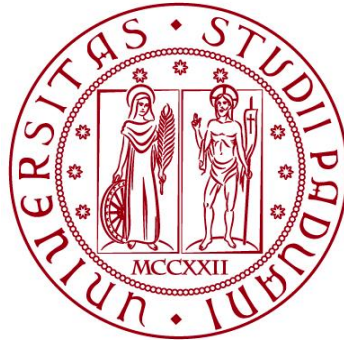


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea magistrale in Biologia Evoluzionistica



TESI DI LAUREA

**Ruolo dei meccanismi di fotoprotezione
nell'acclimatazione di *Physcomitrium patens* a
diverse condizioni di luce**

Relatore: Prof. Alessandro Alboresi

Correlatore: Dott.ssa Claudia Beraldo

Laureanda: Chiara Toffanin

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

1. ABSTRACT.....	5
2. INTRODUZIONE.....	6
2.1 La fotosintesi ossigenica	6
2.1.1 Il trasporto elettronico lineare	8
2.1.2 Il Ciclo di Calvin-Benson	11
2.2 I meccanismi di regolazione della fotosintesi	13
2.2.1 Il quenching non fotochimico (NPQ).....	14
2.2.2 I trasporti elettronici alternativi intorno al PSI: trasporto ciclico e pseudo-ciclico.....	17
2.3 Le briofite.....	20
2.3.1 <i>Physcomitrium patens</i> come organismo modello.....	21
2.3.2 Evoluzione dei meccanismi NPQ e trasporti elettronici alternativi	22
2.3.3 Mutanti fotosintetici di <i>Physcomitrium patens</i> utilizzati nel progetto di tesi	24
3. SCOPO DELLA TESI.....	30
4. MATERIALI E METODI	31
4.1 Materiale vegetale	31
4.1.1 Tecnica di coltura di <i>Physcomitrium patens</i>	31
4.1.2 Mutanti fotosintetici di <i>P. patens</i> utilizzati	33
4.2 Metodi di analisi dell'apparato fotosintetico:	33
4.2.1 Western blot	33
4.2.2 Misure di fluorescenza e assorbimento per determinazione dell'efficienza fotosintetica	37
4.2.3 Determinazione del rapporto stechiometrico PSI/PSII tramite applicazione dell'effetto dell'electrocromismo	41
4.3 Test di crescita.....	43
4.4 Trasformazione di <i>Physcomitrium patens</i>	45
4.4.1 Trasformazione mediante ricombinazione omologa.....	45
4.4.2 Screening delle colonie trasformate tramite RT-PCR.....	48
4.4.3 Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA	48
4.4.4 Polymerase Chain Reaction.....	49

4.4.5	Elettroforesi su gel di agarosio.....	51
5	RISULTATI.....	52
5.1	Acclimatazione del genotipo WT alle tre condizioni di luce.....	52
5.1.1	Analisi della composizione dell'apparato fotosintetico.....	52
5.1.2	Analisi dell'efficienza fotosintetica	54
5.1.3	Analisi della capacità di crescita.....	57
5.2	Acclimatazione dei mutanti dei trasporti elettronici alternativi alle tre condizioni di luce.....	59
5.3	Acclimatazione dei mutanti del meccanismo NPQ nelle tre condizioni di luce	74
5.4	Isolamento del mutante <i>ze psbs</i> KO.....	85
5.4.1	Parziale caratterizzazione del genotipo mutante <i>ze psbs</i> KO	86
5.5	Test di crescita dei genotipi WT e mutanti nelle tre condizioni di luce	92
6.	DISCUSSIONE.....	96
6.1	Capacità di acclimatazione del genotipo WT.....	96
6.2	Acclimatazione dei genotipi mutanti dei trasporti elettronici alternativi intorno al PSI	98
6.3	Acclimatazione dei genotipi mutanti del meccanismo NPQ.....	101
6.4	Parziale caratterizzazione del mutante <i>ze psbs</i> KO	103
6.5	Influenza dei meccanismo fotoprotettivi sulle capacità di crescita durante i processi di acclimatazione alle tre condizioni di luce	104
7.	CONCLUSIONE	106
8.	BIBLIOGRAFIA.....	107

1. ABSTRACT

La fotosintesi ossigenica è un processo attraverso il quale gli organismi fotoautotrofi, acquatici e terrestri, sfruttano l'energia solare per produrre energia chimica, scambiando con l'atmosfera molecole di ossigeno ed anidride carbonica.

Le condizioni ambientali a cui un organismo è esposto in natura possono variare, influenzandone numerosi processi fisiologici. La fotosintesi deve essere finemente regolata per rispondere alle naturali variazioni ambientali, come ad esempio variazioni di intensità luminosa che possono causare la produzione di specie reattive dell'ossigeno, dannose per l'apparato fotosintetico. Gli organismi fotosintetici nel corso dell'evoluzione hanno sviluppato differenti meccanismi fotoprotettivi.

In questo progetto di tesi sono stati studiati il non-photochemical-quenching ed i trasporti elettronici alternativi, due meccanismi fondamentali per proteggere i centri di reazione dell'apparato fotosintetico.

A questo scopo, sono stati effettuati esperimenti di fisiologia e biochimica su piante *wild-type* (WT) e mutanti dell'organismo modello *Physcomitrium patens*. In particolare, è stata analizzata la composizione e l'efficienza del loro apparato fotosintetico durante i processi di acclimatazione a tre diverse condizioni di luce: luce di controllo, alta luce e luce fluttuante.

L'analisi dei risultati di questi esperimenti e le informazioni fornite da studi precedenti mostrano un rimodellamento dell'apparato fotosintetico, e permettono di approfondire il ruolo e l'importanza delle componenti dei meccanismi di fotoprotezione durante i processi di acclimatazione alle diverse condizioni di luce studiate.

2. INTRODUZIONE

2.1 La fotosintesi ossigenica

La fotosintesi è un processo biochimico svolto da organismi fotosintetici che utilizzano la luce per ricavare composti organici stabili ad elevata energia. Questi organismi possono vivere in totale assenza di fonti di sostanza organica, assorbendo esclusivamente ioni e molecole inorganiche dall'ambiente. La loro biomassa viene prodotta nelle vie biosintetiche, le quali richiedono un dispendio energetico sostenuto dalla fase luce-dipendente della fotosintesi ossigenica. Ogni processo di sviluppo, crescita, risposta all'ambiente, sintesi o assorbimento di sostanze, richiede energia che deriva in ultima analisi dalla luce. (Rascio et al., 2021)

Gli organismi fotosintetici sono anche detti organismi fotoautotrofi. In particolare, cianobatteri, alghe e piante terrestri, svolgono la fotosintesi ossigenica, ovvero quell'insieme di reazioni che sfruttano l'energia trasportata dai fotoni per trasformare molecole di anidride carbonica ed acqua in carboidrati, liberando ossigeno come prodotto di scarto. Quest'ultimo è fondamentale per la respirazione di tutti gli organismi aerobi, per mantenere lo strato di ozono necessario a bloccare i raggi UV fuori dall'atmosfera, e per fissare le molecole di CO₂ diminuendo l'effetto serra e producendo biomassa. Per questo motivo gli organismi fotoautotrofi hanno un fondamentale ruolo ecologico. (Barber, 2003; Johnson, 2016)

L'intero processo fotosintetico si può riassumere nella seguente reazione:



Negli organismi eucarioti fotoautotrofi, il processo di fotosintesi ossigenica avviene nel cloroplasto, un organulo cellulare appartenente alla classe dei plastidi. La struttura del cloroplasto è delimitata esternamente da due membrane (Figura 2.1). Nella membrana esterna si inseriscono delle porine che permettono l'ingresso nello spazio intermembrana a ioni, metaboliti e proteine di dimensioni fino a 10KDa. La membrana interna è più selettiva e contiene invece proteine di trasporto che regolano gli scambi tra citosol e stroma, ma anche importanti enzimi delle vie biosintetiche di componenti del cloroplasto. Il mezzo interno al cloroplasto è una matrice definita stroma, nella quale si trovano ribosomi 70s e molecole di DNA plastidiale. Inoltre, nello stroma si trovano enzimi delle vie metaboliche plastidiali: per l'assimilazione di

azoto, zolfo e amido, la sintesi degli acidi grassi, la glicolisi e la via ossidativa dei pentoso-fosfati. Nello stroma è presente un sistema di membrane chiamate tilacoidi, in cui sono contenuti la maggior parte dei complessi proteici coinvolti nelle reazioni luce-dipendenti della fotosintesi. Questo sistema è costituito da membrane lamellari accoppiate a formare sacculi appiattiti, i tilacoidi, al cui interno viene racchiuso il lume tilacoidale. Nei cloroplasti di piante terrestri ed alghe verdi sono presenti due tipologie di tilacoidi: i tilacoidi stromatici che si allungano singolarmente nello stroma, collegando tra loro i tilacoidi granali che si sovrappongono a formare i grana. (Rascio et al., 2021).

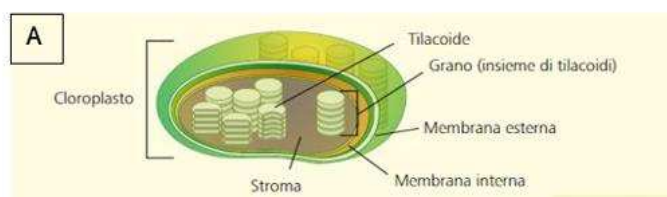


Figura 2.1: Struttura del cloroplasto. L'organulo è delimitato dalla membrana esterna permeabile a molecole di piccole dimensioni, spazio intermembrana e membrana interna impermeabile con proteine trasportatrici selettive. Nello spazio interno si trova lo stroma, una soluzione granulare in cui sono presenti i tilacoidi. Questi ultimi sono lamelle di membrana che si estendono per tutto lo spazio interno al cloroplasto. La membrana tilacoidale in alcune zone si ingrossa e si sovrappone a formare dei dischi, il cui spazio interno costituisce il lume tilacoidale. I dischi tra loro impilati formano i grana. (Barnes and Sue, 2017)

Nella membrana tilacoidale si inseriscono i complessi proteici coinvolti nella fase luce-dipendente. In particolare, la separazione laterale del fotosistema primo (PSI) e del fotosistema secondo (PSII) ha ruolo funzionale per l'efficienza dell'apparato fotosintetico e un ruolo fotoprotettivo per gli eccessi di luce. Il PSI è localizzato marginalmente nei grana tilacoidali, mentre il PSII è presente in entrambi i comparti (Figura 2.2).

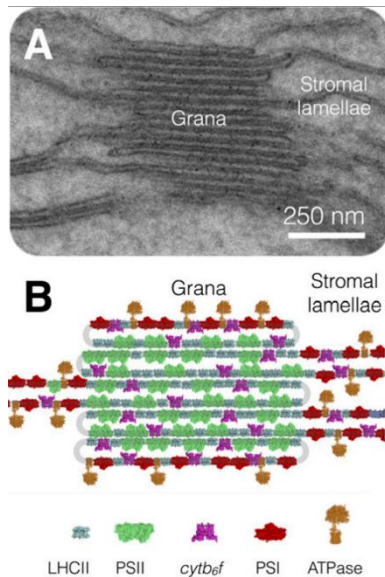


Figura 2.2: Separazione laterale dell'organizzazione dei tilacoidi. A) immagine al microscopio elettronico mostra grana impilati e lamelle stromali non impilate. B) Schema rappresentativo della distribuzione dei principali complessi responsabili del trasporto elettronico e protonico tra i grana impilati e le lamelle stromali. (Johnson, 2016)

L'intero processo della fotosintesi ossigenica si suddivide in due fasi distinte.

In una prima fase luce dipendente, nei tilacoidi, viene sfruttata l'energia dei fotoni per utilizzare una molecola d'acqua come donatore di elettroni, i quali entrano in una catena di trasporto il cui fine è quello di produrre composti ad elevato potere riducente (NADPH). Il trasporto elettronico è accoppiato alla formazione di un gradiente protonico che servirà alla sintesi di molecole ad elevata energia (ATP). In una seconda fase metabolica, nello stroma, ATP e NADPH vengono utilizzati per fissare una molecola di anidride carbonica in un composto organico. (Stirbet et al., 2020)

2.1.1 Il trasporto elettronico lineare

Nella prima fase della fotosintesi ossigenica, viene sfruttato il susseguirsi di una serie di reazioni di ossido-riduzione per produrre composti riducenti: il donatore iniziale di elettroni è l'acqua, il cui potenziale redox è pari a +0,93; l'accettore finale degli elettroni è la molecola di NADP^+ , il cui potenziale redox è pari a -0,32. Il salto energetico che compie l'elettrone, lungo queste reazioni redox, è molto elevato e richiede l'impiego di complessi proteici che formano una catena di trasporto elettronico.

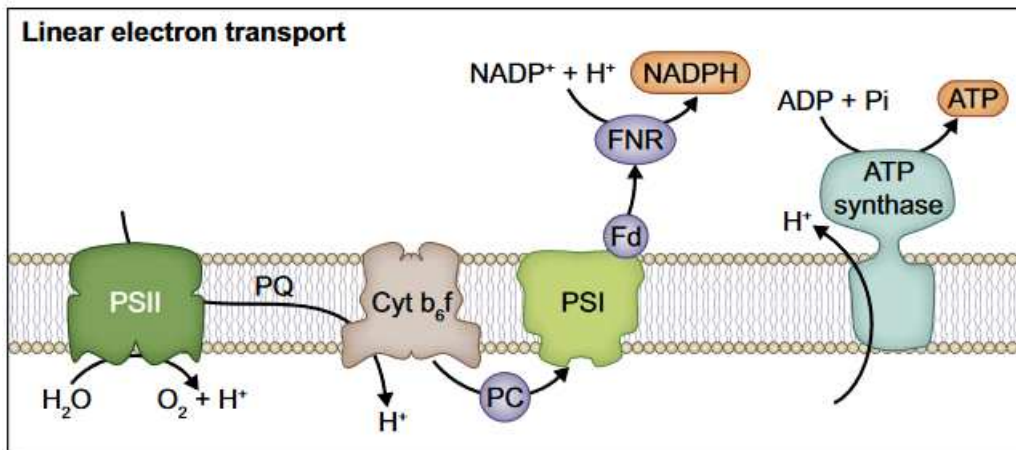


Figura 2.4: Schema dell'organizzazione strutturale dei complessi enzimatici responsabili della fase luce-dipendente della fotosintesi. Da sinistra nella membrana tilacoidale si inserisce il fotosistema secondo (PSII), nel cui centro di reazione è presente una coppia di clorofille (P680), ad esso si associa il complesso evolvente ossigeno (OEC) dal lato lumenale della membrana tilacoidale. Proseguendo verso destra si trova il pool di plastochinoni (PQ/PQH₂), trasportatori elettronici, il complesso del Citocromo (Cyt b₆f) ed un altro trasportatore elettronico indicato come Plastocianina (PC). Segue il fotosistema prima (PSI) nel cui core è presente una coppia di clorofille *a* (P700) a cui sono associate dal lato stromatico la ferredossina (Fd) una proteina ferro-zolfo che prende parte alla catena di trasporto ed una ferredossina-NADP⁺-reduzzasi (FNR) che cede gli elettroni all'accettore finale NADP⁺. Infine, nella membrana tilacoidale si inserisce il complesso ATP sintasi che catalizza la reazione di fotofosforilazione. (Alboresi et al., 2019b)

Il trasporto elettronico lineare (Figura 2.4) coinvolge principalmente il PSII, i plastochinoni (PQ/PQH₂), il complesso del citocromo (Cyt b₆f), la plastocianina (PC), il PSI, la Ferredossina (Fd) e l'enzima Fd-NADPH-reduzzasi (FNR).

Il primo attore della fase luce-dipendente è il PSII, un complesso enzimatico multiproteico che possiede una parte interna formata da un nucleo centrale costituito dal centro di reazione (core), rimasto pressoché invariato durante la sua storia evolutiva (Rascio et al., 2021), ed una coppia di clorofille *a* (P680); esternamente presenta delle antenne periferiche il cui principale componente è il complesso LHCII. L'intera struttura multiproteica è stabilizzata dalla presenza di lipidi tilacoidali. Al PSII, dal lato lumenale della membrana tilacoidale, è associato un complesso evolvente ossigeno (OEC) nel quale avviene la fotolisi dell'acqua.

Il PSII catalizza una reazione di ossidoriduzione in cui, in generale, un elettrone viene ceduto da una molecola d'acqua ed acquisito dal trasportatore plastochinone (Barber, 2003).

Il fotone che arriva trasportato dalla luce viene inizialmente assorbito dal complesso LHCII, il quale ha la capacità di trasmettere l'energia per

risonanza alle molecole di pigmento circostanti, raggiungendo il complesso P680 nel centro di reazione del PSII. Qui avviene la prima separazione di carica, in cui le clorofille P680 si eccitano ed emettono un elettrone, che viene ceduto al primo accettore della reazione, ovvero la feofitina. A questo punto la lacuna elettronica presente sulle clorofille P680⁺, innesca la reazione di fotolisi dell'acqua:



L'ossigeno molecolare prodotto esce dalla cellula per diffusione e viene liberato in atmosfera come prodotto di scarto, gli elettroni vanno a colmare la lacuna positiva presente sul P680⁺, mentre i protoni H⁺ vengono rilasciati nel lume tilacoidale contribuendo alla creazione di un gradiente protonico a cavallo della membrana tilacoidale.

L'elettrone acquisito dalla feofitina viene successivamente ceduto al plastochinone (PQ) che si trova associato al core del PSII, andando a formare un semichinone. Con l'acquisizione di un secondo elettrone, il plastochinolo perde affinità per il sito del PSII cui è associato e permea nella membrana tilacoidale. Il plastochinolo nella sua forma ridotta ha un'elevata affinità per il sito di legame del complesso del citocromo, al quale cede gli elettroni che trasporta tornando nella sua forma ossidata e affine al core del PSII, liberando ulteriori protoni H⁺ nel lume tilacoidale. Il complesso del citocromo (Cyt b₆f) svolge un'attività plastochinolo-plastocianina reduttasica: cede gli elettroni acquisiti alla plastocianina (PC), una metalloproteina idrosolubile, la quale nella sua forma ridotta perde affinità per il sito di legame nel citocromo e diffonde nel lume tilacoidale verso il PSI.

Per svolgere questa funzione, il Cyt b₆f presenta dei centri redox a cui si aggiungono alcune subunità che fungono da siti di legame per i trasportatori elettronici con cui interagisce.

Il PSI è anch'esso un enzima tilacoidale, il cui core è rimasto quasi invariato nell'evoluzione come quello del PSII, ad eccezione della sua forma monomerica presente negli organismi eucarioti, che differisce da quella trimerica nei cianobatteri (Rascio et al., 2021). All'interno del centro di reazione si trovano due clorofille *a* (P700) le quali differiscono dal P680 del PSII per la lunghezza d'onda maggiore della luce che possono assorbire; esternamente sono presenti delle antenne, definite come LHCI. Nel PSI le antenne LHCI assorbono i fotoni e si eccitano, per risonanza lo stato di eccitazione viene trasmesso alle clorofille costituenti il P700 nel core del fotosistema. Qui avviene la reazione di separazione di carica che genera il potenziale redox più negativo conosciuto in natura (Rascio et al.,

2021): le clorofille del P700 nello stato eccitato emettono un elettrone, che viene ceduto alla ferredossina, e la lacuna positiva creata viene colmata dall'elettrone trasportato dalla plastocianina ridotta.

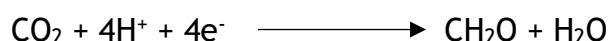
Dal lato stromatico del PSI, alcune subunità sono grado di legare una ferrozolfo proteina detta Ferredossina (Fd), la quale funge da accettore di elettroni nella reazione fotochimica catalizzata dal PSI, ed un enzima che lavora assieme alla Fd definito ferredossina-NADP⁺-reduttasi. La ferredossina ridotta poi cede gli elettroni alla FNR, la quale riduce il NADP⁺ a NADPH.

L'ultimo complesso che agisce in questa fase è l'ATP sintasi, un enzima multiproteico composto di due principali subunità: una componente idrofobica che attraversa la membrana tilacoidale, ed una idrofilica immersa nell'ambiente stromatico. Per la differenza di pH a cavallo della membrana creata dal rilascio di protoni nel lume tilacoidale durante il trasporto lineare che genera una forza proton-motrice (pmf), ed all'attivazione dell'ATP sintasi da parte della luce attraverso la riduzione di un ponte solfuro a due gruppi tiolici, l'ATP sintasi sintetizza molecole di ATP a partire da ADP+Pi. Il complesso accoppia quest'ultima reazione endoergonica indicata come fotofosforilazione, con il passaggio esoergonico pro-gradiente elettrochimico dei protoni dal lume allo stroma (Hisabori et al., 2013).

I prodotti finali della fase luce-dipendente sono quindi molecole di ATP e NADPH, le quali vengono liberate nello stroma e utilizzate per la seconda fase metabolica della fotosintesi.

2.1.2 Il Ciclo di Calvin-Benson

Oltre alle molecole di acqua, tra i reagenti della fotosintesi ossigenica si trovano le molecole di anidride carbonica, utilizzate come substrato per il processo di organizzazione del carbonio comunemente noto come Ciclo di Calvin-Benson. Questo processo si può riassumere nella seguente reazione, il cui funzionamento è legato al trasporto lineare degli elettroni:



I carboidrati (CH₂O) sintetizzati dagli organismi fotoautotrofi possono andare a costituire la biomassa della pianta, oppure essere convertiti in ATP e CO₂ attraverso il processo di respirazione.

Il Ciclo di Calvin-Benson (Figura 2.5) è rimasto pressoché invariato nel corso dell'evoluzione degli organismi fotoautotrofi a partire dai cianobatteri fino alle piante vascolari terrestri. È suddiviso in tre fasi

distinte: la fase di carbossilazione, la fase di riduzione e la fase di rigenerazione.

La prima fase consiste di una reazione catalizzata dall'enzima ribuloso 1,5-bifosfato carbossilasi/ossigenasi (Rubisco) in cui due molecole di CO₂ vengono incorporate a tre molecole di substrato ribuloso 1,5-bifosfato (RuBP) per produrre sei molecole di 3-fosfoglicerato (3PGA).

Durante la seconda fase le sei molecole di 3PGA vengono inizialmente fosforilate dall'enzima fosfoglicerato chinasi (PGK) consumando sei molecole di ATP, e poi ridotte a sei molecole di gliceraldeide-3-fosfato (G3P) dall'enzima gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH). Quest'ultimo utilizza come coenzima il NADPH che, come l'ATP, viene prodotto dalla reazione di fotolisi dell'acqua nella fase luce-dipendente della fotosintesi. L'ADP ed il NADP⁺ prodotti in questa fase vengono in seguito ridotti e ossidati nella terza fase del ciclo. Una delle sei molecole di G3P può a questo punto uscire dal ciclo formando carboidrati nel citoplasma, i quali sostengono la crescita della pianta attraverso la glicolisi e la respirazione mitocondriale.

La terza fase prevede la rigenerazione del RuBP, substrato della Rubisco, a partire dalle cinque restanti molecole di G3P. Questa fase coinvolge l'attività di otto enzimi che catalizzano dieci reazioni, una delle quali consuma tre molecole ATP.

Complessivamente vengono utilizzate 9 molecole di ATP e 6 di NADPH per l'organizzazione di 3 molecole di CO₂, ovvero un rapporto di 1.5 ATP/NADPH per ogni molecola di CO₂. (Johnson, 2016; Rascio et al., 2021)

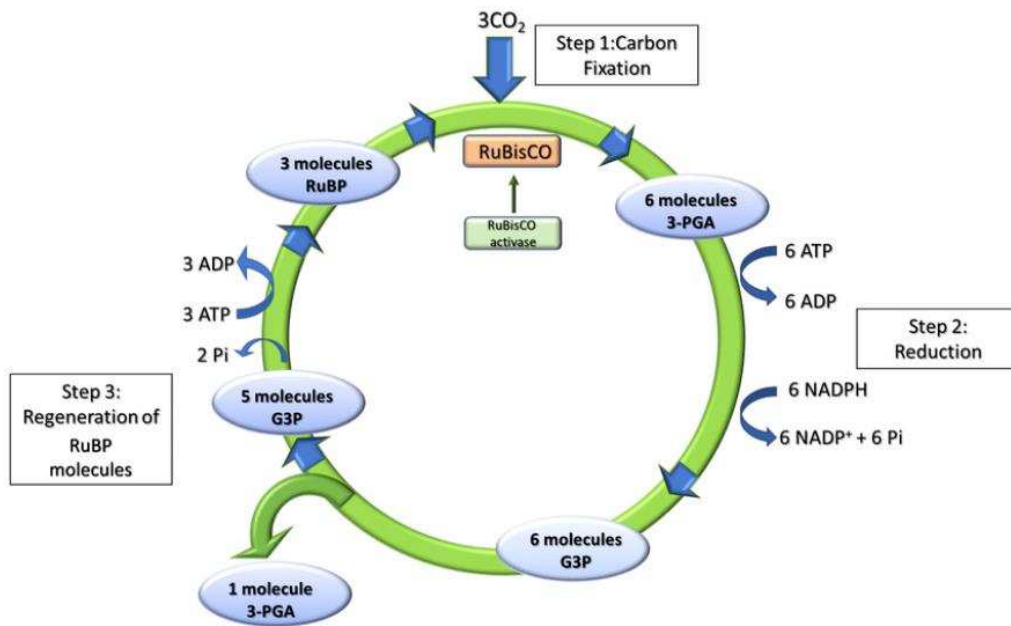


Figura 2.5: Schema generale del Ciclo di Calvin-Benson.
 (Immagine modificata, da www.researchgate.net)

2.2 I meccanismi di regolazione della fotosintesi

L'apparato fotosintetico lavora a pieno regime quando le condizioni ambientali sono ottimali. In natura, fattori come luce, temperatura o disponibilità idrica, essenziali per la sopravvivenza di organismi fotoautotrofi, possono presentarsi in quantità e qualità non ottimali per il funzionamento della fotosintesi. Gli organismi fotoautotrofi, nel corso dell'evoluzione, hanno sviluppato dei meccanismi che permettono di far fronte alla variazione di questi fattori. La diminuzione della temperatura, ad esempio, rende le membrane tilacoidali meno fluide, impedendo una normale permeazione dei plastochinoni verso il complesso del citocromo e causando un rallentamento del trasporto elettronico lineare. Allo stesso tempo, un eccesso di luce può provocare una maggior riduzione dei plastochinoni con conseguente produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) responsabili di danni ossidativi a diverse macromolecole biologiche, tra cui le membrane tilacoidali e le proteine dell'apparato fotosintetico. Gli organismi fotoautotrofi hanno sviluppato dei meccanismi per far fronte a queste variazioni ambientali. In particolare, possono dissipare l'energia luminosa assorbita in eccesso sotto forma di calore, oppure attivare

percorsi alternativi per gli elettroni per evitare una sovrariduzione dei fotosistemi.

I meccanismi di fotoprotezione svolgono ruoli importanti per entrambi i fotosistemi: il PSI è meno sensibile agli stress rispetto al PSII, ma essendo collegato ad esso tramite il complesso del citocromo, viene danneggiato da tutte quelle condizioni in cui gli elettroni in arrivo dal PSII eccedono la capacità di acquisizione da parte degli accettori del PSI (Fd_{ox} e $NADP^+$). Inoltre, nelle piante sono attivi meccanismi di riparazione dei danni subiti dalle subunità del PSII; se invece a subirli sono le subunità del PSI, queste verranno smaltite da parte della cellula, e non riparate. (Rascio et al., 2021)

Nei seguenti paragrafi verranno approfonditi due di questi meccanismi fotoprotettivi: il quenching non fotochimico ed i trasporti elettronici alternativi.

2.2.1 Il quenching non fotochimico (NPQ)

Quando la clorofilla (Chl) assorbe un fotone, passa da uno stato energetico minore (stato fondamentale) ad uno maggiore (stato eccitato). Il ritorno allo stato fondamentale può avvenire in diversi modi. La conversione di energia luminosa in potenziale redox avviene durante la reazione di separazione di carica nel core del PSII, porta alla produzione di plastoquinone ridotto, e viene definita *quenching* fotochimico. Le condizioni ambientali che possono interferire con questo processo, come basse temperature ed eccessi di luminosità, causano una sovrariduzione del pool di plastoquinoni. Questo può portare ad un aumento dell'eccitazione delle clorofille associate al PSII, con conseguente produzione di ROS e compromissione dell'efficienza fotosintetica.

All'aumentare dell'intensità luminosa ambientale, i complessi antenna LHCI convogliano un numero sempre maggiore di fotoni verso il centro di reazione, aumentando anche il numero di elettroni in uscita dal PSII, fino al raggiungimento della capacità massima della catena di trasporto lineare. Quando l'energia luminosa eccede questa capacità, il pool di plastoquinoni si trova completamente in forma ridotta ed incapace di accettare ulteriori elettroni, che restano quindi all'interno del PSII. In queste condizioni, nel centro di reazione, avviene una reazione a ritroso di ricombinazione di carica, in cui l'elettrone ritorna dalla feofitina al P680, portandolo nella sua forma eccitata di tripletto ($^3P680^*$). Quest'ultimo, decadendo, cede la sua energia all'ossigeno, che va a formare l'ossigeno singoletto (1O_2), una specie molto reattiva che può provocare danni al centro di reazione.

Il quenching non fotochimico (Figura 2.6) è la principale via con cui il centro di reazione viene protetto dai danni ossidativi, e prevede la dissipazione dell'energia in eccesso sotto forma di calore. I principali meccanismi che lo compongono sono il quenching dell'energia radiante (qE), il quenching zeaxantina-dipendente (qZ), il quenching fotoinibitorio (qI), il quenching dovuto al movimento dei cloroplasti (qM) ed il quenching dell'antenna (qH). (Malnoë, 2018; Kaiser et al., 2019)

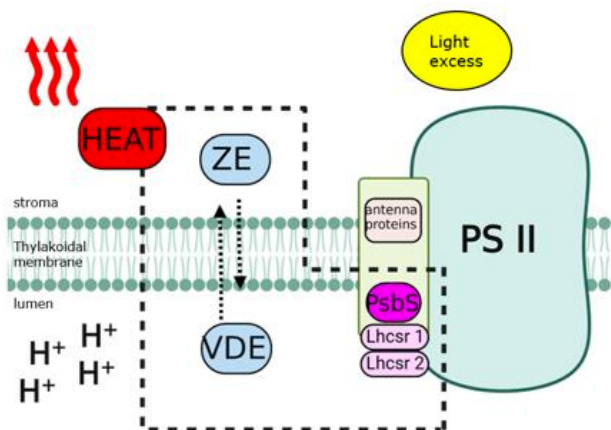


Figura 2.6: Schema dei meccanismi coinvolti nel processo NPQ. Associato al PSII si trova dal lato stromatico il complesso antenna LHCII che convoglia i fotoni nel centro di reazione. Dal lato lumenale vi è associata una proteina PsbS e due complessi proteici LhcsR1 e LhcsR2 (light harvesting complex stress related). Dal lato stromatico della membrana tilacoidale si trova la zeaxantina, un pigmento prodotto dal ciclo delle xantofille, con ruolo di quencher nell'NPQ, che viene convertita tramite l'enzima zeaxantina epossidasi (ZE) in violaxantina. Quest'ultima viene riconvertita in zeaxantina dall'enzima violaxantina de-epossidasi (VDE). (Created with: Biorender.com)

Le componenti qE e qZ dell'NPQ sono regolate dalla differenza di pH (ΔpH) a cavallo della membrana, più precisamente dalla diminuzione del pH lumenale. Nella membrana tilacoidale sono presenti canali ionici in grado di controbilanciare, a livello di cariche ioniche, l'immissione di protoni nel lume, grazie alla traslocazione di ioni Mg^{2+} , K^+ e Cl^- . Alla diminuzione del pH lumenale corrisponde un aumento della differenza di potenziale (ΔE) a cavallo della membrana tilacoidale. I canali mitigano il ΔE traslocando ioni Mg^{2+} , K^+ e Cl^- per controbilanciare l'aumento di cariche positive nel lume. La diminuzione del ΔE rallenta il flusso di protoni attraverso l'ATP sintasi, risultando in un'ulteriore acidificazione dell'ambiente interno ai tilacoidi. Le componenti qE e qZ prevedono, in generale, la partecipazione all'NPQ delle proteine PsbS, LhcsR, e della xantofilla zeaxantina (Figura 2.6). PsbS è una proteina dimerica che non lega pigmenti, integrale della membrana tilacoidale ed appartenente alla famiglia delle LHC. Possiede

due residui acidi di glutammato protrudenti nel lume tilacoidale, che alla diminuzione del pH lumenale, vengono protonati. Quando protonata, la proteina PsbS monomerizza, ed in questa forma è in grado di legare le antenne LHCII inducendone una conformazione adatta alla dissipazione di energia sotto forma di calore, che ne comporta il distacco dal PSII (Li et al., 2002). Allo stesso modo, le proteine LhcsR possiedono residui acidi esposti dal lato lumenale della membrana tilacoidale, che in concentrazioni elevate di protoni vengono ridotte e legano clorofille *a* e xantofille. L'attivazione di PsbS ed LhcsR è un processo molto veloce che richiede pochi secondi. (Croce and Van Amerongen, 2014)

PsbS non agisce come dissipatore attivo, a differenza delle LhcsR, ma come regolatore allosterico ed attivatore del quenching. (Gerotto et al., 2011).

Nel corso dell'evoluzione, queste proteine sono state sottoposte a selezione, quindi non tutte sono presenti in ogni organismo fotosintetico: PsbS è una componente condivisa da tutti gli organismi fotoautotrofi, le LhcsR sono presenti in briofite ed alghe verdi ma assenti nelle piante terrestri, nei cianobatteri tutto il processo di NPQ è innescato da una cromoproteina che lega un carotenoide (OCP: orange carotenoid protein). (Alboresi et al., 2010; Alboresi et al., 2019b)

Un altro attore dell'NPQ è la zeaxantina, un pigmento prodotto nel ciclo delle xantofille (Figura 1.7) a partire dalla violaxantina grazie all'enzima violaxantina de-epossidasi attivato da bassi livelli di pH nel lume. La sua funzione è tutt'ora discussa, potrebbe avere un ruolo diretto come quencher per dissipare energia termica, o potrebbe avere la funzione di legare altri pigmenti che effettuano il quenching non fotochimico.

La sua sintesi, dal momento in cui viene percepito l'aumento di protoni nel lume tilacoidale, richiede qualche minuto ed è quindi meno rapida dell'azione di PsbS e LhcsR. Nelle briofite la zeaxantina ha un ruolo significativo legandosi anche alle proteine LhcsR aumentando la loro attività di quenching. (Pinnola et al., 2013)

Quando il pH lumenale aumenta, la zeaxantina viene riconvertita in violaxantina dall'enzima zeaxantina epossidasi (Figura 2.7) e la sua attività di quencher termina.

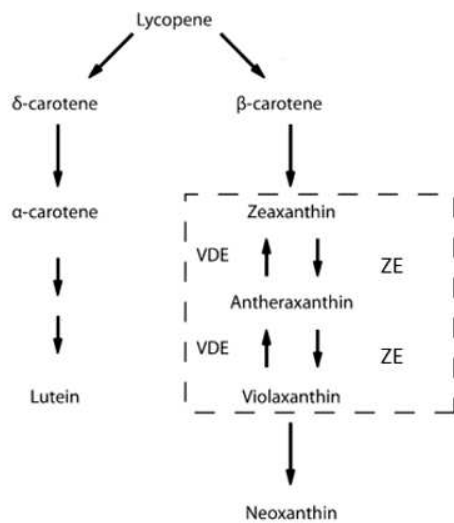


Figura 2.7: Schema della via di biosintesi dei carotenoidi. All'interno di questa via è presente il ciclo delle xantofille. Da violaxantina viene prodotta anteraxantina e zeaxantina grazie all'enzima violaxantina de-epossidasi (VDE); la zeaxantina viene riconvertita in anteraxantina e violaxantina grazie all'enzima zeaxantina epossidasi (ZE). (modificato, da: Pinnola et al., 2013)

2.2.2 I trasporti elettronici alternativi intorno al PSI: trasporto ciclico e pseudo-ciclico

Come il PSII, anche il PSI può subire danni ossidativi. In condizioni di alta luce, basse temperature e stress idrico, si verifica uno sbilanciamento tra reazioni foto-dipendenti e reazioni metaboliche di fissazione del carbonio con conseguente accumulo di elettroni da parte degli accettori finali del PSI, ovvero Fd_{rid} e NADPH. Questo causa la formazione di specie reattive dell'ossigeno, le quali portano ad un'immediata degradazione del core del PSI e della ferredossina.

Un accumulo di elettroni sul P700 innesca una reazione a ritroso di ricombinazione di carica e quindi una diminuzione dell'eccessivo potenziale di riduzione del fotosistema.

Per la fotoprotezione del PSI, vengono messi in atto meccanismi che detossificano le specie reattive dell'ossigeno e diminuiscono il sovraccarico elettronico sugli accettori finali del PSI. Per quest'ultimo scopo interviene il flusso alternativo degli elettroni intorno al fotosistema. (Storti et al., 2020)

Nelle membrane tilacoidali, oltre al trasporto elettronico lineare, si realizza quello ciclico che coinvolge solo il PSI ed ha come scopo principale quello di incrementare la quantità di ATP prodotta. La fissazione di una molecola di anidride carbonica nel ciclo di Calvi-Benson impiega 3 molecole di ATP e 2 di NADPH, con un rapporto di 1,5 ATP/NADPH (Finazzi et al., 1999). Il solo trasporto lineare raggiunge circa 1,28 ATP/NADPH (Rascio et al., 2021), insufficiente a sostenere la fissazione. Il flusso ciclico è di conseguenza necessario per soddisfare la richiesta energetica della fissazione, senza considerare che le molecole di ATP sono essenziali anche

per altre vie biosintetiche e la respirazione cellulare. Il ruolo fotoprotettivo del trasporto ciclico è quindi secondario rispetto a quello fotofosforilativo.

