



**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELL'AMBIENTE FORESTALE E  
DELLE SUE RISORSE**

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN  
ECOLOGIA FORESTALE – XXII CICLO**

**IMPATTO DEGLI STRESS BIOTICI E ABIOTICI SULLA RISPOSTA FOTOCHIMICA  
DELLE PIANTE: ANALISI D'IMMAGINE DELL'EMISSIONE DI FLUORESCENZA  
DELLA CLOROFILLA**

**Settore Scientifico Disciplinare – BIO/13**

**Coordinatore: Prof. Paolo De Angelis**

**Tutori :**

**Prof. Giuseppe Scarascia Mugnozza**

**Dr. Antonia Lai**

**Dottoranda: Dr. Maria Sighicelli**

Università degli Studi della Tuscia  
Dipartimento di Scienze dell'Ambiente Forestale e delle sue Risorse (DISAFRI)  
Via S. Camillo de Lellis, snc 01100 Viterbo

Corso di Dottorato di Ricerca in Ecologia Forestale  
Coordinatore: Prof. Paolo De Angelis

Tesi di Dottorato di Ricerca in Ecologia Forestale (XXII ciclo)  
di: Maria Sighicelli

Marzo 2010

... grazie dell'avventura, ora va e vivine un'altra.

... un grazie particolare a

Dr. **Antonia Lai**, per il contributo tecnico-scientifico durante tutta l'attività di ricerca svolta presso il laboratorio di Biologia Vegetale dell'Enea di Frascati, di cui è Responsabile;

Prof. **Giuseppe Scarascia Mugnozza**, per la collaborazione offerta nel corso dell'attività di ricerca;

Dr. **Francesco Loreto**, per i suggerimenti forniti nei periodi di attività svolta in collaborazione con il laboratorio dell'Istituto di Biochimica ed Ecofisiologia Vegetali (IBAF) del C.N.R. di Montelibretti;

Dr. **Paolo Menesatti** e dr. **Corrado Costa** dell'Unità Ricerca Ingegneria Agraria, CRA-ING di Montelibretti ed al Dr. **Massimiliano Guarneri** del C.R. Enea di Frascati per il notevole contributo tecnico nello sviluppo e realizzazione dei programmi di elaborazione per *imaging* allo scopo di incrementare l'analisi d'immagine di fluorescenza;

Dr. **Gianni Facciotto** dell'Unità di Ricerca per le Produzioni Legnose Fuori Foresta di Casale Monferrato per la disponibilità mostrata nel reperimento delle talee di pioppo;

Dr. **Roberta Fantoni**, in qualità di Capo della Sezione Applicazioni Laser dell'Enea di Frascati, per la possibilità offerta di svolgere l'attività del dottorato nell'ambito della tematica dell'assegno di ricerca Enea (2006-2010).

## Sommario

|                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. CAPITOLO 1 .....                                                                                                | 7  |
| 1.1. Stress ossidativo e stato redox dei fotosistemi vegetali .....                                                | 7  |
| 1.2. L'apparato fotosintetico: struttura ed organizzazione dei fotosistemi nelle piante.....                       | 8  |
| 1.3. La fotochimica delle piante: attività della catena di trasporto fotosintetica.....                            | 11 |
| 1.4. Meccanismi di assorbimento e di dissipazione dell'energia luminosa.....                                       | 14 |
| 1.5. Decadimento radiativo: l'emissione di fluorescenza.....                                                       | 19 |
| 1.6. Misura della fluorescenza della clorofilla <i>a</i> e la tecnica ad impulsi modulati (PAM).....               | 22 |
| 1.7. I parametri fotochimici della curva di induzione .....                                                        | 25 |
| 1.8. Fluorimetro Imaging-PAM per l'analisi d'immagine della fluorescenza .....                                     | 33 |
| 1.9. L' <i>imaging</i> di fluorescenza della clorofilla <i>a</i> nello studio degli stress biotici e abiotici..... | 34 |
| 1.10. Obiettivi della ricerca .....                                                                                | 37 |
| 2. CAPITOLO 2 .....                                                                                                | 39 |
| 2.1. Interazione pianta-patogeno: alterazione dell'efficienza fotosintetica.....                                   | 39 |
| 2.2. Modificazione dei pigmenti fotosintetici .....                                                                | 40 |
| 2.3. Produzione di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....                                                             | 41 |
| 2.4. Interazione pianta-patogeno e l'emissione di fluorescenza della clorofilla .....                              | 42 |
| 2.5. MATERIALI E METODI.....                                                                                       | 46 |
| 2.6. RISULTATI .....                                                                                               | 51 |
| 2.6.1. Test di patogenicità .....                                                                                  | 51 |
| 2.6.2. Analisi della fluorescenza indotta della clorofilla <i>a</i> .....                                          | 52 |
| 2.6.3. Analisi dei pigmenti di piante inoculate su fusto.....                                                      | 77 |
| 2.6.4. Determinazione qualitativa di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> su foglie inoculate .....                       | 79 |
| 2.7. Discussioni e conclusioni .....                                                                               | 80 |

|                                                                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3. Capitolo 3.....                                                                                                                                           | 84  |
| 3.1. Esposizione ai metalli pesanti: valutazione della risposta fotochimica di piante<br>accumulatrici mediante l'analisi d'immagine della fluorescenza..... | 84  |
| 3.2. MATERIALI E METODI.....                                                                                                                                 | 89  |
| 3.3. RISULTATI .....                                                                                                                                         | 94  |
| 3.3.1. Esame del contenuto di metallo nei campioni .....                                                                                                     | 94  |
| 3.3.2. Valutazione dei parametri morfometrici .....                                                                                                          | 95  |
| 3.3.3. Analisi del contenuto dei pigmenti fotosintetici .....                                                                                                | 96  |
| 3.3.4. Analisi della fluorescenza emessa della clorofilla $a$ : .....                                                                                        | 97  |
| 3.4. DISCUSSIONI E CONCLUSIONI.....                                                                                                                          | 113 |
| 4. Bibliografia .....                                                                                                                                        | 117 |

# CAPITOLO 1

## 1.1. Stress ossidativo e stato redox dei fotosistemi vegetali

Anche negli organismi fotosintetici il danno derivante dalla presenza nell'ambiente di diversi fattori di stress, biotici o abiotici, è strettamente legato alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS, Reactive Oxygen Species), determinando quello che viene definito stress ossidativo (Mittler e Zilinskas 2004; Metraux e Durner 2004; Alonso et al 2001; Baier et al. 2005; Ranieri et al., 2005). Nel suo stato fondamentale l'ossigeno ( $O_2$ ) è relativamente poco pericoloso, ma è capace di dare origine a stati eccitati reattivi come radicali liberi e loro derivati. Tra questi l'anione superossido ( $O_2^-$ ), il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), il radicale idrossile ( $\cdot OH$ ) e l'ossigeno singoletto ( $^1O_2$ ) a loro volta danneggiano le strutture cellulari e le macromolecole e agiscono come molecole segnale per l'attivazione di risposte di difesa. La risposta antiossidante delle piante, nota come risposta ipersensibile (HR), generata dall'accumulo di queste ROS nel citoplasma (Wohlgemuth et al., 2002) attiva e intensifica i relativi sistemi enzimatici e vie metaboliche di difesa, di trasduzione del segnale e di riparazione (Mittler R, 2002).

La rete di segnali che si attiva in risposta allo stress ossidativo (de Bruxelles et al 2001) si concretizza, quindi, in una strategia a due livelli: un'azione di contenimento, per limitare e bloccare quanto più velocemente ed efficacemente possibile la diffusione del danno (risposta locale) ed una propriamente di difesa, per avvisare cellule lontane dal punto di crisi e proteggere i tessuti mediante la produzione di specifiche sostanze (risposta sistemica) (Leon et al 2001).

Nei casi in cui l'accumulo delle ROS supera la capacità del sistema antiossidante di rimuoverle, sopraggiunge il danno ossidativo. Tra i primi effetti dello stress ossidativo la perossidazione dei lipidi genera variazioni nella composizione degli acidi grassi che influenzano struttura e proprietà funzionali delle membrane, inattivando le proteine ad esse associate e aumentando la permeabilità delle membrane stesse. Nelle piante, il danno perossidativo si manifesta soprattutto nell'apparato fotosintetico e in particolare nei tilacoidi, sistema di membrane dei cloroplasti, contenenti le strutture della catena fotosintetica di trasporto degli elettroni ( $e^-$ ).

Il danno perossidativo provoca inoltre la distruzione dei pigmenti e l'inattivazione degli enzimi, in particolare Rubisco, coinvolti nelle reazioni di fissazione della  $CO_2$ , (Van Assche and Clijsters, 1986; Monnet et al., 2001; Alonso et al 2001 ).

La continua produzione di  $O_2$  nei fotosistemi ed il trasferimento di elettroni lungo la catena fotosintetica del trasporto elettronico rendono i cloroplasti la principale fonte di ROS, le quali devono essere prontamente allontanate o eliminate. Infatti, l'attività dei fotosistemi, così come i rapporti tra specie ossidate e specie ridotte dei vari trasportatori della catena, devono essere in costante equilibrio per un corretto e ottimale funzionamento dell'apparato fotosintetico. In situazioni di squilibrio si azionano, pertanto, sistemi che tendono a riequilibrare le attività dei due fotosistemi (Anderson et al., 1998; Angelopoulos et al., 1996; Melis, 1999).

Questi meccanismi possono essere sia a breve termine, come la transizione del complesso antenna LHCII (light-harvesting complex II) da un fotosistema all'altro, che a lungo termine, come l'aumento della sintesi di nuove proteine dei centri di reazione, per aggiustarne il rapporto stechiometrico (Allen, 2003; Horton et al., 2005). Entrambi sono mediati dallo stato redox dei trasportatori di elettroni. La sintesi o la degradazione di proteine, centrali nel funzionamento dei complessi multiproteici di membrana (Baena-González, 2001), è prontamente regolata dai cambiamenti ambientali attraverso variazioni dello stato redox di molecole collegate alla catena di trasporto fotosintetica.

Il conseguente cambiamento nello stato redox dei diversi trasportatori può portare alla riduzione o ossidazione di proteine e molecole al di fuori della catena diffondendo lo squilibrio a tutto il cloroplasto e successivamente a tutta la cellula.

Lo stato redox viene, quindi, ad essere un fondamentale indicatore della generale attività dei cloroplasti (Aro and Ohad, 2003). Le piante sottoposte a stress vanno incontro ad un eccesso di potere riducente, dovuto alla limitazione di assimilazione di  $CO_2$ , che causa la sovra-riduzione della catena di trasporto elettronica della fotosintesi ed il ri-direzionamento dell'energia fotonica in processi che favoriscono la produzione di ROS. In una condizione di stress, infatti, l'apparato fotosintetico non è in grado di utilizzare tutta l'energia derivante dalla luce per cui il trasporto elettronico è rallentato, le clorofille eccitate allo stato di singoletto possono spontaneamente decadere allo stato di tripletto e di qui interagire con l'ossigeno molecolare generando specie altamente reattive in grado di portare alla rapida distruzione dei fotosistemi.

## **1.2. L'apparato fotosintetico: struttura ed organizzazione dei fotosistemi nelle piante**

I fotosistemi agiscono come piccoli condensatori elettrici, accumulando energia mediante la separazione di carica fotochimica fra donatore e accettore primario di elettroni, consentendo poi la stabilizzazione delle cariche positive e negative attraverso reazioni redox successive di trasporto di elettroni sulle due facce separate della membrana tilacoidale. Tale processo fotochimico è reso

possibile proprio grazie alla peculiare struttura molecolare del fotosistema I (PSI) e del fotosistema II (PSII), complessi attivi disposti in una sequenza tale da svolgere funzioni distinte e complementari, ognuno articolato in: complesso-antenna, centro di reazione e serie di trasportatori di elettroni (Figura 1).

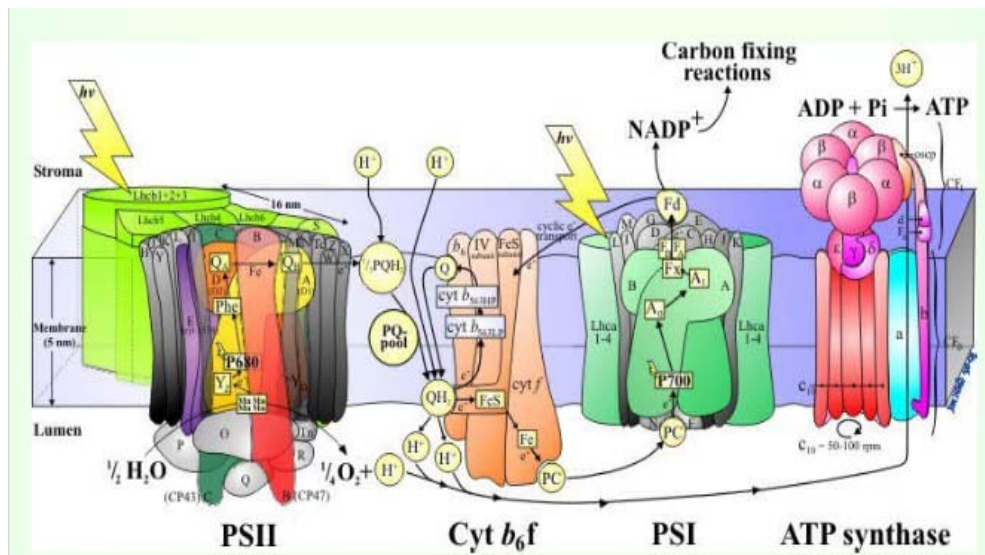


**Figura 1: Modello strutturale dei fotosistemi e della catena di trasporto fotosintetica**

Per catturare l'energia radiante e renderne altamente efficiente il trasferimento, i pigmenti fotosintetici di ciascun fotosistema sono legati a componenti proteiche definite CAB (Chlorophyll a/b-binding protein) che formano così dei complessi, di cui il più abbondante è il complesso per la raccolta della luce del PSII (LHCII).

Strutturalmente si presenta come un trimero mobile composto da polipeptidi di 25-28kDa che contengono clorofilla a (Chla) e clorofilla b (Chlb) in rapporto 1,4:1. Oltre alle clorofille già citate, sono presenti anche molecole di carotenoidi e alcuni lipidi essenziali per l'integrità strutturale all'interno delle membrane tilacoideali. La distanza e l'orientamento delle molecole di clorofilla all'interno dell' LHCII - le Chla più vicine distano ad esempio 12Å - creano le condizioni ideali per un trasferimento energetico estremamente rapido, dell'ordine dei picosecondi. Le molecole di Chlb, che assorbono a lunghezze d'onda minori rispetto alle chla, risultano localizzate all'estremità di ogni monomero, mentre quelle di Chla al centro (Maffei, 1998). Poiché la principale funzione dei complessi LHCII è trasferire energia ai centri di reazione e dal momento che questo avviene per effetto Förster (in cui la velocità di trasferimento diminuisce in funzione della sesta potenza della distanza molecolare) quindi per risonanza induttiva e non per mezzo di trasportatori intermedi, è indispensabile che alcuni pigmenti siano localizzati alla periferia del complesso, formando così l'antenna "esterna". Sebbene LHCII sia il complesso più abbondante sono presenti anche altri

complessi antenna contenenti Chl a e b. Tra questi meglio noti sono i complessi CP24, CP26 e CP29, la cui sigla indica la presenza di un complesso proteina-clorofilla (CP) e la sua massa molecolare. Strutturalmente sono molto simili a LHCII, ma sono più saldamente legati al centro di reazione del PSII, con un rapporto Chl a/b 3:1. Il ruolo di questi complessi antenna minori, denominati antenne “*intermedie*”, è probabilmente sia quello di mediare il trasferimento di energia dal complesso LHCII ai centri di reazione, ma anche di calibrare le dimensioni dell’antenna in risposta alle condizioni di luce, dissociandosi e associandosi e cambiando inoltre l’efficienza del trasferimento di energia attraverso il ciclo delle xantofille (Crimi et al., 2001).

Infine, associate al centro di reazione ci sono altri due grossi polipeptidi trans-membrana che formano il “core-antenna”, CP47 e CP43, definiti anche antenne “*interne*”, le quali insieme al centro di reazione legano circa 40 molecole di chl a. Una delle caratteristiche peculiari della CP47 è la presenza di un lungo anello di amminoacidi che si estende nella parte luminale del tilacoide e che è in relazione con la proteina estrinseca da 33kDa del complesso per lo sviluppo dell’ossigeno (OEC). Per quel che riguarda i pigmenti ciascuna proteina lega 20-25 molecole di clorofilla ed il principale carotenoide è il  $\beta$ -carotene (Maffei, 1998).

L’eccitazione che arriva al centro di reazione o “core” del PSII viene intrappolata eccitando una forma di Chl a che assorbe a 680 nm, definita P680, o donatore primario di elettroni ( $e^-$ ) del PSII. L’attività catalitica del centro di reazione del PSII è legata alla presenza di alcune proteine, tra cui i polipeptidi integrali della membrana D1 e D2 che rappresentano il cuore del sistema fotochimico del PSII (Melis, 1999). Strutturalmente simili tra loro, queste proteine si uniscono formando l’eterodimero D1D2 che si lega a molti cofattori, tra i quali lo stesso P680, la feofitina (Pheo)- una molecola di Chl a priva dell’atomo di Mg- e i plastochinoni  $Q_A$  e  $Q_B$ . Integrato nelle membrane tilacoidali e associato a D1D2, il citocromo b559 (cyt b 559), formato da due peptidi con due gruppi eme a differente potenziale, permette il corretto assemblaggio e funzionamento delle proteine del centro di reazione (Figura 1).

Strutturalmente simile al PSII, il PSI è anch’esso formato da un complesso antenna (LHCI), ma a differenza dell’ LHCII che contiene il 40-50% dei pigmenti tilacoidali, l’LHCI è una componente minore, in grado di legare solo il 5-10% di pigmenti presenti. Il complesso, inoltre, presenta un rapporto Chl a/b maggiore di 3,5 ed una fluorescenza di emissione a lunghezze d’onda maggiore rispetto all’LHCII. Molto più complessa è la struttura del centro di reazione del PSI, di cui finora sono stati caratterizzati 13 polipeptidi. Alcuni al pari dei polipeptidi dell’LHCI hanno una disposizione trans-membrana, anche se delle parti possono estendersi nello stroma o nel lume tilacoidale. Tra questi le proteine Fe-S con peso molecolare più elevato (83kDa) PsaA e PsaB sono

indispensabili per la formazione di centri di reazione eterodimerici funzionali. Esse legano il donatore primario di  $e^-$  formato da una Chl<sub>a</sub> dimerica che assorbe a 700 nm (P700); il suo accettore primario, una Chl monomerica (A<sub>0</sub>); 90 Chl<sub>a</sub> e 12 molecole di  $\beta$ -carotene (antenna interna) e due molecole di fillochinone (vitamina K<sub>1</sub>), accettore secondario (A<sub>1</sub>). È inoltre presente un singolo centro ferro-zolfo Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>, noto come Fx, posizionato a ponte tra i due polipeptidi, che costituisce l'accettore (A<sub>2</sub>). Oltre alle proteine costituenti il *core* del PSI ci sono altri polipeptidi che legano clorofille, stabilizzano il PSI ed interagiscono con proteine redox, come la plastocianina (PC), la ferredossina (Fd) e la ferredossina-NADP<sup>+</sup> riduttasi (FNR). In particolare, Psa C, è una proteina non integrale con due centri Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> indicati come F<sub>A</sub> e F<sub>B</sub>; Psa D e PsaF agganciano rispettivamente la Fd sul lato stromatico e la PC sul lato luminale (Figura 1).

Oltre alle proteine PC e Fd, per il completo funzionamento dei meccanismi di separazione di carica e di trasferimento di elettroni tra PSII e PSI è fondamentale la presenza di un altro importante cofattore redox, quale il complesso del citocromo b<sub>6</sub>-f (cyt<sub>b6</sub>f). Questo unisce i due fotosistemi ed è equamente distribuito, essendo presente sia nelle lamelle dei grana, dove è prevalentemente localizzato il PSII, sia nelle lamelle stromatiche in cui è localizzato quasi esclusivamente il PSI (Figura 1).

### **1.3. La fotochimica delle piante: attività della catena di trasporto fotosintetica**

Rendendo così possibile la cattura di energia solare, questa complessa struttura dell'apparato fotosintetico fa funzionare la catena di trasporto degli elettroni prodotti nei centri di reazione attraverso una serie di reazioni redox tra i trasportatori. L'energia solare nei fotosistemi viene quindi utilizzata per compiere un salto di potenziale ossido-riduttivo e formare una molecola di NADPH. Accoppiata a questa reazione vi è la produzione di ATP tramite il complesso ATP-sintasi, che sfrutta il gradiente elettrochimico formato dal trasferimento di elettroni. Durante il passaggio di  $e^-$  attraverso il complesso cyt b<sub>6</sub>-f i protoni (H<sup>+</sup>) vengono spinti dallo stroma allo spazio tilacoidale, generando così un gradiente elettrochimico protonico, costituito da una differenza di pH ( $\Delta$ pH) e da una differenza di cariche, che genera un potenziale di membrana ( $\Delta$ Ψ). NADPH e ATP sono i prodotti fotochimici della fase luminosa della fotosintesi. La variazione del potenziale redox che accompagna il trasferimento elettronico nella catena di trasporto fotosintetica viene rappresentata nel cosiddetto schema Z, in cui i diversi componenti molecolari sono collocati a seconda del loro potenziale del punto medio (Hill and Bendall, 1960).

Come due trasduttori in serie PSI e PSII assorbono fotoni e trasferiscono elettroni a valle della catena di trasporto fino ad arrivare alla riduzione del NADP. Gli elettroni persi dai centri di

reazione  $P680^+$  e  $P700^+$  in seguito all'assorbimento dei fotoni devono essere rimpiazzati da nuovi elettroni per garantire il funzionamento continuo della catena di trasporto e quindi della fotosintesi. Il PSII recupera dalla scissione o fotolisi dell'acqua l'elettrone perso, attraverso un sistema di interfase molto sofisticato in grado di ossidare l'acqua e produrre ossigeno, senza che si formino intermedi tossici quali  $O_2^-$  e  $O_2^{2-}$ . Tale sistema è il complesso che evolve ossigeno (OEC), strettamente associato al PSII sul lato lumenale della membrana tilacoidale è costituito da tre proteine estrinseche con diverso peso molecolare O (33 kDa), P (23 kDa) e Q (17 kDa) detto anche centro al manganese, perché legano 4 atomi di Mn, e ioni calcio ( $Ca^{2+}$ ) e cloro ( $Cl^-$ ). Così strutturato è in grado di legare 2 atomi di O e mantenerli in posizione molto vicina mentre vengono estratti  $4e^-$ . I  $4e^-$  sottratti all'acqua non passano direttamente al  $P680^+$ , che può accettare un solo  $e^-$  per volta. OEC quindi trasferisce gli  $e^-$  uno alla volta riducendo il donatore di elettroni del  $P680^+$ , costituito dal residuo di tirosina Tyr o Z presente nella proteina D1 del centro di reazione, questo processo con il quale il centro polinucleare di Mn ossida l' $H_2O$  sviluppando  $O_2$  avviene attraverso 5 stadi redox indicati come ciclo  $S_0$ - $S_4$  di Kock ((Maffei, 1998).

Il PSI, invece, che funziona come una sorta di PC-Fd ossido-reduttasi, rimpiazza l'elettrone perso con quello proveniente dal PSII, da cui arriva grazie all'azione di una serie di trasportatori redox di membrana. Infatti il PSII, attraverso l'accettore primario Pheo trasferisce gli  $e^-$  dal  $P680^+$  a  $Q_A$ , il primo dei due plastochinoni legato alla proteina D2, che lo cede al secondo,  $Q_B$ , meno fortemente legato alla proteina D1.

La lettera Q per indicare i chinoni sta a significare *quencher*, cioè tampone, in relazione alla sua azione di smorzamento della fluorescenza variabile. Se un composto con alta affinità compete con i chinoni per il sito di legame esso impedisce il flusso regolare di elettroni creando un ingorgo. In questo caso la clorofilla eccitata non potendo trasferire l'elettrone si de-eccita emettendo fluorescenza. Alcuni erbicidi e diserbanti, ad esempio, agiscono da inibitori del flusso di  $e^-$ . Tra questi il 3(3,4-diclorofenil)1,1-dimetil-urea (DCMU) compete per il sito di legame del  $Q_B$  in una regione del polipeptide D1, mentre l' $N,N'$ -dimetil-4,4'-bipiridinio dicloruro (Paraquat) blocca il trasferimento a livello delle proteine ferro-zolfo PsaC e ferredoxina, formando specie reattive dell'ossigeno (Maffei, 1998).

I chinoni sono molecole liposolubili in cui il trasferimento elettronico permette la formazione di due intermedi, semichinone e idrochinone. Quindi,  $Q_B$  acquistati  $2e^-$  e  $2H^+$  in due cicli di assorbimento di fotoni ( $PQ_BH_2$ ) si stacca dal PSII e diffonde attraverso la membrana, spostandosi dal lato stromatico al lato lumenale in prossimità del sito catalitico del complesso cyt  $b_6-f$ , attivandone così il ciclo.

Il ciclo catalitico del complesso è descritto da un modello che prende il nome di "ciclo Q", che prevede l'accoppiamento in serie di due *redox loops*. Il meccanismo implica che il complesso possa realizzare simultaneamente l'ossidazione e la riduzione di chinoni in due siti distinti della proteina, Qo e Qi, e localizzati sui due lati opposti della membrana.

La seconda funzione essenziale del complesso citocromo  $b_6-f$  è la trasduzione del segnale redox che deriva dall'attività in serie dei due fotosistemi e dal loro diverso spettro di assorbimento regolandone la distribuzione dell'eccitazione luminosa. La differente composizione in pigmenti dei due fotosistemi, infatti, determina lo schema di trasporto elettronico finora descritto, in cui la fotochimica del PSII è attivata dalla luce rossa assorbita dal P680, mentre la luce rossa-lontana assorbita dal P700 attiva la fotochimica del PSI. Per la massima efficienza fotosintetica è indispensabile quindi che i due fotosistemi cooperino, dal momento che la loro attività è collegata attraverso il flusso di elettroni (Maffei, 1998).

Se il PSI assorbe meno luce del PSII, non ci sarà ossidazione dei trasportatori a monte, quelli dal PSII al PSI, che giungeranno a saturazione e saranno quindi in maggioranza ridotti. Gli elettroni, quindi, non riusciranno a fluire liberamente dal PSII quando questo viene eccitato, portando ad una minore efficienza della fotosintesi. Se invece il PSI assorbe più luce del PSII si avrà l'effetto opposto: non arriveranno abbastanza elettroni dal PSII per rimpiazzare quelli persi dal PSI quando viene eccitato. I trasportatori a monte del PSI risulteranno completamente ossidati mentre quelli a valle, ferridossina e tioredossina (Trx), saranno per la maggior parte ridotti.

Per un corretto e ottimale funzionamento della fotosintesi, quindi, le attività dei due fotosistemi e i rapporti tra specie ossidata e specie ridotta dei vari trasportatori della catena, devono essere in costante equilibrio. In situazioni di squilibrio si azionano, pertanto, sistemi che tendono a riequilibrare le attività dei due fotosistemi (Allen, 1992).

È noto infatti che l'illuminazione dell'apparato fotosintetico con una luce "sbilanciata" a favore di uno dei due fotosistemi determina lo spostamento di parte delle proteine antenna LHCII dal PSII al PSI e viceversa (Horton et al., 2005). A questo fenomeno è dato il nome di transizioni di stato. La funzione fisiologica principale delle transizioni di stato è il bilanciamento delle capacità di assorbimento dei due fotosistemi, e quindi l'ottimizzazione dell'utilizzazione fotochimica della luce incidente. Lo stato di transizione di LHCII ed il controllo del turnover delle proteine del centro di reazione del PSII sono entrambi controllati dalla presenza di gruppi fosfato su particolari proteine del complesso (Aro and Ohad, 2003).

La fosforilazione delle proteine del centro di reazione del PSII è responsabile della loro stabilità. Infatti, in situazioni di elevata luminosità le proteine del centro di reazione vengono facilmente

danneggiate sia dalla luce incidente sia dalle specie reattive dell'ossigeno, all'interno del complesso che evolve ossigeno, portando al fenomeno della foto-inibizione. Perché vengano riparate o rimpiazzate il fotosistema deve migrare dai grana, dove si trova, alle lamelle stromali dei tilacoidi, dove le proteine vengono gradualmente de-fosforilate rendendo così possibile la riparazione del fotosistema (Baena-González et al., 1999).

Inoltre, al fine di prevenire il fenomeno della foto-inibizione in condizioni di stress un modo alternativo di produrre ATP è rappresentato dal trasferimento ciclico degli  $e^-$ . In tal modo si mantengono i valori di pH del lume tilacoidale sufficientemente bassi da permettere la dissipazione dell'energia. Il meccanismo proposto, e non ancora del tutto chiarito, prevede l'intervento della Fd, che ridotta dal PSI, cede i propri elettroni al PQ. La Fd, quindi, riduce il semichinone legato al complesso cyt  $b_6-f$  tramite l'enzima Fd-PQ reduttasi, il plastochinolo così prodotto subisce il ciclo Q attorno al complesso, generando un  $\Delta pH$ . In questo modo non si forma NADPH, il PSII non funziona, quindi non c'è sviluppo di ossigeno, ma si crea un gradiente elettrochimico per la sintesi di ATP.

Infine, nel trasporto di elettroni non ciclico, la Fd può fornire gli elettroni necessari anche alla riduzione della Trx attraverso l'azione dell'enzima Fd-Trx ossido reduttasi (FTR), coinvolta nel ciclo di Calvin. Quest'ultima, inoltre, sembra ricoprire un ruolo sempre più rilevante nel controllo esercitato dallo stato redox sull'intero metabolismo cellulare. Infatti la Trx ridotta, a sua volta, riduce i ponti disolfuro dell'enzima, regolandolo. In tal modo gli enzimi del ciclo di Calvin sottoposti a questa regolazione vengono attivati alla luce e disattivati al buio, legando le reazioni della fase luminosa alla fissazione della  $CO_2$  e assicurando che la sintesi dei carboidrati proceda alla luce (Maffei, 1998).

#### **1.4. Meccanismi di assorbimento e di dissipazione dell'energia luminosa**

Come prima tappa nel processo fotochimico, l'assorbimento della luce è un fenomeno che riguarda l'attivazione di uno o più elettroni periferici dei doppi legami -cromofori- coniugati presenti nei pigmenti (Taiz & Zeiger, 2002). Un doppio legame isolato assorbe radiazioni nella zona dell'ultravioletto, se viene coniugato con altri doppi legami, l'assorbimento si sposta nel campo del visibile.

La struttura chimica dei pigmenti fotosintetici contiene un elevato numero di doppi legami coniugati. In particolare, una molecola di clorofilla è caratterizzata da un "nucleo porfirinico" formato da quattro anelli pirrolici, un atomo di magnesio (Mg) e numerosi doppi legami coniugati, responsabili dell'assorbimento di energia luminosa nel rosso. Oltre al "nucleo porfirinico", la molecola presenta

una lunga catena idrocarburica, detta fitolo, che ne permette l'ancoraggio allo strato lipidico della membrana dei tilacoidi. I carotenoidi, principalmente  $\beta$ -carotene e xantofille, sono in grado di assorbire una banda di radiazioni più ampia nella zona del visibile (blu-violetto), per cui riescono ad utilizzare frequenze non assorbite dalle clorofille. Undici doppi legami coniugati, presenti nel  $\beta$ -carotene, ad esempio, ne determinano l'assorbimento a 450 nm.

L'effetto relativo delle varie lunghezze d'onda ( $\lambda$ ) sulla prima fase della fotosintesi è deducibile dallo "spettro d'azione fotosintetico", un diagramma che mostra un andamento parallelo allo spettro d'assorbimento della clorofilla, con piccole differenze. Infatti le bande di frequenze efficaci nel promuovere la fotosintesi sono più ampie di quelle assorbite dalla sola clorofilla, proprio per la presenza dei pigmenti accessori, in grado di assorbire luce in zone diverse dello spettro e di trasferire, poi, la loro energia di attivazione alla clorofilla (Figura 2)

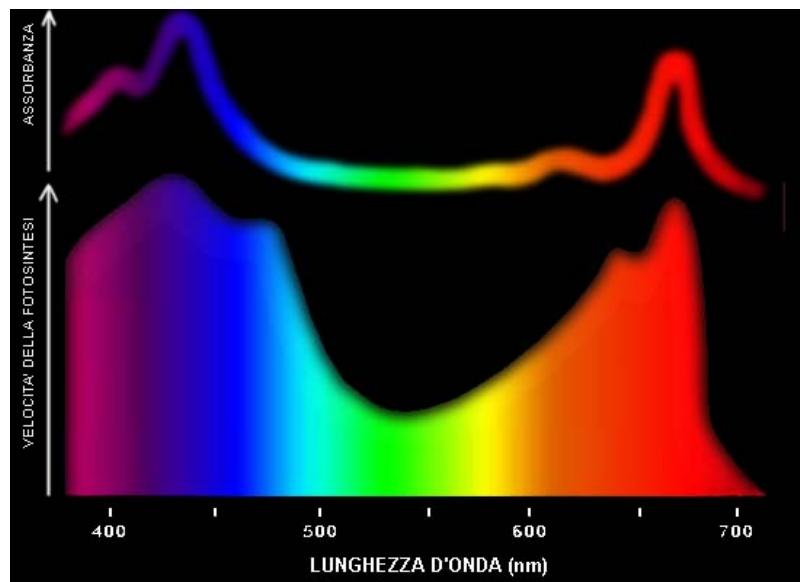


Figura 2: Spettro di assorbimento della clorofilla *a* e spettro d'azione della fotosintesi

In generale, quando un fotone di frequenza appropriata colpisce una molecola, gli elettroni dei doppi legami passano da uno stato fondamentale  $\pi$  ad un livello energetico più alto o stato *eccitato di singoletto*  $\pi^*$ . Gli stati elettronici eccitati possono evolvere con diversi meccanismi. Dopo aver assorbito un fotone  $h\nu$  la molecola decade allo stato iniziale, e il decadimento può avvenire in due modi (Figura 3).

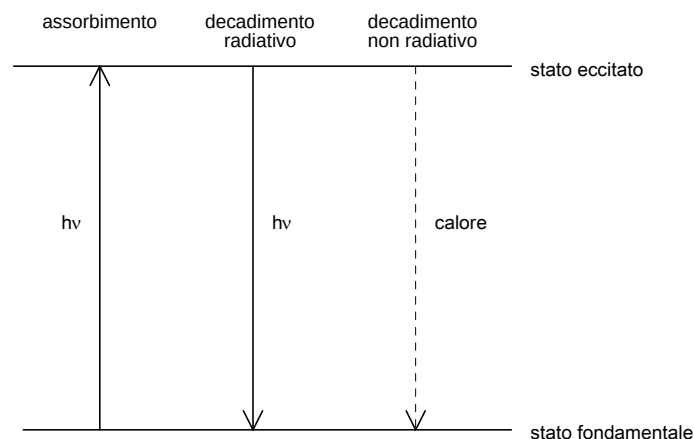


**Figura 3: Meccanismi di decadimento dell'energia di eccitazione**

Il processo di decadimento *radiativo* consiste nell'emissione di un fotone e ritorno della molecola eccitata allo stato energetico fondamentale.

Invece nel decadimento *non radiativo* l'energia si trasferisce sulle vibrazioni rotazioni e traslazioni delle molecole circostanti, cioè sotto forma di calore.

Nel caso in cui la molecola sia eccitata ad un sottolivello vibrazionale superiore, può rilassarsi velocemente tramite decadimento non radiativo al livello vibrazionale più basso (*conversione interna*) e da questo può decadere radiativamente allo stato fondamentale, emettendo un fotone ad energia  $h\nu'$  minore di quella  $h\nu$  assorbita inizialmente. Questo fenomeno di emissione di luce, con tempo di vita medio dell'ordine dei nanosecondi, si chiama fluorescenza (Figura 4).

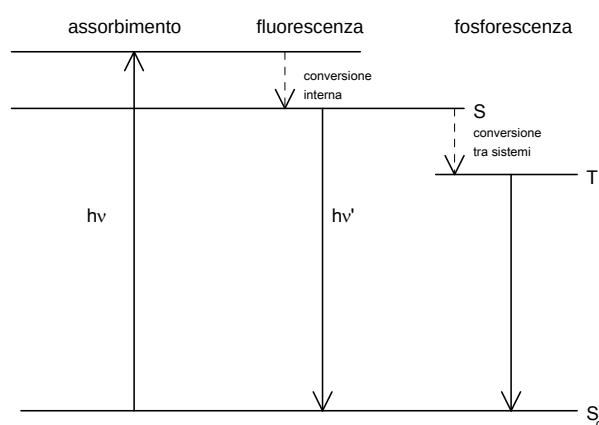


**Figura 4: Forme di emissione di energia degli stati eccitati**

Ciò avviene in stati elettronici con spin appaiati, o antiparalleli  $\uparrow\downarrow$  detti stati di singoletto S.

Molte molecole hanno stati elettronici eccitati con due spin elettronici spaiati o paralleli  $\uparrow\uparrow$ , detti stati di tripletto T. L'energia di questi stati è superiore a quella dello stato di singoletto fondamentale  $S_0$  e inferiore a quella dello stato di singoletto eccitato S. La molecola può decadere

non radiativamente con una lenta *conversione tra sistemi*  $S \rightarrow T$  e successivamente il tripletto si rilassa radiativamente allo stato fondamentale  $S_0$  emettendo un fotone ad energia minore di quella assorbita inizialmente. Questo decadimento, che segue un meccanismo distinto dalla fluorescenza, si chiama fosforescenza. La fluorescenza avviene con un tempo dell'ordine di nanosecondi, invece la fosforescenza, a causa della lentezza delle transizioni  $S \rightarrow T$  e  $T \rightarrow S$ , ha tempi che vanno dall'ordine dei millisecondi fino ai minuti.

In particolare, gli elettroni dei pigmenti antenna al primo stato di singoletto decadono radiativamente trasferendo energia di eccitazione per risonanza dipolo-dipolo (effetto Förster) oppure per risonanza di scambio (effetto Dexter), in tempi molto brevi, dell'ordine dei picosecondi. Il trasferimento per risonanza richiede pertanto che lo spettro di assorbimento del pigmento accettore dell'energia si sovrapponga almeno in parte allo spettro di emissione del pigmento donatore e che il pigmento accettore abbia un picco di assorbimento ad una  $\lambda$  maggiore di quello del pigmento donatore. La struttura e l'organizzazione dei due fotosistemi, come precedentemente descritto, rendono possibile tale processo fotochimico (Maffei, 1998). In tal modo l'energia assorbita dai pigmenti antenna viene progressivamente convogliata da pigmento a pigmento antenna verso il centro di reazione. Man mano che ci si avvicina al centro di reazione i pigmenti assorbono a  $\lambda$  maggiori, come il P680. L'energia dello stato di eccitazione che arriva al centro di reazione è minore di quella alla periferia del complesso antenna. Si genera un incanalamento, o effetto imbuto, delle eccitazioni del sistema antenna verso il centro di reazione (Figura 5) (Taiz & Zeiger, 2002).

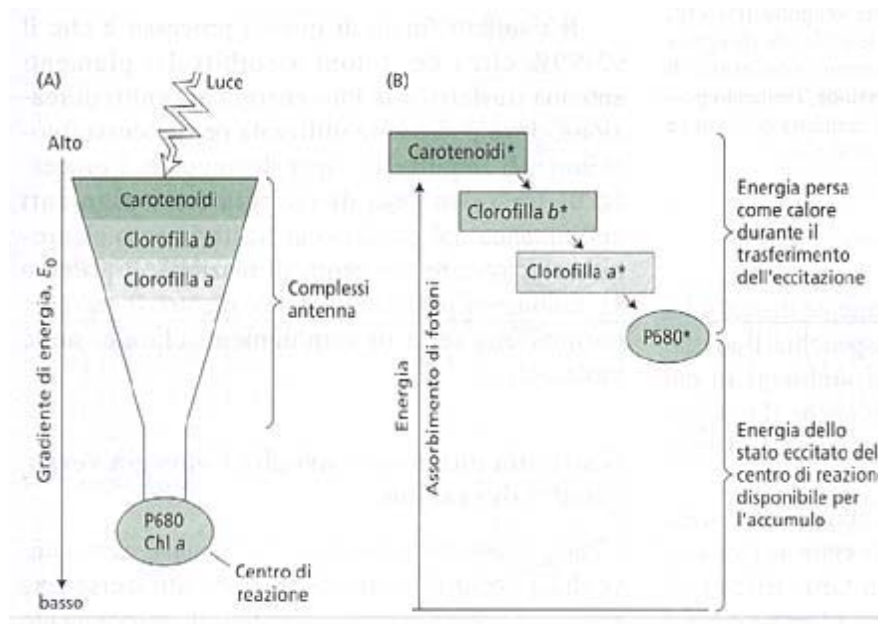


**Figura 5: Incanalamento delle eccitazioni dai complessi antenna ai centri di reazione**

Questo gradiente energetico assicura che il trasferimento di eccitazione verso il centro di reazione sia energeticamente favorevole e che venga sfavorito il trasferimento di eccitazione in direzione inversa, verso le parti periferiche dell'antenna. Durante questo trasferimento una parte di energia è naturalmente persa nell'ambiente sotto forma di calore, ma fondamentalmente tutta l'eccitazione assorbita dai complessi antenna viene donata al centro di reazione. Inoltre, l'energia dello stato  $S_1$  della clorofilla *a*, oltre a giungere al centro di reazione, decade anch'essa con emissione in fluorescenza o passaggio ad un ulteriore stadio molecolare noto come *tripletto*. Infatti, la clorofilla tripletto ( $^3\text{chl}$ ) de-eccitandosi può trasferire la sua energia all'ossigeno molecolare, formando ossigeno singoletto ( $^1\text{O}_2$ ), un radicale libero molto pericoloso. Ma i carotenoidi presenti nel complesso antenna possono de-eccitare  $^3\text{chl}$  e  $^1\text{O}_2$ , formando un carotenoide tripletto ( $^3\text{car}$ ), con tempo di vita medio di alcuni microsecondi, che costituisce una via di estinzione non pericolosa degli eccitoni (elettroni provenienti dalla ionizzazione operata dal fotone liberi di muoversi) del singoletto, che decade allo stato fondamentale con dissipazione termica (Breton *et al.*, 1979; Demmig-Adams, 1990).

L'importanza di queste molecole è legata al loro ruolo chiave nei processi di foto-protezione. Il meccanismo principale sotto indagine riguarda il *non-photochemical quenching* (NPQ) dell'energia di eccitazione. Questo meccanismo è dipendente dalla de-epossidazione della xantofilla violaxantina a zeaxantina. La localizzazione di questi pigmenti nelle subunità dei complessi antenna del PSII e PSI è di fondamentale importanza nello studio del meccanismo molecolare della foto-protezione. Le ricerche svolte negli anni precedenti hanno evidenziato la localizzazione di violaxantina legata nelle tre subunità minori del PS II CP29, CP26 e CP24 e di violaxantina associata debolmente nell'antenna maggiore LHCII. La zeaxantina è stata invece localizzata quasi esclusivamente legata alle antenne minori (Crimi *et al.*, 2001; Frank *et al.*, 2001 ).

Un'efficiente fotosintesi da parte delle piante nel loro ambiente naturale richiede, quindi, un uso ottimale dei fotoni assorbiti. Foglie di piante mature assorbono in genere più dell'80% della radiazione incidente fotosinteticamente attiva (PAR), e in condizioni ottimali utilizzano più del 90% dei fotoni assorbiti nelle reazioni fotochimiche primarie dei due fotosistemi (Taiz & Zeiger, 2002).

Le piante devono però proteggere il loro apparato fotosintetico dagli effetti potenzialmente dannosi della luce in eccesso. In pieno sole, l'assorbimento di fotoni può essere alcune volte maggiore di quello necessario per mantenere la fotosintesi potenziale massima. Quando condizioni ambientali sfavorevoli limitano il metabolismo fotosintetico, anche una quantità moderata di luce può diventare eccessiva e può causare reazioni foto-ossidative distruttive. La luce in eccesso causa l'attivazione dell'ossigeno molecolare (Ledford and Niyogi 2005), formando le ROS che possono

causare danni o da ultimo la morte cellulare. Per evitare un consistente accumulo di ROS le piante utilizzano un grande numero di meccanismi protettivi di dissipazione dell'energia e diversi sistemi antiossidanti (DemmigAdams and Adams 1996; Noctor and Foyer 1998; Asada 1999; Munekaga et al. 2004; Kanervo et al. 2005; Niyogi et al. 2005; Mullineaux and Rausch 2005).

Dal momento che la quantità di energia di eccitazione che può essere dissipata come fluorescenza è piuttosto piccola, al massimo 3 - 4% del totale, e l'emissione di fluorescenza compete con la de-eccitazione fotochimica e non-fotochimica delle molecole di clorofilla *a*, una variazione sia della fotochimica primaria che della dissipazione non-fotochimica dell'energia si riflette nel *quenching* o estinzione della fluorescenza.

### 1.5. Decadimento radiativo: l'emissione di fluorescenza

L'emissione di fluorescenza dai cloroplasti è attribuita prevalentemente alle molecole di clorofilla *a* nei complessi antenna e a quelle associate ai centri di reazione. Osservazioni sperimentali hanno infatti dimostrato che soluzioni di membrane tilacoidali contenenti i due fotosistemi separati, emettono fluorescenza a lunghezze d'onda caratteristiche (Boardman *et al.*, 1966). Inoltre lo spettro di emissione di fluorescenza, a temperatura ambiente per soluzioni di cloroplasti, presenta un massimo a 685 nm, mentre a temperature più basse appare una banda aggiuntiva di emissione con un massimo a 735 nm, che diventa prevalente ad una temperatura di 100 K (Figura 6) (Geacintov e Breton, 1981).

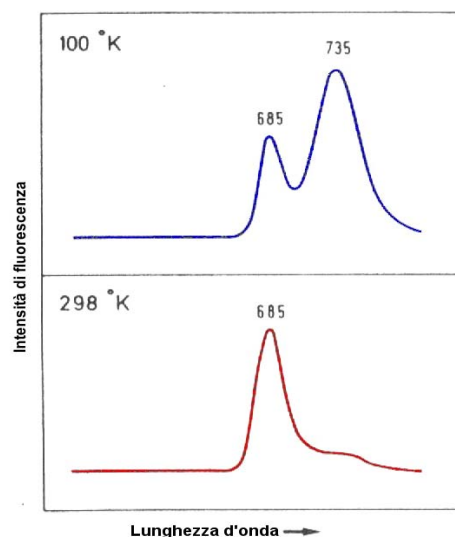


Figura 6: Spettro di emissione di fluorescenza dei cloroplasti a 100 K (-173°C) ed a 298 K (~25°C) (da Geacintov e Breton, 1981).

È così emerso che a temperatura ambiente, circa il 90% della fluorescenza origina dal PSII. I tempi di decadimento della fluorescenza delle bande a 685 e 735 nm sono differenti. La banda a 735 nm ha un tempo di decadimento 3-6 volte più lungo di quella a 685 nm. Questa differenza rende evidente l'eterogeneità dell'emissione di fluorescenza da parte dell'apparato fotosintetico. Sul perché la fluorescenza emessa a temperatura ambiente dal PSI sia così debole, e sul perché essa abbia una variabilità molto bassa, non ci sono teorie certe ma ipotesi (Govindjee, 1995; Boriscov, 2000). Per quanto riguarda la regolazione energetica fra i due fotosistemi, secondo il modello di Butler, gli eccitoni sono trasferiti dalle particelle LHC al PSII o in alternativa al PSI (Butler, 1978). Inoltre l'energia può fluire solo dal PSII al PSI, ma non nella direzione opposta, in quanto i livelli energetici delle molecole di clorofilla *a*, ubicate nel PSI, hanno valori di potenziale più bassi (di circa 0,1 eV) dei livelli energetici delle molecole di clorofilla *a* situate nel PSII e nei complessi antenna di raccolta della luce. La fluorescenza emessa alle lunghezze di 735 e 685 nm può essere utilizzata come prova della densità degli eccitoni rispettivamente nel PSI (solamente a temperature molto basse) e nel PSII o nei pigmenti antenna (a temperature più alte ed a temperatura ambiente) (Butler, 1978). La fluorescenza a 685 nm è collegata all'attività del centro di reazione PSII.

Una volta che il centro di reazione ha assorbito la luce ed il trasportatore di elettroni  $Q_A$  ha accettato un elettrone, non è possibile per questo accettarne un altro fino a quando non viene a sua volta ossidato da  $Q_B$ . Durante questo periodo, il centro di reazione viene detto “chiuso” (Maxell e Johnson, 2000). Al contrario, un centro che ha catturato un eccitone e ha inviato un elettrone verso il PSII riducendo  $Q_A$ , viene definito “aperto”. Quando una foglia viene trasferita alla luce, i centri di reazione, inizialmente aperti, sono rapidamente chiusi. L'energia che perviene sui centri di reazioni, non potendo essere utilizzata per la riduzione dei trasportatori, è dissipata attraverso altre vie, fra cui la fluorescenza. Questo porta ad un aumento della fluorescenza emessa. Tuttavia tale fase è transitoria, in quanto, dopo un periodo di tempo variabile, si assiste ad una diminuzione di fluorescenza fino ad un valore basale. Tali variazioni nella fluorescenza emessa sono conosciute come “effetto Kautsky” (Kautsky *et al.*, 1960). La scoperta del fenomeno della fluorescenza indotta (FI) si deve a Kautsky e Hirsch nel 1931 e per questo è comunemente definito “effetto Kautsky” (Figura 7). I due autori, con l'utilizzo di un filtro rosso, osservarono il fenomeno della fluorescenza su piante adattate al buio, e poi successivamente esposte alla luce blu. Kautsky e Hirsch inoltre riuscirono a correlare l'andamento temporale della fluorescenza con l'assimilazione della  $CO_2$ , precedentemente studiata da Otto Warburg (Kautsky e Hirsch, 1931).

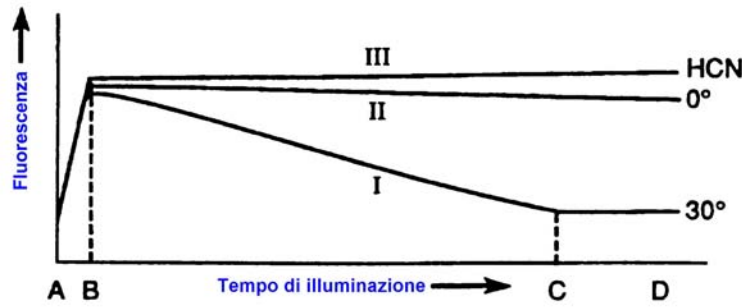


Figura 7: Grafico della differente intensità fluorescenza emessa dalla clorofilla *a* nelle foglie, rilevate a 30°C (I); a 0°C (II); dopo avvelenamento con HCN. (da Kautsky e Hirsch, 1931).

Dal punto di vista della fluorescenza, la fotosintesi rappresenta quindi un *quenching* -estinzione della fluorescenza- fotochimico (qP) e la dissipazione per via termica un *quenching* non-fotochimico (qN e NPQ) (Krause & Weis, 1991).

Il rendimento della fluorescenza della clorofilla *a* arriva al massimo al 4%. La fluorescenza è emessa principalmente dai complessi antenna del PSII. Il PSI contribuisce solo per circa il 5% nell'infrarosso vicino e per l'1-2% nel rosso. Un'altra notevole proprietà della fluorescenza della clorofilla *a in vivo* è che il suo rendimento è variabile e dipende dall'attività fotosintetica e dai meccanismi di regolazione attivi. Più precisamente, il rendimento della fluorescenza del PSII è variabile, mentre quello del PSI è costante.

Per una molecola isolata in fase liquida o gassosa, in presenza di un inibitore, il declino della concentrazione degli stati eccitati è data dall'equazione differenziale:

$$\frac{\partial [Chl^*]}{\partial t} = - (k_F + k_{nr} + k_q [Q]) [Chl^*] \quad (1.1)$$

Con  $k_F$  costante di disattivazione della fluorescenza,  $k_{nr}$  costante di disattivazione della via non radiativa,  $k_q$  costante di disattivazione di un inibitore e  $[Q]$  concentrazione dell'inibitore.

L'integrazione di questa equazione differenziale fornisce:

$$[Chl^*] = [Chl^*]_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (1.2)$$

con  $\tau = (k_F + k_{nr} + k_q [Q])^{-1}$ .

Queste relazioni permettono di esprimere l'efficienza quantica della fluorescenza, definita come il rapporto tra il numero di fotoni emessi come fluorescenza e il numero di fotoni assorbiti, utilizzando le costanti di velocità dei diversi meccanismi in gioco:

$$\Phi_F = \frac{F}{I_a} = \frac{k_F}{k_F + k_{nr} + k_q [Q]} \quad (1.3)$$

con  $\Phi_F$  l'efficienza della fluorescenza,  $F$  il numero di fotoni emessi come fluorescenza e  $I_a$  il numero di fotoni assorbiti. Indicando con  $\tau_0$  il tempo di vita dello stato eccitato, se la fluorescenza è il solo fenomeno di de-eccitazione, si ha  $\tau_0 = k_F^{-1}$ ;

$\Phi_F$  può essere quindi espresso unicamente in funzione dei tempi di vita  $\tau$  e  $\tau_0$ :

$$\Phi_F = \tau / \tau_0 \quad (1.4)$$

In una foglia, la clorofilla non è isolata, ma legata a proteine contenute in complessi molto organizzati. Tuttavia, sperimentalmente, la relazione tra  $\Phi_F$  e  $\tau$  è la stessa del caso di una molecola isolata. Ciò ha condotto al “Lake model”, che suppone eccitazioni mobili tra i centri di reazione e un processo di de-eccitazione bimolecolare (Kramer *et al.*, 2004).

