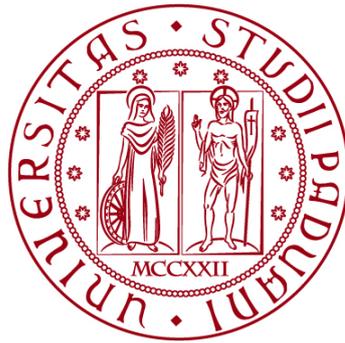


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA

**Studio di mutanti della fotoprotezione
di *Physcomitrium patens*
cresciuto in diverse condizioni di luce**

Tutor: Prof. Alessandro Alboresi
Dipartimento di Biologia

Laureanda: Giulia Corsini

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

ABSTRACT.....	1
1. INTRODUZIONE	2
1.1. Fotosintesi ossigenica.....	2
1.2. Regolazione della fotosintesi	3
1.2.1. NPQ: <i>Non-Photochemical quenching</i>	3
1.2.2. Ciclo delle xantofille	4
1.2.3. Proteine LHCSR e PSBS.....	5
1.3. <i>Physcomitrium patens</i> come organismo modello.....	7
2. SCOPO DELLA TESI	8
3. MATERIALI E METODI	9
3.1. Coltura <i>in vitro</i> di <i>Physcomitrium patens</i>	9
3.2. Dual-PAM-100 (" <i>Pulse Amplitude Modulation</i> ").....	10
3.2.1. Funzionamento dello strumento	11
3.3. Spettrofotometro JTS-10.....	12
3.3.1. Cenni teorici sulle analisi di spettroscopia.....	12
3.3.2. PSI/PSII	13
3.3.3. Dimensione del sistema antenna	14
3.4. Estrazione dei pigmenti e analisi allo spettrofotometro	14
4. RISULTATI.....	16
4.1. Valore di F_v/F_m in wild-type e mutanti cresciuti a luce di controllo e ad alta luce	16
4.2. Confronto di NPQ tra wild-type e mutanti cresciuti a luce di controllo e ad alta luce	18
4.3. Valori di PSI/PSII	20
4.4. Dimensione del sistema antenna.....	21
4.5 Quantificazione dei pigmenti	23
4.5.1. Clorofilla <i>a/b</i>	23
4.5.2. Clorofille/Carotenoidi	24
5. DISCUSSIONE.....	26
6. BIBLIOGRAFIA	28

ABSTRACT

La fotosintesi è il meccanismo determinante per la sopravvivenza di piante, alghe e alcuni batteri. La luce viene catturata dalle clorofille e altri pigmenti che compongono il sistema antenna dei fotosistemi; questi sono supercomplessi proteici che intervengono nella fase luminosa della fotosintesi convertendo l'energia luminosa in energia chimica (*photochemical quenching*). La fase metabolica produce i precursori degli zuccheri, da cui la pianta ricava il proprio sostentamento.

Il processo fotosintetico necessita della presenza di luce per avvenire; tuttavia, stimoli luminosi intensi sono nocivi per l'individuo e portano alla formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che danneggiano i fotosistemi. Inoltre, le piante terrestri sono sessili e, pertanto, hanno dovuto sviluppare strategie per far fronte a questa e ad altre difficoltà.

Il meccanismo principale di fotoprotezione è la dissipazione dell'energia in eccesso sotto forma di calore (*non-photochemical quenching*, NPQ).

Prendono parte attiva al processo alcuni carotenoidi specifici, le xantofille, che si presentano in due conformazioni distinte regolate da un ciclo.

La zeaxantina è il pigmento coinvolto nell'NPQ e si attiva a luce intensa; viene convertita in violaxantina dalla zeaxantina epossidasi (ZEP).

Dalla violaxantina si ottiene nuovamente zeaxantina grazie alla violaxantina de-epossidasi (VDE).

L'NPQ è regolato anche da proteine con un ruolo centrale nel processo: LHCSR, che si ritrova nelle alghe, e PSBS, la cui funzione è stata descritta nelle piante vascolari. Il muschio le possiede entrambe e questo lo rende un interessante oggetto di studio.

In questo lavoro vengono studiati i meccanismi di NPQ grazie all'utilizzo dei mutanti delle proteine ed enzimi precedentemente illustrati (VDE, ZEP, LHCSR e PSBS).

L'organismo modello di riferimento è il muschio *Physcomitrium patens*, che occupa una posizione evolutivamente interessante, consentendo di analizzare le tappe che hanno condotto agli adattamenti fotoprotettivi dalle alghe fino alle piante vascolari.

1. INTRODUZIONE

1.1. Fotosintesi ossigenica

La fotosintesi avviene negli organismi che possiedono cloroplasti (cianobatteri, alghe e piante) e consiste in una serie di reazioni biochimiche in grado di convertire l'energia solare in energia chimica. A partire da un substrato iniziale formato da carbonio inorganico a basso livello energetico, l'anidride carbonica (CO₂), si ottiene una molecola con carbonio organico, il glucosio, ad alto livello energetico. Contemporaneamente, viene consumata H₂O e liberato O₂. Si può riassumere il processo attraverso la seguente formula:



Negli eucarioti, la fotosintesi avviene a livello dei cloroplasti e può essere formalizzata in due fasi distinte. Le membrane tilacoidali ospitano la prima fase, detta luminosa; vengono coinvolti il fotosistema II (PSII), il citocromo b₆f, il fotosistema I (PSI) e l'ATP sintasi. I fotosistemi sono complessi formati da molteplici subunità; possiedono un'antenna esterna, composta da proteine *Light Harvesting Complex* (LHC) leganti pigmenti (clorofilla *a*, clorofilla *b* e carotenoidi). Questi pigmenti sono in grado di catturare i fotoni provenienti dalle radiazioni solari; quando vengono colpiti dalla luce, si eccitano e ritornano allo stato basale tramite trasferimento di energia, diretta verso il core. Questo è dotato di un'antenna interna, che riceve l'energia luminosa raccolta dall'antenna esterna e la convoglia nel centro di reazione, RC; qui si trovano due clorofille speciali, P680 e P700, poste rispettivamente in PSII e PSI, che subiscono un'eccitazione tale da consentire la separazione di carica.

La clorofilla P680* cede un elettrone alla feofitina. P680⁺ è un ossidante potente che recupera l'elettrone perso estraendolo dall'H₂O mediante il complesso evolvente ossigeno (OEC), sito dove avviene la reazione di fotolisi dell'acqua (a partire da 2 molecole di H₂O si ottengono O₂ e 4H⁺). La separazione di carica induce il trasferimento dell'elettrone al PQ (plastochinone); un secondo elettrone provoca la riduzione del PQ a PQH₂. A partire da questa reazione comincia la catena di trasporto degli elettroni che passa dal citocromo b₆f al PSI, fino a raggiungere l'accettore finale, il NADP⁺, che viene convertito a NADPH.

Tale conversione di energia luminosa in energia chimica di ossido-riduzione è definita *quenching* fotochimico, vale a dire lo smorzamento della fluorescenza che avviene durante il processo fotosintetico. La fluorescenza viene emessa quando le clorofille, colpite dalla luce, la riflettono nello

spettro del rosso (Murchie e Lawson, 2013); successivamente, essa entra in competizione con la fotosintesi e subisce una decrescita.

In contemporanea al trasporto elettronico attraverso i fotosistemi, avviene il rilascio di H^+ nel lume tilacoidale ad opera dell'OEC tramite fotolisi dell'acqua, del PSII per riduzione del PQ, e del citocromo b₆f. L'accumulo di protoni genera un gradiente transmembrana che viene sfruttato per produrre ATP attraverso l'ATP sintasi.

Il secondo stadio della fotosintesi è definito dalla fase metabolica, che è indipendente dalla luce e avviene nello stroma del cloroplasto. Il ruolo fondamentale è svolto dal ciclo di Calvin-Benson, composto da tre passaggi (fissazione, riduzione e rigenerazione), che utilizza l'enzima RuBisCO (Ribulosio 1,5-bifosfato) come substrato per sintetizzare gliceraldeide 3-fosfato. Tale prodotto viene trasferito nel citosol e utilizzato per la sintesi di saccarosio, una molecola altamente energetica sfruttabile per il metabolismo.

1.2. Regolazione della fotosintesi

1.2.1. NPQ: *Non-Photochemical quenching*

Quando supera le capacità fotosintetiche dell'organismo, l'energia luminosa può rivelarsi particolarmente dannosa.

Le clorofille sovraeccitate possono diventare una fonte di clorofille tripletto ($^3Chl^*$) e di ossigeno singoletto (1O_2) provocando danni a proteine e membrane fotosintetiche.

Esistono diversi meccanismi che le piante mettono in atto per contrastare questo evento: riduzione della quantità di energia irradiante tramite modulazione della direzione delle foglie e della posizione dei cloroplasti rispetto alla luce incidente, trasporto ciclico degli elettroni (CET) intorno al PSI, eliminazione dei ROS e regolazione della resa della $^3Chl^*$ (Pinnola et al. 2013).

Il *non-photochemical quenching* (NPQ) della fluorescenza della clorofilla *a* è un meccanismo presente in tutti gli organismi fotosintetici e per questo considerato fondamentale per la loro sopravvivenza in natura: l'energia in eccesso non viene trasferita attraverso reazione fotochimica, ma è dissipata sotto forma di calore, proprio per prevenire l'accumulo elettronico.

Ci sono diverse componenti che concorrono a formare l'NPQ. Il qE (*quenching* energetico) dipende dalla variazione di pH generata dall'accumulo di H^+ nel lume tilacoidale e produce una risposta in tempi rapidi, attivando e disattivando il meccanismo nel giro di pochi secondi; è

in grado di rispondere alle naturali fluttuazioni di luce (Müller et al. 2001). Il qI (*quenching* fotoinibitorio) è provocato dalla fotoinibizione e possiede una cinetica molto lenta. Il qT (*quenching* dello stato di transizione) sembra non avere un ruolo importante nella fotoprotezione e il suo effetto risulta trascurabile nelle piante (Müller et al. 2001). Infine, il qZ (*quenching* dipendente dalla zeaxantina) ha un ruolo rilevante all'interno del processo di NPQ, ma possiede una cinetica più lenta rispetto a qE.