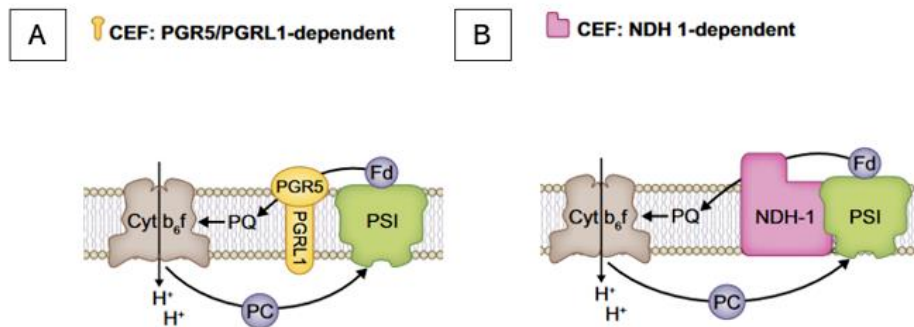


Figura 2.8: Schema delle due vie del trasporto elettronico ciclico (CEF: cyclic electron flow) intorno al PSI: A) gli elettroni in uscita dal PSI passando alla ferredossina Fd, la quale li cede a sua volta al complesso PGR5/PGRL1. Questo ha attività Fd-PQ reduttasica e li cede al pool di plastochinoni; da qui, rientrano nella catena di trasporto a partire dal Cyt b₆f. B) gli elettroni dalla Fd vengono ceduti al complesso enzimatico NDH-1 che a sua volta li cede al pool di plastochinoni, come nella via PGR5/PGRL1. (Alboresi et al., 2019b)

Si conoscono attualmente due vie alternative del trasporto ciclico (Figura 2.8). La prima via prevede che due elettroni, provenienti dalla ferredossina ridotta, tornino al pool di plastochinoni attraverso due proteine con attività Fd-PQ reduttasica. Queste proteine sono PGR5 (proton gradient regulation 5) e PGRL1 (PGR5-like 1), di cui la prima si colloca sul lato stromatico della membrana tilacoide, mentre la seconda è una proteina transmembrana. Insieme, formano un complesso associato al PSI, presente in tutti gli organismi eucarioti fotoautotrofi, che opera il trasporto ciclico di elettroni.

I plastochinoni, riducendosi a plastochinoli e riossidandosi nel ciclo PQ-PQH₂, cedono nuovamente gli elettroni al Cyt b₆f e rilasciano protoni nel lume tilacoide, andando ad alimentare il ΔpH necessario alla sintesi di ATP.

La seconda via conosciuta, anch'essa condivisa da tutti gli organismi fotoautotrofi, si basa sull'attività di un complesso enzimatico multimerico transmembrana, indicato come NDH-1 (NADH deidrogenasi), che si trova strettamente associato al PSI ed ha un'elevata affinità per la ferredossina ridotta. La sua attività è quella di accoppiare il trasferimento di elettroni dalla Fd_{rid} ai plastochinoni, con conseguente traslocazione di protoni nel lume. Questa via risulta avere un ruolo minore nel trasporto ciclico

rispetto a quella di PGR5/PGRL1 (Alboresi et al., 2019b; Rascio et al., 2021).

In aggiunta alle vie cicliche di trasporto elettronico, a partire dal PSI sono presenti anche trasporti pseudo-ciclici (Figura 2.9).

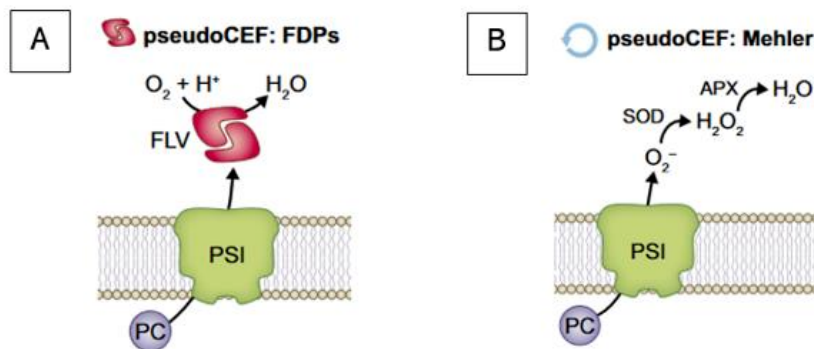


Figura 2.9: Schema delle due vie di trasporto pseudo-ciclico (pseudoCEF: pseudo-cyclic electron flow) associate al PSI: A) gli elettroni in uscita dal PSI vengono utilizzati dalla proteina dimerica non tilcoideale FLV, la quale li utilizza in una reazione di riduzione dell'ossigeno molecolare ad acqua. B) trasporto pseudo-ciclico degli elettroni che coinvolge la reazione di Mehler, in cui un accumulo di elettroni nel PSI comporta la formazione del radicale superossido (O_2^-). Questo, viene convertito in acqua ossigenata (H_2O_2) tramite l'enzima superossido dismutasi (SOD), e poi in acqua (H_2O) dall'enzima ascorbato perossidasi (APX). (Alboresi et al., 2019b)

Uno di questi coinvolge la cosiddetta reazione di Mehler o ciclo acqua-acqua (Figura 2.9 B). L'accumulo di elettroni da parte degli accettori del PSI, in particolare sulla ferredossina, favorisce una reazione redox tra Fd_{rid} e ossigeno molecolare, con formazione del radicale superossido (O_2^-). Il radicale superossido reagisce a sua volta con una molecola di acqua formando molecole di acqua ossigenata, grazie all'azione della superossido dismutasi (SOD), un metalloenzima associato al PSI. La molecola di H_2O_2 , reagendo con i centri ferro-zolfo ridotti della ferredossina porta alla formazione dello ione ossidrilico ($\cdot OH$), una specie estremamente dannosa che provoca la distruzione irreversibile dei centri stessi della ferredossina e anche del core del PSI. In condizioni di sovraccarico elettronico sul PSI, se l'acqua ossigenata non venisse prontamente detossificata vi sarebbe dunque un enorme danno all'apparato fotosintetico. A questo scopo interviene un ulteriore enzima indicato come ascorbato perossidasi (APX), la cui attività è quella di ridurre l' H_2O_2 ad H_2O utilizzando come donatore di elettroni l'ascorbato (AA). Questo meccanismo viene definito pseudo-ciclico perché coinvolge entrambi i fotosistemi, ma interrompendosi con la formazione di acqua, apporta solamente un incremento di gradiente protonico per la

formazione di ATP ai fini fotosintetici, e non interviene nella formazione di NADPH.

Un'altra via di trasporto pseudo-ciclico, a scopo fotoprotettivo, è quella che coinvolge un particolare tipo di enzima della famiglia delle FDP (Flavodiiron proteins), ovvero la FLV (type-C flavodiiron proteins) (Figura 2.9 A). Questa è presente nella maggior parte dei gruppi filogenetici di organismi fotoautotrofi al di fuori delle angiosperme e si presenta in forma di eterodimero non integrale alla membrana tilacoidale (Gerotto et al., 2016). FLV presenta un dominio C-terminale con attività NADPH-flavina ossidoreduttasica, grazie alla quale è in grado di ricevere elettroni dalla Fd_{rid} e cederli ad una molecola di ossigeno, riducendolo ad acqua. (Alboresi et al., 2019a). L'azione di deviazione degli elettroni dal NADPH verso le molecole di ossigeno è massiva ed immediata, ed evita la dannosa sovrariduzione degli accettori del PSI quando gli enzimi del ciclo di Calvin-Benson non sono ancora attivi. La sua attività però risulta essere temporanea, perché si esaurisce all'attivazione degli enzimi della fissazione del carbonio. (Gerotto et al., 2016; Storti et al., 2020; Rascio et al., 2021)

2.3 Le briofite

Le attuali Briofite sono considerate come le specie più strettamente imparentate con gli organismi vegetali che hanno colonizzato l'ambiente terrestre. Rappresentando la transizione dalla vita acquatica a quella terrestre, collegano a livello evolutivo le tracheofite alle loro antenate alghe acquatiche.

Il loro status di taxon terrestre più antico è stato raramente contestato. Tuttavia, la presenza di record fossili di queste piante scarseggia, ma la loro diffusione e colonizzazione durante l'alto Ordoviciano (Figura 2.10) è sostenuta dal ritrovamento di spore microfossili. (Lang et al., 2008)

Le Briofite sono uno dei lineages delle Embriofite maggiormente diversificato. Si trovano in tutti i continenti e occupano molte nicchie ecologiche, mostrano strutture e meccanismi fisiologici adattativi peculiari, come la tolleranza al disseccamento, la presenza di gametofiti elaborati, assorbimento di acqua e nutrienti altamente efficienti, o cicli di vita specializzati, i quali hanno permesso alle loro strette antenate il passaggio dalla vita acquatica a quella terrestre con poca competizione. (Renzaglia et al., 2007)

Per questi motivi sopra esposti, le briofite sono degli organismi estremamente interessanti, il cui studio permette una più approfondita

comprensione del regno vegetale ed i meccanismi fotosintetici che ne permettono il successo evolutivo.

2.3.1 *Physcomitrium patens* come organismo modello

Physcomitrium patens (Hedw.) è un muschio monoico appartenente alla classe Bryopsida delle Briofite. Il suo ciclo vitale (Figura 2.12) è breve, della durata di circa tre mesi, ed è costituito da due fasi.

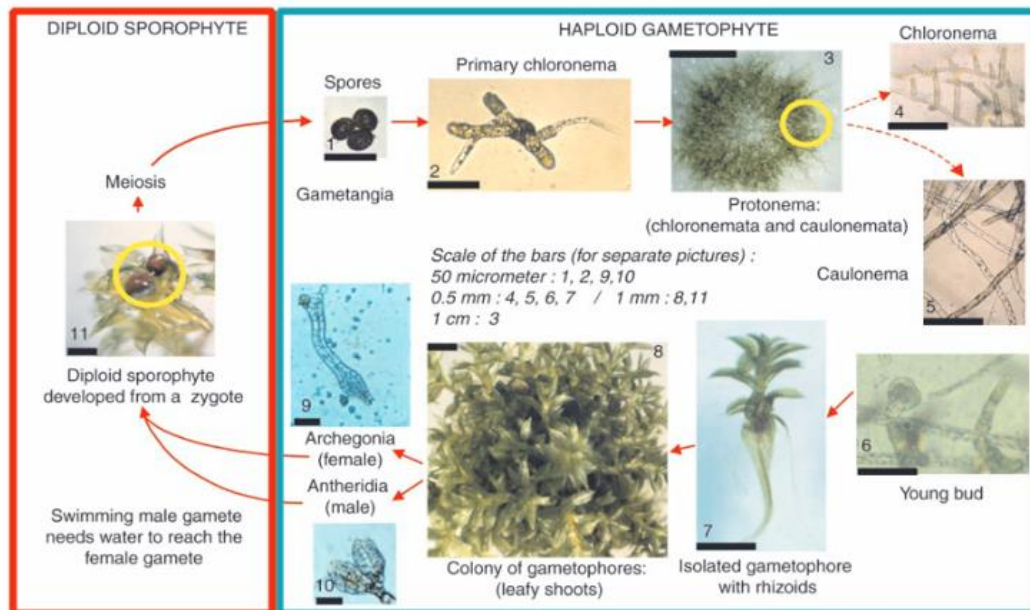


Figura 2.12: Schema del ciclo vitale di *Physcomitrium patens*. La spora è la prima fase aploide del ciclo vitale. Quando germina produce il cloronema primario, un tessuto fotosintetico che per divisione cellulare produce il protonema (formato da cloronema e caulinema). Dal protonema si sviluppa il gametoforo, il quale porta entrambi gli organi sessuali all'interno dei quali si trovano i gameti. I gameti maschili necessitano di acqua per raggiungere quelli femminili. Dopo la riproduzione viene prodotto uno zigote dal quale si sviluppa uno sporofito, che rappresenta l'unica fase diploide del ciclo vitale di *P. patens*. Infine, per meiosi lo sporofito produce le spore. (Lang et al., 2008)

La fase aploide ed autotrofa ha inizio con una spora la cui germinazione necessita di luce e dà origine ad un cloronema primario. Questo, per divisione cellulare produce un tessuto talloso composto di cellule di cloronema e caulinema, indicato come protonema. Una caratteristica interessante di *P. patens* è il fatto che già allo stadio di protonema è possibile osservare alcune risposte fisiologiche a variazioni ambientali, come ad esempio l'eccesso di luce. Da questo tessuto, viene in seguito prodotto un gametoforo, costituito da uno stelo portante foglie che si sviluppa per crescita apicale delle cellule del cloronema, e da rizoidi che si sviluppano per differenziazione del caulinema. Dal gametoforo vengono prodotti gameti femminili (sessili) e maschili (mobili); questi ultimi

richiedono la presenza di acqua per arrivare ai primi e dar luogo ad una riproduzione sessuata. Qui ha inizio la breve fase diploide, con la generazione di uno zigote, da cui si sviluppa per divisione cellulare uno sporofito. Per meiosi vengono infine prodotte le spore aploidi, da cui riparte tutto il ciclo vitale. (Lang et al., 2008)

P. patens è un organismo che vive in zone di terreno umido perenne o stagionale a bassa o moderata altitudine, come in campi, sentieri, pianure di allagamento o bordi di risaie. Infatti, come gli altri muschi, dipende fortemente dalla presenza costante di acqua, ma può sopportare brevi periodi di disseccamento. (Rensing et al., 2020)

Il breve ciclo vitale di *P. patens*, unitamente alle caratteristiche sopra citate, lo rendono un organismo modello di ottimo utilizzo per studi biologici, in quanto è possibile osservarne interamente lo sviluppo da spora, a protonema, a gametoforo in poco tempo.

Il genoma di *P. patens* è stato completamente sequenziato nel 2008 (Lang et al., 2008), la sua lunghezza totale è stimata essere di 480Mb distribuite in 27 cromosomi.

Il potenziale di *P. patens* come organismo modello è dato anche dalla semplicità con cui è possibile effettuare trasformazioni ed ottenere mutanti. È stato il primo organismo multicellulare eucariotico terrestre ad essere trasformato (Schaefer et al., 1991), con un successo dell'1% circa, paragonabile a quello della trasformazione di *Saccharomyces cerevisiae*. L'integrazione di DNA estraneo in sequenze target del genoma di *P. patens* avviene prevalentemente per ricombinazione omologa.

Recenti studi hanno dimostrato anche ottimi risultati in termini di efficienza di trasformazione, delle nuove tecnologie di CRISPR-CAS9 e base editing nell'organismo *Physcomitrium patens* (Beraldo et al., 2023). Queste tecniche permettono la generazione di mutanti con sufficiente facilità da rendere questa operazione routinaria, diminuendo significativamente l'effetto negativo del posizionamento stocastico delle mutazioni nel genoma che caratterizza alcuni altri metodi di mutagenesi.

2.3.2 Evoluzione dei meccanismi NPQ e trasporti elettronici alternativi

A partire dal periodo geologico del Devoniano, circa 400 milioni di anni fa, un diversificato gruppo di organismi vegetali acquatici ha colonizzato l'ambiente terrestre.

La diversità tra le due condizioni di vita ha comportato lo sviluppo di particolari adattamenti per far fronte ai cicli di siccità e disponibilità idrica tipici dell'ambiente terrestre rispetto a quello acquatico di

provenienza, quindi maggior concentrazione atmosferica di ossigeno (un inibitore fotosintetico) e minore di anidride carbonica (substrato per il ciclo di Calvin-Benson). L'ambiente terrestre inoltre presenta una maggior intensità luminosa, in quanto la luce non viene assorbita dalla colonna d'acqua come in quello acquatico, e la forma sessile acquisita dagli organismi colonizzatori impedisce la fuga da eventuali fattori ambientali avversi.

La risposta più rapida ad un eccesso di intensità luminosa è l'NPQ (3.2.1: Il quenching non fotochimico): un processo che coinvolge la proteina PsbS nelle piante vascolari, e LhcsR nelle alghe acquatiche; l'unico organismo per il quale è stata dimostrata la presenza ed il coinvolgimento di entrambe queste proteine nell'NPQ è il muschio *Physcomitrium patens*.

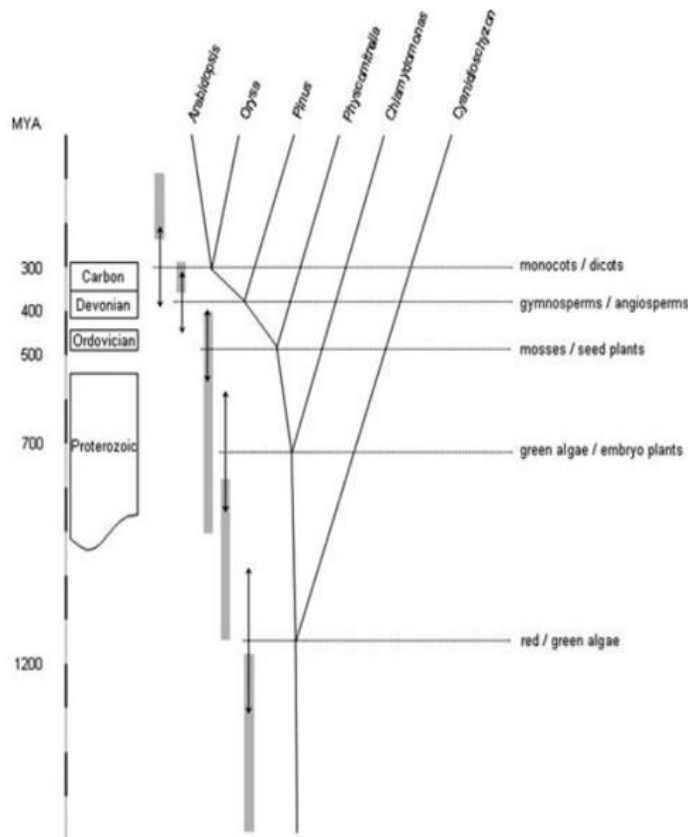


Figura 2.10: Cladogramma delle prime fasi dell'evoluzione degli organismi eucarioti fotosintetici, costruito con il metodo del molecular clock.

I rettangoli in grigio indicano i range temporali forniti dalla letteratura scientifica, utilizzati come priors nella costruzione dell'albero; le linee tratteggiate indicano il tempo stimato di divergenza; le frecce indicano la deviazione standard.

La costruzione del cladogramma è basata su dataset trascrittomici di *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Pinus taeda*, *Physcomitrium patens*, *Chlamydomonas reinhardtii* e *Cyanidioschyzon merolae*, rappresentati i maggiori phyla di eucarioti fotosintetici.

(Zimmer et al., 2007)

Lo studio della filogenesi di questi organismi (Figura 2.10) e la comparazione dei meccanismi di attivazione del processo NPQ, suggeriscono che l'NPQ dipendente dalla proteina PsbS sia comparso prima della perdita del meccanismo dipendente dall'LhcsR. (Alboresi et al., 2010)

Oltre al meccanismo del quenching non fotochimico, gli organismi fotoautotrofi presentano una regolazione del trasporto elettronico che devia gli elettroni in trasporti ciclici e pseudo-ciclici. Questi sono presenti in tutti i phyla fotosintetici, ma distribuiti in maniera disomogenea, suggerendone il cambiamento e la selezione durante processi di adattamento e colonizzazione di nuove nicchie ecologiche.

Il trasporto ciclico mediato dal complesso PGR5/PGRL1 è stato identificato in piante vascolari, briofite, alghe verdi ed in alcuni cianobatteri; quello mediato dal complesso NDH-1 è presente in cianobatteri e briofite, mentre è stato identificato solo in alcune famiglie di clorofite e piante vascolari. Il trasporto pseudo-ciclico che coinvolge la reazione di Mehler è stato identificato in tutti i gruppi filogenetici; quello mediato dal complesso FLV è presente in tutti anch'esso, escluse le angiosperme finora studiate (Alboresi et al., 2019b). (Figura 2.11)

	PGR5/ PGRL1	NDH-1	FLV	Mehler
Cyanobacteria	Yellow	Red	Red	Blue
Chlorophytae	Yellow	Red	Red	Blue
Bryophytes	Yellow	Red	Red	Blue
Gymnospermae	Yellow	Red	Red	Blue
Angiospermae	Yellow	Red	White	Blue

Figura 2.11: Distribuzione dei trasporti ciclici (PGR5/PGRL1 e NDH-1) e pseudo-ciclici (FLV e Mehler) nei principali gruppi filogenetici degli organismi fotoautotrofi. Il riquadro pieno indica la presenza del meccanismo in tutte le famiglie appartenenti al gruppo finora analizzate; il riquadro a metà indica la presenza in alcune famiglie appartenenti al gruppo.

Da questi risultati si evince che le briofite rappresentano un'ottima fonte di studio di questi meccanismi fotoprotettivi, in quanto sono l'unico gruppo filogenetico che presenta tutte le componenti necessarie al loro funzionamento.

2.3.3 Mutanti fotosintetici di *Physcomitrium patens* utilizzati nel progetto di tesi

Grazie alla semplicità con cui si possono ottenere, nel corso del tempo, sono stati isolati numerosi mutanti del muschio *Physcomitrium patens*. Per il presente progetto di tesi, le analisi sono state effettuate su genotipi *wild type* (WT) e mutanti del meccanismo NPQ e dei trasporti alternativi,

di *P. patens* ecotipo Gransden. Seguirà una breve descrizione di alcuni aspetti del fenotipo dei mutanti utilizzati.

Genotipo	Reference	Fenotipo
<i>vde</i> KO (npq1)	<i>Pinnola et al. 2013</i>	Assenza di qZ
<i>zep</i> KO (npq2 o aba1)	<i>Takezawa et al. 2014</i>	Bassa tolleranza a condizioni iperosmotiche
<i>psbs lhcsr1 lhcsr2</i> KO (npq4)	<i>Alboresi et al. 2010</i>	Assenza di qE
<i>psbs</i> KO	<i>Alboresi et al. 2010</i>	~60% qE rispetto a WT
<i>flvA flvB</i> KO	<i>Unpublished</i>	
<i>pgrl1</i> KO	<i>Kukuczka et al. 2014</i>	crescita ridotta rispetto a WT in condizioni di anossia
<i>pgrl1 ndhm</i> KO	<i>Storti et al. 2019</i>	crescita ridotta rispetto a WT in condizioni di luce stressanti
WT		

a. MUTANTI DEL MECCANISMO NPQ

Il mutante *vde* KO è stato isolato e caratterizzato ai fini dello studio della dipendenza del meccanismo NPQ dalla xantofilla zeaxantina. In particolare, il mutante *vde* KO manca della proteina violaxantina de-epossidasi, responsabile della conversione della violaxantina in zeaxantina. Grazie a questa mancanza, è possibile osservare la differenza di attivazione dell'NPQ tra genotipo WT e genotipo mutato, approfondendo l'importanza della zeaxantina in questo meccanismo. Lo studio (Pinnola et al., 2013) evidenzia che la sintesi di zeaxantina è fondamentale per la fotoprotezione in *P. patens*, infatti il mutante *vde* KO mostra un danno nelle capacità di acclimatazione a condizioni di alta luce e un'attivazione del meccanismo NPQ compromessa (Figura 2.13).

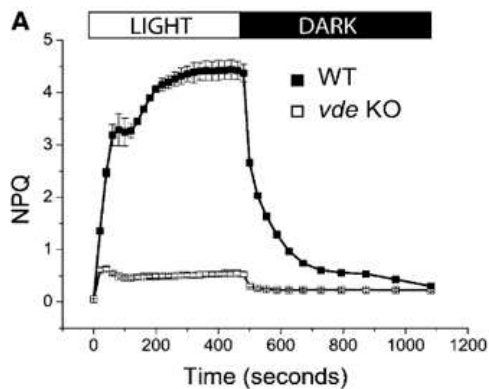


Figura 2.13: Misura dell'induzione dell'attivazione del meccanismo NPQ ad un'intensità di luce attinica di $830\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ su genotipi WT (quadrato nero) e vde KO (quadrato bianco) di *P. patens*.

Il mutante ze KO, privo dell'enzima zeaxantina de-epossidasi, è stato isolato nello studio (Takezawa et al. 2014) al fine di analizzare l'effetto dell'acido abscissico (ABA) endogeno nelle risposte a stress osmotico e di diminuzione delle temperatura in *P. patens*. La sintesi dell'ABA viene catalizzata dall'enzima ZE, che produce anteraxantina e zeaxantina. L'eliminazione dell'enzima ha permesso di osservare l'effetto della mancanza di ABA endogeno, confrontandolo con il fenotipo del WT. Da questo studio si evince l'importanza dell'acido abscissico nell'acclimatazione a condizioni iperosmotiche, cui i mutanti ze KO mostrano una bassa tolleranza; mentre l'effetto delle basse temperature, sembra essere poco incisivo nella crescita e sopravvivenza del mutante ze KO.

Attualmente in letteratura non sono presenti studi che analizzino questo mutante dal punto di vista delle sue capacità di fotoprotezione; data la mancanza dell'enzima ZE, questo mutante accumula in maniera costitutiva la zeaxantina, la quale ha un ruolo cruciale nel processo NPQ. Per questa ragione, in questo progetto di tesi sono state analizzate le capacità fotosintetiche del mutante ze KO. Infine è stato studiato il mutante *psbs lhcsr1 lhcsr2* KO ed il mutante *psbs* KO isolati nello studio (Alboresi et al., 2010). Entrambi questi mutanti hanno mostrato un difetto nella capacità di attivazione dell'NPQ.

In particolare, il mutante *psbs lhcsr1 lhcsr2* KO, mancando di tutte e tre le proteine triggers ha mostrato una quasi totale incapacità di attivazione del meccanismo di fotoprotezione. (Figura 2.14)

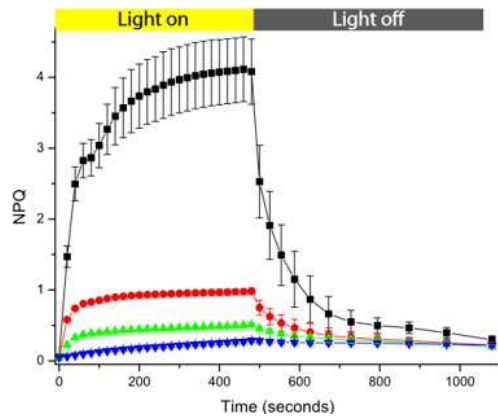


Figura 2.14: cinetica NPQ misurata con luce attinica di $830\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ su genotipi WT (nero), *lhcsr1* KO (rosso), *psbs lhcsr1* KO (verde), *psbs lhcsr1 lhcsr2* KO o *npq4* (blu). (Alboresi et al., 2010)

Invece, il mutante *psbs* KO ha mostrato anch'esso una diminuzione nella capacità di attivazione dell'NPQ rispetto al genotipo WT, ma grazie alla presenza delle proteine LhcsR1 e LhcsR2 è comunque in grado di produrre un NPQ significativo. (Figura 2.15)

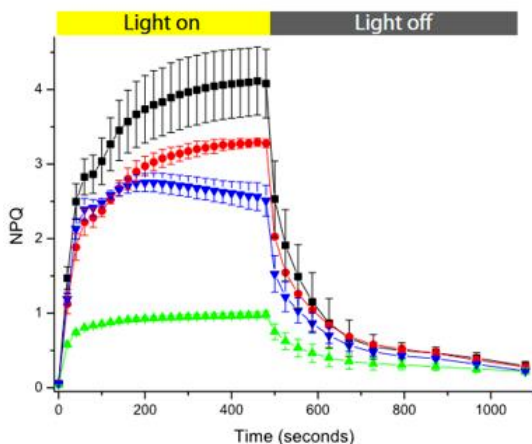


Figura 2.15: cinetica NPQ misurata con luce attinica $830\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ dei genotipi WT (nero), *psbs* KO (blu), *lhcsr1* KO (verde), *lhcsr2* KO (rosso). (Alboresi et al., 2010)

b. MUTANTI DEI TRASPORTI ELETTRONICI ALTERNATIVI

Il mutante *flvA flvB* KO è stato isolato per approfondire il ruolo del complesso FLV nei meccanismi di fotoprotezione. In particolare, dallo studio emerge che FLV ha una funzione importante in condizioni di aumento improvviso di intensità luminosa quando vi è una sovrariduzione degli accettori di elettroni del PSI. Nel momento in cui gli enzimi della fissazione del carbonio non sono ancora attivi, gli elettroni vengono deviati massivamente verso molecole di ossigeno da parte del composto FLV evitando un danno da parte delle ROS al PSI.

Il ruolo del complesso FLV in *P. patens* è evidenziato anche dai test di crescita su organismi mutanti e WT: cresciuti in condizione di luce continua a diverse intensità luminose, i genotipi *flvA* KO e *flvB* KO non presentano grosse differenze di crescita rispetto al genotipo WT nelle stesse condizioni; posti invece in condizioni di crescita a luce fluttuante,

i genotipi mutanti mostrano una crescita ridotta rispetto al WT. (Gerotto et al., 2016)

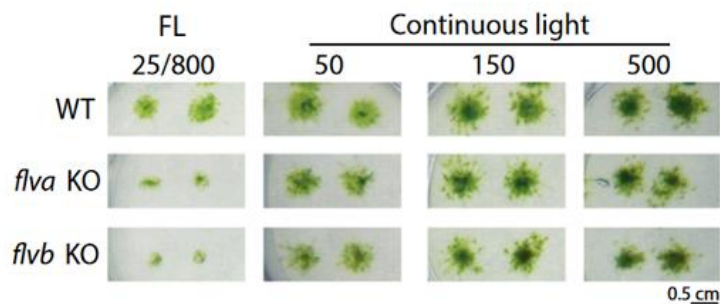


Figura 2.16: test di crescita su genotipo WT e mutanti *flvA* KO e *flvB* KO. Il test è stato effettuato su muschi cresciuti per due settimane in condizioni di luce continua a intensità di $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, $150 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e $500 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, e in condizione di luce fluttuante (FL) in cicli di luce a $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ per 5 minuti e $800 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ per 5 minuti. (Gerotto et al., 2016)

Nello stesso studio viene dimostrato che, in assenza di un gene *flvA* o *flvB*, l'altro viene comunque trascritto ed il relativo RNA è presente; l'accumulo delle singole unità FlvA o FlvB è però fortemente dipendente dalla presenza dell'altro. L'unica forma funzionale del complesso proteico FLV è, dunque, quella di eterodimero.

Il mutante *pgrl1* KO è stato isolato al fine di analizzare il ruolo funzionale del complesso che media il trasporto ciclico degli elettroni. Dallo studio emerge che PgrL1 ha un ruolo nell'acclimatazione ad alta luce in *C. reinhardtii*: l'organismo mutante cresciuto in queste condizioni mostra una diminuzione di crescita rispetto al genotipo WT. (Kukuczka et al., 2014)

Infine, l'ultimo genotipo utilizzato nel seguente progetto di tesi è *pgrl1 ndhm* KO completamente mancante del trasporto ciclico degli elettroni. Essendo presente in *P. patens* anche il complesso FLV responsabile del trasporto pseudo-ciclico, in condizioni di luce di controllo continua, il doppio mutante *pgrl1 ndhm* KO mostra una crescita pari al genotipo WT; mentre, in condizioni di luce fluttuante ed alta luce, mostra una piccola diminuzione di capacità di crescita. (Storti et al., 2020).

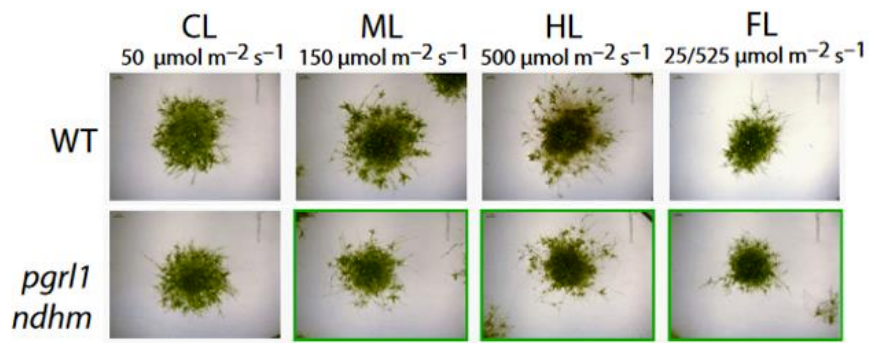


Figura 2.17: test di crescita su genotipi WT e *pgr1 ndhm* KO di *P. patens*. Crescita di 21 giorni in condizioni di luce continua, di controllo (CL: $50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), in eccesso (ML: $150 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e HL: $500 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) e luce fluttuante (FL: $25 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ x 9 min/ $525 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ x 3 min). (Modificato, da Storti et al., 2020)

3. SCOPO DELLA TESI

La fotosintesi è un processo fondamentale per la vita sulla Terra. Gli organismi fotosintetici, rilasciando ossigeno in atmosfera, permettono la vita di tutti gli organismi aerobi presenti sul pianeta.

Altrettanto importanti sono i meccanismi che regolano la fotosintesi, i quali permettono agli organismi di rispondere alle variazioni ambientali che influiscono sui processi fotosintetici, come ad esempio l'aumento dell'intensità luminosa che può rappresentare uno stress per la pianta.

In questo progetto di tesi sono stati studiati due di questi meccanismi: il quenching non fotochimico (NPQ) ed i sistemi di trasporto elettronico alternativo. In particolare, è stata analizzata la loro influenza nelle capacità di acclimatazione dell'organismo modello *Physcomitrium patens* a condizioni di alta luce continua (HL) ed alta luce fluttuante (FL).

4. MATERIALI E METODI

4.1 Materiale vegetale

4.1.1 Tecnica di coltura di *Physcomitrium patens*

La crescita e propagazione di *P. patens* avviene in ambiente sterile. Inizialmente si preparano delle piastre Petri in cui viene colato e solidificato un volume di circa 25 mL di terreno PpNH₄ (composizione: tabelle 4.1 e 4.2). Su di esso si posiziona un filtro circolare di cellulosa che permette lo scambio di nutrienti, al fine di limitare la crescita del muschio alla superficie del terreno e facilitarne la successiva raccolta.

Il protonema viene raccolto in una Falcon tube in un volume di acqua milliQ di 3-6 mL, e viene frullato tramite un mixer Ultra-turrax™. Un volume di 1-2 mL del frullato viene versato sulla piastra contenente il terreno solidificato ed il filtro di cellulosa. La piastra viene infine chiusa, ed il coperto fissato ermeticamente con parafilm.

La crescita in piastra avviene all'interno di una camera di crescita con temperatura di circa 22 °C e fotoperiodo di 16h di luce a 50μE·m⁻²·s⁻¹ e 8h di buio. Dopo circa una settimana, in ambiente sterile, il protonema viene nuovamente raccolto in Falcon tube e può essere conservato a 4 °C per successive semine.

Il materiale vegetale destinato a misure fisiologiche viene seminato, seguendo il medesimo procedimento, su terreno PpNO₃ (composizione: tabelle 4.1 e 4.2). Le piastre, in questo caso, vengono sigillate con parafilm alternato a segmenti di nastro adesivo in garza, il quale permette un maggior scambio di gas con l'ambiente esterno alla piastra.

Componente	PpNH ₄	PpNO ₃
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0,80g/L	0,80g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25g/L	0,25g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,0125g/L	0,0125g/L
Microelementi (1,000X)	1mL/L	1mL/L
KH ₂ PO ₄ -KOH250g/L,pH7.0	1mL/L	1mL/L
NH ₄ tartrato	0,5g/L	-
Glucosio	5g/L	-
Agar	7,2g/L	8g/L

Tabella 4.1: composizione dei terreni di coltura PpNH₄ e PpNO₃ utilizzati per la crescita e la propagazione del materiale vegetale. I microelementi ed il buffer fosfato (KH₂PO₄-KOH250) vengono conservati a 4 °C in una soluzione madre.

Microelementi (1,000X)	Quantità (mg/L)
CuSO ₄ ·5H ₂ O	5,5
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	5,5
H ₃ BO ₃	61,4
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	38,9
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	5,5
KI	2,8

Tabella 4.2: composizione della soluzione madre dei microelementi a concentrazione 1000X.

L'acclimatazione del materiale vegetale (Figura 4.1) avviene a tre diverse condizioni di luce: luce di controllo (CL), alta luce (HL) e luce fluttuante (FL).

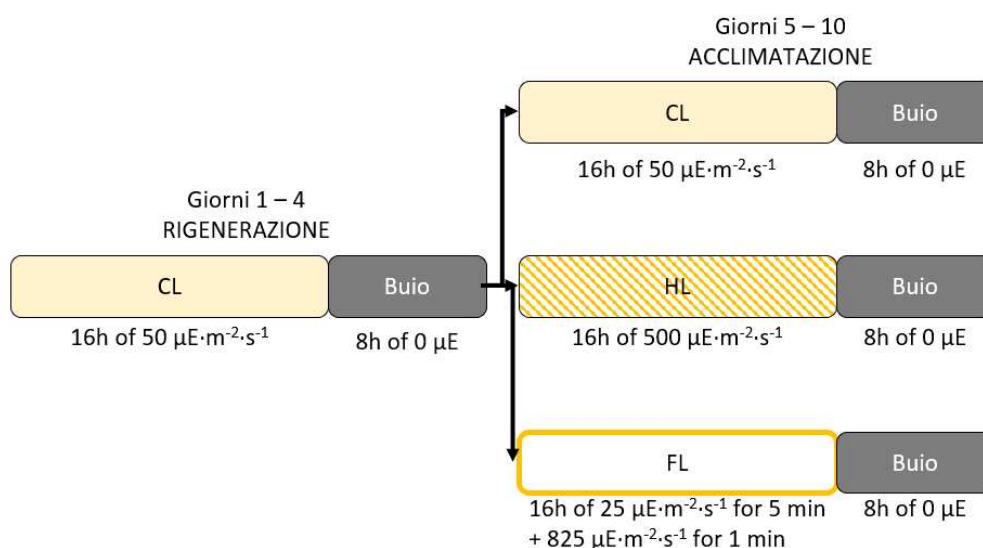


Figura 4.1: rappresentazione schematica del trattamento di acclimatazione alle tre condizioni di luce: luce di controllo (CL), alta luce (HL) e luce fluttuante (FL).

Il materiale vegetale seminato in terreno PpNO₃ viene incubato in camera di crescita con fotoperiodo 16h luce e 8h buio, per un totale di 10 giorni. I primi 4 giorni l'intensità luminosa cui vengono esposti è pari $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ per tutti i trattamenti, in quanto vi è una iniziale fase di rigenerazione dell'organismo. In seguito, avviene la vera e propria acclimatazione, in cui gli organismi seminati in piastra vengono esposti ai diversi trattamenti per i successivi 6 giorni. In questa fase, durante le 16h di luce, gli organismi con trattamento CL vengono esposti ad un'intensità luminosa di $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, quelli con trattamento HL vengono esposti a $500 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ di luce, mentre il trattamento FL prevede cicli continui di $825 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ per 1 minuto e $25 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ per 5 minuti. Mentre l'intensità di luce a CL permette una crescita ottimale dell'organismo, i trattamenti HL e FL lo sottopongono ad uno stress ossidativo dovuto ad un eccesso di luce.

Al decimo giorno di crescita il materiale vegetale viene raccolto per effettuare le misure fisiologiche.

Prima di effettuare ogni misura le piante vengono acclimatate al buio per 20 o 40 minuti, a seconda della misura che verrà effettuata, massimizzando l'ossidazione della catena di trasporto elettronico.

