

RELAZIONE SCIENTIFICA DEL PROGRAMMA DI RICERCA STM

Il Fruitore: Katya Marinova GEORGIEVA

Istituto di afferenza : Istituto di Fisiologia Vegetale dell'Accademia Bulgara delle Scienze M. Popov con qualifica di PROFESSORE livello ORDINARIO

Istituzione ospitante: sede dell'IBIMET di Bologna
Dipartimento di afferenza : Scienze Bio-Agrolimentari

Titolo del programma:

Approccio metabolomico per lo studio dei meccanismi di protezione e resistenza agli stress idrici e termici nella specie vegetale "resurrection" *Haberlea rhodopensis*

Obiettivo del soggiorno della Prof. Katya Georgieva era quello di indagare l'effetto combinato di differenti stress ambientali, quali lo stress idrico ed elevata temperatura, sulle modificazioni metaboliche e sui meccanismi preposti al controllo della fisiologia della pianta. Obiettivo specifico del progetto è quello di contribuire a identificare le strategie e i meccanismi di protezione della pianta "resurrection" specie *Haberlea rhodopensis*, attraverso una definizione del ruolo dei diversi processi fisiologici e biochimici coinvolti nella tolleranza alla disidratazione. Tale lavoro potrà fornire un quadro più completo della risposta delle piante di *Haberlea* sottoposte a condizioni di stress ambientale significativo e all'azione sinergica di differenti stress abiotici, quali la carenza idrica e l'eccesso di temperatura.

Brevemente l'attività ha previsto la determinazione dell'influenza della temperatura sui parametri fotosintetici e di fluorescenza di piante di *Haberlea* adattate ad elevati regimi luminosi sottoposte a differenti livelli di deficit idrico e di temperatura in condizioni di laboratorio mediante la misurazione degli scambi gassosi e della fluorescenza della clorofilla. Le dinamiche dei suddetti processi fisiologici sono state studiate in relazione alla dinamica di diverse vie metaboliche per la sintesi di composti volatili non essenziali, e quelli essenziali non volatili quali l'ABA, le clorofille e i carotenoidi come le xantofille in risposta agli stress abiotici. In particolare, le alterazioni al ciclo dei pigmenti xantofille sono messe a confronto alla funzionalità fotosintetica e ai meccanismi di dissipazione non-fotochimica per esaminare il loro ruolo specifico. Inoltre attraverso l'utilizzo di inibitori di diversi processi di dissipazione termica è stato condotto uno studio specifico di analisi della ripartizione energetica della radiazione assorbita dalle foglie. E' stata quindi quantificata e confrontata l'entità delle diverse vie di utilizzazione dell'energia captata da foglie di piante di *Haberlea* sottoposte a disidratazione combinata con diverse condizioni di temperatura, in presenza o meno di riparazione del fotodanno.

Piante adulte di simile stadio di crescita e ben idratate di *Haberlea* sono state raccolte direttamente in campo da siti localizzati nell'area di Orehovo (Bulgaria) dove le piante sono adattate a condizioni naturali di buona illuminazione. Sono state prelevate piante cresciute in condizioni di elevata intensità luminosa. Le piante sono state trasferite in vaso e collocate in laboratorio presso l'Istituto IBIMET dove sono state mantenute in camere di crescita per una settimana allo scopo di favorirne l'acclimatamento. Allo scopo di valutare l'effetto delle diverse condizioni di temperatura durante la disidratazione, piante ben idratate di *Haberlea*

rhodopensis sono state disidratate attraverso la sospensione dell'apporto idrico alle piante e mantenendo le piante a condizioni di illuminazione di $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a temperatura di $25/20^\circ\text{C}$ e a $38/30^\circ\text{C}$, con un ciclo di 12/12 ore giorno/notte, e in condizioni di umidità relativa pari al 45%. Dopo la disidratazione le piante sono reidratate attraverso spray diretto di acqua sulle foglie e apporto idrico al terreno, in contenitori umidificati. Le piante di controllo (C) sono state irrigate regolarmente durante tutto l'esperimento. Gli studi sono stati condotti a diversi gradi di disidratazione (50%, 20% e 8%) e alla successiva fase di recupero dopo completa reidratazione delle foglie (R).

Le misurazioni di tasso fotosintetico netto (A), conduttanza stomatica (g_s) e concentrazione sottostomatica di CO_2 (C_i) sono state condotte utilizzando un analizzatore programmabile portatile a flusso aperto (LI-6400; Li-Cor, Inc.) operando ad un flusso di $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, in condizioni di crescita a $550\text{-}600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a temperature di 25°C e 38°C .

In foglie adattate al buio, sono stati calcolati la resa quantica del PSII come il rapporto di fluorescenza variabile su fluorescenza massima (F_v/F_m):

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

Tale valore rappresenta l'efficienza quantica massima, quando tutti i centri del PSII sono aperti. In condizioni ottimali e all'inizio dell'esperimento, le piante hanno raggiunto il massimo valore di F_v/F_m di circa 0.8. Per le foglie adattate al buio, i parametri usati per il raggio misuratore sono stati: intensità 1, modulazione 0.25 kHz, filtro 1 e gain 10; quelli per il flash sono stati durata 0.8 sec, intensità 7, modulazione 20 kHz e filtro 50 Hz.