Il *quenching* è, quindi, proporzionale alla concentrazione di centri di reazione aperti. In questo caso è possibile generalizzare l'equazione (1.3) alla Chl *a* dell'apparato fotosintetico:

$$\Phi_F = \frac{F}{I_a} = \frac{k_F}{k_F + k_D + k_T + k_P [Q_A]} \quad (1.5)$$

con  $k_D$  costante di disattivazione della dissipazione termica,  $k_T$  costante di disattivazione del trasferimento di eccitazione verso altre molecole,  $k_P$  costante di disattivazione della conversione fotochimica e  $[Q_A]$  concentrazione di  $Q_A$  ossidato.

### 1.6. Misura della fluorescenza della clorofilla *a* e la tecnica ad impulsi modulati (PAM)

La fluorescenza di una foglia può essere misurata esponendo la foglia ad una luce di  $\lambda$  definita e misurando la quantità di luce emessa a lunghezze d'onda maggiori. Ciò significa che tutte le analisi devono includere una forma di normalizzazione e una grande varietà di differenti parametri di fluorescenza devono essere calcolati (Genty *et al.* 1989; Schreiber *et al.* 1986; Bilger and Björkman 1990; Kramer *et al.*, 2004). Il problema della normalizzazione è stato superato con l'applicazione di un sistema di misurazione “modulato” (Quick e Horton, 1984), in cui la sorgente luminosa usata per misurare la fluorescenza è modulata - accesa e spenta ad alta frequenza- e il rilevatore è regolato per registrare solo la fluorescenza eccitata dalla luce di misura. La resa relativa di fluorescenza, quindi, può essere oggi misurata anche in presenza di illuminazione e soprattutto in presenza di luce piena in campo.

Variazioni di fluorescenza della clorofilla furono osservate nei primi anni '60, quando si scoprì che, in seguito al trasferimento di materiale fotosintetico dal buio alla luce, avveniva un aumento della

resa della fluorescenza della clorofilla in un periodo di circa 1 secondo (Govindjee, 1995). Questo aumento è stato successivamente spiegato come una conseguenza della riduzione degli accettori di elettroni nella catena di reazioni fotosintetiche, a valle del PSII, probabilmente a livello del plastochinone  $Q_A$ . Una volta che il PSII assorbe la luce ed il  $Q_A$  ha accettato un elettrone, esso non è più in grado di accettarne un altro, fino a quando non lo ha trasferito nel successivo trasportatore di elettroni  $Q_B$ . Quando una foglia è trasferita dal buio alla luce, i centri di reazione del PSII si chiudono progressivamente, ciò causa l'aumento della fluorescenza della clorofilla. In seguito a questo evento, tuttavia, il livello di fluorescenza, solitamente in un tempo di pochi minuti, comincia a diminuire nuovamente. Questo *quenching* di fluorescenza è spiegato con un aumento del tasso a cui gli elettroni sono trasportati fuori dal PSII o *photochemical quenching* ( $qP$ ) e allo stesso tempo, un aumento dell'efficienza con cui l'energia è convertita in calore o *non-photochemical quenching* ( $NPQ$ ).

In una tipica pianta, le variazioni dovute a questi due processi durano circa 15–20 min, prima che si raggiunga lo stato costante di fluorescenza ( $F_t$ ). Al fine di avere dati affidabili sull'efficienza fotosintetica di una pianta, è necessario essere in grado di distinguere i contributi dell'estinzione fotochimica e non-fotochimica. L'approccio più usato è quello di “spegnere” uno dei due processi, in particolar modo quello fotochimico, così che si possa stimare la fluorescenza in presenza solo dell'altro. In vitro, questo può essere ottenuto mediante l'aggiunta dell'erbicida DCMU, che inibisce il PSII e annulla completamente i processi fotochimici (Lazar, 1999).

Un altro metodo è quello di utilizzare la tecnica del “raddoppiamento della luce”, che permette l'annullamento dell'estinzione fotochimica (Quick e Horton, 1984). Con questo approccio, la pianta viene sottoposta a un flash di luce di breve durata e di alta intensità, il cui effetto è quello di chiudere temporaneamente tutti i centri di reazione del PSII. Il flash saturante è talmente breve da non influire significativamente sulla fotosintesi. Durante il flash, la fluorescenza raggiunge una fluorescenza massima ( $F_m$ ), il cui valore è equivalente a quello che si potrebbe ottenere in assenza di estinzione fotochimica. Il confronto di questo valore con  $F_t$  e con il valore di fluorescenza in assenza di luce attinica ( $F_o$ ) fornisce informazioni sull'efficienza dell'estinzione fotochimica e sull'efficienza del PSII (Schreiber, 2004).

L'efficienza di dissipazione del calore può variare a seconda di vari fattori interni ed esterni, che si riflettono come variazioni di  $F_m$ . Al contrario delle reazioni fotochimiche, però non è possibile inibire totalmente la dissipazione del calore e quindi non è possibile misurare la fluorescenza della clorofilla in assenza di estinzione non-fotochimica. Di conseguenza, le stime di estinzione non-fotochimica sono strettamente correlate ad un determinato punto adattato al buio (chiamato  $F_m$ ).

Per questa ragione, è necessario compiere esperimenti in modo tale da stimare tale punto di riferimento.

In Figura 8 è riportato lo schema della curva di induzione della fluorescenza. La misurazione della fluorescenza inizia accendendo la *measuring light* (ML), che dà una misura del minimo livello di fluorescenza ( $F_0$ ). Viene quindi applicato un flash di luce saturante (SP), che permette la misura di fluorescenza massima nello stato adattato al buio ( $F_m$ ). In seguito, si applica la luce attinica (AL) e, ad intervalli appropriati, si applicano altri flash di luce saturante (SP). Da ognuno di questi, può essere misurato un valore di  $F'_m$  (fluorescenza massima alla luce). Lo stato costante della fluorescenza immediatamente prima del flash è chiamato  $F_t$ . Dopo un flash, la rimozione della luce attinica, preferibilmente mentre si fornisce simultaneamente un luce nel rosso-lontano, permette la misurazione di  $F_0'$ .

Quindi, dalle formule precedenti risulta che l'efficienza della fluorescenza è minima  $F_0$ , quando  $k_p$  è minima, e ciò si verifica prima di qualsiasi eccitazione e separazione di carica quando tutti i centri di reazione sono aperti e  $Q_A$  ossidati. In questo caso, la conversione fotochimica è il processo dominante. Se tutti i chinoni  $Q_A$  sono ridotti -centri chiusi- non si possono verificare separazioni di carica stabili:  $k_p$  tende a 0 e l'efficienza della fluorescenza raggiunge il suo valore massimo, indicato come  $F_m$ .

Pertanto, la misura di  $F_0$  e di  $F_m$  in condizioni di luce modulata consente di calcolare l'efficienza fotochimica potenziale massima del PSII:

$$\Phi_p = \frac{k_p}{k_F + k_D + k_T + k_p} = \frac{F_m - F_0}{F_m} = \frac{F_v}{F_m} \quad (1.6)$$

La resa di fluorescenza nel tempo viene rappresentata graficamente nella curva di induzione buio-luce della fluorescenza (Figura 8), ottenuta con la tecnica nota come *Pulse Amplitude Modulated* (PAM), i cui parametri sono misurati mediante l'uso di fluorimetri ad ampiezza di impulso modulato, sviluppato per la prima volta da Schreiber nel 1986.

Si possono distinguere 5 differenti stati in corrispondenza di 5 punti, con diversi valori di rendimento in fluorescenza ed i coefficienti di estinzione (Figura 8). Dopo un periodo di buio di circa 20 minuti, sufficiente ad aprire i centri di reazione del PSII (RCII), si attiva una luce di misura (ML) a bassa intensità, che non è in grado di attivare il processo fotochimico, per cui  $qP=1$  e  $qN=0$ . In tali condizioni è possibile misurare  $F_0$ , fluorescenza dello stato di riferimento adattato al buio (stadio 1, Figura 8). L'applicazione di un impulso saturante (SP) chiude tutti gli RCII ed è possibile misurare  $F_m$ , essendo nullo il contributo dei quenching ( $qP=0$  e  $qN=0$ , stadio 2). Dopo che la fluorescenza è tornata al valore di  $F_0$ , viene attivata la luce attinica (AL) e si osserva un

nuovo aumento di fluorescenza che dopo un certo periodo di tempo diminuisce ( $1 > q_P > 0$  e  $1 > q_N > 0$ , stadio 3). Qui è possibile misurare  $F$  ovvero la fluorescenza residua prima della nuova eccitazione. Successivamente un nuovo impulso saturante viene applicato e si registra  $F'_m$ . L'impulso saturante, chiudendo tutti gli RCII, annulla il contributo di  $q_P$  ed è possibile misurare quello di  $q_N$  ( $q_P = 0$  e  $1 > q_N > 0$ , stadio 4). Infine viene spenta AL ed applicando un impulso di luce nel rosso lontano che “scarica” il PSII, si misura  $F'_0$  ( $q_P = 1$  e  $1 > q_N > 0$ , stadio 5).

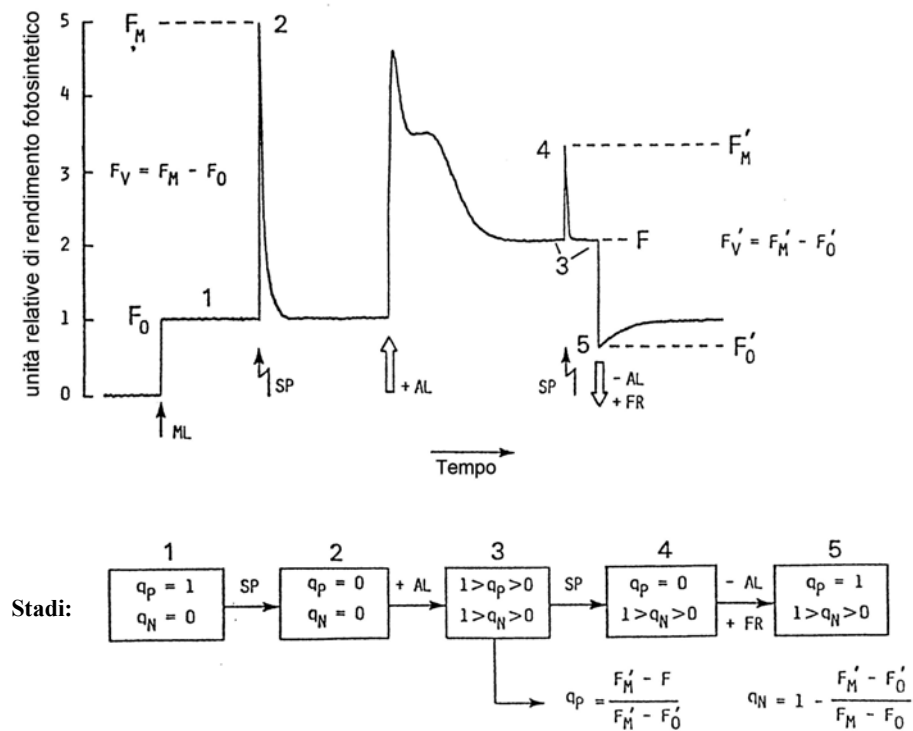


**Figura 8:** Curva di induzione di fluorescenza per foglie adattate al buio e principi di analisi di estinzione attraverso il metodo dell'impulso di saturazione (da van Kooten e Snel, 1990). Cinetica di emissione della fluorescenza clorofilliana. Viene accesa  $\uparrow ML$  e viene misurata  $F_0$ . L'applicazione di  $\uparrow SP$  permette di misurare  $F_m$ . Viene quindi applicata  $\uparrow AL$ . Dopo un certo periodo di tempo viene applicato  $\uparrow SP$  che permette di misurare  $F'_m$ . L'efficienza della fluorescenza appena prima di SP viene chiamata  $F_t$ . Spegnendo AL, in genere in presenza di luce rosso lontano FR è possibile infine calcolare  $F'_0$ .

ML = debole luce pulsata di misurazione ( $\lambda = 660 \text{ nm}$  e intensità  $= 6 \mu\text{mol} \text{ m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ ).

SP = impulso di luce saturante (caratterizzato da  $400 \text{ nm} < \lambda < 700 \text{ nm}$ , intensità  $\sim 10.000 \mu\text{mol} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , tempo di applicazione 0,5-2 s).

AL = luce attinica continua

FR = luce nel rosso lontano (con  $\lambda > 700 \text{ nm}$  e intensità  $6 \mu\text{mol} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). (da Schreiber et al., 1986;1998).

### 1.7. I parametri fotochimici della curva di induzione

La fluorescenza indotta espressa nel grafico di Fig. 8 passa, quindi, da un minimo ( $F_0$ ) ad un massimo ( $F_m$ ). L'intensità di fluorescenza variabile viene indicata con  $F_v$ :

$$F_v = F_m - F_0 \quad (1.7)$$

Il valore di  $F_0$  risulta come conseguenza della competizione fra trasferimento di energia all'RCII e l'emissione da questa stessa clorofilla nel suo stato eccitato. Questa perdita di energia sottoforma di fluorescenza avviene prima che l'eccitone arrivi sul RCII (Munday e Govindjee, 1969). Inoltre è stato ipotizzato che l'eccitone può arrivare alla molecola fotochimica P680 molte volte prima che avvenga la reazione fotochimica (Jennings *et al.*, 1996). Così  $F_0$  può anche riflettere la perdita dell'eccitazione durante tale processo. La mancata cattura degli eccitoni ed il trasferimento dell'energia al P680, così come la cattura degli eccitoni per processi fotochimici e gli altri processi di perdita energetica, sono una conseguenza dell'equilibrio di trasferimento degli eccitoni verso i complessi antenna del PSII e verso l'RCII (Laible *et al.*, 1994). Per questo motivo si ritiene che il valore non-zero di  $F_0$  è una conseguenza di tale equilibrio di trasferimento (Owens, 1996). Inoltre è anche possibile che non tutte le clorofille nel PSII siano funzionalmente connesse all'RCII. Così  $F_0$  può anche includere il contributo in fluorescenza di queste, generalmente definito  $F_n$  (Lavorel, 1972). Non è poi escluso che una parte di  $F_0$  provenga dagli RCII chiusi (Lazàr, 1999). Una misura diretta della resa quantica per la separazione della carica che avviene sulla membrana del tilacoide e dovuta all'attività di RCII dà valori prossimi ad 1. Invece il valore del parametro  $F_v/F_m$ , espressione della massima resa quantica della fotochimica del PSII, misurato in 44 differenti piante con apparati fotosintetici in condizioni ottimali, fornisce valori di circa 0.832 (Bjorkman e Demming, 1987). La differenza fra i due risultati è attribuita ad un incremento di  $F_0$  dovuto all'RCII inizialmente bloccato (o danneggiato). È stato infatti sperimentalmente provato che  $F_0$  proviene principalmente dal PSII, essendo il contributo del PSI all' $F_0$  di circa il 20% (Trissl *et al.*, 1993). È stato anche osservato che l'incremento di  $F_0$  in condizione di stress, quando  $F_m$  rimane costante, è probabilmente dovuto a una diminuzione del tasso complessivo di utilizzazione degli eccitoni per la fotochimica. Ciò è in accordo con il fatto che un leggero aumento di  $F_0$  è causato da un parziale abbassamento reversibile della resa quantica fotochimica del PSII, mentre un più alto incremento di  $F_0$  probabilmente si origina dalla disconnessione irreversibile dell'LHC del PSII (Briantais *et al.*, 1996). È generalmente accettato che la massima intensità della fluorescenza ( $F_m$ ) rende conto dello stato del PSII quando tutti i  $Q_A$  sono ridotti. Ciò si ottiene con un lampo breve di luce saturante di durata non inferiore a 200 ms. L'uso di impulsi troppo brevi di luce saturante nella determinazione di  $F_m$  dà luogo a valori non corretti del rapporto  $F_v/F_m$  (Neubauer e Schreiber, 1987). La massima resa quantica della fotochimica del PSII, può essere espressa come:

$$\Phi_P = \frac{(F_m - F_0)}{F_m} = \frac{F_v}{F_m} \quad (1.8)$$

La resa quantica fotochimica istantanea  $\Phi_P(t)$  del PSII (o Y(II)) al tempo  $t$  e con illuminazione attinica, può essere stimata come :

$$\Phi_P(t) = \frac{F'_m(t) - F(t)}{F'_m(t)} \quad (1.9)$$

dove  $F'_m(t)$  e  $F(t)$  indicano rispettivamente la massima fluorescenza ottenuta con un impulso di luce saturante al tempo  $t$  e la fluorescenza al tempo  $t$  ottenuta dall'illuminazione con luce attinica.

Per ottenere valori corretti del  $\Phi_P(t)$  è stato suggerito che l'intera espressione deve essere moltiplicata per un fattore correttivo  $C$ . L'omissione di tale fattore può portare ad una sottostima di  $\Phi_P(t)$  del 14% (Lavergne e Trissl, 1995).

La variazione della emissione di fluorescenza della clorofilla, deriva dal fatto che essa è complementare alle altre due possibili vie di de-eccitazione, i processi fotochimici e la dispersione di calore (Buschmann, 1999). A causa di questi due fenomeni viene estinta la massima fluorescenza potenzialmente resa e per tale motivo vengono distinti un "quenching fotochimico", dovuto alla conversione in energia fotochimica nei centri PSII, ed un "quenching non-fotochimico", dovuto alla perdita di energia nel sistema antenna. Per l'interpretazione delle variazioni di fluorescenza è essenziale conoscere i contributi relativi dei due quenching. Se ad esempio la variazione di fluorescenza diminuisce, due sono le possibilità: aumento della percentuale fotochimica o aumento della dispersione di calore. Queste due possibilità vengono distinte sperimentalmente tramite l'uso di diversi impulsi saturanti. Servendosi di un forte impulso di luce bianca, si può ridurre la catena del trasporto elettronico tra i due fotosistemi, in modo da bloccare gli accettori della carica fotochimica, causando una chiusura transitoria degli RCII. Durante l'impulso, definito per questo motivo saturante, il quenching di fluorescenza fotochimica diventa zero e tutto il quenching rimanente è non-fotochimico. È assunto che le variazioni nel quenching non-fotochimico siano troppo lente per diventare effettive nel breve arco di tempo dell'impulso saturante (circa 1 s) (Maxell e Johnson, 2000). Sulla base di queste considerazioni sono stati definiti i coefficienti di estinzione  $qP$ ,  $qN$  ed  $NPQ$  che possono essere determinati mediante misure di fluorescenza (Figura 8). Il parametro  $qP$ , viene calcolato come segue:

$$qP = \frac{F'_m - F}{F'_m - F'_0} \quad (1.10)$$

$qP$  assume valori compresi fra 1 e 0. Tale parametro è strettamente legato all'attività del PSII. Descritto per la prima volta da Schreiber (1986),  $qP$  fu proposto come indicatore dello stato redox di  $Q_A$  e quindi di centri PSII aperti, assumendo, in prima approssimazione, una relazione lineare tra resa di fluorescenza e percentuale di  $Q_A$ . Fornisce, quindi, una stima approssimativa dello stato di

riduzione di  $Q_A$  sotto illuminazione attinica, anche se non è linearmente collegato allo stato di riduzione dei plastochinoni (Krause e Jahns, 2003).

Il valore  $1-qP$  è frequentemente usato come misura della *excitation pressure*, ossia come pressione di eccitazione esercitata sul PSII dai sistemi di raccolta di luce (Wilson e Huner, 2000).

Il parametro NPQ viene espresso come:

$$NPQ = \frac{F_m}{F'_m} - 1 = \frac{F_m - F'_m}{F'_m} \quad (1.11)$$

NPQ può assumere valori che vanno da 0 ad  $\infty$  (nel caso limite,  $F'_m = 0$ ), anche se raramente supera valori di 4. Quindi facendo riferimento alla sua normalizzazione viene indicato come NPQ/4 con valori che vanno da 0 ad 1. Demming-Adam e collaboratori (1990) hanno messo in luce come la variazione di NPQ sia in relazione con il ciclo delle xantofille (Figura 9), uno dei maggiori meccanismi con il quale le piante si difendono dall'eccesso di energia luminosa.

L'assorbimento di luce da parte della clorofilla determina l'acidificazione del lume del tilacoide, dovuta all'instaurarsi di un gradiente protonico transmembrana (energizzazione della membrana o  $\Delta pH$ ). Normalmente questo  $\Delta pH$  viene dissipato attraverso la produzione di ATP. Quando l'energia assorbita supera la capacità fotosintetica della pianta, il gradiente di protoni aumenta e promuove lo sviluppo di *quenching* non fotochimico. NPQ può essere diviso in almeno tre diverse componenti sulla base della cinetica di rilassamento e della risposta a diversi inibitori (Tabella 1) (Horton and Hague 1988).

**Tabella 1: Riepilogo dei meccanismi di *quenching* non fotochimico (Muller et al. 2001).**

| <i>Processi di quenching non fotochimico</i> |                                                                                                                                                                                                                                                               |
|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Abbreviazione</i>                         | <i>Definizione</i>                                                                                                                                                                                                                                            |
| NPQ                                          | <i>quenching</i> non fotochimico; tutti i meccanismi, tranne la fotochimica, che diminuiscono l'efficienza della fluorescenza, diviso in qE, qT e qI sulla base della loro cinetica di rilassamento                                                           |
| qE                                           | <i>quenching</i> energetico; richiede l'instaurarsi di un gradiente protonico; si rilancia in tempi dell'ordine di secondi o minuti                                                                                                                           |
| qT                                           | cambiamento di stato; il complesso antenna principale si separa dal fotosistema II (PSII), riducendo quindi la quantità di energia di eccitazione nel PSII che può essere de-eccitata come fluorescenza; si rilancia in tempi dell'ordine di decine di minuti |
| qI                                           | <i>quenching</i> fotoinibitorio; questo <i>quenching</i> è causato dalla fotoinibizione e mostra una cinetica di rilassamento molto lenta, nell'ordine delle ore                                                                                              |

La componente principale e più rapida presente in alghe e piante è il *quenching* dipendente dal pH o energetico (qE). Una seconda componente, qT, si rilassa in qualche minuto ed è più importante

nelle alghe, e piuttosto trascurabile nella maggior parte delle piante, durante l'esposizione ad eccessi di energia luminosa. L'energizzazione della membrana attiva infine un altro meccanismo, la fotoinibizione (qI) della fotosintesi, che si rilassa in un tempo molto più lungo di qE. Il suo meccanismo non è stato completamente chiarito. L'assorbimento di luce solare in eccesso rispetto alla capacità di fissazione di CO<sub>2</sub> da parte della pianta causa l'instaurarsi di un  $\Delta$ pH nel tilacoide, generato dal trasporto di elettroni. La diminuzione del pH all'interno del lume del tilacoide è un segnale immediato di eccesso di energia luminosa che innesci un meccanismo di regolazione dell'assorbimento di luce (qE). Il controllo esercitato dal pH del lume permette l'induzione o l'inversione di qE in qualche secondo dal cambiamento dell'intensità luminosa. Il ruolo del  $\Delta$ pH in qE è stato oggetto di numerose ricerche negli ultimi anni. È stato dimostrato che una diminuzione del pH del lume induce qE attraverso la protonazione delle proteine del PSII e l'attivazione del ciclo delle xantofille. La protonazione dei complessi antenna proteina pigmento del PSII e l'attivazione del ciclo delle xantofille causano, a loro volta, un cambiamento conformazionale del complesso antenna (Holt et al. 2005; Muller et al. 2001; D'Ambrosio et al., 2008) che ha come conseguenza un aumento di dissipazione di energia per via termica.

Il ciclo delle xantofille consiste nella de-epossidazione reversibile del carotenoide violaxantina (V) in antheraxantina (A) e infine zeaxantina (Z) causata dall'acidificazione del lume del cloroplasto per eccesso di energia luminosa (Figura 9). Questa reazione è infatti catalizzata dall'enzima violaxantina de-epossidasi (VDE) che è attivato a pH bassi (intorno a 5) (Eskling et al. 1997). La reazione inversa è invece catalizzata dall'enzima zeaxantina epossidasi (ZE) che ha il suo *optimum* a pH intorno a 8.

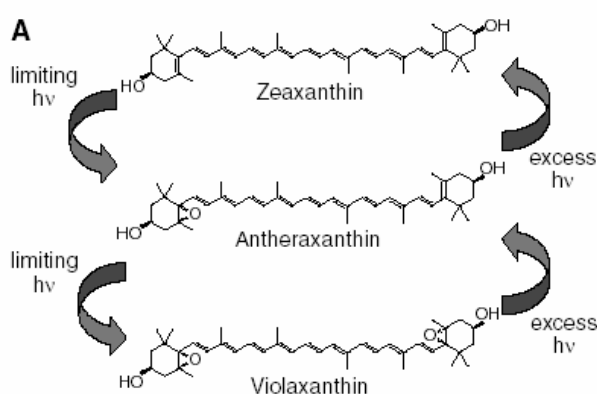


**Figura 9: Ciclo delle xantofille.** In caso di forte illuminazione, la violaxantina viene depossidata e convertita in zeaxantina. Questo meccanismo partecipa alla dissipazione di energia per via termica (da Demmig-Adams, 1990)

Il modello che descrive il modo in cui la de-epossidazione e la protonazione controllano la conformazione dei complessi antenna (Horton et al. 2005) è rappresentato in Figura 10.

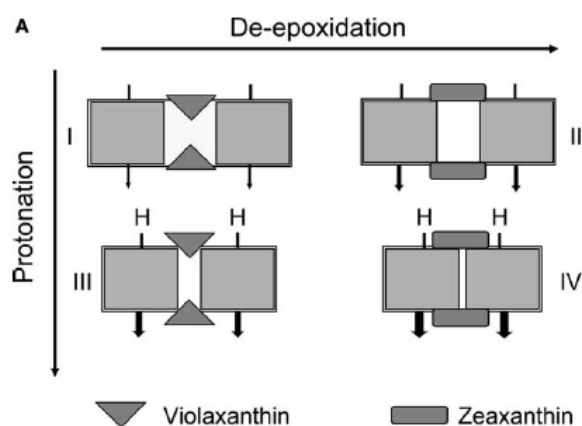


**Figura 10: Modello della conformazione dei complessi antenna per il *quenching* non fotochimico.** La vicinanza tra i rettangoli interni rappresenta l'entità del cambiamento conformazionale del complesso antenna che governa l'efficienza del *quenching* (spessore delle frecce). I rettangoli esterni possono essere riferiti ad un singolo complesso antenna del PSII (LHCII), a un macrodominio di complessi antenna o a megacomplexi LHCII/PSII. Gli stati I - IV si riferiscono alla differenza degli stati di *quenching* - I è lo stato adattato al buio e IV è lo stato con qE massimo, raggiunto dopo alcuni minuti di esposizione ad un eccesso di energia luminosa. Lo stato III è lo stato di qE che può presentarsi temporaneamente, immediatamente dopo l'illuminazione, prima che cominci la de-epossidazione. Lo stato II è lo stato "memoria", riscontrato alcuni minuti dopo l'oscuramento di una foglia precedentemente esposta ad un eccesso di energia luminosa, e descrive il *quenching* rimanente frequentemente chiamato qI (da Horton et al. 2005).

In condizioni di luce limitante, i complessi antenna del PSII sono caratterizzati da un efficiente trasferimento dell'energia di eccitazione al centro di reazione e non viene indotto qE (I). In condizioni di esposizione ad alte intensità luminose, le proteine dei complessi antenna vengono protonate (III). Allo stesso tempo, l'enzima VDE viene attivato, ma la conversione di V a Z è più lenta della protonazione (II). La conversione di V a Z causa una variazione di assorbanza a 505 nm. La formazione del complesso Z - proteina protonata causa un cambiamento conformazionale del complesso antenna che ha come conseguenza un aumento di dissipazione di energia per via termica. Tale cambiamento conformazionale causa variazioni di assorbanza a 535 nm. Successivamente ad una diminuzione dell'intensità luminosa, una diminuzione di  $\Delta pH$  può causare una relativamente rapida de-protonazione delle proteine dei complessi antenna (IV), associata ad una diminuzione dell'efficienza di NPQ (qI). La conversione di Z a V si verifica più lentamente (I).

Infine per quanto riguarda qN, viene espresso come:

$$qN = 1 - \frac{F_m' - F_0'}{F_m - F_0} \quad (1.12)$$

Esso è in relazione con i precedenti parametri qE, qT, qI secondo l'equazione:

$$(1 - qN) = (1 - qE) \cdot (1 - qT) \cdot (1 - qI) \quad (1.13)$$

Per studi di assimilazione di CO<sub>2</sub> basati su fluorescenza, è stato introdotto il rapporto  $F_q'/F_m'$  detto efficienza operativa del PSII, in cui:

$$\frac{F_q'}{F_m'} = \frac{F_v'}{F_m'} \cdot \frac{F_q'}{F_v'} \quad (1.14)$$

Tale rapporto è linearmente proporzionale alla resa quantica di assimilazione per la CO<sub>2</sub> (Genty *et al.*, 1989) eccetto che in condizioni di bassa temperatura o di aumento del tasso di attività del ciclo-Q (Hauska *et al.*, 1996). Sfruttando tale linearità è possibile teoricamente calcolare il tasso di trasporto elettronico non ciclico, dal PSII a PSI :

$$ETR = \frac{F_q'}{F_m'} \cdot I \cdot I_{PSII} \quad (1.15)$$

dove  $I$  è la densità di flusso fotosinteticamente attivo incidente (PPDF) e  $I_{PSII}$  è la frazione di fotoni incidenti che sono assorbiti dal PSII. I fluorometri commercialmente in uso utilizzano il valore 0,84 per quanto riguarda  $I_{PSII}$ , assumendo che la foglia assorba determinate proporzioni di fotoni incidenti (tipicamente l'84%) e che il 50% di questi fotoni siano assorbiti dal PSII. Il calcolo di ETR diventa quindi:

$$ETR = \frac{F_q'}{F_m'} \cdot I \cdot 0.84 \cdot 0.5 \quad (1.16)$$

Sebbene 0,84 rappresenti una ragionevole stima dell'assorbidività, nel caso di foglie adulte ed in buone condizioni di salute, vi sono alcuni casi in cui non è così. Inoltre ad alti valori di PPDF il contributo di fluorescenza emessa dal PSI aumenta, facendo diminuire  $F_q'/F_m'$  e portando in tal modo ad una sottostima di ETR. Tuttavia tale problema può essere minimizzato, misurando la fluorescenza della clorofilla vicino al picco di 683 nm, dove il contributo della fluorescenza del PSI è minore. ETR viene spesso visualizzato in grafici ETR-intensità luminosa definiti come curve di luce (Figura 13; Cap 2).

Molti parametri fotochimici sono stati così derivati dall'analisi della fluorescenza indotta da un impulso saturante, ponendo l'attenzione sul PSII e relativo complesso antenna. La cosiddetta *steady-state* di fluorescenza è stata descritta come un segnale ricco, dal momento che risponde ad un largo numero di fattori, e può potenzialmente fornire informazione su ciascuno di essi (Kramer *et al.*, 2004), ma allo stesso tempo l'insieme dei contributi può confondere semplici interpretazioni. Tra gli anni 80 e 90 si è assistito all'introduzione di diverse nomenclature per i parametri fotochimici e negli ultimi anni alcuni parametri sono stati ri-derivati e altri introdotti ex novo, come  $qL$ ,  $\phi_{NPQ}$  e  $\phi_{NO}$ .

In particolare, Kramer e collaboratori (2004) hanno evidenziato la robustezza del parametro  $\phi_{II}$ . Infatti ri-derivando l'equazione hanno dimostrato che il parametro  $\phi_{II}$  può essere derivato indipendentemente dal modello di unità fotosintetica utilizzato. I due modelli principali, nonché opposti, sono il *puddle model* ed il *lake model*. Nel primo, per ciascun RCII è previsto un suo complesso antenna indipendente dagli altri, per cui non c'è effetto della fluorescenza di  $Q_A$  ossidato sull'efficienza della vicina unità fotosintetica (PSU). L'altro, *lake model*, è più realistico e approssima meglio la PSU, come dimostrato dalla formazione di dimeri funzionali nei centri del PSII (Barber 2003), che in un *puddle model* non sono possibili.

Trattando allo stesso modo il parametro  $qP$ , hanno inoltre mostrato (Kramer *et al.*, 2004) come l'approssimazione di una relazione lineare tra resa di fluorescenza e percentuale di  $Q_A$  ridotti (Schreiber, 1986) basato sul *puddle model* sia incompatibile con i più realistici modelli di PSU.

Quindi, Kramer *et al.* (2004) hanno introdotto un nuovo parametro  $qL$  - per indicare che è derivato usando un *lake model*- che tenga conto del quenching fotochimico e della frazione dei centri di reazione aperti, utilizzando gli stessi parametri di fluorescenza usati per  $qP$ . Nella nuova equazione l'importanza di  $k_{pi}$  è determinata da due parametri, una costante di disattivazione 'intrinseca' per la cattura dell'energia di eccitazione dai RCII, che si assume sia costante, e una frazione di centri di reazione aperti  $qL$ :

$$k_p = k_{pi} \cdot qL \quad (1.17)$$

e secondo l'approccio Stern-Volmer:

$$\phi_f = \frac{k_f}{k_f + k_d + k_{isc} + k_{NPQ} + k_{pi} \cdot qL} \quad (1.18)$$

dove *isc*, sta per *intersystem crossing to form triplet*, e attraverso una serie di passaggi di equazioni e sostituzioni si ha:

$$qL = qP \cdot \frac{F_0'}{F_s} \quad (1.19)$$

Inoltre Kramer *et al.* (2004) hanno introdotto due parametri supplementari per stimare il flusso di energia di eccitazione nei processi competitivi di dissipazione non foto-chimici,  $\phi_{NPQ}$  o resa di fluorescenza indotta dai processi di *down-regulation* e  $\phi_{NO}$  o resa per altre perdite di energia non-fotochimica ma non indotte dalla luce, espresse mediante le seguenti equazioni:

$$\phi_{NO} = \frac{1}{NPQ + 1 + qL \cdot \left( \frac{F_m}{F_0} - 1 \right)} \quad (1.20)$$

$$\phi_{NPQ} = 1 - \phi_{II} - \phi_{NO}$$

La misura di questi parametri risulta pertanto molto utile nello studio dei processi fotochimici della fotosintesi e nell'identificare condizioni di stress per le piante che ne riducono l'efficienza fotosintetica alterando il trasporto degli elettroni. L'efficienza di fluorescenza è in competizione con la conversione fotochimica dell'energia assorbita e con i fenomeni di dissipazione per via termica. Un aumento della dissipazione di energia assorbita come fluorescenza o come calore quindi possono indicare la presenza di diversi fattori di stress. Tale misura viene correntemente eseguita in laboratorio, grazie alla presenza di fluorimetri portatili può essere effettuata anche in campo.

### **1.8. Fluorimetro Imaging-PAM per l'analisi d'immagine della fluorescenza**

Come tutti i fluorimetri PAM, capaci di misurare e determinare mediante specifici algoritmi i parametri fotochimici, i fluorimetri *Imaging*-PAM sono soprattutto in grado di elaborare le immagini di questi stessi parametri. Lo strumento costruisce l'immagine attraverso 4 fasi:

1) cattura dell'immagine, 2) segmentazione immagine, 3) analisi, 4) visualizzazione.

La maggior parte delle moderne strumentazioni possiede fonti di luce modulabili che accrescono l'intervallo di misura della fluorescenza su un ampio intervallo d'intensità di luce attinica (Oxborough and Baker, 1997a,b). Attualmente sono utilizzate sorgenti di luce LED-s (*light-emitting diodes*) che possono essere controllate con intervalli di risposta che scendono sotto il secondo e raggiungono intensità luminose che possono superare di 2 volte quella solare, anche se non possiedono lo stesso intervallo di lunghezze d'onda (Oxborough, 2004a). Tale fonti luminose hanno lunghezze d'onda selezionabili, delle quali le più utilizzate, sia per applicare impulsi saturanti nel metodo PAM o per ottenere luce di misura (ML) o attinica (AL), vanno dal rosso all'arancione o dal blu all'UV. Le sorgenti di luce possono essere in alcuni casi fonte di errore nelle misurazioni in quanto, pur raggiungendo intensità elevate, non riescono a illuminare il campione in maniera omogenea, soprattutto durante l'applicazione dell'impulso luminoso. Tale problema è molto importante quando si analizzano aree estese e in genere viene ridotto durante la fase di elaborazione dei dati. La raccolta delle immagini di fluorescenza provenienti dal campione viene effettuata tramite l'utilizzo di camere con CCD (charge-coupled device), un particolare sensore per la cattura delle immagini. Le camere CCD (CCD-camera), dopo un passaggio della luce raccolta in un filtro che permette il passaggio della luce nel rosso e nel rosso lontano ( $\lambda > 690$  nm), provvedono a raccogliere le immagini dinamiche di fluorescenza, a digitalizzarle (tramite un convertitore digitale, in dati di 12 o 14 bit), ed a trasferirle al computer. Il processo di cattura delle immagini è schematizzato dalla seguente relazione matematica:

$$S \propto (\phi_F \cdot I \cdot A \cdot t) + (k_d \cdot t) + R \quad (1.21)$$

Dove  $S$  è la misura integrata del segnale;  $\Phi_F$  la fluorescenza della clorofilla raccolta;  $I$  la densità di flusso fotonico incidente;  $A$  la frazione incidente di fotoni assorbiti;  $t$  il tempo di integrazione;  $k_d$  il tasso costante per i *dark noise*;  $R$  il valore dei *red noise* (Oxborough, 2004a).

Ci sono due importanti fonti di possibili errori in tale relazione. La prima sono i cosiddetti *dark noise*, ossia l'accumulazione di carica dovuta all'assorbimento di fotoni ad elevate lunghezze d'onda e naturalmente proporzionale a  $t$ . La seconda rappresenta i disturbi associati alla lettura ed alla digitalizzazione dell'immagine, che è indipendente da  $t$ . L'entità dei due disturbi dipende dal tipo di CCD-camera utilizzato. I dati di fluorescenza così raccolti sono trasferiti al computer ed immagazzinati. Successivamente, grazie a strumenti software, le informazioni contenute nei dati vengono elaborate per costruire segmenti di immagine. Tali operazioni vengono eseguite in tempo reale e permettono la visualizzazione su monitor sia dell'andamento dei vari parametri (in grafici fluorescenza-tempo), sia la resa di immagini istante per istante degli stessi parametri. Nelle immagini elaborate dalle strumentazioni più recenti la visualizzazione su monitor della variazione del valore dei parametri viene affidata ad una scala colorimetrica, nella quale ad ogni colore o sfumatura di questo corrisponde un determinato valore (Oxborough, 2004a).

### **1.9. L'imaging di fluorescenza della clorofilla $a$ nello studio degli stress biotici e abiotici**

In molte aree della biologia vegetale e della ricerca agronomica c'è sempre più la richiesta di tecniche capaci di effettuare rapidi screening di controllo di produzione dei raccolti con particolare attenzione alla capacità di crescita e di performance delle piante, e soprattutto alla tolleranza a differenti stress ambientali. La stretta relazione tra parametri di fluorescenza e misura di performance fotosintetica delle foglie (Baker and Rosenqvist, 2004; Chaerle et al., 2006) ma soprattutto il recente sviluppo tecnologico hanno introdotto negli ultimi anni l'analisi di immagine dell'emissione di fluorescenza della clorofilla come efficace metodo d'indagine per molteplici applicazioni in campo ambientale (Baker et al., 2001; Nedbal and Whitmarsh, 2004).

Come già detto, l'analisi della emissione di fluorescenza della clorofilla  $a$  è una metodologia consolidata per lo studio della performance fotosintetica di una pianta (Krause and Weis, 1984; Lichtenthaler and Rinderle, 1988; Maxwell and Johnson, 2000; Barbagallo et al., 2003). Infatti è ormai dimostrata la forte relazione dei parametri di fluorescenza con la capacità di assimilazione della  $CO_2$  da parte delle foglie (Harbinson et al., 1990; Krall and Edwards, 1990, 1991; Barbagallo et al., 2003; Baker and Rosenqvist, 2004). Cambiamenti del metabolismo fotosintetico variano

significativamente la cinetica di emissione della fluorescenza delle piante (Schreiber et al., 1994; Adams and Demmig-Adams, 2004) anche e soprattutto in presenza di fattori di stress, pure se non direttamente coinvolti nel metabolismo fotosintetico (Brack and Frank, 1998; Barbagallo et al., 2003). Sebbene i meccanismi alla base di questi effetti sull'emissione di fluorescenza non sono stati ancora del tutto chiariti, l'inibizione di reazioni non coinvolte nella fotosintesi possono modificare pool e struttura di intermedi metabolici che, influenzando la sintesi di composti chiave del metabolismo fotosintetico, interferiscono con le caratteristiche della cinetica di emissione della fluorescenza (Barbagallo et al., 2003; Nedbal and Whitmarsh, 2004). L'emissione di fluorescenza, quindi, può essere utile come sonda metabolica per studiare le risposte della pianta in funzione di fattori di stress ambientali quali temperatura, luce, acqua, presenza di sostanze inquinanti del terreno come metalli pesanti o dell'aria come l'ozono, e di agenti biologici come batteri, virus e funghi (Baker and Rosenqvist, 2004; Chaerle et al., 2006).

Grazie al notevole sviluppo tecnologico degli ultimi anni, che ha considerevolmente contribuito a potenziare questa tecnica, è stato possibile elaborare la cinetica della emissione di fluorescenza in immagini (Oxborough, 2004b), fornendo così informazioni in tempo reale sull'eterogeneità spaziale dell'attività fotosintetica di una foglia e, data la non distruttività della tecnica, dello stesso campione nel tempo. Il valore aggiunto fornito dall'analisi di immagine (*imaging*) quindi è dovuto alla possibilità di analizzare contemporaneamente una intera area di un numero maggiore di foglie e, quindi di piante, risultando particolarmente utile in programmi di screening (Oxborough, 2004a; Baker and Rosenqvist, 2004). Inoltre, vista la rapidità di acquisizione delle immagini, è possibile fare confronti immediati ed identificare eventuali cambiamenti metabolici prima che l'insorgenza di un qualsiasi effetto sia visibile sulla morfologia della foglia o sulla crescita della pianta (Chaerle et al., 2004; Barbagallo et al., 2003). Questo risulta molto utile sia nella ricerca di base, per la comprensione dei processi che la pianta mette in atto in risposta a stress ambientali, sia applicata, dove la diagnosi precoce e non distruttiva di patologie in fase latente è importante per un eventuale intervento di risanamento (Chaerle and Van Der Straeten, 2001; Baker and Rosenqvist, 2004).

Monitorando l'intera superficie fogliare, quindi, l'*imaging* di fluorescenza è in grado di rilevare e identificare i primi sintomi di infezione fungina, virale o batterica a partire dagli stadi iniziali e seguendo il suo decorso nel tempo (Chaerle and Van Der Straeten, 2000; Chaerle et al., 2002; Berger et al., 2004).

È stato dimostrato che già nelle prime fasi dell'interazioni pianta-patogeno c'è una risposta da parte della pianta detta di ipersensibilità che porta a formazione di necrosi dovuta a morte cellulare (Heath, 2000; Lam et al., 2001). Tra i primi processi colpiti durante questa fase vi è la riduzione

dell'efficienza fotosintetica attraverso l'alterazione del trasporto elettronico (ETR) e un aumento dell'emissione di fluorescenza (Chaerle et al., 2004, 2007; Berger et al., 2007).

Durante l'infezione fungina di *Colletotrichum lindemuthianum* su *Phaseolus vulgaris* cv. Carioca nelle zone di necrosi si è osservata una diminuzione del 70-80% di  $F_m$  e del 38% di ETR, correlata ad una diminuzione del 50% della fotosintesi rispetto al controllo non inoculato (Meyer et al. 2001). L'*imaging* di fluorescenza su foglie di avena inoculate con il fungo *Puccinia coronata*, nello stadio iniziale, quando il danno non è ancora visibile, mostra una leggera diminuzione del parametro  $Y(II)$  associata ad un aumento di  $qN$ , quenching non-fotochimico (Scholes e Rolfe, 1996).

L'analisi d'immagine ha dato risultati anche sull'infezione da virus, in particolare TMV, il virus del mosaico del tabacco. Si è osservata una diminuzione di  $F_v/F_m$  nelle zone di espressione della malattia nelle ore immediatamente successive all'inoculazione (Osmond et al., 1998; Lai et al., 2009). Dopo 30 ore dall'inoculazione virale l'area interessata dalla risposta di ipersensibilità, non ancora visibile, ma in cui la malattia è in via di espressione, presenta valori di fluorescenza molto elevati rispetto alle aree circostanti a partire già da basse intensità luminose (Chaerle et al. 2004).

Nell'interazione fungina barbabietola da zucchero-*Cercospora* i primi sintomi visibili all'analisi d'immagine sono *spots* con intensità di fluorescenza maggiore che indicano un'inibizione del trasporto fotosintetico degli elettroni (Chaerle et al. 2004).

L'analisi d'immagine su foglie di fagiolo in risposta all'interazione batterica con *Pseudomonas syringae* sia pv *phaseolicola* che pv *tomato* ha evidenziato significativi cambiamenti rispetto al controllo in  $Y(II)$  e in  $qN$  prima della comparsa dei sintomi (Rodríguez-Moreno et al., 2008). Immagini del parametro  $Y(II)$  non mostrano differenze tra i due patogeni, mentre appaiono considerevoli differenze in quelle di quenching non fotochimico (Rodríguez-Moreno et al., 2008).

Anche fattori di stress ambientali, come per esempio la presenza di metalli pesanti, producono molteplici e diversificati effetti sulla fotosintesi e di conseguenza sulla crescita della pianta.

I metalli pesanti, sia quelli definiti essenziali (Cu, Mn, Zn) che non (Hg, Cd, As, Pb) per le piante, e quindi potenziali inquinanti presenti nel terreno e nei sedimenti, possono essere facilmente assorbiti e accumulati in diverse parti della pianta. Il loro assorbimento da parte della pianta è regolato da pH, dimensione delle particelle, capacità di scambio cationico del suolo, così come dall'essudazione radicale e da altri parametri fisico-chimico. Gli eccessi di metalli pesanti causano un numero di sintomi di tossicità nelle piante come crescita stentata, clorosi, annerimento delle radici, che inibiscono la fotosintesi, alterano l'assimilazione dei nutrienti ed il bilancio idrico, cambiano lo stato ormonale e colpiscono la struttura delle membrane e la loro permeabilità (Prasad and Strzałka, 1999; Barceló and Poschenrieder, 1999).

Molte alterazioni al livello di apparato fotosintetico, indotte da metalli pesanti differenti, possono essere comuni, anche se l'influenza di ciascuno ione sulla fotosintesi ha uno suo grado di specificità, in termini sia di soglia di tossicità che di range di alterazioni. La natura non intrusiva della misura di fluorescenza della clorofilla offre un gran potenziale nella valutazione dello stress da metallo pesante *in vivo* ed ha notevolmente contribuito anche alla comprensione sia dei meccanismi che dell'entità del danno da metalli pesanti. (Chaerle and Van Der Straeten, 2000; Joshi & Mohanty, 2004).

I parametri di fluorescenza, quali la resa del PSII (YII) ed il trasporto elettronico (ETR), mostrano variazioni, la cui entità dipende sia dallo stadio di crescita della pianta esposta al metallo che dalla durata di esposizione (Joshi & Mohanty, 2004; Popovic et al., 2003).

Analisi d'immagine di foglie di tabacco trattate con metallo pesante ha evidenziato una eterogeneità di risposta dell'intensità di fluorescenza nella foglia studiata e variazioni dei parametri di induzione di fluorescenza in assenza di altri sintomi evidenti con progressiva diminuzione della resa fotosintetica (Ciscato et Valcke, 1998; Chaerle et al., 2003; Chaerle et al., 2006).

Il vantaggio della tecnica di *imaging* fornisce ulteriore forza al progredire della ricerca in questa area ancora da approfondire anche se è già stata utilizzata per dimostrare l'eterogeneità nella localizzazione di vari metalli in foglia e le dinamiche di alterazioni indotte nella resa fotochimica dell'area colpita (Ciscato et al., 1999; Valcke et al., 1999). Può inoltre contribuire a comprendere ulteriormente gli effetti morfologici, fisiologici e biochimici della tossicità dei metalli pesanti e le strategie adottate dalle piante per detossificare e sviluppare una tolleranza a metalli pesanti (Joshi & Mohanty, 2004).

### **1.10. Obiettivi della ricerca**

In sintesi si può affermare che lo stress, qualunque sia l'origine, ha portato, nel corso del tempo, allo sviluppo nell'ospite di meccanismi e sistemi d'azione mirati a contrastarne e limitarne i danni. Nelle piante a livello cellulare e subcellulare i danni da stress si manifestano, nell'insieme, dapprima con alterazioni funzionali a carico dell'apparato fotosintetico e poi con lesioni strutturali di membrane fino ad arrivare ad una vera e propria morte cellulare. Quando le lesioni interessano numerosi gruppi di cellule, caratteristici sintomi necrotici diventano allora visibili sulla lamina fogliare. Spesso, invece, le risposte della pianta non sono visibili, dal momento che i sistemi antiossidanti e i meccanismi di riparazione contribuiscono a difendere l'integrità cellulare. In un ottica di equilibrio cellulare interno, in cui specifici meccanismi di risposta vengono attivati, i cloroplasti e quindi l'apparato fotosintetico contribuiscono al mantenimento dell'equilibrio

omeostatico non senza dispendio energetico. Il costo energetico di tali processi si traduce però in un calo netto della produttività degli individui vegetali e di conseguenza in un minor raccolto.

Nello scenario attuale dei cambiamenti climatici in corso, ma anche di quelli futuri, le piante possono trovarsi ad affrontare continue variazioni delle condizioni ambientali, così come situazioni di stress singoli o concomitanti, i cui effetti non sempre visibili portano nel tempo a ridurre la capacità di crescita e le potenzialità produttive con evidenti conseguenze sia per l'ecosistema, che in ambito economico più stretto, per tutte quelle specie di particolare interesse agronomico e forestale.

In tale contesto si vuole porre particolare attenzione sulla possibilità mediante l'analisi dell'emissione di fluorescenza della clorofilla e dei parametri ad essa associati di quantificare questo dispendio, indice anche di capacità di tolleranza al cambiamento, unitamente alla possibilità di riprodurre immagini di intere aree della lamina fogliare che consentono di caratterizzare le risposte ai diversi fattori. In tale ambito si inserisce questa ricerca che ha lo scopo di studiare, in condizioni sperimentali controllate, l'impatto di stress di origine biotica e abiotica sull'apparato fotochimico sia di specie erbacee che arboree e le potenziali applicazioni dell'*imaging* di fluorescenza come metodo di screening per identificare e monitorare nel tempo tutte le possibili varietà di risposte a differenti tipologie di stress.

In particolare il progetto di ricerca è articolato in due casi studio principali:

- Analisi d'immagine dei parametri fotochimici nell'interazione pianta-patogeno, studio svolto in collaborazione con l'Istituto di Patologia Vegetale di Roma (ISPAVE), su una specie erbacea modello *Brassica oleracea* var. *Italica* Plenck inoculata, in condizioni controllate di laboratorio, con *Phoma lingam*, uno dei più importanti ed aggressivi patogeni fungini del suolo delle brassicacee.
- Analisi d'immagine della risposta fotochimica delle piante nell'accumulo di metalli pesanti, studio svolto in collaborazione con il C.N.R. ed il C.R.A-ING. di Montelibretti su una specie arborea modello *Populus x euramericana* clone I-214 cresciuta in presenza di alte concentrazioni di zinco nel terreno in condizioni controllate di laboratorio.

## CAPITOLO 2

### 2.1. Interazione pianta-patogeno: alterazione dell'efficienza fotosintetica

Lo studio dei meccanismi alla base della risposta delle piante all'attacco di patogeni riveste un ruolo importante in campo agronomico, in particolare per la diagnostica precoce delle malattie. Quando una pianta viene attaccata da un patogeno si verificano, già nelle prime fasi, drastiche modificazioni metaboliche che interessano sia il sito di attacco direttamente colpito che le zone circostanti non ancora direttamente danneggiate ma coinvolte nell'interazione.

Tra le modificazioni si osservano sia la riduzione dell'attività fotosintetica, con eventuale perdita di pigmenti, sia la produzione di acqua ossigenata espressione dello stress ossidativo.

Le cause della diminuzione del tasso fotosintetico sono molteplici ed in diversi modelli pianta-patogeno sono state approfonditamente studiate e caratterizzate (Roberts e Walters, 1988; Jiao *et al.*, 1999; Rahoutei *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2001; Rotenberg *et al.*, 2004).

Roberts e Walters (1988), utilizzando metodologie di scambio gassoso, hanno dimostrato la diminuzione dell'attività fotosintetica durante l'infezione causata da *Puccinia allii* su *Allium porrum* L. Le foglie sono state analizzate separando le zone invase dal patogeno e quelle non invase. In particolare, dopo 14 giorni, nelle aree infette si è verificata una diminuzione del 25% nella produzione di O<sub>2</sub> ed un aumento del 20% del tasso di respirazione al buio, rispetto alle aree non colpite dal patogeno. Anche l'infezione causata dal batterio *Xanthomonas campestris* pv. *Perlagoni* su *Perlagonium domesticum*, causa una diminuzione della fotosintesi del 30% dopo 3 giorni, che diventa del 70% dopo 7 giorni (Jiao *et al.*, 1999).