4.1.2 Mutanti fotosintetici di *P. patens* utilizzati

Genotipo
WT
<i>vde</i> KO
<i>ze</i> KO
<i>psbs lhcsr1 lhcsr2</i> KO
<i>flvA flvB</i> KO
<i>pgrl1</i> KO
<i>pgrl1 ndhm</i> KO
<i>psbs</i> KO
<i>ze psbs</i> KO

4.2 Metodi di analisi dell'apparato fotosintetico:

4.2.1 Western blot

ESTRAZIONE E QUANTIFICAZIONE DELLE PROTEINE

Una porzione del protonema di *P. patens* cresciuta in terreno PpNO₃ per 10 giorni viene raccolta, privata il più possibile del contenuto d'acqua, e posta in Eppendorf da 1,5mL. Il contenuto viene rapidamente congelato immergendo la Eppendorf in azoto liquido, per facilitarne la successiva frammentazione che avviene con l'aiuto di un pestello di plastica. Successivamente si introducono 50-100 µL di tampone di estrazione sample buffer SB 3X (30% glicerolo, 125 mM Tris pH 6,8 e 0,1 M DTT). Il campione viene centrifugato a 13000 RPM per 10 minuti ed il pellet viene scartato. Il surnatante costituisce la soluzione di estratto proteico, utilizzato per quantificare il contenuto di clorofille e successivamente quello di proteine.

Un volume di 2µL di estratto viene diluito con un fattore di diluizione 50X in una soluzione 90% di acetone, e centrifugato. La quantifica delle

clorofille viene effettuata tramite la misura del loro spettro di assorbimento in un intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 600nm e 750nm, grazie allo spettrofotometro Cary 100 UV-Vis (Agilent Technologies). La concentrazione di clorofille, espressa in $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, viene calcolato tramite l'equazione di Porra a partire dai valori di assorbanza (ABS) alle lunghezze d'onda di 645nm, 663nm e 750nm. I primi due valori corrispondono alle lunghezze d'onda di massimo assorbimento rispettivamente della clorofilla *b* e della clorofilla *a*, mentre la lunghezza d'onda di 750nm viene utilizzata come parametro di azzeramento dello spettro in quanto non vi è assorbimento delle clorofille.

Equazione di Porra:

$$[\text{Chlorophylls}] = 20,2 \times (\text{ABS}_{645} - \text{ABS}_{750}) + 8,02 \times (\text{ABS}_{663} - \text{ABS}_{750})$$

Questo procedimento viene effettuato per ogni campione da analizzare.

Dopo la quantificazione delle clorofille, l'estratto viene posto a 100°C per un minuto al fine di denaturare le proteine prima di procedere con la corsa su gel.

CORSA ELETTROFORETICA DI PROTEINE SU GEL DI ACRILAMMIDE

Gli estratti proteici vengono caricati su un gel di sodio dodici solfato (SDS) la cui composizione è riportata nella tabella 4.3, assicurandosi di caricare per ogni campione la medesima quantità di clorofille. Grazie al contenuto in acrilamide del gel ed alla carica negativa assunta dalle proteine in presenza di SDS, applicando un campo elettrico è possibile far migrare le proteine verso il polo positivo. Queste, in base al loro peso molecolare migrano più o meno velocemente nel gel.

Componenti	Running gel (12% acryl)	Stacking
40% acrylamide/bis-acrylamide 37.5:1	3.00mL	250 μL
Tris-HCl 3M, pH 8.84	1.24mL	-
Tris HCl 0.313M, pH 6.8	-	938 μL
H2O MilliQ	5.66mL	1.29mL
SDS 10% (w/v)	100 μL	250 μL
TEMED	20 μL	9 μL
APS 10%	30 μL	13 μL

Tabella 4.3: composizione di running gel e stacking gel per corsa elettroforetica in un gel di acrilamide 12% SDS-PAGE.

In ogni pozzetto del gel viene caricata una quantità di proteine pari per ogni campione da analizzare. Il volume di estratto corrispondente per ogni campione viene calcolato a partire dalla concentrazione delle clorofille quantificata allo spettrofotometro. A questo volume viene aggiunto un ulteriore volume di SB 3X in modo da ottenere un volume pari per ogni

campione. Il volume totale di ogni campione viene infine caricato con l'ausilio di una micropipetta all'interno del corrispondente pozzetto del gel.

La corsa elettroforetica avviene posizionando il gel all'interno di una camera elettroforetica (Bio-Rad) riempita con buffer running la cui composizione è riportata nella tabella 4.4. Inizialmente viene applicato un campo elettrico di 10mA per circa 30 minuti, facendo in modo che il fronte di migrazione delle clorofille si compatti in corrispondenza dell'inizio del running gel. In seguito, viene applicato un campo elettrico di 25mA per circa 120 minuti, interrompendo la corsa nel momento in cui il fronte di migrazione delle clorofille esce dal margine inferiore del gel.

Componenti	Concentrazione 10X
Tris	30.2g
Glicina	144g
SDS	10g

Tabella 4.4: composizione del buffer running in concentrazione 10X.

IMMUNOBLOTTING

Terminata la corsa si ottiene un gel contenente le proteine separate, le quali vengono trasferite in una membrana di nitrocellulosa tramite blotting.

Per questo processo è necessario costituire un sandwich formato da: una spugna, due rettangoli di carta filtrante, la membrana di nitrocellulosa, il gel di acrilamide contenente le proteine separate, due rettangoli di carta filtrante ed un'altra spugna. Il tutto viene posizionato all'interno di una camera di trasferimento (Bio-Rad) riempita con tampone di trasferimento, la cui composizione è riportata nella tabella 4.5, al cui interno viene inserito anche un blocco di ghiaccio per evitare il surriscaldamento del tampone.

Componenti	Concentrazione 10X
Tris	20mM
Glicina	152mM
Metanolo	20%

Tabella 4.5: composizione della soluzione del tampone di trasferimento utilizzato nella fase di blotting.

Per il trasferimento viene applicato un campo elettrico di 100V costanti per 60 minuti, grazie al quale le proteine migreranno verso il polo positivo rappresentato dalla membrana di nitrocellulosa.

Al termine del trasferimento la membrana viene colorata con soluzione di Ponceau (0,1% Ponceau, 5% acido acetico) la quale si lega in maniera

evidente con le proteine Rubisco e LHC che vengono usate come riferimento per tagliare la membrana.

Dapprima si effettua il blocking delle membrane per evitare il legame aspecifico degli anticorpi con esse, grazie all'incubazione di almeno 1 ora in una soluzione di latte in TTBS al 10%. Questo passaggio è seguito da sei lavaggi con TBS da cinque minuti ciascuno.

Ogni frammento di membrana contiene proteine di un determinato peso molecolare, e viene ibridato con specifici anticorpi. Inizialmente avviene l'ibridazione per 2 ore con anticorpo primario che lega le proteine sulla membrana, seguita da sei lavaggi con TBS di 5 minuti ciascuno. Successivamente le membrane vengono ibridate per 1 ora con lo specifico anticorpo secondario: anti-rabbit coniugato con fosfatasi alcalina, o anti-rabbit coniugato con perossidasi. Questo viene poi lavato con sei lavaggi in TTBS.

Al termine di questi passaggi le membrane, se ibridate con anticorpo secondario coniugato con fosfatasi alcalina, vengono sviluppate con una soluzione di sviluppo cui viene aggiunto un volume di 33 μ L di BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) e 66 μ L di NBT (nitro blue tetrazolium chloride) che in presenza dell'anticorpo secondario producono una reazione colorimetrica catalizzata dalla fosfatasi alcalina che evidenzia le bande in cui sono presenti le proteine. Le composizioni delle soluzioni di TBS, TTBS e di sviluppo sono riportate rispettivamente nelle tabelle 4.6, 4.7, 4.8. Se invece le membrane sono state ibridate con anticorpo secondario coniugato a perossidasi, lo sviluppo avviene attraverso l'utilizzo dello strumento ChemiDoc Image System (Bio-Rad), il quale cattura la chemiluminescenza prodotta dalla reazione mediata della perossidasi.

In questo progetto di tesi sono stati utilizzati anticorpi secondari specifici contro le seguenti proteine: Rubisco, LHCII, PsbS, FLVA, FLVB.

Componenti	Concentrazione 20X
Tris-HCl pH 7.4	400mM
NaCl	3M

Tabella 4.6: composizione della soluzione Tris-buffer saline (TBS)

Componenti	Concentrazione 1X
TBS 20X	Tris 0.02M, NaCl 0.15M
Tween 20%	1%

Tabella 4.7: composizione della soluzione TBS con Tween (TTBS)

Componenti	Concentrazione 1X
Tris-HCl pH 9.5	100mM
NaCl	100mM
MgCl ₂	5mM

Tabella 4.8: composizione della soluzione di sviluppo.

DENSITOMETRIA

La quantificazione delle proteine presenti sulle membrane di nitrocellulosa al termine dell'immunoblotting si utilizza un metodo che prevede l'utilizzo del programma di editing di immagine Fiji ImageJ.

Grazie allo sviluppo della membrana tramite lo strumento ChemiDoc è possibile acquisire immagini già digitalizzate e pronte per essere utilizzate per la quantificazione delle proteine contenute nelle bande. Se invece lo sviluppo avviene attraverso reazione colorimetrica, è necessario acquisire uno scanner ad alta definizione (600 DPI). Le immagini vengono poi modificate con il programma ImageJ in cui vengono convertite in scala di grigio. Il programma viene impostato per misurare solo il "Mean Grey Value". Viene selezionata la regione di interesse rappresentata dalle singole bande: l'ampiezza dell'area misurata resta costante per ogni banda in esame e dunque va inizialmente settata sulla banda di maggiori dimensioni. La misura del numero di pixel deve essere effettuata sulle bande di proteine in esame e sulle regioni di background direttamente soprastanti e sottostanti ad esse.

I dati delle bande e del background vengono riportati in un file Excel in cui vengono calcolati i seguenti parametri: densità di pixel invertita della banda e del background, calcolata tramite la formula $255-X$, dove X indica il numero di pixel misurato per la banda in esame o per il suo background; il valore net, calcolato sottraendo il background invertito alla proteina invertita; la quantificazione delle proteine, calcolata come rapporto tra il valore net e la concentrazione di clorofille caricate nel gel di acrilamide. Per assicurare la riproducibilità del procedimento e del risultato, si eseguono almeno tre repliche dell'esperimento.

4.2.2 Misure di fluorescenza e assorbimento per determinazione dell'efficienza fotosintetica

MISURA DELLE CARATTERISTICHE DEL PSII

Per effettuare le misure dell'efficienza fotosintetica è stato utilizzato lo strumento Dual-PAM 100 (Walz, Germania), il quale permette di quantificare la fluorescenza emessa dalle clorofille del PSII e l'assorbimento del PSI.

Le misure sono state effettuate all'interno di una stanza buia, a temperatura ambiente, direttamente su materiale vegetale pre-adattato al buio per 40 minuti al fine di permettere la totale ossidazione del LEF. Una porzione di protonema di *P. patens* viene posta su un filtro in fibra di vetro (Millipore) e posizionato in prossimità del rilevatore.

La misura della fluorescenza della clorofilla è uno dei metodi più largamente usati per indagare il processo di fotosintesi. Il segnale che emette la clorofilla varia sensibilmente a seconda dei cambiamenti nel processo fotosintetico. Attraverso questo segnale è possibile misurare i principali parametri fotosintetici relativi al PSII, in quanto in condizioni di temperatura ambiente il segnale al di sotto della lunghezza d'onda di 700nm proveniente dal PSI non dà un contributo significativo (Baker, 2008) L'energia luminosa che colpisce il P680 del PSII può avere tre diversi destini (Figura 4.2): può essere utilizzata per la reazione fotochimica che induce la separazione di carica e la riduzione del chinone Q_A da parte del PSII, può essere emessa sotto forma di fluorescenza da parte delle clorofille del P680, oppure sotto forma di calore nel meccanismo NPQ. Questi tre processi sono tra loro in diretta competizione e l'aumentare di uno si traduce nella diminuzione degli altri due.

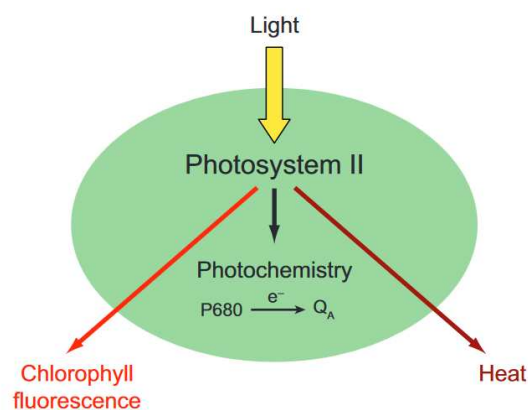


Figura 4.2: rappresentazione schematica dei tre possibili utilizzi dell'energia luminosa catturata dal fotosistema II (PSII): emissione di fluorescenza, reazione fotochimica, emissione di calore.

(Baker, 2008)

Le misure della fluorescenza emessa dal centro di reazione P680 del PSII (Figura 4.3) restituiscono i principali parametri fotosintetici legati al PSII. La prima misura effettuata dal fluorimetro prevede la somministrazione al campione di una intensità luminosa nell'ordine dei decimi di $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, non sufficiente all'attivazione della reazione fotochimica, che corrisponde alla fluorescenza basale F_0 . In seguito, viene emesso un impulso di luce saturante con intensità di migliaia di $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ della durata inferiore a 1 secondo, il quale massimizza la riduzione del pool di plastochinoni e

permette di misurare la fluorescenza massima F_m . La differenza tra i due parametri corrisponde alla fluorescenza variabile $F_v = F_m - F_0$. Con questi dati è possibile ottenere il parametro F_v/F_m corrispondente alla massima efficienza quantica del PSII. Per piante in condizioni ottimali questo rapporto assume valori compresi tra 0.7 e 0.8, mentre valori inferiori sono indice di stress abiotici o biotici. I parametri misurati in seguito all'esposizione del campione al pulse saturante, sono relativi a piante non adattate al buio e vengono indicati con ' . Al pulse saturante segue l'accensione per 8 minuti di una luce attinica continua con intensità luminosa pari a $850 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, che induce l'attivazione delle reazioni fotosintetiche a tassi fisiologici. In questa fase vengono somministrati altri impulsi di luce saturante, grazie ai quali è possibile misurare i parametri di fluorescenza F' e fluorescenza massima F_m' . Seguono infine 10 minuti di buio in cui vengono misurati gli stessi parametri in fase di rilassamento delle reazioni fotosintetiche.

In aggiunta al rapporto F_v/F_m vengono calcolati diversi parametri. Il parametro $Y(II)$ calcolato con formula: $Y(II) = (F_m' - F) / F_m'$, corrisponde al numero di quanti assorbiti dal P680 e convertiti in energia fotochimica utilizzata per la separazione di carica nei centri di reazione del PSII. L'energia residua viene dissipata come calore nel meccanismo NPQ calcolato con formula $NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$. Il parametro qL corrisponde al coefficiente di quenching fotochimico, viene calcolato con formula $qL = (F_m' - F) / (F_m' - F_0') \times F_0' / F$ ed è una misura della frazione di centri di reazione del PSII aperti. In questo progetto, quest'ultimo parametro viene rappresentato come $1 - qL$ corrispondente al numero di centri di reazione chiusi, in cui l'accettore elettronico Q_A si trova allo stato ridotto al momento della misura.

Vengono infine misurati altri due parametri relativi al PSII, $Y(NO)$ e $Y(NPQ)$. Il primo parametro $Y(NO)$ corrisponde alla frazione di energia somministrata che viene passivamente dissipata tramite fluorescenza, definita anche come dissipazione non controllata, calcolata con formula $Y(NO) = F / F_m$. $Y(NPQ)$ corrisponde invece alla frazione di energia che viene dissipata sotto forma di calore nel meccanismo NPQ e viene calcolata con formula $Y(NPQ) = 1 - Y(II) - Y(NO)$. (Baker, 2008)

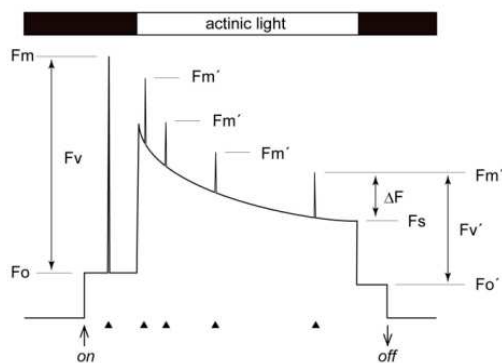


Figura 4.3: Rappresentazione grafica delle misure dei parametri di fluorescenza del P680 ottenuti con lo strumento Dual-PAM 100.

MISURA DELLE CARATTERISTICHE DEL PSI

La determinazione dell'efficienza di conversione dell'energia luminosa in energia fotochimica del PSI viene effettuata sempre dallo strumento Dual-PAM 100 (Walz, Germania), contemporaneamente alle misure di fluorescenza. Lo stato redox dei centri di reazione del P700 nel PSII viene misurato in base alla variazione di assorbanza nello spettro del vicino infrarosso, in termini di differenza di trasmissione o re-emissione del segnale a 875-830 nm. Ai fini di queste misure si applica il metodo dell'impulso saturante (Figura 4.4).

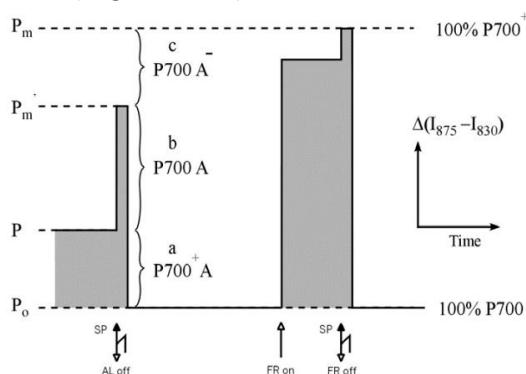


Figura 4.4: Rappresentazione grafica del metodo dell'impulso saturante (SP) per la determinazione dell'efficienza di conversione energetica nel PSI. L'ossidazione del P700 è caratterizzata da una variazione positiva del segnale. L'ossidazione completa del P700 è indotta da un impulso saturante (SP) in presenza di luce Far-Red (FR). In questo modo viene misurato il segnale massimo del P700 indicato con P_m . La riduzione completa del P700 viene indotta dopo il SP e la cessazione dell'illuminazione FR. In questo modo viene misurato il segnale minimo del P700 indicato come P_0 . In presenza di un'intensità di luce attinica (AL) una frazione (a) con limitazione donor-side (centri di reazione del $P700^+A$ chiusi) viene ossidata dall'AL, producendo un segnale intermedio del P700 indicato con P . In questo stato la differenza di segnale indotto dal SP corrisponde all'ossidazione della frazione (b) attiva dei centri di reazione (centri di reazione del $P700A$ aperti), con un segnale massimo del P700 indicato come P_m' . La frazione (c) con limitazione da parte dell'acceptor side (centri di reazione del $P700^+A$ chiusi) che non può essere ossidata corrisponde alla differenza tra P_m e P_m' . (Klughammer and Schreiber, 2008)

Il metodo sopra descritto sfrutta il principio per cui, quando sottoposti a determinate lunghezze d'onda e intensità luminose, i centri di reazione del P700 si possono trovare in tre possibili stati: stato attivo (P700A), stato inattivo a causa della limitazione donor-side (P700⁺A) e stato inattivo a causa della limitazione acceptor-side (P700⁻A). Il rendimento quantico del PSI viene determinato unicamente dalla frazione attiva dei centri di reazione. Solo questa può essere ossidata quando si fornisce un improvviso pulse di luce intensa, passando dallo stato P700A allo stato P700A⁻ ed in seguito rilassandosi nello stato P700⁺A. In questo stato viene raggiunta una stabilità di carica dall'acceptor side.

Analogamente a come viene effettuato per il PSII, si possono calcolare diversi parametri relativi al PSI. Il parametro Y(I) corrisponde all'efficienza quantica del PSI e si calcola con la formula $Y(I) = (P_m' - P) / P_m$. Viene definito come la frazione di centri di reazione del P700 che non sono limitati dall'acceptor-side trovandosi allo stato ridotto e quindi sono in grado di effettuare la conversione fotochimica dell'energia. Il parametro Y(ND) indica la limitazione da parte del donor-side, viene calcolato con la formula $Y(ND) = P / P_m$ e corrisponde alla dissipazione dell'energia per via non fotochimica dovuta frazione di centri di reazione del P700 che si trova allo stato ossidato. Y(NA) corrisponde alla limitazione di dovuta all'acceptor-side, quindi degli accettori che si trovano allo stato ridotto che comporta una dissipazione dell'energia per via non fotochimica. Si calcola con la formula $Y(NA) = (P_m - P_m') / P_m$ oppure a partire dagli altri due parametri $Y(NA) = 1 - Y(I) - Y(ND)$. Indica la frazione di centri di reazione del P700 che l'impulso di luce saturante SP non è in grado di ossidare. (Klughammer and Schreiber, 2008)

4.2.3 Determinazione del rapporto stechiometrico PSI/PSII tramite applicazione dell'effetto dell'electrocromismo

In piante, alghe e batteri fotosintetici, il donatore primario e gli accettori elettronici del LEF sono localizzati nei lati opposti della membrana tilacoidale. L'esposizione alla luce causa una separazione di carica a cavallo della membrana che si traduce nella presenza di un campo elettrico nell'ambiente tilacoidale. Questo influenza i pigmenti fotosintetici il cui spettro di assorbimento viene modificato dall'effetto Stark, noto come electrocromismo, causando uno spostamento del picco di massima assorbanza.

L'assorbimento di un fotone da parte di un pigmento ne causa la transizione dal suo stato stazionario ad uno stato eccitato. Se questi due

stati sono caratterizzati da diversi momenti di dipolo o sono polarizzabili, la differenza energetica tra di essi verrà influenzata dal campo elettrico, risultando nello spostamento della banda di assorbimento. Se l'entità dello spostamento è piccola rispetto allo spessore della banda di assorbimento, è possibile ottenere lo spettro del cambiamento di assorbimento, ovvero il segnale di Electro-Chromic-Shift (ECS).

Il segnale ECS può fornire delle informazioni estremamente precise sulla composizione in pigmenti di un determinato organismo, la loro localizzazione ed il loro orientamento all'interno dei complessi leganti clorofille. (Bailleul et al., 2010)

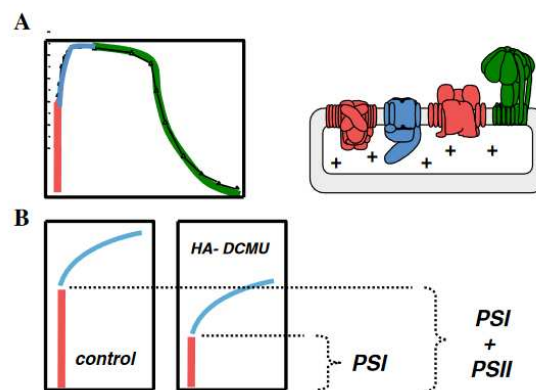


Figura 4.5: A) Cinetica del segnale ECS misurata su cellule intatte di *C. reinhardtii* in seguito alla somministrazione di un impulso saturante. La prima parte di innalzamento del segnale (rosso), indicata come fase “a” corrisponde alla separazione di carica in entrambi i fotosistemi che avviene in una scala temporale irrisolta. Segue una seconda fase “b” (blu) in cui gli elettroni fluiscono nel Cyt b6f, ed una terza fase “c” (verde) in cui vi è un decadimento del segnale ECS per la diminuzione del campo elettrico presente a cavallo della membrana dovuta al flusso di protoni attraverso l’ATP sintasi. B) **Applicazione del segnale ECS per il calcolo del rapporto stechiometrico PSI/PSII:** il PSII viene inibito (pannello di destra) grazie all’aggiunta degli inibitori 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU) e idrossilammina (HA), risultando nella diminuzione del segnale ECS. La diminuzione è direttamente proporzionale con il rapporto $PSI/(PSI+PSII)$ e permette il calcolo del rapporto stechiometrico. (Bailleul et al., 2010)

Lo studio del segnale ECS può fornire informazioni sul funzionamento dei complessi fotosintetici (Figura 4.5): l’ampiezza della fase (a) è proporzionale al numero di fotosistemi attivi, e l’aggiunta di inibitori del PSII permette di calcolare il rapporto stechiometrico PSI/PSII.

Le misure del segnale ECS vengono effettuate grazie allo strumento JTS-10 (Biologic). Questo sfrutta una tecnica spettroscopica in cui viene applicato un flash di luce Xenon al campione, in grado di indurre la separazione di carica necessaria alla formazione del campo elettrico e alla produzione del segnale ECS da parte dei pigmenti. Il materiale viene preadattato al buio per 40 minuti ed in seguito una porzione del protonema

viene posta su un supporto porta-campione ed esposta al flash di luce. Ogni campione viene misurato prima applicando un filtro a 520nm che permette di selezionare la lunghezza d'onda di massimo assorbimento dei pigmenti nel segnale ECS, poi applicando un filtro a 546nm per eliminare il rumore dato dall'assorbimento basale. Una volta effettuate entrambe le misure, si sottrae lo spettro a 546nm allo spettro a 520nm e si mantiene la differenza come misura utile. Questa prima misura è relativa all'induzione della separazione di carica in entrambi i fotosistemi, proporzionale a PSI+PSII. In seguito, il campione viene trattato con 200 μ L di DCMU 40 μ M e 200 μ L di HA 4mM. Il primo inibisce il trasferimento elettronico dal chinone primario Q_A al secondario Q_B , il secondo agisce come donatore elettronico al P680 allo stato eccitato. In questo modo viene inibito solamente il PSII. Viene effettuata una seconda misura sul campione trattato, seguendo le medesime modalità della prima, ricavandone uno spettro ECS ridotto rispetto alla prima misura perché relativo alla sola separazione di carica nel P700, quindi proporzionale al numero di PSI funzionali. Per differenza si ricava il numero di PSII attivi nella prima misura ed in seguito se ne calcola il rapporto stechiometrico PSI/PSII.

4.3 Test di crescita

Questo test viene utilizzato per caratterizzare il fenotipo di crescita dei diversi genotipi acclimatati in condizioni di CL, HL e FL. Il materiale vegetale viene fatto crescere per 10 giorni a intensità di luce $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ in condizioni sterili in piastre Petri contenenti terreno solido PpNO_3 . Al decimo giorno una piccola porzione di protonema viene prelevata e trasferita in un'altra piastra contenente terreno PpNO_3 , tramite l'ausilio di un ago sterile ed un apposito strumento con punta tagliente sterile che permette di standardizzare la grandezza della porzione di protonema prelevata. Nella seconda piastra le piccole porzioni di protonema di diversi campioni vengono fatte aderire al terreno di coltura e organizzate in spot suddividendole per genotipo. Per ogni genotipo in ogni condizione di acclimatazione sono stati predisposti 2 spot come mostrato nella Figura 4.6, disponendo sempre all'interno di una piastra 2 spot di genotipo WT come controllo.

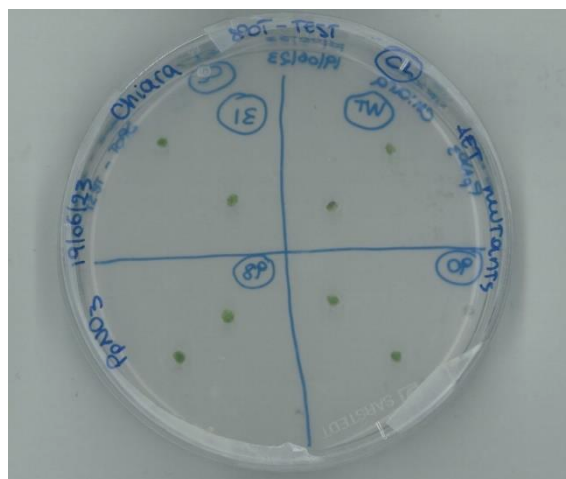


Figura 4.6: Esempio della disposizione degli spot all'interno di una piastra Petri con terreno PpNO₃ per spot-test.

Ogni piastra contenente gli spot test viene esposta per 24 ore a condizione di CL, in seguito viene spostata nella condizione di acclimatazione designata. La durata complessiva del test è di 30 giorni, durante i quali vengono misurati crescita e parametro F_v/F_m per monitorare il benessere della pianta durante l'acclimatazione.

Per misurare la crescita viene effettuato uno scanner delle piastre con lo strumento Konica Minolta bizhub C280, in grado di acquisire immagini con risoluzione 1000ppi. La dimensione degli spot viene misurata con il programma di editing di immagine Fiji ImageJ in termini di densità integrata, parametro in grado di riassumere le tre dimensioni di crescita. La crescita viene monitorata il giorno 1, 7, 14, 21 e 30.

Il parametro F_v/F_m indicativo della capacità di acclimatazione della pianta viene misurato tramite l'utilizzo dello strumento FluorCam 800. Questo strumento analogamente al Dual-PAM 100 (paragrafo 5.2.2) è in grado di misurare la fluorescenza delle clorofille prima e dopo la somministrazione di un impulso di luce saturante. Questo strumento è in grado di catturare simultaneamente i parametri di fluorescenza di tutti gli spot presenti in una piastra grazie ad un sistema di detection CCD. Il parametro F_v/F_m viene misurato al tempo T0 prima di effettuare l'acclimatazione, al T2 dopo 2 ore dall'acclimatazione, al T6 dopo 6 ore di acclimatazione, e dal giorno successivo indicato come giorno 1, viene misurato alla medesima ora per tre giorni successivi. Infine, viene misurato nei giorno 6, 8, 10, 13, 20, 23, 27 e 30.

4.4 Trasformazione di *Physcomitrium patens*

4.4.1 Trasformazione mediante ricombinazione omologa

In questo progetto di tesi è stata effettuata la trasformazione per ricombinazione omologa del nuovo genotipo mutante *lhcsr1 lhcsr2* ze KO. I cloni trasformati sono tuttora in fase di screening ed il risultato della trasformazione non è ancora determinato.

A questo scopo sono stati utilizzati i plasmide prodotti in (Alboresi et al., 2010) in cui le regioni target *LHCSR1* (locus XM_001776900) e *LHCSR2* (locus XM_001768019) sono sostituite dalla cassetta di resistenza per igromicina, per trasformare piante con background genotipico ze KO.

La trasformazione è stata effettuata seguendo il procedimento indicato in (Schaefer et al., 1991) di seguito riportato, con qualche minore modifica.

a. Isolamento dei protoplasti

Usando una spatola sterile si raccoglie il protonema, contenuto in 4 piastre Petri, cresciuto per 6 giorni in terreno PpNH₄. Il materiale viene trasferito in una piastra contenente 10mL di mannitolo 8.5% a cui viene aggiunto un volume di 10mL di soluzione 8.5% mannitolo ed enzima cellulasi Driselase (Sigma D-9515) 2% (w/v), ed incubato a temperatura ambiente per 30min e occasionalmente mescolato con attenzione. In seguito, il materiale viene filtrato attraverso due filtri sterilizzati in autoclave sovrapposti, rispettivamente con maglia di 80 µm e 40 µm. I filtri vengono risciacquati nuovamente con 5mL di mannitolo 8.5% ed i protoplasti raccolti vengono trasferiti in un tubo corex da 30mL. Segue una centrifuga a bassa velocità 600g per 5 min a temperatura ambiente per collezionare i protoplasti sul fondo del tubo. Il surnatante viene scartato ed il pellet risospeso in 10mL di mannitolo 8.5%. Vengono ripetuti i passaggi dalla centrifuga alla risospensione ed infine viene effettuata la conta dei protoplasti tramite microscopio a scansione su un'aliquota di 15µL di sospensione.

b. Conta dei protoplasti

Il numero di protoplasti viene contato su due linee (X numero di protoplasti) e calcolato con la seguente formula:

$X \text{ numero di protoplasti} \times 5 \text{ linee} \times 10^3 \text{ protoplasti} \times 10\text{mL di soluzione} = \text{numero di protoplasti}$

Viene ripetuta la centrifuga a 600g per 5 minuti a temperatura ambiente ed il surnatante viene scartato nuovamente, mentre il pellet viene risospeso in un volume di soluzione MMM (Tabella 4.9) necessario ad ottenere una concentrazione di $1,2 \times 10^6$ protoplasti/mL.

c. Trasformazione dei protoplasti

Il DNA esogeno viene ottenuto per linearizzazione del plasmide contenente le regioni target, ed un volume contenente 10µg di DNA viene posto in un tubo sterile da 14mL. Al suo interno vengono aggiunti 300µL di sospensione contenente i protoplasti, 300µL di soluzione PEG (Tabella 4.10) ed il contenuto viene cautamente mescolato per evitare la rottura dei protoplasti. Segue uno shock termico tramite immersione della soluzione in bagnetto a 45°C per 5 minuti per agevolare l'ingresso del DNA nei protoplasti. La soluzione viene fatta lasciata a temperatura ambiente per 10 minuti ed in seguito vengono aggiunte in successione 5 aliquote di 300µL e 5 aliquote da 1 mL di terreno liquido PpNH₄+mannitolo (Tabella 4.11).

Lo stesso procedimento viene effettuato per il controllo negativo contenente protoplasti in assenza di DNA esogeno.

d. Piastramento dei protoplasti trasformati

Viene prelevata dalla soluzione di protoplasti trasformati un'aliquota di 4mL al fine di ridurre il volume della soluzione stessa, ed al rimanente vengono aggiunti 4mL di Top Agar (Tabella 4.12). La soluzione viene mescolata cautamente ed infine 2mL di questa vengono posti su piastre Petri precedentemente predisposte contenenti terreno PpNH₄+mannitolo solido ed un filtro di cellulosa.

Le piastre vengono incubate in camera di crescita a 24°C con fotoperiodo 16h luce e 8h buio per 2 giorni.

e. Selezione dei trasformati

Il mutante *ze* KO soffre particolarmente lo stress osmotico causato dalla presenza di mannitolo nel terreno di coltura; dunque, è necessario trasferirlo dopo 2 giorni di incubazione, in piastre Petri contenenti terreno solido PpNH₄. Il trasferimento avviene spostando il filtro in cellulosa portante il Top Agar al cui interno sono presenti i protoplasti trasformati, dalla piastra contenente mannitolo alla piastra contenente solo terreno PpNH₄, avendo cura di mantenere la sterilità dell'ambiente.

Dopo un totale di 4 giorni di crescita viene effettuata la conta dei protoplasti rigenerati tramite microscopio a scansione, e viene calcolato una stima del numero totale tramite la seguente formula:

$X \text{ numero di protoplasti rigenerati} \times 1600 \times 4 = \text{numero di protoplasti rigenerati/trasformazione}$

Dopo 6 giorni di crescita totali il filtro con protoplasti trasformati viene trasferito in un'ulteriore piastra Petri contenente terreno solidificato PpNH₄ ed antibiotico igromicina al fine di selezionare i protoplasti che

hanno integrato il DNA esogeno. Le piastre vengono nuovamente incubate in camera di crescita come precedentemente effettuato.

f. Selezione dei mutanti stabili

Dopo 7-10 giorni in antibiotico il 90% delle colonie resistenti corrisponde a trasformati instabili. Il filtro portante le colonie viene dunque trasferito in piastre Petri contenenti terreno solido PpNH₄ e viene incubato per altri 10 giorni in camera di crescita.

Le colonie cresciute in seguito vengono sottoposte a screening per analisi di DNA genomico, RT-PCR e immunoblot.

Componenti	Quantità per 100mL
Mannitolo	8.5 g
MgCl ₂	0,305 g
MES	0,1 g
KOH 10N	25µL (pH finale 5.6)

Tabella 4.9: composizione della soluzione MMM

Componenti	Quantità per 50mL
Mannitolo	3.5 g
CaNO ₃	1.18 g
TRIS 1M pH 7.2	0.5 mL
PEG 4000 (p/v)	20 g

Tabella 4.10: composizione della soluzione PEG

Componente	Quantità per 1 L
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0,80g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,0125g
Microelementi (1,000X)	1mL (vedi Tabella 5.3)
KH ₂ PO ₄ -KOH250g/L,pH7.0	1mL
NH ₄ tartrato	0,5g
Mannitolo	66 g
Agar	-

Tabella 4.11: composizione terreno liquido PpNH₄+mannitolo

Componente	Quantità per 1 L
Mannitolo	85 g
Agar	14 g

Tabella 4.12: composizione del terreno Top Agar

4.4.2 Screening delle colonie trasformate tramite RT-PCR

In questo progetto di tesi la fase di screening dei resistenti stabili è stata effettuata su colonie mutanti con genotipo *psbs ze KO*, recentemente trasformate. La trasformazione per ricombinazione omologa è stata effettuata utilizzando il plasmide prodotto in (Alboresi et al., 2010) in cui la regione target *PSBS* (locus XM_001778511) è sostituita dalla cassetta di resistenza per l'antibiotico igromicina. La trasformazione è stata effettuata su piante con background genotipico *ze KO*.

Lo screening dei mutanti viene effettuato tramite tecniche di Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) e immunoblot.

Il seguente paragrafo descrive i procedimenti coinvolti nella RT-PCR.

4.4.3 Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA

a. Isolamento dell'RNA

Un volume di circa 100-250 μ L di protonema di ogni campione viene pestellato in azoto liquido tramite l'utilizzo di mortaio e pestello in ceramica, fino ad essere ridotto a polvere fine. La polvere viene raccolta all'interno di Eppendorf da 1,5mL a cui viene aggiunto 1mL di TRI REAGENT (Sigma, T 9424). La soluzione viene vortexata per 15 secondi per assicurarsi la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici, ed in seguito viene lasciata a temperatura ambiente per 5 minuti. Viene aggiunto un volume di 0.2 mL di cloroformio, il contenuto della Eppendorf viene agitato vigorosamente per 15 secondi ed in seguito lasciato per 15 minuti a temperatura ambiente. La soluzione risultante viene centrifugata a 12000g per 15 minuti a 4°C che permette la separazione di tre fasi: una fase rossa che contiene materiale organico, un'interfase che contiene il DNA ed una fase biancastra che contiene RNA.

La fase contenente RNA viene trasferita in una nuova Eppendorf, a cui viene aggiunto un volume di 0.5 mL di isopropanolo, la soluzione viene mescolata e lasciata per 10 minuti a temperatura ambiente. Segue una centrifuga a 12000g per 10 minuti a 4°C in cui l'RNA precipita formando un pellet nel fondo della Eppendorf. Viene rimosso il surnatante avendo cautela di non toccare il pellet, e viene aggiunto un volume di 1mL di etanolo 75%. La soluzione viene vortexata e centrifugata a 12000g per 5 minuti a 4°C. Con l'ausilio di una micropipetta si preleva la maggior parte del surnatante e si lascia in seguito evaporare l'etanolo sotto cappa aspirante per 5-10 minuti, avendo cura di non lasciarlo evaporare completamente lasciando l'RNA seccare, per non diminuirne la solubilità.

Infine si aggiunge un volume di 50-100 μ L di acqua MilliQ e si incuba in stufa a 60°C per 10 minuti.