In foglie adattate alla luce, immediatamente dopo le misurazioni di scambi gassosi, sono state determinati i valori di efficienza del PSII (Φ_{PSII}), tasso relativo di trasporto elettronico fotosintetico ($r\text{ETR}$), estinzione fotochimica (qP) ed estinzione non-fotochimica (NPQ). Il flusso di luce all'interno della camera fogliare dello strumento (con il 90% della frazione rossa con una lunghezza d'onda di 630 nm e un 10% della frazione blu a 470 nm) è stata tracciata ogni tre sec da un sensore di luce esterno. Per le foglie adattate alla luce, i parametri usati per il raggio misuratore sono stati: intensità 3, modulazione 10 kHz, filtro 1 e gain 10; quelli per il flash sono stati durata 0.8 sec, intensità 10, modulazione 20 kHz e filtro 50 Hz.

Il valore di Φ_{PSII} è stato determinato come una misura dell'efficienza dei centri chiusi del PSII (Genty *et al.*, 1989) come:

$$\Phi_{\text{PSII}} = \Delta F / F'_m = (F'_m - F_t) / F'_m$$

con misurazioni sotto luce attinica dello stato costante di fluorescenza F_t e della massima resa fotosintetica F'_m ottenuta usando un impulso saturante di 0.8 sec.

Il valore di qP è stato calcolato secondo Maxwell e Johnson (2000)

come:

$$qP = (F'_m - F_t) / (F'_m - F'_o)$$

I valori della Stern-Volmer NPQ sono stati calcolati usando il valore iniziale F_m misurato dopo un lungo periodo di buio e usando il valore di F'_m misurato dopo esposizione alla luce (Bilger e Björkman, 1990) come:

$NPQ = (F_m - F'_m) / (F_m - F'_o)$ (Sia qP che NPQ richiedono F'_o , il valore fluorescenza minima di una foglia adattata alla luce che viene successivamente esposta al buio. Questo valore è stato determinato utilizzando una luce nel rosso-lontano con i seguenti parametri: durata 6 sec, intensità 8, pre-time 1 sec, post-time 1 sec, modulazione 0.25 kHz, filtro 1 Hz.

L'analisi della ripartizione energetica della radiazione assorbita dalle foglie sarà eseguita secondo il metodo proposto da Konyeyev e Hendrickson (2007) combinato con il modello fotosintetico suggerito da von Caemmerer (2000). In particolare, considerando pari ad 1 la quantità di energia assorbita da una foglia: Φ_f, D rappresenta la frazione dissipata attraverso

fluorescenza basale e calore costitutivo; Φ_{NF} è la quota dissipata termicamente dai fotosistemi danneggiati; Φ_{NPQ} è la frazione energetica riemessa tramite il meccanismo protettivo del Non Photochemical Quenching; Φ_{PSII} è la quantità di energia in uscita dal PSII dedicata al trasporto elettronico per la fotosintesi, la fotorespirazione ed i trasporti alternativi; Φ_{AT} è la parte di energia allocata ai trasporti alternativi; Φ_R rappresenta la frazione energetica utilizzata per la fotorespirazione; Φ_{CO2} è la quota allocata alla fotosintesi netta. Ulteriori 3 foglie per ogni trattamento sono state usate per la determinazione del decadimento della funzionalità dei fotosistemi II (PSII) tramite misure di fluorescenza (Losciale et al., 2008). Su tutti i campioni è stato verificato lo stato di completa sanità dei fotosistemi effettuando rilievi di fluorescenza (F_v/F_m) durante le diverse fasi di esposizione a condizioni differenti di temperatura.

Al fine di analizzare e discriminare i diversi processi di dissipazione termica che possono essere coinvolti in condizioni di stress idrico combinato ad elevate temperature sono stati condotti esperimenti in condizioni che prevengono la resintesi di D1 (trattamento con lincomicina) e che inibiscono la conversione della violaxantina in zeaxantina (trattamento con DTT-ditiotreitolo). Il trattamento con lincomicina consente di valutare quanto i meccanismi di riparazione della proteina D1 del fotosistema II intervengono nella funzionalità del fotosistema II, e quindi tale trattamento consente la valutazione della fotoinibizione altrimenti mascherata dalla neosintesi delle parti danneggiate. Il trattamento con DTT che inibisce l'enzima violaxantina deossidasi preposto a convertire la violaxantina in zeaxantina (Yamamoto e Komite, 1972) consente di valutare meglio il ruolo del ciclo delle xantofille in tali processi di dissipazione termica di *Haberlea*. È stato quindi messo a punto la metodologia idonea per condurre tale esperimento con gli inibitori sia verificando l'assorbimento fogliare sia valutando le condizioni idonee che avevano un effetto sul fotosistema II. Foglie di *Haberlea* sono state lasciate in incubazione al buio a dose diverse di lincomicina (1 mM, 2 mM e 3 mM) per tempi diversi. Successivamente sono state esposte a intensità diverse di luce (500, 600, 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) per 60 minuti. Dopo il primo periodo di adattamento al buio per tre ore e dopo un periodo di adattamento al buio per 30 min seguente l'esposizione alla luce è stato misurato l'efficienza quantica massima della fotochimica primaria del fotosistema II (PSII), che è data da $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$. Dopo che la quantità designata di inibitore è stata assorbita, le foglie sono state sottoposte a trattamento fotoinibitorio a 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ di intensità luminosa. Tale trattamento è stato testato sia su piante ben idratate che su piante completamente disidratate seguendone, in quest'ultimo caso, il recupero dalla disidratazione durante l'incubazione in soluzioni con inibitori. Foglie incubate in acqua sono state montiorate come trattamento di controllo durante entrambi gli esperimenti.

