

Ci si trova in una situazione in cui a livello della sorgente abbiamo una pressione idrostatica maggiore mentre a livello degli elementi del cribro del pozzo abbiamo una pressione idrostatica minore. In questo modo si crea un gradiente che spinge l'acqua e tutto ciò che è disciolto nell'acqua dalla sorgente al pozzo. La presenza delle placche rallenta il raggiungimento dell'equilibrio in questo modo si può continuamente avere un flusso.

FITOCROMO

Fotomorfogenesi: controllo della luce nei processi di differenziazione della pianta.

Lo sviluppo di una pianta con la luce comporta un decremento della velocità di allungamento del fusto, sviluppo delle foglie e sintesi dei pigmenti fotosintetici. Se cresce al buio invece avrà la formazione di pigmentazione eziolata.

Negli anni '30 si vide che non tutte le lunghezze d'onda stimolano la fotomorfogenesi e che l'effetto della stimolazione da parte di **luce rossa** (650-680 nm) poteva essere successivamente inibito se si usava un flash di **luce rossa-lontana** (710-740 nm). Anche la luce blu può stimolare la fotomorfogenesi.

Su semi fotoplastici di insalata si può vedere che questo effetto di luce rossa e luce rossa-lontana si ha con stimolo prima della germinazione e poi inibizione della germinazione.

Vennero fatte due ipotesi su questo fenomeno:

- 1) esistono due fotorecettori che assorbono uno la luce rossa e l'altro la luce rossa lontana
- 2) esiste un unico fotorecettore in due forme inter-convertibili, una forma che assorbe luce rossa l'altra che assorbe la luce rossa lontana → **si dimostra quella valida**

Il **fitocromo** esiste in una forma in grado di assorbire la luce rossa (**Pr**) e questa forma può essere convertita dalla luce rossa in una forma in grado di assorbire la luce rossa-lontano (**Pfr**). La forma Pfr può essere convertita dalla luce rossa lontana nella forma Pr.

Pr → luce rossa → Pfr

Pfr → luce rossa-lontano → Pr

Pr ha un massimo di assorbimento (assorbanza) a 660 nm (rosso) mentre il **Pfr** a 730 nm (rosso-lontano). Entrambe le forme assorbono nel blu. L'assorbimento del Pfr nel rosso non è 0, ma in realtà assorbe un po'. E lo stesso lo possiamo dire per Pr.

Equilibrio fotostazionario: equilibrio che si determina a causa della parziale sovrapposizione nello spettro di assorbimento, quando c'è luce rossa non c'è uno spostamento del 100% di Pr a Pfr ma 85% Pfr e 15%Pr, lo stesso vale per la luce rossa-lontana e si avrà 97% Pr e 3% Pfr. Queste differenze di percentuali tra luce rossa e luce rossa-lontana sono dovute al fatto che il Pr assorbe molto poco in luce rossa lontana.

LUCE ROSSA: 85% Pfr e 15% Pr

LUCE ROSSA-LONTANA: 97% Pr e 3% Pfr

Ma quale è la forma attiva del fitocromo? Il Pr o il Pfr?

Sono stati identificati una serie di mutanti con una fotomorfogenesi mutata. Un wild type sotto luce bianca (la componente di luce rossa è maggiore di quella rossa lontana) ha la crescita di ipocotile inibita (quella del fusto) quindi ha una fotomorfogenesi corretta. Un mutante colpito da luce bianca ha la crescita ipocotile non inibita e di conseguenza non hanno una fotomorfogenesi corretta. Questi mutanti non hanno né Pr né Pfr. Questo esperimento dimostra che la fotomorfogenesi è mediata dalla comparsa del Pfr e non dalla scomparsa del Pr di conseguenza **la forma attiva del fitocromo è la Pfr**.

STRUTTURA FITOCROMO

Il **fitocromo** è un pigmento ubiquitario che opera come mediatore dei segnali della luce nella banda del rosso. È un omodimero di una proteina solubile di circa 250 kDa contenente un gruppo cromoforo, la **fitocromobilina**.