In conclusione, per prevenire la formazione di ROS, le piante necessitano di un equilibrio continuo tra l'eccitazione data dalla luce e la disponibilità di substrato (Krishnan-Schmieden et al. 2021).

Qui sotto verranno descritti alcuni dei principali elementi che partecipano alla regolazione dell'NPQ.

1.2.2. Ciclo delle xantofille

Le xantofille sono pigmenti appartenenti alla famiglia dei carotenoidi e situati nelle antenne e nelle membrane fotosintetiche. Hanno la funzione di ampliare l'intervallo di lunghezza d'onda assorbito dalle clorofille e, inoltre, intervengono nei processi di fotoprotezione.

La loro regolazione è basata su un ciclo. L'enzima zeaxantina epossidasi (ZEP) converte la zeaxantina in anteraxantina e poi in violaxantina. La reazione di epossidazione avviene grazie a O₂ e NADPH. Il percorso prosegue anche a ritroso grazie alla violaxantina de-epossidasi (VDE), che ricostituisce anteraxantina e zeaxantina a partire dalla violaxantina.

Il ciclo viene attivato sulla base delle variazioni di pH che si verificano quando, per esempio, la pianta è esposta a luce intensa. In queste condizioni, infatti, l'attività dell'ATP sintasi decresce e il lume subisce acidificazione a causa protoni rimasti al suo interno.

A pH fisiologici, la VDE si trova in forma libera nel lume del tilacoide; quando questo va incontro ad acidificazione, al di sotto di pH 5.8, l'enzima subisce una variazione conformazionale che lo porta a migrare sul lato luminale della membrana (Müller et al. 2001), dove interagisce con la violaxantina. La ZEP, invece, situata sul lato stromatico della membrana, è attiva a pH intorno a 7.5 ed è provvista di attività costitutiva.

Dunque, la conversione nell'una o nell'altra forma dipende dalla quantità di luce a cui la pianta è sottoposta: quando è modesta è attiva la violaxantina, quando è elevata viene sintetizzata zeaxantina.

La zeaxantina ha un ruolo essenziale nel meccanismo di NPQ poiché concorre a formare sia il qE che il qZ. Essa svolge molteplici funzioni: da un lato agisce intervenendo nello *scavenging* dei ROS, dall'altro si lega alle

proteine LHC, di cui aumenta la capacità di dissipare l'energia sotto forma di calore inducendone una variazione conformazionale.

1.2.3. Proteine LHCSR e PSBS

In *Physcomitrium patens* sono state identificate LHCSR e PSBS, due proteine antenna coinvolte nel processo di NPQ, entrambe appartenenti alla superfamiglia delle proteine LHC.

LHCSR è in comune con le alghe ed è presente in due isoforme in *P. patens*: LHCSR1 e LHCSR2, poste sul lato stromatico delle membrane tilacoidali.

Si tratta di proteine leganti pigmenti che partecipano al qE e dissipano l'energia in eccesso sotto forma di calore; tale capacità è intrinseca, infatti non è necessaria alcuna riorganizzazione strutturale. Il segnale di attivazione è la variazione di pH, che viene percepita da residui amminoacidici.

Tra le due isoforme, LHCSR1 ha il ruolo principale nel meccanismo di NPQ (Gerotto et al. 2011); LHCSR2, invece, si attiva a basse temperature. Questa attivazione differenziale permette di fornire una protezione ottimale dal fotodanno nelle diverse condizioni di crescita (Gerotto et al. 2011).

La proteina PSBS è situata all'interno della subunità S del PSII ed è presente sia nelle alghe che nelle piante vascolari, ma il suo ruolo nel processo di NPQ è più chiaro in queste ultime. Anch'essa ha la funzione di attivare l'NPQ, ma il meccanismo è diverso rispetto a quanto avviene in LHCSR, e più finemente regolato.

L'NPQ viene avviato a partire dall'acidificazione del pH nel lume tilacoidale: significa che la sua attivazione è legata all'accumulo elettronico che si verifica quando la pianta è esposta a luce intensa. La variazione di pH viene percepita dalla proteina PSBS, che agisce come sensore, in corrispondenza di due residui di glutammato (Krishnan-Schmieden et al. 2021). La proteina PSBS non lega pigmenti (Krishnan-Schmieden et al. 2021) e, pertanto, si pensa che non costituisca il sito di *quenching* (Sylak-Glassman et al. 2014), e che si verifichi invece un cambiamento conformazionale che determini la riorganizzazione delle proteine LHC a formare siti di *quenching* nel complesso antenna. L'NPQ si verificherebbe in corrispondenza di questi siti.

Studi precedenti hanno dimostrato che in *P. patens* sono necessarie entrambe le proteine, LHCSR e PSBS, per attivare il meccanismo di NPQ; tuttavia, l'assenza di una delle due permette comunque di avere livelli elevati di NPQ, segno che esistono meccanismi compensativi. Questo sembra dimostrare che gli effetti delle due proteine sono cumulativi, oltre che, in buona parte, indipendenti (Alboresi et al. 2010).

Anche PSBS modula il qE, insieme alla zeaxantina (Nilkens et al. 2010) e a LHCSR. È stato dimostrato che la zeaxantina interagisce con l'azione di PSBS e, in misura maggiore, di LHCSR, rafforzandone l'effetto (Pinnola et al. 2013); per questo risulta difficile scindere la componente qZ dalla qE. La combinazione di PSBS e zeaxantina sarebbe funzionale nella risposta alla fotoinibizione nelle naturali condizioni di luce fluttuante (Sylak-Glassman et al. 2014). Tuttavia, esse agiscono secondo dinamiche differenti; infatti, misure di durata della fluorescenza hanno dimostrato che la proteina PSBS interviene nella fase iniziale (primo minuto) del processo di *quenching*, mentre la zeaxantina è in grado di modulare sia l'intervallo di tempo di attivazione e inattivazione del *quenching* che il processo di rilassamento della clorofilla eccitata (Sylak-Glassman et al. 2014).

In Figura 1.2 è riportato lo schema riassuntivo della fotosintesi e della sua regolazione.

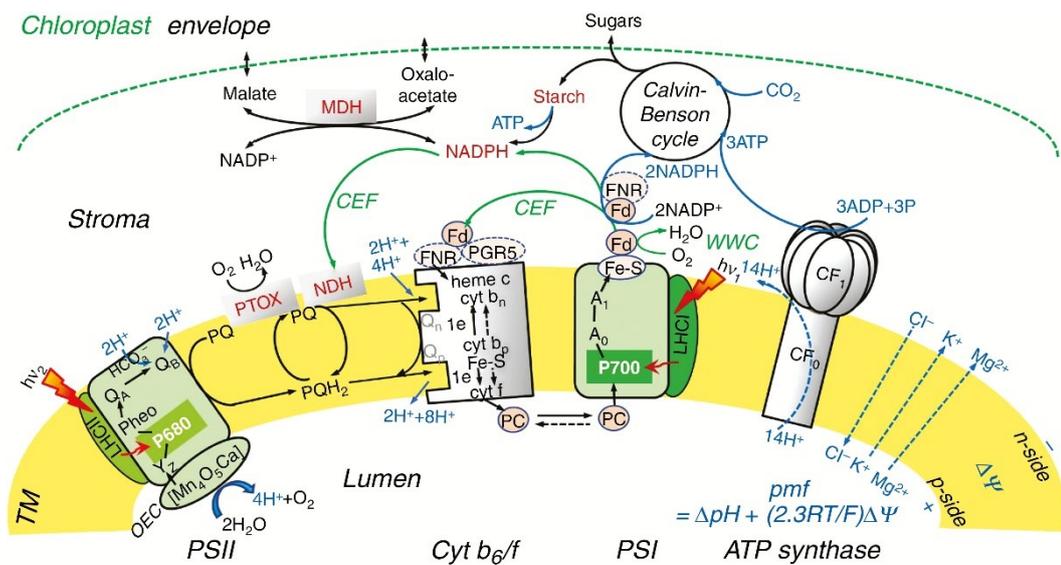


Figura 1.2. Fotosintesi e sua regolazione (da Stirbet et al. 2010, modificato). L'arrivo dei fotoni sulle proteine LHCII del PSII causa l'eccitazione della clorofilla P680, che cede un elettrone alla feofitina. Ha inizio la catena di trasporto elettronico che giunge fino al PSI, dove avviene la riduzione del $NADP^+$ a NADPH. La concomitante generazione di gradiente protonico da parte di OEC, PQH_2 e Cyt b_6/f induce la sintesi di ATP attraverso l'ATP sintasi. ATP, NADPH e la CO_2 atmosferica partecipano al ciclo di Calvin-Benson, che produce gliceraldeide 3-fosfato, che viene utilizzata per la sintesi di saccarosio e amido.

1.3. *Physcomitrium patens* come organismo modello

Physcomitrium patens è una briofita appartenente alle Funariaceae.

Le briofite comprendono le Bryophyta (muschi), di cui fa parte *P. patens*, le Anthocerotophyta e le Marchantiophyta. Tali organismi sono filogeneticamente i più prossimi alle piante vascolari e segnano una tappa importante nel passaggio dall'ambiente acquatico a quello subaereo.

I muschi occupano una posizione evolutivamente intermedia tra alghe e piante vascolari, e offrono notevoli spunti di studi fisiologici, che mettono in evidenza i diversi adattamenti evoluti dai vari gruppi. L'ambiente terrestre, infatti, impone nuove sfide, a causa dell'eccesso di luce e di ossigeno e per la carenza di nutrienti e anidride carbonica. Se le alghe sono in grado di sottrarsi alle condizioni sfavorevoli immergendosi in profondità (Alboresi et al. 2010), le piante terrestri sono sessili e non hanno possibilità di fuga: hanno dunque necessitato di nuove strategie che ne permettessero la sopravvivenza in questi ambienti inospitali.

In questo lavoro sono state studiate due proteine, LHCSR e PSBS, che sottolineano la posizione filogenetica di *P. patens*.