La determinazione della concentrazione dell'RNA in soluzione avviene mediante l'ausilio dello spettrofotometro NanoDrop (Thermo-Fisher) il quale è in grado di restituire concentrazioni in ng/ μ L.

b. Eliminazione del DNA genomico dalla soluzione contenente RNA

Al fine di eliminare molecole di DNA presenti nel campione, ad un volume di 8 μ L di soluzione contenente RNA si aggiungono 1 μ L di buffer di reazione con MgCL₂ e 1 μ L di soluzione DNase I, RNase-free (Sigma). Si incuba la soluzione a temperatura ambiente per 30 minuti ed in seguito si aggiunge 1 μ L di Stop-Solution (Sigma) incubando a 65°C per 10 minuti.

c. Retrotrascrizione del cDNA

In una Eppendorf di 1.5mL viene inserita una concentrazione compresa tra 0.1ng/ μ L e 5 μ g/ μ L di RNA raggiungendo un volume massimo di 11.5 μ L. Ad essa viene aggiunto 1 μ L di primer oligo(dT) ed un volume di acqua DEPC per raggiungere un volume totale di 12.5 μ L. La soluzione viene mescolata e centrifugata ad un numero basso di RPM in modo da precipitare tutti i componenti nel fondo della Eppendorf, ed incubata a 65°C per 5 minuti. In seguito, la Eppendorf viene rapidamente passata in ghiaccio creando uno shock termico, e vengono aggiunti i seguenti reagenti: 4 μ L di Reaction Buffer 5X, 0.5 μ L di RiboLock RNase Inhibitor, 2 μ L di dNTP mix 10mM e 1 μ L di trascrittasi inversa RevertAid (Thermo). La soluzione viene incubata a 42°C per 60 minuti, ed infine si ottiene una soluzione contenente cDNA utilizzata in seguito per RT-PCR.

4.4.4 Polymerase Chain Reaction

La Polymerase Chain Reaction (PCR) è un processo che permette di sfruttare l'azione dell'enzima DNA-Polimerasi per l'amplificazione di specifici tratti di DNA. Questo procedimento prevede l'utilizzo di una coppia di Primers forward e reverse, ovvero una sequenza di DNA a singolo filamento lunga 15-20 nucleotidi. I Primers sono complementari alle regioni di inizio dell'amplicone, ovvero la sequenza di DNA target che si vuole amplificare e contengono una sequenza di start che quando incontrata dall'enzima polimerasi dà inizio alla sua attività di copiatura. Ai fini dello screening dei mutanti con genoma *ze psbs* KO la PCR è stata effettuata su piante con genotipo *ze* KO come controllo positivo, *psbs* KO come controllo negativo e *ze psbs* KO come campione da testare. Sono

state testate due colonie resistenti stabili, rispettivamente indicate come clone #1 e clone #2.

La PCR è stata effettuata sulla regione housekeeping *ACTIN* che codifica per la proteina actina, e sulla regione *PSBS* codificante la proteina PsbS, di lunghezza 1386nt. La PCR su gene *ACTINA* viene effettuata per analizzare la qualità del cDNA che viene impiegato.

I primers utilizzati sono riportati nella Tabella 4.13.

Primer	Sequenza
c1_PSBS FOR	5'-CGCTCGAGATGGCTCAAGCTGCACTCATTTG
c1_PSBS REV	5'-CGGTAACTCAGTCCTCGATGTCGTCGTCG

Tabella 4.13: Primers utilizzati nella PCR per lo screening dei mutanti *ze psbs* KO.

La reazione di PCR necessita di diversi reagenti. All'interno di una Eppendorf da 1,5mL viene preparata una soluzione mix. Al suo interno sono contenuti tutti i reagenti necessari all'amplificazione del DNA target. Per ogni campione da analizzare vengono posti 1µL di Primer Forward, 1µL di Primer Reverse, 5µL di Taq Polimerasi, 2µL di acqua MilliQ e 1µL di cDNA del campione stesso. La PCR avviene grazie all'utilizzo di un termociclatore il quale permette di programmare la temperatura ed il tempo necessari agli step della reazione.

- Denaturazione: permette la separazione dei filamenti del DNA templato, ottenendo DNA a singolo filamento necessario per lo step successivo. La temperatura di questo step generalmente è di 98°C per una durata di 30 secondi.
- Annealing: in questa fase i Primers si legano al DNA a singolo filamento nella regione cui sono complementari. La temperatura di questa fase dipende dalla composizione in base della sequenza e dalla lunghezza dei primers.
- Estensione: attraverso l'incremento della temperatura permette il legame della Taq Polimerasi ai primers e la sua attivazione. L'enzima utilizza il singolo filamento come templato e sintetizza un nuovo filamento complementare di DNA. La durata di questa fase dipende dall'efficienza di copiatura dell'enzima Taq Polimerasi misurata in (numero di basi copiate/secondo), la temperatura dipende dal tipo di enzima utilizzato.

Questi step vengono ripetuti ciclicamente fino a 35 volte, e sono in grado di generare milioni di copie dell'amplicone.

Le specifiche della PCR utilizzate in questo progetto di tesi sono riportate nella tabella 4.14.

Componenti PCR	Amplificazione <i>PSBS</i>	Amplificazione <i>ACTINA</i>
Taq Polimerasi	SuperFi	Orange
Denaturazione	98 °C x 30s	98 °C x 30s
Annealing	60 °C x 10s	56 °C x 10s
Estensione	72 °C x 30s	72 °C x 30s
numero di cicli	35	35

Tabella 4.14: specifiche della PCR effettuata per amplificare la regione *PSBS* e *ACTINA*

4.4.5 Elettroforesi su gel di agarosio

La corsa elettroforetica su gel di agarosio è una tecnica utilizzata per la separazione dei frammenti di DNA in base alla loro dimensione. L'agarosio è un polimero polisaccaride formato da subunità di agarobiosio ripetute. Durante la solidificazione, il polimero costituisce una stretta maglia in grado di regolare la velocità di migrazione delle molecole di DNA che scorrono attraverso di esso, in base alla loro dimensione. Più i frammenti sono lunghi, più lentamente migreranno e viceversa.

I gruppi fosfato che costituiscono i frammenti di DNA li rendono carichi negativamente. Questa carica viene sfruttata per far scorrere le molecole all'interno di un gel di agarosio su cui viene applicato un campo elettrico. Da un'estremità del gel è presente un anodo (-) e dall'altra un catodo (+). I frammenti di DNA posti all'interno di questo campo elettrico migrano verso il polo positivo, ed incontrando la maglia costituita dall'agarosio scorrono con velocità differenti in base alla loro dimensione.

All'interno del gel viene posto un marcatore di peso molecolare (Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder), contenente molecole di lunghezze determinate e colorate diversamente, che permette di visualizzare con chiarezza l'altezza cui i frammenti delle diverse dimensioni migrano.

Il gel viene preparato sciogliendo 0,5g di agarosio in 50mL di TAE (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA), a cui viene aggiunto un agente intercalante in grado di legare i frammenti di DNA e renderli visibili quando illuminati con luce UV.

Il gel viene lasciato solidificare su un apposito supporto, ed in seguito viene inserito in uno strumento in grado di generare un campo elettrico. Il DNA amplificato dalla PCR viene inserito nei relativi pozzetti e viene applicata una differenza di potenziale di circa 100mV per 20 minuti. Al termine della corsa elettroforetica il gel viene esposto a luce UV per visualizzare le bande di migrazione.

5 RISULTATI

5.1 Acclimatazione del genotipo WT alle tre condizioni di luce

5.1.1 Analisi della composizione dell'apparato fotosintetico

Per valutare la capacità di acclimatazione di *P. patens*, il genotipo WT è stato sottoposto alle tre condizioni di luce: luce di controllo (CL), alta luce (HL) e luce fluttuante (FL) come illustrato in Figura 5.1. Sulle piante acclimate sono state svolte analisi delle capacità fotosintetiche della pianta mediante Western Blot, e spettroscopia del segnale ECS.

L'immunoblot in Figura 5.1A mostra il diverso accumulo di proteine dell'apparato fotosintetico, in piante con genotipo WT acclimate in condizioni di CL, HL e FL. In particolare, attraverso l'analisi quantitativa per densitometria, si osserva un incremento dell'accumulo della proteina Rubisco in condizioni di HL, ed una sua diminuzione in condizioni di FL, comparato con l'accumulo in condizioni di CL. La proteina Rubisco costituisce il primo enzima che agisce nel Ciclo di Calvin-Benson, responsabile della produzione di carboidrati parte dei quali vanno a costituire la biomassa stessa della pianta.

L'accumulo di LHCII, dall'analisi per immunoblot sembra restare pressoché invariato nelle tre condizioni di luce.

Il complesso proteico PsbS mostra un accumulo incrementato in condizioni di crescita in HL e FL rispetto a quello presentato dallo stesso genotipo in condizioni di CL.

L'accumulo della proteina D2 risulta essere diminuito in condizioni di crescita in HL rispetto alle condizioni di CL, ed una leggera diminuzione sembra emergere anche in condizioni di FL. La proteina D2 è una componente del core del fotosistema secondo PSII.

L'accumulo di FlvB risulta aumentato in condizioni di HL e FL, comparato a quello che emerge in condizioni di CL. In particolare, il suo accumulo è maggiore in condizioni di FL rispetto alle condizioni di HL. FlvB è costitutivo del complesso FLV responsabile del meccanismo fotoprotettivo di trasporto elettronico pseudo-ciclico intorno al fotosistema primo PSI.

L'accumulo della proteina PsaD, subunità del PSI che attacca la ferredossina, risulta aumentato in condizioni di HL e FL paragonato alle condizioni di crescita in CL.

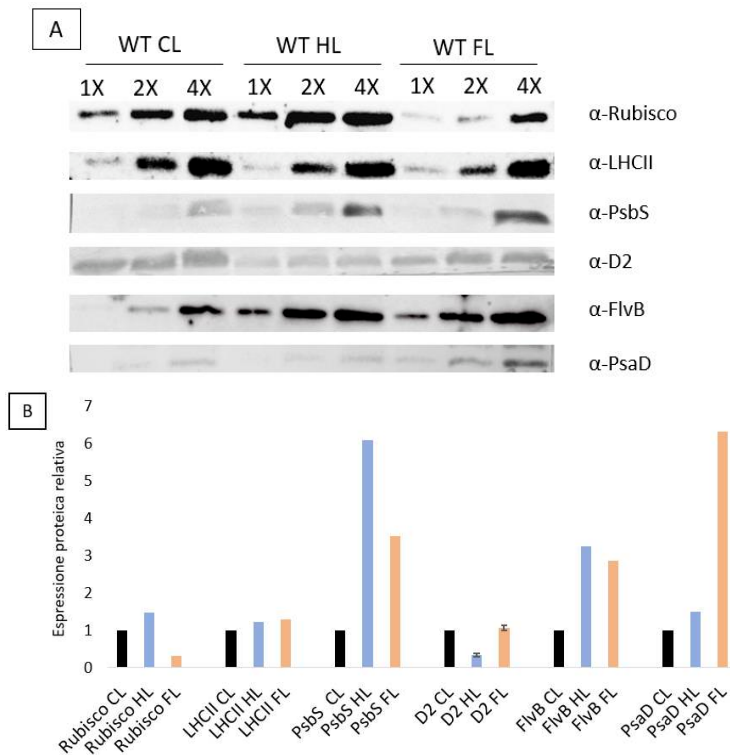


Figura 5.1: A) Immunoblot eseguito su estratti proteici di piante con genotipo WT acclimate a condizioni di CL, HL e FL. Gli estratti sono stati caricati nel gel per Western Blot seguendo un fattore crescente di concentrazione delle clorofille: 1X, 2X, 4X, al fine di ottimizzare l'ibridazione con l'anticorpo secondario. Le membrane sono state ibridate con anticorpi secondari specifici per le proteine Rubisco, LHCII, PsbS, FlvB e Psad. B) Espressione proteica relativa standardizzata sul contenuto proteico della proteina analizzata del genotipo WT cresciuto in CL. La misura è stata eseguita su una singola replica per il contenuto di Rubisco, LHCII, PsbS, FlvB e Psad, mentre per la proteina D2 è rappresentata come media e deviazione standard di due repliche.

L'analisi della composizione dell'apparato fotosintetico viene effettuata anche attraverso tecniche di spettroscopia in grado di misurare il rapporto stechiometrico PSI/PSII. Tramite l'applicazione dell'effetto dell'electrocromismo e la misura del segnale ECS (Electro Chromic Shift), è stata quindi analizzata la composizione in PSI/PSII del genotipo WT dopo l'acclimatazione nelle tre condizioni di luce.

Questa analisi ha prodotto il risultato che si osserva in Figura 5.2, da cui non emergono differenze significative tra i valori assunti dal rapporto PSI/PSII del genotipo WT cresciuto in condizioni di CL, HL e FL.

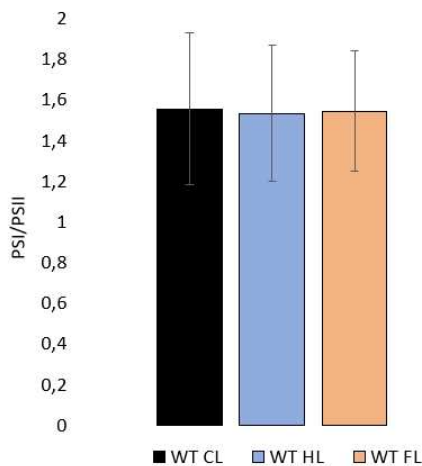


Figura 5.2: Misura del rapporto stechiometrico PSI/PSII del genotipo WT cresciuto in condizioni di CL (nero), HL (blu) e FL (arancione). Il rapporto è rappresentato come media e deviazione standard di 17 repliche per WT CL, 9 repliche per WT HL e 5 repliche per WT FL. La significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

5.1.2 Analisi dell'efficienza fotosintetica

L'analisi dell'efficienza fotosintetica viene effettuata tramite misure fluorimetriche che sfruttano l'emissione di fluorescenza da parte del PSII, e tramite misure di assorbimento di luce far-red da parte del PSI. Per lo studio della capacità fotosintetica le piante vengono sottoposte a luce attinica a $850\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ per 8 minuti, ed in seguito viene misurato il recupero al buio per 10 minuti. La durata totale della misura è di 18 minuti.

Una prima misura rappresentativa della capacità fotosintetica della pianta è il rapporto F_v/F_m (Figura 5.3). Questo indica l'efficienza fotosintetica del PSII, e quando assume valori compresi tra 0,7 e 0,8 è indice di buone capacità fotosintetiche della pianta. Per genotipi WT cresciuti per 10 giorni in condizioni di CL, HL e FL, il rapporto tra fluorescenza variabile e fluorescenza massima non presenta valori significativamente differenti ed in tutte le condizioni di luce risulta superiore a 0,7. Questo indica che il genotipo WT è effettivamente acclimatato a quelle condizioni.

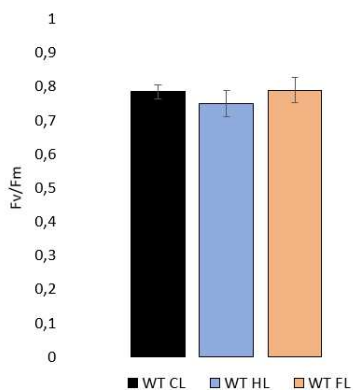


Figura 5.3: Rapporto F_v/F_m di piante con genotipo WT cresciute in condizioni di CL (nero), HL (blu), FL (arancione). La significatività della differenza tra Wt CL e WT HL/FL è calcolata tramite test univariato di Kruskal-Wallis.

Analizzando l'acclimatazione dal punto di vista della capacità di attivazione del meccanismo del non-photochemical quenching (NPQ) risulta che piante con genotipo WT acclimate a condizioni di luce HL sono in grado di maggiori livelli di attivazione di NPQ comparate alle piante cresciute in condizioni di FL e CL (Figura 5.4).

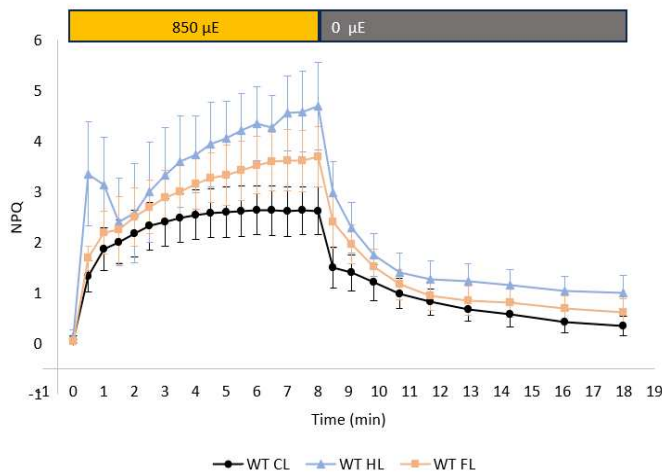


Figura 5.4: Cinetica di attivazione del meccanismo NPQ in piante con genotipo WT acclimate a condizioni di CL (nero), HL (blu) e FL (arancione).

Le barre in alto indicano la durata delle misure durante l'esposizione a luce attinica (giallo) e al buio (grigio).

Numero repliche WT CL: 15; WT HL: 11, WT FL: 6. La significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

L'analisi dei parametri relativi all'efficienza fotosintetica del PSII, ossia $Y(II)$, $Y(NPQ)$ e $Y(NO)$ mostrano come in condizioni di acclimatazione a FL non vi sia una differenza significativa rispetto al WT cresciuto in CL.

L'acclimatazione a condizione di HL comporta una maggior dissipazione dell'energia in maniera controllata sotto forma di calore nella via del NPQ, nei primi minuti di esposizione a luce attinica. Questo risultato si può osservare nella cinetica relativa al parametro $Y(NPQ)$ in Figura 5.5, in cui il genotipo WT cresciuto in condizioni di HL mostra un fenotipo $Y(NPQ)$ maggiore rispetto alle condizioni di CL e FL in corrispondenza dei primi minuti di esposizione alla luce. Questa maggior conversione di energia in calore, comporta una diminuzione della sua dissipazione in maniera non controllata sotto forma di fluorescenza, indicata dal parametro $Y(NO)$.

Un altro parametro relativo al PSII che è stato analizzato è quello indicato come 1-qL. Questa misura rappresenta la frazione di centri di reazione del PSII che si trovano in uno stato chiuso, definendo lo stato redox del chinone Q_A accettore primario del PSII. Nelle tre condizioni di acclimatazione il genotipo WT non mostra livelli significativamente diversi di questo parametro.

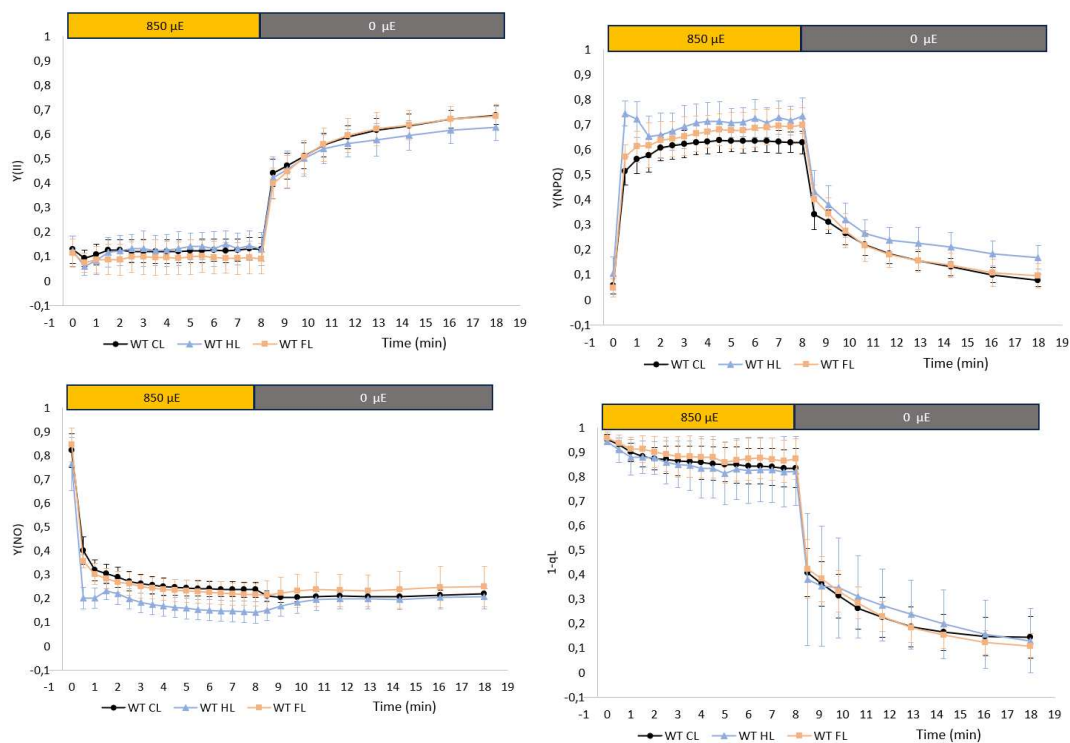


Figura 5.5: Parametri fotosintetici relativi al PSII. Y(II): indice dell'efficienza quantica del PSII; Y(NPQ): indice della frazione di energia dissipata in maniera controllata sotto forma di calore dal meccanismo NPQ; Y(NO): indice dell'energia dissipata in maniera non controllata sotto forma di fluorescenza; 1-qL: indice della frazione di centri di reazione chiusi del PSII.

I parametri sono relativi al genotipo WT acclimatato in condizioni di CL (nero), HL (blu), FL (arancione). La significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

Per quanto riguarda l'efficacia fotosintetica del PSI, le misure vengono effettuate contemporaneamente a quelle relative al PSII, ma i parametri vengono rilevati assorbimento nello spettro far-red. In particolare, vengono rilevati tre parametri relativi a: efficienza quantica del PSI, livello di donor side limitation e livello di acceptor side limitation, rispettivamente indicati come Y(I), Y(ND), Y(NA).

I risultati ottenuti dalla misura di questi tre parametri non mostrano differenze significative da parte del genotipo WT acclimatato in condizioni di crescita in CL, HL e FL (Figura 5.6)

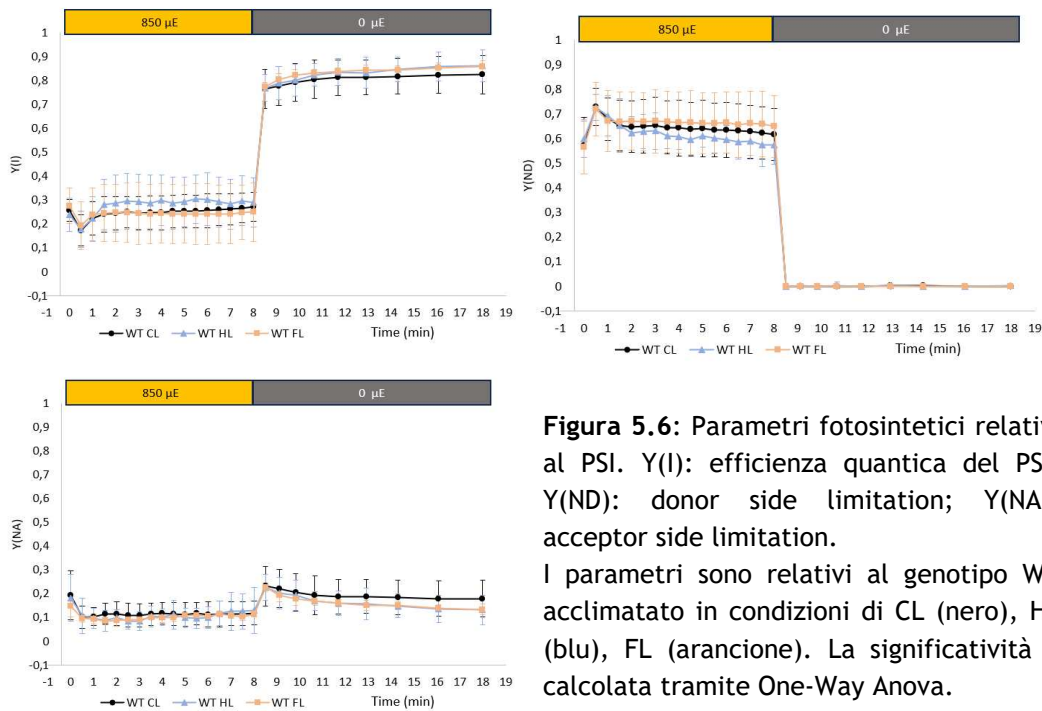


Figura 5.6: Parametri fotosintetici relativi al PSI. Y(I): efficienza quantica del PSI; Y(ND): donor side limitation; Y(NA): acceptor side limitation. I parametri sono relativi al genotipo WT acclimatato in condizioni di CL (nero), HL (blu), FL (arancione). La significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

Le differenze tra genotipi WT cresciuti in condizioni di CL, HL e FL durante l'esposizione a luce attinica sono state esaminate tramite test statistico One-Way ANOVA, i *p-values* sono riportati nella Tabella 5.1 per i parametri relativi al PSII, e nella Tabella 5.2 per i parametri relativi al PSI.

Genotipi comparati	Y(II)	Y(NPQ)	Y(NO)	1-qL	NPQ
WT CL vs. WT HL	0,548554	0,079012	0,07367	9,54E-06	4,2E-05
WT CL vs. WT FL	9,47E-11	0,397101	0,763648	0,041866	0,023636

Tabella 5.1: One-Way ANOVA dei parametri relativi al PSII. Per il calcolo del *p-value* è stato utilizzato ogni punto della misura relativo alla fase di esposizione alla luce attinica. I *p-value*<0.05 sono evidenziati in verde.

Genotipi comparati	Y(I)	Y(ND)	Y(NA)
WT CL vs. WT HL	0,003202	0,006811	0,247074
WT CL vs. WT FL	0,510469	0,066845	0,023201

Tabella 5.2: One-Way ANOVA dei parametri relativi al PSI. Per il calcolo del *p-value* è stato utilizzato ogni punto della misura relativo alla fase di esposizione alla luce attinica. I *p-value*<0.05 sono evidenziati in verde.

5.1.2 Analisi della capacità di crescita

Il test di crescita permette una semplice visualizzazione del processo di acclimatazione delle piante alle tre condizioni di luce, e di monitorarne la crescita dell'organismo in un periodo totale di 30 giorni.

Una prima immagine (Figura 5.7) permette di osservare visivamente le differenze al giorno 30 di crescita del genotipo WT nelle tre condizioni di luce.

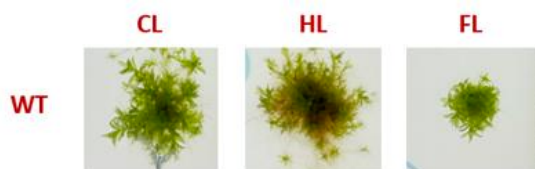


Figura 5.7: Immagine rappresentativa della crescita al giorno 30 del genotipo WT acclimato a condizioni di CL, HL e FL.

All'osservazione visiva viene associata una misura digitalizzata della densità integrata in relazione ai pixel dell'immagine, la quale racchiude due diverse dimensioni di variazione di crescita dello spot: il diametro e la densità di crescita. La densità integrata dello spot al giorno 30 della crescita viene normalizzata a quella misurata al giorno 1 dello stesso spot per evitare errori di variabilità legati alla dimensione iniziale dello spot. I dati vengono rappresentati come media e deviazione standard della densità integrata al giorno 30 di crescita dello spot analizzato, normalizzata sulla densità integrata del genotipo WT CL al giorno 30 (Figura 5.8 A). Alla misura della densità integrata si associa una misura del rapporto F_v/F_m per analizzare la capacità fotosintetica della pianta durante l'acclimatazione.

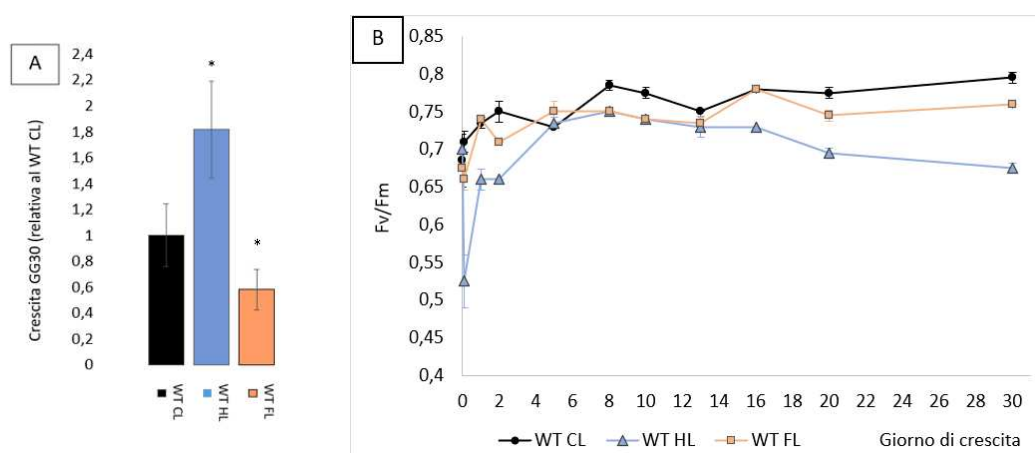


Figura 5.8: A) Analisi della densità integrata. Variazione del fenotipo di crescita del genotipo WT acclimato a CL (nero), HL (blu), FL (arancione). B) Rapporto F_v/F_m misurato durante il test di crescita. Sull'asse X viene rappresentato il tempo in numero di ore. Il genotipo WT nelle condizioni di acclimatazione mantiene il codice colore descritto nella figura A.

Tutte le misure sono relative a media e deviazione standard calcolate su due repliche. La significatività della differenza osservata tra WT CL e WT HL/FL è calcolata tramite test univariato di Kruskal-Wallis. I dati con $p\text{-value} < 0.05$ sono indicati con *.

Dall'analisi della densità integrata si osservano diverse tendenze di crescita nel genotipo WT acclimatato nelle tre condizioni di luce. In particolare, in condizioni di HL si osserva una crescita significativamente aumentata rispetto a quella che si osserva in CL. La pianta acclimatata in FL, invece, mostra un fenotipo di crescita minore comparato alle altre due condizioni di luce.

L'analisi del rapporto F_v/F_m mostra che in condizioni di HL, inizialmente vi è una significativa diminuzione dell'efficienza fotosintetica del PSII, che in seguito torna ad aumentare ma assumendo valori inferiori a quelli mostrati in condizioni di CL e FL. I valori assunti dal rapporto F_v/F_m nelle condizioni di crescita a FL mostrano un fenotipo simile a quello assunto dalle piante cresciute in CL. Le piante mostrano il picco massimo di efficienza fotosintetica del PSII tra il giorno 8 e il giorno 12 (tra le 200 e le 300 ore) ed in seguito si osserva una tendenza alla diminuzione dei valori assunti dal rapporto F_v/F_m .

I risultati ottenuti dall'analisi tramite Western Blot della composizione dell'apparato fotosintetico del genotipo WT cresciuto nelle tre condizioni di luce hanno evidenziato una differenza nell'accumulo di proteine medianti i trasporti elettronici alternativi ed attivatrici dell'NPQ. Per approfondire questo risultato ed analizzare il ruolo dei meccanismi PCEF, CEF ed NPQ nell'acclimatazione a condizioni di HL e FL, sono stati svolti medesimi esperimenti per i genotipi mutanti di tali meccanismi.

5.2 Acclimatazione dei mutanti dei trasporti elettronici alternativi alle tre condizioni di luce

L'analisi dell'efficienza fotosintetica dei mutanti dei trasporti elettronici ciclici e pseudo-ciclici di *P. patens* permette di avere un quadro più chiaro del ruolo e l'importanza di ogni componente dei meccanismi fotoprotettivi, nei processi di acclimatazione a condizioni di CL, HL e FL. Una prima valutazione viene effettuata misurando i valori assunti dal rapporto F_v/F_m dai diversi mutanti cresciuti nelle tre condizioni di luce (Figura 5.9). Il mutante *flvA flvB* KO, mancante del complesso FLV responsabile del trasporto elettronico pseudo-ciclico (PCEF) presenta un rapporto F_v/F_m paragonabile al WT in condizioni di crescita a CL, mentre in condizioni di HL assume valori leggermente inferiori al WT nelle medesime condizioni. In condizioni di FL, dove il ruolo del complesso FLV è noto essere essenziale (Gerotto et al., 2016), il mutante *flvA flvB* KO assume valori di F_v/F_m significativamente inferiori al genotipo WT cresciuto nelle stesse condizioni di luce. Inoltre, in condizioni di FL il

rapporto F_v/F_m del mutante *flvA flvB* KO assume valori inferiori a 0.7, indicando uno stato di stress per la pianta.

L'analisi del rapporto F_v/F_m del genotipo mutante *pgrl1* KO, il quale manca del complesso PgrL1 mediante una delle vie del trasporto ciclico degli elettroni (CEF) intorno al fotosistema primo (PSI), ha prodotto i seguenti risultati: in condizioni di crescita a CL e FL il rapporto F_v/F_m assume valori paragonabili a quelli del genotipo WT nelle medesime condizioni; in condizioni di HL si osserva un notevole e significativo decremento dei valori assunti dal rapporto F_v/F_m paragonato al genotipo WT cresciuto in HL. In particolare, anche in questo caso, i valori assunti risultano inferiori a 0.7, indicando uno stato di stress fotosintetico per il mutante *pgrl1* KO in HL.

Allo stesso modo del mutante *pgrl1* KO, anche il mutante *pgrl1 ndhm* KO mostra valori di F_v/F_m significativamente diminuiti in condizioni di HL, mentre in condizioni di CL e FL resta paragonabile al genotipo WT. La mancanza del complesso NDH-1, sembra non avere particolare effetto in mancanza del complesso PgrL1 per quanto riguarda l'efficienza quantica del PSII rappresentata dal rapporto F_v/F_m .

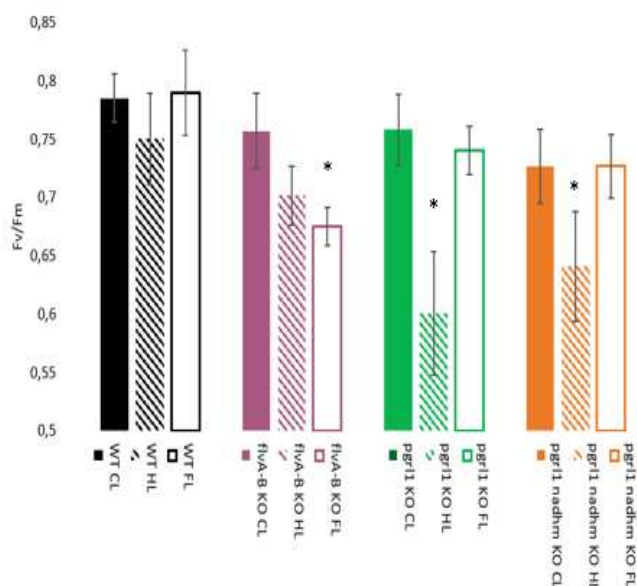


Figura 5.9: rapporto F_v/F_m dei genotipi mutanti dei trasporti elettronici ciclici e pseudo-ciclici intorno al PSI. Il rapporto indica l'efficienza quantica del fotosistema secondo (PSII).

Le misure sono riferite ai genotipi WT (nero), *flvA flvB* KO (viola), *pgrl1* KO (verde), *pgrl1 ndhm* KO (arancione), acclimatati nelle tre condizioni di luce CL (riempimento completo), HL (riempimento diagonale), FL (bordo colorato).

La significatività della differenza tra genotipo WT e mutante, cresciuti nella

medesima condizione di luce, è calcolata tramite test univariato di Kruskal-Wallis. Le misure con $p\text{-value} < 0.05$ sono indicate con *.

Le differenze tra genotipi WT e mutanti durante l'esposizione a luce attinica sono state esaminate tramite test statistico One-Way ANOVA, i $p\text{-values}$ sono riportati nella Tabella 5.3 per i parametri relativi al PSII, e nella Tabella 5.4 per i parametri relativi al PSI.

Al fine di indagare il ruolo fotoprotettivo delle singole componenti dei meccanismi di trasporto ciclico e pseudo-ciclico degli elettroni, sono stati analizzati i parametri di efficienza fotosintetica relativi al PSII ed al PSI. Queste analisi sono state condotte tramite misure di fluorescenza e spettri di assorbimento, esponendo il materiale vegetale ad una luce attinica di intensità $850\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ per 8 minuti, in grado di attivare i meccanismi di fotoprotezione, ed a 10 minuti di buio per misurarne il rilassamento.

Per quanto riguarda i parametri fotosintetici relativi alle capacità fotosintetiche del PSII in condizioni di CL, si osserva che in corrispondenza dell'accensione della luce attinica, vi è una diversa distribuzione dell'energia tra via fotochimica Y(II), via del non-photochemical quenching Y(NPQ) e via della fluorescenza Y(NO), a seconda della mutazione che portano i diversi genotipi (Figura 5.10).

Il mutante *flvA flvB* KO in condizioni di CL mostra una diminuzione del parametro Y(II) rispetto al genotipo WT in CL, ovvero una minor frazione di energia impiegata per la reazione fotochimica. Analizzando i parametri Y(NPQ) ed Y(NO), si osserva che per il mutante *flvA flvB* KO vi è un incremento del parametro Y(NO) in corrispondenza della diminuzione dei valori assunti dal parametro Y(II). Il mutante *pgrl1* KO al contrario non mostra particolari differenze significative in condizioni di CL rispetto al genotipo WT. Il mutante *pgrl1 ndhm* KO, invece, mostra un fenotipo paragonabile al mutante *flvA flvB* KO comparato al genotipo WT in condizioni di CL. Infatti, all'accensione della luce attinica si osserva una diminuzione della frazione di energia che viene impiegata per la reazione fotochimica nel PSII, a cui corrisponde un incremento della frazione dissipata in maniera non regolata.