Con tecniche di *gas exchange* e di fluorescenza, è stato possibile quantificare i danni provocati dal processo di patogenesi sulla fotosintesi. Durante l'infezione di *Fusarium oxysporum* su pomodoro l'invasione del fungo all'interno dei tessuti dell'ospite causa una riduzione del potenziale idrico della foglia, dovuta all'occlusione dei vasi xilematici (Sidorova 1983), provocando uno stato fisiologico i cui sintomi sono simili ad una carenza idrica (Pshibytko *et al.*, 2006). Ciò causa un rapido aumento della chiusura stomatica, che porta ad una diminuzione dell'attività della rubisco (Stangarlin e Pascolati, 2000). Un altro sistema bersaglio è il PSII, la cui attività risulta fortemente limitata. In modo particolare, è il processo di fotolisi, che avviene nel PSII, ad essere inibito (Pshibytko *et al.*, 2006). L'inibizione dell'attività PSII causa una significativa diminuzione del trasporto elettronico, che si riflette in modo negativo sull'intero processo fotosintetico (Fluhr, 2001). Gli effetti di disattivazione del PSII sono stati osservati attraverso studi di analisi della fluorescenza indotta della clorofilla *a* (Bassanezi *et al.*, 2002), che hanno dimostrato come l'infezione del patogeno *Phaeoisariopsis griseola* su pisello porti ad una graduale diminuzione

dell'attività del PSII, suggerendo meccanismi d'azione simili a quelli osservati nell'interazione *Fusarium oxysporum*-pomodoro (Pshibytko *et al.*, 2006). Anche Meyer *et al.* (2001), utilizzando sistemi *gas exchange*, hanno evidenziato come l'infezione del fungo *Colletotricum lindemuthianum* su *Phaseolus vulgaris* cv. Carioca porti ad una rapida diminuzione dell'attività fotosintetica di quasi il 100% dopo 18 giorni, con un costante aumento del tasso respiratorio e un graduale aumento della chiusura stomatica (Meyer *et al.*, 2001). Anche alterazioni del cloroplasto o una diminuzione del contenuto di clorofilla, entrambe causate dal patogeno, possono avere importanti conseguenze sul processo fotosintetico (Bassanezi *et al.*, 2002). È comunque evidente come la diminuzione dell'attività fotosintetica sia maggiore in tutti quei tessuti direttamente colpiti dal patogeno a causa soprattutto dell'attività metabolica dell'agente infettivo (Shtienberg, 1992; Scholes e Rolfe, 1995). Tuttavia la diminuzione della resa in fotosintesi è anche osservabile nelle porzioni di tessuto non direttamente colpite dal patogeno, ma la cui presenza, ne modifica il metabolismo (Scholes e Rolfe, 1995).

## **2.2. Modificazione dei pigmenti fotosintetici**

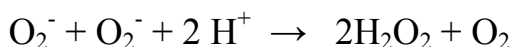
La degradazione della clorofilla quando non è dovuta a processi di senescenza, osservabile ad esempio nelle foglie durante il periodo autunnale, è dovuta a clorosi causate da attacchi di patogeni (Ni *et al.*, 2002). Anche se i meccanismi dettagliati circa l'effetto degli agenti infettivi sulla concentrazione dei pigmenti fotosintetici non sono del tutto noti, molti attacchi di patogeni portano ad una graduale diminuzione della concentrazione dei pigmenti nell'ospite (Sziràki *et al.*, 1984; Kuzniak e Sklodowska, 2001; Sighicelli *et al.*, 2005). Le possibili cause di tale evento sono legate al rilascio, nei tessuti dell'ospite, di enzimi di degradazione e di tossine, provenienti dall'attività metabolica del patogeno, che sono stati associati con processi di alterazioni delle componenti cloroplastiche (Sziràki *et al.*, 1984). Ad esempio su foglie di *Lycopersicon esculentum* Mill. l'infezione causata da *Botrytis cinerea* porta ad una graduale diminuzione del contenuto di clorofilla nei cloroplasti (Kuzniak e Sklodowska, 2001). Tale variazione si osserva già dopo un giorno dall'inoculazione e dopo 5 giorni il valore diventa del 50% più basso rispetto il primo giorno (Kuzniak e Sklodowska, 2001). La degradazione dei pigmenti in risposta all'infezione è stata anche quantificata durante l'attacco di *Penicillium italicum* e *Phytophthora citrophthora* su frutti di arancio ed è stato osservato come la variazione della concentrazione dei pigmenti fotosintetici possa essere riscontrabile già dopo uno o due giorni dall'inoculazione (Sighicelli *et al.*, 2005).

### 2.3. Produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è specie reattive dell'ossigeno. La prima reazione nella sua produzione è catalizzata dalla NADPH ossidasi:



La NADPH ossidasi è un enzima localizzato sulla membrana plasmatica e produce l'anione superossido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) verso l'esterno di questa, entro la parete cellulare. L'O<sub>2</sub><sup>-</sup>, una specie già altamente reattiva, viene trasformata ulteriormente in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nella seconda reazione (dismutazione) catalizzata dalla superossido dismutasi (SOD):



La SOD è un enzima apoplastico ed è uno dei sistemi chiave nella risposta ad infezioni di patogeni o nella soppressione di tale risposta, risultando sensibile a molti fattori ambientali (Blokhina et al., 2003). Il perossido di idrogeno, insieme ad altre ROS, agisce sulla proliferazione dei patogeni, influenzando negativamente sul loro metabolismo, in quanto come forti ossidanti interagiscono con le componenti strutturali favorendone l'idrolisi. In diversi studi è stato messo in evidenza il loro ruolo fondamentale nella risposta della pianta all'attacco di patogeni (Peng e Kuc, 1992) attraverso la modificazione delle caratteristiche strutturali delle pareti cellulari (Gaspar *et al.*, 1991, Pena *et al.*, 1996), inducendo la risposta ipersensibile (HR) (Dat *et al.*, 2000; Grant e Loake, 2000), attivando la sintesi di composti antimicrobici (Dmitriev, 2003). Durante l'infezione di *Fusarium oxysporum* su *Pisum sativum* è stata osservata una intensa attività degli enzimi responsabili della produzione dei ROS nelle ore immediatamente successive all'attacco del patogeno (Luhov6 *et al.*, 2006). Nell'infezione su orzo causata da un suo patogeno è stato messo in evidenza come l'interazione pianta-patogeno scateni la produzione dei ROS e come la loro concentrazione diminuisca nell'arco di 24h dallo stimolo iniziale (Thordal-Christensen *et al.*, 1997). Anche l'infezione causata da *Phytophthora infestans* su patata è accompagnata da un'intensa produzione di ROS (Doke, 1983).

I ROS, tuttavia, risultano tossici anche per la pianta che li produce. Così esistono sistemi per la modulazione ed il controllo mediante l'utilizzo di molecole antiossidanti in grado di limitare o annullare l'effetto dei ROS (Blokhina et al., 2003), come l'acido ascorbico (vitamina C), il tocoferolo (vitamina E), i composti fenolici ed il glutathione. Quest'ultimo, un tripeptide, espone un gruppo SH sul residuo di cisteina con il quale può formare legami disolfuro con altre molecole di glutathione o con gruppi SH esposti su proteine bersaglio. Il suo ruolo nel controllo del metabolismo plastidiale e cellulare è molto ampio (Mullineaux and Rausch, 2005). È coinvolto nella protezione dalle intossicazioni di metalli pesanti, nel metabolismo dello zolfo, ha effetti nella crescita e nello

sviluppo ed è fonte di potere riducente in alcune reazioni enzimatiche. Inoltre, promuove la risposta dell'organismo in risposta ad agenti patogeni o ancora alla mancanza di nutrienti. In questi casi agisce sia proteggendo proteine bersaglio da eccessiva ossidazione, processo detto glutathionilazione, sia modificando l'espressione genica, nucleare o plastidiale, attivando geni per la difesa o per l'adattamento dell'organismo all'ambiente.

#### **2.4. Interazione pianta-patogeno e l'emissione di fluorescenza della clorofilla**

Una stima indiretta dell'efficienza fotosintetica può essere effettuata anche attraverso lo studio della fluorescenza indotta della clorofilla *a*. L'emissione di fluorescenza è un metodo non distruttivo ampiamente utilizzato sia per il monitoraggio dello stato di salute delle piante che per gli studi di base della fotosintesi (Bjorkman e Demming, 1987; Osama *et al.*, 1987; Ning *et al.*, 1995; Lichtenthaler e Babani, 2000; Oxborough, 2004). L'applicazione di tale tecnica è anche in grado di mettere in evidenza effetti dovuti ad invasione di patogeni, prima che i sintomi appaiano visibili. Molti studi sottolineano la possibilità sia di quantificare i danni riportati dall'ospite durante il ciclo infettivo (Scholes e Rolfe, 1996; Osmond *et al.*, 1998), sia l'opportunità di seguire il decorso della malattia (Bassanezi *et al.*, 2002) in riferimento alle fasi iniziali dell'infezione (Noguès *et al.*, 2002). È soprattutto in tale breve periodo in cui la malattia è in via di sviluppo ma non è manifesta che si ha la possibilità di rilevare cambiamenti fisiologici della pianta attraverso le misure di fluorescenza. L'emissione di fluorescenza indotta della clorofilla *a* misura soprattutto l'attività del fotosistema due (PSII). Osservazioni sperimentali, ottenute attraverso l'analisi degli spettri di soluzioni di tilacoidi a diverse temperature, hanno infatti dimostrato che a temperatura ambiente circa il 90% della fluorescenza origina dal PSII (Boardman *et al.*, 1966; Geacintov e Breton, 1981). Ulteriori informazioni sul funzionamento del PSII possono essere ottenute attraverso altri parametri di fluorescenza. La resa quantica del PSII al buio ( $F_v/F_m$ ) e l'effettiva resa quantica misurata alla luce ( $Y(II)$ ), il trasporto elettronico (ETR), il quenching fotochimico (qP) e non-fotochimico (qN, NPQ), restituiscono importanti informazioni sul processo fotosintetico. È da tempo noto, infatti, che fattori che interessano l'efficienza di cattura della luce da parte del PSII, come fotoinibizione o aumento dei quenching non-fotochimici, possono modificare il trasporto elettronico lineare (Genty *et al.*, 1989; Genty *et al.*, 1990a; Genty *et al.*, 1990b; Harbinson *et al.*, 1990). Pshibytko *et al.* (2006) riportano che nell'interazione del patogeno *Fusarium oxysporum* con *Lycopersicon esculentum* L. cv. Kunera tra i primi bersagli interessati dal processo di patogenesi vi è il PSII, la cui attività risulta fortemente limitata. Anche altri autori riportano che durante l'infezione *Fusarium oxysporum*-*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Roma è stata osservata dopo 31 giorni dall'inoculazione una significativa diminuzione del 27% di  $Y(II)$ , del 50% di ETR e del 28% di qP, mentre  $F_v/F_m$  è

diminuito di circa il 25% dopo 35 giorni (Noguès *et al.*, 2002). Bassanezi *et al.* (2002) hanno messo in evidenza come l'effetto di patogeni sul processo fotosintetico dipenda anche dalle modalità di propagazione dell'infezione. Anche se l'invasione da parte di un patogeno nei tessuti della pianta avviene attraverso diverse modalità, si possono riconoscere tre tipi di patosistemi: biotrofico, emibiotrofico e necrotrofico. Utilizzando tecniche di analisi di fluorescenza e di scambio gassoso, è stato osservato che l'effetto sul processo fotosintetico è diverso secondo il tipo di patosistema considerato (Bassanezi *et al.*, 2002). In patogeni biotrofici come *Uromyces appendiculatus* su *Phaseolus vulgaris* L. non si osserva una significativa variazione di  $F_0$ ,  $F_m$  e  $F_v/F_m$ . Si è osservata comunque una diminuzione significativa del tasso di fotosintesi correlata sia alla diminuzione della conduttanza stomatica che alla diminuzione della concentrazione dei pigmenti fotosintetici (Bassanezi *et al.*, 2002). La diminuzione del contenuto di clorofilla in piante attaccate dal patogeno, correlata al rilascio di enzimi di degradazione e di tossine è una delle principali cause della diminuzione dell'efficienza fotosintetica (Szirák *et al.*, 1984; Kuzniak e Sklodowska, 2001). Anche nell'interazione fra *Phaeoisariopsis griseola* (un patogeno emibiotrofico) e *Lycopersicon esculentum* non si notano significative variazioni di  $F_0$ ,  $F_m$  ed  $F_v/F_m$ , ma si osserva una diminuzione netta della fotosintesi del 40%, correlata alla diminuzione di clorofilla nelle aree di necrosi (Bassanezi *et al.*, 2002). Per patogeni necrotrofici come *Colletotrichum lindemuthianum* lo sviluppo della malattia su *Lycopersicon esculentum* causa una drastica diminuzione di  $F_m$ , di  $F_v/F_m$  e del tasso di fotosintesi, dovuta alla distruzione dei tessuti fotosintetici durante il processo di propagazione del fungo, mentre  $F_0$  rimane inalterato (Bassanezi *et al.*, 2002). Anche infezione virali come quella del virus del mosaico del tabacco (TMV) è stata studiata attraverso misure di fluorescenza, che hanno mostrato una diminuzione del 10% di  $F_v/F_m$  durante il processo di patogenesi (Osmond *et al.*, 1998). Le metodologie di analisi di fluorescenza, possono quindi essere utilizzate con successo per lo studio dell'interazione ospite-parassita, riuscendo a valutare indirettamente le variazioni sulla fotosintesi causate dal patogeno.

Negli ultimi decenni, con lo sviluppo di metodiche avanzate basate sugli innovativi studi di Osama *et al.* (1987), è stato possibile associare l'emissione di fluorescenza della clorofilla *a* all'analisi di immagine (*imaging*). In questo modo, oltre ai vantaggi delle tecniche di analisi di fluorescenza, si è aggiunta la possibilità di valutare i processi fotochimici contemporaneamente sull'intera superficie fogliare, non realizzabile con metodi di tipo puntuali. Ciò risulta di grande utilità nel campo della fisiopatologia vegetale. L'effetto del patogeno causa cambiamenti fisiologici sia nelle zone in cui esso è direttamente presente e sia in quelle influenzate dalla sua presenza a distanza (risposta eterogenea sulla superficie fogliare). L'analisi di immagine, quindi, come già indicato

precedentemente si propone come uno strumento utile per la comprensione del processo di patogenesi (Berger et al., 2004).

In letteratura quindi sono riportati molti di studi di fotosintesi per modelli pianta-patogeno, ma poco si conosce sul sistema *Brassica oleracea-Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. & de Not. (forma amorfa *Phoma lingam*, Tode ex Fr.). *P. lingam* è uno dei più importanti ed aggressivi patogeni del suolo, per le sue modalità di infezione e riproduzione colpisce tutti gli organi dell'ospite ed i sintomi non sono immediatamente visibili. Le patologie più importanti nelle zone a clima temperato come le nostre sono rappresentate proprio dai patogeni del terreno, a causa della loro lunga persistenza nel terreno, fino 4 anni, come forma di resistenza (West et al., 2001). *P. lingam* infetta principalmente brassicacee, causando una sintomatologia nota come “cancro del fusto” (*stem cancer*).

I patogeni del terreno per la molteplicità delle strategie adattative del loro ciclo vitale sono tra gli agenti infettivi più interessanti per lo studio di interazione pianta-patogeno. In questi tipi di patogeni, i maggiori danni sono causati dalla proliferazione necrotrofica e da quella biotrofica, che in genere non causa la morte dell'ospite, anche se incide profondamente sulla sua fisiologia. Nella proliferazione necrotrofica, la propagazione del patogeno è accompagnata dalla distruzione dei tessuti attaccati, con formazione di estese lesioni ed un radicale mutamento della fisiologia dell'ospite (Meyer et al., 2001). In *L. maculans* è stato osservato che la fase biotrofica e necrotrofica possono alternarsi all'interno del ciclo vitale in funzione dei fattori climatici (Petrie, 1994; Poisson et al., 1999), aumentando i danni per l'ospite. Il processo di infezione porta ad una colonizzazione biotrofica intercellulare del mesofillo fogliare, che segue ad un'invasione dei tessuti xilematici anch'essa biotrofica, e che culmina con una fase necrotrofica sul fusto. La fase necrotrofica è nota in *L. maculans* come *crown canker* e porta ad un accentuazione dei danni provocati dalla fase biotrofica, inibendo in maniera quasi completa il trasporto idrico (Davies, 1986). La pianta durante l'infezione opera una maggior deposizione di lignina sia nei vasi xilematici che nelle cellule parenchimatiche circostanti per tentare di inibire o di arrestare la proliferazione del patogeno (Hammond e Lewis, 1987). L'occlusione dei vasi xilematici incide sulla regolazione del bilancio idrico (Bassanezi et al., 2002) e la principale conseguenza è la riduzione della traspirazione dovuta alla graduale chiusura stomatica in risposta al minor flusso idrico (Bassanezi et al., 2002). Altri patogeni del terreno come *Fusarium oxysporum* o *Verticillium dahliae* hanno meccanismi di azione simili anche se il loro principale bersaglio di infezione sono gli organi ipogei e non si nota la presenza di una fase necrotrofica distruttiva (Sidorova, 1983; Goicoechea et al., 2000).

Oltre alla deposizione di lignina come meccanismo difensivo la pianta produce un elevato numero di molecole che vengono rilasciate in risposta al processo di patogenesi. Fra le sostanze prodotte dalle piante e meglio conosciute troviamo le fitoalessine, un vasto gruppo di metabolici secondari a carattere antimicrobico (Hammerschmidt, 1999; Mansfield, 2000). Inoltre anche il patogeno produce sostanze per facilitare il processo di penetrazione nell'ospite. Tra le tossine prodotte dai patogeni fungini sono note ad esempio le sirodesmine (Rouxel *et al.*, 1988) e il phomalide (Soledade *et al.*, 1998) prodotte da *L. maculans*, o le destruxine (Soukupova, 2003) prodotte da *Alternaria brassicae*.

Numerosi lavori hanno messo in evidenza come uno dei principali processi fisiologici che subisce alterazione fin dai primi stadi della patogenesi sia quello fotosintetico e che la diminuzione della resa in fotosintesi è direttamente correlata con l'avanzamento dell'infezione del patogeno (Roberts e Walters, 1988; Meyer *et al.*, 2001; Nogués *et al.*, 2002; Bassanezi *et al.*, 2002; Rotenberg *et al.*, 2004; Pshibytko *et al.*, 2006). Quindi la misura dei parametri fotosintetici può essere utilizzata come un efficace strumento di diagnosi anche precoce di una malattia (Nedbal *et al.*, 2000).

Negli ultimi anni numerosi studi della risposta delle piante ad attacco di patogeni hanno sempre più messo in luce il coinvolgimento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nel processo di patogenesi (Baker e Orlandi, 1995). Molte delle risposte delle piante ai patogeni sono mediate o sono dovute ai ROS, la cui comparsa è stata osservata fin dalle prime fasi dell'infezione (Baker e Orlandi, 1995). I ROS partecipano direttamente al processo di difesa della pianta come molecole a forte carattere antimicrobico. È stato inoltre osservato il loro ruolo indiretto nella modificazione della parete cellulare (Gaspar *et al.*, 1991) e quello diretto nella risposta ipersensibile (HR) (Dmitriev, 2003), nella quale si osserva una rapida morte delle cellule intorno al sito di infezione per arrestare la proliferazione del patogeno.

Nessuno studio effettuato attraverso l'analisi di fluorescenza e di *imaging* ha messo fin ora in luce gli effetti che tale patogeno può avere sull'attività del PSII o sul processo fotosintetico in generale. Obiettivo quindi del presente studio, effettuato presso il Centro Ricerche ENEA di Frascati, in collaborazione con l'Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale di Roma (ISPAVE), è stato quello di valutare l'effetto di *P. lingam* sul processo fotosintetico, attraverso i parametri fotochimici, in piante di *Brassica oleracea*, convar. *Botrytis* L., var. *Italica* Plenck, un'erbacea ortiva a ciclo biennale di forte interesse agronomico. Sono state utilizzate metodologie di analisi di immagine della fluorescenza indotta della clorofilla *a* sia per quantificare i danni riportati dall'ospite durante l'infezione sia per analizzare la malattia sull'intera superficie della foglia, al fine di effettuare una diagnostica precoce. È stata anche stimata la risposta della pianta durante

l'infezione osservando la variazione della concentrazione dei pigmenti e valutando qualitativamente la produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## **2.5. MATERIALI E METODI**

### **Materiali**

Sono state utilizzate due cultivar (cv.) di *Brassica oleracea* var. *Italica*: cv. Calabrese tardivo e cv. Verde romanesco, ottenute da semi provenienti da agricoltura biologica, e ceppi di *Phoma lingam* provenienti da due distinte collezioni:

- ceppo 1290 ER, fornito dal dott. Infantino dell' ISPAVE, isolato da seme;
- ceppo UWA P30, fornito dal Dott. M. Barbetti (Faculty of Natural and Agricultural Sciences, Australia), è stato isolato in natura da pianta infetta.

### **Metodi**

#### **Allevamento delle piante**

Per assicurare una omogeneità di crescita delle piante è stata effettuata una pre-germinazione in camera umida (RH=100%) a  $T=30 \pm 1$  C° per 4 giorni. Successivamente le plantule sono state messe in vasi (10x10x20 cm). Allo scopo di prevenire qualsiasi contaminazione i vasi sono stati lavati e sterilizzati con NaClO 4,5%, mentre il terreno è stato precedentemente sterilizzato in autoclave ( $T=120^{\circ}\text{C}$ , per 20 minuti). Il terreno utilizzato è composto da torba, sabbia e terriccio nei rapporti di 7 : 2 : 1. Le piante sono state allevate in camera di crescita a  $T=24 \pm 1$  C°, RH=60%, 16000 lux, fotoperiodo 16:8 h. Il periodo di crescita è variato in funzione del tipo di inoculazione a cui le piante sono state sottoposte.

#### **Allevamento del fungo**

Allevato *in vitro* in capsula petri su substrato di PDA (Potato Destrosio Agar – Oxoid) a  $T=23 \pm 1$  C° e sub-culturato ogni 20 giorni. Per facilitare la formazione dei picnidi il fungo è stato fatto crescere in assenza di luce. La comparsa dei picnidi su piastra comincia dal settimo giorno di coltura ed arriva a maturazione al ventesimo con la produzione di un essudato rosaceo che fuoriesce dal picnidio. Patogeno semi-obbligato, per mantenerne la virulenza, è stato periodicamente isolato da materiale infetto e con presenza di picnidi. A tale scopo la foglia viene prima inoculata e, alla comparsa di picnidi, sterilizzata per immersione in una soluzione di NaClO al 2% per 1 minuto. Il segmento infetto ritagliato da questa è stato poi piastrato in condizioni asettiche su PDA.

#### **Preparazione dell'inoculo**

L'inoculo è stato preparato secondo il protocollo descritto da Gugel et al., (1990) modificato. Si è utilizzato il fungo di 20 giorni, sul quale si è accertata precedentemente la presenza di picnidi con essudato. Asportato in ambiente sterile micelio e picnidi sono stati raccolti in una quantità nota di

acqua distillata. Dalla soluzione così ottenuta è stata determinata la concentrazione dei conidi mediante camera contaglobuli di spessore 0,1 mm ed area 0,0025 mm<sup>2</sup> (Bunker, Fortuna, Germany). La concentrazione utilizzata per le inoculazioni è di 1 x 10<sup>7</sup> picnidi/ml.

### **Test di patogenicità**

Allo scopo di accertare la patogenicità dei due ceppi sono state effettuate inoculazioni su cotiledone di 25 piante di ciascuna cv. Per entrambe i ceppi 20 piante sono state inoculate con acqua distillata ed usate come controlli. Dopo 10 giorni dall'inoculazione la severità dei danni è stata stimata secondo Bansal *et al.*, (1994) mediante una scala da 0 a 4.

Per confrontare la patogenicità dei due ceppi è stato calcolato l'indice di severità del danno (IS) (Bansal *et al.*, 1994) secondo la seguente formula:

$$IS = \frac{\sum (\text{numero piante in una categoria} \times \text{valore scala danno})}{\sum (\text{numero totale piante} \times \text{massimo valore danno})} \cdot 100 \quad (2.1)$$

Un basso valore di IS, espresso in percentuale, indica una bassa patogenicità. Sono stati confrontati gli IS dei due ceppi verso le due cultivar. Inoltre è stata misurata mediante un calibro manuale la dimensione dell'area necrotica del cotiledone infetto, rilevando il diametro maggiore della lesione.

### **Tecniche di inoculazione**

#### **a) Su fusto**

L'inoculazione su fusto è stata effettuata su piante di 48 giorni. Una goccia di 10 µl di soluzione conidica (1 x 10<sup>7</sup> picnidi/ml) è stata posta sulla ferita procurata dal taglio con bisturi della profondità di 1 mm, a circa 8 cm dal piede. Ciascuna pianta inoculata con la soluzione conidica è stata confrontata con piante inoculate con sola acqua sterile (pianta controllo).

#### **b) Su foglia**

L'inoculazione su foglia è stata effettuata su piante di 48 giorni. Ogni foglia è stata inoculata con 2 gocce di inoculo da 10 µl (1 x 10<sup>7</sup> picnidi/ml), sui due lati opposto della pagina superiore della foglia. La ferita è stata provocata bucando la foglia con un ago del diametro di 200 µm. Ciascuna pianta inoculata con la soluzione conidica è stata confrontata con piante inoculate con sola acqua sterile (pianta controllo).

Per entrambe le inoculazioni, al fine di favorire l'infezione, piante controllo e piante inoculate sono state racchiuse per 5 giorni con un telo di plastica trasparente, così da garantire una umidità del 100%. Le piante sono state messe in camera di crescita alla T=28 ± 1 C°, fotoperiodo 16:8. Trascorso tale periodo la plastica è stata rimossa.

## Fluorescenza ed analisi di immagine

Le misure sono state effettuate utilizzando il fluorimetro Imaging-PAM (Waltz) interfacciato ad un PC per l'elaborazione e la visualizzazione dei dati. Tale sistema elabora, in tempo reale, sia la fluorescenza indotta della clorofilla *a*, sia immagini in due dimensioni del campione. Le misure vengono effettuate attraverso il metodo dell'amplificazione dell'impulso saturante (PAM), messo a punto da Schreiber nel 1986. La variazione della fluorescenza indotta indica i cambiamenti nell'efficienza fotochimica e nella dispersione di energia in calore.

Il sistema è composto dai seguenti componenti (Figura 11):

- Unità di controllo del sistema.
- Sistema di LED-s sopra il campione.
- CCD-camera.
- Sistema per il supporto elettrico.
- PC con il software di comando (Imaging Win-software).

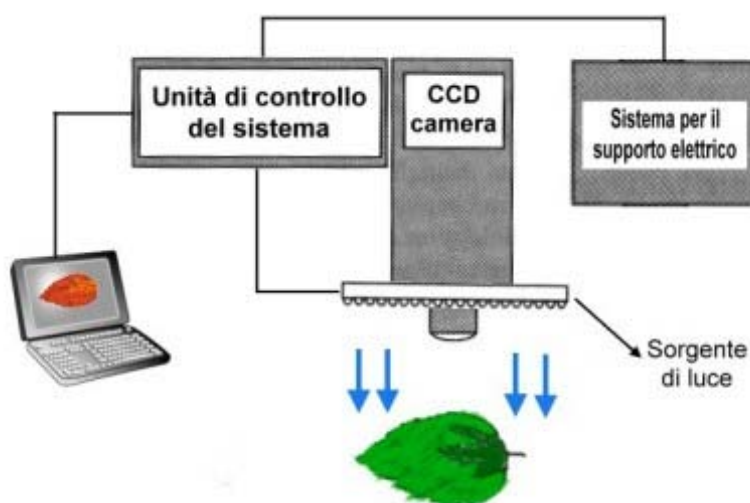


**Figura 11: Schema generale di un fluorimetro Imaging-PAM**

L'unità di controllo connette la CCD-camera al PC e opera la raccolta dei dati verso il computer, oltre a definire i parametri utili alle misure. La sorgente luminosa è composta da 96 LED-s a luce nel blu ( $\lambda=470$  nm), 8 LED-s a luce rossa ( $\lambda=650$  nm) e 8 LED-s per la luce nel vicino infrarosso (NIR,  $\lambda=780$  nm). Per la luce nel blu l'intensità standard di eccitazione è di  $0,5 \mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; la massima intensità di luce attinica è di  $1500 \mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; l'intensità massima dell'impulso saturante è di  $2400 \mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . La CCD-camera, posizionata sopra il campione, possiede due filtri che permettono il passaggio della luce con una lunghezza d'onda compresa fra 640 e 780 nm.

Il software di comando (Imaging Win-software) opera l'analisi dei dati e la loro visualizzazione in forma di immagini. A tale scopo viene adottata una scala in falsi colori per tutti i parametri di fluorescenza (valori compresi fra 0 ed 1)

Per garantire la resa di immagini in fluorescenza uniformi la CCD-camera deve essere opportunamente calibrata con l'utilizzo di uno standard rosso, utile a determinare un valore di colore uniforme su tutta la superficie. Successivamente il campione *in vivo* è posto sotto lo strumento che effettua la misura. I risultati vengono forniti attraverso informazioni di analisi di immagine per ogni parametro misurato e misure quantitative degli stessi parametri misurati. Tali parametri sono rappresentati da:

- $F_0$  (fluorescenza minima al buio) e  $F_0'$  (fluorescenza minima alla luce);
- $F_m$  (fluorescenza massima al buio) e  $F_m'$  (fluorescenza massima alla luce);
- $F$  (effettiva intensità di fluorescenza in ogni momento, nel testo indicata come  $F_L$ );
- $F_v/F_m$  (massima resa quantica del PSII) e  $F_v'/F_m'$  (o  $Y(II)$ , resa quantica del PSII);
- $qN$  (quenching non-fotochimico);
- $qP$  (quenching fotochimico);
- ETR (trasporto elettronico);

I valori dei parametri possono essere ottenuti da grafici fluorescenza-tempo (curva di induzione buio-luce) oppure intensità di luce-trasporto elettronico (curva di luce). Per determinare in modo corretto la curva di induzione buio-luce le piante sono state poste in assenza di luce per almeno 20 min, allo scopo di aprire i centri di reazione e determinare correttamente i parametri di buio. Successivamente si è osservata la resa di fluorescenza nel tempo delle stesse piante, mantenendo la luce attinica costante a  $80 \mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Da precedenti prove effettuate su diversi campioni tale luce attinica è risultata in grado di attivare in modo completo il processo fotosintetico, senza saturare i centri di reazione. Nella curva di luce invece, allo scopo di ottenere valori corretti di ETR, il campione è stato prima adattato alla luce attinica per almeno 10 min e poi è stato sottoposto ad una intensità luminosa crescente. Sia per la curva di induzione buio-luce che per la curva di luce è stata usata un'intensità di impulso saturante di  $1200 \mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR.

Le misure sono state eseguite su foglie di piante:

- a) inoculate su fusto (esperimento 1)
- b) inoculate su foglia (esperimento 2)

Per le caratteristiche proprie della diagnostica non-distruttiva è stata seguita sempre la stessa foglia della stessa pianta.

### **a) Esperimento 1: piante inoculate su fusto**

Sono state analizzate la quarta e la quinta foglia vera di 15 piante inoculate su fusto ( $n=30$ ), in confronto con i controlli inoculati con acqua sterile, utilizzate allo scopo di valutare la risposta in fluorescenza in tale tipo di infezione. Anche per questo esperimento si è effettuato lo screening prima dell'inoculazione ( $T_0$ ), svolto con le stesse modalità dell'inoculazione su foglia. Sia i controlli che gli inoculati, sono stati seguiti nel tempo effettuando le misure ad intervalli di 6, 12, 19, 21 e 26 giorni dall'inoculazione.

### **b) Esperimento 2: piante inoculate su foglia**

Le misure di fluorescenza sono state effettuate sulle stesse foglie sulle quali è stata effettuata l'inoculazione. Sono state analizzate la quarta-quinta foglia vera di 15 piante inoculate su foglia, in confronto con controlli inoculati con acqua sterile, ad intervalli di 4, 7, 8, 11, 14 e 18 giorni dall'inoculazione. Per analizzare esclusivamente piante in condizioni fisiologiche ottimali, prima dell'inoculazione ( $T_0$ ), è stato effettuato uno screening valutando la massima resa quantica del PSII ( $F_v/F_m$ ). La presenza sia nei controlli che negli inoculati di piante in condizioni fisiologiche non ottimali avrebbe potuto fornire dati non confrontabili.

Per l'analisi di immagine, su ogni foglia sono stati individuati 3 punti di analisi:

- punto di inoculo
- zona immediatamente adiacente
- zona lontana dall'infezione

### **Estrazione dei pigmenti di campioni inoculati dell'esperimento 1**

Il contenuto dei pigmenti fogliari è stato valutato mediante analisi spettrofotometrica di estratti in soluzione di acetone all'80% al buio ed a 4°C per 24h. Il campione è stato quindi centrifugato a 4000 rpm per 20 min a 4°C. Infine dalla lettura del surnatante eseguita fra 400 e 800 nm è stata determinata la concentrazione in  $\mu\text{g}/\text{mg}$  di Chl *a*, Chl *b* e Car secondo l'equazioni di Lichtenthaler (1987).

Le misure sono state effettuate su foglie di 5 piante ( $n=5$ ) di 51 giorni inoculate su fusto e confrontate con i controlli. Ogni foglia è stata suddivisa in 6 segmenti di 1 cm<sup>2</sup> (6 repliche/foglia). Ognuna di queste è stata accuratamente pesata. I prelievi sono stati effettuati a 8, 12, 18 e 25 giorni dall'inoculazione.

### **Determinazione qualitativa dell'acqua ossigenata nell'esperimento 2**

La stima qualitativa dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nei campioni analizzati è stata effettuata utilizzando il saggio colorimetrico descritto da Thordal-Christensen *et al.* (1997). Per tale determinazione è stato usato il

DAB (Diamminobenzudina), in grado di polimerizzare istantaneamente e localizzarsi nei siti in cui vi è produzione di  $H_2O_2$ . I polimeri formati sono visibili come ammassi bruno-marroni all'analisi microscopica in diffrazione.

I campioni da saggiare sono stati ottenuti prelevando la porzione di foglia contenente i due punti di inoculo, in confronto con un controllo inoculato con acqua sterile. I campioni sono stati immersi nella soluzione di reazione, contenente DAB 1 mg/ml, e tenuti in agitazione a 100 rpm a  $T = 30^\circ C$ , per permettere al colorante di penetrare nei tessuti. Essendo il DAB fotosensibile la soluzione in agitazione è stata tenuta al buio. Dopo 24 h la soluzione di DAB è stata sostituita con etanolo al 96% per 30 min a  $65^\circ C$ , in modo da consentire il fissaggio del colorante nei tessuti. In seguito la soluzione è stata portata a temperatura ambiente e sostituita con una nuova soluzione di etanolo al 96% per l'osservazione con microscopio ottico (4x e 10x).

L'inoculazione per il saggio è stata effettuata su foglie di piante di 51 giorni. Sono state inoculate 3 piante con il patogeno in confronto a controlli inoculati con acqua sterile. Sulle foglie delle piante inoculate sono state prelevate porzioni di foglia di 1 cm di diametro, scelte in modo da contenere il punto di inoculo. Su tali porzioni è stata effettuata la colorazione e confrontata con quella dei controlli. I prelievi sono stati eseguiti ad intervalli di tempo di 4, 6, 8, 24 ore, dal momento dell'inoculazione. Sono stati effettuati 2 prelievi per ogni foglia, partendo dalla terza alla sesta foglia vera.

## **Elaborazione dati**

L'analisi dei dati di fluorescenza è avvenuta attraverso il software Imaging Win-software (versione V 0.55, Walz). L'elaborazione statistica dei dati per l'analisi di varianza, coefficiente di variazione, valore F, differenze tra le medie (*test di Duncan*) è stata fatta con il programma SPSS per Windows, Release 11.0.

## **2.6. RISULTATI**

### **2.6.1. Test di patogenicità**

In Tabella 2 sono mostrati i risultati del test di patogenicità dei due ceppi analizzati.

L'indice di severità del danno è circa 3 volte significativamente superiore ( $F=30,828$ ;  $P \leq 0,001$ ) nel ceppo UWA P30 (65% e 50%) in confronto al ceppo 1290 ER (19% e 15%). Il re-isolamento da cotiledone inoculato del ceppo 1290 ER ha evidenziato che il fungo, pur sviluppando abbondante micelio, non ha prodotto mai picnidi. Al posto di questi ha prodotto esclusivamente strutture cellularizzate, non cave, amorfe, a funzione non infettiva, ma di resistenza, dette *picnidosclerozi* (Boerema e van Kesteren, 1964). Il reisolamento del ceppo UWA P30 invece ha mostrato la produzione di picnidi con essudato, che conferma la sua alta virulenza (Bansal *et al.*, 1994). Gli

esperimenti condotti sulla cv. Calabrese tardivo hanno dimostrato danni significativamente superiori ( $F=30,828$ ;  $P\leq 0,044$ ) rispetto la cv. Verde romanesco. Per tale motivo è stata utilizzata la cv. Calabrese tardivo per le successive analisi.

**Tabella 2: Test di patogenicità dei ceppi 1290 ER e UWAP30 inoculati su cotiledoni sulle cultivar Calabrese tardivo e Verde romanesco. Nella tabella è riportato l'errore standard. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi per  $P\leq 0,05$ . \*\*\*= significativo per  $P\leq 0,001$ . IS=indice di severità del danno.**

| <b>Ceppo fungino</b> | <b>Cultivar</b>   | <b>n° cotiledoni inoculati</b> | <b>Severità danno<br/>(<math>\pm</math> S.E.)</b> | <b>IS<br/>(%)</b> |
|----------------------|-------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------|
| 1290 ER              | Calabrese tardivo | 45                             | $0,78 \pm 0,13$ c                                 | 19                |
| 1290 ER              | Verde romanesco   | 45                             | $0,80 \pm 0,22$ c                                 | 15                |
| UWA P30              | Calabrese tardivo | 42                             | $2,62 \pm 0,22$ a                                 | 65                |
| UWA P30              | Verde romanesco   | 46                             | $2 \pm 0,16$ b                                    | 50                |
| <b>F</b>             | $F=30,828$ ***    |                                |                                                   |                   |

## 2.6.2. Analisi della fluorescenza indotta della clorofilla *a*

### Esperimento 1

#### Piante inoculate su fusto: analisi dei parametri fotochimici

L'effetto dell'attività del patogeno su piante inoculate su fusto è stato misurato valutando i parametri di fluorescenza  $F_v/F_m$ ,  $Y(II)$ , ETR,  $qP$  e NPQ della foglia in confronto al controllo. La Figura 12 mostra i risultati della massima resa del PSII al buio, espressa come  $F_v/F_m$ , delle piante inoculate e delle piante controllo a diversi giorni dall'inoculazione. Per assicurarsi di scegliere piante in condizioni fisiologiche ottimali tutte le piante sono state valutate prima dell'inoculazione ( $T_0$ ). I risultati mostrano valori di  $F_v/F_m$  simili a quelli riportati in letteratura per piante nel normale stato fisiologico (Bjorkman e Demming, 1987) (Figura 12). Dopo 6 giorni nei controlli si osserva una diminuzione di  $F_v/F_m$ , comunque non significativa secondo il test di Duncan, rispetto al valore osservato a  $T_0$  (Figura 12). Questo risultato è spiegabile secondo le modalità di inoculazione. Infatti per favorire l'infezione tutte le piante, inclusi i controlli, nei 5 giorni successivi l'inoculazione sono

state sottoposte a condizioni di temperatura ed umidità più alte rispetto alle normali condizioni di crescita. Tale trattamento ha influito in modo negativo sulla fisiologia di tutte le piante trattate.

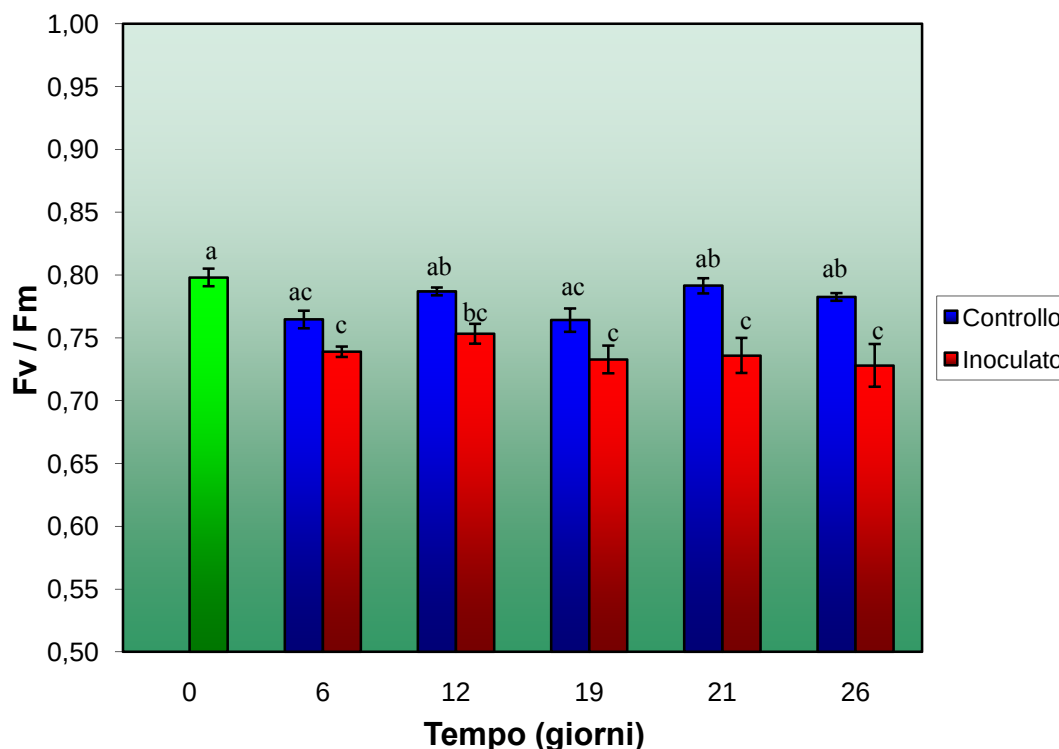


**Figura 12: Resa quantica del PSII al buio, espressa come  $F_v/F_m$ , su foglie di piante inoculate su fusto a diversi giorni dall'inoculazione. Le barre indicano l'errore standard.  $F=4,986$  \*\*\*. \*\*\*= significativo per  $P \leq 0,001$ .**

Non si osservano differenze significative fra piante controllo e le piante inoculate fino al 21° giorno, dove invece si osserva una diminuzione statisticamente significativa di circa il 10 % di  $F_v/F_m$  rispetto al controllo non inoculato (Figura 12). Dopo questo periodo di tempo l'invasione da parte del patogeno può ritenersi quasi completa (West *et al.*, 2001) e l'ostruzione dei vasi di conduzione porta ad un effetto simile a quello dello stress idrico, che induce una diminuzione nell'attività del PSII (Girardi *et al.*, 1996). La diminuzione del turgore nei tessuti di tutte le piante inoculate su fusto che sviluppano la sintomatologia tipica si osserva già dopo il 12° giorno e diventa evidente a 21 giorni (Foto 1).



**Foto 1: Pianta inoculata su fusto dopo 21 giorni dall'inoculazione in confronto alla pianta controllo**

Allo scopo di scegliere la migliore intensità di luce per la valutazione del trasporto elettronico tutte le piante sono state sottoposte ad intensità di PAR crescente da 0 a  $1200 \mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . È stata scelta la PAR di  $460 \mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in quanto a tale intensità tutte le piante hanno espresso il massimo di trasporto elettronico prima della saturazione (Figura 13).

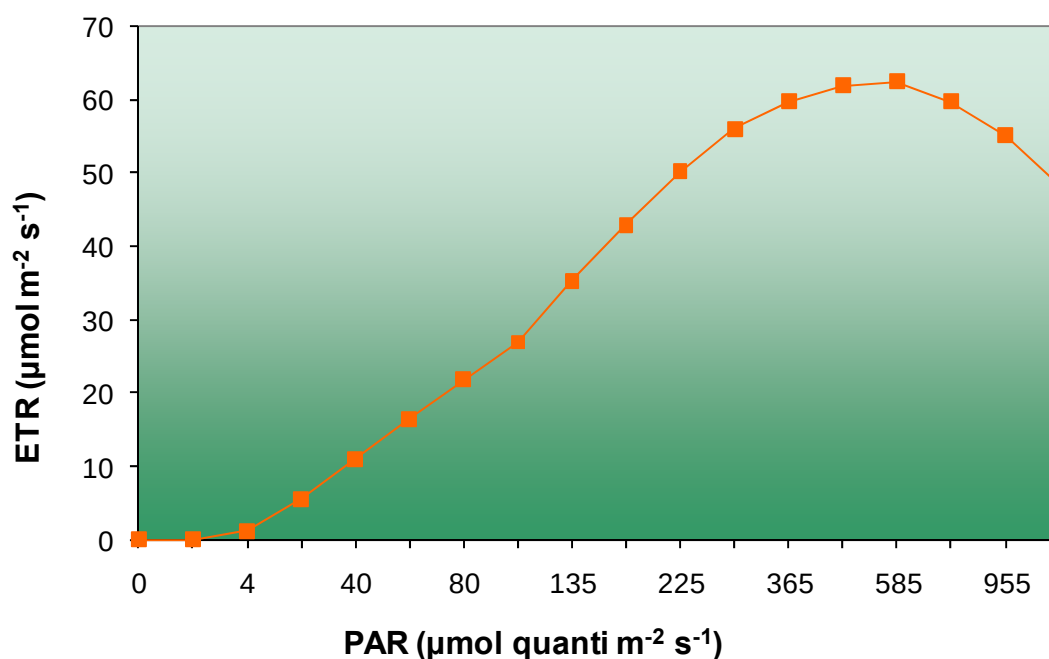


**Figura 13: Trasporto elettronico, espresso come ETR, ad intensità di luce crescente in piante di *B. oleracea* di 30 giorni.**

Nella Figura 14 sono riportati i valori di ETR a diversi giorni dall'inoculazione di piante inoculate su fusto in confronto ai controlli. In tutti i giorni di misura si osserva un valore significativamente più alto di ETR nei controlli rispetto alle piante inoculate ( $F=22,361$ ;  $P\leq 0,001$ ). Già dopo 6 giorni dall'inoculazione il trasporto elettronico delle piante inoculate appare significativamente differente rispetto al controllo ( $ETR=59b \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $ETR=46,9a \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , significativamente diversi secondo il test di Duncan). Nei giorni successivi l'ETR delle piante inoculate, diminuisce significativamente ( $F=22,361$ ;  $P\leq 0,001$ ) fino al valore minimo di  $22,8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (48% inferiore rispetto al 6° giorno), che indica una diminuzione dell'attività fotosintetica. A partire da 19 giorni dall'inoculazione anche nelle piante controllo si osserva la diminuzione significativa del trasporto elettronico, comunque sempre significativamente più alta delle piante inoculate.

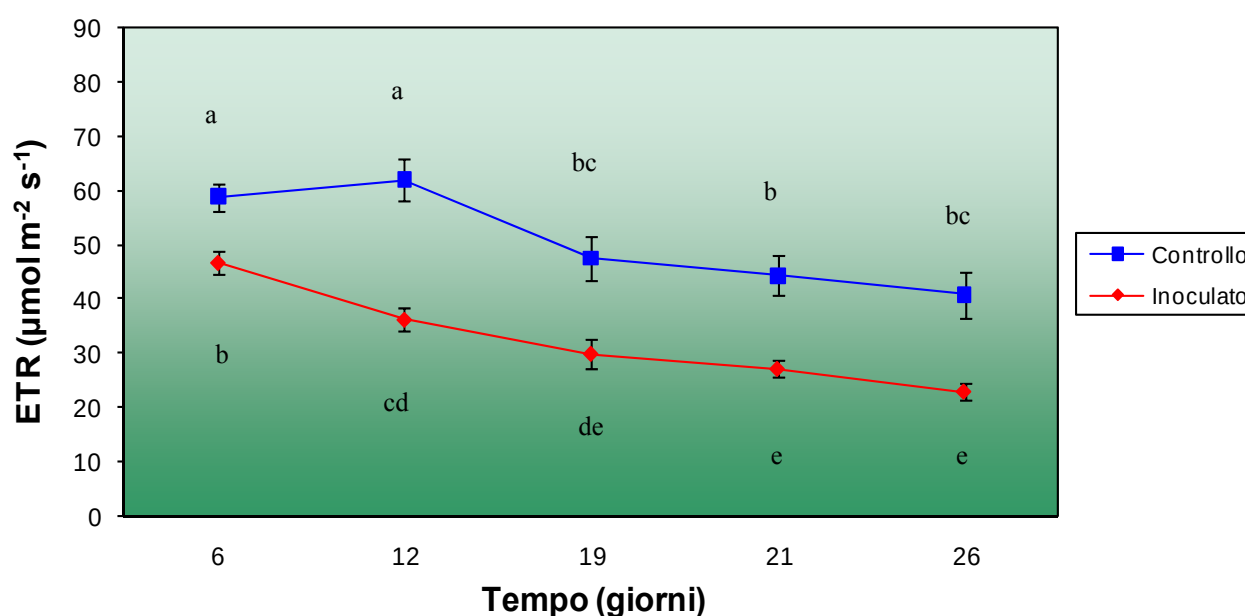


**Figura 14:** Trasporto elettronico, espresso come ETR, di foglie di piante inoculate su fusto (PAR utilizzata  $460 \mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a diversi giorni dall'inoculazione. Le barre indicano l'errore standard.  $F=22,361$  \*\*\*. \*\*\*= significativo per  $P\leq 0,001$ . I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Duncan per  $P\leq 0,05$ .

Sono stati misurati i parametri  $Y(II)$  (Figura 15),  $qP$  (Figura 16) ed  $NPQ$  (Figura 17) ottenuti dalla curva di induzione buio-luce ad una PAR di  $80 \mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Già dopo 6 giorni  $Y(II)$  è del 15% significativamente inferiore rispetto al controllo (grafico 7) e, in accordo con ETR, è significativamente diverso in tutti i giorni di misura ( $F=10,151$ ;  $P\leq 0,001$ ). Nei controlli  $Y(II)$  si mantiene costante nel tempo. La graduale e lenta diminuzione di  $Y(II)$  osservata nelle piante inoculate (Figura 15) mostra il suo minimo nell'ultimo giorno di misura ( $Y(II)=0,44$ ),

significativamente diverso, secondo il test di Duncan, rispetto a quello osservato nei giorni

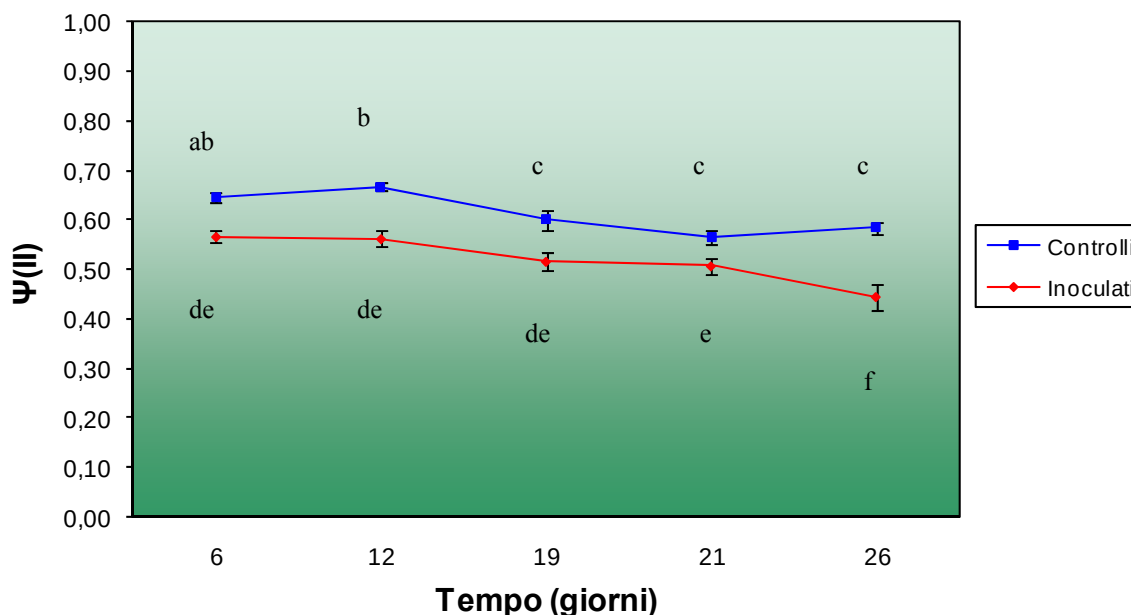


**Figura 15:** Resa quantica del PS II, espressa come Y(II), di foglie di piante inoculate su fusto (PAR utilizzata  $460 \mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a diversi giorni dall'inoculazione. Le barre indicano l'errore standard. Valore di  $F=10,151$  \*\*\*. \*\*\*= significativo per  $P \leq 0,001$ .

precedenti. Questo potrebbe indicare che il danno al PSII, osservato già dal primo giorno, diviene rilevante anche per la sua attività dal 26° giorno in poi.

La Figura 16 mostra il quenching fotochimico (qP) delle piante inoculate su fusto in confronto ai controlli nei diversi giorni dopo l'inoculazione. In tutti i giorni di misura, ad eccezione del primo in cui non ci sono differenze secondo il test di Duncan, si osservano valori di qP significativamente inferiori nelle piante inoculate ( $F=8,024$ ;  $P \leq 0,001$ ). Anche nei controlli si osserva una diminuzione comunque non significativa secondo il test di Duncan fino a 19 giorni. Le piante inoculate mostrano valori di qP significativamente inferiori rispetto al controllo già a 12 giorni dall'inoculazione, in accordo con la diminuzione significativa del trasporto elettronico (Figura 14) e della resa quantica per la fotochimica del PSII (Figura 15) ed indica una diminuzione dell'efficienza fotosintetica.