Durante l'evoluzione delle piante vascolari deve essere avvenuta la sostituzione di LHCSR con una proteina, PSBS, più funzionale per le caratteristiche del nuovo ambiente. *P. patens*, invece, possiede entrambe le proteine, e questo lo rende l'organismo modello ideale per lo studio della loro funzione.

La coesistenza di tali proteine nel muschio è dovuta alla sua posizione evolutivamente intermedia e potrebbe derivare dal fatto che esso condivide l'ambiente terrestre con le piante vascolari, ma, per la sua sopravvivenza, è ancora vincolato ad ambienti provvisti di un elevato grado di umidità. Entrambe le proteine svolgono un ruolo nel processo di NPQ, e questo dimostra che LHCSR era ancora presente quando nelle piante vascolari si è sviluppato il meccanismo di NPQ basato su PSBS (Alboresi et al. 2010).

Physcomitrium patens, inoltre, è un organismo modello ideale poiché il suo genoma è stato interamente sequenziato, e ne si conoscono le tecniche di manipolazione genetica. In aggiunta, è facilmente coltivabile in laboratorio sia in terreno solido che liquido.

2. SCOPO DELLA TESI

In questo lavoro è stato studiato il meccanismo di NPQ tramite l'utilizzo di mutanti che mancano di elementi importanti per il suo funzionamento.

Due di questi sono privi degli enzimi del ciclo delle xantofille: *npq1, vde* KO, che dunque non sintetizza zeaxantina, e *npq2, zep* KO, che non è in grado di convertire la zeaxantina in violaxantina. L'obiettivo era verificare se avvengono variazioni nell'efficienza del meccanismo di NPQ in assenza di questi enzimi e, quindi, se e quanto essi siano rilevanti all'interno del processo. È stato poi approfondito il ruolo complessivo delle proteine LHCSR e PSBS attraverso l'analisi della fotoprotezione del triplo mutante *lhcsr1, lhcsr2* e *psbs* KO (*npq4*).

Sono stati valutati il livello di NPQ e l'efficienza fotosintetica dei vari genotipi tramite confronto col WT; inoltre, si è indagato sulle proporzioni relative di PSII e PSI, le dimensioni del sistema antenna e la composizione in pigmenti per verificare se la presenza delle mutazioni produca variazioni. Il confronto tra le piante cresciute a luce di controllo e quelle ad alta luce ha permesso di valutare la presenza o meno di una riorganizzazione dell'apparato fotosintetico in funzione della mutata condizione luminosa.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Coltura in vitro di *Physcomitrium patens*

Il triplo mutante *lhcsr1 lhcsr2 psbs* KO (*npq4*) (Alboresi et al. 2010), il mutante *vde* KO (*npq1*) (Pinnola et al. 2013) e il mutante *zep* KO (*npq2*) (Takezawa et al. 2014) di *Physcomitrium patens* sono stati cresciuti in due tipi di terreni (Tabella 3.1 e in Tabella 3.2). Il terreno PpNO₃ ha come unica risorsa di azoto lo ione nitrato e non contiene carbonio organico; viene utilizzato per ottenere piante su cui effettuare misure di fotosintesi. Il terreno PpNH₄, invece, contiene ulteriori risorse di azoto e carbonio sotto forma di tartrato di ammonio e glucosio; è utilizzato per propagare le piante ogni 5-7 giorni. Per la propagazione del muschio si è proceduto in questo modo: il protonema è stato prelevato dalle piastre Petri con una spatola sterile ed è stato trasferito in un tubo Falcon, contenente da 3 a 6 mL di acqua purificata Milli-Q®. Il materiale è stato miscelato tramite un omogeneizzatore Ultra-Turrax®. In condizioni di sterilità, 23 mL di terreno sono stati versati nelle piastre Petri, dove il mezzo è stato fatto solidificare; al di sopra si è applicato un filtro in cellophane e successivamente 2 mL di frullato di muschio. Il filtro impedisce alla pianta di crescere all'interno del terreno e consente di raccogliercela più facilmente, senza tuttavia impedire gli scambi di nutrienti. La rigenerazione è stata effettuata anche tramite asportazioni di porzioni di protonema successivamente inserite nelle piastre Petri con terreno solido. Per la coltura sono stati rispettati questi parametri: 23 ± 2°C con fotoperiodo di 16h di luce e 8h di buio. Le piante sono state cresciute in due diverse condizioni di luce: luce di controllo (control light, CL), da 50 μmol fotoni m⁻² s⁻¹, utilizzata come parametro di condizioni luminose ottimali per il muschio, e alta luce (high light, HL), da 500 μmol fotoni m⁻² s⁻¹ (Figura 3.1), in grado di indurre stress luminoso e stimolare meccanismi di protezione.

Tabella 3.1. Composizione del mezzo di coltura usato per la propagazione delle piante. Composto	PpNO₃	PpNH₄
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0,80 g/L	0,80 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,25 g/L	0,25 g/L
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,0125 g/L	0,0125 g/L
Microelementi (1,000X)	1 mL/L	1 mL/L
KH ₂ PO ₄ -KOH 250 g/L, pH 7.0	1 mL/L	1 mL/L
NH ₄ tartrato	/	0,5 g/L
Glucosio	/	5 g/L
Agar	8 g/L	7,2 g/L

Tabella 3.2. Composizione dei microelementi in concentrazione 1,000X

Microelementi (1,000X)	
Composto	
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	5.5 mg/L
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	5.5 mg/L
H ₃ BO ₃	61.4 mg/L
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	38.9 mg/L
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	5.5 mg/L
KI	2.8 mg/L
Na ₂ MoO ₄ · 4 H ₂ O	2.5 mg/L

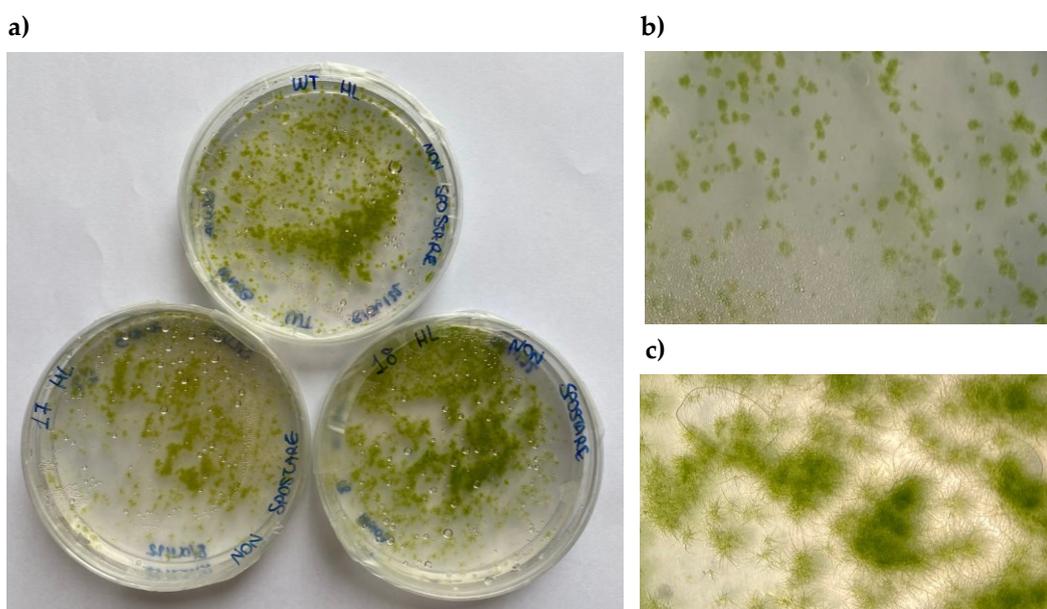


Figura 3.1. Piastre Petri con campioni appartenenti a genotipi diversi. a) WT, *npq4 npq1* (18) cresciuti ad alta luce (HL). c) e d): dettagli di campioni in piastra.

3.2. Dual-PAM-100 (“Pulse Amplitude Modulation”)

Per le misure della fluorescenza è stato utilizzato il fluorimetro Dual-PAM-100 (Walz, Germania). Tale strumento consente di effettuare misure *in vivo* di fluorescenza delle clorofille a livello del PSII e variazioni di assorbanza della clorofilla P700 (Murchie e Lawson, 2013). La clorofilla nello stato eccitato è in grado di ritornare allo stato basale attraverso tre diversi percorsi in competizione tra loro: la via fotochimica, la fluorescenza e il calore (NPQ). Si possono dunque ottenere informazioni riguardo l'efficienza fotosintetica e la dissipazione di calore calcolando la resa data dalla fluorescenza della clorofilla. (Murchie e Lawson, 2013).

3.2.1. Funzionamento dello strumento

Le piante vengono preadattate al buio per 40 min; ciò determina un rilassamento dei meccanismi di fotoprotezione e l'apertura dei centri di reazione del PSII.

Per le misure è stato utilizzato il doppio canale Fluo + P700. Esso consente di ottenere i parametri sia del PSII, grazie alla misura di fluorescenza delle clorofille, che del PSI, per la misura di assorbanza della clorofilla P700.

Il protocollo di misura utilizzato dura 20 min. Attraverso una luce di misura a bassa intensità ($19 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$) si calcola il livello basale di fluorescenza (F_0). In queste condizioni, infatti, la clorofilla subisce un grado di eccitazione sufficiente per misurare F_0 , ma l'impulso non è abbastanza intenso per indurre trasporto elettronico nel PSII (Murchie e Lawson, 2013). Successivamente, viene emesso un *pulse* saturante caratterizzato da luce intensa ($6000 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in grado di saturare i fotosistemi: la via fotochimica risulta inibita e l'energia viene dissipata sotto forma di calore (NPQ) o fluorescenza. In una pianta sana non si verifica NPQ perché il campione risulta completamente adattato al buio (Murchie e Lawson, 2013); pertanto tutta l'energia è convertita in fluorescenza e si può misurare il livello di fluorescenza massima (F_m). La differenza tra F_0 e F_m è definita dalla fluorescenza variabile (F_v), e il rapporto tra F_v/F_m è esplicitato dalla seguente equazione:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$$

Tale rapporto corrisponde alla resa quantica massima del PSII. Il valore ottimale è intorno allo 0.8; livelli inferiori sono indice di un cattivo stato di salute della pianta e si verificano quando, per esempio, questa subisce un fotodanno.