All'N-terminale è presente il dominio di legame per il cromoforo mentre al C-terminale è presente il sito di dimerizzazione.

La fitocromobilina è un **tetrapirrolo lineare** a differenza della molecola di clorofilla dove è chiuso. Condivide i primi passaggi della sintesi della clorofilla. Si trova legata covalentemente all'N-terminale con il peptide.

La fitocromobilina viene sintetizzata nei plastidi, il fitocromo nel citoplasma. Il loro assemblaggio è auto-catalitico, non ha bisogno di nessun enzima.

Quando il fitocromo passa dalla Pr alla Pfr abbiamo un cambiamento conformazionale del gruppo cromoforo che porta poi successivamente a un cambiamento conformazionale alla parte proteica del complesso.

A livello del gruppo cromoforo si ha un cambiamento di isomeria, **l'anello D di pirrolo passa dalla forma cis alla forma trans.**

Primi tentativi di purificazione vennero fatti su germogli di avena eziolati (fatti germinare al buio) questo perché i tessuti eziolati contengono la maggior parte di fitocromo.

Questa purificazione ha potuto mostrare che esistono due tipi di fitocromo: **di tipo I e di tipo II.** Nelle piante eziolate il rapporto tipo I / tipo II è di 9:1 mentre nelle piante verdi è di 1:1. Questo suggeriva che il fitocromo di tipo I fosse una forma fotolabile del tipo II.

I geni in Arabidopsis per il fitocromo sono 5 (nel riso sono 3 e variano da pianta a pianta): **PHYA, PHYB, PHYC, PHYD e PHYE.** Si è capito una volta codificati i geni che il phyA è il tipo I mentre da phyB a phyE sono il tipo II. Le forme phyA e phyB sono le forme che predominano del fotorecettore.

Il fitocromo phyA in forma Pfr è molto fotolabile e quindi viene facilmente degradato. Man mano che i tessuti diventano verde quindi c'è più luce il phyA viene distrutto. Per quanto riguarda gli altri fitocromi questo non succede. Infatti, phyA è prevalentemente presente nei germogli eziolati mentre phyB e gli altri sono prevalenti nelle piante che crescono nella luce.

Studi di localizzazione del fitocromo: si sono fatti studi spettrofotometrici su piante eziolate poiché su piante verdi la clorofilla avrebbe coperto tutto, si è visto che la maggior parte dei fitocromi sono presenti sul germoglio e su la parte più apicale del fusto. Per la localizzazione in tessuti e cellule si sono usati geni reporter che sottospecifica luce rendevano tessuti fosforescenti.

CARATTERISTICHE DELLE RISPOSTE INDOTTE DAL FITOCROMO

Le risposte indotte dal fitocromo possono essere distinte in base alla quantità di luce richiesta intesa come **fluenza** cioè la quantità di fotoni per superficie

- **VLFR** (very low-fluence response) 0,1 - 50 nmol/m²
- **LFR** (low fluence response) 1 - 1000 μmol/m²
- **HIR** (high irradiance response) 10 mmol/m²

VLFR

Sono ad esempio in germogli di avena cresciuti al buio, stimolazioni per la crescita coleotile e per l'inibizione della crescita mesocotile. Non sono foto-reversibili. Queste bassissime fluenze convertono in Pfr meno dello 0,1% del fitocromo totale e ciò rende le VLFR **non foto-reversibili.** Infatti, l'induzione delle risposte da parte della luce R non può essere invertita dalla luce FR poiché nello stato di fotoequilibrio in luce rossa lontano il Pfr costituisce il 3% del fitocromo totale che è una quantità sufficiente a mantenere la risposta. Sono coinvolti i **phyA**

LFR

Sono le classiche risposte indotte dalla luce R e invertite dalla luce FR. Appartengono a queste risposte la germinazione di semi di lattuga ed eventi del deeziolamento di plantule cresciute al buio come l'inibizione

della crescita in lunghezza del fusto, lo srotolamento delle foglie e lo sviluppo dei cloroplasti. Sono coinvolti i **phyB** ma anche i **phyC** e i **phyE**.