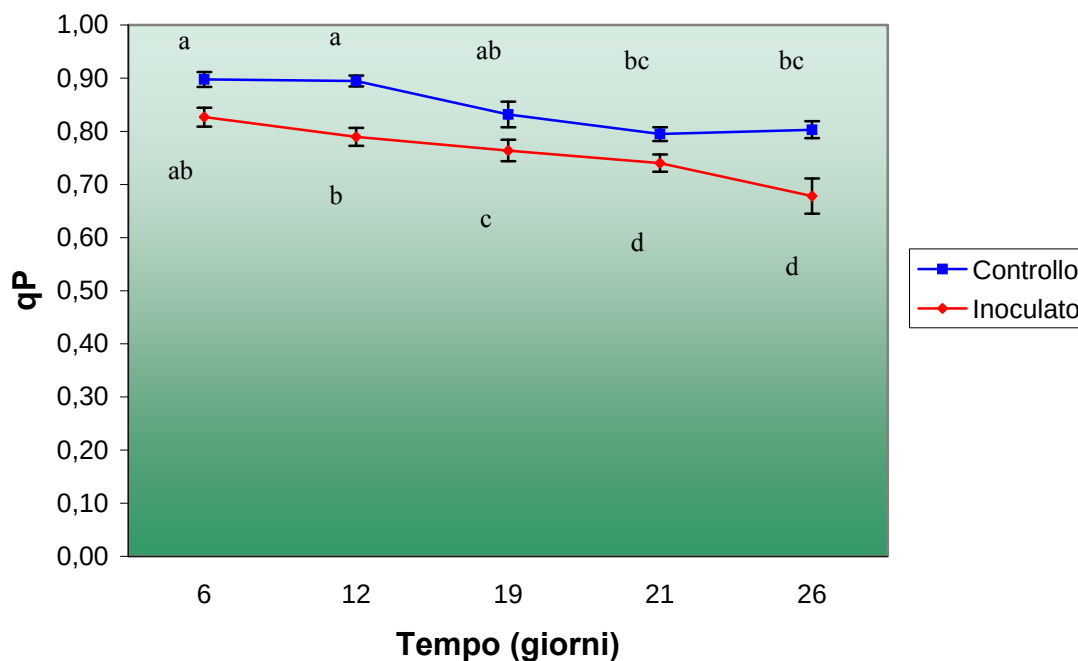


Figura 16: Quenching fotochimico, espresso come qP, di foglie di piante inoculate su fusto (PAR utilizzata  $460 \mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a diversi giorni dall'inoculazione. Le barre indicano l'errore standard.

$F=8,024$  \*\*\*. \*\*\*= significativo per  $P \leq 0,001$ . I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Duncan per  $P \leq 0,05$ .

La Figura 17 mostra i risultati del quenching non-fotochimico (NPQ) delle piante inoculate con il patogeno su fusto in confronto ai controlli a diversi giorni dall'inoculazione. I valori di NPQ delle piante inoculate nei diversi giorni di misura non sono significativamente diversi rispetto ai controlli e tra di loro in tutti i giorni di misura ( $F=1,892$ ;  $P=0,059$ ). Un aumento di tale parametro, in genere normalizzato a 4 (NPQ/4), indica una maggiore attivazione del ciclo delle xantofille con formazione di una maggiore concentrazione di zeaxantina (Demming-Adam *et al.*, 1990). Il risultato ottenuto, insieme al minore valore di qP (Figura 16) in confronto col controllo, indica che l'energia persa dal PSII delle piante inoculate è stata dissipata attraverso altre vie che non hanno coinvolto il ciclo delle xantofille.

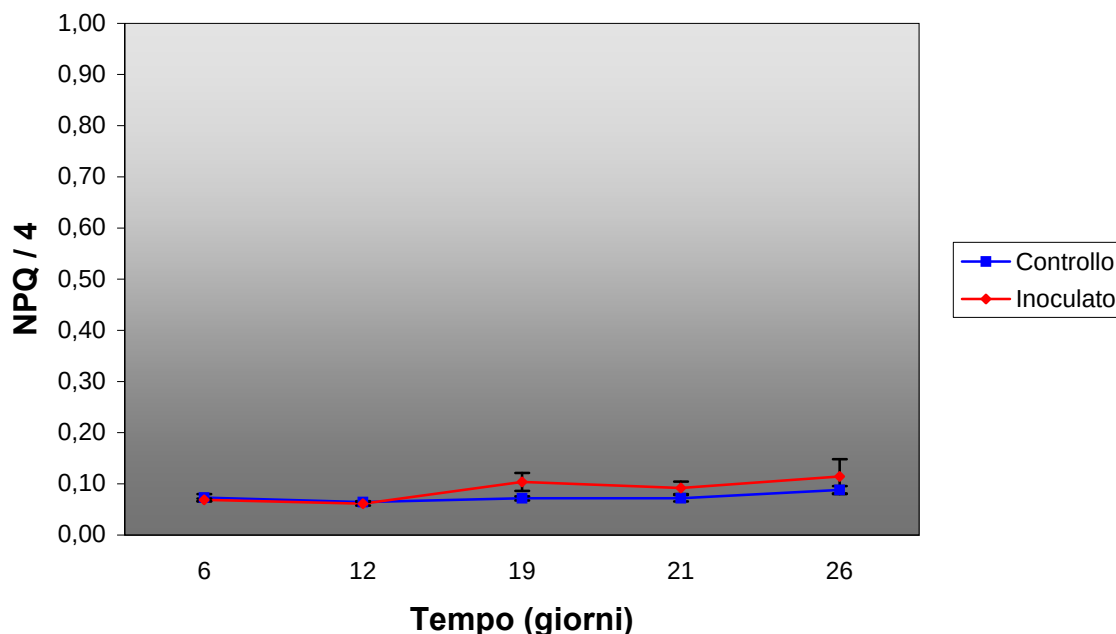


**Figura 17: Quenching non-fotochimico, espresso come NPQ, di foglie di piante inoculate su fusto (PAR utilizzata  $460 \mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a diversi giorni dall'inoculazione su fusto. Le barre indicano l'errore standard.  $F=1,892$ ; non significativo.**

### **Analisi di immagine dei parametri fotochimici**

L'analisi di immagine delle foglie di piante inoculate su fusto è mostrata nelle Figura 18÷Figura 20 per il parametro  $F_L$ , Figura 21÷Figura 23 per il parametro  $Y(II)$ , Figura 24÷Figura 26 per il parametro  $qP$ , Figura 27÷Figura 29 per il parametro  $qN$ . Le immagini sono state raccolte durante lo stadio 3 della curva di induzione (Figura 8; Cap 1) (luce attinica di  $460 \mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Fra tutti i campioni analizzati è stata scelta la pianta inoculata maggiormente rappresentativa ed è stata seguita nel tempo a 6, 12, 19, 21 e 26 giorni dall'inoculazione e confrontata con un controllo inoculato con acqua sterile. L'immagine del parametro  $F_L$  è omogenea su tutta la superficie fogliare in tutti i giorni successivi all'inoculazione (Figura 18-Figura 19), tranne a 26 giorni (Figura 20), dove, oltre al valore di  $F_L$  più alto nell'inoculato ( $F_L=0,383$ ) rispetto al controllo ( $F_L=0,219$ ) su tutta la superficie, si osservano anche delle zone di diversa fluorescenza in tutte e due le foglie (Figura 20). Infatti nelle foglie delle piante inoculate (Figura 20b) i valori di  $F_L$  sono di 0,342 e di 0,454 comunque superiori rispetto al controllo ( $F_L=0,194$  e  $F_L=0,242$ ) (Figura 20a). La maggiore quantità di energia persa come fluorescenza dal PSII delle piante inoculate riflette la minor attività fotosintetica. La resa quantica del ( $Y(II)$ ) del campione inoculato non mostra differenze fra controllo ed inoculato dopo 6, 12 e 19 giorni, i cui valori non cambiano nel tempo fino a 21 giorni dall'inoculazione (Figura 22). A questo tempo si osserva un valore di  $Y(II)$  per il controllo di 0,663 e di 0,485 per le piante inoculate. Tale risultato sta ad indicare la minor resa quantica del PSII delle piante inoculate, come aspettato. A 26 giorni dall'inoculazione (Figura 23) si ha una ulteriore

aumento delle differenze osservate fra le piante controllo e le piante inoculate, i cui valori di  $Y(II)$  risultano rispettivamente di 0,536 e 0,383. Inoltre in tale giorno per l' inoculato si osserva anche la comparsa di zone con diversi valori  $Y(II)$  (Figura 23b).

Le Figura 24-Figura 25-Figura 26 mostrano l'immagine del quenching fotochimico ( $qP$ ) e si osserva che a 6, 12, 19 e 21 giorni, ad eccezione delle aree lungo le venature maggiori, non ci sono differenze fra controllo ed inoculato come eterogeneità di risposta della foglia (Figura 24-Figura 25). Dopo 26 giorni (Figura 26) il valore di  $qP$  del controllo, anche se è inferiore rispetto ai precedenti giorni di misura ( $qP=0,741$ ), è comunque maggiore dell'inoculato ( $qP=0,698$ ), come sempre osservato fin dal primo giorno di misura (Figura 24-Figura 26). A 26 giorni, inoltre, per l'inoculato (Figura 26b) si osservano diversi valori di  $qP$  sulla superficie fogliare, che variano da un massimo di 0,725 ad un minimo di 0,632. Le Figura 27-Figura 28-Figura 29 mostrano l'immagine del quenching non-fotochimico ( $qN$ ) nei giorni successivi l'inoculazione su fusto. In tutti i giorni di misura non si riscontra una disomogeneità nella risposta fogliare per tale parametro, fatta eccezione per le venature maggiori. Dal confronto dei valori del quenching non-fotochimico emerge che in tutti i giorni di misura il valore di  $qN$  dei controlli risulta sempre minore di quello degli inoculati, ed è evidente all'ultimo giorno dove tale differenza risulta del 18%. Ciò è in accordo con quanto osservato per il parametro  $qP$ , in quanto ad un più basso valore del quenching fotochimico corrisponde un più alto valore del quenching non-fotochimico. L'analisi di immagine dei parametri di fluorescenza conferma, non solo per il controllo e l'inoculato utilizzati per il confronto, ma anche in tutti i campioni analizzati, l'assenza del patogeno sulla superficie fogliare e sottolinea che l'effetto del patogeno sull'attività fotosintetica, dovuto alla proliferazione del fungo nei tessuti di conduzione, porta ad un effetto simile a quello dello stress idrico in cui si osserva una diminuzione di attività del PSII (Noguès *et al.*, 2002), testimoniata dai diversi valori dei parametri di fluorescenza dell'inoculato rispetto al controllo.

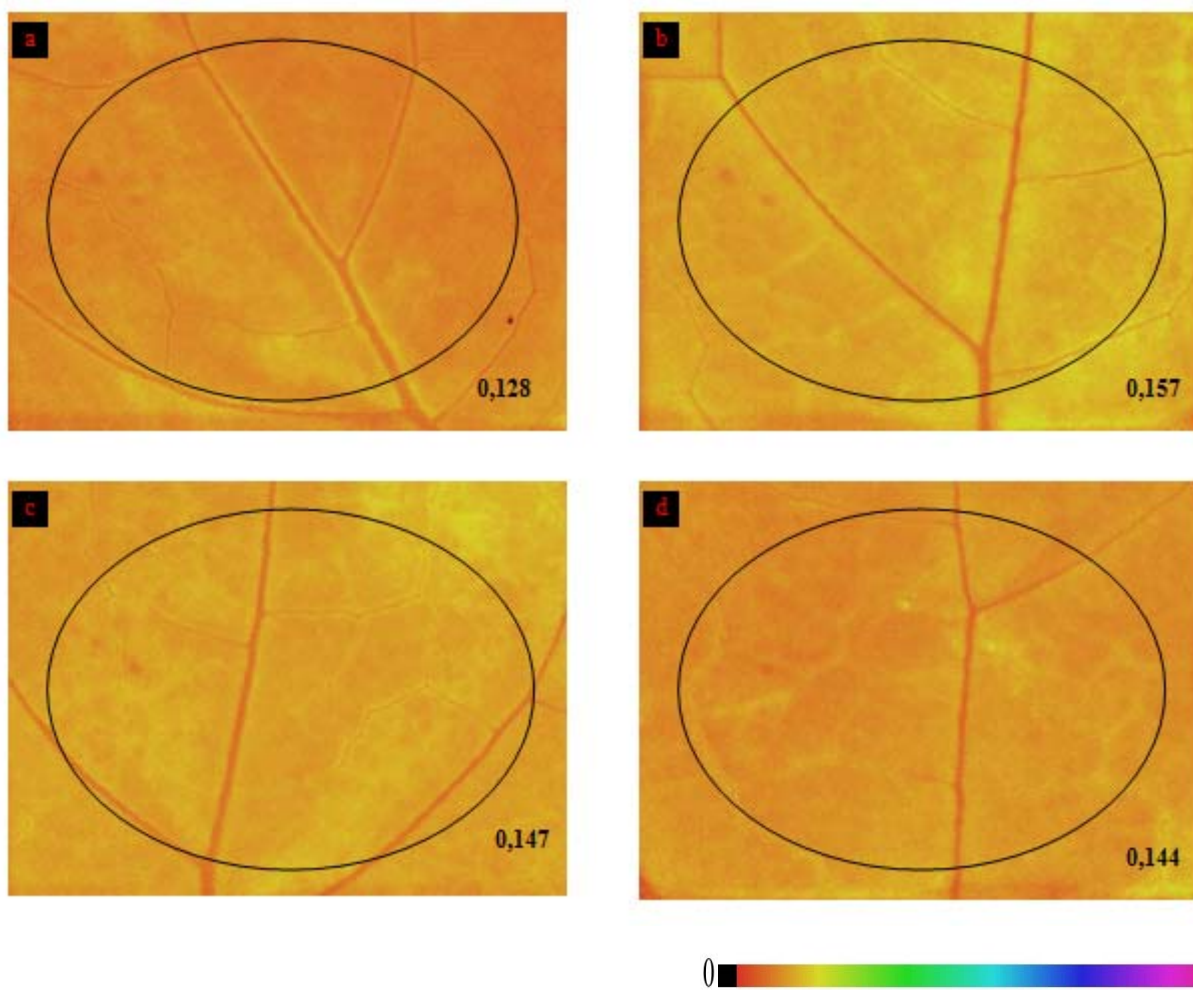


**Figura 18:** Analisi di immagine del parametro  $F_L$  (PAR di 460  $\mu\text{mol}$  quanti  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) su foglie di piante inoculate su fusto: a) controllo 6 giorni; b) inoculato 6 giorni dall'inoculazione; c) controllo 12 giorni; d) inoculato 12 giorni dall'inoculazione. Barra colorimetrica: 0= minima fluorescenza; 1= massima fluorescenza.

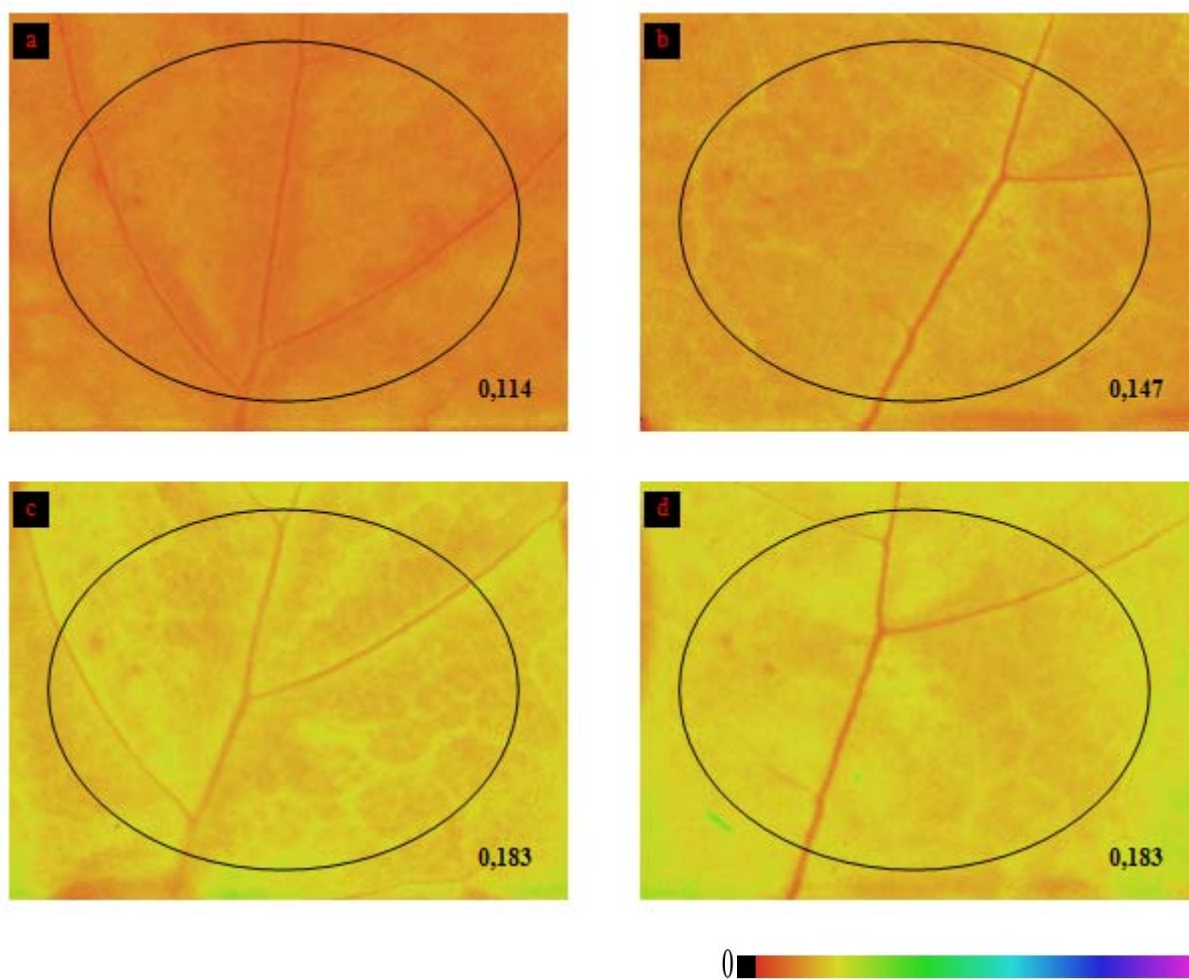


Figura 19: Analisi di immagine del parametro  $F_L$  (PAR di 460  $\mu\text{mol}$  quanti  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) su foglie di piante inoculate su fusto: a) controllo 19 giorni; b) inoculato 19 giorni dall'inoculazione; c) controllo 21 giorni; d) inoculato 21 giorni dall'inoculazione. Barra colorimetrica: 0= minima fluorescenza; 1= massima fluorescenza.

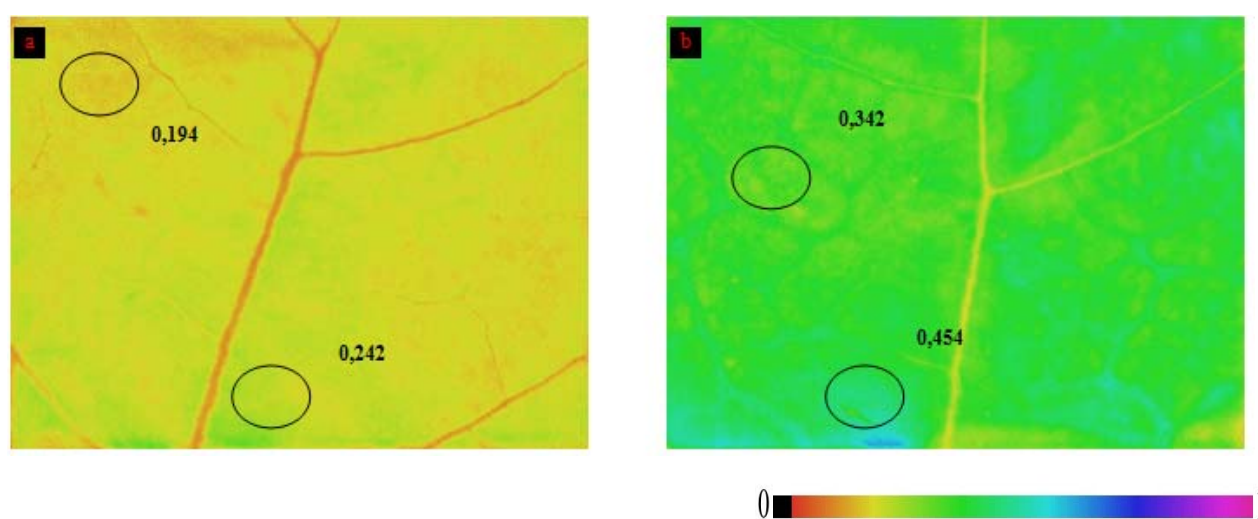


Figura 20: Analisi di immagine del parametro  $F_L$  (PAR di 460  $\mu\text{mol}$  quanti  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) su foglie di piante inoculate su fusto: a) controllo 26 giorni; b) inoculato 26 giorni dall'inoculazione. Barra colorimetrica: 0= minima fluorescenza; 1= massima fluorescenza.

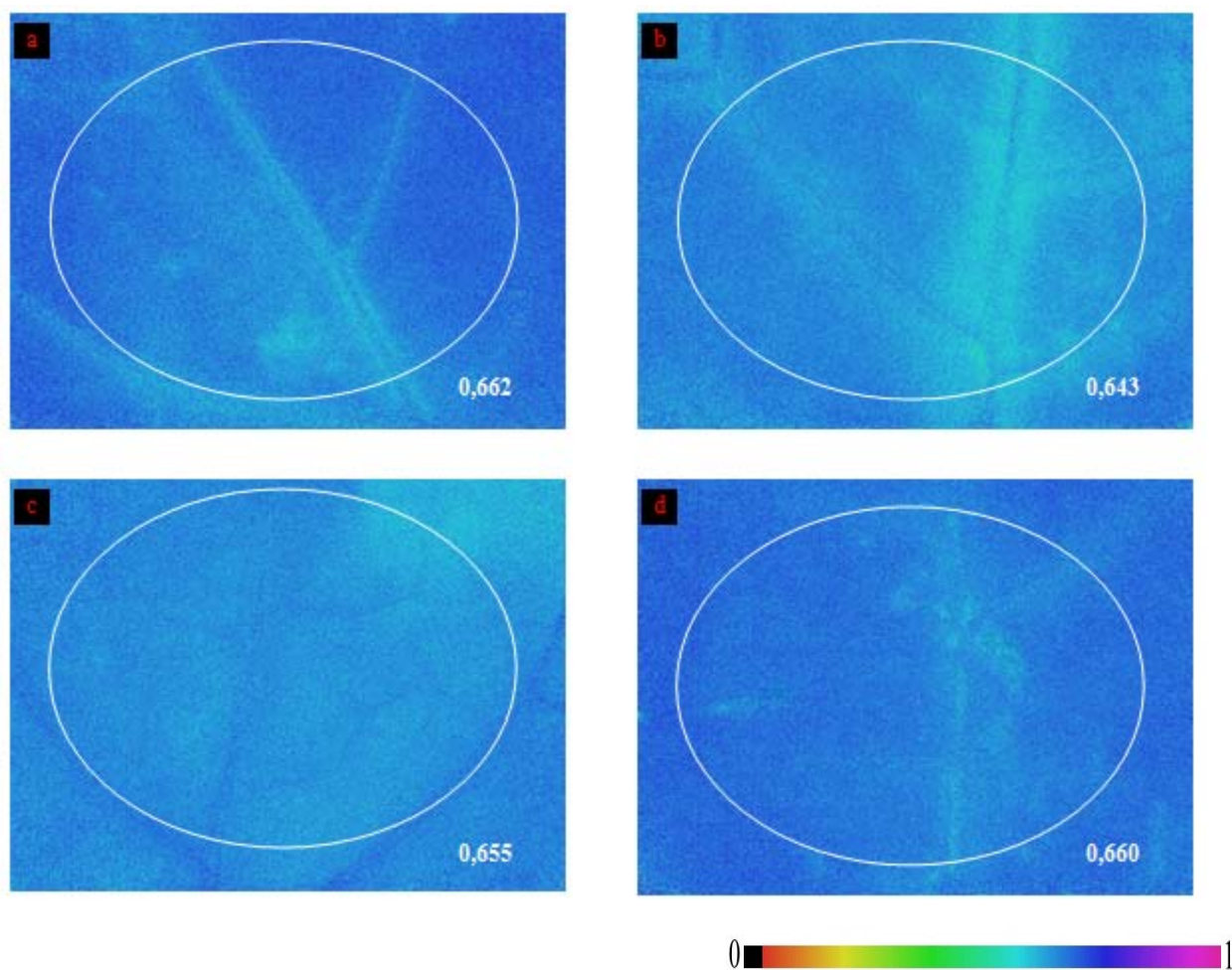


**Figura 21: Analisi di immagine del parametro Y(II) (PAR di 460  $\mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) su foglie di piante inoculate su fusto: a) controllo 6 giorni; b) inoculato 6 giorni dall'inoculazione;c) controllo 12 giorni; d) inoculato 12 giorni dall'inoculazione. Barra colorimetrica: 0= minima fluorescenza; 1= massima fluorescenza.**

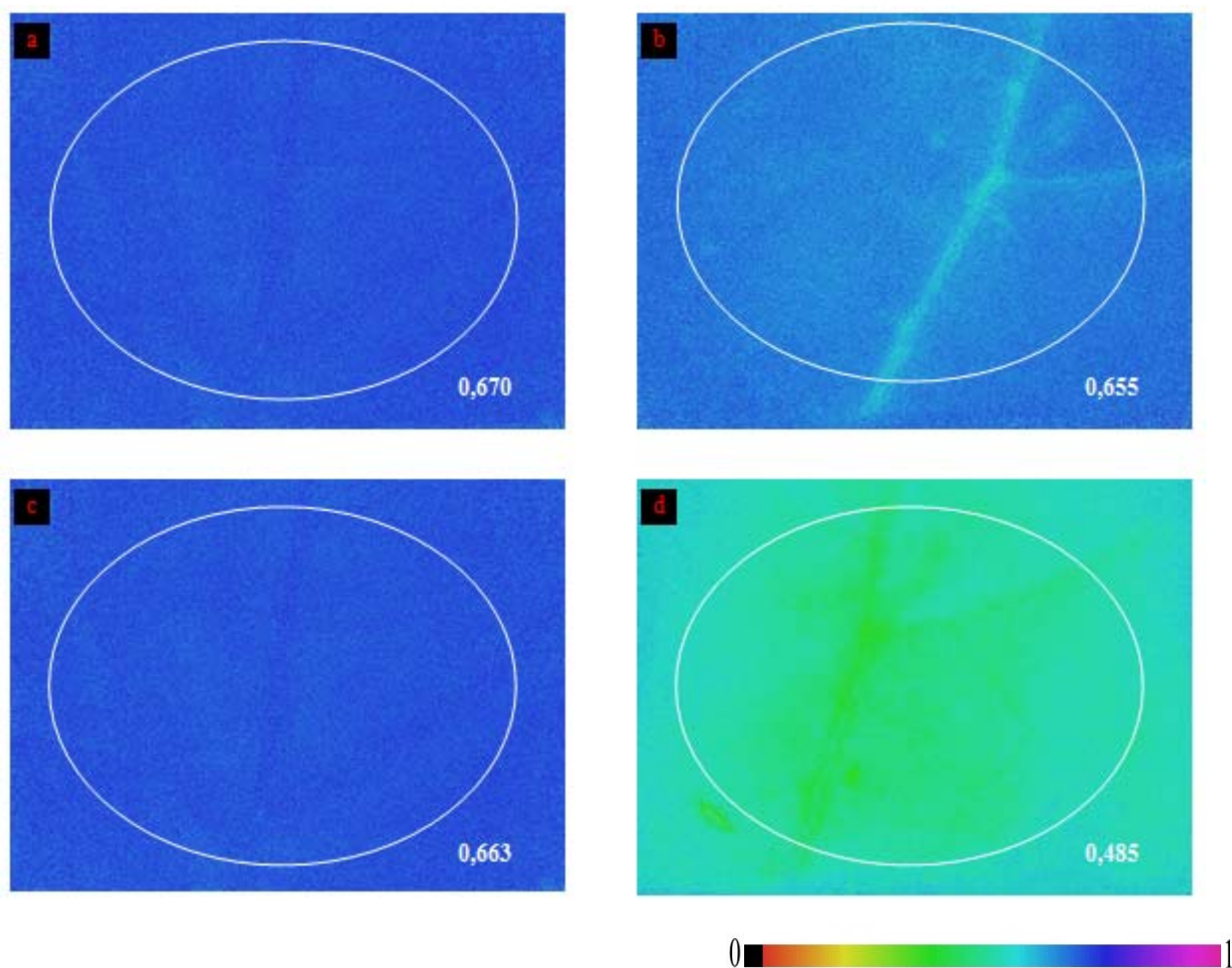


Figura 22: Analisi di immagine del parametro Y(II) ( $\text{PAR di } 460 \mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) su foglie di piante inoculate su fusto: a) controllo 19 giorni; b) inoculato 19 giorni dall'inoculazione; c) controllo 21 giorni; d) inoculato 21 giorni dall'inoculazione. Barra colorimetrica: 0= minima fluorescenza; 1= massima fluorescenza.

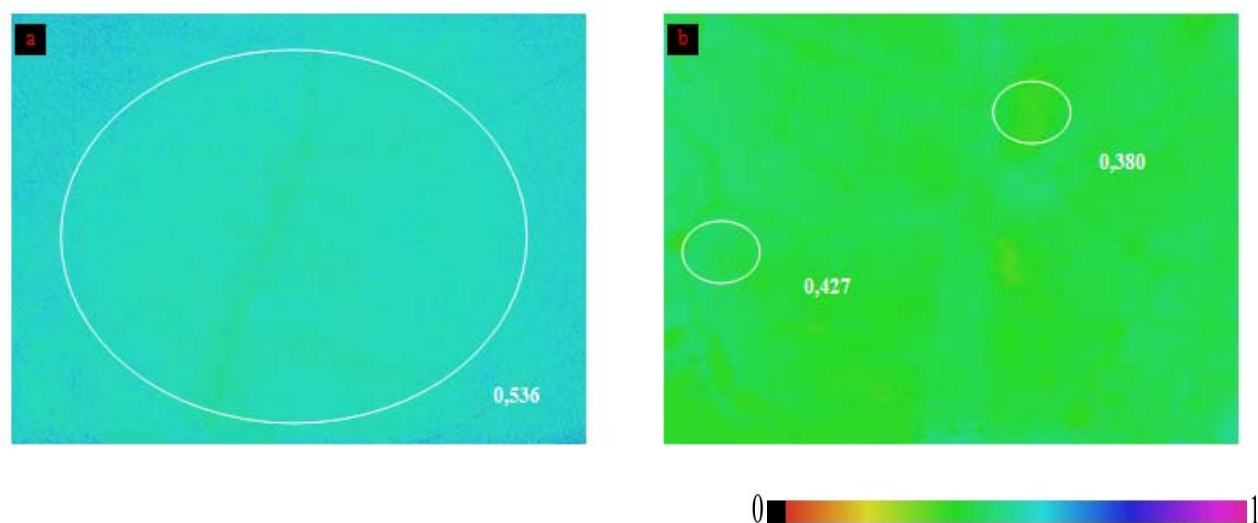


Figura 23: Analisi di immagine del parametro Y(II) ( $\text{PAR di } 460 \mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) su foglie di piante inoculate su fusto: a) controllo 26 giorni; b) inoculato 26 giorni dall'inoculazione. Barra colorimetrica: 0= minima fluorescenza; 1= massima fluorescenza.

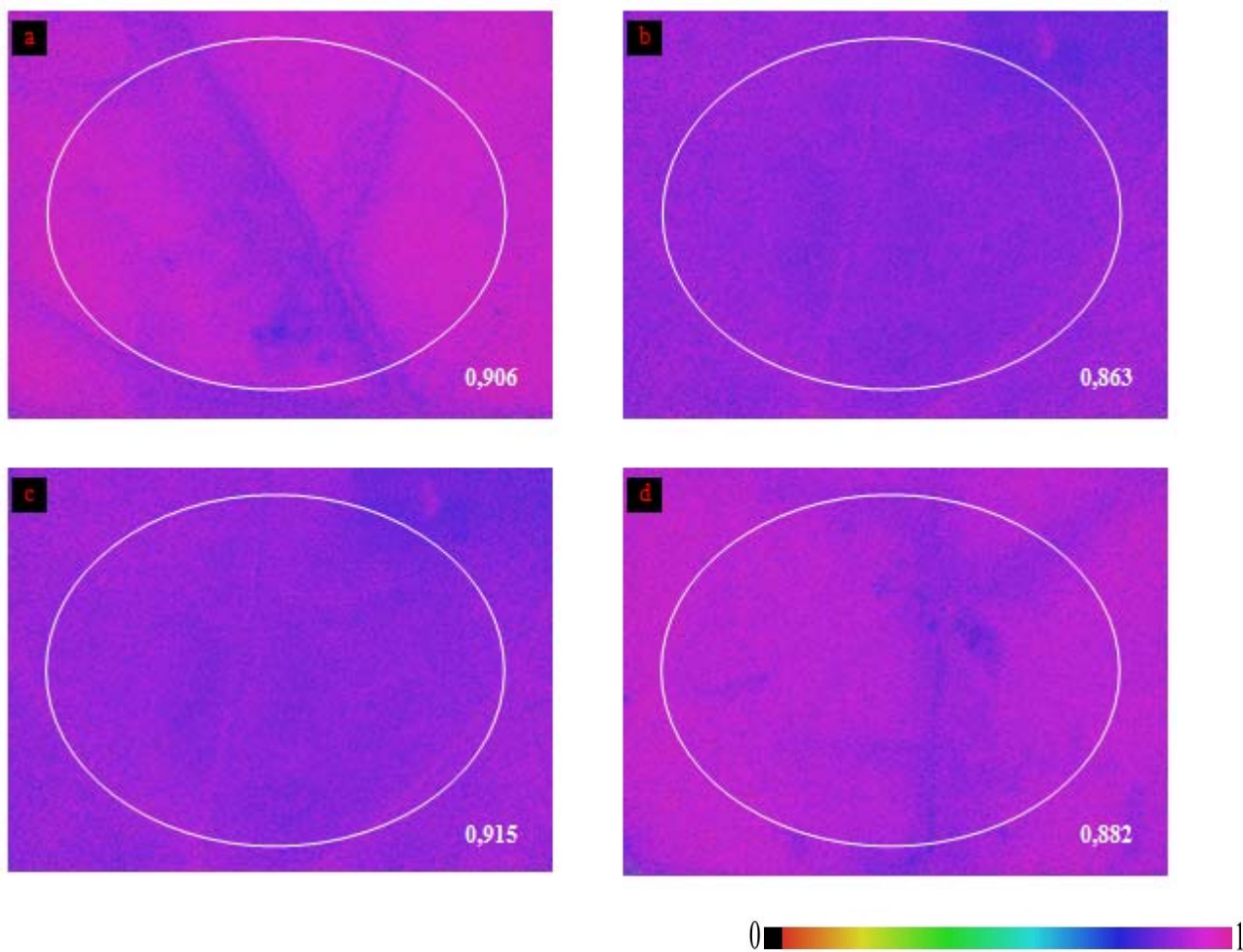


**Figura 24:** Analisi di immagine del parametro  $qP$  (PAR di  $460 \mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) su foglie di piante inoculate su fusto: a) controllo 6 giorni; b) inoculato 6 giorni dall'inoculazione; c) controllo 12 giorni; d) inoculato 12 giorni dall'inoculazione. Barra colorimetrica: 0= minima fluorescenza; 1= massima fluorescenza

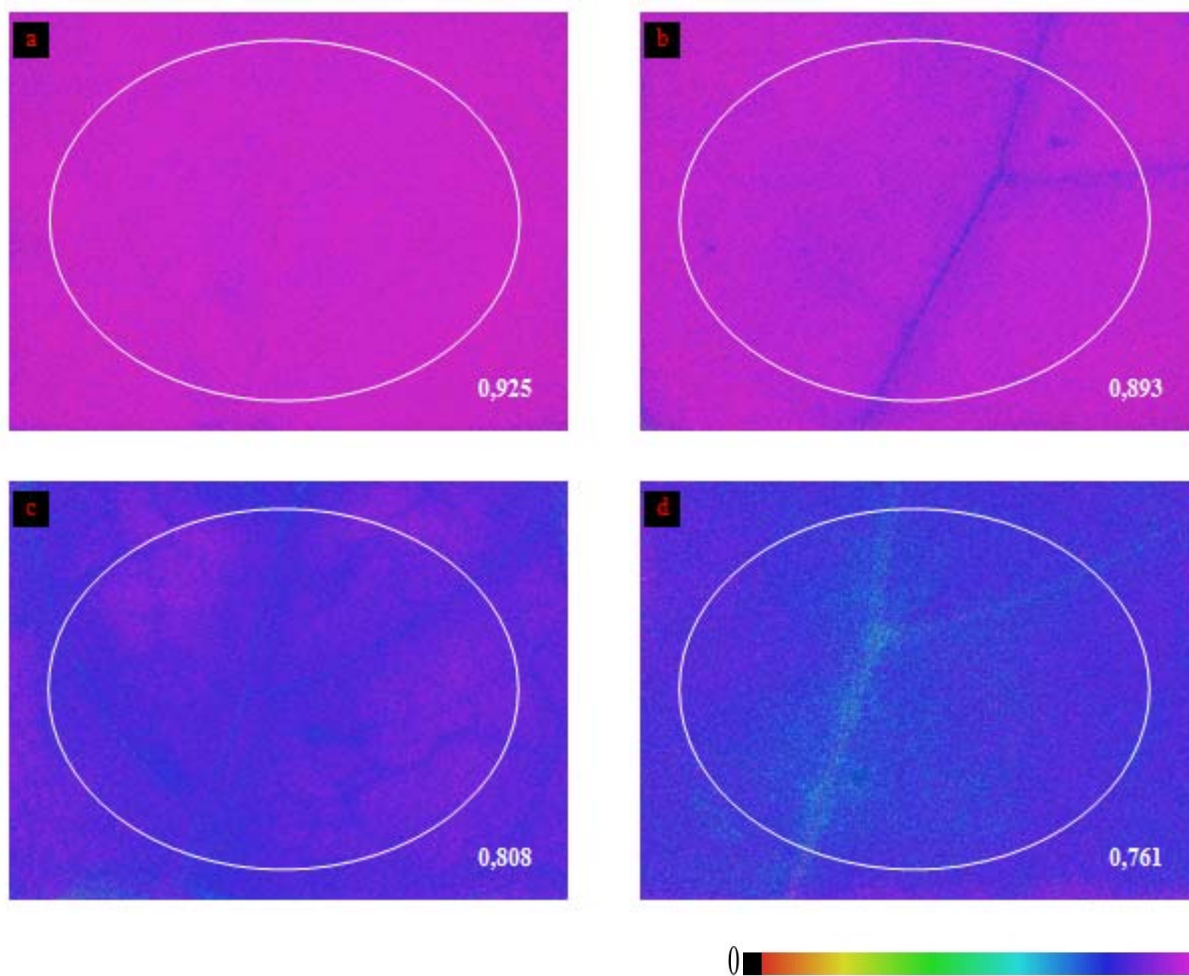


Figura 25: Analisi di immagine del parametro qP (PAR di 460  $\mu\text{mol}$  quanti  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) su foglie di piante inoculate su fusto: a) controllo 19 giorni; b) inoculato 19 giorni dall'inoculazione; c) controllo 21 giorni; d) inoculato 21 giorni dall'inoculazione. Barra colorimetrica: 0= minima fluorescenza; 1= massima fluorescenza

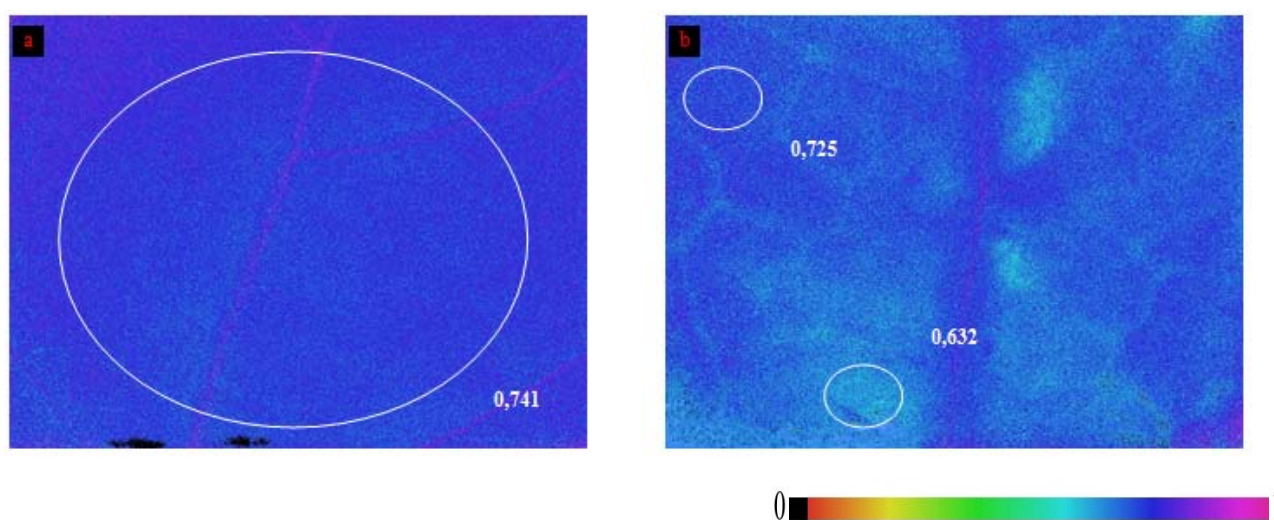


Figura 26: Analisi di immagine del parametro qP (PAR di 460  $\mu\text{mol}$  quanti  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) su foglie di piante inoculate su fusto: a) controllo 26 giorni; b) inoculato 26 giorni dall'inoculazione. Barra colorimetrica: 0= minima fluorescenza; 1= massima fluorescenza.

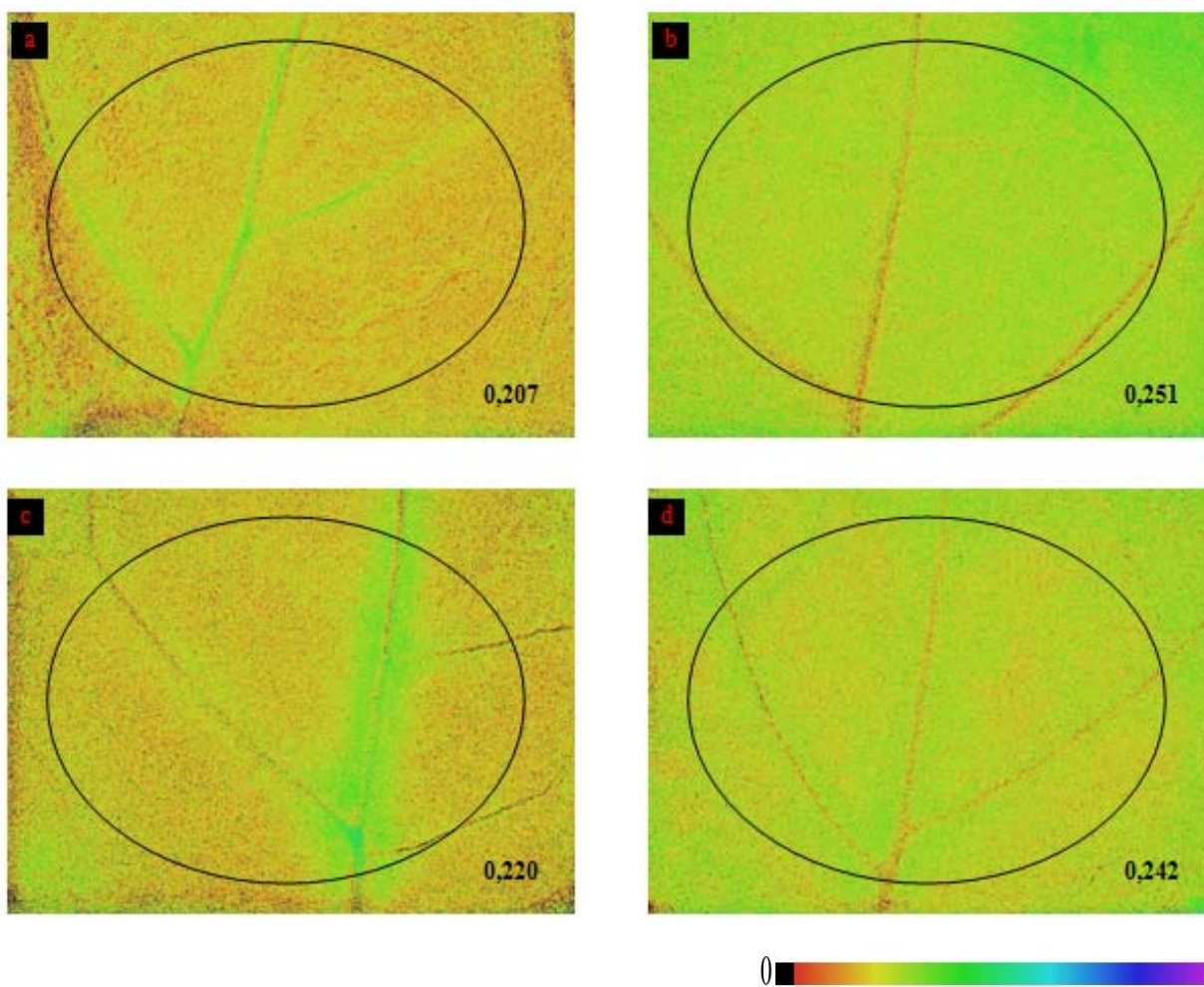


**Figura 27:** Analisi di immagine del parametro  $qN$  (PAR di  $460 \mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) su foglie di piante inoculate su fusto: a) controllo 6 giorni; b) inoculato 6 giorni dall'inoculazione; c) controllo 12 giorni; d) inoculato 12 giorni dall'inoculazione. Barra colorimetrica: 0= minima fluorescenza; 1= massima fluorescenza

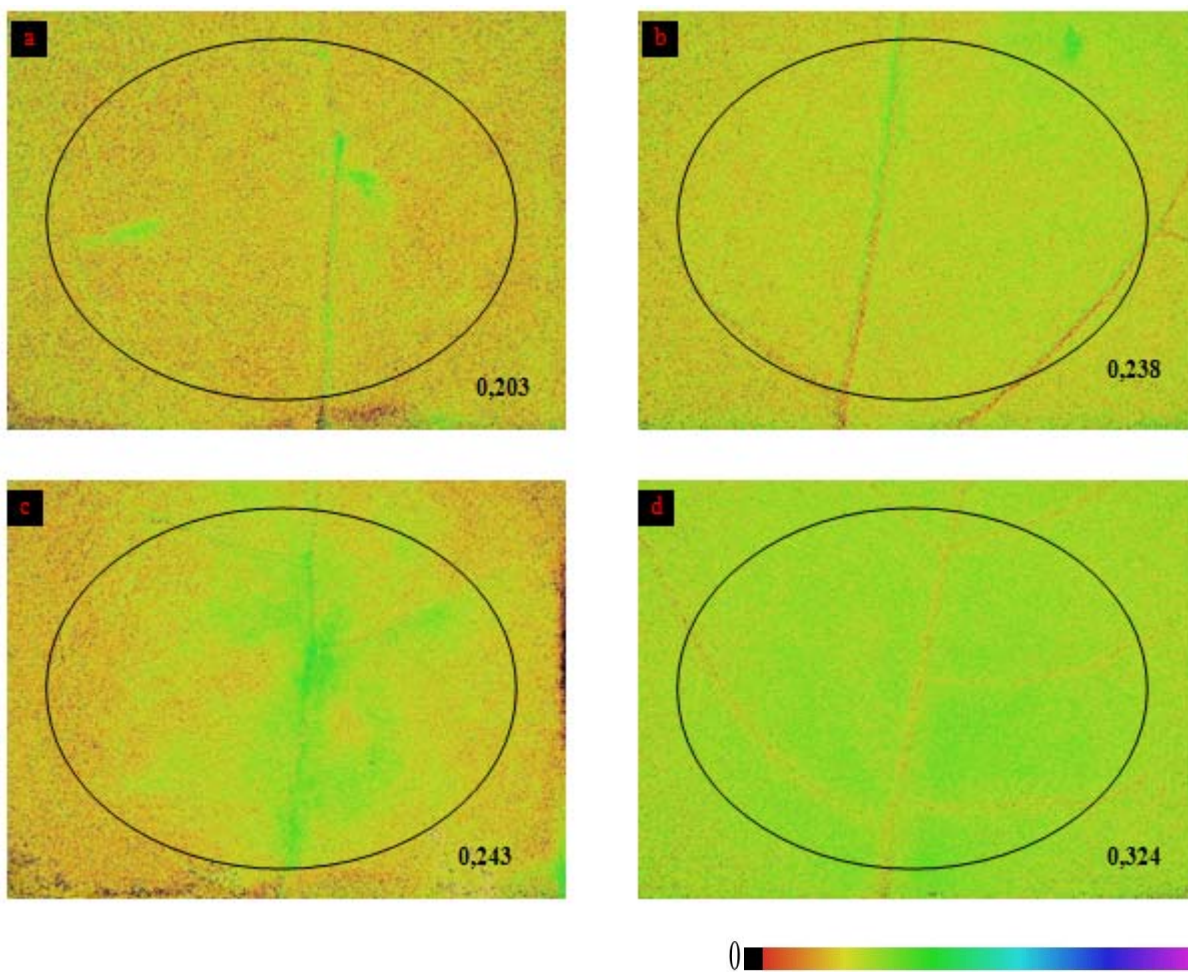


**Figura 28:** Analisi di immagine del parametro qN (PAR di  $460 \mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) su foglie di piante inoculate su fusto: a) controllo 19 giorni; b) inoculato 19 giorni dall'inoculazione; c) controllo 21 giorni; d) inoculato 21 giorni dall'inoculazione. Barra colorimetrica: 0= minima fluorescenza; 1= massima fluorescenza

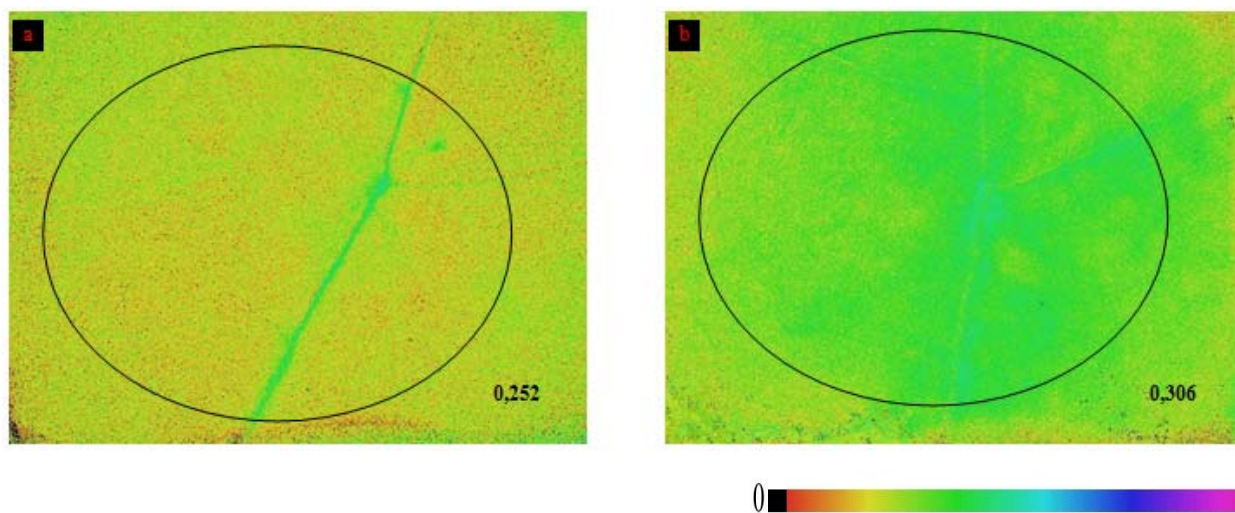


**Figura 29:** Analisi di immagine del parametro qN (PAR di  $460 \mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) su foglie di piante inoculate su fusto: a) controllo 26 giorni; b) inoculato 26 giorni dall'inoculazione. Barra colorimetrica: 0= minima fluorescenza; 1= massima fluorescenza.

## Esperimento 2

### Piante inoculate su foglia: analisi dei parametri fotochimici

Allo scopo evidenziare l'eventuale presenza di una diversa risposta fra zone direttamente colpite dal patogeno e quelle lontane, ma influenzate dalla sua presenza (Meyer *et al.*, 2001), la superficie fogliare delle piante inoculate su foglia è stata suddivisa in due aree: una immediatamente adiacente al punto d'inoculo (area 1) ed una più distante da questo (area 2) (Figura 30).