In seguito, viene accesa la luce attinica ($850 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$), sufficientemente intensa da indurre la fotosintesi nella pianta preadattata al buio. Si riattivano ciclo di fissazione del carbonio e reazione fotochimica, prima inibiti; invece, il livello di fluorescenza prima aumenta, per poi diminuire a causa della competizione con *photochemical* e *non-photochemical quenching*.

F_s indica il livello di stato stazionario di fluorescenza.

Quando è ancora presente la luce attinica, viene applicato un breve *pulse* di luce saturante, che chiude il centro di reazione. Si ottiene così F_m' , il valore della fluorescenza massima nello stato di preadattamento alla luce.

Il valore di F_m' è inferiore a quello di F_m poiché è in competizione con il processo di NPQ, che, in condizioni di preadattamento al buio, era assente, ma che si attiva con la luce.

Con i dati così ottenuti è possibile calcolare il livello di NPQ grazie alla seguente formula:

$$\text{NPQ} = (F_m - F_m') / F_m'$$

La luce attinica viene infine spenta e viene mantenuta soltanto la luce di misura a bassa intensità, con la quale si può calcolare il livello basale di fluorescenza in condizioni di preadattamento alla luce (F_0'). Si applicano ulteriori *pulse* di luce saturante, progressivamente più intensi, che permettono di rilevare, in una pianta preadattata alla luce, la competizione tra il livello di fluorescenza e il livello di NPQ, inversamente proporzionali tra di loro.

3.3. Spettrofotometro JTS-10

3.3.1. Cenni teorici sulle analisi di spettroscopia

Lo spettrofotometro JTS-10 (Biologic, Francia) è uno strumento che permette di effettuare analisi non invasive di spettroscopia.

Quando sui cloroplasti giunge l'energia luminosa, essa viene sfruttata per le reazioni fotochimiche, che comportano il trasporto degli elettroni attraverso PSI, PSII e il citocromo b₆f. Tale trasporto è associato al trasferimento di protoni dallo stroma al lume del tilacoide. Viene dunque a crearsi un gradiente protonico elettrochimico ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$) che costituisce la fonte energetica per la sintesi di ATP; esso è composto da un gradiente protonico (ΔpH), che, come visto precedentemente, è coinvolto nel processo di fotoprotezione, e dà un gradiente di potenziale elettrico ($\Delta\Psi$). $\Delta\Psi$ è in grado di produrre l'*ElectroChromic Shift* (ECS), ovvero uno *shift* nello spettro di assorbimento di alcuni pigmenti fotosintetici. Infatti, clorofille e carotenoidi sono posti all'interno di membrane lipidiche e la presenza di un campo elettrico produce variazioni nella loro assorbanza massima. L'ECS è in grado di fornire informazioni precise riguardo alla composizione in pigmenti. (Bailleul et al. 2010).

L'andamento della curva di ECS prevede tre fasi. Una prima fase ascendente è dovuta al contributo dei fotosistemi nel loro insieme; una seconda fase ascendente dipende dal trasferimento elettronico attraverso il citocromo b. Entrambe originano dalla separazione di carica.

La terza fase, invece, è discendente ed è dovuta alla dissipazione del gradiente protonico, a sua volta causato dal passaggio di protoni dal lume allo stroma mediante l'ATP sintasi (Bailleul et al. 2010).

3.3.2. PSI/PSII

Per quanto riguarda il rapporto PSI/PSII è stata presa in considerazione la prima fase della curva di ECS.

Le misure sono state svolte utilizzando il protocollo ECS XENON e inserendo nel detector il filtro BG39 (Schott, Mainz, Germania), che permette di escludere la luce attinica dall'analisi (Nawrocki et al. 2019).

Il campione viene avvolto in un filtro di cellophane e caricato sul porta-campione. In direzione del campione vengono proiettati impulsi di luce LED bianca e viene calcolato l'ECS sulla base della differenza tra le variazioni di assorbanza a 546 e 520 nm, utilizzando i rispettivi filtri.

Si effettuano, cioè, due misure separate, una a 546 nm e una a 520 nm; successivamente si calcola la differenza. A queste lunghezze d'onda, infatti, i citocromi offrono uno scarso contributo alle variazioni di assorbanza (Roberty et al. 2014); inoltre, esse forniscono la più ampia variazione di assorbanza (Sun e Golbeck, 2015).

In una prima fase, le misure sono state eseguite come descritto precedentemente; in seguito, per ottenere informazioni più precise riguardo all'apporto effettivo di ciascun fotosistema, sono stati applicati 100 μ L di DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea) 20 μ M e 100 μ L di idrossilammina 4 mM, due inibitori del PSII.

In questo modo le misure successive hanno mostrato il solo contributo del PSI e, per differenza, è stata ottenuta anche la componente del PSII. Le curve tipo da cui è stata ricavata la misura sono riportate in Figura 3.2.

A questo punto è stato possibile calcolare il rapporto PSI/PSII.

Il meccanismo di NPQ avviene esclusivamente a livello del PSII, e i mutanti utilizzati derivano da mutazioni di componenti del PSII. L'obiettivo delle analisi è stato dunque verificare se mutazioni a livello del PSII provochino una riorganizzazione a livello della composizione proteica dei due fotosistemi, e quindi se avvenga una variazione nel rapporto PSI/PSII.

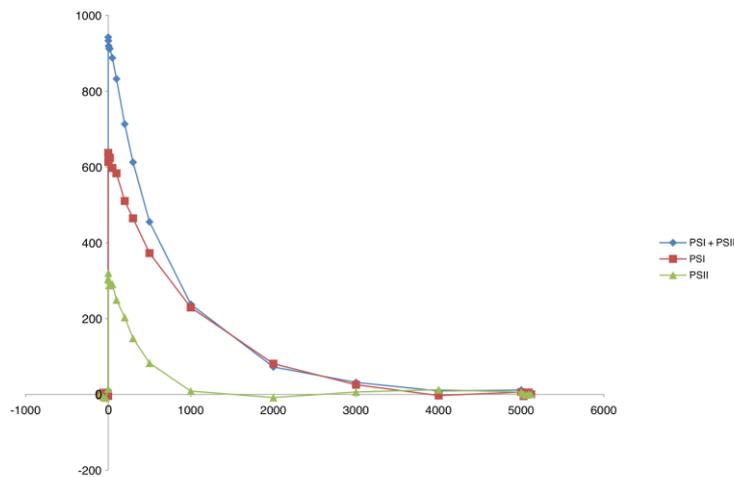


Figura 3.2. Esempio di curve calcolate con JTS-10. In blu è riportata la curva con i valori dei fotosistemi nel loro complesso (PSI + PSII); in rosso la curva del solo PSI ottenuta applicando gli inibitori per il PSII; in verde la curva del solo PSII ottenuta per sottrazione di PSI+PSII e PSI.

3.3.3. Dimensione del sistema antenna

Per lo studio delle dimensioni del sistema antenna, invece, è stata presa in considerazione la curva di saturazione ricavata utilizzando il filtro FLUO e impiegando il protocollo IND CURVE ASII_LUNGA. Prima di effettuare le misure, il PSII del campione è stato parzialmente inibito con 100 μ L di DCMU 20 μ M. Le curve ottenute avevano pendenze diverse: un'ascesa più rapida significava maggiore velocità di saturazione del sistema antenna e, dunque, era indice della presenza di antenne di dimensioni ridotte; viceversa, un'ascesa più graduale indicava che il sistema antenna era di dimensioni maggiori. È stato dunque calcolato $t/2$, ovvero il valore temporale al quale il 50% dei sistemi antenna è giunto a saturazione; sulla base della velocità di saturazione si è potuto stabilire la dimensione del sistema antenna.

3.4. Estrazione dei pigmenti e analisi allo spettrofotometro

Sono state effettuate analisi riguardanti la composizione in pigmenti dei vari genotipi a luce di controllo e ad alta luce per verificare se l'acclimatazione ne provocasse una riorganizzazione oppure no, e per controllare se avvenissero riarrangiamenti nei mutanti che mancavano di alcuni pigmenti (*npq1* e *npq2*).

Innanzitutto, sono stati estratti i pigmenti. Per fare ciò, frammenti di campione di *P. patens* per ogni genotipo sono stati prelevati con una spatola sterile e posti ciascuno in una provetta contenente acetone 90%.

Dopo un'ora di tempo il campione di muschio risulta di colore biancastro, segno che i pigmenti sono stati estratti dall'acetone, che, infatti, è di colore verde. Successivamente, le eppendorf sono state centrifugate per 10 min a 13.000 rpm; il surnatante è stato trasferito in nuove provette e centrifugato per altri 5 min a 130.000 rpm. 70 μ L di campione sono stati prelevati e utilizzati per le misure allo spettrofotometro.

Per lo spettrofotometro è stato selezionato l'intervallo di lunghezza d'onda compreso tra 750 e 350 nm. Infine, sono stati ricavati i valori di assorbanza per il calcolo della concentrazione delle clorofille a e b e dei carotenoidi totali tramite l'applicazione GitHub (Chazaux et al. 2022).

4. RISULTATI

4.1. Valore di F_v/F_m in wild-type e mutanti cresciuti a luce di controllo e ad alta luce

Le analisi condotte mediante lo strumento Dual-PAM-100 sui vari genotipi (WT, *npq1*, *npq2*, *npq4*) hanno fornito i valori di F_v/F_m (Figura 4.1). Innanzitutto, è stato valutato lo stato di salute delle piante cresciute in condizioni di luce di controllo (CL). In questo caso i genotipi presentano differenze trascurabili tra di loro e, a parte l'*npq2* che ha livelli leggermente inferiori, mostrano tutti valori prossimi allo 0,8. Infatti, la luce di controllo ($50 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ha un'intensità adeguata alla capacità fotosintetica del muschio, dunque la produzione di ROS è limitata, i meccanismi di NPQ sono basali e sufficienti a proteggere la pianta.