Sia le LFR sia le VLFR rispondono alla **LEGGE DI RECIPROCIÀ: risposta = velocità di affluenza * tempo di irradiazione**, la risposta sarà proporzionale alla dose di luce fornita.

HIR

Hanno bisogno di tanta luce e sono **non foto-reversibili**, tutte le LFR vengono stimulate anche dalle HIR. Non rispondono alla legge di reciprocità poiché sono insensibili a luce continue a bassa intensità ma anche a esposizioni veloci di luce ad alta intensità, non conta la fluenza totale ma la velocità di fluenza.

Coinvolte in eventi di deeziolamento come la sintesi di antocianine e l'inibizione dell'allungamento dell'ipocotile.

In HIR si ha un picco massimo nel rosso-lontano (718 nm) e picchi nel blu e nell'UV-A.

La particolarità dello spettro d'azione si è pensato fosse dovuto all'utilizzo di un altro recettore, lo studio è avvenuto in mutanti con fitocromo non funzionante in cui non si hanno risposte in FR ma si hanno risposte in UVA e nel blu, per cui sono necessari altri recettori, **criptocromi** specifici per la luce blu. Sono coinvolti **phyA**.

Per capire l'azione nel rosso lontano si sono usati flash di luce rossa a 658 nm e non si è osservata risposta, stessa cosa per 768. Ma se le usiamo insieme (658 + 768) si osserva una risposta fisiologica. Questo perché se do 658 si forma Pfr che non mi dà risposta, se do 768 si forma Pr non ho risposta, se invece le do insieme si genera un rapporto preciso tra **Pfr/Ptot** che è lo stesso che si genera se illumino con 720. Serve un equilibrio spostato verso Pr ma comunque serve una certa quantità di Pfr.

Se faccio stessa cosa in una pianta verde (prima si parlava di pianta eziolata) il picco massimo d'azione torna ad essere nel rosso. La differenza tra eziolata e verde sta nella presenza del PHYA che è fotolabile, questo perché il PHYA risponde prevalentemente al rosso lontano, mentre gli altri rispondono al rosso.

Quindi non è vero che la forma attiva è sempre la forma Pfr ma alcune volte come nel caso di PHYA è un complesso in cui è presente la forma Pr e quella Pfr.

RISPOSTE INDOTTE DA FITOCROMO

Il **fitocromo** è un sensore che misura il rapporto (R/FR) tra luce rossa (R) e luce rossa lontana (FR) che varia in determinate condizioni, regolando la fotomorfogenesi di conseguenza.

Fuga dall'ombra: effetto mediato in piante che si vengono a trovare sotto una copertura con valori bassi del rapporto R/FR e del rapporto Pfr/Ptot (è avvenuta una diminuzione della luce). Esempi sono la crescita in lunghezza del fusto e dei piccioli a scapito della ramificazione e dell'espansione delle foglie. In alcune piante abituate alla scarsa luminosità non avvengono cambi morfogenetici.

Il fitocromo induce la germinazione dei **semi fotoblastici**. Semi grandi hanno riserve disponibili e non richiedono luce per germinare mentre i semi piccoli hanno poche riserve disponibili e quindi richiedono luce. Fitocromi importanti per determinare i ritmi circadiani.

L'apertura e la chiusura del **pulvino** è dovuta allo stato di turgore delle cellule del pulvino, come negli stomi, avviene perché le ventrali sono turgide e le dorsali flaccide, la chiusura è il contrario. Lo stadio flaccido o turgore dipende dagli ioni e dalla luce, la luce blu stimola l'apertura, se si fornisce la luce rossa+buio si stimola la chiusura.

Il **ciclo circadiano** è sincronizzato dalla luce, se la pianta è sottoposta buio prolungato si ha un mantenimento del ciclo ma si ha un allargamento del picco. Alcuni geni si accendono o si spengono a secondo del ritmo circadiano e questo meccanismo coinvolge il fitocromo.