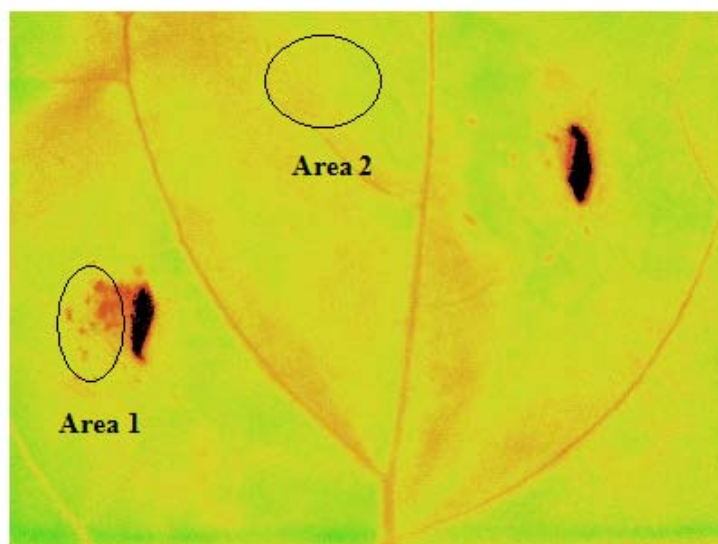


Figura 30: Aree scelte per il confronto dei parametri di fluorescenza nell'inoculazione su foglia.

Nella Tabella 3 sono riportati i risultati ottenuti per i parametri  $F_v/F_m$ ,  $Y(II)$ , ETR e  $qP$  (PAR di  $80 \mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) nei giorni successivi l'inoculazione. Anche in tale esperimento tutte le piante sono state analizzate prima dell'inoculazione ( $T_0$ ) misurando la massima resa quantica del PSII, per selezionare piante in uno stato fisiologico ottimale. Già a 4 giorni dall'inoculazione il valore di  $F_v/F_m$  di tutte le piante inoculate mostra differenze significative sia nell'area 1 che nell'area 2 in confronto con  $T_0$  ( $F=8,229$ ;  $P\leq 0,001$ ). Nel confronto fra le due aree non si osservano differenze fino a 18 giorni dall'inoculazione, dove il parametro  $F_v/F_m$  è significativamente minore nell'area 2 rispetto l'area 1 di circa il 4,5%, e raggiunge inoltre il valore significativamente più basso ( $F_v/F_m=0,700$ ) rispetto i precedenti giorni di misura (Tabella 3). Il parametro  $Y(II)$  non mostra mai differenze significative per le due aree considerate ( $F=2,840$ ;  $P=0,257$ ). A 4 giorni dall'inoculazione il trasporto elettronico è significativamente più alto ( $F=2,933$ ;  $P\leq 0,001$ ) nella zona 2 rispetto alla zona 1 ( $ETR_2=54,9a$  e  $ETR_1=48,0bc$ ), anche se non è accompagnato da un significativo aumento di  $qP$  ( $qP_2=0,779ce$  e  $qP_1=0,748e$ ) (Tabella 3), che si mostra significativamente più alto nella zona 2 ( $qP_2=0,822ac$ ) rispetto la zona 1 ( $qP_1=0,770de$ ) dopo 8 giorni dall'inoculazione ( $F=6,497$ ;  $P\leq 0,001$ ) (Tabella 3). Valori più alti di ETR e  $qP$  potrebbero indicare una maggiore attività fotosintetica nell'area 2 rispetto l'area 1. L'interazione fra *B. oleracea* e *P. lingam* è di tipo biotrofico e quindi

nell'area 2 i cambiamenti metabolici indotti dalla presenza del fungo, tra i quali troviamo lo spostamento dei fotosintati dalla pianta al patogeno, possono indurre una maggiore attività fotosintetica rispetto a zone in cui non si osserva tale interazione. L'aumento di attività fotosintetica nelle zone in cui si stabilisce tale tipo di relazione è già stato osservato durante le prime fasi dello sviluppo di una malattia causata da altri patogeni.

**Tabella 3: Resa quantica del PS II al buio ( $F_v/F_m$ ) e alla luce ( $Y(II)$ ), trasporto elettronico (ETR), quenching fotochimico (qP) nei diversi giorni dall'inoculazione su foglia. Area 1=punto di inoculo; Area 2= lontana dal punto di inoculo . I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi per il test di Duncan per  $P \leq 0,05$ . \*\*= significativo per  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*= significativo per  $P \leq 0,001$ .**

| Parametro | Giorni dall'inoculazione | Area 1 ( $\pm$ S.E.)                   | Area 2 ( $\pm$ S.E.)                   |
|-----------|--------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| $F_v/F_m$ | 0                        | 0,788 $\pm$ 0,004 a                    |                                        |
|           | 4                        | 0,765 $\pm$ 0,004 b                    | 0,752 $\pm$ 0,005 bc                   |
|           | 7                        | 0,740 $\pm$ 0,008 ce                   | 0,740 $\pm$ 0,004 ce                   |
|           | 8                        | 0,748 $\pm$ 0,005 bd                   | 0,748 $\pm$ 0,004 bd                   |
|           | 11                       | 0,739 $\pm$ 0,007 ce                   | 0,729 $\pm$ 0,013 ce                   |
|           | 14                       | 0,725 $\pm$ 0,016 de                   | 0,723 $\pm$ 0,004 e                    |
|           | 18                       | <b>0,700 <math>\pm</math> 0,011 f</b>  | <b>0,733 <math>\pm</math> 0,007 ce</b> |
| <b>F</b>  | 4,351 ***                |                                        |                                        |
| $Y(II)$   | 4                        | 0,567 $\pm$ 0,007                      | 0,533 $\pm$ 0,014                      |
|           | 7                        | 0,591 $\pm$ 0,014                      | 0,560 $\pm$ 0,011                      |
|           | 8                        | 0,579 $\pm$ 0,012                      | 0,534 $\pm$ 0,012                      |
|           | 11                       | 0,611 $\pm$ 0,009                      | 0,596 $\pm$ 0,009                      |
|           | 14                       | 0,565 $\pm$ 0,017                      | 0,574 $\pm$ 0,014                      |
|           | 18                       | 0,538 $\pm$ 0,023                      | 0,573 $\pm$ 0,015                      |
| <b>F</b>  | 2,840 n. s.              |                                        |                                        |
| ETR       | 4                        | <b>54,9 <math>\pm</math> 3,7 a</b>     | <b>48,0 <math>\pm</math> 3,4 bc</b>    |
|           | 7                        | 43,0 $\pm$ 3,6 bd                      | 47,4 $\pm$ 2,8 bc                      |
|           | 8                        | 43,9 $\pm$ 2,6 cde                     | 41,0 $\pm$ 2,2 cde                     |
|           | 11                       | 48,3 $\pm$ 4,4 bc                      | 48,7 $\pm$ 3,9 bc                      |
|           | 14                       | 42,0 $\pm$ 3,9 cde                     | 44,8 $\pm$ 3,2 bcd                     |
|           | 18                       | 33,5 $\pm$ 2,6 e                       | 35,5 $\pm$ 3,0 de                      |
| <b>F</b>  | 2,933 **                 |                                        |                                        |
| qP        | 4                        | 0,779 $\pm$ 0,011 ce                   | 0,748 $\pm$ 0,017 e                    |
|           | 7                        | 0,849 $\pm$ 0,019 ab                   | 0,809 $\pm$ 0,014 bc                   |
|           | 8                        | <b>0,822 <math>\pm</math> 0,015 ac</b> | <b>0,770 <math>\pm</math> 0,016 de</b> |
|           | 11                       | 0,860 $\pm$ 0,015 a                    | 0,855 $\pm$ 0,009 ab                   |
|           | 14                       | 0,832 $\pm$ 0,016 ab                   | 0,829 $\pm$ 0,011 ab                   |
|           | 18                       | 0,819 $\pm$ 0,018 ac                   | 0,844 $\pm$ 0,012 ab                   |
| <b>F</b>  | F=6,497 ***              |                                        |                                        |

### Analisi di immagine dei parametri fotochimici

Allo scopo di studiare l'eterogeneità della risposta sulla superficie fogliare all'invasione da parte di *P. lingam* è stata scelta una foglia inoculata maggiormente rappresentativa e sono state mostrate le immagini dei parametri di fluorescenza  $F_L$ ,  $Y(II)$ ,  $qN$ ,  $qP$ , ottenute durante lo stadio 3 della curva di induzione (Figura 8; Cap 1) (luce attinica di  $460 \mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a 4, 7, 8 ed 11 giorni dall'inoculazione. Tali giorni comprendono le informazioni più significative sulla propagazione iniziale del patogeno. L'analisi di immagine nei giorni successivi l'inoculazione (14, 18 e 21 giorni) danno informazioni sulla propagazione secondaria della malattia in quanto il danno diventa visibile come necrosi, e per tale motivo non sono state riportate. La Figura 31 mostra l'analisi di immagine dei parametri  $F_L$  e  $Y(II)$  delle foglie di piante inoculate con sola acqua sterile, il primo e l'ultimo giorno di analisi (rispettivamente 4 e 18 giorni dopo). Come aspettato, in tutti i giorni di analisi non si osservano differenze nei valori di  $F_L$  e  $Y(II)$  né nel punto di inoculo e né nelle aree adiacenti, anche se nel punto di inoculo è visibile un punto nero a destra ed a sinistra della venatura centrale dovuto alla ferita procurata dall'ago. L'aumento del valore di  $F_L$  del 20%, accompagnato da una diminuzione di  $Y(II)$  di circa il 10%, si osserva dal primo (Figura 31a, c) all'ultimo (Figura 31b, d) giorno di misura, ed è dovuto a cambiamenti della fisiologia fogliare, come già osservato nei controlli relativi all'inoculazione su fusto (Figura 18-Figura 23).

Anche per l'analisi di immagine delle foglie inoculate con il patogeno (Figura 32÷Figura 35), allo scopo di valutare il processo di invasione e propagazione del fungo, si è divisa la superficie fogliare in tre aree di interesse: 1 (punto di inoculo); 2 (area lontana dal punto di inoculo); 3 (area di reazione distante dal punto di inoculo) (Figura 32a). Già 4 giorni dopo l'inoculazione (Figura 32a) si osserva una differenza di emissione di fluorescenza nella area 1 e 3 (valori di  $F_L$  rispettivamente di 0,137 e 0,216). La bassa fluorescenza riscontrata nell'area 1 è dovuta alla risposta della pianta alla presenza del patogeno nei tessuti. Nella Figura 32b, a 7 giorni dall'inoculazione, è evidente un ulteriore abbassamento di  $F_L$  dell'area 1 ( $F_L = 0,122$ ) ma soprattutto nell'area 3 si osserva la formazione di un'estesa zona di reazione della foglia al patogeno. Tale reazione non è correlata con la formazione di una necrosi, che non è visibile, ed è inoltre lontana dal punto di inoculo. È quindi dovuta ad un effetto a distanza del patogeno sul metabolismo fogliare. In Figura 32c si osserva l'ulteriore propagazione della malattia nelle aree 1 e soprattutto nell'area 3, dove  $F_L$  diminuisce ulteriormente arrivando ad un valore di 0,079. Inoltre nello stesso giorno si ha l'inizio di una nuova zona di reazione anche questa distante dal punto di inoculo (freccia tratteggiata), che diventa maggiormente evidente dopo 11 giorni (Figura 32d, area 4), e che dimostra ulteriormente il meccanismo di propagazione del fungo nei tessuti fogliari. Questi risultati sono stati osservati in tutte le immagini delle foglie analizzate. Un ulteriore esempio di tale interazione a distanza è

riportato in Figura 36, la cui immagine di  $F_L$  a 4 giorni dall'inoculazione (Figura 36a) mostra la comparsa di zone di reazione lontane dal punto di inoculo (freccette) che diventano maggiormente estese dopo 7 giorni (Figura 36b, freccette con asterisco). Gli stessi punti diventano aree di necrosi solo dopo 11 giorni (Figura 37).

La Figura 33 mostra l'immagine del parametro  $Y(II)$  nei giorni successivi l'inoculazione su foglia. Differenze nei valori del parametro  $Y(II)$  sono visibili soprattutto dopo 7 giorni dall'inoculazione in cui si evidenzia un valore più basso del 50% nell'area 3 rispetto all'area 2, che arriva, dopo 11 giorni dall'inoculazione, al 72% evidenziando la diminuzione di attività fotosintetica in una zona lontana dal punto di inoculo. Si osserva anche un aumento di  $Y(II)$  nell'area 2 ( $Y(II)=0,627$ ) che rimane fino a 8 giorni. L'immagini dei parametri  $qP$  e  $qN$  nei diversi giorni dall'inoculazione sono riportate rispettivamente in Figura 34 e Figura 35. Si osserva dal primo all'ultimo giorno di misura un graduale aumento di  $qP$  nella area 1, che è accompagnato dalla diminuzione dei valori di  $qN$  nella stessa zona. Inoltre si osserva dal 7° all'11° giorno di osservazione una lenta diminuzione di  $qP$  associata ad un aumento di  $qN$  (tranne nell'ultimo giorno di osservazione) nell'area 3, che è in accordo con quanto osservato per  $Y(II)$ , e conferma la diminuzione di attività fotosintetica nella zona 3, non direttamente interessata dalla presenza del patogeno. Nell'area 1 si osservano quindi alti valori di  $Y(II)$  e  $qP$ , e valori più bassi di  $qN$ , rispetto all'area 2. Ciò indica in tale area, interessata da un'interazione di tipo biotrofica fra pianta e fungo, un aumento di attività fotosintetica confermando quanto già osservato nell'analisi statistica dei parametri fotochimici (Tabella 3).

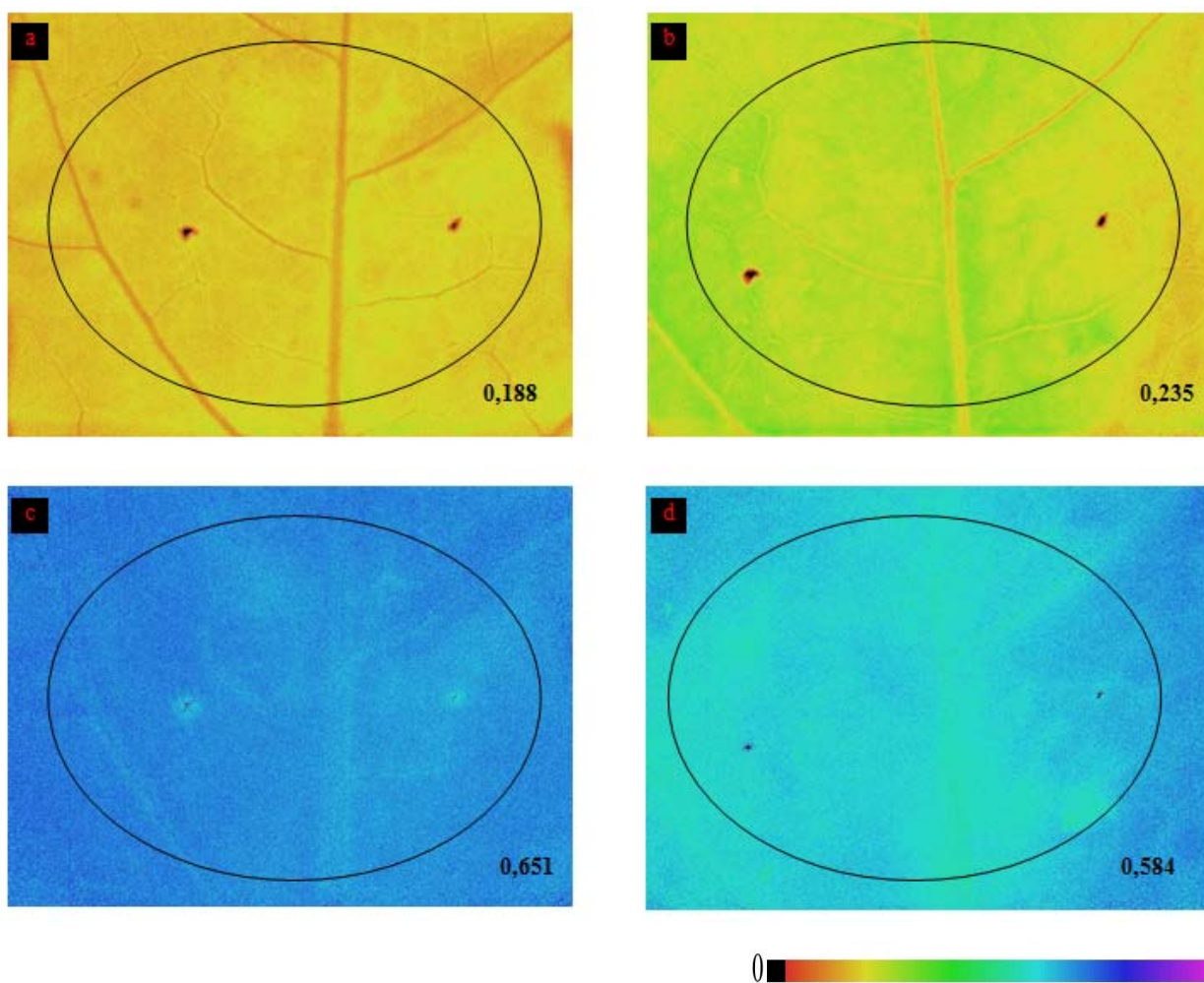


**Figura 31: Analisi di immagine del parametro  $F_L$  e  $Y(II)$  (PAR di  $460 \mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) di foglie inoculate con acqua sterile (controllo): a)  $F_L$  a 4 giorni; b)  $F_L$  a 18 giorni; c)  $Y(II)$  4 giorni; d)  $Y(II)$  18 giorni. Barra colorimetrica: 0= minima fluorescenza; 1= massima fluorescenza.**

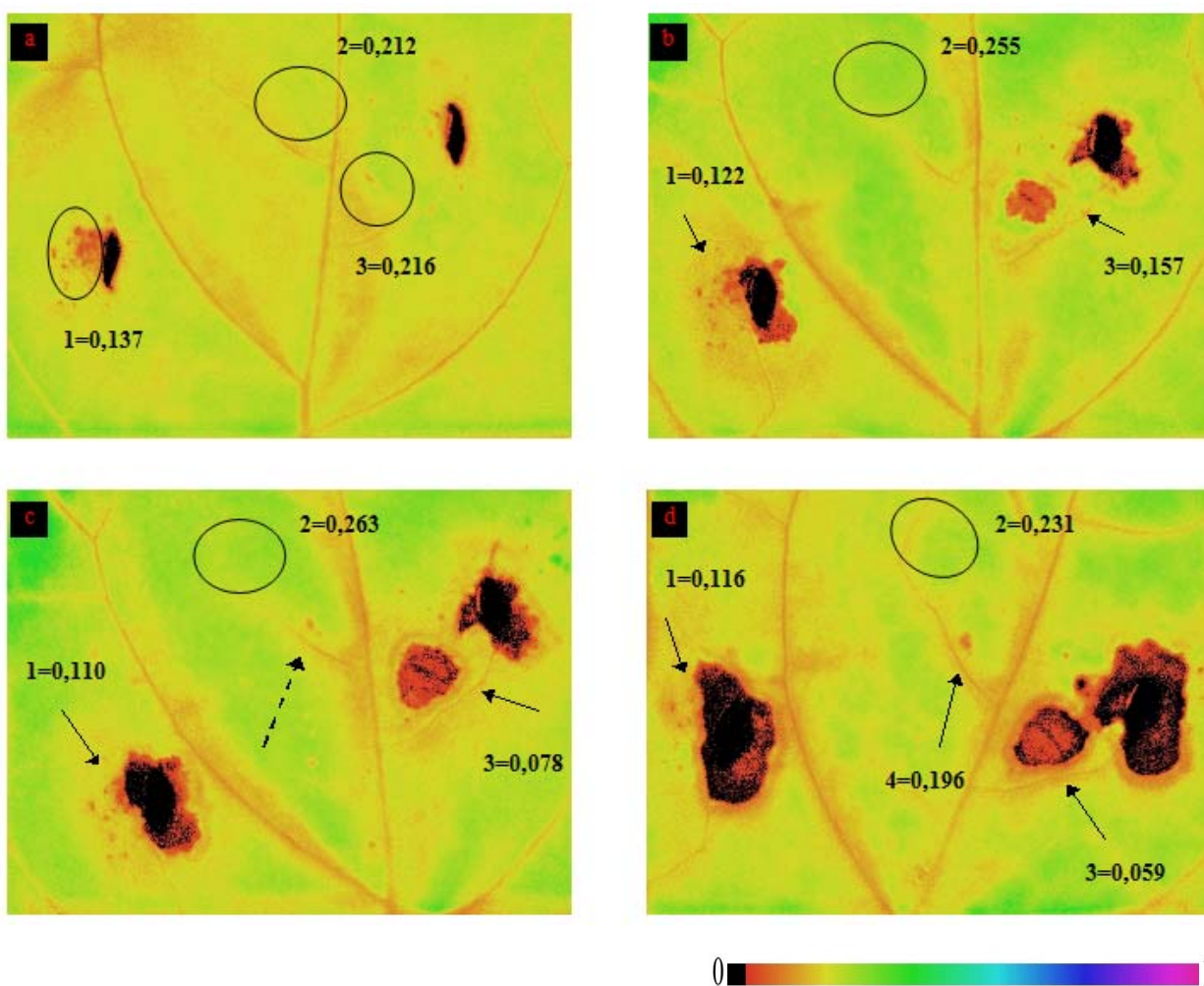


Figura 32: Analisi di immagine del parametro  $F_L$  (PAR di  $460 \mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) su foglie di piante inoculate su foglia: a) 4 giorni; b) 7 giorni; c) 8 giorni; d) 11 giorni. Barra colorimetrica: 0= minima fluorescenza; 1= massima fluorescenza.

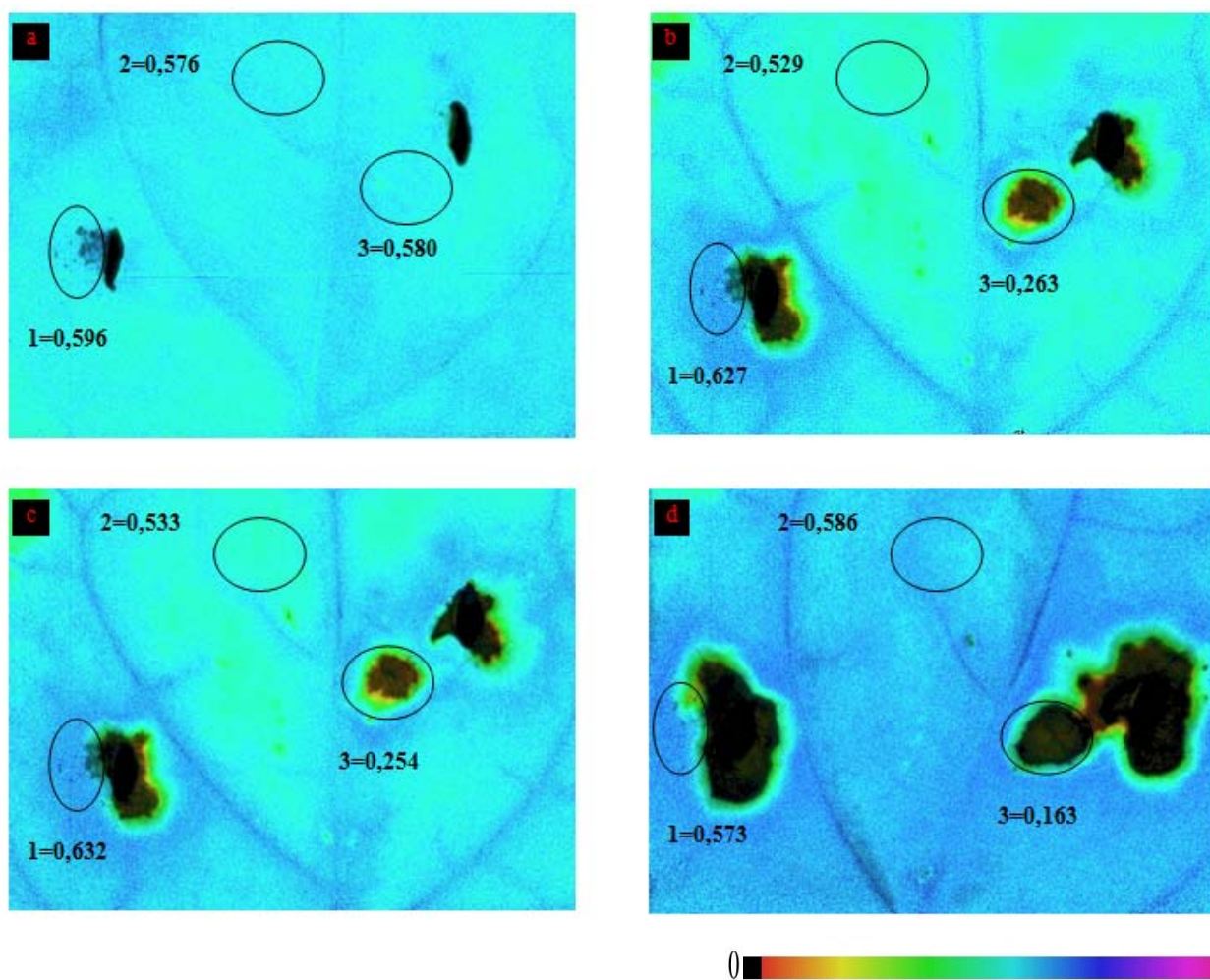


Figura 33: Analisi di immagine del parametro Y(II) (PAR di  $460 \mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) su foglie di piante inoculate su foglia: a) 4 giorni; b) 7 giorni; c) 8 giorni; d) 11 giorni. Barra colorimetrica: 0= minima fluorescenza; 1= massima fluorescenza.

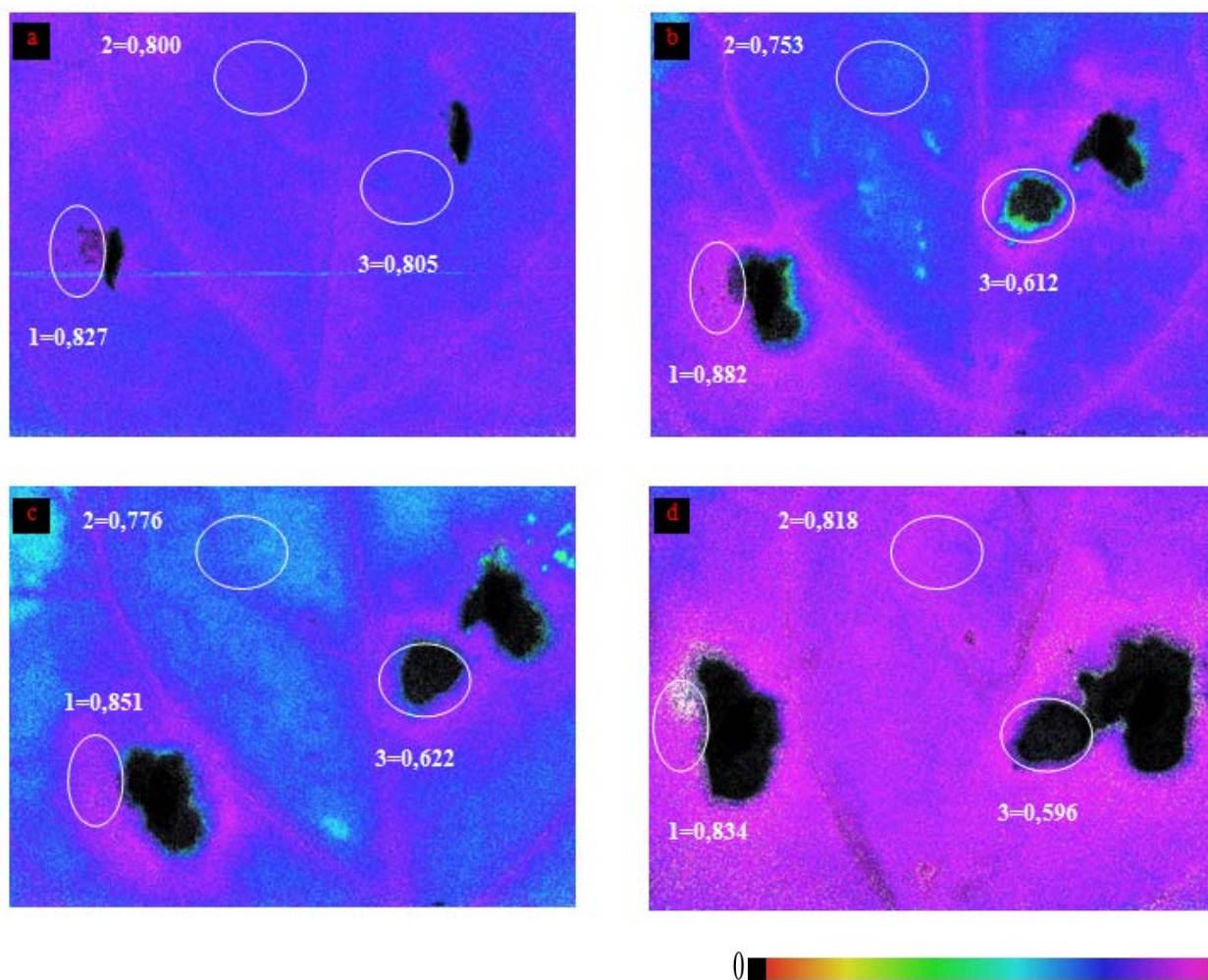


Figura 34: Analisi di immagine del parametro qP (PAR di 460  $\mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) su foglie di piante inoculate su foglia: a) 4 giorni; b) 7 giorni; c) 8 giorni; d) 11 giorni. Barra colorimetrica: 0= minima fluorescenza; 1= massima fluorescenza.

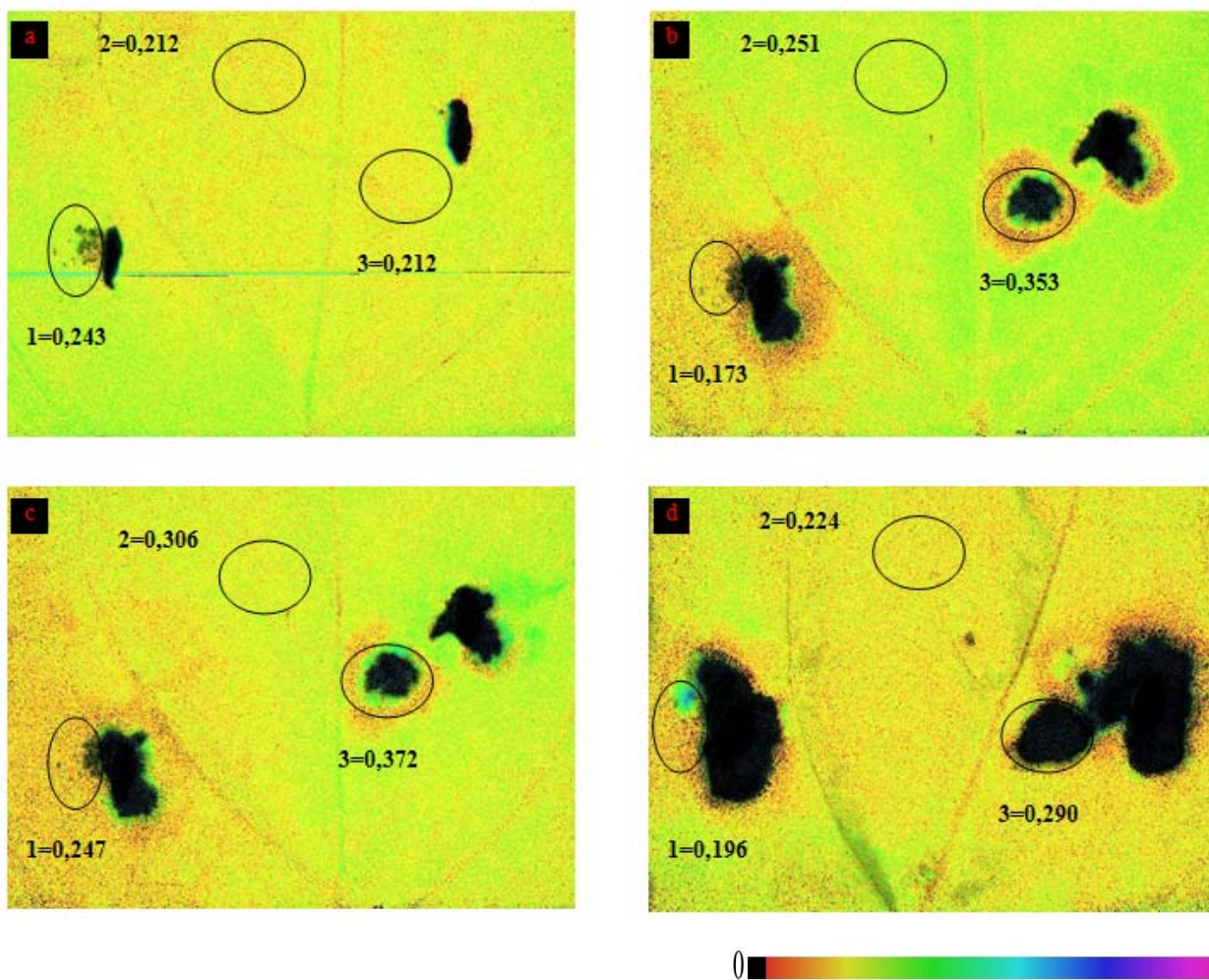


Figura 35: Analisi di immagine del parametro  $qN$  (PAR di  $460 \mu\text{mol quanti m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) su foglie di piante inoculate su foglia: a) 4 giorni; b) 7 giorni; c) 8 giorni; d) 11 giorni. Barra colorimetrica: 0= minima fluorescenza; 1= massima fluorescenza.

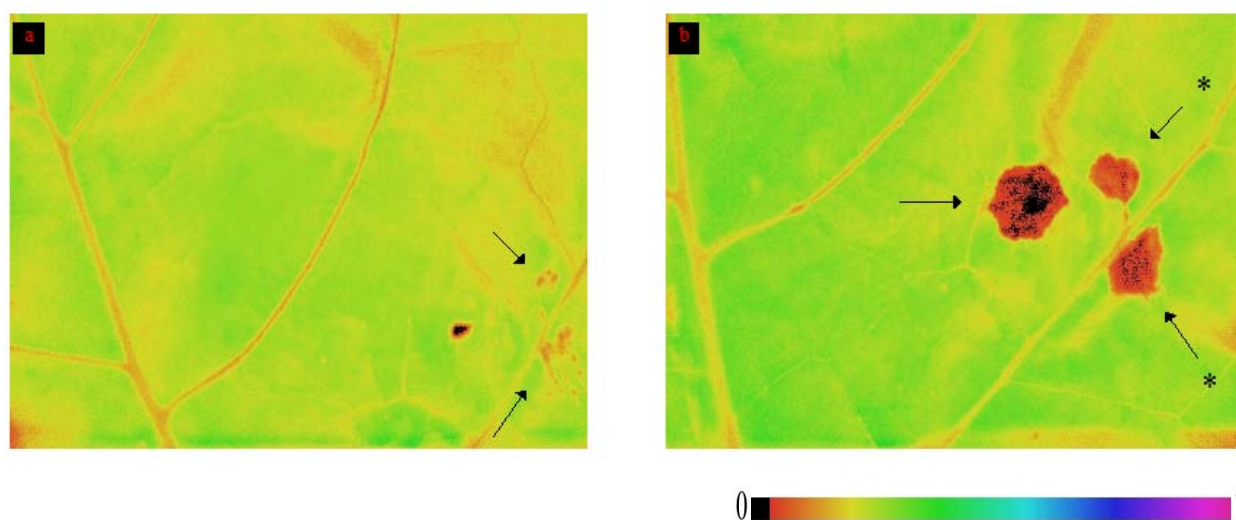


Figura 36: Analisi di immagine del parametro  $F_L$  di un ulteriore campione inoculato a) su foglia dopo 4 giorni dall'inoculazione (le frecce indicano la comparsa della *patchiness* di fluorescenza distante dal punto d'inoculo); b) dopo 7 giorni dall'inoculazione (la freccia di sinistra indica il punto d'inoculo, mentre quelle di destra indicano l'estesa reazione a distanza). Barra colorimetrica 0= minima fluorescenza; 1= massima fluorescenza.

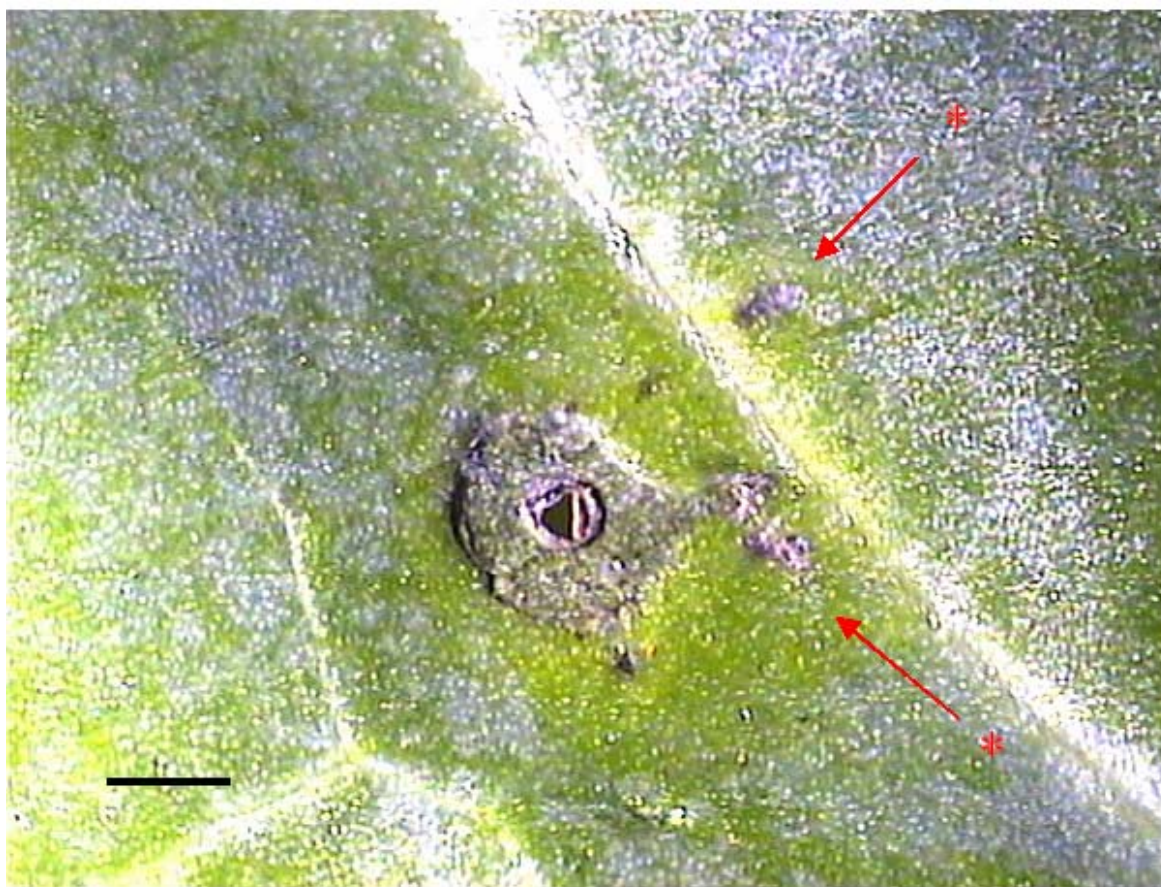


**Figura 37:** Foto allo stereoscopio dopo 11 giorni dall'inoculazione della stessa foglia analizzata in fluorescenza e riportata in figura 50. Con la freccia si evidenziano le aree che hanno sviluppato necrosi, e che corrispondono alle aree indicate nella analisi di fluorescenza con l'asterisco (barra 500  $\mu\text{m}$ ).

### **2.6.3. Analisi dei pigmenti di piante inoculate su fusto**

La Tabella 4 mostra i risultati ottenuti sulla variazione della concentrazione della clorofilla *a*, della clorofilla *b* e dei carotenoidi totali (incluse le xantofille) in foglie di piante inoculate su fusto a diversi giorni dall'inoculazione. Tutte le piante inoculate hanno mostrato la sintomatologia della malattia su fusto. Già 8 giorni dopo l'inoculazione si osservano differenze significative nella concentrazione della Chl *a* su pianta inoculata (0,84  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) e su pianta controllo (1,32  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) e della Chl *b* su pianta inoculata (0,33  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) e su pianta controllo (0,49  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), rispettivamente  $F=25,279$ ;  $P\leq 0,05$  e  $F=27,454$ ;  $P\leq 0,001$  rispetto al controllo (Tabella 4).

**Tabella 4: Concentrazione della clorofilla *a*, della clorofilla *b* e dei carotenoidi totali dei controlli e degli inoculati nei giorni successivi all'inoculazione su fusto. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Duncan per  $P \leq 0,05$ . \*= significativo per  $P \leq 0,05$ ; \*\*\*= significativo per  $P \leq 0,001$ . n. s.= non significativo.**

| <b>Tempo<br/>(giorni)</b> | <b>Clorofilla <i>a</i> (<math>\pm</math> S.E.)<br/>(<math>\mu\text{g}/\text{mg}</math>)</b> |                             | <b>Clorofilla <i>b</i> (<math>\pm</math> S.E.)<br/>(<math>\mu\text{g}/\text{mg}</math>)</b> |                             | <b>Carotenoidi totali<br/>(+ xantofille) (<math>\pm</math> S.E.)<br/>(<math>\mu\text{g}/\text{mg}</math>)</b> |                             |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
|                           | <b>Piante non<br/>inoculate</b>                                                             | <b>Piante<br/>inoculate</b> | <b>Piante non<br/>inoculate</b>                                                             | <b>Piante<br/>inoculate</b> | <b>Piante non<br/>inoculate</b>                                                                               | <b>Piante<br/>inoculate</b> |
| 8                         | 1,32 $\pm$ 0,09 b                                                                           | 0,84 $\pm$ 0,05 c           | 0,49 $\pm$ 0,03 b                                                                           | 0,33 $\pm$ 0,02 cd          | 7,31 $\pm$ 0,45                                                                                               | 7,88 $\pm$ 0,49             |
| 12                        | 1,57 $\pm$ 0,14 a                                                                           | 0,94 $\pm$ 0,09 c           | 0,55 $\pm$ 0,04 a                                                                           | 0,35 $\pm$ 0,03 c           | 7,93 $\pm$ 0,68                                                                                               | 7,98 $\pm$ 0,40             |
| 18                        | 1,62 $\pm$ 0,13 a                                                                           | 1,01 $\pm$ 0,08 c           | 0,56 $\pm$ 0,04 a                                                                           | 0,35 $\pm$ 0,03 c           | 8,76 $\pm$ 0,52                                                                                               | 8,39 $\pm$ 0,65             |
| 25                        | 1,49 $\pm$ 0,17 ab                                                                          | 0,97 $\pm$ 0,14 c           | 0,48 $\pm$ 0,05 b                                                                           | 0,30 $\pm$ 0,05 d           | 8,40 $\pm$ 0,60                                                                                               | 7,92 $\pm$ 0,69             |
| <b>F</b>                  | 25,279 *                                                                                    |                             | 27,454 ***                                                                                  |                             | 2,204 n. s.                                                                                                   |                             |

La concentrazione di Chl *a* e di Chl *b* delle piante inoculate è costante in tutti i giorni di osservazione ed è sempre significativamente inferiore, secondo il test di Duncan, rispetto al controllo, di circa il 35% (Tabella 4). La concentrazione dei carotenoidi totali non è mai statisticamente diversa rispetto al controllo non inoculato ( $F=2,204$ ;  $P=0,119$ ) (Tabella 4).

La diminuzione della concentrazioni di clorofilla osservata nei giorni successivi all'inoculazione con *P. lingam* è in accordo con quanto già riportato in letteratura (Sziràki *et al.*, 1984; Kuzniak e Sklodowska, 2001; Sighicelli *et al.*, 2005). I carotenoidi ed in particolare il ciclo delle xantofille intervengono come sistema di difesa in risposta a fattori ambientali, come il deficit idrico e l'eccesso di luce. Nonostante l'attività del patogeno su fusto simili nei tessuti dell'ospite uno stato di carenza idrica, il valore costante in tutti i giorni di misura dei carotenoidi non sembra attivare in queste condizioni sperimentali il ciclo delle xantofille.

#### **2.6.4. Determinazione qualitativa di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> su foglie inoculate**

La determinazione qualitativa dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è stata ottenuta mediante saggio colorimetrico con DAB, ed ha fornito importanti informazioni sulla reazione locale della pianta all'attacco del patogeno, nelle ore immediatamente successive all'infezione. La Figura 38 mostra i risultati dell'inoculazione su foglia (Figura 38e, f, g, h) in confronto al controllo (Figura 38a, b, c, d) da 2 a 24 ore dall'inizio dell'infezione. Dopo 2 ore dall'inoculazione nel punto di inoculo (Figura 38e) è visibile un'intensa colorazione bruno-marrone intorno ai tessuti infettati, mentre nel controllo (Figura 38a), dopo lo stesso intervallo di tempo, non si osserva deposizione di DAB. L'intensa colorazione dell'inoculato indica un'estesa polimerizzazione di DAB che riflette l'abbondante produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dovuta all'infezione del patogeno nei tessuti della foglia. Dopo 6 ore dall'inizio dell'infezione, nell'inoculato (Figura 38f) si osserva la polimerizzazione del DAB nei tessuti intorno alla ferita, che appare più diffusa rispetto a quella osservata a 4 ore, mentre il controllo risulta simile a quello osservato dopo 4 ore (Figura 38b). Tale osservazione è in relazione con l'allargamento della risposta in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nei tessuti infettati in seguito alla diffusione del patogeno. La colorazione sugli inoculati eseguita dopo 8 ore dall'infezione (Figura 38g) mostra un aumento della polimerizzazione di DAB nei tessuti intorno alla ferita, maggiore rispetto a quanto osservato a 6 ore, che suggerisce l'ulteriore allargamento dell'infezione. Inoltre nel controllo dopo lo stesso periodo di tempo (Figura 38g) si osserva un inizio di deposizione di DAB, dovuto con ogni probabilità alla produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in seguito alla ferita procurata dall'ago. Questa osservazione è confermata dalla presenza nel controllo a 24 ore (Figura 38d) di una abbondante deposizione di DAB intorno ai tessuti feriti. Nell'inoculato dopo 24 ore (Figura 38h) è possibile osservare che la colorazione del DAB, oltre ad essere molto intensa nelle zone direttamente infettate, è visibile in porzioni lontane dal sito di infezione. Ciò è da mettere in relazione con la diffusione del patogeno nel mesofillo fogliare, che provoca nuovi focolai di infezione in cui la pianta risponde con una abbondante produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

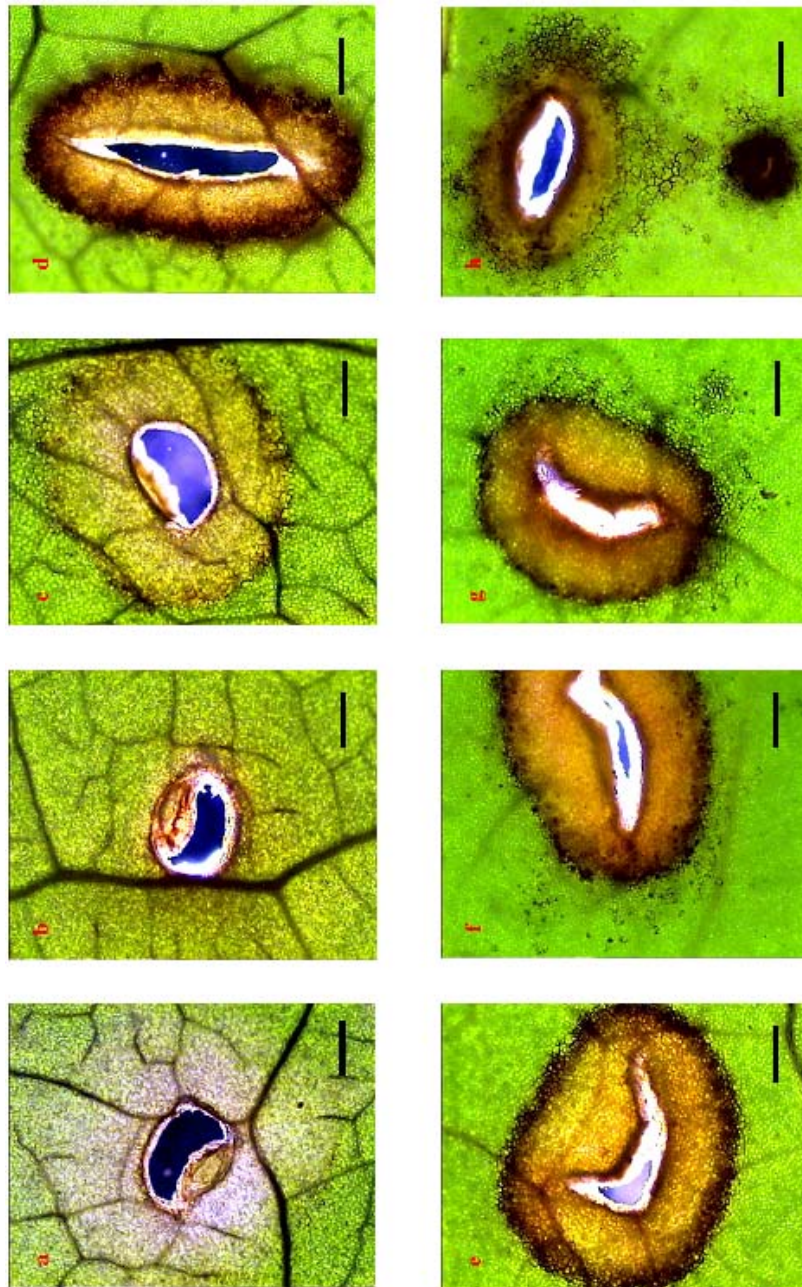


**Figura 38:** Risultato della colorazione con DAB (Diamuninobenzaidina) su foglie di piante inoculate con il patogeno, in confronto ai controlli inoculati con acqua sterile. a, controllo 2h; e, inoculato 2h; b, controllo 6h; f, inoculato 6h; c, controllo 8h; g, inoculato 8h; d, controllo 24h; h, inoculato 24h (barra 200μm).

## 2.7. Discussioni e conclusioni

I risultati ottenuti dallo studio della risposta di *Brassica oleracea* var *italica* all'attacco di *Phoma lingam* hanno permesso di trarre le seguenti conclusioni.

Dal confronto fra il ceppo 1290ER e UWA P30 questo ultimo ha manifestato un'alta virulenza, dimostrata, dopo reisolamento da cotiledone infetto, sia dall'abbondante produzione di picnidi con essudato su terreno di coltura *in vitro*, che dalla severità del danno causato soprattutto sulla cv. Calabrese tardivo (indice di severità del danno >2,5 con IS = 65%; Tabella 2). Quindi il ceppo

UWA P30 nelle diverse inoculazioni si è dimostrato come migliore agente selettivo. Il ceppo 1290ER invece ha perso la virulenza, probabilmente per il lungo periodo di conservazione (più di 2 anni a  $T=4^{\circ}$  in tubo sotto olio minerale) senza passaggi sull'ospite.

La risposta delle piante inoculate con due diverse modalità di inoculazione, su fusto e su foglia, ha permesso di confermare l'utilizzo sia dei parametri di fluorescenza che dell'analisi di immagine della clorofilla *a* come strumento di diagnosi precoce e non distruttivo per lo screening di piante attaccate da patogeni. Infatti, per entrambe le tecniche di inoculazione analizzate è stato possibile evidenziare variazioni fisiologiche della stessa pianta nel tempo, anche su tessuti non interessati direttamente dal patogeno. L'effetto di un patogeno sull'attività fotosintetica di foglie non direttamente inoculate è stato già osservato da Bastiaans (1991), il quale ha ricavato una funzione per descrivere la diminuzione del tasso di fotosintesi nelle foglie non inoculate, assumendo le lesioni visibili come parte di una lesione virtuale che può comprendere anche parti della pianta non raggiunte dal patogeno.

I risultati ottenuti sulla risposta di *B. oleracea* a *P. lingam* inoculato su fusto sono in accordo con quelli osservati in piante inoculate con diversi patogeni del terreno che invadono i tessuti del fusto. In queste interazioni l'effetto mostrato è simile a quello ottenuto per lo stress idrico (Meyer *et al.* 2001; Bassanezi *et al.*, 2002). L'inibizione del trasporto idrico nel fusto è principalmente causato da una riduzione del diametro dei vasi dell'ospite invasi dal patogeno, del suo metabolismo e dalla deposizione da parte della pianta di composti quali lignina e callosio (Hammond e Lewis, 1987; Aguilloreza *et al.*, 1995; Sidorova 1983). L'ipotesi di induzione di uno stress idrico su *B. oleracea* inoculata su fusto è supportata anche dai risultati ottenuti dalla diminuzione di efficienza massima del PSII al buio (Figura 12). Infatti il valore di  $F_v/F_m$  è significativamente diminuito (Figura 12) rispetto al controllo a 21 giorni dall'inoculazione, tempo in cui l'invasione nei vasi xilematici da parte del patogeno è avanzata (Foto 1). La diminuzione del turgore dopo 21 giorni dall'inoculazione nei tessuti di tutte le piante inoculate su fusto con *P. lingam* (Foto 1) supporta l'ipotesi di induzione di deficit idrico, osservato anche per altri patogeni del terreno (Fluhr, 2001; Noguès *et al.*, 2002; Pomar *et al.*, 2004; Pshibytko *et al.*, 2006). Tuttavia, i valori di NPQ osservati nei diversi giorni di misura non sono mai significativamente diversi rispetto ai controlli (Figura 17) indicando che il ciclo delle xantofille con produzione di zeaxantina nei sistemi antenna, uno dei principali sistemi di difesa in risposta a fattori ambientali come il deficit idrico e l'eccesso di luce (Morosinotto *et al.*, 2003), non è stato attivato. Ciò è in accordo con i risultati ottenuti per l'analisi dei pigmenti fotosintetici (Tabella 4) dove la concentrazione dei carotenoidi totali (incluse le xantofille) nelle piante inoculate non è mai diversa dal controllo e non varia nel tempo di osservazione.