La situazione è diversa quando si considera l'analisi effettuata in piante cresciute in condizioni di alta luce (HL), a $500 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tale intensità, normalmente, induce meccanismi di fotoprotezione.

Il WT possiede tutte le proteine e gli enzimi necessari per il funzionamento dell'NPQ, e, infatti, mantiene lo stesso valore di F_v/F_m prossimo allo 0,8 che mostrava a CL. I mutanti, invece, subiscono una diminuzione del 25%, sia rispetto al WT che ai valori che mostravano a CL.

Le piante WT adattate all'HL sovraesprimono PSBS e LHCSR (Gerotto et al. 2011), provocando un aumento del livello di NPQ. L'eliminazione delle due proteine nel mutante *npq4* induce una riduzione non solo della fotoprotezione, ma anche della resa del PSII; spiega, cioè, la diminuzione del rapporto F_v/F_m (Gerotto et al. 2011).

Il malfunzionamento dei meccanismi di NPQ causa, dunque, fotoinibizione nei mutanti cresciuti a HL.

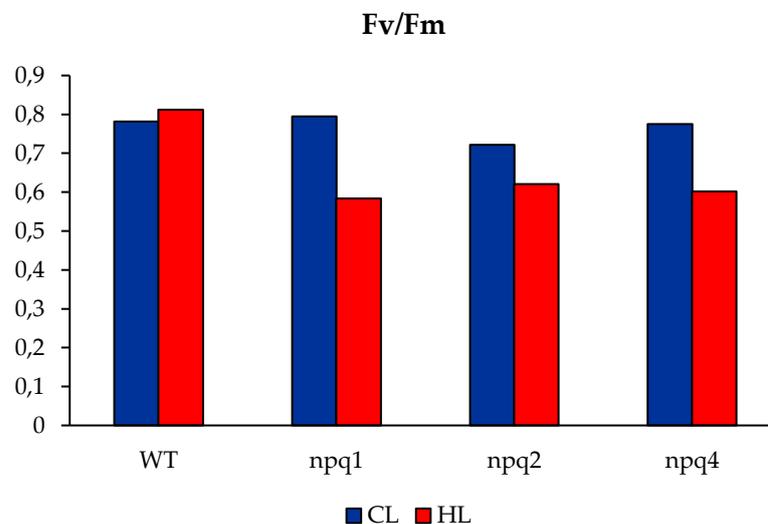


Figura 4.1. Valori di F_v/F_m nei genotipi WT, *npq1*, *npq2* e *npq4* cresciuti a luce di controllo e ad alta luce. Tramite Dual-PAM-100 è stata ottenuta la misura di F_v/F_m , riportata in blu per CL e in rosso per HL. Il parametro di riferimento per l'efficienza fotosintetica è 0,8.

L'analisi con Dual-PAM-100 ha fornito le tracce di fluorescenza dei genotipi; in Figura 4.2 ne sono riportati alcuni esempi.

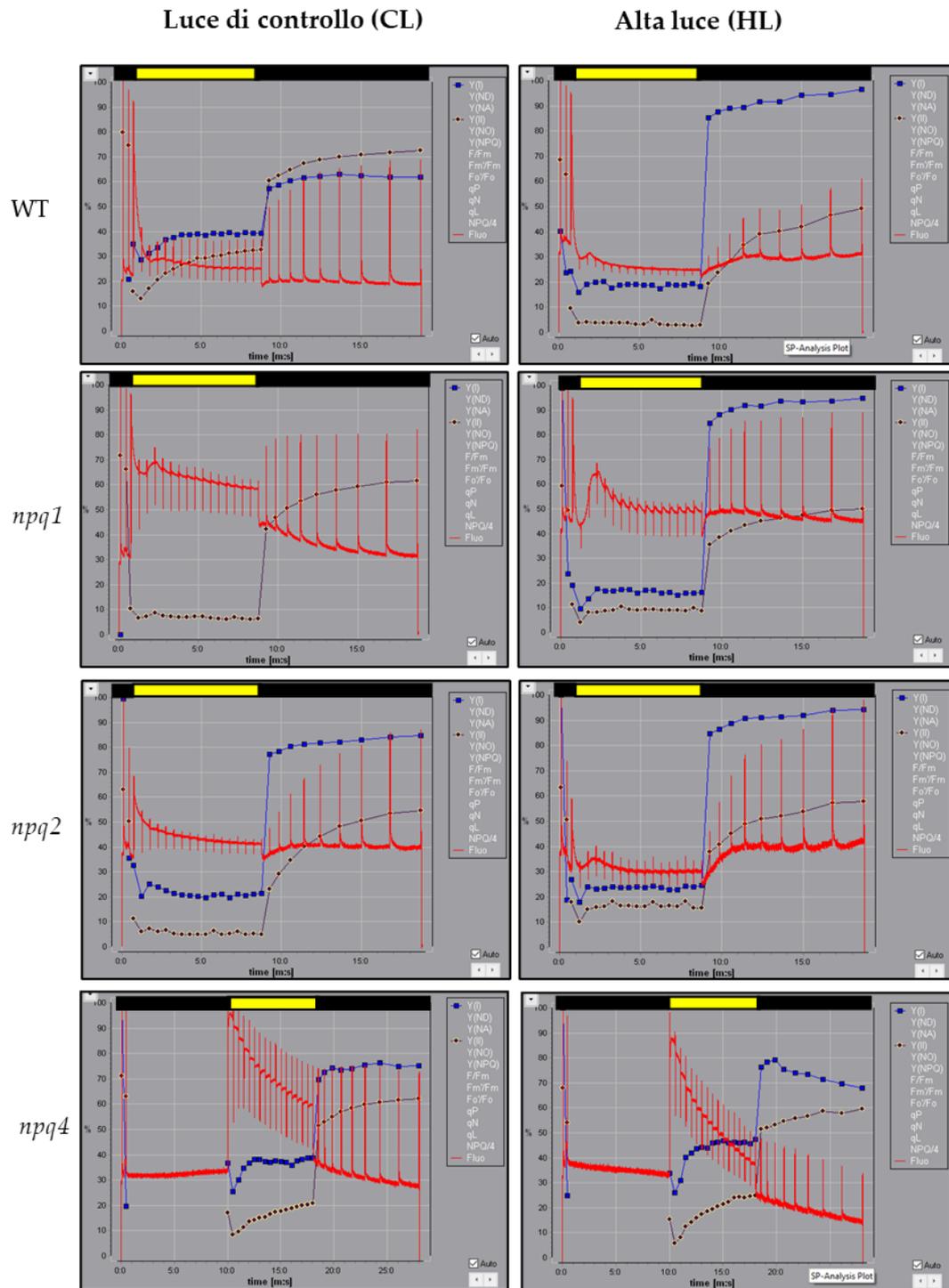


Figura 4.2. Tracce di fluorescenza ottenute mediante Dual-PAM-100. La curva rossa indica il livello di fluorescenza. La curva blu è definita dai parametri del PSI e comprende Y(I), indice della resa quantica del PSI. La curva nera contornata di giallo rappresenta i parametri del PSII e mostra il livello di Y(II), indice della resa quantica del PSII. Per i genotipi WT, *npq1* e *npq2* è riportata la traccia di un ciclo intero di misura (20 min), con un *pulse* di luce saturante iniziale, a cui segue 1 min di buio; la luce attinica viene accesa dal min 1 al min 8; segue un periodo di buio dal min 8 al min 20. Per il mutante *npq4*, è stato utilizzato un protocollo di misura di 30 min, con 10 min di buio che seguono il *pulse* iniziale; la luce attinica è accesa nei minuti 10-18, e il periodo di buio è indotto dal min 18 al 30. Le barre gialle segnalano la presenza della luce attinica, quelle nere il periodo di buio.

4.2. Confronto di NPQ tra wild-type e mutanti cresciuti a luce di controllo e ad alta luce

Grazie all'utilizzo del Dual-PAM-100 è stata ottenuta la curva dei valori di NPQ nell'arco di 20 min (Figura 4.3). Le piante cresciute a luce di controllo presentano differenze piuttosto marcate tra i genotipi. Il WT ha un'ascesa rapida e la sua curva presenta ampiezza pari a 2,6 al minuto 1 e poi pari a 3,2 tra 2,5 e 8 min. Questo fenomeno è stato ricondotto all'attivazione del metabolismo della pianta, con avvio del ciclo di Calvin-Benson; l'ATP viene consumata e ciò porta alla parziale dissipazione del gradiente protonico luminale, su cui si basa l'NPQ (Gerotto et al. 2011). Al minuto 8 la luce attinica viene spenta e l'NPQ prima cala drasticamente e poi decresce progressivamente fino al termine della misura. Un'ascesa e una decrescita così brusche sono indice del fatto che l'andamento è prevalentemente dovuto al qE, la componente più rapida dell'NPQ (Gerotto et al. 2011). Infatti, effettuando le analisi in intervalli di tempo piuttosto brevi e con queste condizioni di luce intensa, non è possibile rilevare adeguatamente il qZ.

Rispetto al WT, gli altri genotipi presentano un livello di NPQ minore. Infatti, *npq2* mostra valori inferiori del 50% rispetto al WT. Questo dato è interessante perché ci si aspetterebbe che il livello di *npq2* non si discosti in modo rilevante da quello del WT, dato che possiede sia PSBS insieme a LHCSR, proteine chiave nel meccanismo di NPQ, che la zeaxantina, la xantofilla che viene sintetizzata proprio per effettuare fotoprotezione. L'assenza di ZEP impedisce la corretta regolazione del ciclo delle xantofille, e questo potrebbe incidere negativamente sul livello di NPQ, nonostante la presenza di tutti i componenti necessari per il processo.

I valori di *npq1*, invece, raggiungono solo lo 0,49. In tale mutante sono presenti PSBS e LHCSR, ma manca la zeaxantina. L'assenza di tale pigmento determina l'abbattimento della curva di NPQ, nonostante la presenza di PSBS e LHCSR; ciò dimostra che la zeaxantina svolge un ruolo rilevante nei processi di NPQ.