I fitocromi sono anche coinvolti nel **fotoperiodismo** che si riferisce ai cambiamenti della qualità della luce durante le stagioni; si parla dell'inizio della fioritura, sviluppo dei fiori, riproduzione asessuale, formazione organi di riserva e dormienza.

Fioritura si divide nelle piante che sono:

- **Piante brevidiurne:** fioritura avviene durante giorni brevi
- **Piante longidiurne:** fioritura avviene durante i giorni lunghi
- **Piante intermediodiurne:** fioritura avviene tra limiti precisi di lunghezza del giorno e della notte

Le piante misurano la durata della notte ed è controllato dal fitocromo. Se durante la notte do un flash di luce R la piante non fiorisce. Ma se compenso con FR la pianta fiorisce

FITOCROMO B

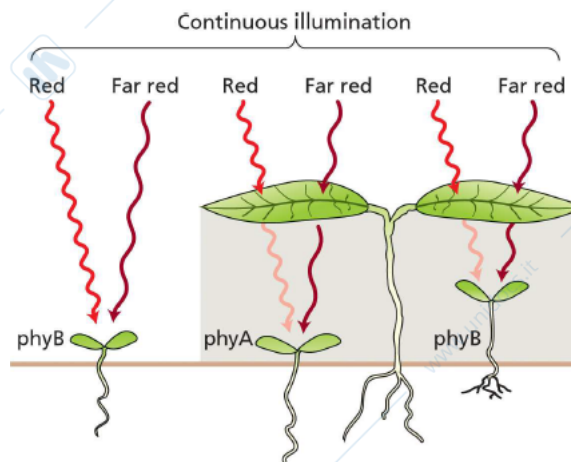
Nei mutanti *hy* di *Arabidopsis* si è visto che il PHYB è quello che determina l'inibizione di allungamento del fusto, se è mutato si ha l'allungamento. Le altre forme di fitocromo non sono in grado di prevenire l'accorciamento dell'ipocotile in risposta alla luce bianca. L'*hy3* manca della riduzione di crescita dell'ipocotile, ha ridotti livelli di clorofilla, ridotti livelli mRNA proteine sviluppo dei cloroplasti, e la germinazione non risponde a LFR.

FITOCROMO A

Per rintracciare i mutanti di *phyA* faccio uno screening per la capacità di rispondere a luce FR. Si identificano due popolazioni di mutanti: mutanti *phyA* e mutanti per il cromoforo. Per distinguerli tratto con luce rossa: i mutanti con *phyA* rispondono perché il *phyB* è normale, mentre quelli che sono mutanti per il cromoforo non rispondono perché manca il cromoforo.

Il *phyA* è presente nella piantina eziolata ma inattivo perché necessita della FR, ma all'esposizione alla R si degrada, *phyB* è attivo e media la deeziolatura e inibisce l'allungamento del fusto.

Il *phyA* è importante quando la pianta cresce in condizione dove FR è maggiore di R, come quando è coperta da un'altra pianta, in questo modo media la deeziolatura.



Le funzioni di **PHYC**, **PHYD**, **PHYE** non sono rilevanti perché sono ridondanti rispetto a **PHYA** e **PHYB**, questo si è visto con le mutazioni in questi loci che portano allo sviluppo comunque della pianta.

Per comprendere quali parti strutturali delle proteine di *phyA* e *phyB* funzionano si sono fatte delle indagini di ingegneria genetica andando a formare proteine chimere: *phyAB* (N-terminale A e C-terminale B) e *phyBA* (contrario di prima) → AB risponde alla luce FR e BA risponde alla luce R di conseguenza è importante l'**N-terminale**.

La fotodegradazione di *phyAB* è determinata dall'**N-terminale** di A che ha la sequenza **PEST**. Però l'**N-terminale** da solo è stabile, di conseguenza è presente qualcosa nel dominio C-terminale che è importante per la degradazione.