Il trasporto elettronico e l'effettiva resa quantica del PSII nelle piante inoculate su fusto risultano rispettivamente inferiori di circa il 21% e del 12% rispetto al controllo già dopo 6 giorni dall'inoculazione (Figura 14 e Figura 15). Questi risultati sono in accordo con quanto osservato per il parametro qP (quenching fotochimico), dove la diminuzione significativa a 12 giorni (Figura 16) sta ad indicare una diminuzione della efficienza fotosintetica in accordo con diversi autori (Bjorkman e Demming, 1987; Genty *et al.*, 1990a; Genty *et al.*, 1990b; Harbinson *et al.*, 1990; Lichtenthaler e Babani, 2000). L'analisi di immagine degli stessi parametri di fluorescenza non ha evidenziato sulla foglia aree di diversa fluorescenza (*patchiness*) (Figura 18÷Figura 29), indicando che durante i 26 giorni di osservazione e nelle condizioni sperimentali in cui si è lavorato il patogeno inoculato su fusto non ha raggiunto il mesofillo delle foglie analizzate.

Nelle piante inoculate su foglia sono state evidenziate diverse risposte fra le aree direttamente colpite dal patogeno e quelle lontane, ma influenzate dalla sua presenza. Durante le misure di analisi di immagine già a 4 giorni e poi a 11 giorni si sono evidenziate altre zone con diversa emissione di fluorescenza definite area 3 ed area 4 (area di risposta lontana dal punto di inoculo), rispettivamente Figura 32a e Figura 32c. Questo risultato, oltre a dimostrare l'eterogeneità nella risposta sulla superficie fogliare da parte della pianta, ha evidenziato la possibilità di monitorare precocemente, fin dagli stadi iniziali, l'evoluzione di una malattia. Tutte le piante analizzate hanno confermato questa osservazione. Quindi, l'analisi di immagine in fluorescenza permette la visualizzazione della propagazione della malattia, e quindi del fungo, non solo nella zona adiacente al punto di inoculo, ma anche in aree lontane (Figura 32 e Figura 36). La comparsa di zone di diversa fluorescenza, indice di reazione fisiologica correlata all'azione del patogeno anche in aree lontane dall'inoculo (Figura 36a), è confermata dalla comparsa di necrosi negli stessi punti nei giorni successivi (11 giorni) (Figura 37). L'utilizzo di questa tecnica non distruttiva, quindi, si dimostra un ottimo strumento che si affianca a studi di fisiopatologia, sia per la valutazione della risposta della pianta ad attacco di patogeni sia nell'osservazione della propagazione fin dalle fasi iniziali che della diffusione di un patogeno sulla superficie fogliare.

La massima efficienza quantica del PSII di una pianta attaccata da un patogeno, il cui organo bersaglio è direttamente la foglia, subisce un danno a partire da 4 giorni dall'inoculazione come dimostrato dai valori di  $F_v/F_m$  significativamente inferiori rispetto alle foglie di piante analizzate prima dell'inoculazione ( $T_0$ ) (Tabella 3). I valori di  $F_v/F_m$ , non significativamente diversi tra l'area direttamente interessata dalla propagazione del patogeno (area 1) e l'area lontana dal punto di inoculo (area 2), confermano il danno al PSII anche nelle aree della superficie fogliare dove non c'è la presenza diretta del patogeno. I valori di ETR e di qP, significativamente più alti nell'area 1 rispetto l'area 2, rispettivamente dopo 4 e 8 giorni dall'inoculazione (Tabella 3), confermati anche

dall'analisi di immagine di Y(II) (Figura 33b) e qP (Figura 34b) a 7 giorni, suggeriscono una maggiore attività fotosintetica nell'area 1, come già osservato da Pomar *et al.*, (2004) durante le prime fasi dello sviluppo di *Verticillium dahliae* su *Capsicum annuum*. Infatti nell'area 1 l'interazione fra pianta e patogeno è di tipo biotrofico. In tale zona, quindi, i cambiamenti metabolici indotti dalla presenza del fungo, che utilizza e induce nuova sintesi dei fotosintati della pianta, possono causare una maggiore attività fotosintetica rispetto a zone in cui non si osserva tale interazione (Pomar *et al.*, 2004).

La concentrazione della Chl *a* e della Chl *b* in piante inoculate su fusto è significativamente diminuita rispetto ai controlli non inoculati nei giorni successivi l'inoculazione (Tabella 4) in accordo con quanto già osservato in altri modelli pianta-patogeno (Szirák *et al.*, 1984; Kuzniak e Sklodowska, 2001; Sighicelli *et al.*, 2005).

La produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> osservata nell'interazione *B. oleracea* - *P. lingam* (Figura 38) è indice di stress ossidativo (Doke, 1983; Peng e Kuc, 1992; Thordal-Christensen *et al.*, 1997; Luhov6 *et al.*, 2006). La produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> che si osserva già dopo 2 ore dall'inoculazione (Figura 38e) che aumenta dopo 6 ore (Figura 38f) e dopo 8 ore (Figura 38g) è significativamente più intensa rispetto al controllo. Dopo 24 ore la produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> si osserva anche in zone lontane dal punto di inoculo (Figura 38h), indice di formazione di nuovi focolai di infezione. La comparsa della reazione al DAB anche nel controllo a 8 ore (Figura 38c) è successiva alla ferita prodotta dall'ago (inoculazione con sola acqua sterile) e comunque più lenta rispetto alla reazione dell'ospite inoculato con *P. lingam*. L'analisi di immagine dei parametri fotochimici si confermano come metodologie utili sia per lo studio di base della fisiologia della fotosintesi che per la diagnostica precoce di malattie, essendo in grado di rilevare la patogenesi prima che sia evidente. Inoltre la possibilità di studiare ogni singola pianta in modalità non distruttiva e quindi seguita nel tempo permette l'approfondimento negli studi di base per la comprensione di meccanismi fisiologici e molecolari dell'interazione ospite-parassita.

## Capitolo 3

### 3.1. Esposizione ai metalli pesanti: valutazione della risposta fotochimica di piante accumulatrici mediante l'analisi d'immagine della fluorescenza.

L'aumento di concentrazione di inquinanti organici e di metalli pesanti è un problema molto diffuso. L'azione fitotossica di questi inquinanti, in particolare i metalli pesanti, costituenti naturali della crosta terrestre, il cui ciclo biogeochimico è drasticamente alterato da numerose attività umane (Kabata-Pendias & Pendias, 1992), minaccia la vegetazione nei paesi industrializzati. Prodotti di vari processi industriali e di diverse pratiche agricole hanno incrementato negli anni il flusso di metalli che può essere trasportato e reso disponibile anche per gli organismi vegetali (Di Baccio et al. 2003).

Alcuni metalli come manganese (Mn), ferro (Fe), rame (Cu), zinco (Zn), molibdeno (Mo) e nickel (Ni), noti come micronutrienti per l'importante ruolo fisiologico svolto, sono essenziali (Welch, 1995), tuttavia una concentrazione troppo alta li rende tossici e dannosi per le cellule vegetali (Market et al., 2003). Tra questi lo Zn, oltre ad essere presente in particolari rocce con un livello naturale tra 30 e 150 ppm (Mullican et al. 2001) e in terreni non contaminati in concentrazione inferiore a 125 ppm con una frazione disponibile  $< 10$  ppm, è uno dei più diffusi metalli utilizzati nelle attività mineraria e siderurgica, nella produzione e stoccaggio dei rifiuti e nell'applicazione di fanghi di depurazione e compost (Pinamonti et al., 1997).

Il livello fisiologico di Zn nelle foglie è di 15-50 mg kg<sup>-1</sup> di peso secco (Joshi & Mohanty, 2004) e un accumulo di alte concentrazioni può interferire, ad esempio, con il metabolismo del Fe inducendo sintomi da carenza di Fe che causa clorosi (De Fillipis and Pallaghy, 1976a,b). Un legame non controllato dello zinco a macromolecole biologiche in condizioni di tossicità determina l'attivazione di specifiche proteine (Stiborova et al., 1988). Non solo, può competere per i siti di legame con Mg<sup>2+</sup> (Watanabe and Kobayashi, 1988), la cui sostituzione nelle molecole di clorofilla, quando i livelli di Zn sono elevati, porta ad un'inibizione della Rubisco e quindi della fotosintesi (Clemens, 2001; Monnet et al., 2001). Nell'insieme, lo zinco gioca un ruolo fondamentale in molte delicate e critiche funzioni cellulari (Taiz & Zeiger, 1998; Broadley et al., 2007).

In generale, ancora poco si conosce sul fabbisogno e sulla tossicità dello Zn nelle piante, soprattutto in quelle legnose (Watmough et al., 1995; Punshon & Dickinson, 1997). Non ci sono per ora risultati univoci sull'esistenza di soglie di tolleranza o di tossicità dello zinco nelle piante, in quanto sono funzione di differenti fattori esogeni (biodisponibilità del metallo,

condizioni climatiche) ed endogeni (genotipo, condizioni fisiologiche della pianta). Inoltre, risultati sull'assorbimento e accumulo di metalli pesanti in specie arboree quale il pioppo sono limitati, come lo sono i risultati sulle risposte fisiologiche alla base dei meccanismi di tolleranza e di de-tossificazione dello zinco. Tognetti et al. (2004), infatti, hanno osservato nelle talee ibride di piante di pioppo (clone Eridano) cresciute per una stagione in terreni modificati contenenti quantità tossiche di metalli, come Zn, Cu, Cr e Cd, differenze nella capacità di assimilazione della CO<sub>2</sub> rispetto al controllo, a causa di forti limitazioni stomatiche e di danni ai cloroplasti. Tali effetti non erano presenti nelle talee del clone I-214 (Tognetti et al., 2004).

Le piante hanno evoluto, quindi, un complesso sistema di meccanismi omeostatici in grado di mantenere la concentrazione interna degli elementi essenziali tra il limite di carenza e tossicità eliminando l'elemento in eccesso. Gli stessi meccanismi di regolazione permettono di tenere gli elementi non essenziali sotto la corrispondente soglia di tossicità, specifica di ciascun metallo rendendo questo non bio-disponibile (Clemens et al 2001).

Molte specie possono tollerare alti livelli di metalli presenti nel terreno, e allo stesso tempo accumularli in diversi parti dei tessuti vegetali. La risposta delle piante allo stress causato dalla tossicità dei metalli risulta molto diversificata, dipendendo, in parte, anche dalla variabilità individuale. I meccanismi di resistenza delle piante alla tossicità dei metalli, dunque, sono riconducibili a due tipi essenziali di strategia che consistono nel tollerare (piante *indicators e accumulators*) o nell'evitare lo stress (piante *excluders*) (Baker, 1981).

Il concetto di metallo-esclusione ed i meccanismi di protezione contro l'assorbimento e la traslocazione dei metalli non sono ancora ben chiari, si ritiene che la maggior parte delle piante "*excluders*" prevenga l'assorbimento e la traslocazione degli inquinanti presenti nel suolo immobilizzandoli nella membrana plasmatica delle radici o nelle micorrize. Tali piante riescono, così, a mantenere piuttosto costante la composizione elementale dei loro tessuti interni ed a prevenire eventuali effetti tossici degli inquinanti (Baker et al., 1989).

Nelle piante *indicators e accumulators* sono stati sviluppati diversi meccanismi di metallo-resistenza, tra cui il sequestro del metallo da parte della parete cellulare, presenza di membrane metallo tolleranti e di pompe che trasportano attivamente i metalli all'esterno della cellula, detossificazione enzimatica, compartimentalizzazione, riduzione della sensibilità dei target cellulari degli ioni metallici (Bruins, 2000). In primo luogo, la protezione della pianta contro gli effetti tossici dei metalli è assicurata dal controllo dell'assorbimento radicale e del trasporto a lunga distanza dei metalli (Briat and Lebrun, 1999). Le radici infatti agiscono come una barriera che limita la traslocazione dei metalli verso il germoglio, la sua capacità di accumulo tuttavia varia a seconda della specie. Diversi autori hanno dimostrato che le piante di pomodoro sono

più tolleranti di piante di fagiolo cresciute in terreni con cadmio, in quanto il loro sistema radicale è più efficiente nell'accumulare il metallo (Leita et al., 1991; Obata and Umebayashi, 1993; Salt et al., 1995b). Nel sistema radicale si accumula la maggior quantità di metalli, mentre fusto, foglie, frutti e semi ne contengono quantità progressivamente minori (Hall, 2002). Le cellule radicali a diretto contatto con le soluzioni circolanti nel suolo sono esposte agli ioni tossici che possono danneggiare la membrana cellulare causando la perdita di potassio dalla cellula, o l'inibizione dell'attività degli enzimi superficiali (Carballeira et al., 1999). In questo caso, un efficiente meccanismo di resistenza contro i metalli ad attività redox è rappresentato da modificazioni strutturali nella membrana plasmatica tali da renderla meno vulnerabile alla perdita di nutrienti o all'inibizione enzimatica (Wainwright and Woolhouse, 1975). L'assorbimento di metalli attraverso le foglie, invece, può diventare notevole nel caso di inquinanti atmosferici che le raggiungono direttamente attraverso le deposizioni atmosferiche (Bargagli, 1998). L'elevata metallo-tolleranza di alcune specie è data dalla capacità di accumulare i metalli, soprattutto a livello cellulare, senza permettere a questi di penetrare all'interno del protoplasto, che è maggiormente sensibile alla loro azione tossica. A livello intracellulare, le piante metallo tolleranti possono adottare varie strategie per limitare l'azione tossica di quei metalli che, superando l'ostacolo della parete e della membrana cellulare, riescono a penetrare all'interno della cellula. La metallo-detossificazione all'interno delle cellule si può realizzare anche attraverso il legame con specifici ligandi organici. In questo modo si ha la formazione di complessi metallici non dannosi per la cellula. Ad esempio, sia nelle specie sensibili, che in quelle metallo-tolleranti, il maggior apporto di alcuni metalli, quali Zn, Cd e Pb, può indurre la produzione di peptidi metallo-chelanti, ricchi di residui cisteinici, generalmente definiti fitochelatine (PCs) (Rauser, 1995; Salt et al., 1995). Le PCs sono direttamente coinvolte nel controllo omeostatico (Zenk, 1996) degli ioni metallici all'interno della cellula vegetale (Ortiz et al., 1995; Galli et al., 1996; Kotrba et al., 2009). Un ulteriore meccanismo di metallo-resistenza è rappresentato dall'accumulo preferenziale dei metalli in organi senescenti, come per esempio le foglie, in modo che, con l'abscissione di tali organi, si ottenga anche la rimozione dell'eccesso di metalli dalla pianta (Bargagli, 1998; Kotrba et al., 2009). La metallo-tolleranza può essere una proprietà costitutiva determinata geneticamente, indotta in seguito all'esposizione preventiva a metalli pesanti, oppure di natura mista in quanto determinata geneticamente ma con grado di espressione dipendente dalle condizioni ambientali (Meharg, 1994). La metallo-tolleranza costitutiva è stabile e non influenzabile dalle condizioni ambientali, mentre la metallo-tolleranza indotta, essendo una forma di acclimatazione

all'ambiente (Okland et al., 1997), persiste finché sussistono gli specifici fattori di stress che ne hanno determinato l'insorgenza (Rout et al., 2000).

Tale regolazione può essere tuttavia alterata da elevate concentrazioni nell'ambiente, oltre la soglia di tolleranza. Gli organismi fotosintetici sono altamente sensibili alle elevate concentrazioni dei metalli pesanti, la cui esposizione provoca alterazioni sia a livello fisiologico, che metabolico e anatomico. Oltre alla riduzione della crescita e della produttività, il loro effetto sulle piante include la distruzione di molte funzioni cellulari mediante la formazioni di legami a gruppi proteici sulfidrilici e la sostituzione di ioni essenziali (Meharg, 1994; Boucher et Carpentier, 1999). Alcuni metalli agiscono limitando il trasporto elettronico nelle membrane tilacoidali, attraverso la formazione di radicali dell'ossigeno e la conseguente modificazione delle proteine D1 del centro di reazione e del complesso che evolve l'ossigeno. Conseguenti cambiamenti strutturali all'interno del fotosistema PSII possono alterare la funzionalità dell'intero apparato fotochimico (Ait Ali et al 2006). Inoltre, come negli stress biotici, l'esposizione a metalli pesanti determina un aumento nella produzione di ROS (Scandalios, 1997). Tuttavia, la complessità dell'interazione metalli pesanti-pianta e il notevole numero di fattori che ne influenzano i meccanismi di fitotossicità rendono la comprensione del fenomeno articolata e lontana dall'essere completa.

I sistemi vegetali quindi sono ottimi modelli per lo studio delle problematiche relative all'inquinamento da metalli pesanti.

Un'ampia attività sperimentale su questo tema ha evidenziato che i danni visibili sulle foglie sono solo la fase finale dell'azione fitotossica dei metalli pesanti ma che, anche in assenza di danni visibili, si verificano alterazioni biochimiche e interazioni fisiologiche negative. Infatti, l'esposizione oltre le soglie di tolleranza dei metalli pesanti induce danni da stress ossidativo simili a quelli causati da alte intensità luminose, da stress idrico e da alte temperature.

Come già detto, le membrane cellulari sono il bersaglio principale del processo fitotossico dei metalli pesanti, e i cambiamenti nella loro integrità, permeabilità e fluidità sono alla base dei diversi effetti riscontrati a differenti livelli di complessità strutturale degli organismi vegetali. In particolare, l'esposizione a metalli pesanti può avere un impatto negativo sulle caratteristiche fisiologiche associate all'assimilazione di carbonio, quali la pigmentazione fogliare, la funzione stomatica e la fotosintesi, dal momento che reagendo con accettori e donatori di elettroni della catena di trasporto fotosintetica alterano lo stato redox dei cloroplasti.

La misura di fluorescenza della clorofilla *a* svolge un ruolo importante nell'individuazione precoce e nel monitoraggio dello stress da metalli pesanti, contribuendo a incrementare le conoscenze riguardo all'azione degli ioni metallici sui sistemi fotosintetici (Papovic et al.,

2003; Joshi & Mohanty, 2004). L'emissione di fluorescenza della clorofilla *a* viene quindi utilizzata come sonda per valutare la tossicità dei metalli e anche per studiare la capacità di tolleranza delle piante (Joshi & Mohanty, 2004). L'alterazione di processi fotosintetici con conseguente variazione di fluorescenza osservata in piante esposte ad alte concentrazioni di metalli come Pb, Cu e Zn è stata monitorata anche con fluorimetro ad impulsi modulati (Sgardelis et al., 1994).

L'analisi di fluorescenza della Chl *a* conferma i risultati ottenuti con altre tecniche evidenziando gli effetti inibitori indotti da diversi metalli pesanti sulle reazioni redox della catena di trasporto elettronico, sia come donatori (Ouzounidou et al., 1997; Boucher & Carpentier, 1999) che come accettori di elettroni del PSII (Mohanty et al., 1990; Yurela et al., 1996).

In particolare, i parametri fotochimici  $F_0$ ,  $F_m$ ,  $F_v$ ,  $F_s$ , variano in funzione dello stadio di crescita della pianta e del tempo di esposizione alle diverse dosi di ciascun metallo (Joshi & Mohanty, 2004). Variazioni differenti sono state osservate nei valori di  $F_m$  e  $F_0$  di tilacoidi isolati trattati con diversi metalli pesanti (Boucher & Carpentier, 1999). Il decremento di resa quantica del PSII sia al buio che alla luce risulta strettamente correlato ad una forte riduzione di  $F_m$  in presenza di ioni metallici come  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $Pb^{2+}$ , ed è maggiore di quella osservata per  $F_0$ , legata a cambiamenti strutturali dei pigmenti antenna (Boucher & Carpentier, 1999). Diminuzioni di  $F_0$  e  $F_m$  risultano anche in diatomee esposte allo Zn, mentre si osserva un aumento di  $F_0$  in piante di *Halophila ovalis* trattate con basse concentrazioni di Zn (Ralph and Burchett, 1998). In ogni caso, i cambiamenti di  $F_0$  sono causati dall'impatto del metallo sulla capacità di trasferimento dell'energia da parte del complesso antenna al centro di reazione associato ad effetti fotoinibitori (Ouzounidou, 1993) con conseguente aumento del *quenching* non fotochimico (Boucher & Carpentier, 1999; Rosenqvist, 2001).

Le modificazioni fotosintetiche osservate indotte nelle piante da diversi metalli possono essere comuni, ma l'influenza che ogni metallo ha sulla fotosintesi ha un suo grado di specificità. L'uso dell'analisi d'immagine, associata alla tecnica di fluorescenza della Chl *a*, ha evidenziato una distribuzione eterogenea dell'intensità di fluorescenza di piante trattate, legata ad una differente inibizione della fotosintesi (Ciscato et al., 1999; Valcke et al., 1999), che può essere spiegata sulla base di una eterogenea distribuzione del metallo. Variazioni nell'eterogeneità spaziale del *quenching* non fotochimico e dell'efficienza fotosintetica sono state quindi valutate e monitorate attraverso le immagini di questi parametri. In particolare, l'*imaging* di fluorescenza effettuato nello studio di foglie di fagiolo trattate con Cd e di tabacco trattate con Cu ha rivelato una eterogeneità spaziale dei valori di resa quantica del PSII prima che i sintomi

specifici legati allo stress da metalli siano evidenti (Ciscato and Valcke, 1998; Chaerle et Van Der Straeten, 2000).

L'attività di ricerca, svolta in collaborazione con il C.N.R ed il CRA-ING di Montelibretti è stata finalizzata allo studio, mediante l'analisi d'immagine dell'emissione di fluorescenza, degli effetti indotti dalle alte concentrazioni dei metalli pesanti sull'apparato fotochimico di specie arboree tolleranti. L'obiettivo principale è stato quello di caratterizzare la risposta fotochimica di foglie di pioppo del clone I-214 esposte a crescenti livelli tossici di zinco.

Le migliori specie iper-accumulatrici di metalli sono state individuate, fino ad oggi, soprattutto tra le piante erbacee (Macek et al., 2004), tuttavia anche le piante arboree, quali il pioppo e il salice, presentano numerose caratteristiche ottimali per il biorisanamento (Robinson et al., 2005; Zacchini et al., 2009). Infatti la loro elevata resa in biomassa (Pulford et Watson 2003; Fischerová et al., 2006) per la produzione di energia, l'apparato radicale più esteso e profondo, l'adattabilità di alcune specie a crescere in terreni marginali, il basso impatto sulla catena alimentare e la coltivazione di colture energetiche a corta rotazione su terreni agricoli (Scarascia-Mugnozza et al., 1997; Moffat et al., 2001) costituiscono aspetti molto interessanti ai fini strategici del fitorimedio (Robinson et al., 2000). L'importanza economico-produttiva del pioppo ed il rapido accrescimento, la facilità di propagazione e la presenza di un'ampia variabilità genetica sono caratteristiche rilevanti per le esigenze di studio della biologia delle piante arboree, che ne rafforzano il suo ruolo di pianta modello (Koprivova et al., 2002).

Allo scopo di individuare modificazioni indotte dalla presenza di Zn sull'apparato fotochimico e quindi di caratterizzare la risposta fotochimica della pianta accumulatrice al termine di cinque settimane di trattamento sono state analizzate le immagini dei principali parametri di fluorescenza di foglie di *Populus x euramericana* clone I-214 a diverse concentrazioni di Zn. Al fine di una più completa analisi della risposta della pianta alla presenza di elevate concentrazioni di Zn sono stati esaminati durante il trattamento i parametri di crescita, l'assorbimento e quindi il contenuto di zinco presente nel terreno, nelle foglie e nelle radici, nonché la concentrazione dei pigmenti fotosintetici (clorofilla e carotenoidi) delle foglie di pioppo.

### **3.2. MATERIALI E METODI**

#### **Materiale vegetale**

Sono state utilizzate 28 piante di *Populus deltoides x Populus nigra* (*Populus x euramericana*) clone I-214 ottenute da talea prelevando, durante il periodo invernale, porzioni di rami da alberi

adulti provenienti da collezione clonale presso l'ex-Istituto di Sperimentazione per la Pioppicoltura di Casale Monferrato.

Le talee, sono state fatte radicare in vasi da 2L con terreno commerciale e tenute in camere di crescita in condizioni controllate di luce ( $1200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e fotoperiodo luce-buio 16:8), umidità relativa (R.U. 70%) e temperatura ( $24 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Tutte le piante, regolarmente irrigate, sono cresciute in queste condizioni per circa 6 settimane prima dell'inizio del trattamento. Le misurazioni sono state eseguite su foglie completamente espanse dopo 21 giorni (T1) e dopo 30 giorni (T2) dall'inizio del trattamento.

### **Preparazione e contaminazione dei terreni**

Al fine di assicurare condizioni di crescita omogenee idonee all'accumulo del metallo da parte della pianta sono stati utilizzati due diversi terreni:

- un terreno A composto da sabbia, terra di campo e compost in rapporto 1:1:1,5 e pH 8.2. Tale composizione, necessaria per il fabbisogno nutrizionale delle piante, è stata utilizzata per la crescita iniziale dei campioni nelle prime 6 settimane dell'esperimento.
- un terreno B meno organico e più adatto all'accumulo di metallo da parte della pianta, ha una composizione caratterizzata da sabbia e limo (*loam*), in rapporto 1:1 con aggiunta di torba. Per assicurare lo scambio ionico del metallo nell'interfaccia suolo-radici favorendone la biodisponibilità, il pH è stato aggiustato fino a 6.3 (Castiglione et al. 2009).

Al tempo T0, prima dell'inizio del trattamento, il terreno B è stato pesato e ripartito in 15 vasi da 4L. I vasi sono stati, quindi, suddivisi in tre gruppi: controllo non trattato (C); 500\_Zn e 1000\_Zn, corrispondenti rispettivamente a 500 ppm (25mM) e 1000 ppm (50mM) di zinco nel terreno. Per ogni gruppo sono state previste 5 repliche. Allo scopo di evitare il dilavamento dell'inoculo sciolto in soluzione acquosa preventivamente all'inoculazione è stata valutata la capacità drenante di ciascun terreno. Ciascun vaso quindi è stato inoculato aggiungendo 500 ml di soluzioni acquose di solfato di zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Le piante controllo sono state irrigate con 500 ml di sola acqua distillata.

Al fine di rendere omogenea la distribuzione del metallo il terreno con le soluzioni è stato mescolato in tutta la colonna, dalla superficie al fondo del vaso (0-40 cm). Per ottimizzare le condizioni di solubilizzazione del metallo ed assicurarne l'*uptake*, dopo due settimane dall'inizio del trattamento, in ogni vaso sono stati aggiunti 200 ml di una soluzione 5mM dell'agente chelante EDTA (acido etilendiamminotetraacetico  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ ) in accordo con Chen *et al.*, (2004).

### **Determinazione del contenuto di metallo nelle piante.**

Allo scopo di valutare nel tempo le concentrazioni di zinco sia nel terreno che nelle piante il metallo è stato estratto dopo tre e cinque settimane dall'inizio del trattamento (a T1 e a T2 rispettivamente), mentre per radici e foglie si è effettuato un unico prelievo al termine del trattamento (T2). Il prelievo è stato effettuato nei primi 40 cm di terreno come riportato da Castiglione *et al.*, (2009).

I campioni sono stati essiccati per 6h a 95°C e poi omogeneizzati. Dopo la dissoluzione del campione mediante attacco in digestore a microonde (Milestone 1200) con acido nitrico (HNO<sub>3</sub>), perclorico (HClO<sub>4</sub>) e fluoridrico (HF), in rapporto 5:1:1, i campioni sono stati alla fine solubilizzati e aggiunti a 50 ml di HCl 0.5M.

Le soluzioni così ottenute sono state analizzate con spettrometria di emissione in sorgente a plasma (ICP-OES Inductively Coupled Plasma) usando un Perkin Elmer Optima 2000. Sono state eseguite due letture per ciascun campione preparato. I dati delle misure di concentrazioni di Zn nelle radici e nelle foglie sono stati normalizzati rispetto al controllo e mostrati come incremento percentuale del metallo nei due tessuti vegetali al termine del trattamento.

### **Misura dei parametri morfometrici delle piante**

La crescita dei campioni è stata valutata al tempo T1 e T2. Sono state misurate sia la lunghezza del fusto (dalla base alla gemma apicale) che il numero di foglie nuove. La lunghezza delle radici è stata determinata alla fine del trattamento (T2). Gli stessi parametri sono stati misurati al tempo T0, prima dell'inizio del trattamento.

### **Estrazione dei pigmenti fotosintetici**

Allo scopo di valutare eventuali modificazioni nel contenuto dei pigmenti fotosintetici delle piante trattate rispetto al controllo è stata determinata la concentrazione dei pigmenti fogliari al termine della quinta settimana di trattamento (T2). Campioni di foglie sono state immerse per 24 h al buio in acetone 80% a 4°C. Per ottenere la separazione del pellet dal supernatante, i campioni sono stati centrifugati a 4000 rpm per 20 minuti. Le soluzioni così ottenute sono state analizzate allo spettrofotometro (Perkin Elmer λ25). Il supernatante è stato prelevato e posto in cuvette al quarzo da 1 cm di cammino ottico, la lettura è stata effettuata nello spettro del visibile, fra 400 e 800 nm.

Dagli spettri così ottenuti sono state selezionate le lunghezze d'onda e i relativi coefficienti di estinzione secondo Lichtenthaler (1987) con cui sono state calcolate le concentrazioni in µg/mg di clorofilla *a*, *b* e dei carotenoidi totali.

## Misura dei parametri di fluorescenza

I parametri fotochimici sono stati determinati misurando la fluorescenza emessa dalle foglie ( $n=4$ ) di ogni pianta adattata al buio per 20 minuti e poi esposta a valori crescenti di PAR da 0 a  $1600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  della curva di luce. Per ogni parametro misurato o elaborato su ciascuna foglia viene calcolato il valore medio in tutte le piante al tempo T1 e T2 su una stessa area, pari a  $6 \text{ cm}^2$  corrispondenti all'area di misura dell'immagine  $2 \times 3 \text{ cm}$  del fluorimetro Imaging-Pam.

Misure dirette di fluorescenza minima ( $F_0$ ) e di fluorescenza massima ( $F_m$ ) delle curve di luce nei due tempi hanno consentito di determinare mediante il software dello strumento, in accordo con Genty et al (1989), i valori di efficienza massima del PSII al buio ( $F_v/F_m$ ) e alla luce ( $Y_{II}$ ), così come i parametri di quenching non fotochimico (NPQ). Sono stati inoltre calcolati alcuni rapporti di fluorescenza variabile ( $F_v$ ), valutati come ulteriori indicatori dello stato di salute del PSII. In particolare, essi includono l'integrità del PSII ( $F_v/F_0$ , Dan et al., 2000; Ruley et al., 2004), l'efficienza del plastochinone pool ( $F_v/2$ , Bolhar-Nordenkamp and Oquist, 1993), l'efficienza del *water-splitting apparatus* ( $F_0/F_v$ , Kriedemann et al., 1985).

## Elaborazione d'immagine dei parametri fotochimici

Per l'elaborazione delle immagini di parametri delle singole superfici fogliari è stato sviluppato un nuovo software funzionale alle esigenze sperimentali utilizzando la piattaforma di programmazione MATLAB.

Il programma sviluppato è comprensivo di una interfaccia grafica (GUI) che permette all'utente di caricare i dati provenienti dal PAM e di selezionarne il parametro fotochimico e la PAR. Attraverso specifici algoritmi individuati durante la sperimentazione il software è in grado di effettuare diverse operazioni statistiche sulle immagini, sia sull'intera superficie analizzata che su piccole porzioni.

La caratteristica principale del programma, poi utilizzata per la comprensione dei parametri durante tutta la sperimentazione, è quella di determinare la distribuzione delle frequenze dei singoli parametri fotochimici su tutta la superficie fogliare, caratterizzandone l'andamento per mezzo di curve parametriche di tipo gaussiano (Figura 39). Tali risultati vengono salvati su file di tipo EXCEL per permetterne l'importazione in altri software di analisi statistica come Origin8 (OriginLab®). In questo modo attraverso l'analisi dei parametri che caratterizzano ogni singola gaussiana è stato possibile determinare in modo oggettivo le risposte ai diversi trattamenti cui sono state esposte le piante.

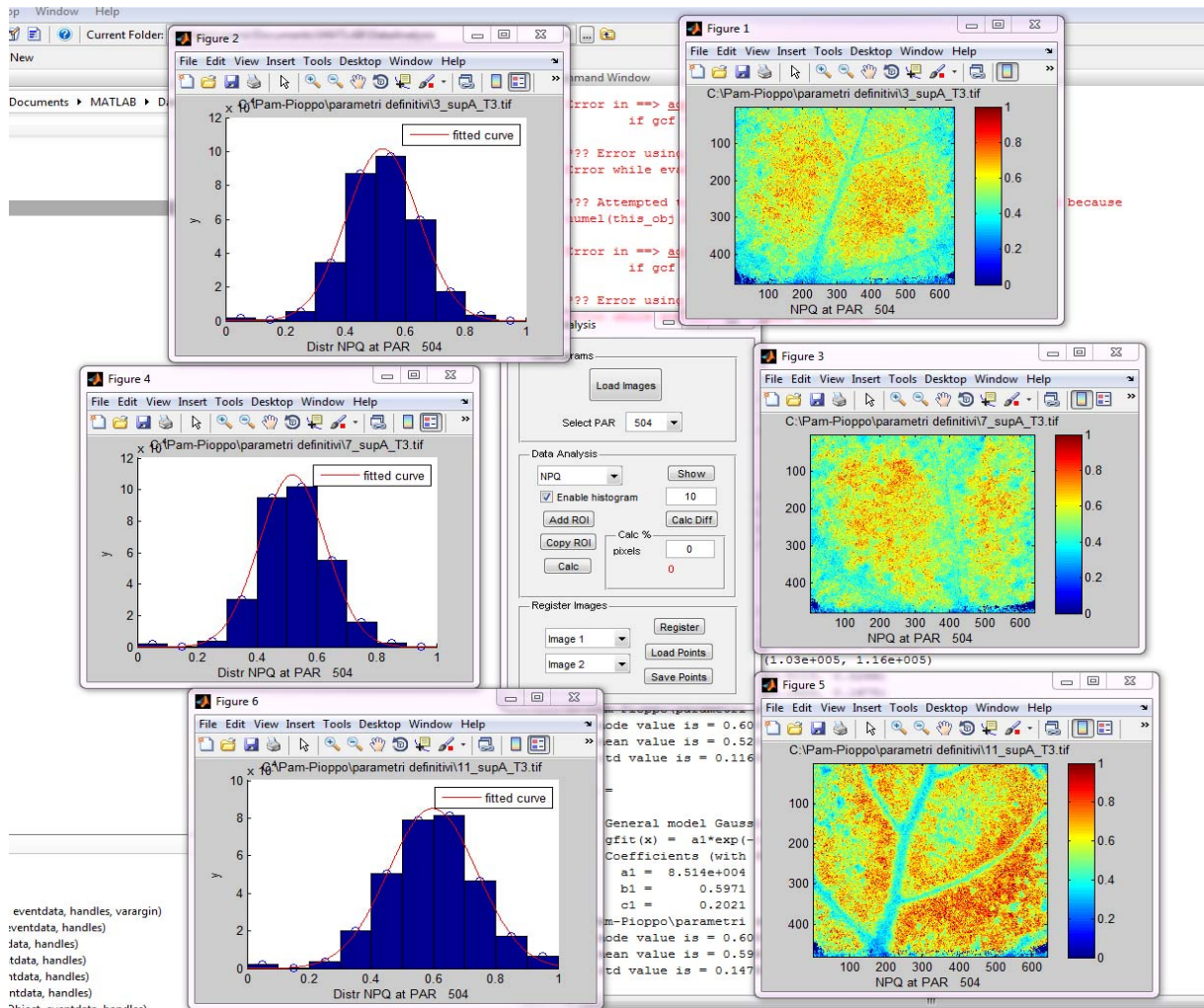


**Figura 39: Interfaccia software sviluppato per l'elaborazione avanzata dei dati acquisiti mediante fluorimetro Imaging-PAM.**

Ogni immagine rielaborata, formata da 640x480 pixel, contiene le informazioni relative a ciascun parametro, in particolare ad ogni pixel è associato un valore del parametro in esame, così l'insieme dei valori risulta spazialmente distribuito su tutta l'area di misura di ogni foglia. In questo modo per ciascun parametro si è potuto descrivere mediante il software le distribuzioni di frequenza dei pixel, per le quali è stato possibile successivamente effettuare un fitting di tipo gaussiano confermato dai valori di  $R^2$  dell'analisi statistica.

I dati sperimentali presentano una distribuzione simmetrica con forma genericamente a campana caratterizzata da un picco, quindi l'analisi delle immagini è stata ricondotta allo studio dei parametri che caratterizzano la distribuzione, in cui il picco di ogni gaussiana rappresenta il valor medio della distribuzione ( $x_c$ ) al quale corrisponde il numero massimo di pixel, cioè l'altezza della curva (H). In più, la larghezza a mezza'altezza (FWHM) e l'area sottostante la curva (A) ne definiscono meglio la forma rendendo possibile il confronto tra distribuzioni di più foglie nei due tempi di misura (Figura 39).

### **Elaborazione statistica dei dati**

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante test dell'analisi della varianza (ANOVA) a una e a due vie, utilizzando il programma d'analisi statistica Origin8 (OriginLab®). Per il confronto delle medie sono stati eseguiti test post hoc come LSD di Fisher e HSD di Tukey, con livello di confidenza  $\alpha$  0.05.

## **3.3. RISULTATI**

### **3.3.1. Esame del contenuto di metallo nei campioni**

In Figura 40 è riportato il contenuto di Zn presente nel terreno a T0 e T2 (Figura 40a) e nelle piante a T2 (Figura 40b). I risultati confermano i livelli di tossicità nei quali sono cresciuti i cloni I 214 di *Populus x euramericana* e la loro capacità di accumulare lo zinco. I terreni contaminati con alte concentrazioni di Zn, 500 e 1000 ppm a T0 presentano differenze significative del contenuto di metallo rispetto al controllo (65 ppm) dopo 30 giorni di trattamento (T2) (Figura 40a). In particolare, nei suoli esposti a 1000 ppm si osserva una riduzione della concentrazione di Zn del 21.4% significativamente maggiore di quella trovata a 500 ppm (-10.5%) (Figura 40a).

In Figura 40b è riportata la percentuale di accumulo di Zn nelle piante trattate rispetto ai controlli non trattati al tempo T2. Si osserva un aumento significativo del contenuto del metallo sia nelle radici che nelle foglie; in particolare, nelle radici delle piante trattate a 1000 ppm il bioaccumulo osservato è 2.5 volte maggiore di quello a 500 ppm (Figura 40b). Tra i due trattamenti invece non si osservano differenze significative nella quantità di Zn traslocata nelle foglie, facendo supporre un effetto soglia nella capacità di trasporto del metallo nella parte aerea della pianta.

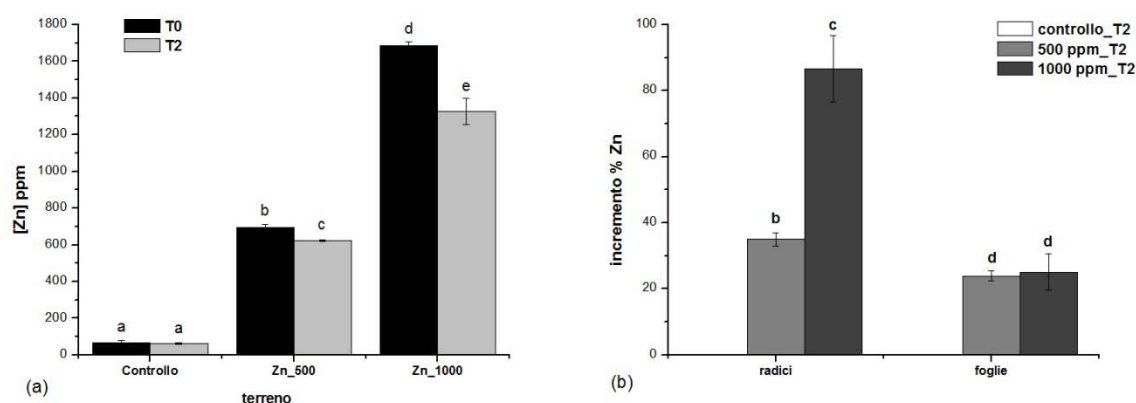


**Figura 40: (a) Contenuto di Zn in ppm presente nel terreno a T0 e T2 ( $F=9.268$  significativo con  $P\leq 0.01$ ). (b) Incremento percentuale di Zn nelle radici ( $F=30.801$  significativo con  $P\leq 0.01$ ) e nelle foglie ( $F=18.734$  significativo con  $P\leq 0.05$ ) a T2. Le barre indicano l'errore standard. I valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test HSD di Tukey con livello di confidenza  $\alpha=0.05$ .**

Il fattore di bio-concentrazione (BCF) dello Zn nel sistema radicale e nelle parti aeree della pianta non è diverso nelle piante trattate a 500 e a 1000ppm, mentre quello di traslocazione ( $T_f$ ), indice della capacità della pianta di accumulare nelle parti aeree (fusto e foglie) il metallo assorbito dalle radici (Zayed *et al.*, 1998), è differente rispettivamente 69 nei campioni a 500 ppm e 30 nei campioni a 1000 ppm.

### 3.3.2. Valutazione dei parametri morfometrici

In Figura 41 sono mostrati i risultati ottenuti sui parametri di crescita dei campioni esposti alle due concentrazioni di Zn nel terreno rispetto al controllo.

I valori della lunghezza delle radici (Figura 41a), del fusto (Figura 41b) e del numero di foglie nuove (Figura 41c) sono stati misurati a diversi tempi (T0, T1 e T2).

L'incremento osservato in tutti i parametri di sviluppo morfologico studiati evidenzia un trend di crescita in tutti i campioni esaminati. Sia nel fusto che nelle radici delle piante trattate si osserva un accrescimento durante tutto il periodo di esposizione (Figura 41a-b), anche se le piante esposte a 1000 ppm alla fine del trattamento mostrano un incremento percentuale più basso delle piante cresciute a 500 ppm, sia per il parametro lunghezza delle radici (+6.5% rispetto a +22.75%) che per quello del fusto (+15.38% rispetto a +35.48%), come anche osservato da Di Baccio *et al* (2003). La percentuale di aumento del numero di foglie nuove, invece, appare simile tra i due trattamenti (+33% rispetto a +30%), contribuendo a sostenere un possibile effetto soglia sulla capacità di traslocare lo Zn dalle radici alle foglie.

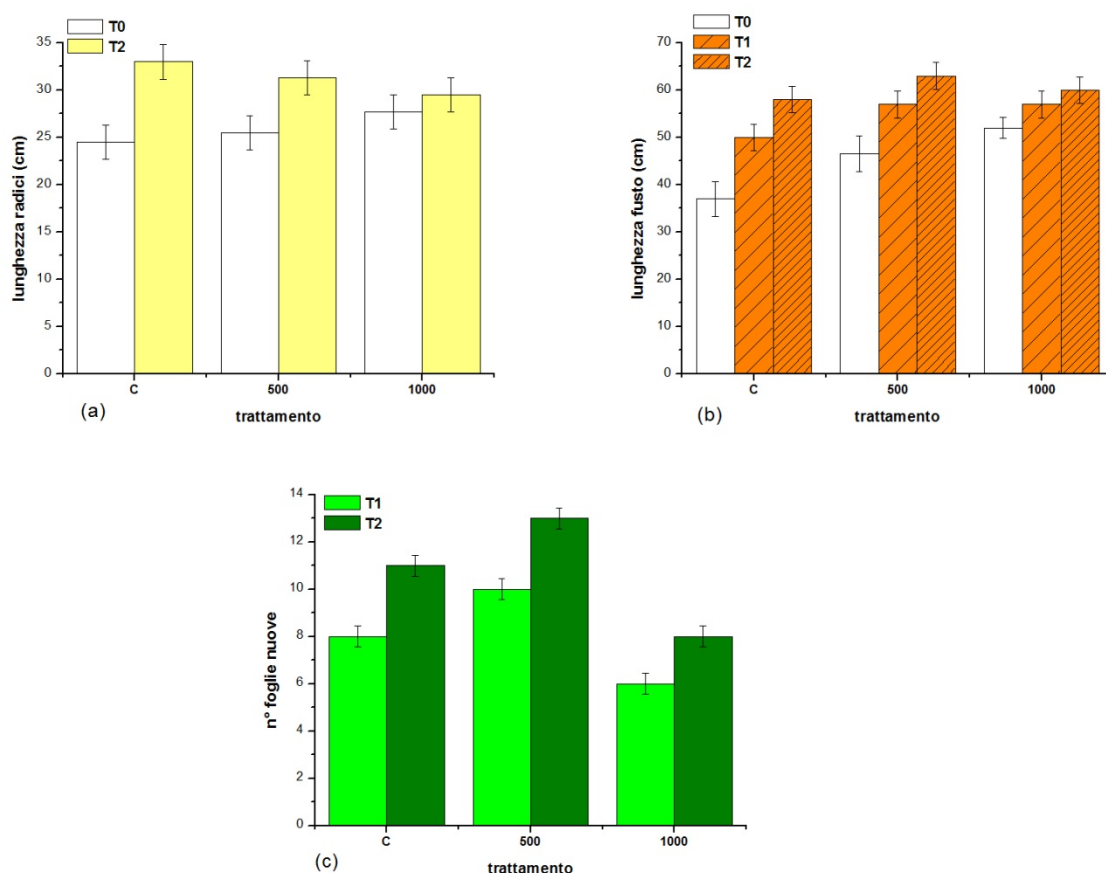


**Figura 41: Parametri di crescita di piante trattate con 500 e 1000 ppm di Zn e controllo non trattato, (a) lunghezza delle radici a T0 e T2; (b) lunghezza del fusto a T0, T1 e T2; (c) numero di foglie nuove a T1 e T2. Le barre indicano l'errore standard.**

### 3.3.3. Analisi del contenuto dei pigmenti fotosintetici

In Figura 42 sono riportati i risultati sulle concentrazioni dei pigmenti nelle foglie al tempo T2 al termine delle settimane di trattamento.

Sia nelle piante trattate a 500 che nelle piante a 1000 ppm di Zn non si osservano differenze significative né nella concentrazione di Chl *a* né in quella di Chl *b*.

La concentrazione dei carotenoidi totali, principali componenti dei complessi antenna, invece è significativamente inferiore nelle piante trattate con 1000 ppm di metallo ( $4.11 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) rispetto alle piante cresciute a 500 e al controllo ( $4.84 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  e  $5.02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , rispettivamente).

Per poter meglio evidenziare l'effetto dei trattamenti sulla sintesi del *photosystem cores* e degli altri pigmenti del complesso di raccolta della luce sono stati calcolati i rapporti tra Chl *a/b* e Chl<sub>tot</sub>/Car<sub>tot</sub> (Figura 42d-e). Le piante cresciute in terreno contaminato con 500 e 1000 ppm di Zn mostrano valori di Chl *a/b* tra loro confrontabili, rispettivamente 3.54 e 3.56, significativamente maggiori rispetto al controllo (Chl *a/b* 3.32). Un incremento significativo si osserva anche nel rapporto tra clorofille e carotenoidi totali, in cui i valori più alti sono presenti

nelle foglie delle piante contaminate (4.57 in Zn 500 e 4.66 in Zn 1000, rispetto al valore 3.97 del controllo).

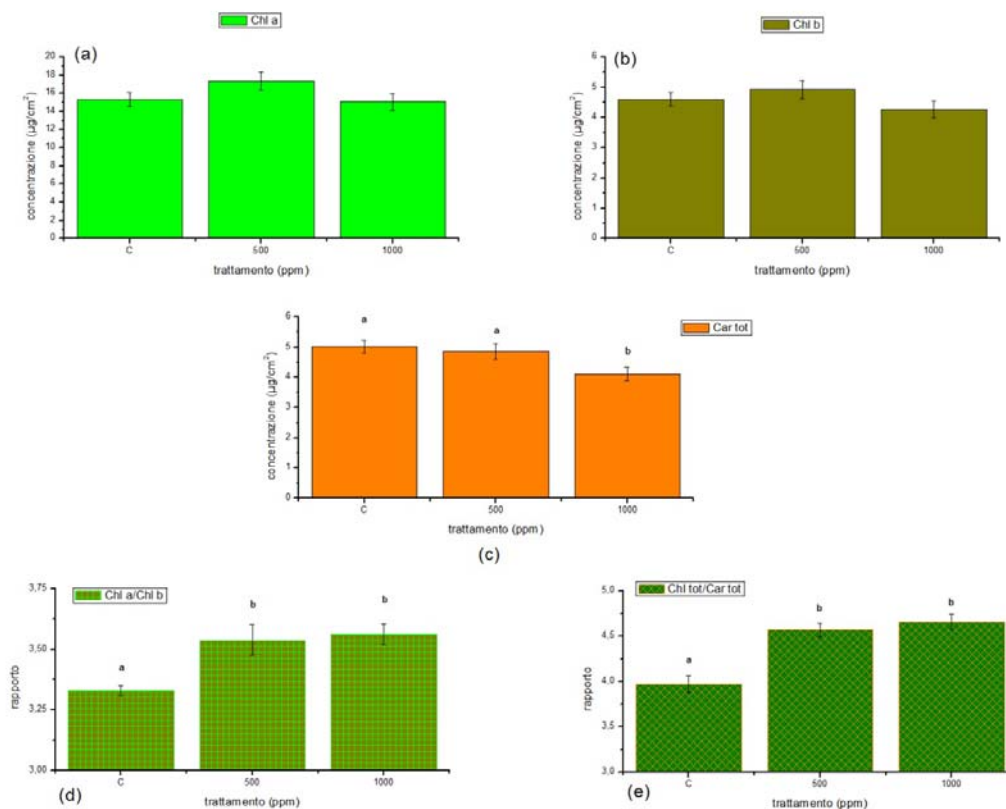


**Figura 42:** Contenuto dei pigmenti fotosintetici a T2 di piante trattate e controllo non trattato. (a) concentrazione di clorofilla *a* espressa in  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $F=1.758$  non significativo); (b) concentrazione di clorofilla *b* espressa in  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $F=1.551$  non significativo); (c) concentrazione dei carotenoidi totali (incluse xantofille) espressa in  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $F=3.774$  significativo con  $P \leq 0.05$ ); (d) rapporto tra le concentrazioni di Chl *a*/Chl *b* ( $F=4.352$  significativo con  $P \leq 0.01$ ); (e) rapporto tra le concentrazioni di Chl tot / Car tot ( $F=14.542$  significativo con  $P \leq 0.001$ ). Le barre indicano l'errore standard. Valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il LSD di Fisher con livello di confidenza  $\alpha=0.05$ .

### 3.3.4. Analisi della fluorescenza emessa della clorofilla *a*:

I risultati della risposta fotochimica di *Populus x euramericana* clone I 214 cresciuto in presenza di alte concentrazioni di zinco nel terreno sono riportati dalla Figura 43 alla Figura 47, in Figura 48 e Figura 49 sono riportati l'ulteriore elaborazione d'immagine dei parametri di resa fotochimica e non fotochimica e nelle Tavola 1÷Tavola 6 le relative immagini con il software.

#### a) Studio dei parametri di fluorescenza

Nella Figura 43 sono riportati i valori di fluorescenza minima  $F_0$  e di fluorescenza massima  $F_m$  misurati a T1 e T2 di piante controllo e piante trattate a 500 e 1000 ppm adattate al buio; nella

Figura 44 sono rappresentati i valori ricavati di fluorescenza variabile e dei rapporti ad essa associati:  $F_v/F_m$ ,  $F_v/F_0$ ,  $F_v/2$ ,  $F_0/F_v$ .

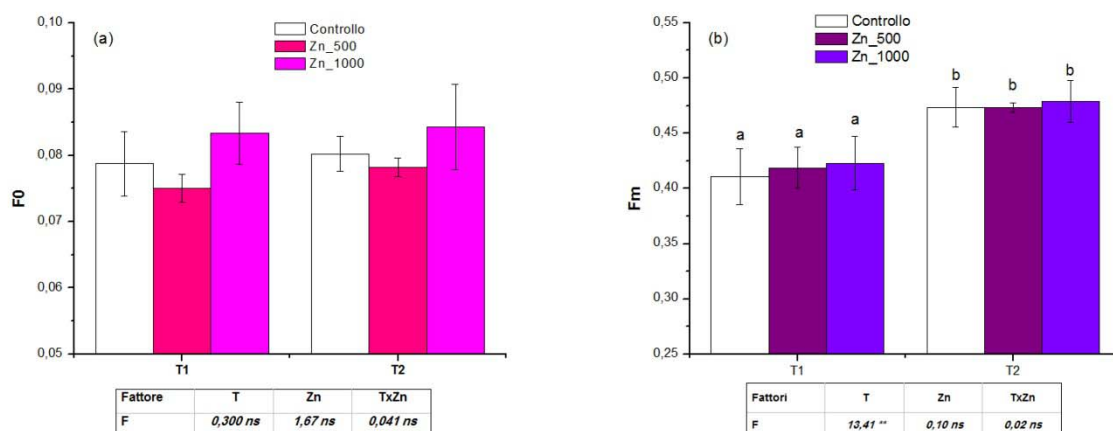


**Figura 43: Parametri di fluorescenza di piante trattate e controllo non trattato a T1 e a T2. (a) fluorescenza minima, espressa come  $F_0$ , e (b) fluorescenza massima, espressa come  $F_m$ , di foglie adattate al buio. Le barre indicano l'errore standard. I valori di F e di P dell'ANOVA sono riportati nelle tabelle, dove \*\* = significativo  $\leq 0,01$ ; ns= non significativo; T= fattore tempo; Zn= fattore dose; T x Zn = interazione tra i due fattori. Valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test HSD di Tukey con livello di confidenza  $\alpha=0.05$ .**

In riferimento ai valori di  $F_0$  non si osservano mai differenze significative nel tempo per il trattamento e neanche nell'interazione fra i due fattori (Figura 43a), mentre per  $F_m$  si osserva un suo aumento significativo nel tempo ( $F=13.41^{**}$ ) (Figura 43b). L'aumento di  $F_m$ , osservato anche nel controllo, sta ad indicare che le variazioni di fluorescenza potrebbero non essere l'indice diretto del trattamento.