Infine, *npq4* presenta livelli di NPQ minimi. Questo risultato è in linea con le caratteristiche del mutante, che manca dei geni per le proteine PSBS e LHCSR, che si confermano elementi determinanti nel processo di NPQ.

L'analisi è stata effettuata sugli stessi genotipi acclimatati in condizioni di luce elevata (HL). Effettuando un confronto genotipo per genotipo rispetto alle analisi condotte con piante adattate a CL, si rileva un incremento generale dei livelli di NPQ. Le piante cresciute a HL, infatti, presentano una sovraespressione di PSBS e LHCSR, che determina maggiori livelli di NPQ (Gerotto et al. 2011). Tuttavia, se tale aumento è comunque associato a valori piuttosto bassi nei mutanti *npq2* (che passa da 1,7 a CL a 2,4 a HL) e *npq1* (da 0,49 a CL a 1,3 a HL), nel WT si osserva un incremento notevole di NPQ che, nella sua ampiezza massima, raggiunge valori pari a 7,2, superiori del 55% all'ampiezza dell'NPQ sotto CL (3,2).

Per *npq1* l'incremento è del 40% e per *npq2* del 28%; in *npq4* avviene invece una riduzione del 9%.

Normalmente, le piante acclimate ad elevata intensità di luce mostrano livelli di NPQ molto maggiori, come rilevato nel WT. Ciò rimarca ancora di più le differenze rispetto ai genotipi che non possiedono enzimi o proteine essenziali per il meccanismo di fotoprotezione. Infatti, ad HL, il WT mostra valori massimi di NPQ più elevati del 70% rispetto all'ampiezza di *npq2*; sotto CL, invece, lo scarto tra i due era del 50%.

Il mutante *npq4*, al contrario, non presenta differenze rispetto all'analisi precedentemente mostrata, prova del fatto che, senza PSBS e LHCSR, l'NPQ non riesce a svilupparsi, anche a seguito di acclimatazione a condizioni luminose più intense, che, normalmente, ne stimolerebbero il processo.

Questa analisi evidenzia anche come il muschio *Physcomitrium patens* abbia evoluto meccanismi che gli consentono di modulare i valori di NPQ a seconda del livello di esposizione alla luce; si tratta di una strategia di protezione nei confronti della fotoinibizione (Gerotto et al. 2011).

In ogni caso, per ottenere dati più attendibili, è necessario effettuare ulteriori repliche dell'esperimento.

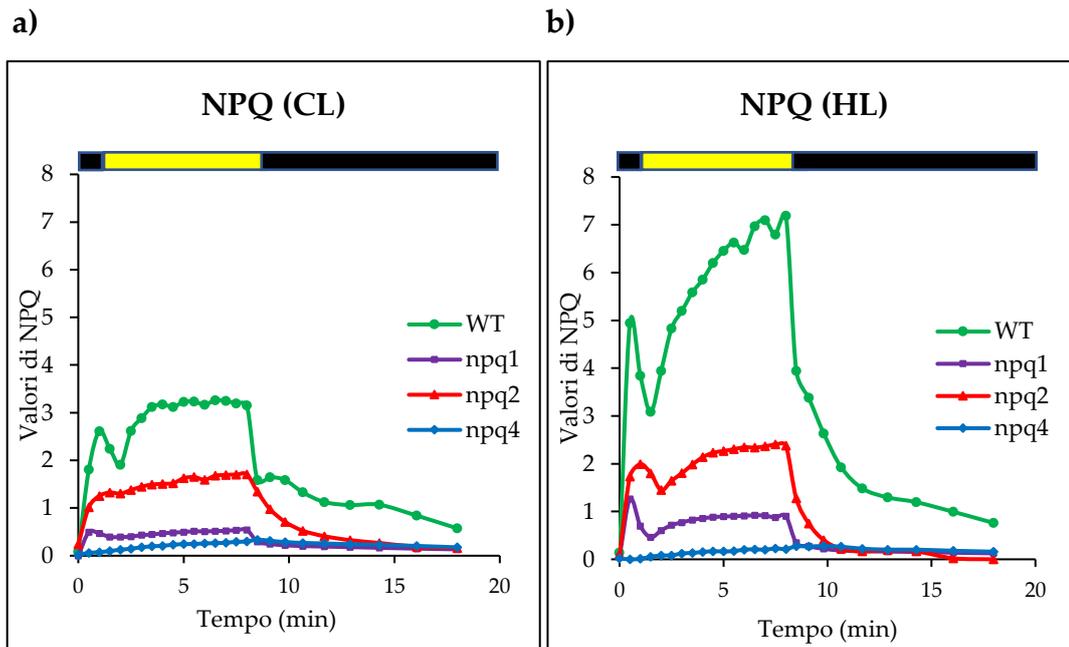


Figura 4.3. Valori di NPQ in WT, *npq1*, *npq2* e *npq4* cresciuti a luce di controllo (CL) (a) e ad alta luce (HL) (b). In verde è rappresentato il WT, in viola *npq1*, in rosso *npq2* e in blu *npq4*. Tramite l'utilizzo del Dual-PAM-100 è stato misurato il livello di NPQ per ciascun genotipo, con un protocollo di 20 min. Dopo un breve *pulse* saturante, fino al minuto 1 viene impostato un periodo di buio; poi viene accesa la luce attinica (min 1-8) e la misura termina con un periodo di buio (min 8-20).

4.3. Valori di PSI/PSII

L'analisi di spettroscopia effettuata con JTS-10 ha permesso di calcolare il rapporto PSI/PSII dei vari genotipi nelle due diverse condizioni di luce (CL e HL). In questo modo è stato possibile rilevare differenze nella stechiometria dei due fotosistemi. I risultati sono riportati in Figura 4.4.

A luce di controllo, sono evidenti differenze piuttosto marcate tra i genotipi. Il WT esprime valori intorno all'1,4; tale risultato è in linea con analisi effettuate da studi precedenti (Storti et al. 2018). Gli altri genotipi, presi nell'ordine *npq1*, *npq2*, *npq4*, presentano valori via via maggiori, fino a raggiungere circa 2,2. Questa discrepanza sembra dimostrare che i mutanti subiscano variazioni a livello di PSI e/o PSII che comporterebbero un diverso rapporto stechiometrico tra i due fotosistemi, con PSI che avrebbe un peso maggiore rispetto a PSII. Tuttavia, sono necessarie ulteriori repliche per confermare il risultato.

In condizioni di alta luce, il WT mantiene lo stesso valore espresso sotto CL; anche questo dato rispecchia i risultati di studi precedenti (Storti et al. 2018). I mutanti, invece, mostrano valori che si discostano molto fra di loro e anche rispetto ai valori che avevano sotto CL. In particolare, *npq1* subisce un

innalzamento del livello di PSI/PSII; *npq2* e *npq4* una decrescita piuttosto drastica.

Il risultato più interessante ricavato da questa analisi è la forte decrescita di *npq2* ad HL. Per ottenere dei dati solidi sono necessarie ulteriori repliche dell'esperimento, ma, se tale tendenza venisse confermata, potrebbe indicare la presenza di un maggior numero di PSII attivi. Il mutante in questione è *zep* KO, dunque è lecito supporre che la maggior parte delle variazioni avvenga a livello del PSII; una possibile spiegazione di questo fenomeno potrebbe essere l'attivazione di un maggior numero di PSII in seguito a danni subiti.

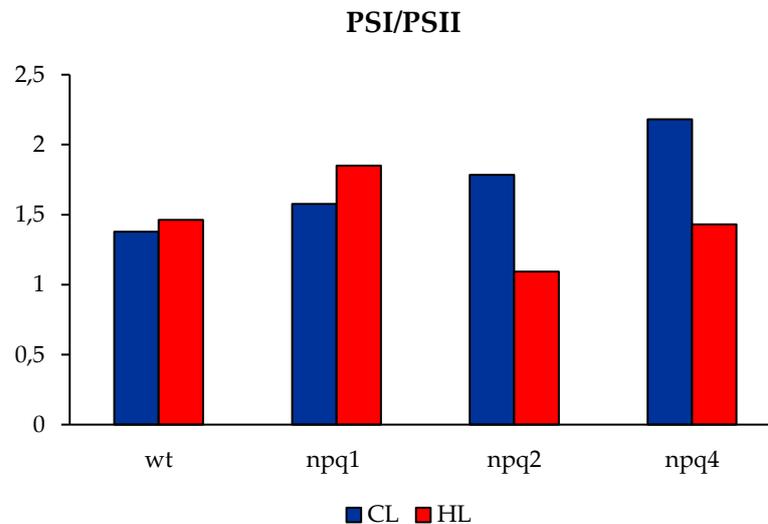


Figura 4.4. Valori di PSI/PSII in piante cresciute a luce di controllo (CL) e ad alta luce (HL). Tramite lo spettrofotometro JTS-10, per ciascun genotipo e condizione di luce sono stati ricavati i valori di PSI e PSII, da cui è stato ricavato il rapporto PSI/PSII. Il grafico riporta questi valori in blu per CL e in rosso per HL.

4.4. Dimensione del sistema antenna

Tramite l'utilizzo del JTS sono poi state effettuate misure riguardanti le dimensioni dei sistemi antenna dei vari genotipi, acclimatati a CL e a HL. I risultati si interpretano basandosi sul calcolo della dimensione del sistema antenna: il tempo che l'antenna impiega a raggiungere metà della saturazione complessiva è indicatore della dimensione della stessa.

Se giunge a saturazione velocemente, significa che l'energia luminosa impiega meno tempo per raggiungere il centro di reazione.

Dunque, l'antenna ha dimensioni ridotte poiché composta da poche clorofille che in breve tempo risultano tutte sature: non possono accogliere ulteriori fotoni e la resa fotosintetica non cresce. Al contrario, una curva di saturazione più graduale indica la presenza di un sistema antenna di

dimensioni maggiori, più ricco di clorofille, adatto a raccogliere quanti più fotoni possibile.