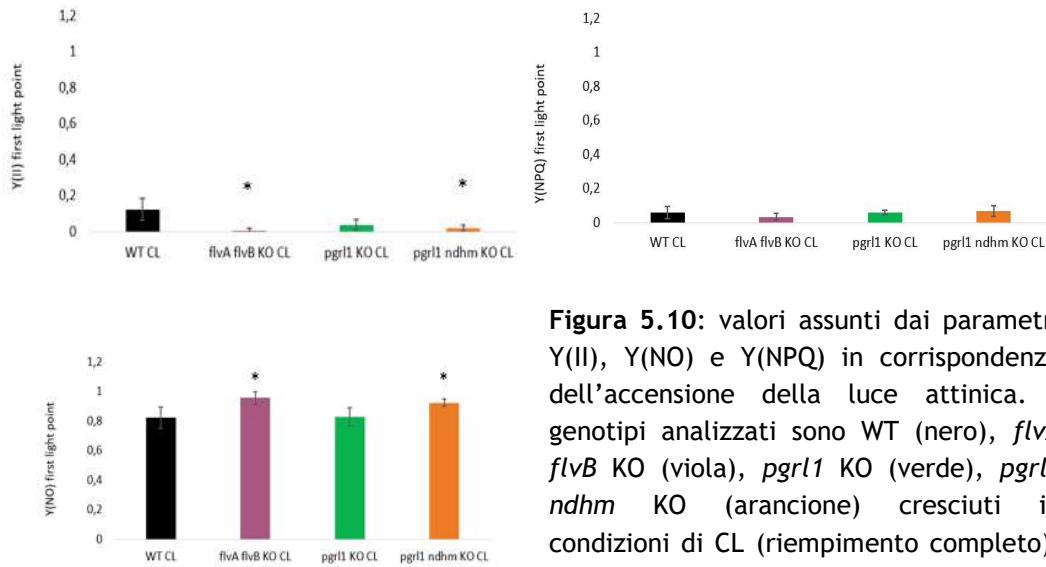


Figura 5.10: valori assunti dai parametri Y(II), Y(NO) e Y(NPQ) in corrispondenza dell'accensione della luce attinica. I genotipi analizzati sono WT (nero), *flvA flvB* KO (viola), *pgr1* KO (verde), *pgr1 ndhm* KO (arancione) cresciuti in condizioni di CL (riempimento completo). La significatività della differenza tra

genotipo WT e mutante è calcolata con test univariato di Kruskal-Wallis. Le misure con $p\text{-value} < 0.05$ sono indicate con *.

La cinetica dei parametri Y(II), Y(NPQ) ed Y(NO), per il restante tempo di misura, resta pressochè invariata per tutti i genotipi mutanti paragonati al genotipo WT in condizioni di crescita a CL (Figura 5.11).

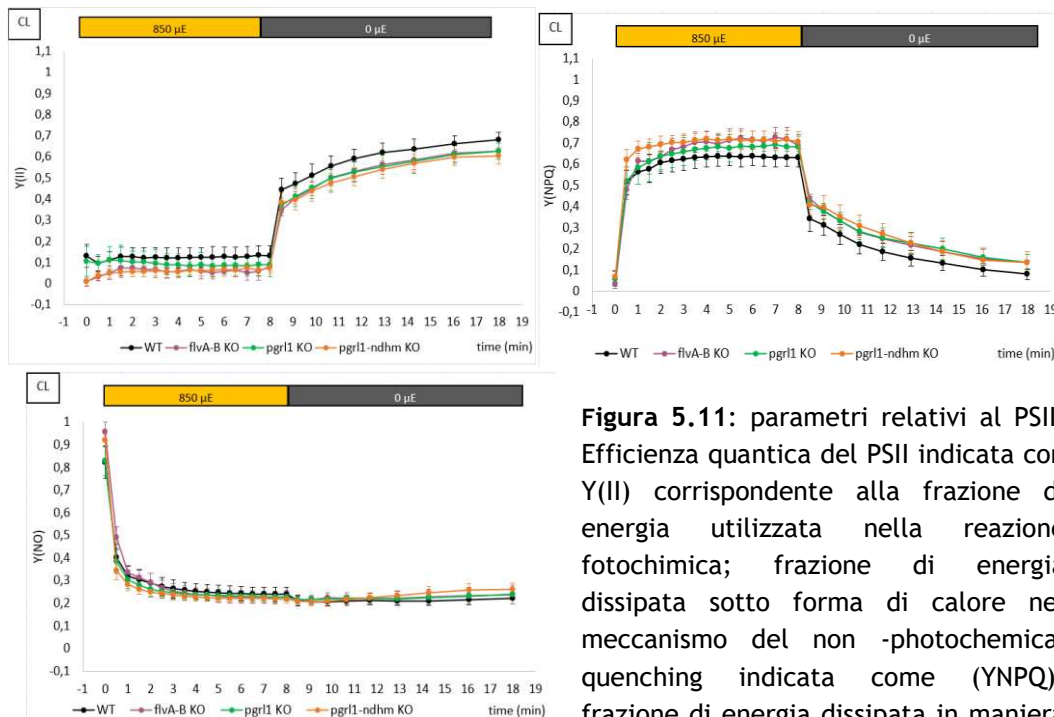


Figura 5.11: parametri relativi al PSII. Efficienza quantica del PSII indicata con $Y(II)$ corrispondente alla frazione di energia utilizzata nella reazione fotochimica; frazione di energia dissipata sotto forma di calore nel meccanismo del non-photochemical quenching indicata come $Y(NPQ)$; frazione di energia dissipata in maniera

non regolata sotto forma di fluorescenza indicata come $Y(NO)$. I genotipi analizzati sono cresciuti per 10 giorni in condizioni di CL (marker circolare). Il genotipo WT viene indicato con il colore nero, il genotipo *flvA flvB* KO con il colore viola, il genotipo *pgr1* KO con il colore verde, il genotipo *pgr1 ndhm* KO con il colore arancione. La significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

Altri due parametri del PSII che vengono analizzati tramite le misure di fluorescenza sono quelli relativi alla cinetica di attivazione del meccanismo del quenching non fotochimico ed alla frazione di centri di reazione del PSII che si trovano allo stato chiuso, indicati come NPQ ed $1-q_L$. L'analisi di questi due parametri per i genotipi WT e mutanti dei trasporti elettronici alternativi cresciuti in condizioni di luce di controllo (CL) è riportata in Figura 5.12.

In queste condizioni i mutanti *flvA flvB* KO, *pgr1* KO e *pgr1 ndhm* KO mostrano valori simili di attivazione del meccanismo NPQ rispetto a quelli presentati dal genotipo WT. La frazione di centri di reazione allo stato chiuso, indice dello stato redox ridotto del chinone Q_A degli stessi mutanti è paragonabile a quella presentata dalle piante WT in condizioni di crescita a CL.

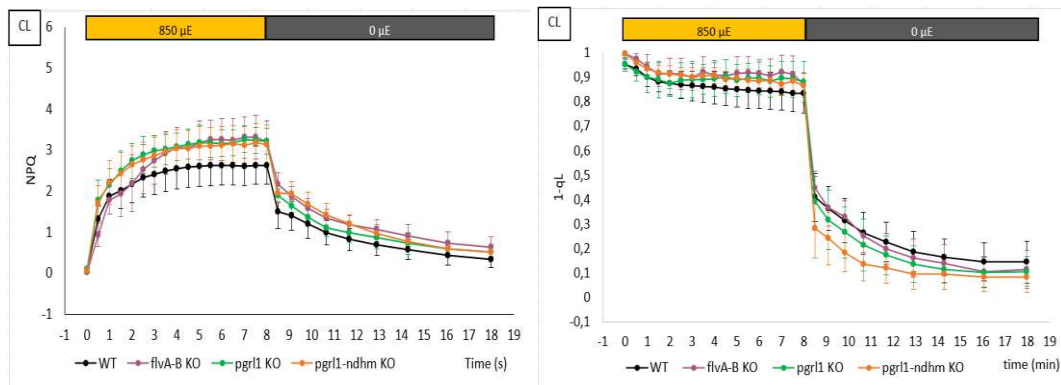


Figura 5.12: cinetica di attivazione del meccanismo del quenching non fotochimico (NPQ) e misura della frazione di centri di reazione allo stato chiuso (1-qL). Le misure sono relative a piante con genotipo WT (nero), *flvA flvB* KO (viola), *pgrl1* KO (verde), *pgrl1 ndhm* KO (arancione), cresciute in condizioni di CL (marker circolare pieno). La significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

Analizzando i valori assunti dal parametro 1-qL all'accensione della luce attinica, si osserva che il genotipo mutante *flvA flvB* KO cresciuto in condizioni di CL assume valori significativamente superiori rispetto al genotipo WT e molto vicini al valore massimo 1 (Figura 5.13). Il medesimo risultato si ottiene all'analisi del parametro 1-qL all'accensione della luce attinica relativo al mutante *pgrl1 ndhm* KO.

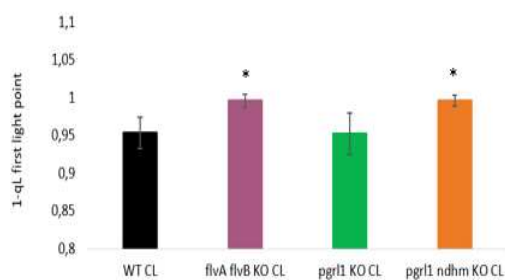


Figura 5.13: valori assunti dal parametro 1-qL all'accensione della luce attinica. I genotipi analizzati sono WT (nero), *flvA flvB* KO (viola), *pgrl1* KO (verde), *pgrl1 ndhm* KO (arancione) cresciuti in condizioni di CL (riempimento completo). La significatività della differenza tra genotipo WT e mutante è calcolata con test univariato di Kruskal-Wallis. Le misure con $p\text{-value} < 0.05$ sono indicate con *.

L'analisi dei parametri fotosintetici relativi al fotosistema secondo (PSII) dei genotipi mutanti dei trasporti ciclici e pseudo-ciclici cresciuti in condizioni di alta luce (HL), hanno rivelato risultati significativamente differenti in corrispondenza dell'accensione della luce attinica (Figura 5.14). Il genotipo *flvA flvB* KO cresciuto in condizioni di HL mostra una minor efficienza quantica del PSII, indicata dal parametro Y(II), rispetto al genotipo WT nella medesima condizione di luce. Ad una diminuzione del parametro Y(II) corrisponde un incremento del parametro Y(NO), il

quale indica la frazione di energia che viene dissipata come fluorescenza in maniera non regolata.

Il mutante *pgrl1* KO, invece, in corrispondenza di una diminuzione dei valori assunti dal parametro Y(II), mostra un incremento del parametro Y(NPQ); mentre i valori assunti dal parametro Y(NO) restano paragonabili a quelli esibiti dal genotipo WT nella medesima condizione di luce.

Il mutante *pgrl1 ndhm* KO mostra valori di Y(II), Y(NPQ) e Y(NO) paragonabili a quelli presentati dal mutante *pgrl1* KO.

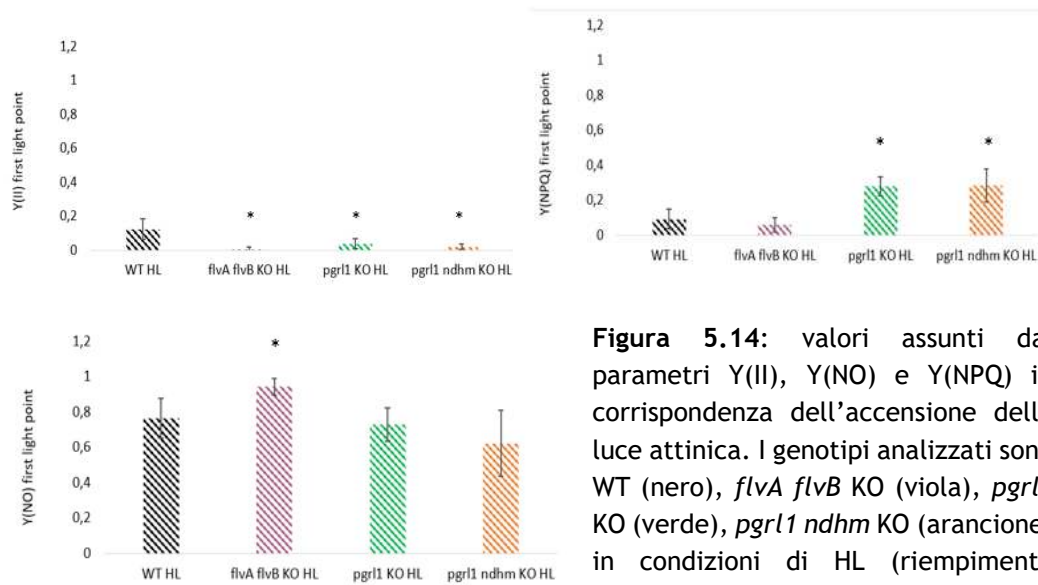


Figura 5.14: valori assunti dai parametri Y(II), Y(NO) e Y(NPQ) in corrispondenza dell'accensione della luce attinica. I genotipi analizzati sono WT (nero), *flvA flvB* KO (viola), *pgrl1* KO (verde), *pgrl1 ndhm* KO (arancione) in condizioni di HL (riempimento diagonale). La significatività della

differenza tra genotipo WT e mutante è calcolata con test univariato di Kruskal-Wallis. Le misure con *p-value* < 0.05 sono indicate con *.

La cinetica dei parametri Y(II), Y(NPQ) ed Y(NO), per il restante tempo di misura, resta pressochè invariata per tutti i genotipi mutanti paragonati al genotipo WT in condizioni di crescita ad HL (Figura 5.15).

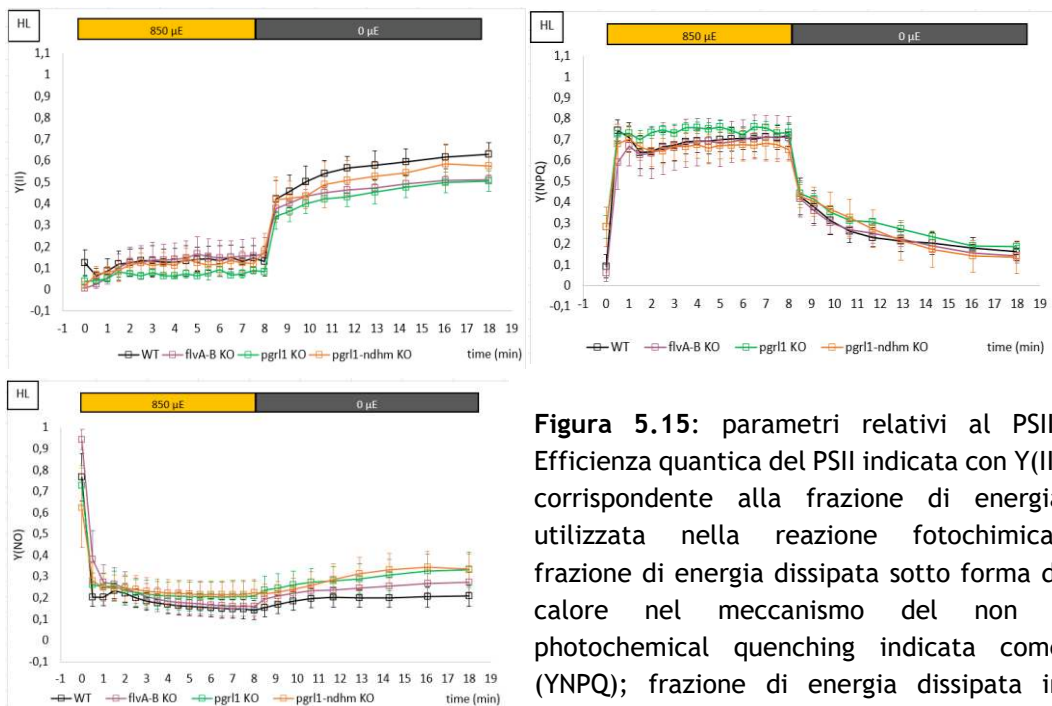


Figura 5.15: parametri relativi al PSII. Efficienza quantica del PSII indicata con Y(II) corrispondente alla frazione di energia utilizzata nella reazione fotochimica; frazione di energia dissipata sotto forma di calore nel meccanismo del non-photochemical quenching indicata come Y(NPQ); frazione di energia dissipata in maniera non regolata sotto forma di

fluorescenza indicata come Y(NO). I genotipi analizzati sono cresciuti per 10 giorni in condizioni di HL (marker quadrato). Il genotipo WT viene indicato con il colore nero, il genotipo *flvA flvB* KO con il colore viola, il genotipo *pgr1* KO con il colore verde, il genotipo *pgr1 ndhm* KO con il colore arancione. La significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

L'analisi della cinetica di attivazione del meccanismo NPQ da parte dei genotipi mutanti dei trasporti elettronici alternativi attorno al PSI, cresciuti in condizioni di alta luce (HL), mostra valori comparabili ai livelli di attivazione del meccanismo da parte del genotipo WT in HL (Figura 5.16). Allo stesso modo le misure del parametro 1-qL mostrano valori simili tra genotipi mutanti e genotipo WT, cresciuti in condizioni di HL.

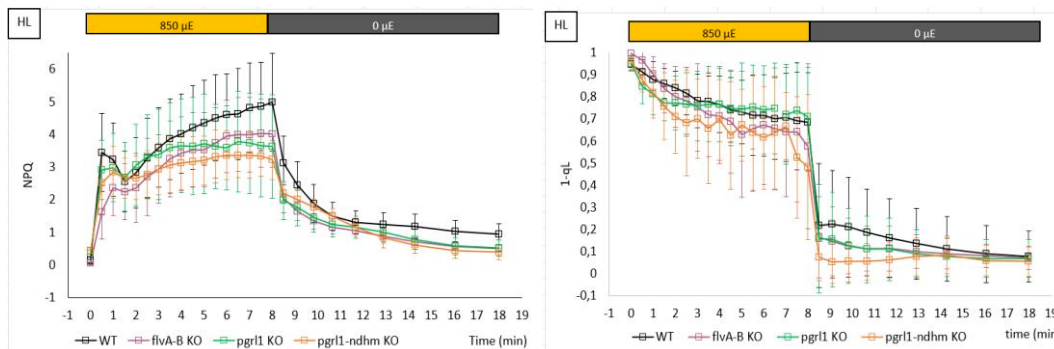


Figura 5.16: cinetica di attivazione del meccanismo del quenching non fotochimico (NPQ) e misura della frazione di centri di reazione allo stato chiuso (1-qL). Le misure sono relative a piante con genotipo WT (nero), *flvA flvB* KO (viola), *pgr1* KO (verde), *pgr1 ndhm* KO (arancione), cresciute in condizioni di HL (marker quadrato vuoto). La significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

Analizzando la frazione di centri di reazione chiusi del PSII all'accensione della luce, si osserva che solamente il genotipo mutante *flvA flvB* KO mostra valori significativamente differenti dal genotipo WT, cresciuti in condizioni di HL (Figura 5.17). In particolare, i valori assunti dal parametro 1-qL del mutante privo del complesso FLV sono superiori rispetto a quelli assunti dal genotipo WT, e molto vicini al valore massimo 1.

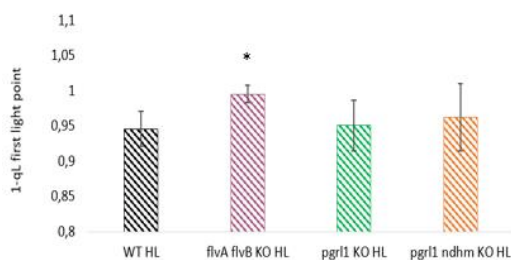


Figura 5.17: valori assunti dal parametro 1-qL all'accensione della luce attinica. I genotipi analizzati sono WT (nero), *flvA flvB* KO (viola), *pgr1* KO (verde), *pgr1 ndhm* KO (arancione) cresciuti in condizioni di HL (riempimento diagonale). La significatività della differenza tra genotipo WT e mutante è calcolata con test univariato di Kruskal-Wallis. Le misure con *p-value* < 0.05 sono indicate con *.

test univariato di Kruskal-Wallis. Le misure con *p-value* < 0.05 sono indicate con *.

L'analisi dei parametri relativi all'efficienza fotosintetica del PSII dei genotipi mutanti dei meccanismi CEF e PCEF a confronto con il genotipo WT, cresciuti in condizioni di luce fluttuante (FL) (Figura 5.18) ha mostrato risultati significativamente diversi da parte del mutante *flvA flvB* KO. In particolare, il parametro Y(II) assume valori significativamente inferiori a quelli assunti dal genotipo WT in condizioni di FL, e molto vicini allo 0. Il parametro Y(NPQ) all'accensione della luce assume valori maggiori rispetto al genotipo WT nella medesima condizione di luce.

I mutanti del trasporto elettronico ciclico *pgrl1* KO e *pgrl1 ndhm* KO, mostrano valori di Y(II), Y(NPQ) e Y(NO) simili al genotipo WT in condizioni di luce fluttuante.

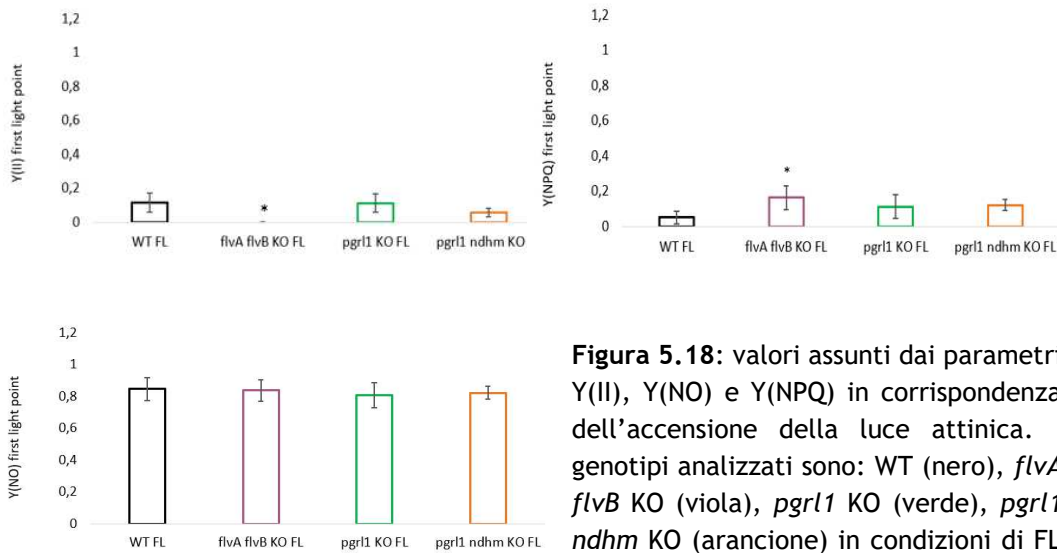


Figura 5.18: valori assunti dai parametri Y(II), Y(NPQ) e Y(NO) in corrispondenza dell'accensione della luce attinica. I genotipi analizzati sono: WT (nero), *flvA flvB* KO (viola), *pgrl1* KO (verde), *pgrl1 ndhm* KO (arancione) in condizioni di FL

(bordo colorato). La significatività della differenza tra genotipo WT e mutante è calcolata con test univariato di Kruskal-Wallis. Le misure con *p-value*<0.05 sono indicate con *.

Analizzando l'intera cinetica relativa ai parametri fotosintetici del PSII dei mutanti dei meccanismi di CEF e PCEF (Figura 5.19), si osserva che i genotipi mutanti del trasporto ciclico *pgrl1* KO e *pgrl1 ndhm* KO non mostrano valori che si discostano da quelli presentati dal genotipo WT, cresciuti nelle medesime condizioni di luce fluttuante. Il mutante *flvA flvB* KO, al contrario, mostra valori di efficienza quantica del PSII inferiori rispetto al WT. In corrispondenza di questa diminuzione del parametro Y(II), si osserva un iniziale aumento del parametro Y(NO), seguito da un aumento dei valori assunti dal parametro Y(NPQ) i quali risultano maggiori rispetto al WT anche durante la fase di recupero del meccanismo NPQ.

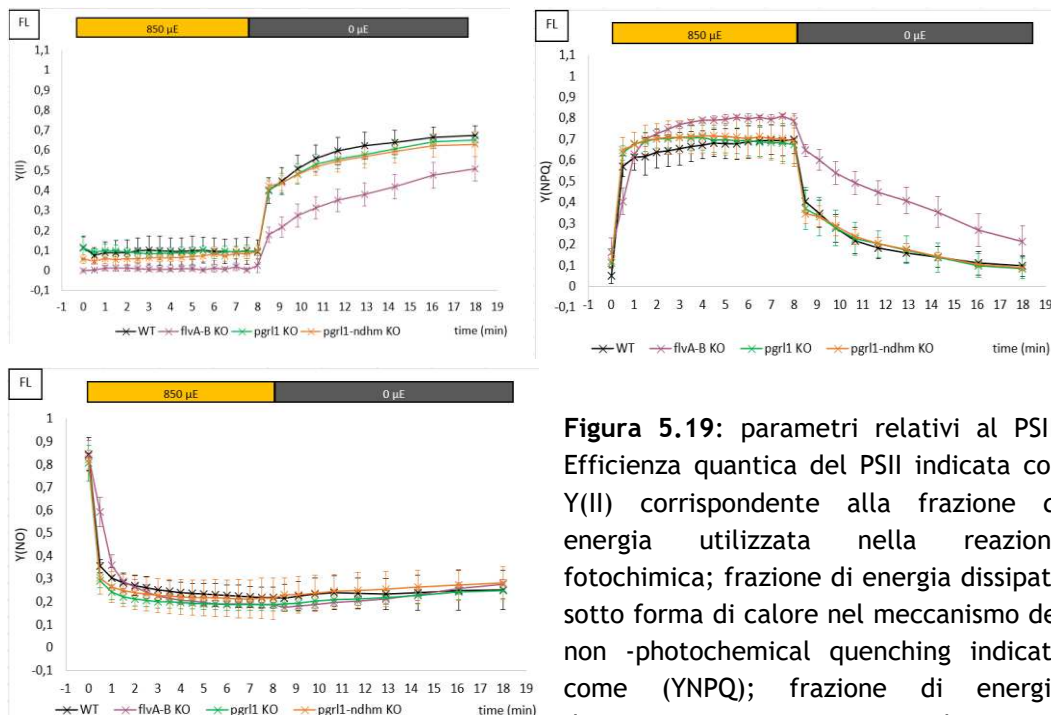


Figura 5.19: parametri relativi al PSII. Efficienza quantica del PSII indicata con $Y(II)$ corrispondente alla frazione di energia utilizzata nella reazione fotochimica; frazione di energia dissipata sotto forma di calore nel meccanismo del non-photochemical quenching indicata come $Y(NPQ)$; frazione di energia dissipata in maniera non regolata sotto

forma di fluorescenza indicata come $Y(NO)$. I genotipi analizzati sono cresciuti per 10 giorni in condizioni di FL (marker a croce). Il genotipo WT viene indicato con il colore nero, il genotipo *flvA flvB* KO con il colore viola, il genotipo *pgr1* KO con il colore verde, il genotipo *pgr1 ndhm* KO con il colore arancione. La significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

Analizzando la cinetica di attivazione del meccanismo NPQ ed i valori assunti dal parametro $1-q_L$ dei genotipi WT e mutanti dei trasporti alternativi cresciuti in condizioni di luce fluttuante, si osservano i risultati riportati in Figura 5.20. Tutti i mutanti mostrano una cinetica di attivazione del meccanismo NPQ paragonabile a quella presentata dal genotipo WT, cresciuto nelle medesime condizioni di FL. Una differenza significativa si osserva nella fase di rilassamento del meccanismo NPQ al buio da parte del genotipo mutante *flvA flvB* KO. In particolare, raggiunge il completo rilassamento della dissipazione in maniera più graduale paragonato all'andamento esibito dal genotipo WT.

I genotipi mutanti dei meccanismi CEF non mostrano differenze significative nella cinetica di attivazione del meccanismo NPQ rispetto al WT, cresciuti in condizioni di FL.

L'analisi dei valori assunti dal parametro $1-q_L$ rivela che il mutante *flvA flvB* KO mostra valori significativamente maggiori rispetto al genotipo WT cresciuti in condizioni di FL durante la fase di esposizione alla luce attinica.

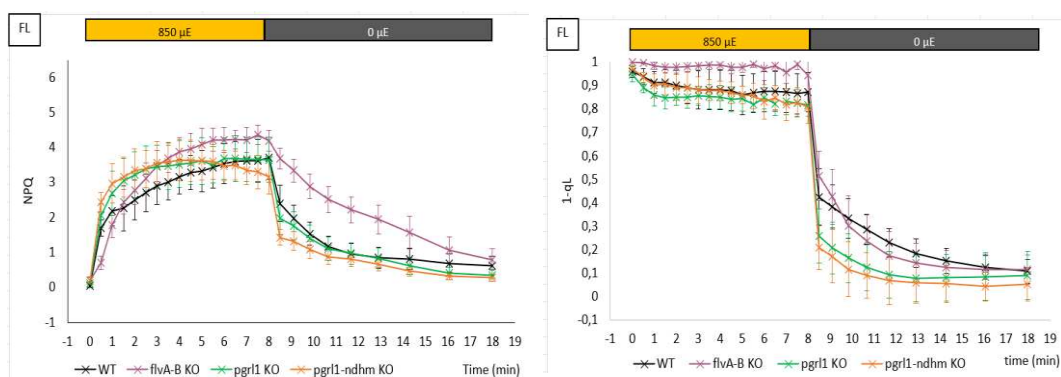


Figura 5.20: cinetica di attivazione del meccanismo del quenching non fotochimico (NPQ) e misura della frazione di centri di reazione allo stato chiuso (1-qL). Le misure sono relative a piante con genotipo WT (nero), *flvA flvB* KO (viola), *pgr1* KO (verde), *pgr1 ndhm* KO (arancione), cresciute in condizioni di FL (marker a croce). La significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

Attraverso misure di assorbimento nello spettro far-red, per i mutanti dei trasporti elettronici alternativi sono stati valutati i parametri relativi all'efficienza fotosintetica del fotosistema primo PSI. In particolare, sono stati misurati i parametri Y(I), Y(ND) ed Y(NA), rispettivamente rappresentanti l'efficienza quantica del PSI, la limitazione causata dai donatori elettronici del PSI, e la limitazione causata dagli accettori elettronici del PSI. L'analisi di questi parametri per i mutanti dei trasporti elettronici alternativi cresciuti in condizioni di CL, HL e FL può aiutare ad approfondire il ruolo dei meccanismi PCEF e CEF nell'acclimatazione a tali regimi di luce. I risultati dell'analisi di tali parametri per la condizioni di CL sono riportati in Figura 5.21.

Il mutante *flvA flvB* KO mostra una iniziale efficienza del PSI diminuita rispetto al genotipo WT, la quale poi assume valori paragonabili al WT durante la fase della misura di esposizione a luce attinica. I valori assunti dal parametro della acceptor side limitation Y(NA) sono anch'essi elevati all'accensione della luce attinica per il mutante *flvA flvB* KO. Entrambi i parametri per la restante durata della misura mostrano livelli paragonabili al genotipo WT.

L'efficienza fotosintetica del PSI, la donor side limitation e la acceptor side limitation del mutante *pgr1* KO mostrano livelli comparabili a quelli presentati dal genotipo WT, cresciuti in condizioni di CL.

Al contrario, il mutante *pgr1 ndhm* KO, completamente privo del meccanismo di CEF mostra livelli di efficienza fotosintetica del PSI inferiori al WT nella fase di misura al buio. Il parametro della acceptor side limitation assume valori paragonabili al fenotipo del mutante *flvA*

flvB KO all'accensione della luce, i quali restano maggiorati rispetto al WT anche nel restante tempo di esposizione alla luce attinica.

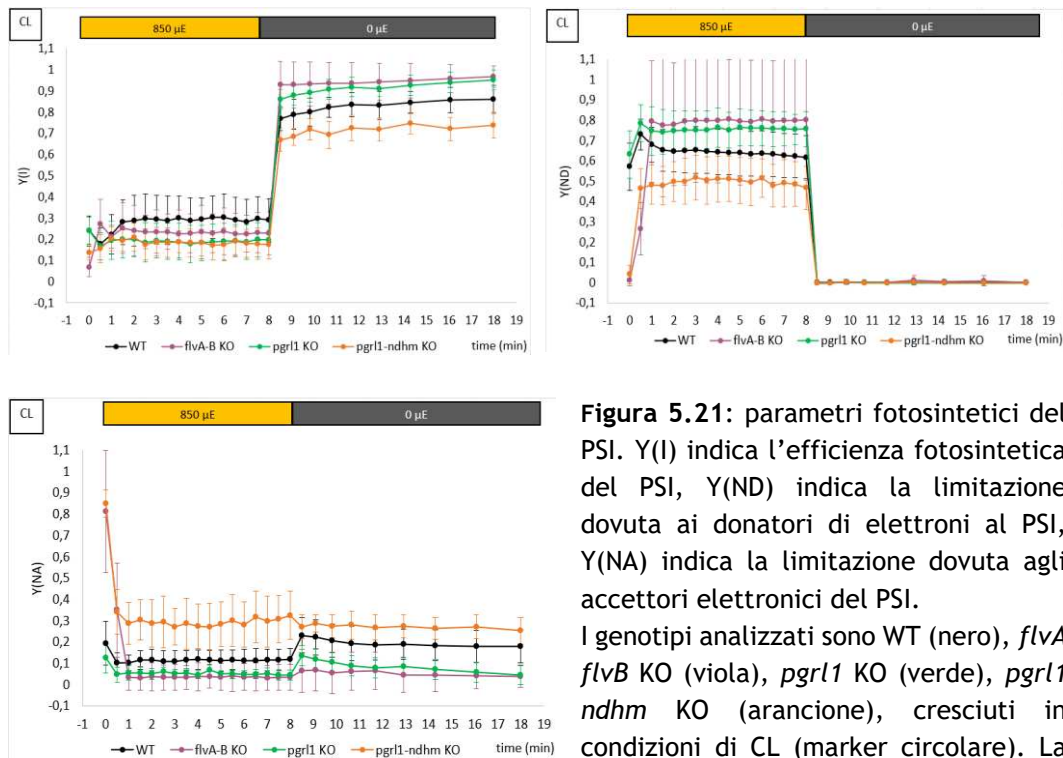


Figura 5.21: parametri fotosintetici del PSI. Y(I) indica l'efficienza fotosintetica del PSI, Y(ND) indica la limitazione dovuta ai donatori di elettroni al PSI, Y(NA) indica la limitazione dovuta agli accettori elettronici del PSI. I genotipi analizzati sono WT (nero), *flvA flvB* KO (viola), *pgr1* KO (verde), *pgr1 ndhm* KO (arancione), cresciuti in condizioni di CL (marker circolare). La significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

L'analisi degli stessi parametri, relativi ai genotipi WT e mutanti dei trasporti elettronici alternativi cresciuti in condizioni di crescita ad alta luce (HL) ha prodotto i risultati presentati in Figura 5.22.

Le cinetiche del parametro Y(NA) assumono valori significativamente maggiorati per tutti i mutanti dei trasporti ciclici e pseudo-ciclici all'accensione della luce attinica. Particolarmente elevato risulta essere il valore assunto dal parametro Y(NA) da parte del mutante *pgr1 ndhm* KO, il quale resta significativamente maggiore rispetto al fenotipo WT e mutante del trasporto pseudo-ciclico per la totale durata dell'esposizione a luce attinica.

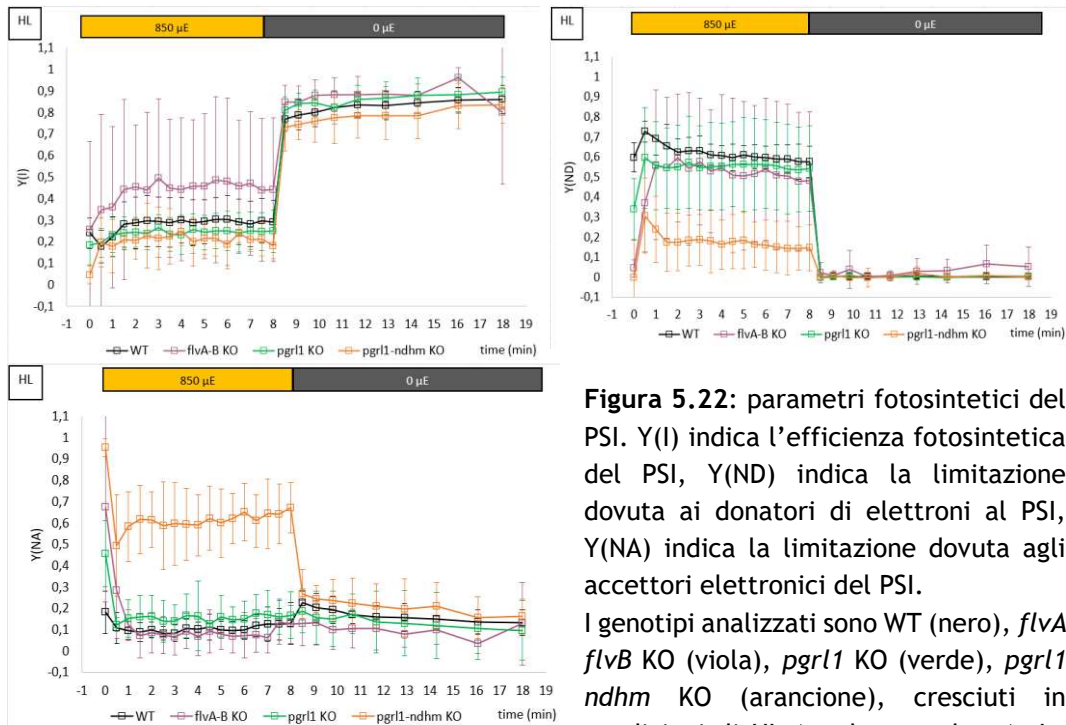


Figura 5.22: parametri fotosintetici del PSI. Y(I) indica l'efficienza fotosintetica del PSI, Y(ND) indica la limitazione dovuta ai donatori di elettroni al PSI, Y(NA) indica la limitazione dovuta agli accettori elettronici del PSI. I genotipi analizzati sono WT (nero), *flvA flvB* KO (viola), *pgr1* KO (verde), *pgr1 ndhm* KO (arancione), cresciuti in condizioni di HL (marker quadrato). La

significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

L'analisi dei parametri relativi all'efficienza del PSI dei mutanti dei trasporti alternativi cresciuti in condizioni di luce fluttuante (FL), ha prodotto i risultati riportati in Figura 5.23.

Il mutante *flvA flvB* KO manca del meccanismo del PCEF. Questo mutante soffre particolarmente la crescita a luce fluttuante, per via della mancanza del complesso FLV. Questo complesso è noto avere un ruolo essenziale nell'alleviare la sovrariduzione degli accettori del PSI nel momento in cui vi è un improvviso aumento di intensità luminosa, condizione che si verifica ciclicamente in FL. All'accesione della luce attinica il mutante *flvA flvB*, infatti, mostra un'elevata acceptor side limitation, comparata ai valori assunti dal genotipo WT in questa condizione di crescita.

Il mutante *pgr1 ndhm* KO assume anch'esso un valore di Y(NA) maggiorato rispetto al fenotipo WT all'accensione della luce attinica.