EVENTI BIOCHIMICI

Gli eventi biochimici che avvengono riguardano soprattutto la iperpolarizzazione e la depolarizzazione della membrana. Di solito avviene l'attivazione di **geni di risposta primaria** che trascrivono per un fattore di trascrizione che andranno ad attivare **geni di risposta secondaria**.

LIVELLO CITOSOLICO

I fitocromi sono omologhi alle Istidina-chinasi dei batteri, in seguito al riconoscimento dei segnali luminosi compiono un'auto-fosforilazione al livello di una serina invece che di una istidina. Il fitocromo così fosforilato può fosforilare altre proteine attivandole a dando così avvio alla loro funzione.

LIVELLO NUCLEARE

Il fitocromo una volta attivato dalla luce subisce un processo di traslocazione verso il nucleo, il phyB che è presente in forma Pr in prevalenza nel citosol migra nel nucleo in forma Pfr, il phyA può entrare nel nucleo sia come Pfr sia come Pr se prima però è passato per la fase Pfr.

Importanti sono i **fattori di interazione con il fitocromo (PIF)** facenti parte della classe **basica elica-giro-elica (bHLH)**. In *Arabidopsis* sono presenti 8 PIF che presentano nella regione N-terminale la sequenza **APB** per legare phyB. Inoltre, i PIF1, PIF2 e PIF3 possiedono anche **APA** per legare phyA. I PIF operano principalmente come regolatori negativi della risposta della pianta alla luce.

Una volta che il fitocromo incontra i PIF nel nucleo li lega impedendone la loro funzione. L'associazione fitocromo/PIF porta alla degradazione di quest'ultimi attraverso una **via dell'ubiquitina/proteosoma 26S**.

Il meccanismo avviene grazie a Pfr che porta alla fosforilazione di PIF che vengono così marcati per l'ubiquitinazione da parte di **E3 ubiquitina ligasi** composta da una porzione detta **COP1**

Al buio: i FTF (fattori di trascrizione come HFR1 e HY5, che attivano l'espressione di geni per la fotomorfogenesi) vengono degradati dal sistema ubiquitina/proteosoma. I PIF invece si legano sia alle G-BOX impedendo la trascrizione di geni di risposta primaria sia a promotori per attivare geni della scotomorfogenesi. COP1 presente nel nucleo

Alla luce: il Pfr entra nel nucleo e porta alla degradazione di PIF in questo modo i FTF si legano ai promotori per attivare geni della fotomorfogenesi e si attivano i geni della risposta primaria che attiveranno quelli della risposta secondaria. COP1 presente nel citosol

ORMONI VEGETALI

Il sito di sintesi non è chiaramente localizzato, non agiscono sempre in maniera costante, ogni ormone può regolare numerosi processi diversi. Le classi principali sono:

- Auxine
- Gibberelline
- Citochinine
- Etilene
- Acido Abscissico
- Brassinosteroidi

Altre sostanze segnale sono l'acido jasmonico, l'acido salicilico, sistemina e poliammine

H⁺ - ATPasi

Proteina che idrolizza ATP per spostare H⁺

- le **F-ATPasi** dei mitocondri e dei cloroplasti, sfruttano gradiente di H per la sintesi di ATP
- le **V-ATPasi**, presente nel tonoplasto, pompano i protoni all'interno del vacuolo, generando la forza proton motrice idrolizzando ATP
- le **P-ATPasi** presenti sulla membrana, composta da un'unica subunità, presenta un sito di acido aspartico che viene fosforilato durante il loro ciclo catalitico

È responsabile:

- del mantenimento del pH del citoplasma, sia la F sia la V
- genera il gradiente protonico importante per tutti i trasporti attivi secondari,
- importante anche nella iperpolarizzazione della membrana con conseguente aumento di K⁺ e ingresso di Cl⁻ con aumento del turgore e apertura delle cellule di guardia degli stomi
- movimenti pulvinici, pulvino organo alla base dei piccioli,