Nei grafici (Figura 4.5), è stato calcolato il reciproco del tempo; dunque, a valore maggiore corrisponde antenna di dimensioni minori. Viene studiato il confronto fra antenne di piante acclimatate a CL e a HL; infatti, le piante vascolari, per prevenire la fotoinibizione, tendono a ridurre la dimensione dell'antenna quando sono esposte a stimoli luminosi più intensi. Si è voluto verificare se nei muschi avvenga lo stesso.

I mutanti, rispetto al WT, presentano notevoli differenze, sia sotto CL che sotto HL. In particolare, tendono ad avere un'antenna di dimensioni inferiori; questo probabilmente è dovuto al fatto che la mancanza di proteine ed enzimi coinvolti nei processi fotoprotettivi li rende più facilmente esposti alla fotoinibizione e, pertanto, la riduzione dell'antenna potrebbe essere un meccanismo alternativo di difesa dall'eccesso di luce.

Il WT, invece, subisce una lieve diminuzione ad HL, ma l'antenna rimane comunque di grandi dimensioni. I muschi, infatti, sono adattati ad ambienti in cui la luce scarseggia e possiedono numerose e ampie antenne.

Tuttavia, sembra che questo non crei problemi ad HL, come invece avviene nelle piante vascolari, poiché, dopo breve tempo dall'esposizione alla luce intensa, i tessuti vanno incontro a disidratazione e il processo fotosintetico viene bloccato (Gerotto et al. 2011).

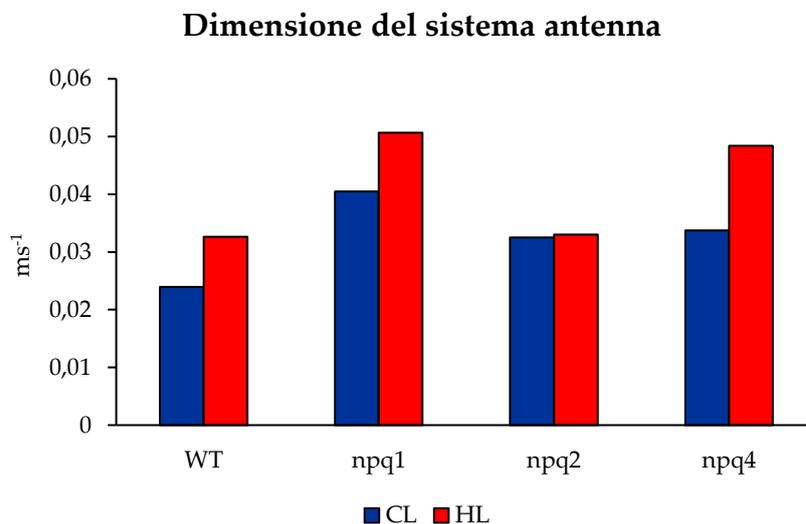


Figura 4.5. Dimensione del sistema antenna in piante cresciute in condizioni di luce di controllo (CL) e di alta luce (HL). Tramite lo spettrofotometro JTS-10 è stato calcolato $t/2$, ossia il tempo necessario affinché metà delle antenne risulti satura. In seguito, si è ricavato $t-2/3$ e infine il reciproco. Il tempo di saturazione del sistema antenna è indicatore delle sue dimensioni; se l'antenna impiega poco tempo per saturarsi significa che è di piccole dimensioni, se ne impiega di più è più grande. Poiché è misurato in ms^{-1} , il grafico va interpretato considerando dimensioni inferiori per valori più elevati, e viceversa. In blu sono riportati i valori a CL e in rosso quelli a HL.

4.5 Quantificazione dei pigmenti

È stato valutato il contenuto in pigmenti dei vari genotipi cresciuti nelle due diverse condizioni di luce. In questo modo si è potuto capire se avviene una redistribuzione di carotenoidi e clorofille a seguito della deplezione di enzimi e proteine coinvolti nel processo fotosintetico. Inoltre, è stato valutato se in *P. patens* l'intensità luminosa influisce nell'organizzazione dei pigmenti.

4.5.1. Clorofilla *a/b*

I risultati del rapporto clorofilla *a/b* (Figura 4.6) mostrano valori simili tra i vari genotipi, all'interno di un range di circa 2,5-3: ciò implica che nei mutanti non sono avvenute variazioni nella distribuzione dei pigmenti. Sono necessarie ulteriori repliche per confermarlo, ma si tratta di un dato importante poiché significa che tali mutanti possono essere sottoposti ad analisi fotosintetiche (come il livello di NPQ descritto nei paragrafi 3.1 e 3.2) a paragone diretto col WT, dal momento che condividono un simile contenuto in pigmenti.

Inoltre, non emergono grandi differenze neanche dal confronto tra i genotipi cresciuti a luce di controllo e quelli cresciuti ad alta luce.

L'unico che subisce un innalzamento è *npq2*, ma si tratta comunque di una crescita limitata. Questo significa che, nei muschi, a differenza di quanto accade nelle piante vascolari, non vi è un riarrangiamento del contenuto in pigmenti in risposta alle diverse condizioni di luce (Gerotto et al. 2011).

In generale, una variazione del rapporto Chl *a/b*, soprattutto all'interno del PSII, è dovuta alla modificazione del sistema antenna. Infatti, la clorofilla *b* è associata alle antenne dei fotosistemi, mentre la clorofilla *a* è legata al core. Il rapporto tra le due clorofille consente di verificare se avvengono variazioni nel numero di antenne: una loro riduzione (definita da valori maggiori del rapporto Chl *a/b*) sarebbe indice di un adattamento della pianta in risposta alla fotoinibizione; questo è il meccanismo attuato dalle piante vascolari (Bailey et al. 2001). A questo proposito, pare che i muschi abbiano sviluppato una diversa strategia per rispondere all'eccesso di luce: invece di potenziare il meccanismo fotosintetico lo interrompono del tutto (Gerotto et al. 2011).

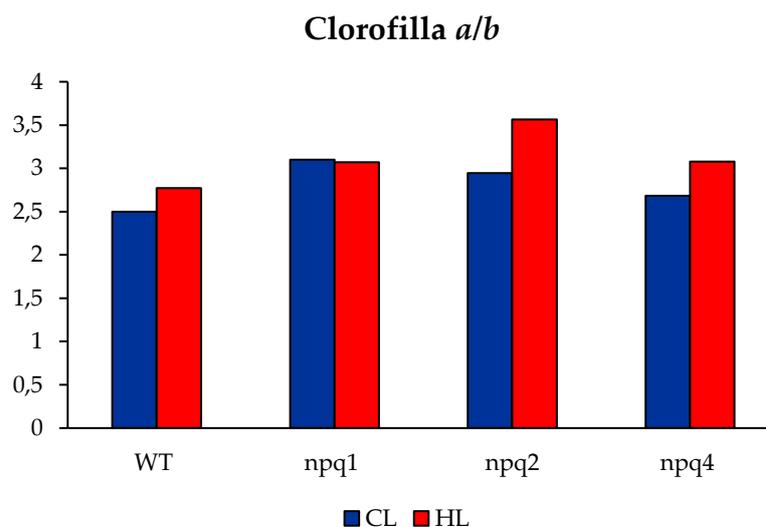


Figura 4.6. Quantificazione di clorofilla *a* e *b* tramite rapporto Chl *a/b* in piante cresciute in condizioni di luce di controllo (CL) e di alta luce (HL). Con l'utilizzo dello spettrofotometro sono stati ricavati i valori di assorbanza dei vari genotipi nelle due condizioni di luce. Tramite l'applicazione GitHub (Chazaux et al. 2022), si sono ottenuti i valori della clorofilla *a* e *b*, da cui è stato calcolato il rapporto. In blu sono riportati i valori di CL e in rosso quelli di HL.

4.5.2. Clorofille/Carotenoidi

Per quanto riguarda il rapporto Chl/Car, il confronto tra genotipi a CL non evidenzia particolari differenze, se non per *npq2*, che presenta valori superiori. Il confronto tra le due condizioni di luce in questo caso mette in evidenza una riduzione generale di tale rapporto; solo *npq1* mantiene lo stesso valore anche a HL. Anche in questo caso sono necessarie ulteriori repliche, ma, se venisse confermata, questa tendenza sarebbe segno di un aumento della quantità di carotenoidi all'interno dei sistemi antenna, rispetto alle clorofille. I carotenoidi sono coinvolti nel processo di dissipazione dell'energia sotto forma di calore (NPQ), e una loro concentrazione maggiore in condizioni di stress luminoso è indice dell'attività di tale meccanismo. Questo dato è coerente con la strategia descritta nel paragrafo 4.5.1: quando esposti a luce intensa, privi del riparo offerto dall'ombra, i muschi vanno incontro a disseccamento e blocco dell'attività fotosintetica. Nel frattempo, essi si liberano dell'energia residua che, altrimenti, provocherebbe danni ai fotosistemi, dissipandola sotto forma di calore proprio grazie alla presenza dei carotenoidi (Gerotto et al. 2011).

Dunque, l'aumento relativo dei carotenoidi ha due risvolti importanti: da un lato è coinvolto nel forte processo di NPQ durante la disidratazione; dall'altro dimostra che la mancata variazione nel rapporto Chl *a/b* non è

dovuta a una risposta inadeguata da parte di *P. patens*, ma è una caratteristica specifica di tale muschio (Gerotto et al. 2011).