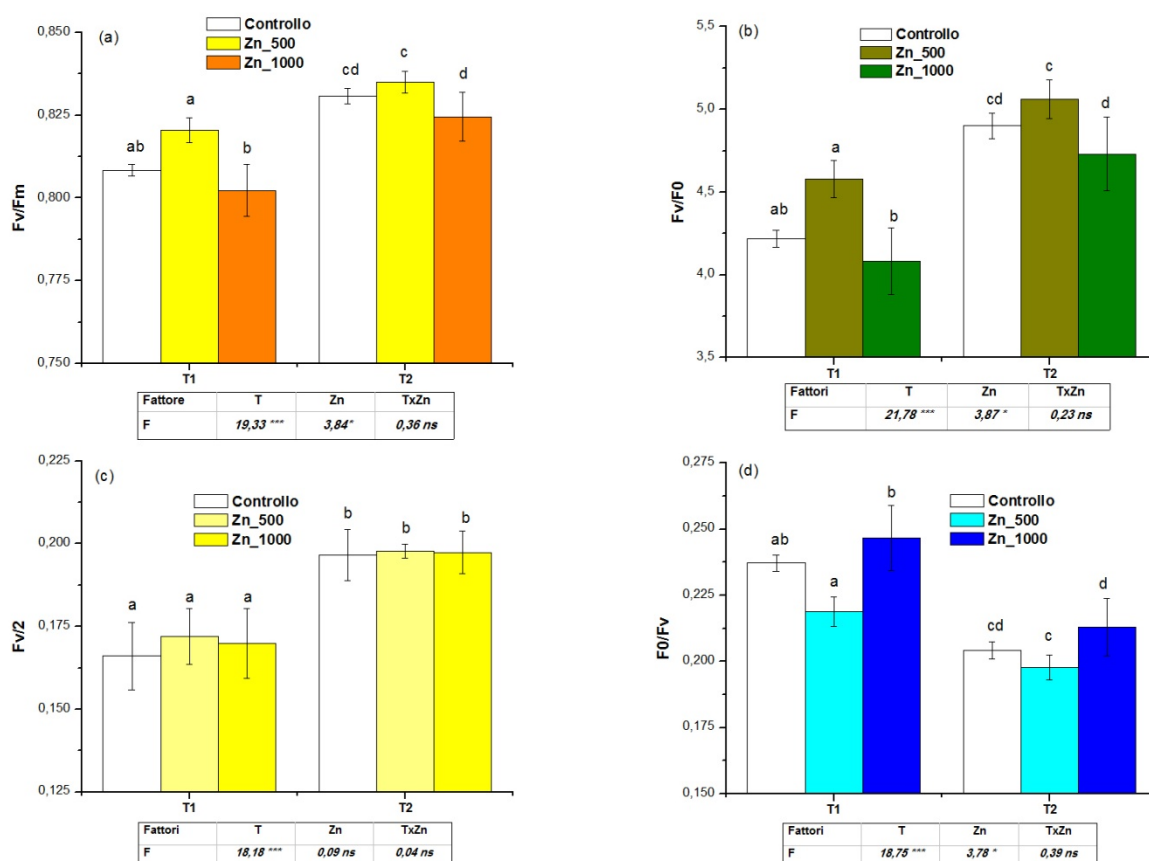


**Figura 44: Parametri fotochimici di piante trattate e controllo non trattato a T1 e a T2. (a) efficienza massima del foto sistema al buio, espressa come  $F_v/F_m$ , (b) integrità fotosintetica, espressa come  $F_v/F_0$ , (c) efficienza del pool del plastochinone, espresso come rapporto  $F_v/2$ , (d) efficienza dell'apparato di scissione dell'acqua, espresso come  $F_0/F_v$ , di foglie adattate al buio. Le barre indicano l'errore standard. I valori di F e di P dell'ANOVA sono riportati nelle tabelle, dove \*\*\* = significativo  $\leq 0,001$ ; \*\* = significativo  $\leq 0,01$ ; \* = significativo  $\leq 0,05$ ; ns= non significativo; T= fattore tempo; Zn= fattore dose; T x Zn = interazione tra i due fattori. Valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test HSD di Tukey con livello di confidenza  $\alpha=0.05$ .**

Valori di  $F_v/F_m$  (indicatore dell'efficienza fotosintetica della pianta) e di  $F_v/F_0$  (indice della condizione e del numero di centri fotosintetici attivi nel cloroplasto) rispettivamente  $\geq 0.8$  e  $\geq 0.4$  sono caratteristici di piante sane e non sottoposte a uno stress fotosintetico (Dan et al., 2000; Ruley et al., 2004). Il rapporto  $F_v/F_m$ , indicatore dello stato di salute delle piante, aumenta significativamente da T1 a T2 in tutte le piante trattate di *Populus x euramericana* (Figura 44a). Tale aumento si osserva anche nei controlli (0.81 e 0.83). Confrontando le piante trattate a 500 e a 1000 ppm si osservano differenze significative, infatti i valori di  $F_v/F_m$ , rispettivamente a T1 e T2, sono significativamente maggiori nelle piante a 500 ppm (0.82 e 0.84) rispetto a quelli delle piante trattate a 1000 ppm (0.802 e 0.825). L'interazione (T x Zn) non è significativa. Sembrerebbe quindi che nel tempo il trattamento non ha provocato danno al PSII. Anche per il parametro  $F_v/F_0$  le piante cresciute in presenza di Zn mostrano nei due tempi di misura valori  $\geq 4$ , indice di integrità fotosintetica, come osservato nel controllo (4,2 a T1 e 4,9 a

T2) (Figura 44b). Le differenze di  $F_v/F_0$  tra le due concentrazioni di Zn sono significative sia a T1 che a T2, con valori per il trattamento a 500 ppm (4.6 a T1 e 5.1 a T2) significativamente maggiori di quelli a 1000 (4.1 e 4.7).

Le variazioni del rapporto  $F_v/2$  e quindi l'impatto delle alte concentrazioni di zinco nel tempo sul pool del plastochinone sono riportate in Figura 44c. Anche per questo parametro non si osservano significativi danni, poiché le piante controllo e le piante trattate mostrano tutte un aumento significativo del parametro da T1 a T2 e non si osservano differenze significative di attività del pool tra i diversi trattamenti.

La Figura 44d mostra infine i valori del parametro  $F_0/F_v$ , indice di efficienza dell'apparato di scissione dell'acqua. Al tempo T2 si osserva un decremento significativo del parametro in tutte le piante trattate, non significativamente diverso dal controllo. Tra le piante trattate invece si osservano differenze significative in entrambi i tempi di misura, con un decremento a T2 rispetto a T1 maggiore nelle piante a 1000 ppm (-13.7% ) di quello a 500 (-9.6%).

In Figura 45 per ciascun tempo è riportato il confronto di ETR tra i diversi trattamenti (Figura 45a-b) ed i relativi fitting del primo tratto, fino a  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , di ciascuna curva di luce (Figura 45c-d), le cui pendenze determinano la velocità del trasporto elettronico (Figura 45e).

Mentre a T1 non si osservano tra i campioni differenze significative di ETR alle PAR minori di quella di saturazione (Figura 45a), confermato anche dalle rette ricavate e riportate in Figura 45c, a T2 le piante a 1000 ppm mostrano variazioni nell'andamento di ETR al variare della PAR (Figura 45c). Si osserva, infatti, una riduzione della velocità di trasporto elettronico confermata da una diminuzione di circa il 10% della *slope* calcolata dalle basse intensità di luce fino a  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 45d-e).

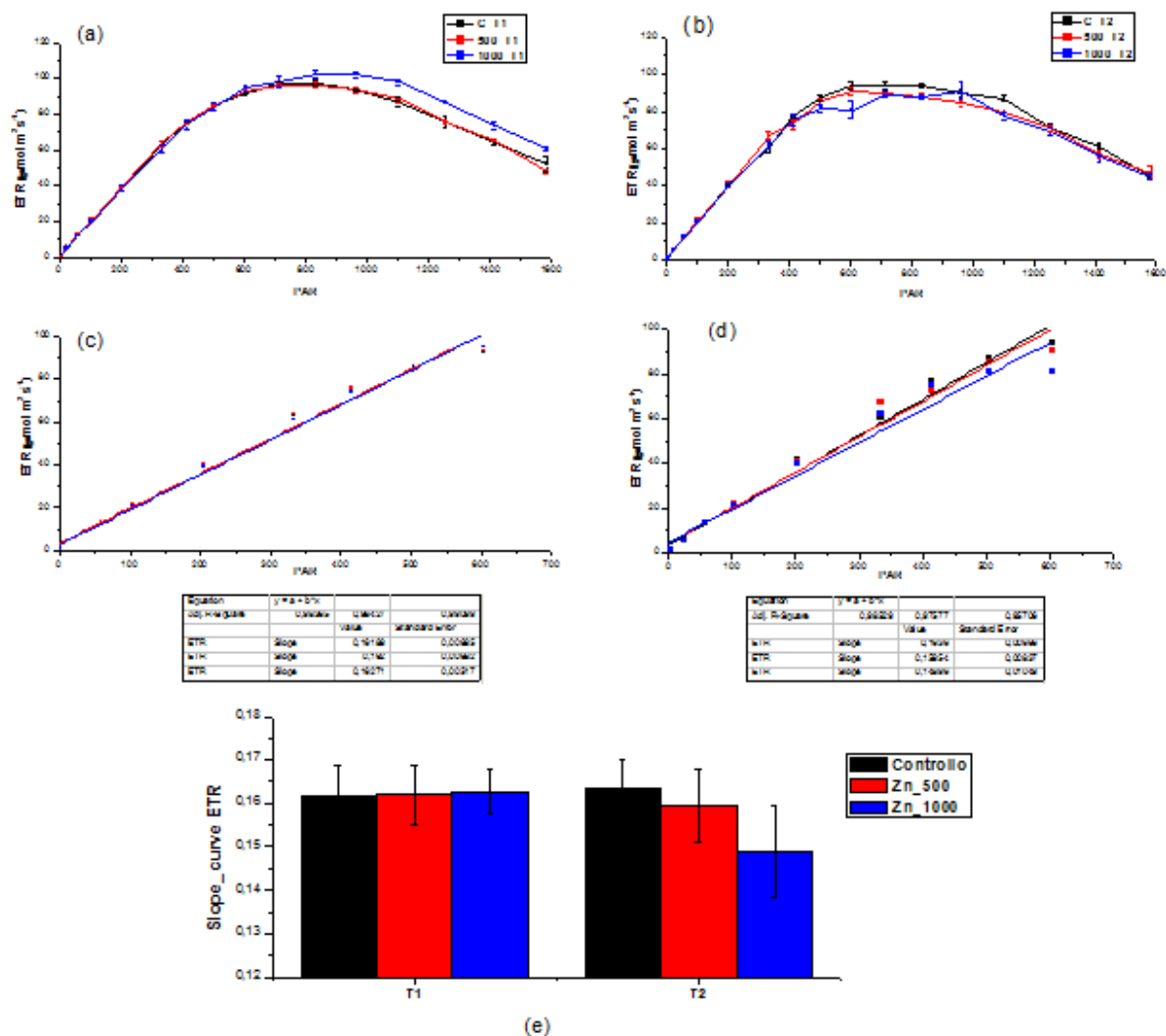


Figura 45: Trasporto elettronico espresso come ETR in  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in foglie adattate alla luce. Confronto di ETR tra piante trattate e controllo non trattato a T1 (a) e a T2 (b) al variare della PAR; (c) tratto iniziale della curva (a) a T1 e della curva (b) da 0 a 600 in  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e relativi valori della pendenza (*slope*) riportati in tabella. (e) Confronto dei valori di *slope* tra i campioni a T1 e T2. Le barre indicano l'errore standard.

La scelta della PAR ottimale per la valutazione del trasporto elettronico è stata eseguita mediante l'analisi delle curve di risposta alla luce di ETR nei due tempi di misura riportate in Figura 46 per ciascun trattamento al variare della PAR da 0 a 1600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Tutte le piante mostrano un incremento del trasporto elettronico fino ad un valore massimo raggiunto alla PAR di 800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , oltre la quale il sistema satura (Figura 46a, b e c).

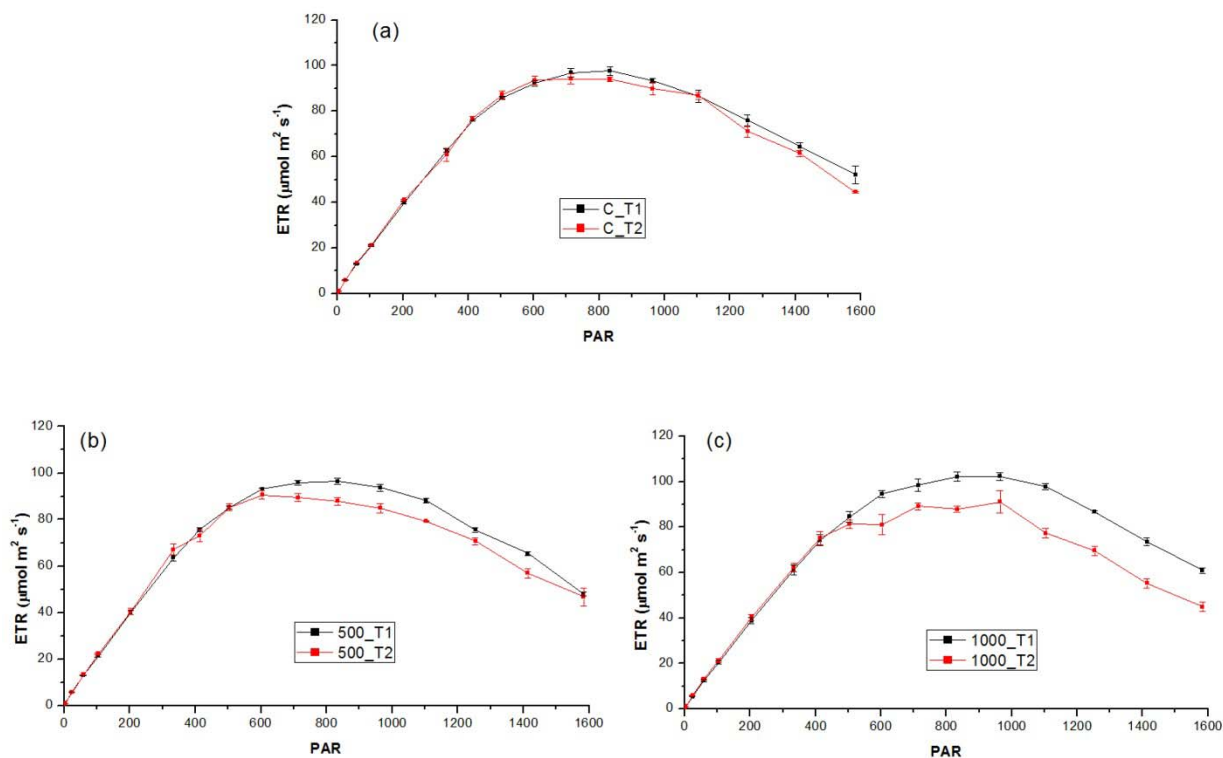


**Figura 46:** Curve di risposta alla luce di ETR espresso come  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in piante controllo non trattato (a) e in piante trattate con 500 (b) e 1000ppm (c) a T1 e T2 al variare della PAR da 0 a 1600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

In Figura 47 sono mostrati i valori massimi di ETR raggiunti alla PAR di 800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  dalle piante nelle due settimane di misura. A T1 i campioni cresciuti in presenza di zinco mostrano valori di trasporto elettronico non significativamente diversi dal controllo (98  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). A T2 i valori di ETR diminuiscono significativamente del 9.0% a 500 ppm e del 14.1% a 1000 ppm rispetto a T1. Nel controllo la riduzione di ETR osservata a T2 può essere considerata fisiologica, -2.2% rispetto a T1. Tra le piante trattate a 500 e 1000 ppm non si osservano differenze significative nel valore di ETR ( $\sim 88 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). L'interazione significativa T x Zn, ( $F=5.72$  \*\*) osservata nelle piante trattate conferma l'effetto causato dalla presenza di metalli pesanti sulla catena di trasporto degli elettroni.

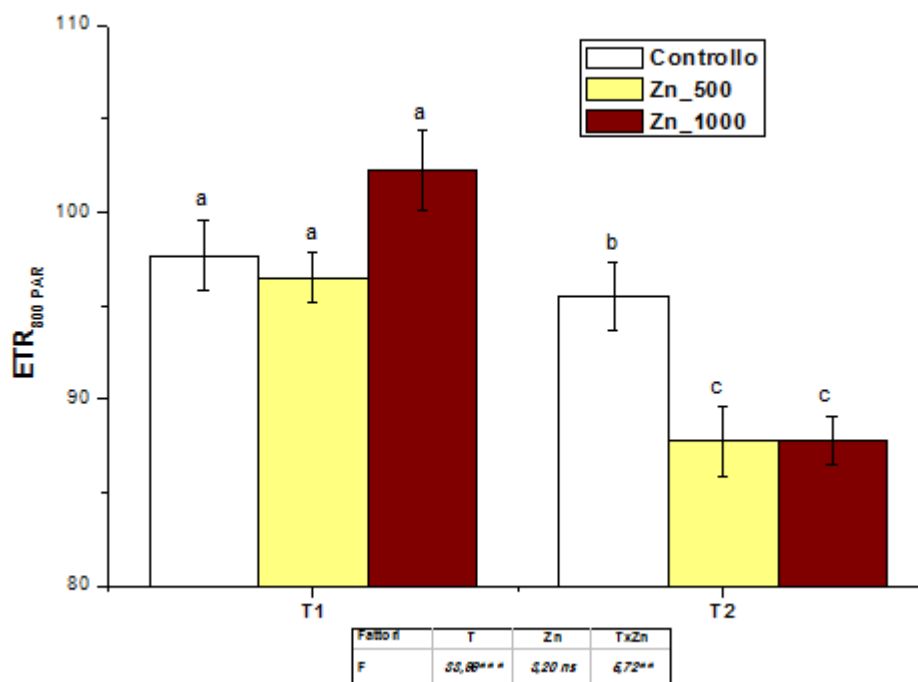


Figura 47: Trasporto elettronico espresso come ETR di foglie adattate alla luce valutato alla PAR di 800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in piante controllo e trattate con 500 e 1000 ppm di Zn. Le barre indicano l'errore standard. I valori di F e di P dell'ANOVA sono riportati nelle tabelle, dove \*\*\* = significativo  $\leq 0,001$ ; \*\* = significativo  $\leq 0,01$ ; ns = non significativo; T = fattore tempo; Zn = fattore dose; T x Zn = interazione tra i due fattori. Valori con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test HSD di Tukey con livello di confidenza  $\alpha=0.05$ .

## b) Studio dell'elaborazione d'immagine dei parametri fotochimici

Lo studio degli effetti dello zinco sullo stato di salute di *P. x euramericana*, ed in particolare della capacità del clone I-214 di tollerare e accumulare livelli tossici del metallo, è stato eseguito anche attraverso l'analisi d'immagine dei parametri fotochimici sulla stessa area fogliare nel tempo. Le immagini acquisite con il fluorimetro sono state importate ed elaborate nel software d'analisi progettato e sviluppato in funzione delle esigenze sperimentali.

La grande quantità di dati elaborata per ogni parametro determinato su ciascuna foglia analizzata di ogni pianta ha necessariamente richiesto una sintesi delle immagini ottenute. Per questo sono state selezionate le immagini significativamente rappresentative di 8 foglie, di cui 4 di una pianta trattata a 500 ppm e 4 di una trattata a 1000 ppm, in confronto a 3 foglie di una pianta controllo.

Le immagini selezionate dei parametri analizzati quali la resa quantica del fotosistema II (YII) ed il quenching non fotochimico (NPQ), al tempo T1 e T2 di piante adattate alla luce, sono riportate rispettivamente in Tavola 1, Tavola 2, Tavola 3 e in Tavola 4, Tavola 5, Tavola 6. Tali immagini sono acquisite ad un'intensità di PAR di 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  alla quale le variazioni di ETR osservate nelle curve di luce tra i due tempi sono risultate significative (Figura 45).

Ogni immagine rielaborata dal software è formata da 640x480 pixel, ad ogni pixel è associato un valore del parametro in esame, così l'insieme dei valori risulta spazialmente distribuito su tutta l'area di misura di ogni foglia. Per ciascun parametro è stata determinata la distribuzione di frequenza del numero di pixel, i cui valori di  $R^2$  riportati nei grafici (Figura 48-Figura 49) confermano il fitting di tipo gaussiano effettuato.

Nella Figura 48 sono riportate le distribuzioni di frequenza del numero di pixel a T1 e a T2 elaborate per il parametro Y(II) di diverse foglie di ciascuna pianta presa in esame.

Al tempo T1, dopo tre settimane di esposizione allo Zn, le piante trattate non differiscono dal controllo non trattato (Figura 48a-b-c), risultato confermato anche dall'analisi d'immagine (Tavola 1sx, Tavola 2sx, Tavola 3sx) dove si osserva un'uniformità di risposta tra le diverse foglie. Il valore medio di Y(II) su tutta l'area è pari a 0.4, ottenuto dal contributo del maggior numero di pixel di ciascuna foglia compreso tra 0.35 e 0.45, valori corrispondenti rispettivamente al 36 % e al 34% dei pixel, e nel complesso al 70% dell'immagine acquisita.

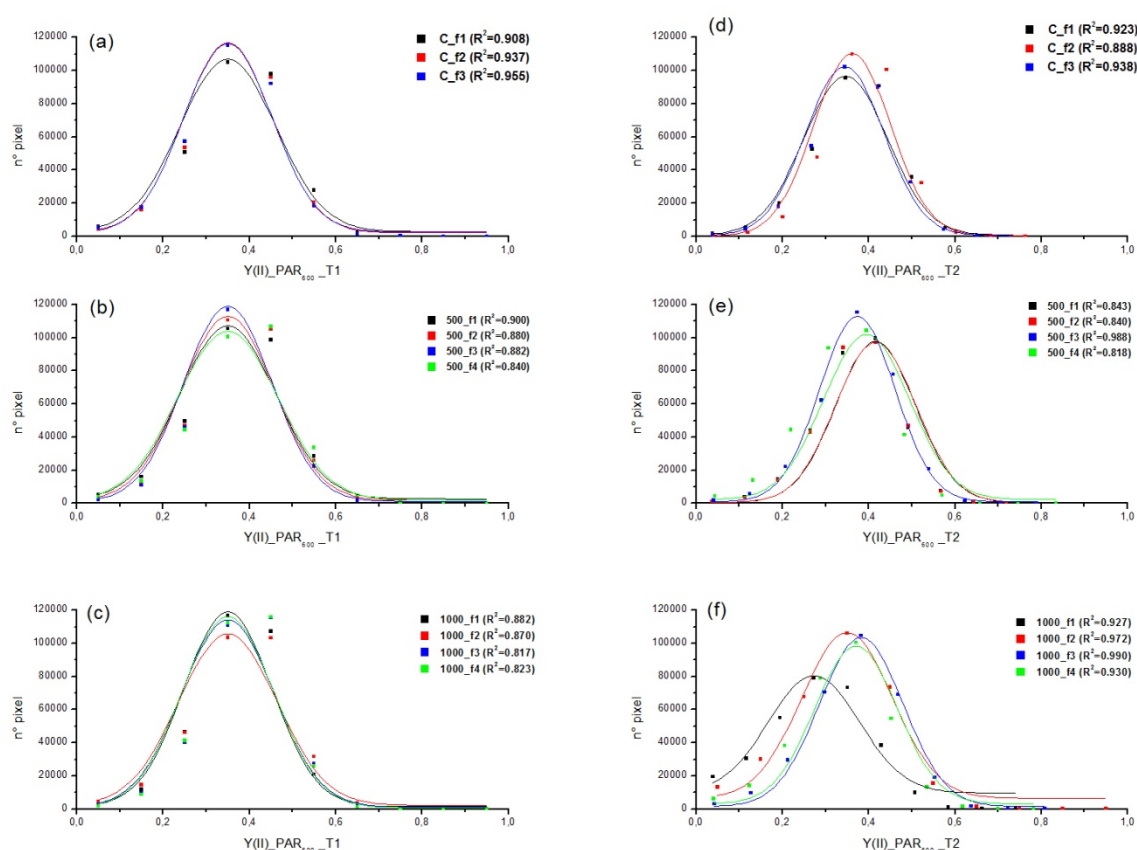


**Figura 48:** Distribuzione di frequenza dei pixel delle immagini di resa quantica del PSII, espressa come Y(II), di piante adattate alla luce acquisite alla PAR di 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ed elaborate dal software. Fitting gaussiano delle distribuzioni di (a) foglie di piante controllo non trattate a T1; (b) foglie di piante trattate con 500 ppm a T1; (c) foglie di piante trattate con 1000 ppm a T1; (d) foglie di piante controllo non trattate a T2; (e) foglie di piante trattate con 500 ppm a T2; (f) foglie di piante trattate con 1000 ppm a T2. Sono indicati i valori del quadrato del coefficiente di correlazione ( $R^2$ ).

Al tempo T2, al termine delle cinque settimane di trattamento, invece si osservano differenze nell'andamento delle curve di distribuzione dei pixel tra piante trattate e controllo non trattato (Figura 48d-e-f). Nel controllo (Figura 48d) non si osservano differenze nelle diverse foglie analizzate e la riduzione di ampiezza delle curve osservata indica la presenza di scarti meno frequenti rispetto al valor medio. Questo spiega anche l'omogeneità osservata nelle immagini delle foglie (Tavola 1dx).

I risultati sulle foglie di piante cresciute a 500 ppm, anche se rilevano un andamento confrontabile con il controllo, mostrano un valor medio significativamente più grande, evidenziato dallo spostamento verso destra delle curve (Figura 48e).

Nelle foglie delle piante trattate a 1000 ppm le differenze nella risposta sono più evidenti e in ogni caso si osserva una diminuzione significativa del numero di pixel intorno al valor medio, mentre non è significativa la variazione d'ampiezza delle curve analizzate (Figura 48f). La maggiore frequenza di pixel che si discostano dal valor medio della distribuzione spiegherebbe la maggiore eterogeneità presente nelle immagini riportate nella Tavola 3dx.

La Figura 49 mostra le distribuzioni di frequenza del numero di pixel elaborate per NPQ ai tempi T1 e a T2 di foglie diverse di piante trattate e del controllo non trattato. Già a T1 si evidenziano delle differenze nelle distribuzioni di NPQ tra le foglie delle diverse piante, contrariamente a quanto osservato per Y(II). Poiché il parametro NPQ evidenzia una diversa attività di azione alla luce da parte dei pigmenti antenna coinvolti nel processo di quenching non fotochimico, valutati anche tramite l'analisi dei pigmenti, la capacità di dissipare l'energia luminosa da parte di foglie differenti della stessa pianta appare più eterogenea nella pianta controllo di quella mostrata dalle foglie della pianta a 500 e dalle foglie della pianta a 1000 ppm (Figura 49a-b-c).

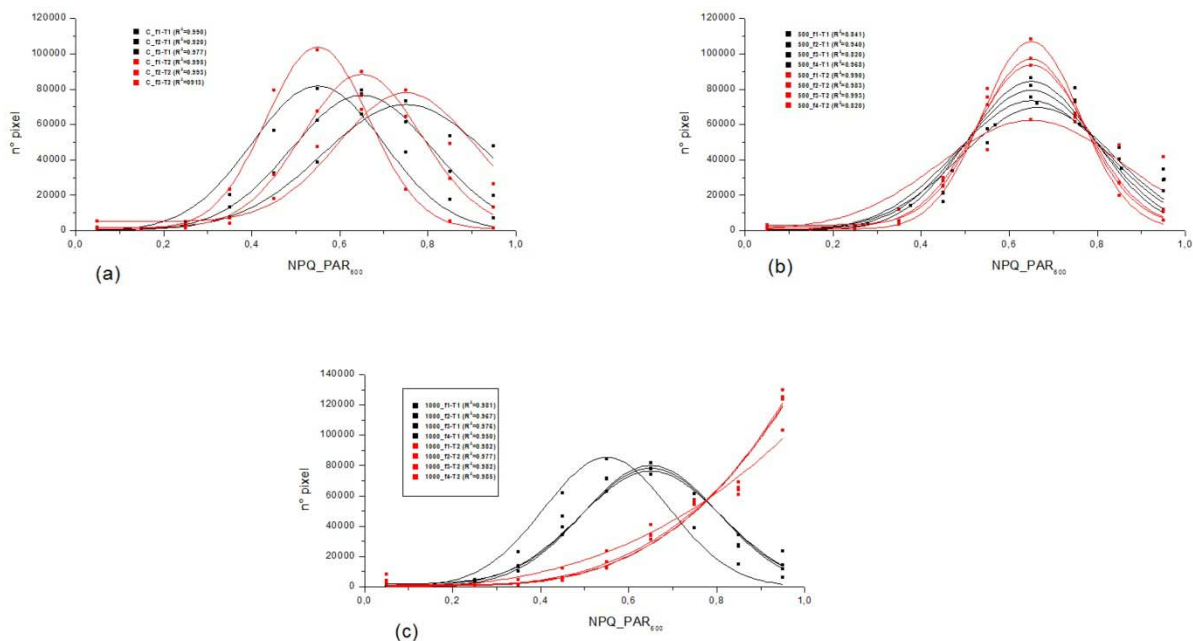


**Figura 49: Distribuzione di frequenza dei pixel delle immagini di quenching non fotochimico, espresso come NPQ, di piante adattate alla luce acquisite alla PAR di  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ed elaborate dal software. Fitting gaussiano delle distribuzioni di (a) foglie di piante controllo non trattate a T1 (nero) e T2 (rosso); (b) foglie di piante trattate con 500 ppm a T1 (nero) e T2 (rosso); (c) foglie di piante trattate con 1000 ppm a T1 (nero) e T2 (rosso); sono indicati i valori del quadrato del coefficiente di correlazione ( $R^2$ ).**

Nella pianta controllo infatti i picchi a T1 sono separati e corrispondenti ad attività diverse di NPQ, mentre sono sovrapposti negli altri due campioni (Figura 49a-b-c).

L'eterogeneità di risposta delle foglie della pianta controllo è confermata anche a T2, mentre si osserva una saturazione nella risposta alla luce solo nella pianta trattata a 1000 ppm (Figura 49c). Nelle foglie delle piante trattate a 500 ppm si osserva un assestamento dei valori di quenching delle antenne evidenziabile da una diminuzione dell'ampiezza ed un maggiore innalzamento delle curve intorno ai rispettivi valori massimi delle distribuzioni (Figura 49b).

Le immagini ottenute dai parametri NPQ ed Y(II) confermano e mettono maggiormente in evidenza l'importante ruolo svolto dai complessi antenna di ciascuna foglia analizzata, la cui modalità d'azione è finalizzata a compensare le variazioni nell'attività fotosintetica determinate dalla presenza del metallo in funzione del tempo di esposizione e della diversa concentrazione.

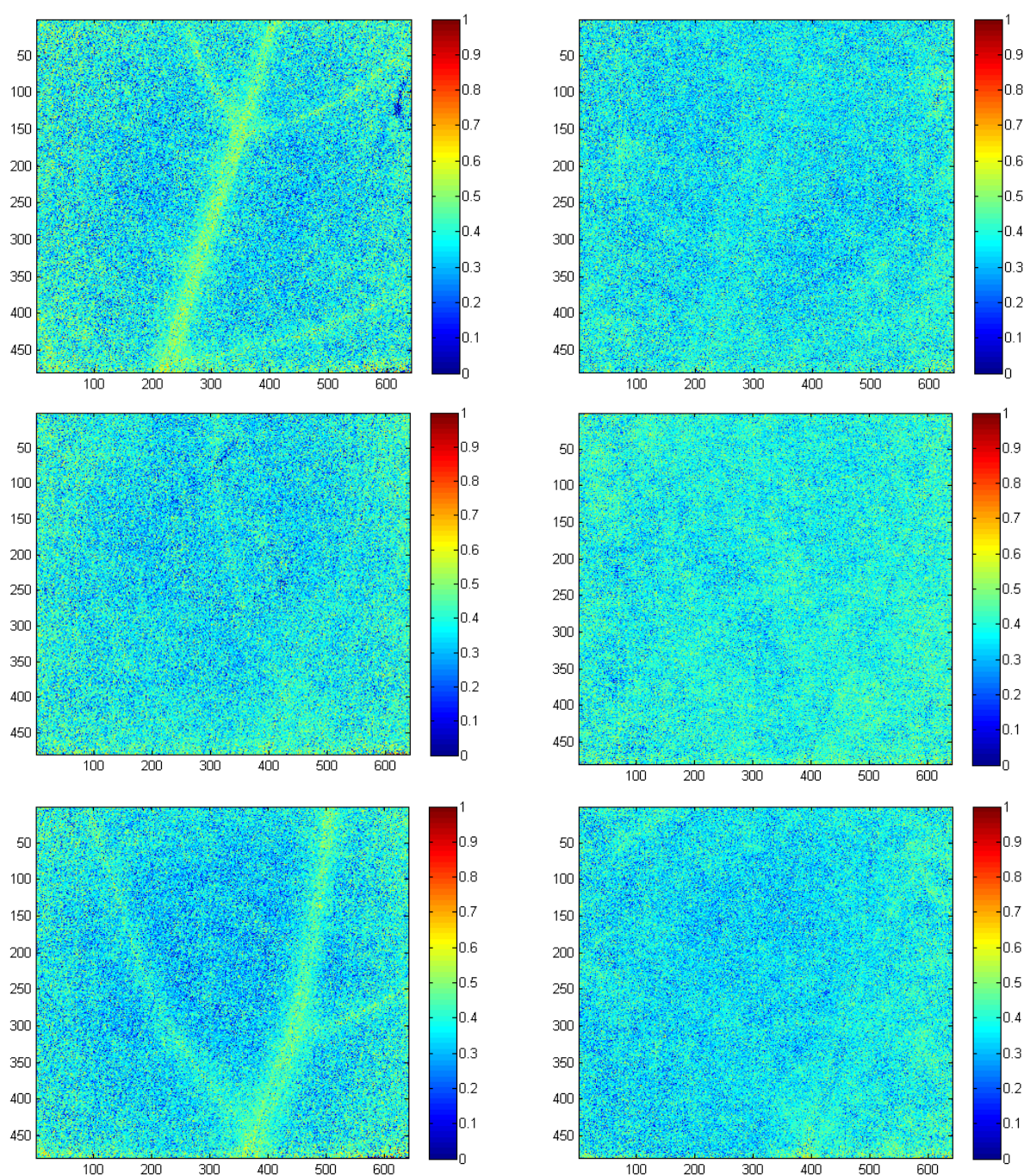


**Tavola 1: Immagine del parametro  $Y(II)$  a PAR  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  di tre foglie della pianta controllo non trattata al tempo T1 nella colonna sinistra (sx) e al tempo T2 colonna destra (dx). Le immagini elaborate con il software sono in falsi colori su una scala colorimetrica compresa tra 0 (blu) minima fluorescenza e 1 (rosso) massima fluorescenza.**

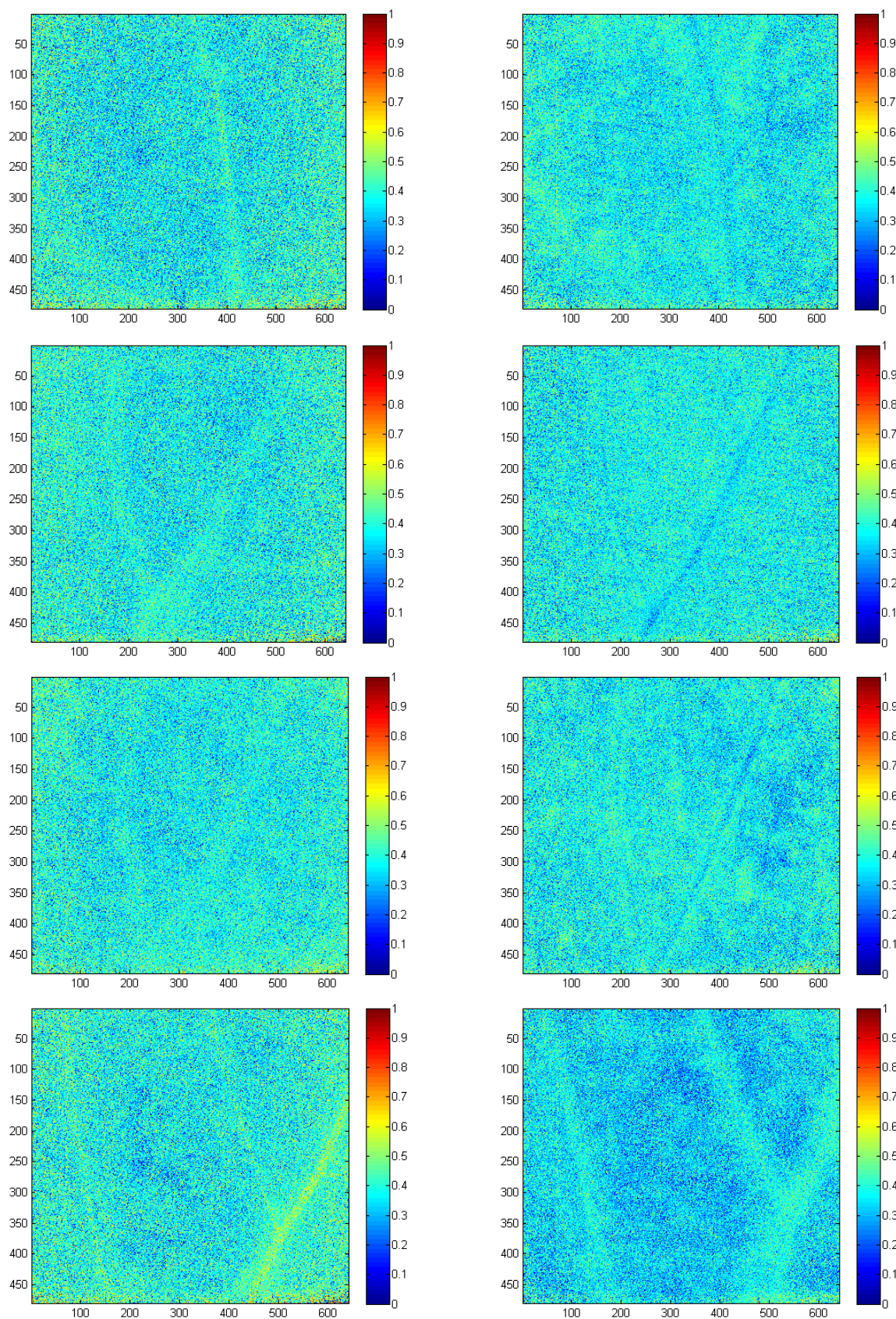


**Tavola 2: Immagine del parametro  $Y(II)$  a  $PAR\ 600\ \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$  di quattro foglie della pianta trattata con 500 ppm di Zn al tempo T1 nella colonna sinistra (sx) e al tempo T2 colonna destra (dx). Le immagini elaborate con il software sono in falsi colori su una scala colorimetrica compresa tra 0 (blu) minima fluorescenza e 1 (rosso) massima fluorescenza.**

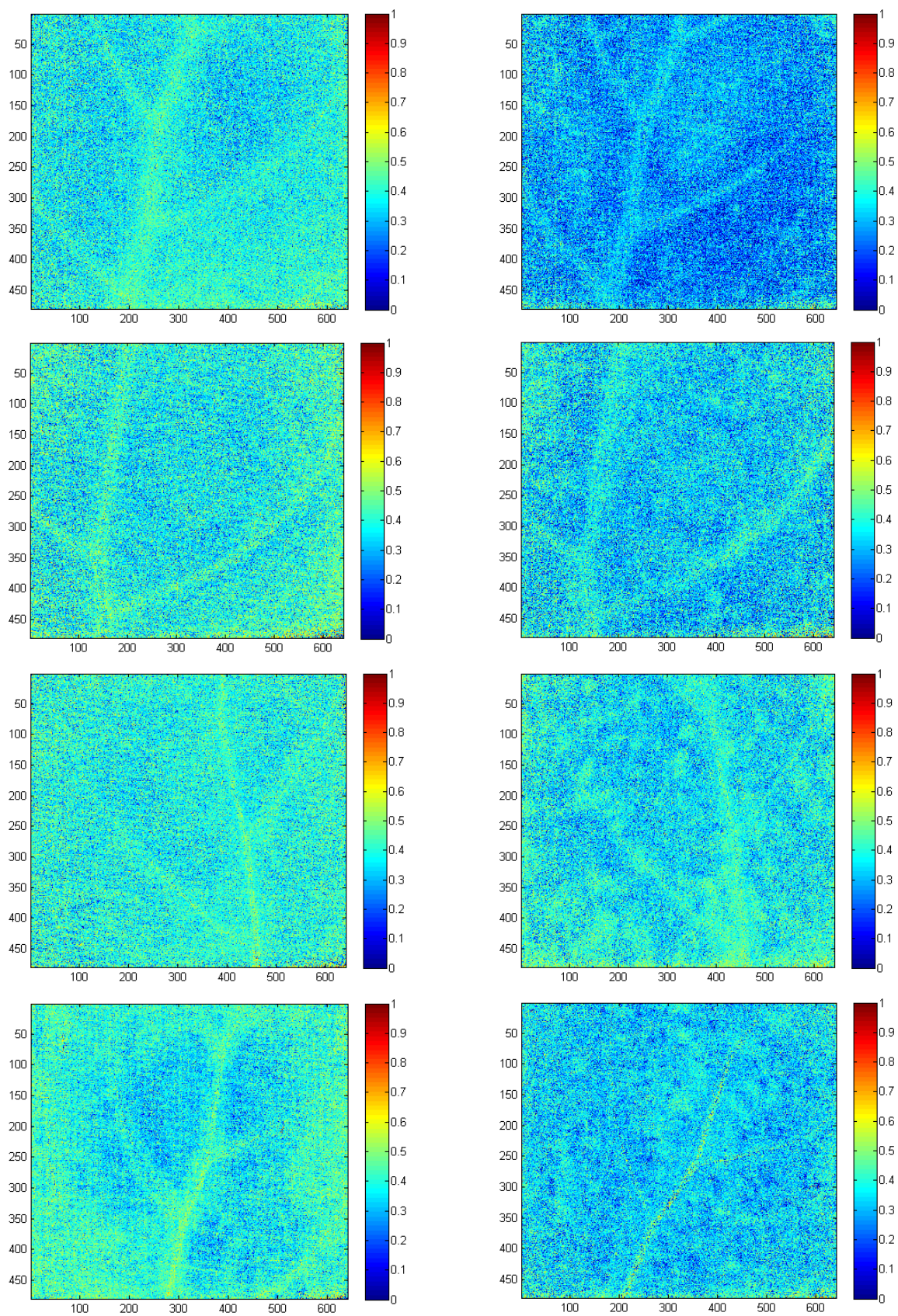


**Tavola 3: Immagine del parametro  $Y(II)$  a  $PAR\ 600\ \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$  di quattro foglie della pianta trattata con 1000 ppm di Zn al tempo T1 nella colonna sinistra (sx) e al tempo T2 colonna destra (dx). Le immagini elaborate con il software sono in falsi colori su una scala colorimetrica compresa tra 0 (blu) minima fluorescenza e 1 (rosso) massima fluorescenza.**

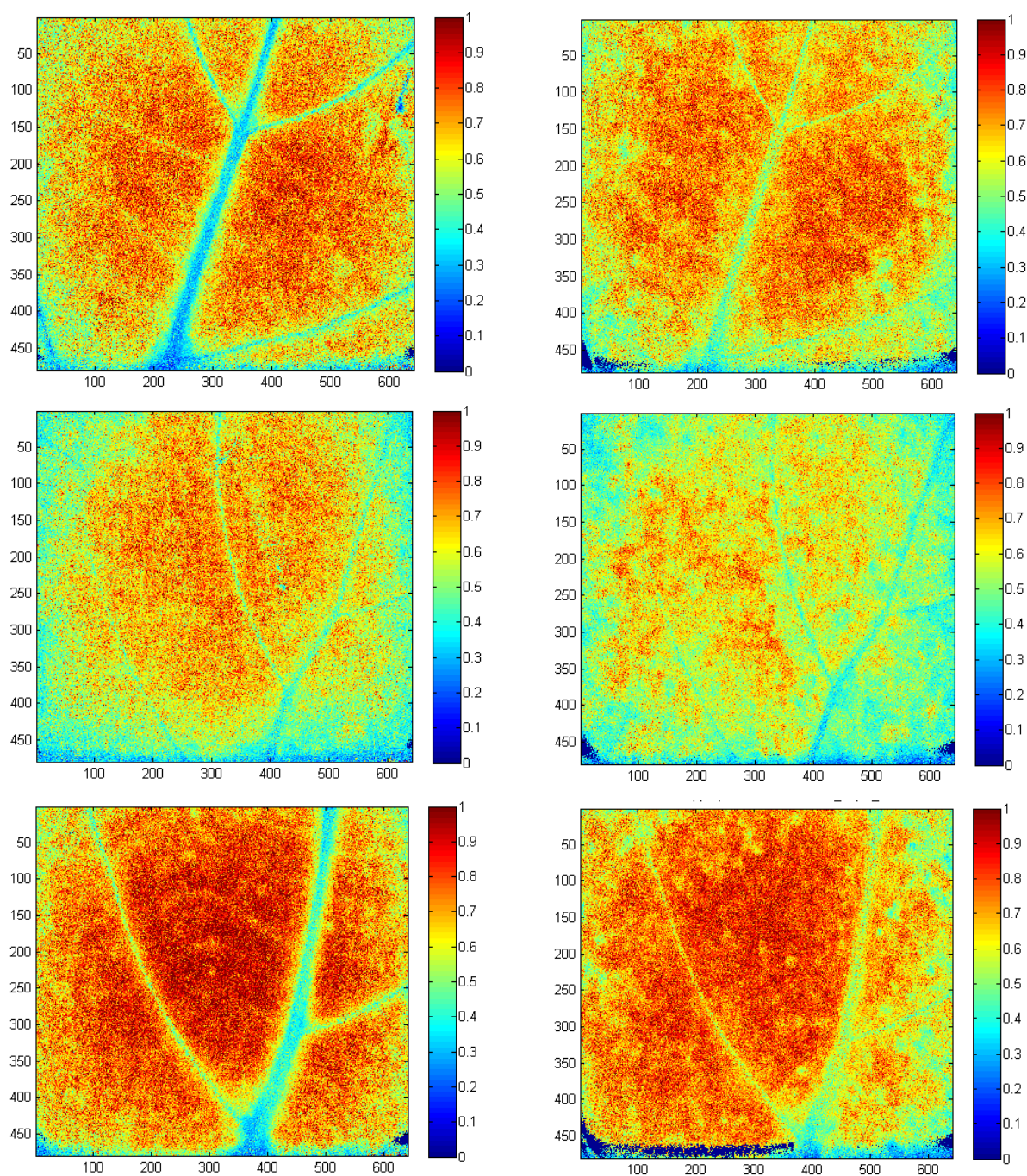


**Tavola 4: Immagine del parametro NPQ a PAR  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  di tre foglie della pianta controllo non trattata al tempo T1 nella colonna sinistra (sx) e al tempo T2 colonna destra (dx). Le immagini elaborate con il software sono in falsi colori su una scala colorimetrica compresa tra 0 (blu) minima fluorescenza e 1 (rosso) massima fluorescenza.**

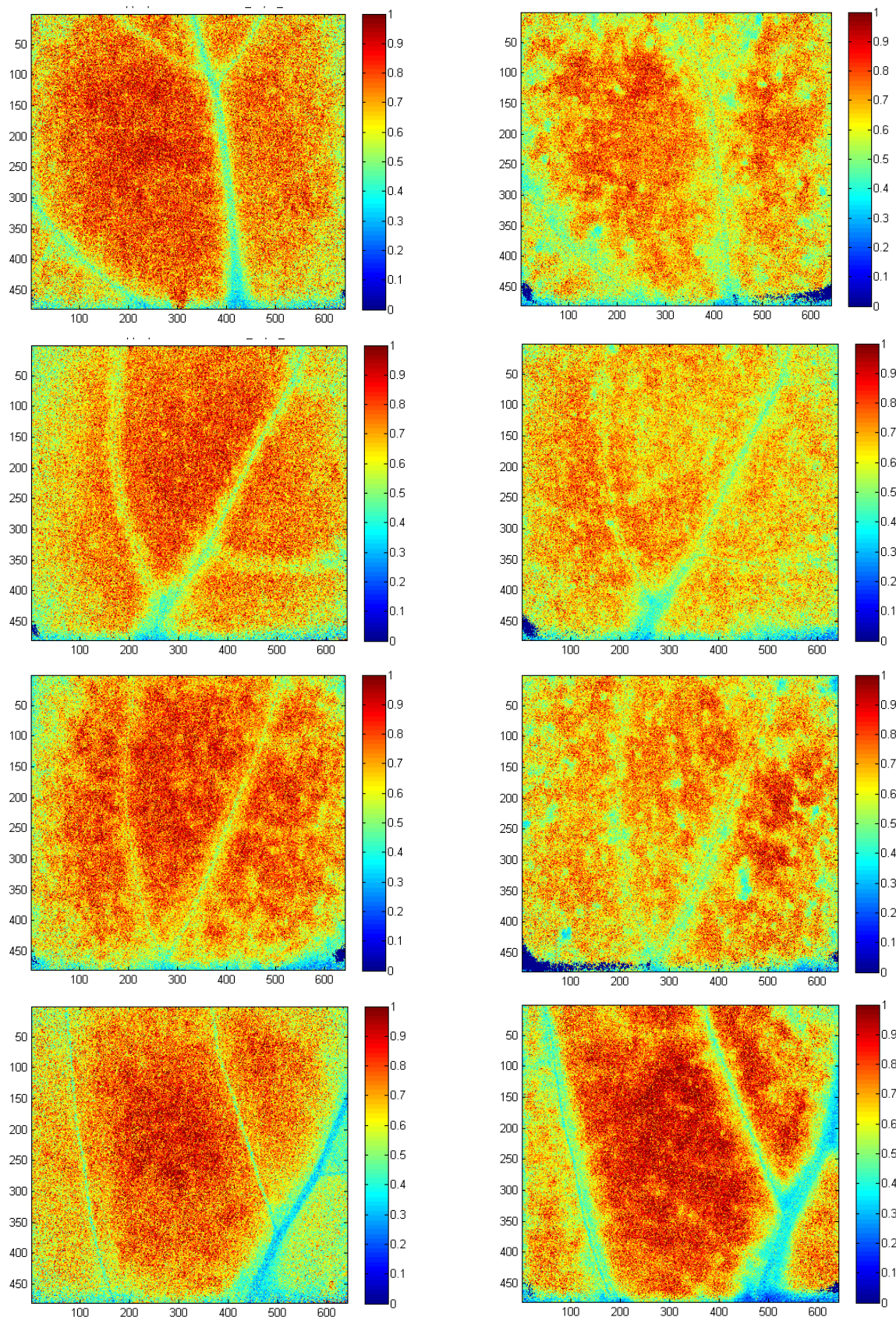


**Tavola 5: Immagine del parametro NPQ a PAR  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  di quattro foglie della pianta trattata con 500 ppm di Zn al tempo T1 nella colonna sinistra (sx) e al tempo T2 colonna destra (dx). Le immagini elaborate con il software sono in falsi colori su una scala colorimetrica compresa tra 0 (blu) minima fluorescenza e 1 (rosso) massima fluorescenza.**

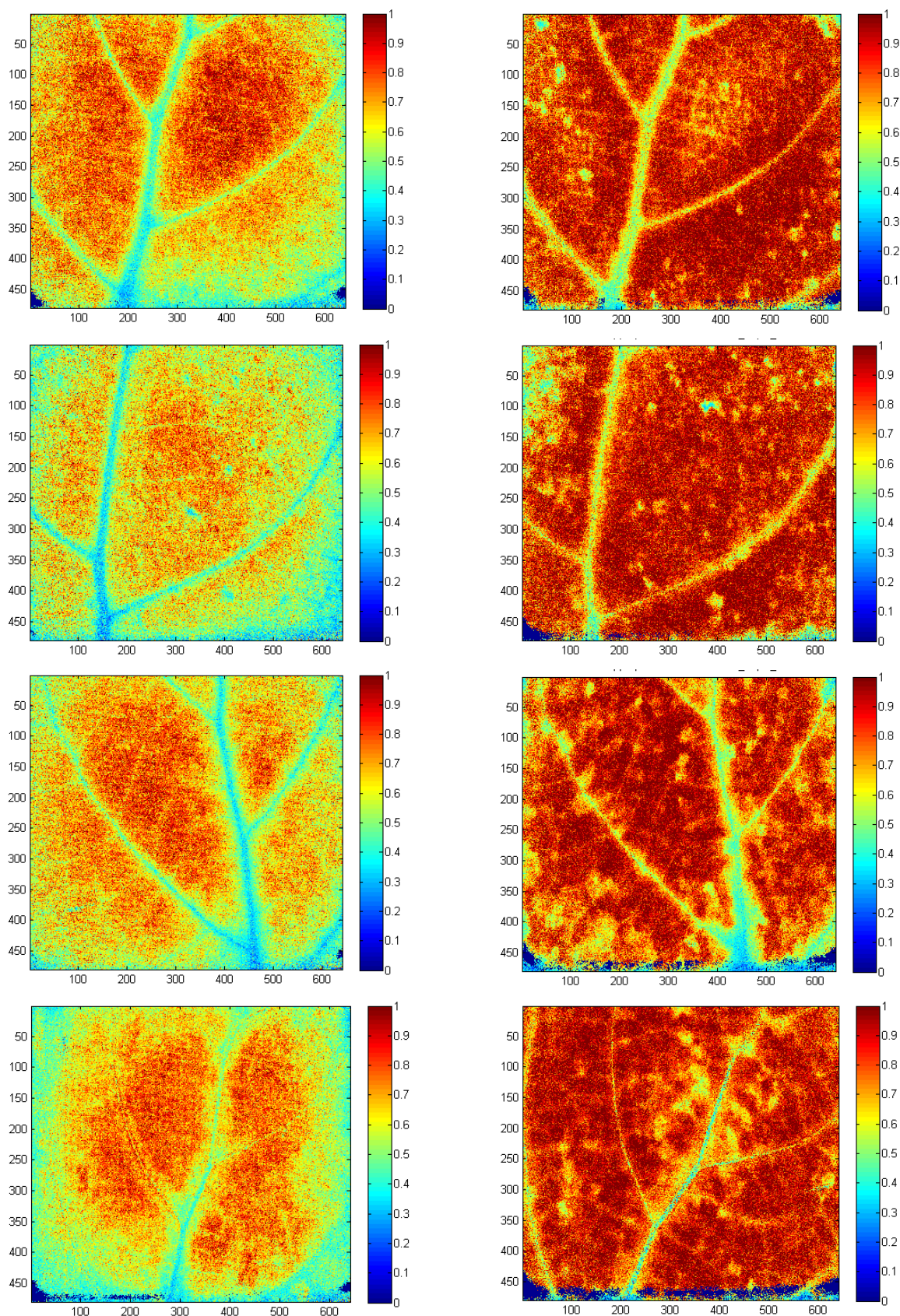


**Tavola 6: Immagine del parametro NPQ a PAR  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  di quattro foglie della pianta trattata con 1000 ppm di Zn al tempo T1 nella colonna sinistra (sx) e al tempo T2 colonna destra (dx). Le immagini elaborate con il software sono in falsi colori su una scala colorimetrica compresa tra 0 (blu) minima fluorescenza e 1 (rosso) massima fluorescenza.**

### 3.4. DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Lo zinco è considerato un micronutriente essenziale e può essere presente anche ad alte concentrazioni, per esempio, in terreni di rocce serpentiniche o nelle vicinanze di miniere (Willson, 1988; Di Baccio et al. 2003). Sul fabbisogno e sulla tossicità di Zn nelle piante, in particolare nelle specie arboree, si conosce ancora poco, dal momento che le soglie di tossicità o di tolleranza sono funzione di differenti fattori endogeni ed esogeni (Watmough et al., 1995; Punshon & Dickinson, 1997). Inoltre, la capacità di crescita e di accumulo del pioppo in risposta a livelli crescenti di metallo sono specie-specifico e clone-specifico (Brunner et al. 2004; Tognetti et al. 2004; Borghi et al., 2008).