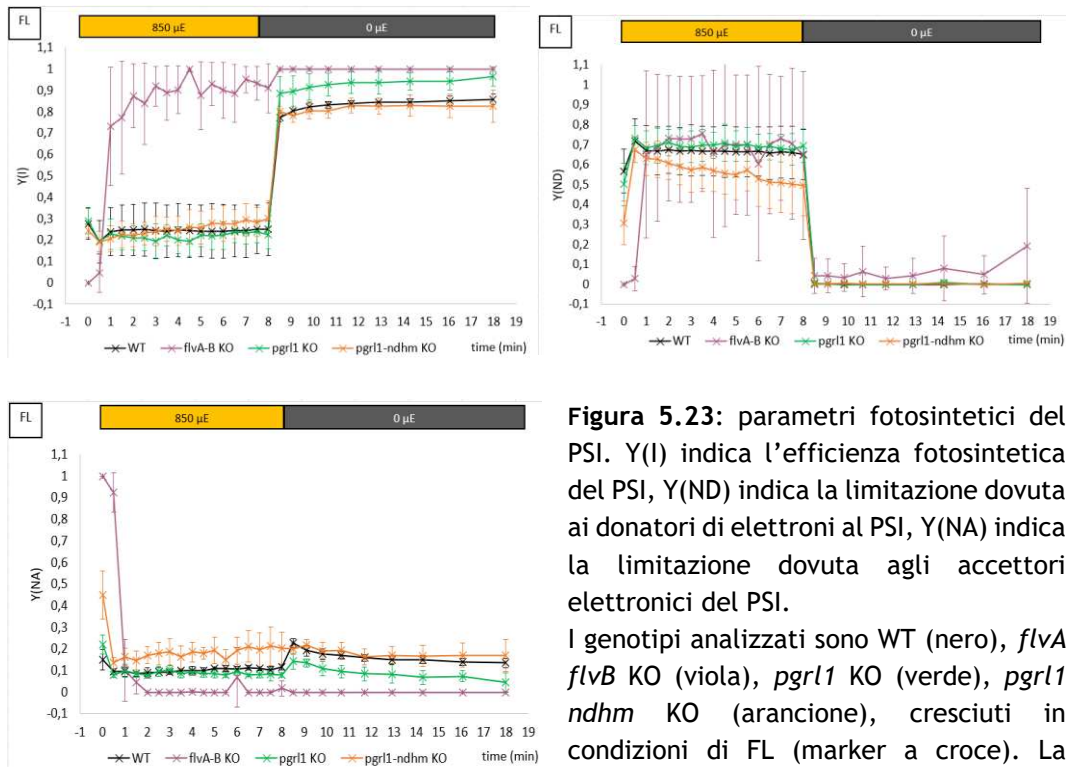


Figura 5.23: parametri fotosintetici del PSI. Y(I) indica l'efficienza fotosintetica del PSI, Y(ND) indica la limitazione dovuta ai donatori di elettroni al PSI, Y(NA) indica la limitazione dovuta agli accettori elettronici del PSI.

I genotipi analizzati sono WT (nero), *flvA flvB* KO (viola), *pgrl1* KO (verde), *pgrl1 ndhm* KO (arancione), cresciuti in condizioni di FL (marker a croce). La significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

L'analisi del rapporto stechiometrico PSI/PSII dei genotipi WT e mutanti dei trasporti elettronici alternativi ha prodotto i risultati riportati in Figura 5.24.

Risultati significativi sono stati riscontrati nel valore assunto dal rapporto PSI/PSII relativo al genotipo mutante *flvA flvB* KO in condizioni di crescita in FL. Questo mutante infatti presenta un rapporto inferiore al valore assunto dal genotipo WT nella medesima condizione di luce. Il mutante *pgrl1 ndhm* KO mostra un valore di PSI/PSII paragonabile a quello relativo al mutante del meccanismo pseudo-ciclico. Questo dato è però relativo ad un'unica misura e necessita di ulteriori repliche per essere considerato significativo.

I restanti valori assunti dal rapporto PSI/PSII non mostrano differenze significative comparati con il genotipo WT nelle rispettive condizioni di crescita.

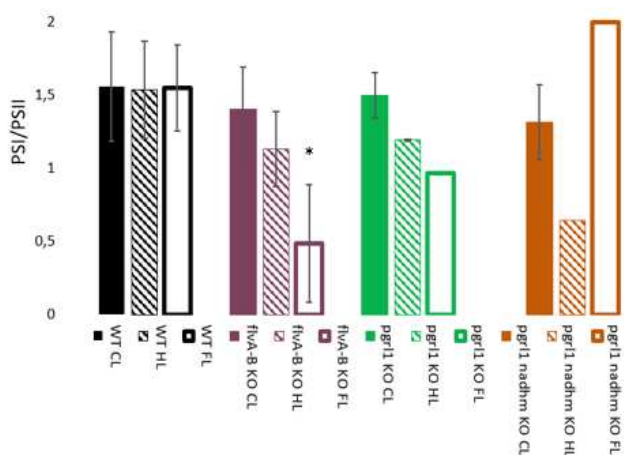


Figura 5.24: analisi del rapporto stechiometrico PSI/PSII dei genotipo WT (nero), *flvA flvB* KO (viola), *pgrl1* KO (verde), *pgrl1 ndhm* KO (arancione) cresciuti in condizioni di CL (riempimento completo), HL (riempimento diagonale), FL (bordo colorato). I rapporti sono indicati come media e deviazione standard del seguente numero di

repliche per genotipo: 17 (WT CL), 9 (WT HL), 5 (WT FL), 2 (*flvA flvB* KO CL), 3 (*flvA flvB* KO HL), 3 (*flvA flvB* KO FL), 4 (*pgrl1* KO CL), 2 (*pgrl1* KO HL), 1 (*pgrl1* KO FL), 6 (*pgrl1 ndhm* KO), 1 (*pgrl1 ndhm* KO HL), 1 (*pgrl1 ndhm* KO FL). La significatività della differenza tra genotipo WT e mutante, cresciuti nella medesima condizione di luce, è calcolata con test univariato di Kruskal-Wallis. Le misure con *p-value*<0.05 sono indicate con *.

5.3 Acclimatazione dei mutanti del meccanismo NPQ nelle tre condizioni di luce

L'acclimatazione dei genotipi mutanti del meccanismo del quenching non fotochimico (NPQ), permette di approfondire il suo ruolo fotoprotettivo e l'importanza delle singole componenti che partecipano all'attivazione dell'NPQ, nel processo di acclimatazione a condizioni di crescita ad alta luce e luce fluttuante. I genotipi mutanti analizzati in questa parte del progetto di tesi sono: *vde* KO, *ze* KO e *psbs lhcsr1 lhcsr2* KO (da qui in seguito indicato come *psbs l1 l2* KO).

Una prima valutazione dell'efficienza fotosintetica dei genotipi mutanti cresciuti in queste condizioni di luce viene effettuata tramite l'analisi del rapporto F_v/F_m . I dati raccolti da questa analisi sono riportati in Figura 5.25.

In condizioni di crescita a luce di controllo, si osserva una differenza significativa del valore di F_v/F_m per il genotipo *ze* KO in tutte le condizioni di crescita.

Un'altra significativa diminuzione dei valori assunti dal rapporto F_v/F_m risulta dalla crescita di tutti genotipi mutanti del meccanismo NPQ in condizioni di alta luce. In particolare, i valori riportati sono inferiori a 0.7, indicando un particolare stato di stress per le piante. Anche in condizioni di crescita a luce fluttuante i valori assunti dal rapporto F_v/F_m risultano diminuiti per i mutanti del meccanismo NPQ comparati con il genotipo WT, in particolare con valori inferiori a 0.7 per i genotipi *ze* KO e *psbs l1 l2* KO.

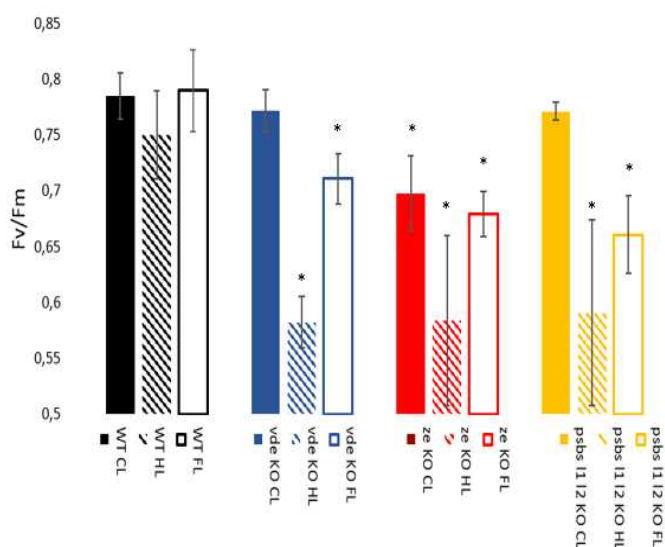


Figura 5.25: rapporto F_v/F_m dei genotipi mutanti del meccanismo NPQ. Il rapporto indica l'efficienza quantica del fotosistema secondo (PSII).

Le misure sono riferite ai genotipi WT (nero), *vde* KO (blu), *ze* KO (rosso), *psbs 11 12* KO (arancione), acclimatati nelle tre condizioni di luce CL (riempimento completo), HL (riempimento diagonale), FL (bordo colorato). La significatività della differenza tra genotipo WT e mutante, cresciuti nella medesima

condizione di luce, è calcolata con test univariato di Kruskal-Wallis. Le misure con $p\text{-value} < 0.05$ sono indicate con *.

Le differenze tra genotipi WT e mutanti durante l'esposizione a luce attinica sono state esaminate tramite test statistico One-Way ANOVA, i $p\text{-values}$ sono riportati nella Tabella 5.3 per i parametri relativi al PSII, e nella Tabella 5.4 per i parametri relativi al PSI.

Al fine di comprendere il ruolo delle singole componenti che partecipano all'attivazione del meccanismo NPQ nei processi di acclimatazione, sono stati analizzati i parametri relativi all'efficienza fotosintetica del PSII ed il PSI. Le misure di questi parametri vengono effettuate esponendo il materiale vegetale ad una luce attinica di intensità pari a $850 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ per 8 minuti, ed al buio per 10 minuti, come effettuato per i mutanti dei trasporti elettronici alternativi. In particolare sono stati analizzati i parametri Y(II), Y(NPQ) ed Y(NO).

I risultati prodotti dalle misure di questi parametri per piante cresciute in condizioni di CL sono riportati nella Figura 5.26.

La frazione di energia investita nella reazione fotochimica nel PSII, Y(II), resta paragonabile tra i genotipi mutanti del meccanismo NPQ ed il genotipo WT cresciuti in condizioni di CL, per tutta la durata dell'esposizione delle piante a luce attinica. Al contrario i parametri Y(NPQ) ed Y(NO) risultano molto diversi a seconda del genotipo considerato. In particolare, il genotipo *vde* KO mostra una diminuzione della frazione di energia dissipata come calore nel meccanismo NPQ rispetto ai livelli presentati dal genotipo WT, alla quale corrisponde un aumento della frazione di energia dissipata in maniera non regolata.

Il genotipo *ze KO* all'accensione della luce attinica mostra un valore $Y(NO)$ inferiore a tutti gli altri genotipi studiati.

Per la restante durata della misura, il mutante *ze KO* mostra anch'esso una diminuzione della frazione di energia dissipata come calore rispetto al livello esibito dal WT, ed un conseguente aumento della frazione di energia dissipata in maniera non regolata.

Il mutante *psbs l1 l2 KO* mostra una notevole diminuzione della frazione di energia dissipata come calore, a cui corrisponde un aumento della frazione di energia dissipata in maniera non regolata.

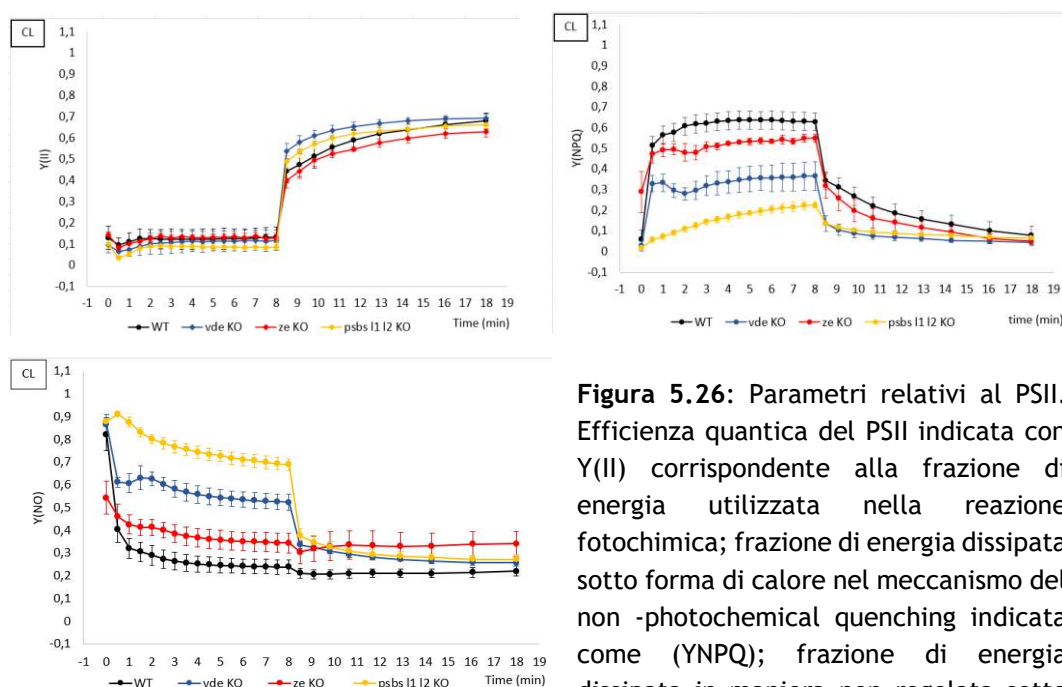


Figura 5.26: Parametri relativi al PSII. Efficienza quantica del PSII indicata con $Y(II)$ corrispondente alla frazione di energia utilizzata nella reazione fotochimica; frazione di energia dissipata sotto forma di calore nel meccanismo del non-photochemical quenching indicata come $Y(NPQ)$; frazione di energia dissipata in maniera non regolata sotto

forma di fluorescenza indicata come $Y(NO)$. I genotipi analizzati sono cresciuti per 10 giorni in condizioni di CL (marker circolare). Il genotipo WT viene indicato con il colore nero, il genotipo *vde KO* con il colore blu, il genotipo *ze KO* con il colore rosso, il genotipo *psbs l1 l2 KO* con il colore giallo. La significatività calcolata tramite One-Way Anova.

Altri due parametri relativi al PSII analizzati per la valutazione dell'efficienza fotosintetica, sono NPQ ed $1-q_L$.

In condizione di CL l'analisi dei parametri ha prodotto i risultati riportati nella Figura 5.27.

Il mutante *vde KO* mostra una cinetica di attivazione del meccanismo NPQ molto ridotta rispetto al genotipo WT, indicando che la mancanza di zeaxantina prodotta dall'enzima VDE comporta una forte diminuzione di capacità di dissipazione dell'energia sotto forma di calore. Anche il genotipo *ze KO* mostra una cinetica di attivazione del meccanismo NPQ che assume valori ridotti rispetto al genotipo WT, ma l'entità della riduzione è minore rispetto a quella presentata dal genotipo *vde KO*.

Il mutante *psbs l1 l2* KO mostra una pressochè totale incapacità di attivazione del meccanismo NPQ.

La maggior diminuzione di capacità di attivazione del meccanismo NPQ si osserva nel genotipo mutante *psbs l1 l2* KO, mentre nei primi minuti di esposizione a luce attinica il mutante *vde* KO mostra valori leggermente più elevati.

Il parametro relativo alla frazione di centri di reazione chiusi nel PSII non mostra risultati significativamente differenti per i diversi genotipi mutanti comparati con il genotipo WT.

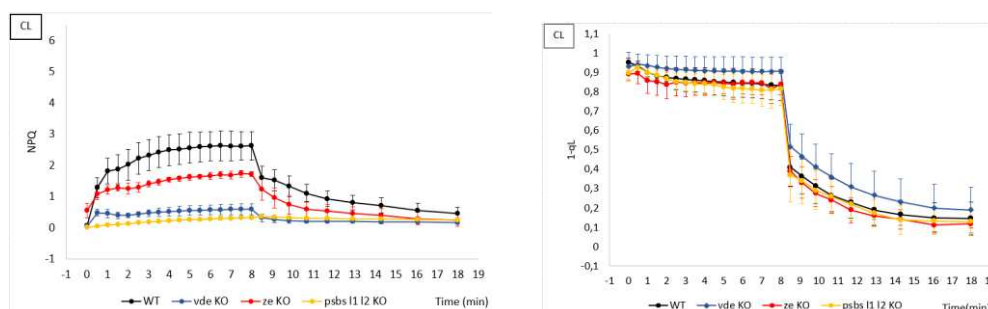


Figura 5.27: cinetica di attivazione del meccanismo del quenching non fotochimico (NPQ) e misura della frazione di centri di reazione allo stato chiuso (1-qL). Le misure sono relative a piante con genotipo WT (nero), *flvA flvB* KO (viola), *pgrl1* KO (verde), *pgrl1 ndhm* KO (arancione), cresciute in condizioni di CL (marker circolare). La significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

L'analisi dei parametri fotosintetici relativi al PSII dei genotipi mutanti cresciuti in condizioni di alta luce (HL), ha prodotto i risultati riportati in Figura 5.28.

I valori assunti dal parametro Y(II) relativi alla frazione di energia impiegata per la reazione fotochimica nel PSII restano paragonabili al genotipo WT per tutti i mutanti del meccanismo NPQ.

Il genotipo *vde* KO in condizioni di crescita in HL mostra una significativa diminuzione della frazione di energia dissipata sotto forma di calore rispetto al genotipo WT, a cui corrisponde un aumento dell'energia dissipata in maniera non regolata.

Anche il genotipo *ze* KO mostra una diminuzione nei valori assunti dal parametro Y(NPQ) ed un aumento del parametro Y(NO), ma con un'entità minore rispetto a quella che interessa il genotipo *vde* KO.

Infine la più significativa riduzione della frazione di energia dissipata sotto forma di calore si osserva nel mutante *psbs l1 l2* KO, cui corrisponde un altrettanto notevole aumento dell'energia dissipata in maniera non regolata.

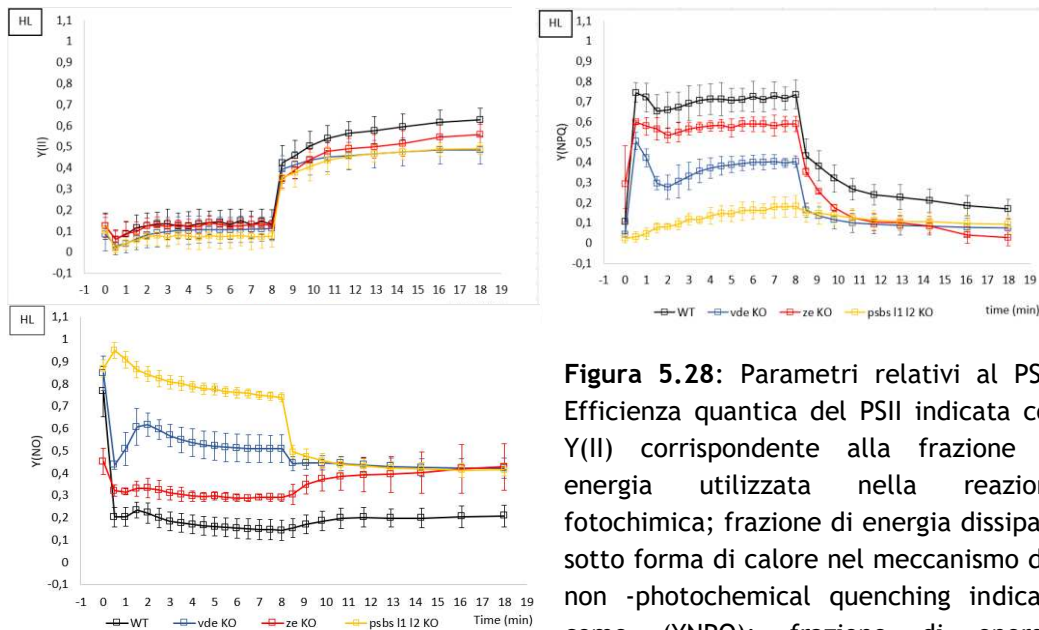


Figura 5.28: Parametri relativi al PSII. Efficienza quantica del PSII indicata con Y(II) corrispondente alla frazione di energia utilizzata nella reazione fotochimica; frazione di energia dissipata sotto forma di calore nel meccanismo del non-photochemical quenching indicata come Y(NPQ); frazione di energia

dissipata in maniera non regolata sotto forma di fluorescenza indicata come Y(NO). I genotipi analizzati sono cresciuti per 10 giorni in condizioni di HL (marker quadrato). Il genotipo WT viene indicato con il colore nero, il genotipo *vde* KO con il colore blu, il genotipo *ze* KO con il colore rosso, il genotipo *psbs l1 l2* KO con il colore giallo. La significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

In condizioni di crescita in HL l'analisi dei parametri NPQ ed 1-qL ha prodotto i risultati riportati in Figura 5.29.

Il genotipo *vde* KO in HL mostra una cinetica di attivazione del meccanismo NPQ diminuita rispetto al genotipo WT. In particolare, all'accensione della luce vi è un iniziale aumento dei valori assunti che tornano a scendere dopo circa 1 minuto. Questo fenotipo è esibito anche dal genotipo WT nella medesima condizione di luce, a differenza della fase di decrescita dell'attivazione dell'NPQ la quale al contrario aumenta fino allo spegnimento della luce attinica. Anche il genotipo *ze* KO mostra una diminuzione della capacità di attivazione del meccanismo NPQ, indicando che un accumulo della zeaxantina provoca una parziale inibizione dell'attivazione del meccanismo NPQ nonostante tutte le componenti che vi partecipano siano presenti. Il genotipo triplo mutante *psbs l1 l2* KO mostra una pressochè totale incapacità di attivazione del meccanismo NPQ.

I genotipi mutanti *vde* KO e *psbs l1 l2* KO assumono valori del parametro 1-qL significativamente maggiori rispetto al genotipo WT durante tutta la fase di misura in cui la luce attinica è accesa.

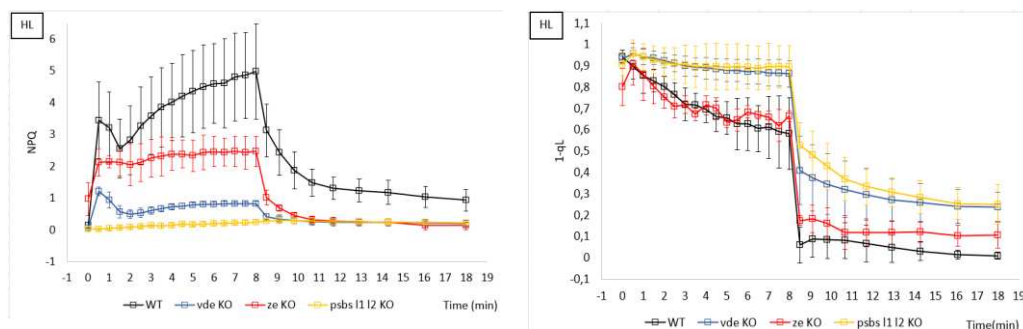


Figura 5.29: cinetica di attivazione del meccanismo del quenching non fotochimico (NPQ) e misura della frazione di centri di reazione allo stato chiuso (1-qL). Le misure sono relative a piante con genotipo WT (nero), *flvA flvB* KO (viola), *pgrl1* KO (verde), *pgrl1 ndhm* KO (arancione), cresciute in condizioni di HL (marker quadrato). La significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

L'analisi dei parametri $Y(II)$, $Y(NPQ)$ ed $Y(NO)$ per i genotipi mutanti cresciuti in condizioni di FL ha prodotto i risultati riportati in Figura 5.30. In condizioni di crescita a FL non si osserva una significativa diminuzione della frazione di energia impiegata per la reazione fotochimica dal PSII in nessuno dei genotipi mutanti paragonati ai valori esibiti dal genotipo WT. Il genotipo *ze* KO in questa condizione di crescita non presenta valori assunti dai parametri $Y(NPQ)$ ed $Y(NO)$ significativamente diversi dal genotipo WT nella medesima condizione di luce.

Il genotipo mutante *vde* KO presenta una diminuzione nei valori assunti dal parametro $Y(NPQ)$, a cui corrisponde un aumento nel parametro $Y(NO)$. Allo stesso modo il mutante *psbs l1 l2* KO mostra una significativa diminuzione dell'energia dissipata sotto forma di calore, ed un aumento di quella dissipata in maniera non regolata.

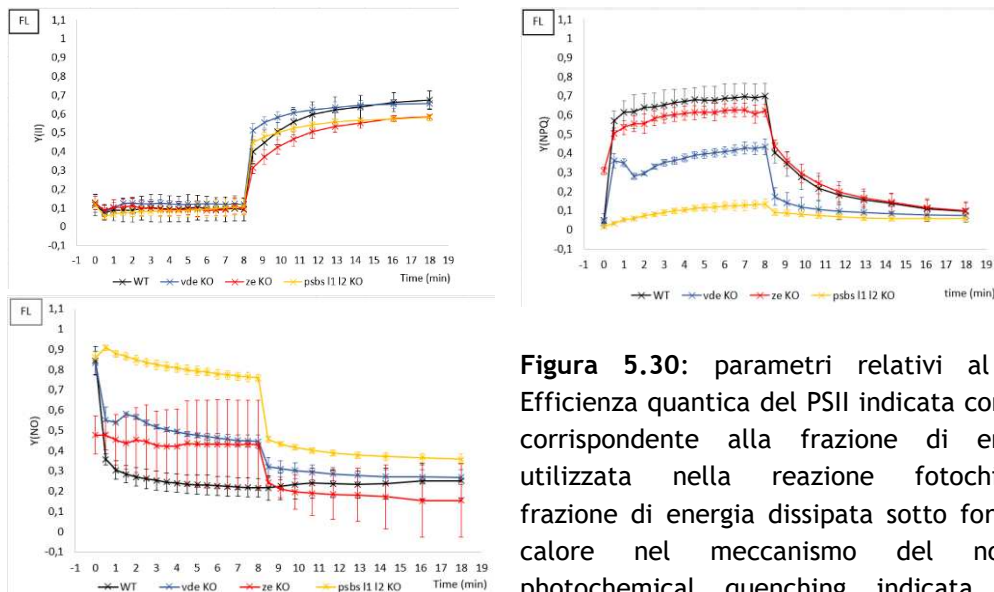


Figura 5.30: parametri relativi al PSII. Efficienza quantica del PSII indicata con $Y(II)$ corrispondente alla frazione di energia utilizzata nella reazione fotochimica; frazione di energia dissipata sotto forma di calore nel meccanismo del non-photochemical quenching indicata come

$Y(NPQ)$; frazione di energia dissipata in maniera non regolata sotto forma di fluorescenza indicata come $Y(NO)$. I genotipi analizzati sono cresciuti per 10 giorni in condizioni di FL (marker a croce). Il genotipo WT viene indicato con il colore nero, il genotipo *vde* KO con il colore blu, il genotipo *ze* KO con il colore rosso, il genotipo *psbs l1 l2* KO con il colore giallo. La significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

L'analisi dei parametri NPQ ed $1-q_L$ dei genotipi WT e mutanti del meccanismo NPQ ha prodotto i risultati riportati nella Figura 5.31.

Anche in condizioni di crescita a FL i risultati indicano una diminuzione della capacità di attivazione del meccanismo NPQ da parte di tutti i mutanti, con una particolare inibizione nel mutante triplo KO.

La frazione di centri di reazione chiusi resta invece paragonabile al genotipo WT nella medesima condizione di crescita.

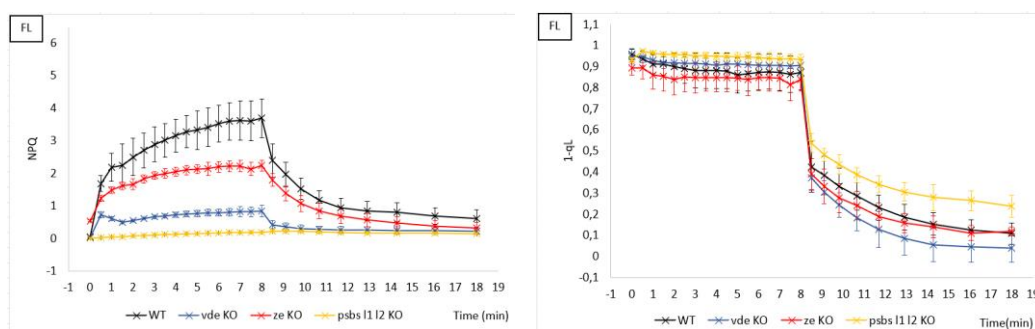


Figura 5.31: cinetica di attivazione del meccanismo del quenching non fotochimico (NPQ) e misura della frazione di centri di reazione allo stato chiuso ($1-q_L$). Le misure sono relative a piante con genotipo WT (nero), *flvA flvB* KO (viola), *pgrl1* KO (verde), *pgrl1 ndhm* KO (arancione), cresciute in condizioni di FL (marker a croce). La significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

Analizzando l'ultimo punto alla luce attinica dei parametri NPQ ed 1-qL dei diversi genotipi mutanti del meccanismo NPQ cresciuti nelle tre condizioni di luce, si osservano i risultati riportati in Figura 5.32.

Tutti i genotipi mutanti mostrano una significativa diminuzione dei valori assunti dal parametro NPQ rispetto al genotipo WT nella medesima condizione di luce. In particolare si osserva che il genotipo ze KO cresciuto in condizioni di HL e FL mostra un livello di attivazione del meccanismo NPQ paragonabile a quello esibito dal genotipo WT cresciuto in CL.

Una significativa diminuzione dei valori assunti dal parametro 1-qL si osserva da parte del genotipo WT e del genotipo mutante ze KO. Gli altri genotipi nelle tre condizioni di luce mostrano valori molto vicini al valore massimo 1 e non significativamente diversi tra di loro.

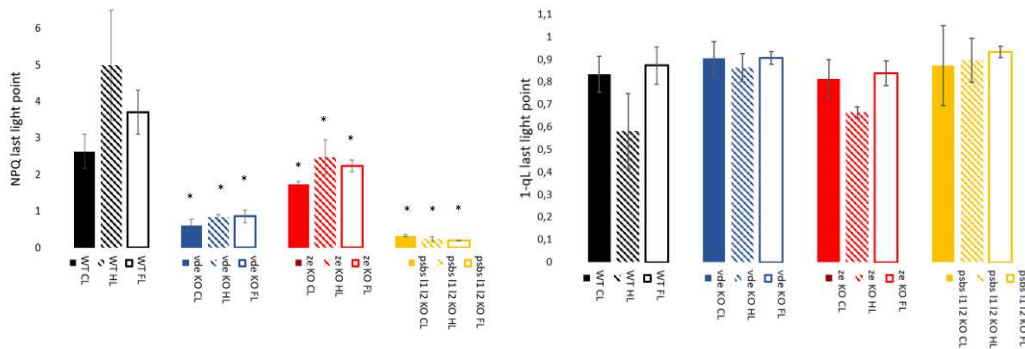


Figura 5.32: Valori assunti dai parametri NPQ ed 1-qL nell'ultimo punto di misura relativo alla fase di esposizione a luce attinica, dei genotipo WT (nero), vde KO (blu), ze KO (rosso), psbs l1 l2 KO (giallo) cresciuti in condizioni di CL (riempimento completo), HL (riempimento diagonale), FL (bordo colorato). La significatività della differenza tra genotipo WT e mutante, cresciuti nella medesima condizione di luce, è calcolata con test univariato di Kruskal-Wallis. Le misure con p -value < 0.05 sono indicate con *.

L'analisi del primo valore assunto dal parametro NPQ all'accensione della luce attinica, riportata in Figura 5.33, evidenzia come per il mutante ze KO in tutte le condizioni di luce vi sia un significativo aumento del valore da cui parte la cinetica del meccanismo NPQ.

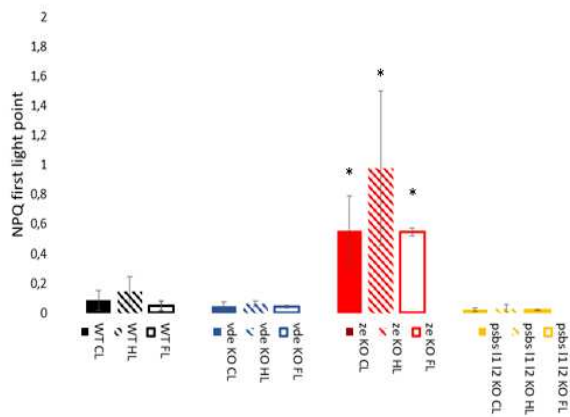


Figura 5.33: valori assunti dal parametro NPQ all'accensione della luce attinica dei genotipo WT (nero), *vde* KO (blu), *ze* KO (rosso), *psbs 11 12* KO (giallo) cresciuti in condizioni di CL (riempimento completo), HL (riempimento diagonale), FL (bordo colorato). La significatività della differenza tra genotipo WT e mutante, cresciuti nella medesima condizione di luce, è calcolata con test univariato di

Kruskal-Wallis. Le misure con $p\text{-value} < 0.05$ sono indicate con *.

Attraverso misure di assorbimento della luce far-red, per i mutanti del meccanismo NPQ sono stati valutati i parametri relativi all'efficienza fotosintetica del fotosistema primo PSI. In particolare, sono stati misurati i parametri $Y(I)$, $Y(ND)$ ed $Y(NA)$, come effettuato per i mutanti dei trasporti elettronici alternativi.

L'analisi di questi parametri dei genotipi WT e mutanti del meccanismo NPQ cresciuti in condizioni di luce di controllo (CL), alta luce (HL) e luce fluttuante (FL), sono riportate rispettivamente nella Figura 5.34, Figura 5.35 e Figura 5.36. In nessuna di queste misure sono stati riscontrati risultati significativamente differenti da parte dei genotipi mutanti comparati al genotipo WT cresciuto nella rispettiva condizione di luce.

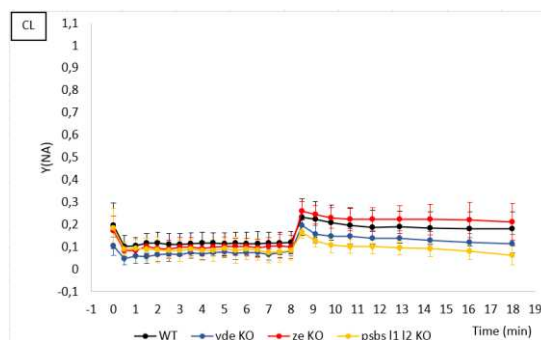
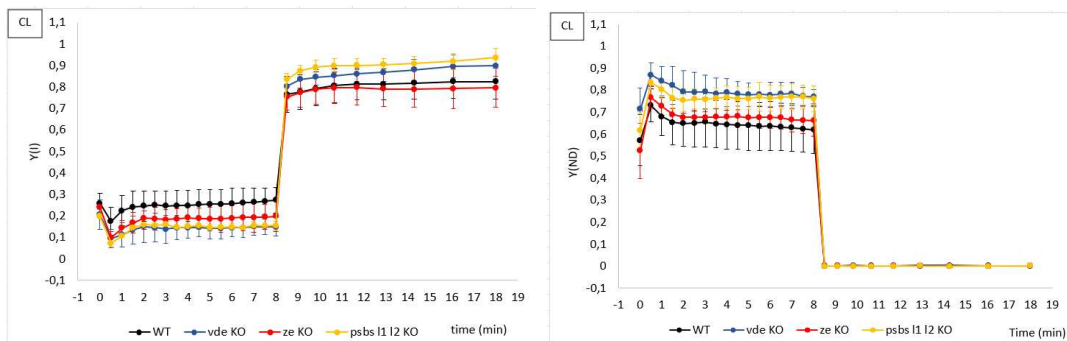


Figura 5.34: valori assunti dai parametri $Y(I)$ relativo all'efficienza quantica del PSI, $Y(ND)$ relativo alla limitazione del dono side, $Y(NA)$ relativo alla limitazione dell'acceptor side. I genotipi analizzati sono WT (nero), *vde* KO (blu), *ze* KO (rosso), *psbs 11 12* KO (giallo), cresciuti in condizioni di CL (marker circolare). La significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

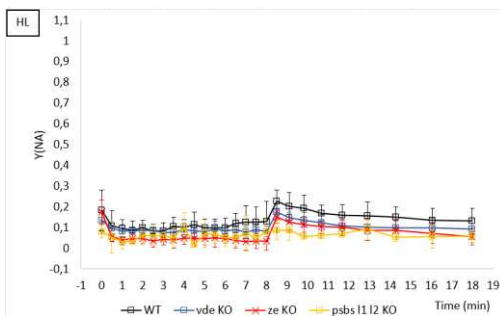
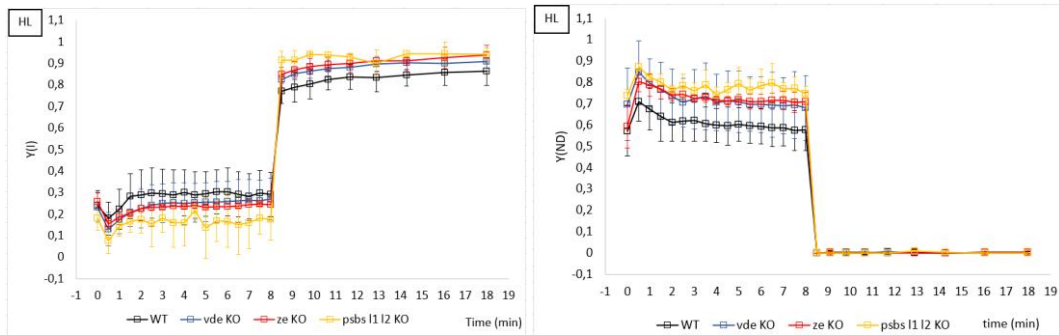


Figura 5.35: valori assunti dai parametri Y(I) relativo all'efficienza quantica del PSI, Y(ND) relativo alla limitazione del dono side, Y(NA) relativo alla limitazione dell'acceptor side. I genotipi analizzati sono WT (nero), *vde* KO (blu), *ze* KO (rosso), *psbs l1 l2* KO (giallo), cresciuti in condizioni di HL (marker quadrato). La significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

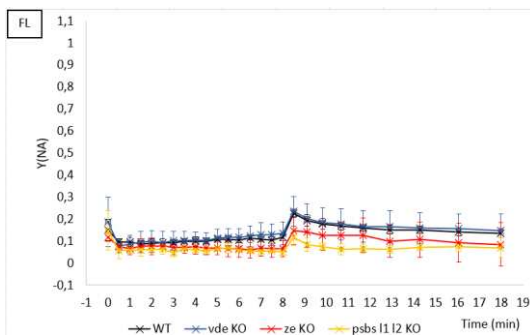
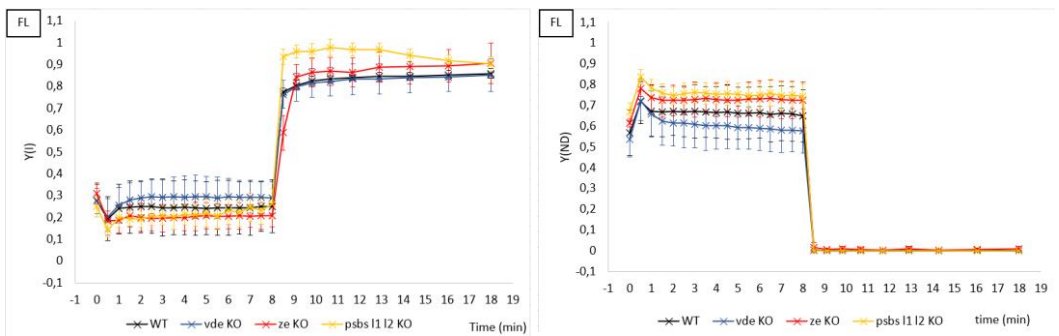


Figura 5.36: valori assunti dai parametri Y(I) relativo all'efficienza quantica del PSI, Y(ND) relativo alla limitazione del dono side, Y(NA) relativo alla limitazione dell'acceptor side. I genotipi analizzati sono WT (nero), *vde* KO (blu), *ze* KO (rosso), *psbs l1 l2* KO (giallo), cresciuti in condizioni di FL (marker a croce). La significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

L'analisi della composizione dell'apparato fotosintetico tramite applicazione del segnale di Electro Chromic Shift (ECS), permette di determinare il rapporto stechiometrico PSI/PSII. I risultati di questa analisi sui genotipi WT e mutanti del meccanismo NPQ nelle tre condizioni di luce sono riportati in Figura 5.37.