La capacità delle piante di rilasciare isoprenoidi è stata testata contemporaneamente alla misurazione degli scambi gassosi, utilizzando un sistema a T che permetteva il campionamento di parte del flusso in uscita dalla cuvetta, mediante sia campionamento con trappole adsorbenti sia direttamente mediante uno spettrometro di massa a trasferimento protonico (PTR-MS. Proton Transfer Reaction Mass Spectrometer, Ionicon, Innsbruck, Austria) (Lindinger et al., 1998). Il settaggio utilizzato prevedeva una pressione di 2.6-5 mbar e l'acquisizione ogni secondo dei segnali dei singoli ioni. Le misure registrate come CPS (count per second), sono state convertite mediante apposite curve di calibrazione in nmol s^{-1} ed espresse come media di 8-10 campionamenti per foglia. Le trappole campionate invece sono state desorbite termicamente utilizzando un termodesorbitore (Markes) abbinato ad un gascromatografo e spettrometro di massa (Agilent 7890-5975).

A questi rilievi sono stati accoppiati, su foglie adiacenti, prelievi di campioni di tessuto per l'analisi del contenuto di pigmenti clorofilliani, xantofille, e fenoli.

Il programma ha beneficiato del know-how scientifico e tecnologico della Prof. Georgieva in tali tematiche, consentendo di confrontare e scambiare competenze nel settore della fisiologia degli stress abiotici. La prof. Georgieva dell'Istituto bulgaro Acad. M. Popov Institute of Plant Pathology ha già dimostrato alcuni meccanismi fisiologici messi in atto dalle piante 'resurrection' nella tolleranza allo stress da carenza idrica, e in particolare utilizzando la fluorescenza della clorofilla per studiare gli effetti degli stress ambientali in tale specie, poichè la fotosintesi è spesso ridotta nelle piante sottoposte a condizioni sfavorevoli, come il deficit idrico ed elevata temperatura. Queste indagini sono state oggetto di studio durante il suo soggiorno presso l'Istituto del CNR di Biometeorologia (IBIMET) al fine di integrare tali competenze nell'analisi dei meccanismi di dissipazione termica mediante analisi della fluorescenza con quelle specifiche dell'IBIMET nell'analisi chimica di diversi metaboliti coinvolti nei meccanismi di difesa delle piante.

Relativamente alla funzionalità fotosintetica e dei meccanismi messi in atto dalla piante per dissipare l'eccesso di energia sono emerse differenze sia durante la disidratazione che per effetto delle diverse condizioni di temperatura. Tuttavia i dati sono ancora in corso di elaborazione e un'analisi dettagliata fornirà informazioni precise su tali processi.

Relativamente alla capacità di sintesi e di emissione di metaboliti La metodologia applicata ha mostrato come *Haberlea* non sia una specie emettitrice di isoprenoidi sia in condizioni standard sia quando sottoposta ad elevate temperature. Tuttavia verranno analizzati i campioni vegetali al fine di verificare se composti isoprenoidi appartenenti alla classe dei monoterpeni e dei sesquiterpeni sono conservati all'interno di strutture specializzate, seppure non rilevati nelle emissioni. Inoltre il mancato rilevamento di emissioni di VOC da parte della specie *Haberlea rhodopensis* potrebbe essere legato allo stadio vegetativo delle piante che sono state raccolte alla fine di settembre per essere adattate alle condizioni di crescita controllate ed esaminate in novembre durante il soggiorno della Prof. Georgieva. Poiché in letteratura non esistono informazioni sulla capacità di emissione di tale specie al fine di verificare i dati preliminari ottenuti, durante la prossima stagione vegetativa verranno ripetute tali misure su piante subito dopo la ripresa vegetativa.

I risultati delle analisi chimiche dei diversi metaboliti coinvolti nei processi di dissipazione termica consentiranno non solo una analisi dettagliata delle diverse componenti in gioco ma anche di identificare i composti chiave nella regolazione delle vie metaboliche preposte all'accumulo di metaboliti di difesa e protezione dai danni dovuti alle condizioni di stress.

Bologna 02/12/2013


Francesca Rapparini