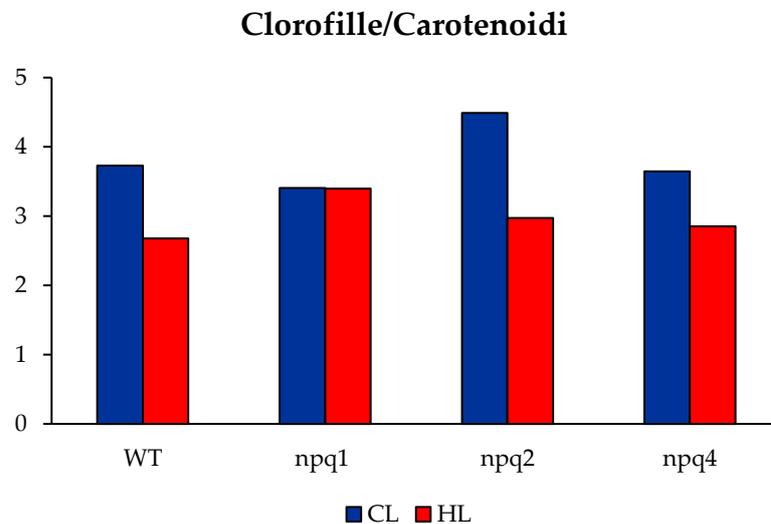


Figura 4.7. Quantificazione di clorofilla e di carotenoidi tramite rapporto Chl/Car in piante cresciute in condizioni di luce di controllo (CL) e di alta luce (HL). Con l'uso dello spettrofotometro sono stati ricavati i valori di assorbimento dei vari genotipi nelle due condizioni di luce. Tramite l'applicazione GitHub (Chazaux et al. 2022), si sono ottenuti i valori delle clorofille e dei carotenoidi, da cui è stato calcolato il rapporto. In blu sono riportati i valori di CL e in rosso quelli di HL.

5. DISCUSSIONE

Lo studio dei meccanismi di fotoprotezione è un argomento molto attuale, poiché permette di valutare in modo più accurato l'impatto sui vegetali della variazione degli habitat dovuta ai cambiamenti climatici.

È, inoltre, cruciale la necessità di soddisfare il fabbisogno alimentare globale con coltivazioni che abbiano una produttività maggiore e siano in grado di gestire in modo efficiente le risorse, tra cui l'energia solare; una conoscenza approfondita di questi processi, il cui funzionamento non è stato ancora del tutto descritto, può condurre a un miglioramento della resa agricola.

L'analisi dei mutanti della fotoprotezione permette, infatti, di individuare proteine e/o enzimi, con funzioni utili per la coltivazione, che gli incroci tradizionali non sono in grado di rilevare. L'utilizzo delle nuove tecniche di miglioramento genetico potrebbe sfruttare tali conoscenze per produrre piante dotate di una resa maggiore.

Physcomitrium patens è un ottimo organismo modello per questo tipo di analisi grazie alla facilità e rapidità della sua coltivazione in laboratorio; si dispone, inoltre, dell'intera mappa del suo genoma e se ne conoscono le tecniche di manipolazione. La sua posizione filogeneticamente intermedia tra alghe e piante, lo rende un oggetto di studio interessante per comprendere l'evoluzione dei processi fotoprotettivi nelle piante vascolari.

Le analisi effettuate in questo studio hanno messo in evidenza la funzione di LHCSR, tipica delle alghe, e PSBS, propria delle piante vascolari, nei meccanismi di NPQ. Dai dati ottenuti, che sono coerenti con la letteratura al riguardo, queste proteine risultano fondamentali, in particolare nelle fasi iniziali del processo (Sylak-Glassman et al. 2014). Infatti, in loro assenza, l'NPQ non può avvenire, nonostante la regolare espressione di zeaxantina. PSBS e LHCSR, tuttavia, si differenziano per la diversa modalità d'azione e regolazione, inoltre il loro effetto è cumulativo e indipendente (Alboresi et al. 2010).

Anche la zeaxantina si conferma un elemento fondamentale del processo, poiché la sua mancanza nel genotipo *npq2*, *vide* KO, rende il livello di NPQ pressoché trascurabile.

È invece interessante notare come il mutante *npq1*, che manca della ZE, abbia sì un elevato livello di NPQ, ma subisca comunque uno scarto rispetto al WT, segno che la zeaxantina da sola non è sufficiente, e che, probabilmente, una cattiva regolazione del ciclo delle xantofille influenza negativamente il processo.

Analisi riguardanti i fotosistemi hanno messo in luce alcune caratteristiche di *P. patens*: nel WT, l'esposizione a luce intensa non modifica il rapporto PSI/PSII; inoltre, anche la dimensione del sistema antenna e il rapporto Chl *a/b* non subiscono variazioni. Ciò indica che la pianta non mette in atto una riorganizzazione a livello dei fotosistemi, come invece accade nelle piante vascolari, per adeguare il sistema di cattura dell'energia radiante alle nuove condizioni di luce. Questa particolarità, che potrebbe sembrare una risposta inadeguata del muschio allo stress fotossidativo, parrebbe invece far parte di una diversa modalità di regolazione. I muschi, infatti, sono organismi adattati ad ambienti provvisti di quantità esigue di luce, e, pertanto, sono dotati di antenne numerose e ampie per raccogliere quanta più energia solare possibile; quando vengono esposti a una quantità di luce eccessiva, vanno presto incontro a disseccamento a causa della disidratazione dei loro tessuti e la fotosintesi viene completamente inibita (Gerotto et al. 2011). In questo stato, dunque, adeguare la capacità fotosintetica alla luce elevata risulta poco utile.

L'ipotesi che questa sia una strategia alternativa, e non una risposta inadeguata, è sostenuta anche dal fatto che la quantità di carotenoidi subisce una crescita sotto HL, segno che i meccanismi di fotoprotezione vengono avviati e, in breve tempo, eliminano tutta l'energia in eccesso (Gerotto et al. 2011).

In questo lavoro sono state eseguite misure con luce attinica intensa di 850 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$, utilizzando un protocollo di 20 min. In questo modo è stato analizzato il qE, la componente principale dell'NPQ. Alcuni dei genotipi studiati, *npq1* e *npq2*, sono mutanti del ciclo delle xantofille; pertanto, sarebbe interessante analizzare più nel dettaglio qZ, che possiede una cinetica più lenta che viene rilevato con difficoltà in queste condizioni di luce e con intervalli di tempo così brevi. Ricerche future potrebbero approfondire tale aspetto tramite l'utilizzo di luce attinica a intensità minore e un protocollo di misura più lungo.

6. BIBLIOGRAFIA

- Alboresi, Alessandro, Gerotto Caterina, Giacometti Giorgio M., Bassi Roberto e Morosinotto Tomas. 2010. "Physcomitrella patens mutants affected on heat dissipation clarify the evolution of photoprotection mechanisms upon land colonization" *PNAS*
- Bailey, Shaun, Walters Robin G., Jansson Stefan e Horton Peter. 2001. "Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the existence of separate low light and high light responses" *Springer* 213: 794-801
- Bailleul, Benjamin, Cardol Pierre, Cécile Breyton e Finazzi Giovanni. 2010. "Electrochromism: a useful probe to study algal photosynthesis." *Photosynthesis Research* 106: 179-189
- Chaux, Marie, Schiphorst Christo, Lazzari Gioele e Caffari Stefano. 2022. "Precise estimation of chlorophyll a, b and carotenoid content by deconvolution of the absorption spectrum and new simultaneous equations for Chl determination" *The Plant Journal* 109: 1630-1648
- Gerotto, Caterina, Alboresi Alessandro, Giacometti Giorgio M., Bassi Roberto e Morosinotto Tomas. 2011. "Role of PSBS and LHCSR in *Physcomitrella patens* acclimation to high light and low temperature" *Plant, Cell & Environment* 34: 922-932
- Krishnan-Schmieden, Maithili, Konold Patrick E., Kennis John T. M. e Pandit Ankali. 2021. "The molecular pH-response mechanism of the plant light-stress sensor PsbS" *Nature Communications*
- Müller, Patricia, Li Xiao-Ping e Niyogi Krishna K. 2001. "Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy" *Plant Physiology* 125: 1558-1566
- Murchie, E. H. e Lawson T. 2013. "Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications" *Journal of Experimental Botany* 64 (13): 3983-3998
- Nawrocki, W.J, Bailleul B., Cardol P., Rappaport F., Wollman F.-A. e Joliot P. 2019. "Maximal cyclic electron flow rate is independent of PGRL1 in *Chlamydomonas*" *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* 1860: 425-432
- Nilkens, Manuela, Kress Eugen, Lambrev Petar, Miloslavina Yuliya, Müller Marc, Holzwarth Alfred R. E Jahns Peter. 2010. "Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady-state conditions in *Arabidopsis*" *Biochimica et Biophysica Acta* 1797: 466-475
- Pinnola, Alberta, Dall'Osto Luca, Gerotto Caterina, Morosinotto Tomas, Bassi Roberto e Alboresi Alessandro. 2013. "Zeaxanthin binds to

- Light-Harvesting Complex stress-related protein to enhance nonphotochemical quenching in *Physcomitrella patens*" *The Plant Cell* 25: 3519-3534
- Roberty, Stéphane, Bailleul Benjamin, Berne Nicolas, Franck Fabrice e Cardol Pierre. 2014. "PSI Mehler reaction is the main alternative photosynthetic electron pathway in *Symbiodinium* sp., symbiotic dinoflagellates of cnidarians" *New Phytologist* 204: 81-91
- Stirbet, Alexandrina, Lazár Dušan, Guo Ya e Govindjee Govindjee. 2020. "Photosynthesis: basics, history and modelling" *Annals of Botany* 126: 511-537
- Storti, Mattia, Alboresi Alessandro, Gerotto Caterina, Aro Eva-Mari, Finazzi Giovanni e Morosinotto Tomas. 2018. "Role of cyclic and pseudo-cyclic electron transfer in response to dynamic light changes in *Physcomitrella patens*" *Plant, Cell & Environment* 1-13
- Sun, Junlei e Golbeck John H. 2015. "The presence of the IsiA-PSI supercomplex leads to enhanced photosystem I electron throughput in iron-starved cells of *Synechococcus* sp. PCC 7002" *ACS Publications* 119: 13549-13559
- Takezawa, Daisuke, Watanabe Naoki, Ghosh Totan Kumar, Saruhashi Masashi, Suzuki Atsushi, Ishiyama Kanako, Somemiya Shinnosuke, Kobayashi Masatomo e Sakata Yoichi. 2014. "Epoxy-carotenoid-mediated synthesis of abscisic acid in *Physcomitrella patens* implicating conserved mechanisms for acclimation to hyperosmosis in embryophytes" *New Phytologist* 206: 209-219