Non si osserva una differenza significativa nei valori assunti dal rapporto PSI/PSII da parte dei genotipi mutanti del meccanismo NPQ rispetto al genotipo WT cresciuto nella medesima condizione di luce, né confrontando lo stesso genotipo cresciuto nelle tre diverse condizioni di luce.

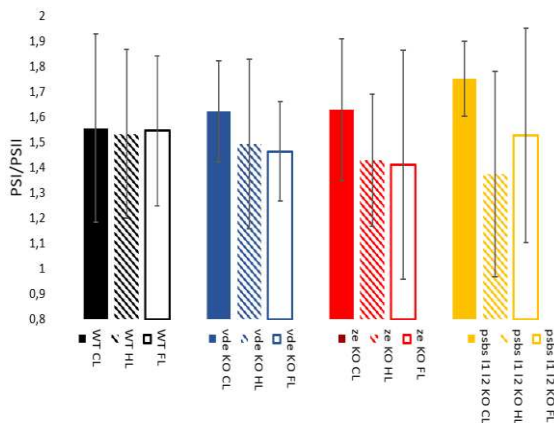


Figura 5.37: Analisi del rapporto stechiometrico PSI/PSII dei genotipo WT (nero), *vde* KO (blu), *ze* KO (rosso), *psbs l1 l2* KO (giallo) cresciuti in condizioni di CL (riempimento completo), HL (riempimento diagonale), FL (bordo colorato).

La significatività della differenza tra genotipo WT e mutante, cresciuti nella medesima condizione di luce, è calcolata con test univariato di Kruskal-Wallis. Le misure con p -value < 0.05 sono indicate con *.

Condizione di luce	Genotipi comparati	Y(II)	Y(NPQ)	Y(NO)	NPQ	1-qL
CL	WT vs. <i>vde</i> KO	0,000174475	1,07618E-07	3,9768E-08	9,07873E-12	3,64084E-06
	WT vs. <i>ze</i> KO	0,412217841	0,039048745	0,023918929	0,000160849	0,112797771
	WT vs. <i>psbs l1 l2</i> KO	1,81516E-10	4,9803E-13	1,51683E-13	1,37881E-13	0,004595398
	WT vs. <i>flvA flvB</i> KO	1,57624E-15	0,314895738	0,921327673	0,175246271	1,76062E-05
	WT vs. <i>pgl1</i> KO	1,18854E-10	0,465183396	0,769334828	0,034847856	0,003237917
	WT vs. <i>pgl1 ndhm</i> KO	1,16365E-16	0,119199021	0,691288332	0,059198495	0,001581871
HL	WT vs. <i>vde</i> KO	0,000163734	2,5496E-08	1,98447E-09	9,88057E-12	3,59154E-07
	WT vs. <i>ze</i> KO	0,399830809	0,008419731	0,008511711	1,56686E-05	0,95481155
	WT vs. <i>psbs l1 l2</i> KO	4,67703E-09	1,30324E-15	1,73345E-16	6,77141E-14	1,06918E-07
	WT vs. <i>flvA flvB</i> KO	0,827859545	0,536418375	0,498924937	0,738835501	0,523955555
	WT vs. <i>pgl1</i> KO	3,06312E-10	0,368751334	0,407151573	0,15760854	0,086170827
	WT vs. <i>pgl1 ndhm</i> KO	0,144666352	0,552234746	0,322695521	0,0146444	0,493169479
FL	WT vs. <i>vde</i> KO	6,48669E-08	6,16585E-07	4,94042E-06	9,92865E-11	0,001112447
	WT vs. <i>ze</i> KO	0,339448477	0,25233848	0,000187977	0,000429005	2,55597E-05
	WT vs. <i>psbs l1 l2</i> KO	0,098833473	3,62461E-15	2,9671E-15	1,98885E-13	1,44145E-09
	WT vs. <i>flvA flvB</i> KO	1,49774E-27	0,135872811	0,916005875	0,302053108	9,57868E-14
	WT vs. <i>pgl1</i> KO	0,254639177	0,543833085	0,376067914	0,323680575	0,000341456
	WT vs. <i>pgl1 ndhm</i> KO	1,54993E-08	0,414349398	0,675456484	0,312067604	0,179888181

Tabella 5.3: One-Way ANOVA dei parametri relativi al PSII. Per il calcolo del p -value è stato utilizzato ogni punto della misura relativo alla fase di esposizione alla luce attinica. I p -value < 0.05 sono evidenziati in verde.

Condizione di luce	Genotipi comparati	Y(I)	Y(ND)	Y(NA)
CL	WT vs. vde KO	3,50827E-15	1,17625E-14	1,56011E-09
	WT vs. ze KO	1,83052E-08	0,029014495	0,015781131
	WT vs. psbs l1 l2 KO	9,74272E-14	1,24318E-10	0,001432877
	WT vs. flvA flvB KO	0,055401629	0,172904914	0,715460597
	WT. vs pgr1 KO	8,61319E-10	2,88595E-11	2,03324E-10
	WT vs. pgr1 ndhm KO	2,62857E-11	5,09202E-07	4,2548E-07
HL	WT vs. vde KO	0,001522269	2,25132E-09	0,002135258
	WT vs. ze KO	1,91034E-05	2,26722E-09	1,06006E-06
	WT vs. psbs l1 l2 KO	2,14859E-12	1,41909E-15	1,3313E-07
	WT vs. flvA flvB KO	0,994638185	0,000726509	0,532742048
	WT. vs pgr1 KO	0,000185904	0,000221303	0,002430735
	WT vs. pgr1 ndhm KO	1,8646E-06	3,3349E-23	3,33325E-21
FL	WT vs. vde KO	2,00909E-06	2,57089E-05	0,233113803
	WT vs. ze KO	3,73426E-05	9,77098E-07	2,01765E-07
	WT vs. psbs l1 l2 KO	0,000445567	3,03385E-10	6,78149E-07
	WT vs. flvA flvB KO	1,19906E-08	0,393517407	0,765580942
	WT. vs pgr1 KO	0,001971868	0,13035341	0,314319504
	WT vs. pgr1 ndhm KO	0,335638623	7,46367E-06	7,33071E-06

Tabella 5.4: One-Way ANOVA dei parametri relativi al PSI. Per il calcolo del *p-value* è stato utilizzato ogni punto della misura relativo alla fase di esposizione alla luce attinica. I *p-value*<0.05 sono evidenziati in verde.

5.4 Isolamento del mutante *ze psbs* KO

Al fine di approfondire quale tra le proteine triggers del quenching non fotochimico svolge un ruolo di maggiore importanza per la sua attivazione in presenza di zeaxantina, è stata eseguita la trasformazione del genotipo mutante *ze* KO con i costrutti *psbs* KO e *lhcsr1 lhcsr2* KO.

Dopo una prima fase di screening, ho partecipato alla caratterizzazione di alcune linee mutanti. È stata svolta una RT-PCR sulla regione *PSBS*, utilizzando come controllo positivo il genotipo mutante *ze* KO e come controllo negativo il genotipo mutante *psbs* KO. Il risultato della RT-PCR è riportato in Figura 5.38 A. Da questo esperimento sono stati isolati due cloni con genotipo *ze psbs* KO indicati come clone #1 e clone #2 i quali non presentano la banda relativa alla regione codificante *PsbS*.

Per confermare l'assenza di espressione della proteina PsbS nei due cloni isolati è stato eseguito un Western Blot. Come controlli positivi sono stati utilizzati il genotipo WT ed il genotipo di background della trasformazione *ze* KO; come controllo negativo è stato utilizzato il genotipo *psbs* KO. Il risultato di questo esperimento è riportato in Figura 5.38 B. I cloni #1 e #2 precedentemente testati hanno confermato l'assenza di espressione del complesso proteico PsbS.

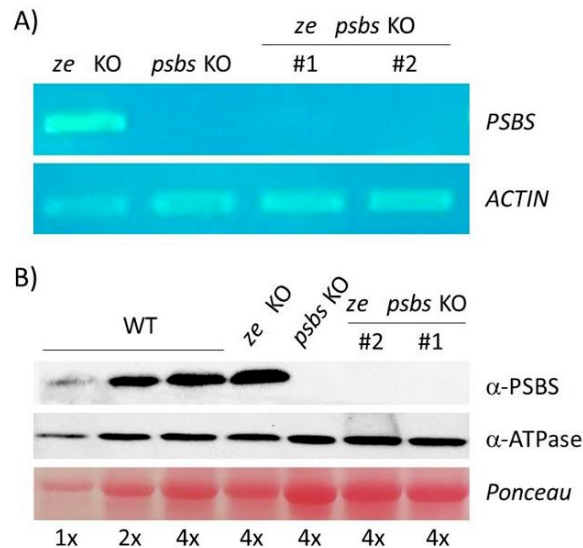


Figura 5.38: Isolamento del clone #1 e del clone #2 trasformati, con genotipo *ze psbs* KO. A) Risultato della RT-PCR su regione PSBS e ACTINA per i genotipi *ze* KO, *psbs* KO e cloni #1 e #2 trasformati, visualizzato tramite illuminazione con raggi UV in seguito alla corsa elettroforetica su gel di agarosio. La RT-PCR su regione ACTINA, che viene effettuata per valutare la qualità del cDNA analizzato, ha dato segnale di banda positivo per tutti i campioni testati. La RT-PCR su regione PSBS ha dato segnale di banda positivo sul controllo positivo *ze* KO, mentre ha dato segnale di banda negativo sul controllo negativo *psbs* KO e sui cloni #1 e #2. B) Western Blot eseguito ibridando le membrane con anticorpi specifici per PsbS ed ATPasi. L'immunoblot viene eseguito utilizzando come controlli positivi i genotipi WT e *ze* KO, come controllo negativo il genotipo *psbs* KO. L'immunoblot contro l'ATPasi viene eseguito come controllo e dà segnale di banda positivo per tutti i campioni testati. L'immunoblot contro PsbS dà segnale di banda positivo per i controlli positivi WT e *ze* KO, mentre dà segnale di banda negativo per il controllo negativo *psbs* KO e per i cloni testati #1 e #2.

5.4.1 Parziale caratterizzazione del genotipo mutante *ze psbs* KO

In questo progetto di tesi sono state svolte alcune analisi per la caratterizzazione del nuovo genotipo mutante *ze psbs* KO. In particolare, sono state analizzate le capacità fotosintetiche della pianta cresciuta in

condizioni di luce di controllo (CL) ed alta luce (HL). Le stesse analisi sono state effettuate su genotipo mutante *ze* KO e genotipo mutante *psbs* KO. Tramite misure di fluorescenza e di assorbimento della luce far-red, sono stati valutati i parametri fotosintetici relativi al PSII ed il PSI considerati anche nelle precedenti analisi per i mutanti dei trasporti elettronici alternativi e del meccanismo NPQ.

In Figura 5.39 sono riportati i valori assunti dai genotipi mutanti *psbs* KO, *ze* KO e *ze psbs* KO, in condizioni di crescita a CL dai parametri $Y(II)$, $Y(NPQ)$ ed $Y(NO)$.

Il mutante *ze psbs* KO mostra un significativo aumento della frazione di energia dissipata sotto forma di calore rispetto al genotipo *ze* KO, e della frazione di energia dissipata in maniera non regolata rispetto al mutante *psbs* KO.

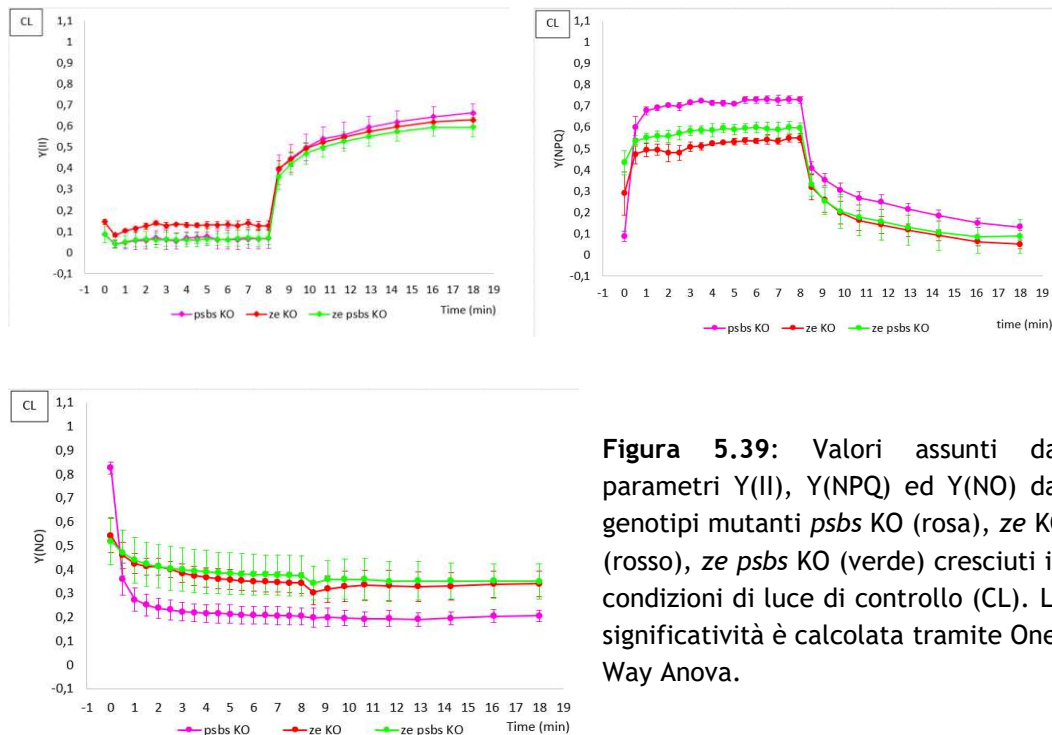


Figura 5.39: Valori assunti dai parametri $Y(II)$, $Y(NPQ)$ ed $Y(NO)$ dai genotipi mutanti *psbs* KO (rosa), *ze* KO (rosso), *ze psbs* KO (verde) cresciuti in condizioni di luce di controllo (CL). La significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

In Figura 5.40 sono riportati i valori assunti dai parametri NPQ ed $1-q_L$ per i genotipi *psbs* KO, *ze* KO e *ze psbs* KO cresciuti in condizioni di CL. Il genotipo *psbs* KO mostra una cinetica di attivazione del meccanismo NPQ più elevata rispetto agli altri due mutanti, i quali invece tra di loro non presentano particolari differenze significative. La frazione di centri di reazione chiusi del PSII risulta significativamente aumentata per il genotipo *ze psbs* KO rispetto a *ze* KO.

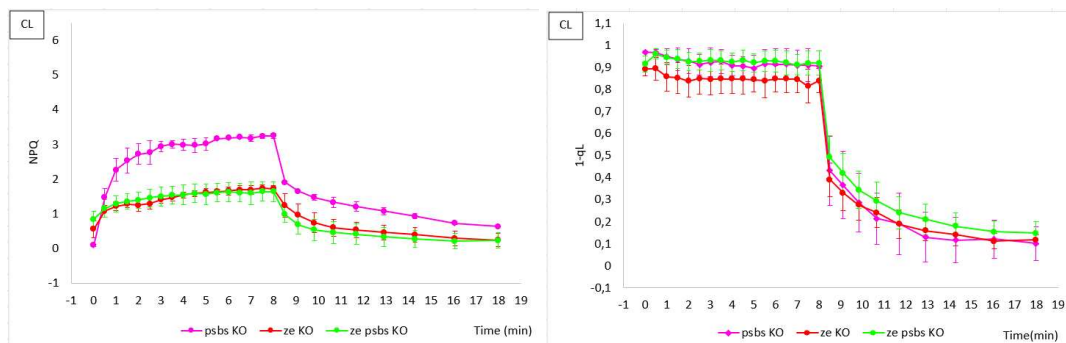


Figura 5.40: Valori assunti dai parametri NPQ ed 1-qL dai genotipi mutanti *psbs* KO (rosa), *ze* KO (rosso), *ze psbs* KO (verde) cresciuti in condizioni di luce di controllo (CL). La significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

In Figura 5.41 sono riportati i valori assunti dai parametri $Y(I)$, $Y(ND)$ ed $Y(NA)$, per i genotipi *psbs* KO, *ze* KO e *ze psbs* KO cresciuti in condizioni di CL.

Un significativo aumento dell'efficienza del PSI viene mostrato dal mutante *ze psbs* KO rispetto al mutante *psbs* KO, mentre la donor side limitation del mutante *ze psbs* KO risulta significativamente aumentata rispetto a quella mostrata dal mutante *ze* KO.

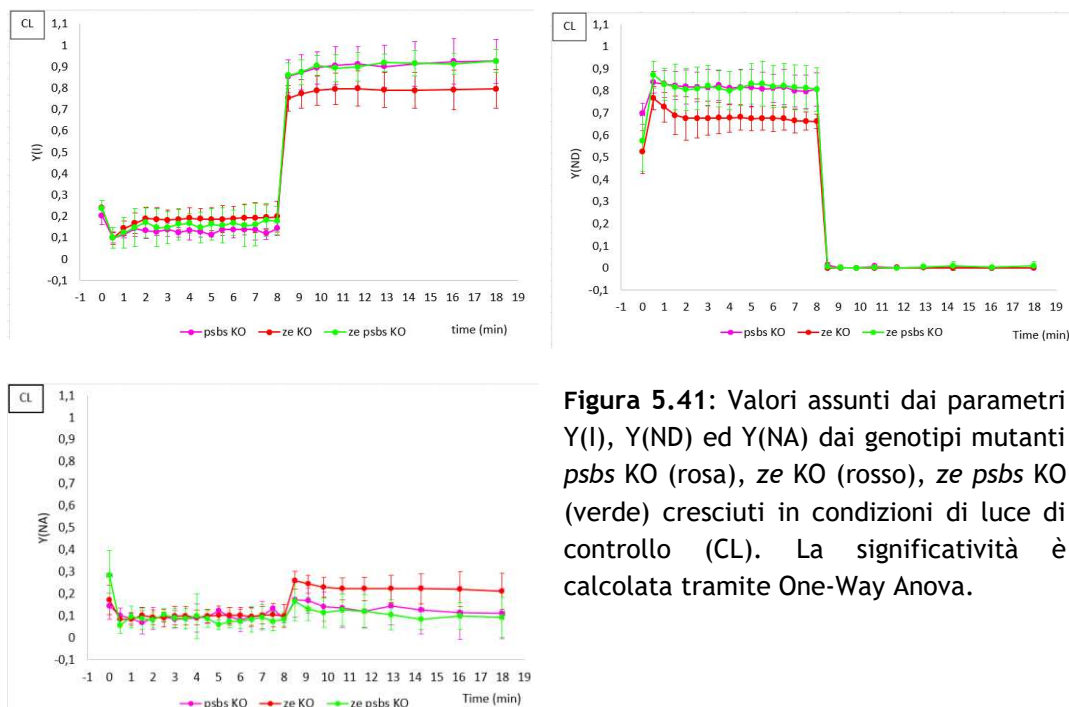


Figura 5.41: Valori assunti dai parametri $Y(I)$, $Y(ND)$ ed $Y(NA)$ dai genotipi mutanti *psbs* KO (rosa), *ze* KO (rosso), *ze psbs* KO (verde) cresciuti in condizioni di luce di controllo (CL). La significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

I tre mutanti considerati per la caratterizzazione del nuovo genotipo *ze psbs* KO sono stati cresciuti in condizioni di alta luce (HL). Questo esperimento può aiutare a chiarire il ruolo del complesso proteico PsbS

nella regolazione del meccanismo NPQ in presenza di un accumulo di zeaxantina.

L'analisi dei parametri $Y(II)$, $Y(NPQ)$ ed $Y(NO)$ delle piante cresciute in HL è riportata in Figura 5.42.

Come per i risultati osservati per gli stessi parametri in condizioni di crescita a CL, una differenza significativa si osserva tra i genotipi nella capacità di regolazione della dissipazione di energia. In particolare, la frazione di energia dissipata sotto forma di calore risulta significativamente maggiore per il genotipo *psbs* KO, mentre i mutanti *ze* KO e *ze psbs* KO presentano una frazione maggiore di energia dissipata in maniera non regolata. Tra i due mutanti *ze* KO e *ze psbs* KO risultano significative le differenze relative ai parametri dell'energia impiegata per la reazione fotochimica e della frazione dissipata sotto forma di calore.

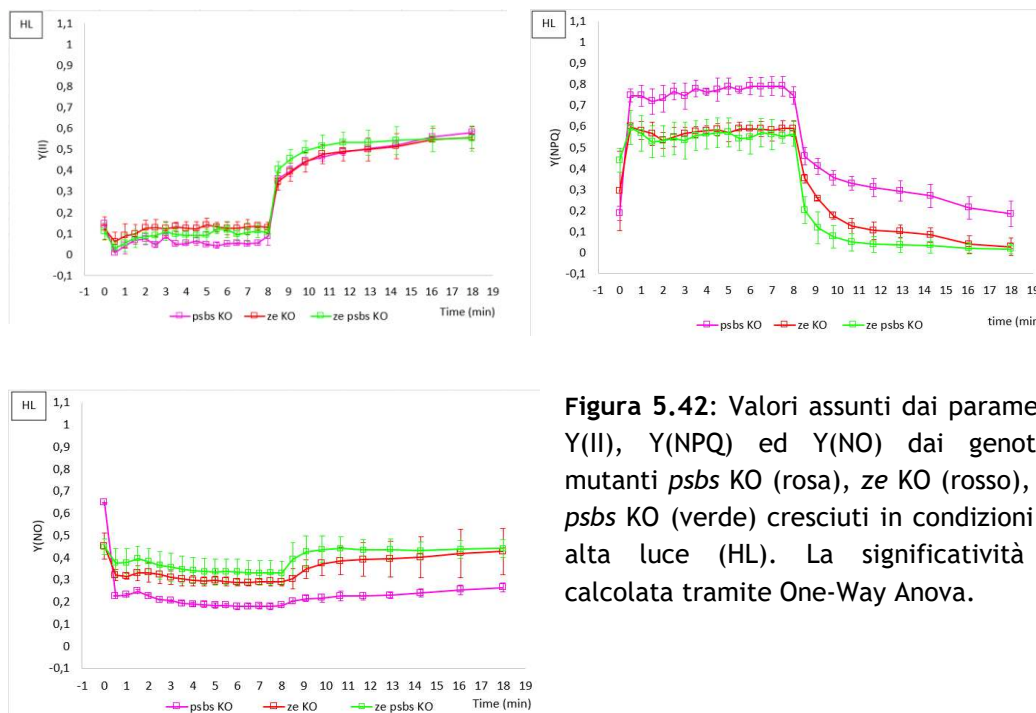


Figura 5.42: Valori assunti dai parametri $Y(II)$, $Y(NPQ)$ ed $Y(NO)$ dai genotipi mutanti *psbs* KO (rosa), *ze* KO (rosso), *ze psbs* KO (verde) cresciuti in condizioni di alta luce (HL). La significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

L'analisi dei parametri NPQ ed $1-qL$ per i genotipi *psbs* KO, *ze* KO e *ze psbs* KO ha prodotto i risultati riportati in Figura 5.43.

Differenze significative nella cinetica di attivazione del meccanismo NPQ per genotipi cresciuti in HL vengono riscontrate tra il genotipo *psbs* KO e gli altri due genotipi mutanti. In particolare, *psbs* KO mostra una maggior attivazione del meccanismo NPQ. Rispetto al genotipo *ze* KO, il doppio mutante *ze psbs* KO mostra una significativa diminuzione del parametro NPQ.

I valori assunti dal parametro 1-qL riportano delle tendenze diverse: una maggior frazione di centri di reazione chiusi del PSII viene presentata dal genotipo *psbs* KO, ed una minor frazione viene presentata dal genotipo *ze* KO. Il doppio mutante *ze psbs* KO mostra un fenotipo intermedio, significativamente differente solo dal mutante *psbs* KO.

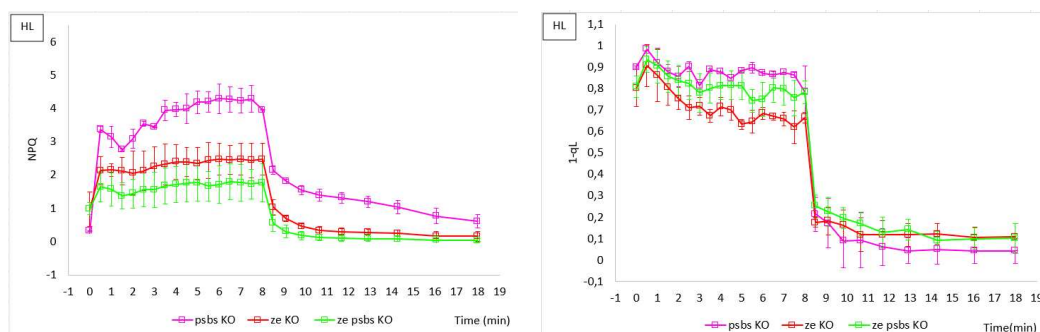


Figura 5.43: Valori assunti dai parametri NPQ ed 1-qL dai genotipi mutanti *psbs* KO (rosa), *ze* KO (rosso), *ze psbs* KO (verde) cresciuti in condizioni di alta luce (HL). La significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

Le misure dei parametri fotosintetici del PSI, rispettivamente Y(I), Y(ND) ed Y(NA), per le piante cresciute in condizioni di HL, sono riportate in Figura 5.44.

Il parametro relativo all'efficienza fotosintetica del mutante *psbs* KO risulta significativamente minore rispetto al mutante *ze* KO, e significativamente maggiore rispetto al mutante *psbs* KO. La acceptor side limitation del mutante *ze psbs* KO risulta significativamente maggiore rispetto a quella mostrata dal mutante *psbs* KO, mentre rispetto al mutante *ze* KO risulta maggiore la donor side limitation.

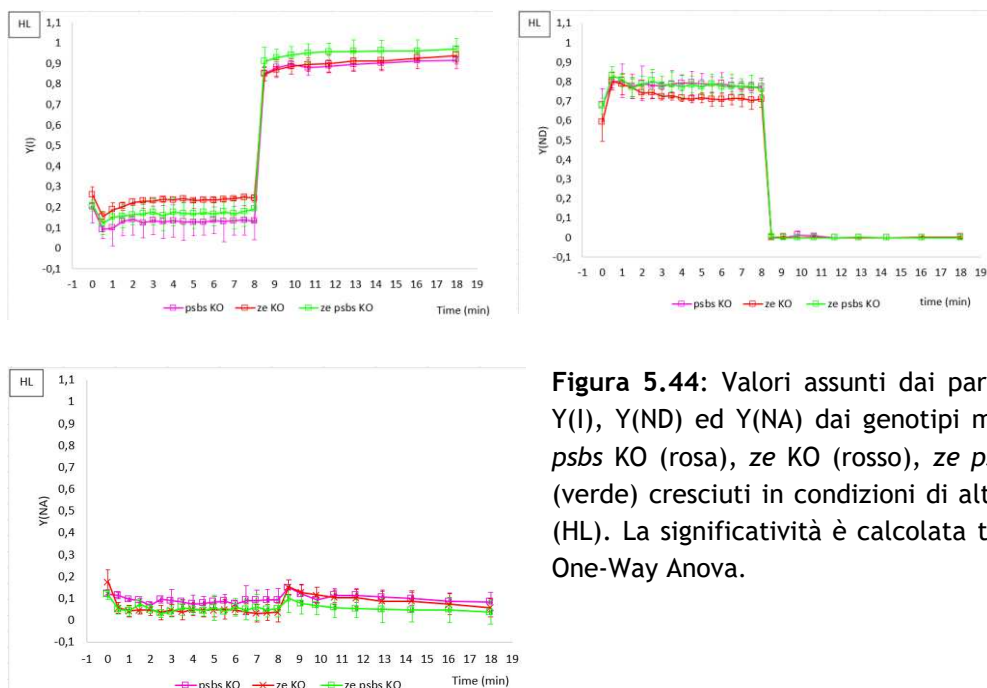


Figura 5.44: Valori assunti dai parametri Y(I), Y(ND) ed Y(NA) dai genotipi mutanti *psbs* KO (rosa), *ze* KO (rosso), *ze psbs* KO (verde) cresciuti in condizioni di alta luce (HL). La significatività è calcolata tramite One-Way Anova.

Le differenze tra genotipi WT e mutanti, cresciuti in condizioni di CL e HL, durante l'esposizione a luce attinica sono state esaminate tramite test statistico One-Way ANOVA, i *p-values* sono riportati nella Tabella 5.5 per i parametri relativi al PSII, e nella Tabella 5.6 per i parametri relativi al PSI

Condizione di luce	Genotipi comparati	Y(II)	Y(NPQ)	Y(NO)	1-qL	NPQ
CL	ze <i>psbs</i> KO vs. <i>psbs</i> KO	0,989395	0,014977	0,000731	0,390365	7,83E-07
	ze <i>psbs</i> KO vs. <i>ze</i> KO	8,41E-16	0,000494	0,267651	5,97E-10	0,750509
HL	ze <i>psbs</i> KO vs. <i>psbs</i> KO	0,000806	1,34E-05	5,09E-05	0,000382	2,33E-09
	ze <i>psbs</i> KO vs. <i>ze</i> KO	0,000971	0,580419	0,001048	0,000311	5,34E-07

Tabella 5.5: One-Way ANOVA dei parametri relativi al PSII. Per il calcolo del *p-value* è stato utilizzato ogni punto della misura relativo alla fase di esposizione alla luce attinica. I *p-value* < 0.05 sono evidenziati in verde.

Condizione di luce	Genotipi comparati	Y(I)	Y(ND)	Y(NA)
CL	ze <i>psbs</i> KO vs. <i>psbs</i> KO	0,00485	0,844545	0,848884
	ze <i>psbs</i> KO vs. <i>ze</i> KO	0,024031	6,57E-08	0,619813
HL	ze <i>psbs</i> KO vs. <i>psbs</i> KO	5,03E-06	0,91551	5,01E-07
	ze <i>psbs</i> KO vs. <i>ze</i> KO	7,7E-09	0,000241	0,73724

Tabella 5.6: One-Way ANOVA dei parametri relativi al PSI. Per il calcolo del *p-value* è stato utilizzato ogni punto della misura relativo alla fase di esposizione alla luce attinica. I *p-value* < 0.05 sono evidenziati in verde.

5.5 Test di crescita dei genotipi WT e mutanti nelle tre condizioni di luce

Il test di crescita svolto per i genotipi WT e mutanti dei trasporti elettronici alternativi e del meccanismo NPQ permette una valutazione del ruolo fotoprotettivo dei meccanismi stessi, e l'influenza che essi hanno nella capacità di crescita delle piante durante l'acclimatazione alle condizioni di luce stressante.

Una valutazione a livello visivo si può effettuare osservando il diverso fenotipo di crescita presentato dopo 30 giorni nelle tre condizioni di luce da parte dei genotipi WT e mutanti, riportati in Figura 5.45.

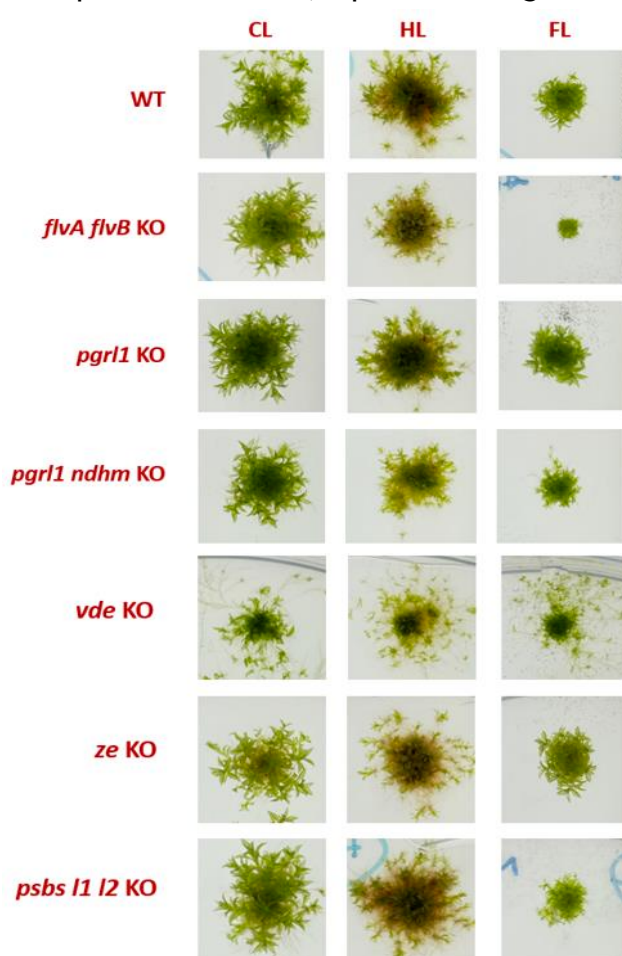


Figura 5.45: Immagine rappresentativa della crescita al giorno 30 dei genotipi WT e mutanti *flvA flvB* KO, *pgrl1* KO, *pgrl1 ndhm* KO, *vde* KO, *ze* KO e *psbs l1 l2* KO, cresciuti in condizioni di luce di controllo (CL), alta luce (HL), luce fluttuante (FL).

Dal punto di vista qualitativo si può osservare in generale una tendenza alla diminuzione della dimensione delle piante quando cresciute in condizioni di luce fluttuante, con una particolare diminuzione per il genotipo *flvA flvB* KO.

All'osservazione visiva si associa la misura della densità integrata relativa alla crescita al giorno 30 per ogni genotipo in tutte e tre le condizioni di luce (Figura 5.46).

Il genotipo mutante *flvA flvB* KO presenta una significativa diminuzione nella capacità di crescita in condizioni di luce HL e FL rispetto al genotipo WT cresciuto nelle medesime condizioni e al genotipo *flvA flvB* KO cresciuto in CL. Particolarmente ridotta risulta la crescita in condizioni di FL.

Il genotipo *pgrl1* KO in condizioni di CL mostra un aumento di crescita rispetto al genotipo WT in CL. Cresciuto in condizioni di HL e FL non mostra differenze significative comparato al rispettivo genotipo WT.

Il genotipo doppio mutante *pgrl1 ndhm* KO mostra una significativa diminuzione della capacità di crescita in condizioni di HL rispetto al genotipo WT in HL.

Tra i mutanti del meccanismo NPQ, il genotipo *vde* KO è l'unico ad esibire una crescita in condizioni di CL diminuita rispetto al genotipo WT in CL. In condizioni di HL la crescita è significativamente diminuita rispetto al WT; mentre, in condizioni di FL la crescita non risulta significativamente differente dal genotipo WT. Come si può osservare in Figura 5.45 sopra il fenotipo di crescita del mutante *vde* KO è morfologicamente diverso dalle altre pianta, presentando una crescita maggiorata di rizoidi.

I genotipi mutanti *ze* KO e *psbs l1 l2* KO non presentano significative diminuzioni della capacità di crescita nelle tre condizioni di luce comparati al rispettivo genotipo WT.

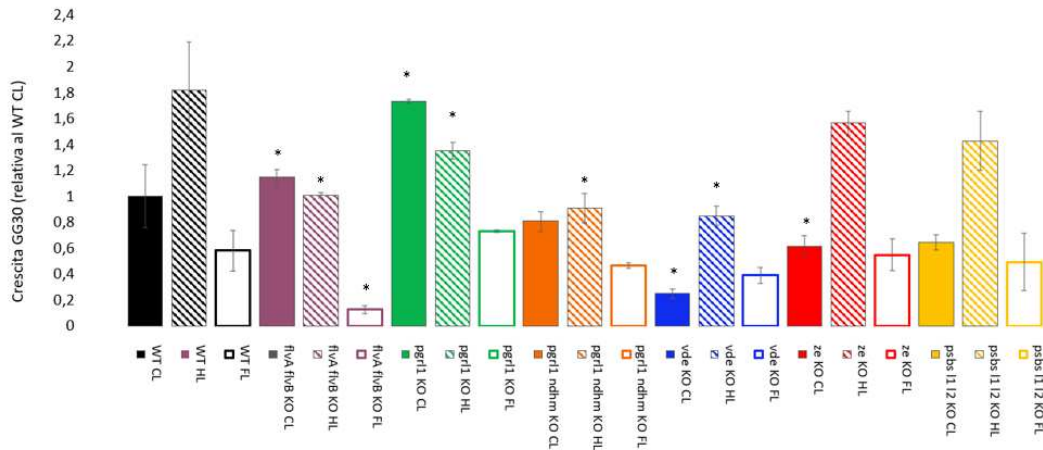


Figura 5.46: Analisi della densità integrata misurata su piante cresciute per 30 giorni in condizioni di luce di controllo CL (riempimento completo), alta luce HL (riempimento diagonale), luce fluttuante FL (bordo colorato), dei genotipi WT (nero), *flvA flvB* KO (viola), *pgrl1* KO (verde), *pgrl1 ndhm* KO (arancione), *vde* KO (blu), *ze* KO (rosso), *psbs 11 12* KO (giallo). La crescita è rappresentata come media e deviazione standard del rapporto tra la misura della densità integrata al giorno 30 del mutante e la misura della densità integrata media del genotipo WT al giorno 30 cresciuto in condizioni di CL. La significatività della differenza tra genotipo WT e mutante, cresciuti nella medesima condizione di luce, è calcolata con test univariato di Kruskal-Wallis. Le misure con $p\text{-value} < 0.05$ sono indicate con *.

L'analisi dei valori assunti dal rapporto F_v/F_m dai genotipi WT, mutanti dei trasporti elettronici alternativi e del meccanismo NPQ, al giorno 30 della crescita in condizioni di CL, HL e FL, dà informazioni sulle capacità fotosintetiche delle piante dopo l'acclimatazione. I risultati di tale analisi sono riportati in Figura 5.47.

La crescita in condizioni di HL comporta una riduzione significativa dell'efficienza quantica del PSII per tutti i genotipi, al di fuori del mutante *flvA flvB* KO il quale presenta valori paragonabili al genotipo cresciuto in CL. In questa condizione gli F_v/F_m scendono al di sotto del valore 0.7, soglia sopra cui si considera uno stato di benessere dell'apparato fotosintetico.

Il genotipo *vde* KO presenta la più ingente diminuzione dei valori assunti dell'efficienza quantica del PSII in condizioni di HL, assieme ad una forte diminuzione della capacità di crescita.

Il genotipo *ze* KO presenta una significativa diminuzione del rapporto F_v/F_m in tutte e tre le condizioni di luce.

In condizioni di crescita a FL si osserva che, ad esclusione del genotipo mutante *ze* KO, i valori assunti dal rapporto F_v/F_m sono paragonabili a quelli esibiti in condizioni di crescita a CL.

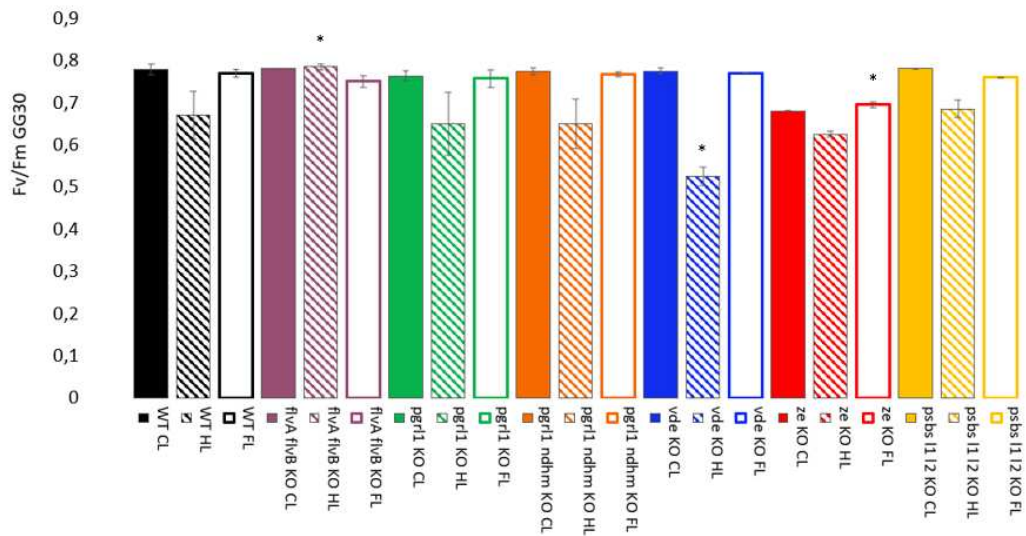


Figura 5.47: Valori assunti dal rapporto F_v/F_m su piante cresciute per 30 giorni in condizioni di luce di controllo CL (riempimento completo), alta luce HL (riempimento diagonale), luce fluttuante FL (bordo colorato), dei genotipi WT (nero), *flva flvb* KO (viola), *pgr1* KO (verde), *pgr1 ndhm* KO (arancione), *vde* KO (blu), *ze* KO (rosso), *psbs l1 l2* KO (giallo). La crescita è rappresentata come media e deviazione standard del rapporto tra la misura della densità integrata al giorno 30 del mutante e la misura della densità integrata media del genotipo WT al giorno 30 cresciuto in condizioni di CL. La significatività della differenza tra genotipo WT e mutante, cresciuti nella medesima condizione di luce, è calcolata con test univariato di Kruskal-Wallis. Le misure con $p\text{-value} < 0.05$ sono indicate con *.

6. DISCUSSIONE

6.1 Capacità di acclimatazione del genotipo WT

L'analisi della composizione dell'apparato fotosintetico attraverso Western Blot del genotipo WT cresciuto in condizioni di CL, HL e FL riportata in Figura 5.1 ha mostrato diversi risultati a seconda della proteina analizzata e della condizione di luce considerata.

L'enzima Rubisco è il primo ad intervenire nel Ciclo di Calvin-Benson, il quale porta alla sintesi di carboidrati che vanno a costituire la biomassa della pianta stessa. Un aumento del suo accumulo in condizioni di HL rispetto alle condizioni in CL è coerente con il fenotipo di crescita esibito dalla pianta nella medesima condizione, riportato in Figura 5.7. Infatti, la crescita del genotipo WT in condizioni di HL risulta aumentata rispetto alla crescita in CL. Parallelamente la diminuzione dell'accumulo della Rubisco in condizioni di FL è coerente con il fenotipo di crescita diminuito che si osserva nella medesima condizione di luce per il genotipo WT.

Questo risultato suggerisce che l'acclimatazione a condizione di alta luce comporti una up-regulation della produzione della proteina Rubisco, e viceversa per le condizioni di FL.

La mancanza di variazione dell'accumulo del sistema antenna LHCII legato al PSII, nelle tre condizioni di luce, suggerisce che queste non abbiano un ruolo nel processo di acclimatazione a tali condizioni di luce.

Il complesso proteico PsbS è una delle componenti responsabili dell'attivazione della componente qE del meccanismo NPQ. Un suo maggior accumulo in condizioni di crescita in HL e FL è coerente con la cinetica di attivazione dell'NPQ osservata in Figura 5.4, dove il genotipo WT in HL e FL assume valori maggiori rispetto al WT in CL. Questo risultato indica che in condizioni di crescita ad alta luce continua e fluttuante, vi sia una up-regulation della produzione di PsbS, la quale gioca un ruolo fondamentale per l'acclimatazione della pianta a tali regimi di luce.

La subunità D2 è costitutiva del core del PSII, ed il suo accumulo diminuito in condizioni di crescita in HL è coerente con la leggera tendenza di diminuzione dell'efficienza fotosintetica del PSII indicata dal rapporto F_v/F_m mostrato in Figura 5.3. Questo risultato potrebbe essere indicativo di una condizione di stress fisiologico che consegue dall'acclimatazione ad alta luce.

FlvB è una delle subunità che costituiscono il complesso FLV. Un suo maggior accumulo in condizioni di HL e FL, indica un processo di acclimatazione a tali condizioni di luce. In particolar modo è coerente con

l'essenziale funzione che esso svolge in condizioni di improvviso aumento di intensità luminosa, situazione che si verifica ciclicamente a luce fluttuante. I risultati suggeriscono però che il suo ruolo non sia limitato a questo tipo di condizioni, e che abbia un contributo importante anche in alta luce continua per alleviare la sovrariduzione della catena di trasporto elettronico.

La proteina PsaD è una subunità del PSI, ed il suo maggior accumulo in condizioni di FL è coerente con i risultati ottenuti dall'analisi del rapporto stechiometrico PSI/PSII riportati in Figura 5.2. In particolare, si osserva che il rapporto non varia nelle tre condizioni di luce, dunque un aumento del PSII indicato dalla proteina D2 è accompagnato da un aumento del PSI indicato dalla proteina PsaD. In condizioni di HL i risultati appaiono ambigui, in quanto visivamente l'accumulo della proteina D2 sembrerebbe diminuire rispetto a quello presentato in CL, mentre dalla densitometria ne risulta un leggero aumento. In quanto risultato di una sola replica, questo esperimento necessita di altre prove per essere confermato.

L'assenza di differenze significative tra i valori assunti dall'efficienza fotosintetica del PSII nelle tre condizioni di luce (Figura 5.3) ed una maggior capacità di attivazione del meccanismo NPQ (Figura 5.4) indicano che, esposte a condizioni di luce stressanti, le piante con genotipo WT sono in grado di attivare meccanismi fotoprotettivi che consentono l'acclimatazione a tali regimi di luce.

Dal punto di vista della capacità di regolazione della dissipazione dell'energia del PSII, si osserva che il maggior accumulo della proteina PsbS in condizioni di HL responsabile dell'attivazione del meccanismo NPQ, comporta una maggior capacità di dissipazione dell'energia sotto forma di calore e quindi una diminuzione della dissipazione in maniera non regolata, nel momento in cui la pianta viene esposta a forti intensità luminose (Figura 5.5).

L'assenza di variazioni nella donor side limitation e nella acceptor side limitation nelle tre condizioni di luce (Figura 5.6) indica che anche a livello del PSI vengono attivati meccanismi di fotoprotezione che consentono l'acclimatazione della pianta a tali regimi luminosi. Questo risultato è confermato dal maggior accumulo della proteina FlvB osservato nei risultati del Western Blot, in condizioni di HL e FL.

I risultati ottenuti dallo studio dei valori assunti dal parametro F_v/F_m durante la crescita per 30 giorni nelle diverse condizioni di luce, suggeriscono che la condizione di HL costituisce un forte stress temporaneo per la pianta. Successivamente, entrando in gioco i meccanismi fotoprotettivi, la pianta riesce ad acclimatarsi a questa condizione di luce.

Al fine di studiare il ruolo fotoprotettivo dei meccanismi del trasporto elettronico alternativo attorno al PSI, e dell'NPQ nel PSII, durante i processi di acclimatazione sono state svolte analisi fisiologiche, biochimiche e morfologiche su genotipi mutanti dei meccanismi stessi.

6.2 Acclimatazione dei genotipi mutanti dei trasporti elettronici alternativi intorno al PSI

L'efficienza quantica del PSII indicata dal rapporto F_v/F_m riportata in Figura 5.9, indica che in condizioni di crescita in HL tutti i mutanti del CEF e PSCEF soffrono uno stress, particolarmente marcato per i mutanti del CEF dove i valori scendono sotto allo 0.7. Le condizioni di crescita in FL comportano una riduzione dell'efficienza quantica del PSII solamente per il mutante *flvA flvB* KO, mancante del complesso FLV. Questo risultato è coerente con l'essenziale ruolo che questo complesso è noto avere in condizioni di improvviso aumento dell'intensità luminosa (Gerotto et al., 2016).

I valori assunti dai parametri $Y(II)$, $Y(NPQ)$, $Y(NO)$, NPQ ed $1-q_L$ in condizioni di CL, riportati nelle Figure 6.11 e 6.12, non presentano differenze significative rispetto a quelli presentati dal genotipo WT, suggerendo che i meccanismi di PCEF e CEF non influiscano sulle performance fotosintetiche del PSII. Analizzando però il primo valore assunto dai parametri $Y(II)$, $Y(NPQ)$ ed $Y(NO)$ all'accensione della luce attinica, riportato in Figura 5.10, si notano delle diverse capacità di regolazione della dissipazione dell'energia. In particolare, l'aumento della frazione di energia dissipata in maniera non regolata che caratterizza i mutanti *flvA flvB* KO e *pgrl1 ndhm* KO, suggerisce che i meccanismi di PCEF e CEF abbiano un ruolo nell'alleviare l'improvvisa sovrariduzione del LEF causata dalla accensione della luce attinica. Quando questi meccanismi mancano, le piante non sono in grado di dissipare l'improvviso eccesso di energia sotto forma di calore, che viene quindi emessa in maniera non regolata. Anche l'analisi del primo punto alla luce del parametro $1-q_L$ riportata in Figura 5.13, suggerisce uno stesso ruolo per i due meccanismi, in quanto un iniziale stato ridotto del Q_A potrebbe essere dovuta ad una incapacità di alleviare la sovrariduzione del LEF da parte dei mutanti privi di CEF e PCEF.

Un'assenza di differenze significative da parte del genotipo *pgrl1* KO all'accensione della luce attinica potrebbe essere spiegata dal fatto che

il CEF mediato dal complesso NDH-1 riesce singolarmente a compensare la mancanza del meccanismo mediato da PgrL1.

L'analisi degli stessi parametri per i mutanti cresciuti in condizioni di HL, riportata nelle Figure 6.15 e 6.16, non ha mostrato differenze significative con il genotipo WT cresciuto nella medesima condizione. Questo risultato suggerisce che nel processo di acclimatazione ad HL i meccanismi PCEF e CEF non hanno particolare influenza nelle performance fotosintetiche del PSII.

Analizzando però il valore assunto in HL dai parametri $Y(II)$, $Y(NPQ)$ ed $Y(NO)$ all'accensione della luce attinica, riportato in Figura 5.14, si notano delle differenze significative. La diversa distribuzione dell'energia, all'attivazione della luce attinica, tra via fotochimica, di dissipazione sotto forma di calore o fluorescenza, può aiutare ad asserire la fotoinibizione dell'apparato fotosintetico della pianta causata dall'acclimatazione ad alta luce.

Un'interessante differenza si evince tra il mutante del meccanismo PCEF ed i mutanti dei meccanismi CEF. In corrispondenza di una diminuzione dell'energia impiegata per la reazione fotochimica nel PSII, il mutante *flvA flvB* KO mostra un aumento della dissipazione dell'energia in maniera non regolata, mentre i mutanti *pgrl1* KO e *pgrl1 ndhm* KO mostrano un aumento dell'energia dissipata come calore nel meccanismo NPQ. Questi risultati indicano che la mancanza dei meccanismi PCEF e CEF comporta una minor capacità di impiego dell'energia nella reazione fotochimica nel momento in cui vi è un improvviso aumento dell'intensità luminosa. Per i mutanti del meccanismo FLV dipendente, la diminuzione è data da una maggior riduzione del plastochinone Q_A (Figura 5.17), che limita la cessione degli elettroni da parte del PSII il quale dissipa l'eccesso di energia in maniera non regolata. La mancanza parziale o completa del meccanismo CEF invece potrebbe avere un'influenza sulle componenti attivatrici del meccanismo NPQ durante la crescita in HL, causando una maggior capacità di dissipazione dell'energia come calore nel momento in cui c'è un aumento di intensità luminosa. Per chiarire questi meccanismi sono necessari altri esperimenti, come ad esempio un'analisi biochimica della composizione dell'apparato fotosintetico dei mutanti dei trasporti alternativi acclimatati a condizioni di HL.

I risultati relativi alle capacità fotosintetiche del PSII da parte dei genotipi mutanti dei trasporti elettronici alternativi cresciuti in condizioni di FL hanno evidenziato una diminuzione del parametro $Y(II)$ cui corrisponde un aumento di $Y(NPQ)$ da parte del genotipo *flvA flvB* KO (Figura 5.20). lo stesso mutante presenta una più graduale fase di rilassamento del

meccanismo NPQ, ed una elevata riduzione del chinone Q_A (Figura 5.20). Questi risultati suggeriscono che l'acclimatazione a condizioni di alta luce fluttuante comportino uno stress per la pianta priva di PCEF mediato da FLV, che causa fotoinibizione. Questo risultato suggerisce che il complesso FLV svolge un ruolo importante per alleviare la sovrariduzione della catena di trasporto elettronico lineare, durante l'acclimatazione a condizioni di FL.

Le analisi dell'efficienza fotosintetica del PSI dei mutanti dei meccanismi dei trasporti elettronici alternativi cresciuti in condizioni di CL, HL e FL aiutano a comprendere il ruolo fotoprotettivo che essi svolgono per il PSI. In condizioni di crescita a CL (Figura 5.21) si osserva che all'accensione della luce attinica i valori dell'efficienza fotosintetica dei mutanti *flvA flvB* KO e *pgrl1 ndhm* KO sono diminuiti rispetto al WT, mentre si osserva un forte incremento della acceptor side limitation. Questo risultato indica che i meccanismi PCEF e CEF hanno un ruolo nell'alleviare la sovrariduzione degli accettori elettronici del PSI causata da un improvviso eccesso di luce. In particolare, la mancanza totale del CEF provoca un'elevata acceptor side limitation per tutta la durata della misura, mentre gli altri genotipi mutanti tornano ad avere valori paragonabili al WT. Questo può indicare che il CEF riesce a compensare la funzione di FLV quando quest'ultimo manca, ma al contrario FLV singolarmente non compensa una mancanza totale della funzione del CEF, suggerendo un ruolo di maggior rilevanza nell'ossidazione di Fd e NADPH da parte dei meccanismi mediati da PgrL1 e NDH-1 in condizioni di eccesso di luce.

In condizioni di crescita in HL (Figura 5.22), il parametro della acceptor side limitation risulta più elevato all'accensione della luce per tutti i mutanti dei trasporti elettronici alternativi rispetto al WT, evidenziando nuovamente il ruolo di questi meccanismi nell'alleviare la riduzione degli accettori elettronici del PSII. In particolare, anche in questa condizioni di crescita il parametro $Y(NA)$ del genotipo mutante *pgrl1 ndhm* KO risulta essere più elevato rispetto ai valori assunti per gli altri genotipi mutanti, restando maggiorato rispetto al WT per tutta la durata della misura. Questo risultato chiarisce che la mancanza di trasporto ciclico causa fotoinibizione alla pianta cresciuta in condizioni di HL, la quale non è in grado di ripristinare lo stato ossidato degli accettori elettronici del PSI. La mancanza del trasporto ciclico in condizioni di HL sembra essere quindi più limitante rispetto alla mancanza del meccanismo mediato da FLV, definendone un ruolo fondamentale per l'acclimatazione a questo regime di luce.

I risultati delle misure dell'efficienza fotosintetica del PSI per i genotipi cresciuti in condizioni di FL (Figura 5.23) suggeriscono che il genotipo

mutante *flvA flvB* KO a causa della mancanza del complesso FLV, soffre particolarmente questa condizione di luce. Il mutante *pgrl1 ndhm* KO, completamente mancante del trasporto elettronico ciclico, assume anch'esso valori elevati di acceptor side limitatio, suggerendo che anche i trasporti ciclici giochino un ruolo importante nell'acclimatazione a condizioni di luce fluttuante.

Le analisi della composizione dell'apparato fotosintetico misurate tramite rapporto stechiometrico PSI/PSII, sono riportate in Figura 5.24. La diminuzione del rapporto PSI/PSII per il mutante *flvA flvB* KO in condizioni di crescita a FL potrebbe essere spiegata dalla diminuzione del PSI, coerente con un maggiore fotodanno causato dall'assenza del complesso FLV essenziale per l'acclimatazione in condizioni di FL.

6.3 Acclimatazione dei genotipi mutanti del meccanismo NPQ

Tramite la misura dei valori assunti dal parametro F_v/F_m dei genotipi mutanti del meccanismo NPQ cresciuti in condizioni di CL, HL e FL, si può valutare lo stress che interessa l'apparato fotosintetico durante l'acclimatazione in mancanza di determinati componenti dell'NPQ. I risultati riportati in Figura 5.25, indicano che in condizioni di crescita in CL solamente il mutante *ze* KO presenta una diminuzione del rapporto F_v/F_m rispetto al WT, suggerendo che la mancata conversione di zeaxantina in violaxantina che interessa questo mutante, comporta una diminuzione dell'efficienza quantica massima del PSII. In condizioni di crescita in HL, invece, la diminuzione dell' F_v/F_m rispetto al valore esibito dal WT ed al di sotto di 0.7, interessa tutti i genotipi mutanti dell'NPQ. Questo risultato suggerisce che la mancanza di una o più componenti attivatrici dell'NPQ, comporta uno stress per l'apparato fotosintetico delle piante, sottolineando un fondamentale ruolo fotoprotettivo del meccanismo stesso durante il processo di acclimatazione in HL. In condizioni di crescita in FL risulta una diminuzione per l' F_v/F_m dei mutanti NPQ rispetto al WT, ma di un'entità minore della diminuzione che si presenta in condizioni di HL. Questo risultato suggerisce che il meccanismo NPQ svolge un ruolo fotoprotettivo anche nell'acclimatazione a condizioni di FL, ma la sua mancanza o una diminuzione della capacità di dissipazione dell'energia in eccesso sotto forma di calore incide molto più negativamente sulla performance fotosintetica del PSII in acclimatazione in HL.

L'analisi dei parametri fotosintetici del PSII dei mutanti dell'NPQ cresciuti in condizioni di CL ha prodotto i risultati riportati nelle Figura 5.26 e 5.27.

Tutti i mutanti del meccanismo NPQ riportano una diminuzione della frazione di energia dissipata sotto forma di calore, alla quale corrisponde un aumento di quella dissipata in maniera non regolata. La più significativa diminuzione del parametro $Y(NPQ)$ si osserva da parte del genotipo *psbs l1 l2 KO* il quale manca completamente della componente qE del processo NPQ, seguito da *vde KO* ed infine da *ze KO*; coerentemente anche il parametro NPQ diminuisce. Questi risultati suggeriscono che la mancanza di produzione di zeaxantina o delle proteine triggers del meccanismo NPQ, quali PsbS, LhcsR1, LhcsR2, danneggiano le capacità di attivazione del meccanismo NPQ. In particolare, l'assenza delle proteine triggers rende quasi nulla la capacità di dissipazione dell'energia in eccesso, mentre l'assenza della produzione di zeaxantina causa una notevole diminuzione dell'NPQ ma non rendendolo assente. L'incapacità di riconversione della zeaxantina in violaxantina che caratterizza il mutante *ze KO* risulta in un accumulo costitutivo della xantofilla nella membrana tilacoidale, il quale viene evidenziato dal valore assunto dal primo punto di esposizione alla luce attinica del parametro NPQ che risulta più elevato per il genotipo mutante *ze KO* rispetto a tutti gli altri genotipi studiati (Figura 5.33). l'accumulo di zeaxantina danneggia le capacità di attivazione del meccanismo NPQ, ma i risultati, suggeriscono un ruolo meno incisivo della funzione dell'enzima ZE rispetto alle altre componenti coinvolte nel meccanismo NPQ, in quanto la diminuzione dell'attivazione del meccanismo NPQ risulta meno significativa rispetto a quella presentata dagli altri mutanti.

Analizzando le misure degli stessi parametri per piante mutanti del meccanismo NPQ cresciute in condizioni di HL (Figure 6.28 e 6.29), si può approfondire il ruolo fotoprotettivo delle diverse componenti attivatrici dell'NPQ nel processo di acclimatazione ad alta luce. Anche in queste condizioni di luce tutti i genotipi mutanti mostrano una diminuzione della frazione di energia dissipata sotto forma di calore, a cui corrisponde un aumento di quella dissipata in maniera non regolata, indicando che la mancanza di una o più componenti del meccanismo NPQ impedisce una capacità di regolazione della dissipazione di energia. In particolare, osservando la cinetica di attivazione del meccanismo NPQ, emerge che il genotipo mutante *vde KO* ed il genotipo WT mostrano un iniziale picco di attivazione dell'NPQ, che negli altri due mutanti non è visibile. Questo risultato suggerisce che in condizioni di crescita in HL vi sia una up-regulation della sintesi delle proteine triggers dell'NPQ, responsabili di una prima temporanea attivazione dell'NPQ. In seguito, il genotipo WT mostra nuovamente un aumento di NPQ mentre il genotipo *vde KO* resta costante e diminuito rispetto all'iniziale picco. Questa seconda fase di

attivazione del meccanismo NPQ è quindi riconducibile all'attività della zeaxantina, che mancando nel genotipo *vde* KO, non presenta questa più lenta attivazione del meccanismo. Il genotipo *psbs l1 l2* KO, anche in condizione di crescita in HL mostra una totale incapacità di attivazione del meccanismo NPQ, che risulta in una emissione dell'energia in eccesso in maniera non regolata. I mutanti *vde* KO e *psbs l1 l2* KO, presentano un'elevata frazione di centri di reazione del PSII rispetto agli altri genotipi, indicando un ruolo importante di zeaxantina, PsbS, LhcsR1 e LhcsR2 nell'alleviare l'eccesso di energia accumulato nel LEF dissipandola sotto forma di calore nel meccanismo NPQ. Anche il mutante *ze* KO mostra una diminuita capacità di attivazione del meccanismo NPQ, indicando che l'accumulo di zeaxantina comporta uno stress per la pianta.

In condizioni di crescita a FL (Figure 6.30 e 6.31) si osservano risultati simili alle condizioni di crescita in HL, con la differenza che il parametro 1-qL risulta paragonabile al genotipo WT per tutti i mutanti, indicando che l'acclimatazione alla condizione di FL comporta una sovrariduzione minore del Q_A e quindi una minor fotoinibizione del LEF.

Complessivamente, in Figura 5.32, si osserva che le mutazioni portate dai genotipi *vde* KO e *psbs l1 l2* KO comportano la maggior incapacità di attivazione del meccanismo NPQ in tutte le condizioni di crescita; mentre, l'accumulo di zeaxantina che caratterizza il genotipo *ze* KO comporta una diminuita capacità di attivazione del meccanismo NPQ, ma di un'entità inferiore rispetto agli altri due mutanti. L'analisi dell'ultimo punto alla luce assunto dal parametro 1-qL indica la capacità di alleviare la sovrariduzione del Q_A da parte delle piante. In particolare, il risultato suggerisce che in condizioni di crescita in HL vi sia una up-regulation della produzione di VDE, PsbS, LhcsR1 ed LhcsR2 che consente di dissipare l'eccesso di energia sotto forma di calore.

L'assenza di differenze significative nei parametri relativi all'efficienza fotosintetica del PSI per i genotipi mutanti del meccanismo NPQ cresciuti in condizioni di CL, HL e FL (Figure 6.34, 6.35, 6.36) indica che il meccanismo NPQ non svolge un ruolo fotoprotettivo essenziale per il PSI. Questi risultati suggeriscono che il meccanismo NPQ, svolga invece una essenziale funzione fotoprotettiva per il PSII durante il processo di acclimatazione in FL, e soprattutto in HL.

6.4 Parziale caratterizzazione del mutante *ze psbs* KO

L'analisi delle capacità fotosintetiche relative al PSII in condizioni di crescita in CL del genotipo mutante *ze psbs* KO, comparate a quelle dei

genotipo *ze* KO e *psbs* KO, riportate nelle Figure 6.39, 6.40 e 6.41, suggeriscono che la mancanza del complesso PsbS su genotipo *ze* KO non influisce sulle capacità di regolazione della dissipazione di energia. In particolare, la capacità di attivazione del meccanismo NPQ resta invariata tra mutante *ze* KO e *ze psbs* KO, e diminuita rispetto alle capacità presentate dal mutante *psbs* KO. Questo risultato suggerisce che l'accumulo di zeaxantina rappresenta un limite maggiore per l'attivazione del meccanismo NPQ rispetto alla mancanza del complesso PsbS.

A livello di capacità fotosintetiche del PSII non sono presenti variazioni tra i genotipi analizzati, chiarendo l'assenza di un ruolo influente da parte del meccanismo NPQ per la fotoprotezione del PSI.

I risultati relativi all'analisi dei parametri fotosintetici del PSII dei mutanti cresciuti in condizioni di HL, riportati nelle Figure 6.42 e 6.43, suggeriscono che l'assenza del complesso PsbS in mutanti *ze* KO influiscono sulla capacità di regolazione della dissipazione dell'energia. Le diminuite capacità di attivazione del meccanismo NPQ in questa condizione per il mutante *psbs ze* KO rispetto a *ze* KO suggeriscono un ruolo del complesso PsbS nell'acclimatazione a condizioni di HL, andando in particolare dissipare l'eccesso di energia che altrimenti provoca una maggior frazione di centri di reazione del PSII allo stato chiuso. L'analisi dei parametri fotosintetici del PSI riportata in Figura 5.44 per piante cresciute in HL, conferma che il meccanismo NPQ regolato dal complesso PsbS non ha un'importante ruolo fotoprotettivo per il PSI.

6.5 Influenza dei meccanismi fotoprotettivi sulle capacità di crescita durante i processi di acclimatazione alle tre condizioni di luce

Dalle analisi della capacità di crescita dei genotipi WT e mutanti nelle tre condizioni di luce, riportate nelle Figure 6.45 e 6.46, si osserva che anche cresciuti in condizioni ottimali di luce (CL), i mutanti del meccanismo NPQ, in particolare il mutante *vde* KO, mostrano una diminuzione della crescita, suggerendo un'importanza fondamentale di un pieno funzionamento del meccanismo NPQ nel processo di produzione di biomassa. L'aumento della crescita del mutante *pgr1* KO in condizioni di CL rispetto al genotipo WT non è coerente con le caratteristiche esibite dal mutante negli esperimenti condotti precedentemente. Questa misura necessita di ulteriori repliche.

La crescita in condizioni di HL risulta aumentata rispetto a quella presentata in condizioni di CL in tutti i genotipi, suggerendo che una up-

regulation dell'accumulo di Rubisco in queste condizioni di luce possa interessare anche i genotipi mutanti. Il genotipo *flvA flvB* KO è l'unico a fare eccezione in questo senso, mostrando una diminuzione della crescita tra condizioni di luce CL e HL. Questo suggerisce un ruolo importante del meccanismo PCEF mediato da FLV per l'acclimatazione a questa condizione di luce. A confronto con la crescita del genotipo WT, in condizioni di HL tutti i mutanti dei meccanismi PCEF e CEF mostrano una diminuzione di crescita, suggerendone un importante ruolo per la produzione di biomassa durante il processo di acclimatazione. Tra i mutanti del meccanismo NPQ, la mancanza di produzione di zeaxantina che caratterizza il genotipo *vde* KO sembra essere la mutazione che influisce più negativamente nelle capacità di crescita della pianta, suggerendo un ruolo importante della xantofilla per la crescita durante il processo di acclimatazione in HL.

In condizioni di FL si osserva una generica diminuzione della crescita. Particolarmente inibita risulta la crescita del genotipo mutante *flvA flvB* KO in condizioni di FL. Questi risultati suggeriscono che i cicli di alta e bassa intensità luminosa che caratterizzano le condizioni di FL rappresentano una limitazione per la capacità di crescita della pianta in generale. Un particolare ruolo di importanza in questa condizione lo svolge il complesso FLV che media il trasporto pseudo-ciclico nel PSI, in quanto la sua mancanza risulta in una forte diminuzione della capacità di crescita per la pianta.

L'analisi dei valori assunti dal rapporto F_v/F_m dei genotipi WT e mutanti al giorno 30 di crescita nelle condizioni di CL, HL e FL è riportata in Figura 5.47. Durante la crescita in HL i risultati indicano una condizione di stress per le piante la cui efficienza fotochimica del PSII diminuisce. In condizioni di crescita a FL i risultati indicano che le piante, nonostante le mutazioni che portano, sono in grado di compensare attivando gli altri meccanismi che ne consentono una buona efficienza quantica del PSII e quindi un'acclimatazione a take regime luminoso.

7. CONCLUSIONE

La fotosintesi, pilastro fondamentale della vita sulla Terra, richiede una fine regolazione per rispondere alle mutevoli condizioni ambientali. In questo contesto, i meccanismi di quenching non fotochimico e di trasporto elettronico alternativo emergono come guardiani essenziali per preservare l'efficienza fotosintetica durante i periodi di stress luminoso.

L'approfondita analisi condotta su *P. patens* ha rivelato un intricato intreccio di regolazioni sotto differenti regimi luminosi. In particolare, emerge una funzione fotoprotettiva efficace da parte del meccanismo NPQ durante l'acclimatazione in entrambe le condizioni di luce, mentre i meccanismi di PCEF e CEF sembrano avere un ruolo fotoprotettivo preponderante rispettivamente nei processi di acclimatazione a FL e HL. Questi risultati mettono in luce una straordinaria plasticità dell'apparato fotosintetico nel gestire le variazioni luminose e gli stress che esse comportano. La comprensione del ruolo dei meccanismi fotoprotettivi riveste un'importanza cruciale, non solo per ampliare la conoscenza del mondo vegetale, ma anche per aprire nuove prospettive nelle applicazioni in campo agricolo. Questa conoscenza è fondamentale per lo sviluppo di strategie innovative che possano migliorare in modo sostenibile le capacità fotosintetiche delle piante, contribuendo così ad affrontare le sfide ambientali future.

8. BIBLIOGRAFIA

- Alboresi A, Gerotto C, Giacometti GM, Bassi R, Morosinotto T (2010)** *Physcomitrella patens* mutants affected on heat dissipation clarify the evolution of photoprotection mechanisms upon land colonization. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 11128-11133
- Alboresi A, Storti M, Cendron L, Morosinotto T (2019a)** Role and regulation of class-C flavodiiron proteins in photosynthetic organisms. *Biochemical Journal* **476**: 2487-2498
- Alboresi A, Storti M, Morosinotto T (2019b)** Balancing protection and efficiency in the regulation of photosynthetic electron transport across plant evolution. *New Phytologist* **221**: 105-109
- Bailleul B, Cardol P, Breyton C, Finazzi G (2010)** Electrochromism: a useful probe to study algal photosynthesis. *Photosynth Res* **106**: 179-189
- Baker NR (2008)** Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 89-113
- Barber J (2003)** Photosystem II: the engine of life. *Quart Rev Biophys* **36**: 71-89
- Barnes, Sue N (2017)** Invito alla Biologia: cellula - genetica - evoluzione - animali - piante. Zanichelli
- Beraldo C, Guyon-Debast A, Alboresi A, Nogu  F, Morosinotto T (2023)** Functional analysis of PSBS transmembrane domains through base editing in *Physcomitrium patens*. *The Plant Journal* **113**: 1049-1061
- Croce R, Van Amerongen H (2014)** Natural strategies for photosynthetic light harvesting. *Nat Chem Biol* **10**: 492-501
- Finazzi G, Furia A, Barbagallo RP, Forti G (1999)** State transitions, cyclic and linear electron transport and photophosphorylation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1413**: 117-129
- Gerotto C, Alboresi A, Giacometti GM, Bassi R, Morosinotto T (2011)** Role of PSBS and LHCSR in *Physcomitrella patens* acclimation to high light and low temperature. *Plant Cell & Environment* **34**: 922-932
- Gerotto C, Alboresi A, Meneghesso A, Jokel M, Suorsa M, Aro E-M, Morosinotto T (2016)** Flavodiiron proteins act as safety valve for electrons in *Physcomitrella patens*. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**: 12322-12327

- Hisabori T, Sunamura E-I, Kim Y, Konno H (2013)** The Chloroplast ATP Synthase Features the Characteristic Redox Regulation Machinery. *Antioxidants & Redox Signaling* **19**: 1846-1854
- Johnson MP (2016)** Photosynthesis. *Essays in Biochemistry* **60**: 255-273
- Kaiser E, Correa Galvis V, Armbruster U (2019)** Efficient photosynthesis in dynamic light environments: a chloroplast's perspective. *Biochemical Journal* **476**: 2725-2741
- Klughhammer C, Schreiber U (2008)** Saturation Pulse method for assessment of energy conversion in PS I.
- Kukuczka B, Magneschi L, Petroustos D, Steinbeck J, Bald T, Powikrowska M, Fufezan C, Finazzi G, Hippler M (2014)** Proton Gradient Regulation5-Like1-Mediated Cyclic Electron Flow Is Crucial for Acclimation to Anoxia and Complementary to Nonphotochemical Quenching in Stress Adaptation. *Plant Physiology* **165**: 1604-1617
- Lang D, Zimmer AD, Rensing SA, Reski R (2008)** Exploring plant biodiversity: the *Physcomitrella* genome and beyond. *Trends in Plant Science* **13**: 542-549
- Li X-P, Müller-Moulé P, Gilmore AM, Niyogi KK (2002)** PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 15222-15227
- Malnoë A (2018)** Photoinhibition or photoprotection of photosynthesis? Update on the (newly termed) sustained quenching component qH. *Environmental and Experimental Botany* **154**: 123-133
- Pinnola A, Dall'Osto L, Gerotto C, Morosinotto T, Bassi R, Alboresi A (2013)** Zeaxanthin Binds to Light-Harvesting Complex Stress-Related Protein to Enhance Nonphotochemical Quenching in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* **25**: 3519-3534
- Rascio N, Carfagna S, Esposito S, La Rocca N, Lo Gullo MA, Trifilò P, Trost P, Vona V (2021)** *Elementi di Fisiologia Vegetale, III Edizione*. EdiSES
- Rensing SA, Goffinet B, Meyberg R, Wu S-Z, Bezanilla M (2020)** The Moss *Physcomitrium* (*Physcomitrella*) *patens*: A Model Organism for Non-Seed Plants. *Plant Cell* **32**: 1361-1376
- Renzaglia KS, Schuette S, Duff RJ, Ligrone R, Shaw AJ, Mishler BD, Duckett JG (2007)** Bryophyte phylogeny: Advancing the molecular and morphological frontiers. *The Bryologist* **110**: 179-213

- Schaefer D, Zryd J-P, Knight CD, Cove DJ (1991)** Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*. *Molec Gen Genet* **226**: 418-424
- Stirbet A, Lazár D, Guo Y, Govindjee G (2020)** Photosynthesis: basics, history and modelling. *Annals of Botany* **126**: 511-537
- Storti M, Segalla A, Mellon M, Alboresi A, Morosinotto T (2020)** Regulation of electron transport is essential for photosystem I stability and plant growth. *New Phytologist* **228**: 1316-1326
- Zimmer A, Lang D, Richardt S, Frank W, Reski R, Rensing SA (2007)** Dating the early evolution of plants: detection and molecular clock analyses of orthologs. *Mol Genet Genomics* **278**: 393-402

RINGRAZIAMENTI

Innanzitutto, vorrei ringraziare il Prof. Alessandro Alboresi, la cui gentile guida è stata per me fondamentale in questo percorso.

Ringrazio Claudia per essermi stata d'esempio durante questi mesi di tirocinio, per avermi aiutata sempre, per la sua infinita disponibilità e per aver creato un ambiente stimolante e leggero in cui imparare moltissimo.

Ringrazio Giulia, Elena, Ester, Marco, Pietro, Paolo e Jan per aver reso immensamente divertenti ed istruttivi questi ultimi due anni. Sono grata che la vita ci abbia messo nello stesso cammino, avete reso indimenticabile questo percorso.

Ringrazio Federico e le mie amiche di sempre, Federica e Jenny, la cui costante ed irremovibile presenza nella mia vita è stata e sarà sempre un insegnamento sul significato di vera amicizia.

Ringrazio Jan per il sostegno, la pazienza e l'amore con cui mi è stato vicino in questi mesi, per la serenità e la gioia che ha portato nella mia vita. La tua curiosità e la tua passione sono per me un'inestimabile fonte di ispirazione, lasceremo questo pianeta migliore di come l'abbiamo trovato.

Infine, voglio dedicare questo lavoro alla mia Famiglia. Ringrazio Morena, Valter e Luca per avermi spronata a fare sempre del mio meglio, per aver sempre creduto in me e per avermi accompagnata con entusiasmo ed amore in ogni momento importante della vita.