I risultati ottenuti sulla crescita di piante di *Populus x euramericana* clone I-214 in terreni contaminati con alte concentrazioni di Zn contribuiscono, soprattutto attraverso l'analisi d'immagine, a descrivere sia la risposta fotochimica che il relativo meccanismo di compensazione sviluppati per tollerare livelli tossici del metallo. Con l'analisi d'immagine dell'emissione di fluorescenza della clorofilla *a* è stato possibile rilevare i cambiamenti spaziali e temporali sulle foglie di piante inoculate con il metallo.

Gli incrementi dei valori di efficienza massima del PSII presenti in tutte le piante trattate, simili ai controlli (Figura 44a), rilevano nei due tempi di misura un'attività fotochimica tipica di piante sane, confermato anche dalla concentrazione di clorofilla *a* che al termine della quinta settimana non è significativamente diversa dal controllo (Figura 42a). Inoltre, l'aumento osservato in tutti i parametri morfometrici analizzati nelle condizioni sperimentali descritte indica una crescita della pianta e, quindi, la capacità di tollerare alte concentrazioni del metallo (Figura 41a-b-c). È però evidente un effetto soglia della dose, in cui l'incremento percentuale sia della lunghezza del fusto che delle radici a 1000 ppm non è significativo nel tempo ed è minore di quello osservato a 500 ppm (Figura 41a-b).

Questo minore accrescimento delle radici a 1000 ppm è influenzato da un maggiore accumulo dello zinco nell'apparato radicale (Figura 40b). Alla dose di 1000 ppm il metallo sembra rimanere concentrato nelle radici. La quantità di Zn traslocata nelle foglie, infatti, non mostra differenze significative tra i due trattamenti (Figura 40b). Ciò può essere spiegato dall'esistenza di meccanismi di difesa o di tolleranza ad un eccesso di *uptake* del metallo da parte della pianta che limitano il trasporto di Zn verso le foglie giovani come osservato da Di Baccio et al. (2003). Differenti strategie sono state proposte per spiegare la tolleranza delle piante a livelli tossici di metalli (Baker and Walker, 1990). Tra le specie tolleranti, le cosiddette *escluders* utilizzano meccanismi di metallo-esclusione immobilizzando il metallo nelle radici e limitandone la

traslocazione, le *includers* invece accumulano trasferendo e compartimentando il metallo nei diversi tessuti della pianta, tra cui fusto e foglie (Baker, A.J.M. 1981). Il pioppo, come pianta tollerante, accumula i metalli, tra cui lo zinco, escludendoli da regioni e tessuti in cui hanno luogo delicati e fondamentali processi metabolici (Salt *et al.*, 1998; Di Baccio *et al.*, 2003), questo spiegherebbe l'incremento del numero di foglie nuove osservato al termine del trattamento (Figura 41c). Quindi, i risultati ottenuti sul contenuto di metallo nei tessuti di *Populus x euramericana* clone I-214 e sui fattori di bio-accumulo (BCF) e di traslocazione (Tf) al termine delle cinque settimane di trattamento evidenziano questa capacità del pioppo di utilizzare entrambe le strategie nel tollerare lo zinco, così da proteggere l'apparato fotosintetico dalla tossicità di dosi crescenti del metallo (Pulford *et al.* 2002).

I risultati ottenuti dall'analisi dei parametri fotochimici e del contenuto dei pigmenti confermano la capacità di tollerare alti livelli di Zn da parte del clone I-214 (Kopponen *et al.* 2001; Di Baccio *et al.*, 2003; Borghi *et al.* 2008).

Poiché lo Zn nelle piante compete con il Mg in diverse fasi della biosintesi della clorofilla (von Wettstein *et al.*, 1995), un eccesso di zinco causa una diminuzione nel contenuto totale delle clorofille. Tuttavia, nelle specie tolleranti si osservano incrementi del contenuto di clorofilla in presenza di metalli come Cu (Romeu-Moreno and Mas, 1999) e Zn (Ralph and Burchett 1998; Di Baccio *et al.*, 2003) oppure variazioni non significative in risposta al trattamento con i metalli pesanti (Baszyński *et al.*, 1982; Stiborova *et al.*, 1986).

Le differenze non significative osservate in questo studio al termine delle cinque settimane di trattamento nel contenuto delle clorofille *a* e *b* di piante trattate rispetto al controllo non trattato (Figura 42a-b) confermano la capacità del clone I-214 di tollerare alte concentrazioni di Zn in accordo con Tognetti *et al.* (2004).

Come altri metalli, l'eccesso di zinco nelle foglie causa tossicità principalmente perché interferisce con la catena di trasporto degli elettroni e con il complesso che evolve l'ossigeno del PSII (Moustakas *et al.*, 1994; Romanowska, 2002), inoltre induce un decremento della fluorescenza minima ( $F_0$ ) e massima ( $F_m$ ) ed inibisce la fluorescenza variabile ( $F_v$ ) (Boucher & Carpentier, 1999). Poiché  $F_0$  origina dalle clorofille *a* delle antenne associate al complesso che raccoglie la luce del PSII (Karukstis, 1991), dai risultati ottenuti si può ipotizzare che lo Zn non ha un impatto significativo sul complesso, visto che non si osserva una significativa alterazione, in confronto al controllo, dell'efficienza di trasferimento dell'energia dal complesso al centro di reazione del fotosistema (Figura 43a).

L'intensità di fluorescenza massima ( $F_m$ ) è generalmente accettata come espressione dello stato del PSII quando tutte le molecole di  $Q_A$  sono ridotte (Mallick & Mohn, 2003). L'efficienza

massima del PSII ( $F_v/F_m$ ) può, perciò, diminuire se la ri-ossidazione di  $Q_A$  viene limitata da una diminuzione o parziale blocco del trasporto elettronico. L'aumento significativo di  $F_v/F_m$  (Figura 44a) e del pool del plastochinone, come rapporto  $F_v/2$  (Figura 44c) osservato nelle piante dopo cinque settimane di esposizione a livelli crescenti del metallo evidenzia un effetto non dannoso dello Zn sull'attività del PSII. Inoltre l'analisi delle immagini di resa quantica delle foglie (Tavola 1-Tavola 2-Tavola 3) evidenziano una abilità di risposta del clone nell'ottimizzare la luce al fine di preservare la capacità fotosintetica. L'abilità osservata nel mantenere  $Q_A$  parzialmente ossidato è un fattore chiave della capacità di tollerare gli stress ambientali, in accordo con Rosenqvist (2001).

I cambiamenti indotti sulla cinetica di fluorescenza della clorofilla da diversi metalli, quali cadmio, rame, cromo, nichel e zinco possono includere un progressivo aumento dei valori di  $F_0/F_v$ , come conseguenza della loro azione sui siti del complesso di scissione dell'acqua, attraverso la probabile sostituzione dello ione  $Mn^{2+}$  sul lato ossidante dell'OEC (Mallick et Mohn, 2003; Moustakas et al., 1994). Questo effetto non si osserva sulle piante durante tutto il tempo di esposizione, si rileva invece una significativa diminuzione del rapporto  $F_0/F_v$  a T2 in confronto a T1 sia nei controlli che nei trattati (Figura 44d).

Pur essendo significative le differenze osservate a T2 del trasporto elettronico tra le piante trattate e il controllo non trattato (Figura 47), l'analisi dell'ETR, indice diretto dell'efficienza fotosintetica, evidenzia una capacità di tolleranza del clone I-214 alla quantità di zinco che la pianta trasloca nelle foglie al termine delle cinque settimane. Questa abilità nel mantenere efficiente l'attività del PSII, valutata attraverso l'analisi di fluorescenza associata all'*imaging*, potrebbe essere spiegato dalla presenza di differenti meccanismi di difesa antiossidanti, per i quali sono comunque richiesti studi biochimici e molecolari. Molti di questi meccanismi lavorano in tandem (Kochian et al., 2004), e l'attenzione si è focalizzata sul possibile ruolo svolto dalle fitochelatine nel sequestro di metalli come Zn, Cd, Pb nelle cellule vegetali (Rauser, 1995; Salt et al., 1995). Le fitochelatine, peptidi in grado di legare metalli trasportandoli così attraverso il tonoplasto e sequestrandoli infine nei vacuoli, riducono in questo modo il contenuto del metallo nel citoplasma cellulare (Gong et al., 2003).

In molte condizioni di stress la dissipazione non-radiativa dell'energia rappresenta il principale meccanismo di regolazione per prevenire effetti fotoinibitori nelle piante. I risultati ottenuti su *P. x euramericana* evidenziano un incremento crescente della capacità del processo di *downregulation* nel clone I-214 all'aumentare della concentrazione di Zn (Figura 49c).

Il processo di fotoinibizione è caratterizzato dall'aumento del valore di quenching di fluorescenza non fotochimico legato alla dissipazione di calore (Maxwell and Johnson, 2000;

Muller et al., 2001). Livelli tossici dei metalli pesanti determinano variazioni nei meccanismi dissipatori interferendo con il processo di fotoinibizione regolato dal ciclo delle xantofille, nel quale intermedi di reazione della violaxantina si trasformano in zeaxantina accettando l'energia di eccitazione direttamente dalle clorofille dei complessi antenna che raccolgono la luce.

I risultati ottenuti attraverso l'elaborazione delle immagini di Y(II) e di NPQ evidenziano una funzionalità dell'apparato fotosintetico, in cui la presenza del metallo non riduce la conversione fotochimica dell'energia (Tavola 1-Tavola 2-Tavola 3) e i meccanismi di protezione sono in grado di dissipare l'energia in eccesso (Tavola 4-Tavola 5-Tavola 6).

L'incremento dei rapporti tra le clorofille e tra i carotenoidi totali osservato nelle piante trattate rispetto ai controlli (Figura 42d-e) potrebbe essere dovuto ad un effetto indotto dal metallo sulla capacità di regolazione dell'intensità luminosa da parte dei pigmenti antenna, coinvolti nell'assorbimento e trasferimento della luce. Tale effetto, che sembra contraddire i risultati di Y(II) e di NPQ, è invece spiegato dall'analisi d'immagine del parametro NPQ, in cui si evidenzia una eterogeneità spaziale nella risposta fotochimica (Tavola 4-Tavola 5-Tavola 6) (Govindjee et al., 2000). I risultati dell'*imaging* suggeriscono una distribuzione eterogenea dell'utilizzo della luce sulla superficie fogliare legata ad un differente contenuto di pigmenti presente nelle cellule delle diverse regioni delle foglie di piante trattate (Terashima, 1992), che insieme contribuiscono ad ottimizzare l'energia luminosa compensando l'efficienza dell'attività fotochimica su tutta l'area fogliare esaminata (Chaerle et al., 2003).

L'*imaging* di fluorescenza della clorofilla come metodo per lo studio dei parametri fotochimici in grado di analizzare e risolvere spazialmente l'eterogeneità di risposta di intere aree fogliari di piante sottoposte a stress è confermato dai risultati di questa ricerca. Inoltre, la potenzialità mostrata dall'analisi d'immagine è stata rafforzata dallo sviluppo di uno software progettato ed adattato alle esigenze sperimentali in grado di caratterizzare la risposta fotochimica in termini di distribuzione dei pixel valutando in tal modo la performance fotosintetica della pianta e la capacità di tollerare stress ambientali.

La valutazione della risposta fotochimica del pioppo, come specie arborea modello per lo studio dei meccanismi di accumulo di metalli pesanti, ha posto l'attenzione sul possibile ruolo esercitato dai pigmenti fotosintetici ed ha permesso di ipotizzare un loro coinvolgimento attivo nei diversi meccanismi di tolleranza della pianta in risposta alla presenza di livelli tossici crescenti di un microelemento essenziale. Si può dunque concludere confermando la validità del sistema d'indagine, rapido e non distruttivo, dell'*imaging* di fluorescenza e del software sviluppato, come contribuito ad aumentare le conoscenze sui processi fisiologici alla base di uno stress abiotico.

## Bibliografia

- Adams W.I. and Demmig-Adams B. (2004).** Chlorophyll fluorescence as a tool to monitor plant response to the environment. In: Papageorgiou G and Govindjee (eds) Chlorophyll Fluorescence: The Signature of Green Plant Photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Aguirreolea J., Irigoyen J., Sanchez-Diaz M., Salaverri J. (1995).** “Physiological alterations in pepper during wilt induced by *Phytophthora capsici* and soil water deficit”. Plant Pathol., 44: 587-596.
- Ait Ali N., Dewez D., Didur O. (2006).** Inhibition of photosystem II photochemistry by Cr is caused by the alteration of both D1 protein and oxygen evolving complex. Photosynth Res. 89: 81-87.
- Ait Ali N., Juneau P., Didur PO, Perreault F., Popovic R. (2008).** Effect of dichromate on photosystem II activity in xanthophylls-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. Photosynth Res. 95: 45-53.
- Allen J.F. (1992).** How does protein phosphorylation regulate photosynthesis? Trends Biochem. Sci. 17: 12-17
- Allen J.F. (2003).** State transitions - a question of balance. Science 299:1530-1532.
- Alonso R., Elvira S., Castillo F.J., Gimeno B.S. (2001).** Interactive effects of ozone and drought stress on pigments and activities of antioxidative enzymes in *Pinus halepensis*. Plant Cell and Environment 24: 905-916.
- Anderson J.M., Park Y., Chow W.S. (1998).** Unifying model for the photoinactivation of Photosystem II *in vivo* under steady-state photosynthesis. Photosynth Res 56: 1-13
- Angelopoulos K., Dichio B., Xiloyannis C. (1996).** Inhibition of photosynthesis in olive trees (*Olea europaea* L.) during water stress and rewatering. J Exp Bot 47 (301): 1093-1100
- Aro E.M. and Ohad I. (2003).** Redox regulation of thylakoid protein phosphorylation. Antioxidants Redox Signaling 5:55-67
- Asada K. (1999).** The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 50: 601-639.
- Baena-González E., Baginsky S., Mulo P., Summer H., Aro E.M. and Link G. (2001).** Chloroplast transcription at different light intensities. Glutathione-mediated phosphorylation of the major RNA polymerase involved in redox-regulated organellar gene expression. Plant Physiology, 127:1044-1052.

- Baena-González E., Barbato R. and Aro E.M. (1999).** Role of phosphorylation in repair cycle and oligomeric structure of photosystem II. *Planta*, 208:196-204
- Baier M., Kandlbinder A., Golldack D., Dietz K.J. (2005).** Oxidative stress and ozone: perception, signalling and response. *Plant Cell and Environment*, 28: 1012-1020.
- Baker A.J.M., Brooks R.R. (1989).** Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1: 81–126.
- Baker A.J.M., Walker P.L. (1990).** Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: Shaw AJ, ed. *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 155–177.
- Baker C., Orlandi E. (1995).** “Active oxygen in plant pathogenesis”. *Ann. Rev.*, 33: 299-321.
- Baker N. R., Oxborough K., Lawson T. and Morison J. I.L. (2001).** High resolution imaging of photosynthetic activities of tissues, cells and chloroplasts in leaves. *J. Exp. Bot* 52: 615-621
- Baker N.R. and Rosenqvist E. (2004).** Application of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J. Exp. Bot* 55: 1607-1621
- Baker, A.J.M. (1981).** *Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals*. *J. Plant Nutr.* 3, p.643-654.
- Bansal K., Kharbanda P., Stringam G., Thiagarajah M., Tewari J. (1994).** “A comparison of greenhouse and field screening methods for blackleg resistance in doubled haploid lines of *Brassica napus*”. *Plant Dis.*, 78: 276-281.
- Barbagallo R.P., Oxborough K., Pallett K.E., Baker N.R. (2003).** Rapid, non-invasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology* 132: 485–493.
- Barber J. (2003).** Photosystem II: the engine of life. *Q Rev Biophys* 36: 71–89
- Barceló J., Poschenrieder Ch.M. (1999).** Structural and ultrastructural changes in heavy metal exposed plants. Pp 183-205 In: M.N.V. Prasad & J. Hagemeyer (eds.) *Heavy Metal Stress in Plants; from Molecules to Ecosystems*. Springer Verlag, Berlin.
- Bargagli R. (1998).** Chemical elements and plants life. In: Trace elements in terrestrial plants: an eco-physiological approach to bio-monitoring and bio-recovery 1-21. Springer- Verlag, Berlino, 324 pp.
- Bassanezi R., Amorim L., Bergamin Filho A., Berger D. (2002).** Gas exchange and emission of chlorophyll fluorescence during the monocycle of rust, angular leaf spot and anthracnose on bean leaves as a function of their trophic characteristics. *J. Phytopathol.*, 150: 37-47.
- Bastiaans L. (1991).** Ratio between virtual and visual lesion size as a measure to describe reduction in leaf photosynthesis of rice due to leaf blast. *Phytopathol.*, 81: 611-615.

- Baszyński T., Król M., Krupa Z., Ruszkowska M., Wojcieszka U., Wolińska D. (1982).** Photosynthetic apparatus of spinach exposed to excess of copper. *Z. Pflanzenphysiol.* 108: 385-392.
- Berger S., Benediktyova Z., Matous K., Benfig K., Mueller M.J., Medbal L., Roitsch T. (2007).** Visualization of dynamics of plant–pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana*. *J. Exp. Bot* 58: 797–806
- Berger S., Papadopoulos M., Schreiber U., Kaiser W. and Roitsch T. (2004).** Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiologia Plantarum* 122: 419-428.
- Bilger W., Björkman O. (1990).** Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.* 25: 173-185
- Bjorkman O., Demming B. (1987).** Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170: 489-504.
- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. (2003).** “Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review”. *Ann. Bot.*, 91: 179-194.
- Boardman N., Thorne S., Anderson J. (1966).** Fluorescence properties of particles obtained by digitonin fragmentation of spinach chloroplast. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 56: 586-593.
- Boerema G., Van Kesteren H. 1964.** “The nomenclature of two fungi parasitizing Brassica”. *Personia*, Published by Rijksherbarium, Leinden, vol. 3, part I, pp. 17-28.
- Bolhar-Nordenkamp H.R., Oquist G.O. (1993).** Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: Hall, D.O., Seurlock, J.M.O., Bolhar-Nordenkamp, H.R., Leegood, R.C., Long, S.P. (Eds.), *Photosynthesis and Production in a Changing Environment: A Field and Laboratory Manual*. Chapman & Hall, London, pp. 193–206.
- Borghi M., Tognetti R., Monteforti G., Sebastiani L. (2007).** Responses of *Populus* × *euramericana* (*P. deltoides* × *P. nigra*) clone Adda to increasing copper concentrations. *Environmental and Experimental Botany* 61: 66-73.
- Borghi M., Tognetti R., Monteforti G., Sebastiani L. (2008).** Responses of two poplar species (*Populus alba* and *Populus* × *canadensis*) to high copper concentrations. *Environ. Exp. Bot.* 62: 290-299.
- Boriscov A. (2000).** The currently accepted model of primary energy conversion in the plant photosystem must be substantially modernized. *Membr. Cell. Biol.*, 14: 333-341.

- Boucher N. & Carpentier R. (1999).**  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , and  $\text{Pb}^{2+}$ - induced changes in Photosystem II photochemical yield and energy storage in isolated thylakoid membranes: A study using simultaneous fluorescence and photoacoustic measurements. *Photosynth Res.* 59: 167-174.
- Brack W., Frank H. (1998).** Chlorophyll *a* fluorescence: A tool for the investigation of toxic effects in the photosynthetic apparatus. *Ecotoxicol. environ. Safety* 40: 34-41
- Breton J., Geacintev N.E., Swenberg C.E. (1979).** Quenching of fluorescence by triplet excited states in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 548: 616–635.
- Briantais J., Dacosta J., Goulas Y., Ducruet J., Moya I. (1996).** Heat stress induces in leaves an increase of the minimum level of chlorophyll fluorescence,  $F_0$  : A time-resolved analysis. *Photosynth. Res.*, 48: 189-196
- Briat J. F. and Lebrun M. (1999).** Plant responses to metal toxicity. *C. R. Academy Science III* 322: 43-54.
- Broadley M.R., White P.J., Hammond J.P., Zelko I., Lux A. (2007).** Zinc in plants. *New Phytol.* 173, 677–702.
- Bruins M. R., Kapil S., Oehme F. W. (2000).** Microbial resistance to metals in environment. *Ecotoxicology Environmental Safety* 45: 198-207.
- Brunner A.M., Busov V.B., Strauss S.H. (2004).** Poplar genome sequence: functional genomics in an ecologically dominant plant species. *Trends Plant Sci.* 9: 49–56.
- Buschmann C. (1999).** Photochemical and non-photochemical quenching coefficients of the chlorophyll fluorescence: comparison of variation and limits. *Photosynthetica* 37: 217-224
- Butler W. (1978).** Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 29: 345-378.
- Carballeira A., Lyopez J., Vyazquez M. D. (1999).** Uptake of heavy metals to the extracellular and intracellular compartments in three species of aquatic bryophyte. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44: 12-24.
- Castiglione S., Todeschini V., Franchin C., Torrigiani P., Gastaldi D., Cicatelli A., Rinaudo C., Berta G., Biondi S., Lingua G. (2009).** Clonal differences in serviva capacity, copper and zinc accumulation, and correlation with leaf polyamine levels in poplar: A large-scale field trial on heavily polpute soil. *Environmental Pollution* 157: 2108-2117.
- Chaerle L. and Van Der Straeten D. (2000).** Imaging techniques and the early detection of plant stress. *Trends Plant Sci.* 5: 495-501.
- Chaerle L. and Van Der Straeten D. (2001).** Seeing is believing: imaging techniques to monitor plant health, *Biochim Biophys Acta* 1519: 153–166.

- Chaerle L., Hagenbeek D., De Bruyne E., Valche R., Van Der Straeten D. (2004).** Thermal and chlorophyll-fluorescence imaging distinguish plant-pathogen interactions at an early stage. *Plant Cell Physiol.*, 45: 887-896.
- Chaerle L., Hulsen K., Hermans C., Strasser R.J., Valcke R., Höfte M., Van Der Straeten D. (2003).** Robotized time-lapse imaging to assess *in-planta* uptake of phenylurea herbicides and their microbial degradation. *Physiologia Plantarum* 118 613–619.
- Chaerle L., Leinonen I., Jones H.G. and Van Der Straeten D. (2006).** Monitoring and screening plant populations with combined thermal and chlorophyll fluorescence imaging. *J. Exp. Bot. Imaging Stress Responses in Plant Special Issue*. pp 1-12
- Chaerle L., Lenk S., Hagenbeek D., Buschmann C., Van Der Straeten D. (2007).** Multicolor fluorescence imaging for early detection of the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Journal of Plant Physiology* 164: 253-262.
- Chaerle L., vande Ven M., Valcke R. and Van Der Straeten D. (2002).** Visualisation of early stress responses in plant leaves. *Proc SPIE* 4710: 417–423
- Chen Y., Li X., Shen Z. (2004).** Leaching and uptake of heavy metals by ten different species of plants during an EDTA-assisted phytoextraction process. *Chemosphere* 57: 187-196.
- Ciscato M. and Valcke R. (1998).** Chlorophyll fluorescence imaging of heavy metal treated plants. In *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* (Vol. IV) pp. 2661–2663 Garab G. (ed). Kluwer Academic Publishers.
- Ciscato M., Vansgronsveld J. and Valcke R. (1999).** Effects of heavy metals on the fast chlorophyll fluorescence induction kinetics of photosystem II: a comparative study. *Bioscience* 54: 735–739.
- Clemens S. (2001).** Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212: 475–486.
- Crimi M., Dorra D., Bösiinger C.S., Giuffra E., Holzwarth A. R. and Bassi R. (2001).** Time-resolved fluorescence analysis of the recombinant photosystem II antenna complex CP29. Effects of zeaxanthin, pH and phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* 268: 260-267
- D'Ambrosio N., Guadagno C.R. and Virzo De Santo A. (2008).** Is qE always the major component of non-photochemical quenching? In Allen J.F., Gantt E., Golbeck J.H., and Osmond B.(eds.), *Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Congress on Photosynthesis*, 1001–1004. Springer.
- Dan T.V., KrishnaRaj S., Saxena P.K. (2000).** Metal tolerance of scented geranium (*Pelargonium* sp. 'Frensham'): effects of cadmium and nickel on chlorophyll fluorescence kinetics, *Int. J. Phytorem.* 2 91–104.

- Dat J., Vandenbeelee S., Vranova E., Van Montagu M., Inzé D., Van Breusegem F. (2000).** Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**, 779–795
- Davies J., (1986).** Diseases of oilseed rape. In: Scarisbrick DH, Daniels RW, eds. *Oilseed Rape*. London: Collins, 195-236.
- de Bruxelles, G.L. and Roberts M.R. (2001)** Signals regulating multiple responses to wounding and herbivores. *Crit. Rev. Plant Sci.* **20**., 487–521
- De Filippis L.F. and Pallaghy C.K. (1976).** The effect of sub-lethal concentrations of mercury and zinc on *Chlorella*. II. Photosynthesis and pigment composition. *Z. PflPhysiol.* **Vol. 78**, pp. 314–322.
- Demmig-Adams B. and Adams W.W. (1996).** Xanthophyll cycle and light stress in nature: Uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. *Planta* **198**: 460-470.
- Demmig-Adams B. (1990).** Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta* **1020**, 1–24
- Demmig-Adams B., Adams W.W., Heber U., Neimanis S., Winter K., Kruger A. Czygan F.C., Bilger W., Björkman O. (1990).** Inhibition of zeaxanthin formation and of rapid changes in radiationless energy dissipation by dithiothreitol in spinach leaves and chloroplasts. *Plant Physiol.*, **92**: 293-301.
- Di Baccio, D., Tognetti, R., Sebastiani, L., Vitagliano, C. (2003).** Responses of *Populus deltoides* × *Populus nigra* (*Populus* × *euramericana*) clone I-214 to high zinc concentrations. *New Phytol.* **159**, 443–452.
- Dmitriev A. (2003).** Signal molecules for plant defense response to biotic stress. *Russ. J. Plant Physiol.*, **50**: 417-425.
- Doke N. (1983).** Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and the hyphal wall components. *Physiol. Plant Pathol.*, **23**: 345-357.
- Eskling M., Arvidsson P.O. and Akerlund H.E. (1997).** The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiologia Plantarum* **100**: 806-816.
- Fischerová Z., Tlustos P., Szakova J. & Sichorova K. (2006).** A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. *Environmental Pollution*, **144**, 93–100.
- Fluhr R., (2001).** “Sentinel of disease. Plant resistance genes”. *Plant Physiol.*, **127**: 1367-1374.
- Frank H. A., Das S. K., Bautista J. A., Bruce D., Vasil'ev S., Crimi M., Croce R. and Bassi R. (2001).** Photochemical Behavior of Xanthophylls in the Recombinant Photosystem II Antenna Complex, CP26. *Biochemistry* **40**: 1220-1225.

- Galli U., Schüepp H., Brunold C. (1996).** Thiols in cadmium- and copper-treated maize (*Zea mays* L.). *Planta* 198: 139-143.
- Gaspar T., Penel C., Hagege D., Greppin H. (1991).** Peroxidase in plant growth, differentiation, and development processes. In: Lobarzewski J., Greppin H., Penel C., Gaspar T., (eds.): *Biochemical Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*, pp. 249-281 Univiversit  de Gen ve, Gen ve.
- Geacintov N., Breton J. (1981).** Application of pulsed Lasers to the study of energy transfer and fluorescence phenomena in photosynthetic systems. In: *Primary events in biology probed by ultrafast laser spectroscopy*. Ed.R.R.Altano, Academic Press, New York, pp.213-236.
- Genty B., Briantais J.M., Baker N.R. (1989).** The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 990: 87–92
- Genty B., Harbinson J., Baker N.R. (1990).** Relative quantum efficiencies of the two photosystems of leaves in photorespiratory and nonphotorespiratory conditions. *Plant Physiol Biochem* 28: 1–10
- Genty B., Wonders J., Baker N., (1990).** Non-photochemical quenching of  $F_0$  in leaves is emission wavelength dependent: consequences for quenching analysis and its interpretation. *Photosynth. Res.*, 26: 133-139.
- Girardi M., Cona B., Geiken B., Kucera T., Masojidek J., Matoo A.K., (1996).** Long-term drought stress induces structural and functional reorganization of photosystem II. *Planta*, 199: 118-125.
- Goicoechea N., Aguirreolea J., Cenoz S., Garcia-Mina J. (2000).** *Verticillium dahliae* modifies the concentration of proline, soluble sugar, starch, soluble protein and abscisic acid in pepper plants. *Europ. J. Plant Pathol.*, 106: 19-25.
- Gong J.M., Lee D.A., Schroeder J.I. (2003).** Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatins and cadmium in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 10118–10123.
- Govindjee and Nedbal L. (2000).** The chlorophyll fluorescence imaging and its application in plant science and technology. *Seeing is Believing. Photosynthetica* 38: 481-482.
- Govindjee. (1995).** Six-three years since Kautsky: Chlorophyll *a* fuorescence. *Aust. J. Plant. Physiol.*, 22: 131-160.
- Grant J.J., Loake G.J. (2000).** Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology* 124: 21–29
- Gugel R., Seguin-Swartz G., Petrie G. (1990)** Pathogenicity of three isolates of *Leptosphaeria maculans* on *Brassica* species and other crucifers. *Can. J. Plant Pathol.*, 12: 75-82.

- Hall J.L. (2002).** Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53, 1–11.
- Hammerschmidt R. (1999).** Phytoalexins: what have we learned in 60 years. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 37: 285-306.
- Hammond K., Lewis B. (1987).** Variation in stem infections caused by aggressive and non-aggressive isolates of *Leptosphaeria maculans* on *Brassica napus* var. *oleifera*. *Plant Pathol.*, 36: 53-65.
- Harbinson J., Genty B., Baker N.R. (1990).** The relationship between CO<sub>2</sub> assimilation and electron transport in leaves. *Photosynth. Res.* 25: 213–224
- Hauska G., Schutz M., Buttner M. (1996).** The cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex-composition, structure and function. In: Ort DR AND Yocum CF (eds) *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*, pp. 377-398, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Heath M.C. (2000).** Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44 321–334
- Hill R. and Bendall F. (1960).** Function of the 2 cytochrome components in chloroplasts - working hypothesis. *Nature* 186 (4719): 136-137
- Holt N.E., Zigmantas D. Valkunas L., Li X.P., Niyogi K.K. and Fleming G.R. (2005).** Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting. *Science*. 307:433-436.
- Horton P., Wentworth M. and Ruban A. (2005).** Control of the light harvesting function of chloroplast membranes: The LHCII-aggregation model for non-photochemical quenching. *Febs Letters*. 579:4201-4206.
- Horton, P. and Hague A. (1988).** Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts: IV. Resolution of non-photochemical quenching. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 932:107-115.
- Jennings R., Flavio M., Finzi L., Zucchelli G. (1996).** Slow exciton trapping in Photosystem II: A possible physiological role". *Photosynth. Res.*, 47: 167-173.
- Jiao J., Goodwin P., Grodzinski B. (1999).** Inhibition of photosynthesis and export in geranium grown at two CO<sub>2</sub> levels and infection with *Xanthomonas campestris* pv. *Pelargoni*. *Plant Cell Envir.*, 22: 15-25.
- Joshi M.K. & Mohanty P. (2004).** Chlorophyll *a* fluorescence as a probe of heavy metal ion toxicity in plants. In *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. C. Papageorgiou and Govindjee (eds.) 2004. Springer. Printed in The Netherlands.
- Kabata-Pendias A, Pendias H. (1992).** *Trace elements in soil and plants*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.

- Kanervo E., Suorsa M. and Aro E.M. (2005).** Functional flexibility and acclimation of the thylakoid membrane. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 4:1072-1080.
- Karukstis, K.K. (1991).** Chlorophyll fluorescence as a physiological probe of the photosynthetic apparatus. In: Scheer, H. (Ed.), *Chlorophylls*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 769–795.
- Kautsky H., Apel W., Amann H. (1960).** Chlorophyllfluoreszenz und Kohlensäureassimilation. *Biochem Z* **322**: 277–292.
- Kautsky H., Hirsch A. (1931).** Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation, *Naturwissenschaften*, 19:964-964.
- Kochian L.V., Hoekenga O.A., Pineros M.A. (2004).** How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorus efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 459-493.
- Kopponen, P., Utrianen, M., Lukkari, K., Suntioinen, S., Kärenlampi, L., Kärenlampi, S. (2001).** Clonal differences in copper and zinc tolerance of birch in metal-supplemented soils. *Environ. Pollut.* 112, 89–97.
- Koprivova A., Kopriva S., Jager D., Will B., Jouanin L., Rennenberg H. (2002).** Evaluation of transgenic poplars over-expressing enzymes of glutathione synthesis for phytoremediation of cadmium. *Plant Biology* 4: 664–670.
- Kotrba P., Najmanova J., Macek T., Ruml T., Mackova M. (2009).** Genetically modified plants in phytoremediation of heavy metal and metalloid soil and sediment pollution. *Biotechnology Advances* 27: 799-810
- Krall J.P., Edwards G.E. (1990).** Quantum yields of photosystem II electron transport and CO<sub>2</sub> fixation in C<sub>4</sub> plants. *Aust J Plant Physiol* 17: 579–588
- Krall J.P., Edwards G.E. (1991).** Environmental effects on the relationship between quantum yield of carbon assimilation and *in vivo* PS II electron transport in maize. *Aust J Plant Physiol* **18**: 267–278
- Kramer D.M., Johnson G., Kiirats O., Edwards G.E. (2004):** New fluorescence parameters for determination of QA redox state and excitation energy fluxes. *Photosynth. Res.* **79**: 209-218
- Krause G.H., Weis E. (1984)** Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of fluorescence signals. – *Photosynth. Res.* **5**: 139-157.
- Krause G.H., Weis E. (1991).** Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. – *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Biol.* 42: 313-349
- Krause G.H., Jahns P. (2003).** Pulse amplitude modulated chlorophyll fluorometry and its application in plant science. – In: Green, B.R., Parson, W.W. (ed.): *Light-harvesting Antennas in Photosynthesis*. Pp. 373-399. Kluwer Academic Publ., Dordrecht

- Kriedemann P.F., Graham R.D., Wiskich J.T. (1985).** Photosynthetic dysfunction and in vivo chlorophyll a fluorescence from manganese-deficient wheat leaves. *Aust. J. Agric. Res.* 36, 157–169.
- Kuzniak E., Sklodowska M., (2001).** Ascorbate, glutathione and related enzymes in chloroplasts of tomato leaves infected by *Botrytis cinerea*. *Plant Sci.*, 160: 723-731.
- Lai A., Sighicelli M., Alioto D., D'Aquino L. (2009).** Imaging PAM Fluorescence to evaluate virus attack in *Datura stramonium* L. In 2<sup>nd</sup> Plant Ecophysiology Workshop - Chlorophyll Fluorescence: From Theory To (Good) Practice. Ciraa Enrico Avanzi, University Of Pisa - May 25, 2009.
- Laible P., Zipfel W., Owens T. (1994).** Excited state dynamics in chlorophyll-based antennae: the role of transfer equilibrium. *Biophys. J.*, 66: 844-860.
- Lam E., Kato N. and Lawton M. (2001).** Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411: 848-853
- Lavergne J., Trissl H. (1995).** Theory of fluorescence induction in PS II: derivation of analytical expressions in a model including exciton-radical pair equilibrium and restricted energy transfer between photosynthetic units. *Biophys. J.*, 65: 2474-2492.
- Lavorel J., Joliot P. (1972).** A connected model of the photosynthetic unit. *Biophys. J.*, 12: 815-831.
- Lazàr D. (1999).** Chlorophyll a fluorescence induction, *Biochim. Biophys. Acta* 1412: 1-28.
- Ledford H.K. and Niyogi K.K. (2005).** Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. *Plant Cell and Environment*. 28:1037-1045.
- Leita L., Contin M., Maggioni A. (1991).** Distribution of cadmium and induced cd-binding proteins in root, stem, leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Science* 77: 139-147.
- Leon J., Rojo E. and Sanchez-Serrano J.J. (2001).** Wound signalling in plants. *J. Exp Bot.*, 52: 1-9.
- Lichtenthaler H.K., Rinderle U. (1988).** The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *CRC crit. Rev. anal. Chem.* 19: S29-S85
- Lichtenthaler H., (1987).** Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: *Methods in Enzymology*, 148: 350-382. Academic Press Inc., London, UK.
- Lichtenthaler H., Babani F., (2000).** Detection of photosynthetic activity and water stress by imaging the red chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol. Biochem.*, 38: 889-895.
- Luhov6 L., Lebeda A., Kutrov6 E., Hedererov6 D., Pe6 P., (2006).** Peroxidase, catalase, amine oxidase and acid phosphatase activities in *Pisum sativum* during infection with *Fusarium oxysporum* and *F. solani*. *Biol. Plantar.*, 58: 675-682.

- Macek T., Francova K., Kochankova L., Lovecka P., Ryslava E., Rezek J. (2004).** Phytoremediation: biological cleaning of a polluted environment. *Rev Environ Health*;19:63–82.
- Maffei M. (1998).** Fotosintesi: Reazioni alla luce. In *Biochimica vegetale*. Ed. Piccin
- Maksymiec W. (1997).** Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthetica* 34, 321–342.
- Mallick N., Mohn F.H. (2003).** Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with green microalga *Scenedesmus*. *Ecotox. Environ Saf* 55: 64-69.
- Mansfield J., (2000).** Mechanisms of resistance to plant diseases. Eds. Slusarenko A., Fraser R. and van Loon L., 325-370. Kluwer, Dordrecht.
- Market B. (ed) (2003).** Plants as biomonitors: Indicators for heavy metals in the terrestrial environment. VHC Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Maxell K., Johnson G. (2000).** Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51: 659-668.
- Meharg A.A. (1994).** Integrated tolerance mechanisms: Constitutive and adaptive plants responses to elevated metal concentrations in the environment. *Plant Cell Environ* 17: 989-993
- Melis A. (1999).** Photosystem -II damage and repair cycle in chloroplast : what modulates the rate of photodamage in vivo? *Trends in Plant Science* 4: 130-135
- Métraux J.P. and Durner J. (2004).** The role of salicylic acid and nitric oxide in programmed cell death and induced resistance. In: Sandermann H, ed. *Molecular ecotoxicology of plants*. Berlin, Germany: Springer, 111–150.
- Meyer S., Saccardy-Adji K., Rizza F., Genty B. (2001).** Inhibition of photosynthesis by *Colletotricum lindemuthianum* in bean leaves determined by chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Cell Envir.*, 24: 947-955.
- Mittler R. & Zilinskas B. A. (2004).** Activated oxygen species in multiple stress situations and protective systems. In: *Molecular Ecotoxicology of Plants* (H. Sandermann, Ed.). Springer Ecological Studies, Vol. 170: pp. 51-74.
- Mittler R. (2002)** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, 7: 405-410.
- Moffat A.J., Armstrong A.T., Ockleston J. (2001).** The optimization of sewage sludge and effluent disposal on energy crops of short rotation hybrid poplar. *Biomass and Bioenergy* 20: 161–169.
- Mohanty N., Vass I., Demeter S. (1990).** Copper toxicity affects photosystem II electron transport at the secondary quinone acceptor, Q<sub>B</sub>. *Plant Physiol.* 90: 175–179

- Monnet F., Vaillant N., Vernay P., Coudret A., Sallanon H. and Hitmi A. (2001).** Relationship between PSII activity, CO<sub>2</sub> fixation, and Zn, Mn and Mg contents of *Lolium perenne* under zinc stress, *J. Plant Physiol.* vol. 158: 1137–1144.
- Morosinotto T., Caffarria S., Dall’ostoia L., Bassia R., (2003).** “Mechanistic aspects of the xanthophyll dynamics in higher plant thylakoids”. *Physiol. Plantar.*, 119: 347–354.
- Moustakas M., Lanaras T., Symeonidis I., Karataglis S. (1994).** Growth and some photosynthetic characteristics of field grown *Avena sativa* under copper and lead stress. *Photosynthetica* **30**: 389–396.
- Muller P., Li X.P. and Niyogi K.K. (2001).** Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*. 125:1558-1566.
- Mulligan CN, Yong RN, Gibbs BF. (2001).** Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater. *Engineering Geology* **60**: 193–207.
- Mullineaux P.M. and Rausch T. (2005).** Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stressresponsive gene expression. *Photosynthesis Research* **86**: 459-474.
- Munday J., Govindjee. (1969).** Light-induced changes in the fluorescence yield of chlorophyll *a* in vivo. III. The dip and the peak in the fluorescence transient of *chlorella pyrenoidosa*. *Biophys. J.* **9**: 1-21.
- Munekaga Y., Hashimoto M., Miyaka C., Tomizawa K.I., Endo T., Tasaka M. and Shikanai T. (2004).** Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* **429**: 579-582.
- Murthy S.D.S., Bukhov N.G. and Mohanty P. (1990).** Mercury-induced alterations of chlorophyll *a* fluorescence kinetics in cyanobacteria: multiple effects of mercury on electron transport. *J. Photochem. Photobiol.* **6**: 373–380.
- Nedbal L., Soukupova J., Whitmarsh J., Trtlek M. (2000).** Postharvest imaging of chlorophyll fluorescence from lemons can be use to predict fruit quality. *Photosynthetica*, **38**: 571-579.
- Nedbal L. and Whitmarsh J. (2004).** Chlorophyll fluorescence imaging of leaves and fruits. In Papageorgiu G and Govindjee G (Eds.). *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis* Dordrecht, The Netherlands Springer pp. 389–407
- Neubauer C., Schreiber U. (1987).** The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous Illumination. II. Partial control by the photosystem II donor side and possible ways of interpretation. *Z. Naturforschung*, **42c**: 1255-1264.
- Ni X., Quisenberry S., Heng-Moss T., Markwell J., Higley L., Baxendale F., Sarath G., Klucas R. (2002).** Dynamic change in photosynthetic pigments and chlorophyll degradation elicited by cereal aphid feeding. *Entom. Exp. Appl.*, **105**: 43-53.

- Ning L., Edwards G., Strobel G., Daley L., Callis J. (1995).** Imaging fluorometer to detect pathological and physiological change in plants. *Appl. Spectr.*, 49: 1381-1389.
- Niyogi, K.K., Li X.P., Rosenberg V. and Jung H.S. (2005).** Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? *Journal of Experimental Botany* 56: 375-382.
- Noctor G. and Foyer C.H. (1998).** Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249-279.
- Nogues S., Cotxarrera L., Alegre L., Trillas M. (2002).** Limitations to photosynthesis in tomato leaves induced by *Fusarium* wilt. *New Phytol.*, 154: 461-470.
- Obata H. and Umebayashi M. (1993).** Production of SH compounds in higher plants of different tolerance to Cd. *Plant soil* 155/156: 533-536.
- Okland R. H., Steinnes E., Okland T. (1997)** - Element concentration in the boreal forest moss *Hylocomium splendens*: variation due to segment size, branching pattern and pigmentation. *Journal of Bryology* 19: 671-684.
- Ortiz D.F, Ruscitti T., McCue K.F., Ow D.W. (1995).** Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J. Biol. Chem* 270: 4721-4728.
- Osama K., Shimazaki K., Aiga I., Laracher W., Onoe M. (1987).** Image analysis of chlorophyll fluorescence transient for diagnosing the photosynthetic system of attached leaves. *Plant Physiol.*, 84: 748-752.
- Osmond C., Daley P., Badger M., Lüttge U. (1998).** Chlorophyll fluorescence quenching during photosynthetic induction in leaves of *Abutilon striatum* Dicks. Infected with Abutilon mosaic virus, observed with a field- portable imaging system. *Bot. Acta*, 111: 390-397.
- Ouzounidou G. (1993).** Changes of photosynthetic activities in leaves as a results of Cu-treatment: Dose response relations in *Silene* and *Thlaspi*. *Photosynthetica* 29: 455-462
- Ouzounidou G., Moustakas M., Strasser R. (1997).** Sites of action of copper in the photosynthetic apparatus of maize leaves: kinetic analysis of chlorophyll fluorescence oxygen evolution, absorption changes and thermal dissipation as monitored by photoacoustic signals. *Aust. J. Plant Physiol.* 24: 81-90
- Owens T. (1996).** Photosynthesis and the Environment. Ed. N. R. Baker, Kluwer, Dordrecht, pp. 1-23.
- Oxborough K. (2004 a).** Imaging of chlorophyll *a* fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. *J. Exp. Bot.*, 45: 1195-1205
- Oxborough K. (2004 b).** Using chlorophyll *a* fluorescence imaging to monitor photosynthetic performance. In: Papageorgiou Govindjee, Papageorgiou George C, eds. *Chlorophyll*

*fluorescence—a signature of photosynthesis*. Advances in Photosynthesis and Respiration Series. Kluwer Academic Publishers

**Oxborough K., Baker NR. (1997a).** An instrument capable of imaging chlorophyll *a* fluorescence from intact leaves at very low irradiance and at cellular and subcellular levels. *Plant, Cell and Environment* 20: 1473–1483.

**Oxborough K., Baker NR. (1997b).** Resolving chlorophyll *a* fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components: calculation of  $qP$  and  $F'_v/F'_m$  without measuring  $F'_o$ . *Photosynthesis Research* 54: 135–142.

**Papovic R., Dewez D. and Juneau P. (2003).** Applications of Chlorophyll Fluorescence in Ecotoxicology: heavy metals, herbicides, and air pollutants. In: Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology. Edited by DeEll J.R. and Toivonen P.M.A. Kluwer Ac. Publ.

**Pena M., Revilla G., Zarra I. (1996).** Change in dehydroferulic acids and peroxidase activity against ferulic acid associated with cell walls during growth of *Pisum pinaster* hypocotyl. *Plant Physiol.*, 111: 941-946.

**Peng M., Kuc J.A. (1992).** Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf disks. *Phytopathology* 82: 696–699.

**Petrie G., (1994).** Effects of temperature and moisture on the number, size and septation of ascospores produced by *Leptosphaeria maculans* (blackleg) on rapeseed stubble. *Can. Plant Dis. Surv.*, 74: 141-151.

**Pinamonti F., Stringari G., Gasperi F., Zorzi G. (1997).** The use of compost: its effects on heavy metal levels in soil and plants. *Resources, Conservation and Recycling* 21: 129–143.

**Poisson B., Peres A. (1999).** Study of rapeseed susceptibility to primary contamination of *Leptosphaeria maculans* in relation plant vegetative stage. Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Rapeseed Congress, 1999. Canberra, Australia. <http://www.regional.org.au/papers/index.htm>

**Pomar F., Novo M., Berdal M., Merino F., Ros Barceló A. (2004).** Change in stem lignins (monomer composition and crosslinking) and peroxidase are related with the maintenance of leaf photosynthetic integrity during *Verticillium* wilt in *Capsicum annuum*. *New Phytolog.*, 163: 111-123.

**Prasad M.N.V. and Strzalka S. (1999).** Impact of heavy metals on photosynthesis. In: MNV Prasad and J Hagemeyer, Editors, *Heavy Metal Stress in Plants, from Molecules to Ecosystems*, Springer, Berlin, pp. 117–138.

**Pshibytko N., Zenevich L., Kabashnikova L. (2006).** Change in the photosynthetic apparatus during fusarium wilt of tomato. *Russ. J. Physiol.*, 53: 25-31.

- Pulford I.D., & Watson C. (2003).** Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees - a review. *Environ. Int.* 29, 529–540.
- Pulford I.D., Riddell-Black D., Stewart C. (2002).** Heavy metal uptake by willow clones from sewage sludge-treated soil: the potential for phytoremediation. *Int. J. Phytoremediation* 4: 59-72.
- Punshon T, Dickinson N. (1997).** Acclimation of *Salix* to metal stress. *NewPhytologist* 137: 303–314.
- Quartacci M.F., Pinzino C., Sgherri C.L.M., Navari-Izzo F. (2000).** Growth in excess copper induces changes in the lipid composition and fluidity of PSII-enriched membranes in wheat. *Physiol. Plantarum* 108, 87–93.
- Quick WP, Horton P (1984).** Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in barley protoplast. I. Factors affecting the observation of oscillations in the yield of chlorophyll fluorescence and the rate of oxygen evolution. *P Roy Soc–Biol Sci* 220: 361–370
- Rahoutei J., Garcia-Luque I., Baron M. (2000).** Inhibition of photosynthesis by viral infection: Effect on PSII structure and function. *Physiol. Plantar.*, 110: 286-292.
- Ralph P.J., Burchett M.D. (1998).** Photosynthetic response of *Halophila ovalis* to heavy metal stress. *Environmental Pollution* 103: 91–101.
- Ranieri A., Castagna A., Scebba F., Careri M., Zagnoni I., Predieri G., Pagliari M., Sanità di Toppi L. (2005).** Oxidative stress and phytochelatin characterisation in bread wheat exposed to cadmium excess. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 45-54.
- Rausser W.E. (1995).** Phytochelatins and related peptides, structure, biosynthesis and function. *Plant Physiol.* 109: 1141-1149
- Roberts A., Walters D. (1988).** Photosynthesis in discrete regions of leaves infected with rust, *Puccinia allii* Rud.. *New Physiol.*, 110, 371-376.
- Robinson B.H., Mills T.M., Green S., Chancerel B., Clothier B., Fung L.E. et al. (2005).** Trace element accumulation by poplars and willows used for stock fodder. *New Zeland Journal of Agriculture Research* 48: 489-497.
- Robinson B.H., Mills T.M., Petit D., Fung, L.E., Green S. & Clothier B. (2000).** Natural and induced cadmium accumulation in poplar and willow: Implications for phytoremediation. *Plant and Soil* 227: 301–306
- Rodríguez-Moreno L., Pineda M., Soukupová J., Macho A.P., Beuzón C.R., Barón M., Ramos C. (2008).** Early detection of bean infection by *Pseudomonas syringae* in asymptomatic leaf areas using chlorophyll fluorescence imaging. *Photosynth Res.* 96: 27-35

- Romanowska E. (2002).** Gas exchange functions in heavy metal stressed plants. In: Prasad, .N.V., Strzalka, K. (Eds.), *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 260–262.
- Romeu-Moreno A., Mas A. (1999).** Effects of copper exposure in tissue cultured *Vitis vinifera*. J. Agric. Food Chem. 47, 2519–2522.
- Rosenqvist E. (2001).** Light acclimation maintains the redox state of PSII electron acceptor Q<sub>A</sub> within a narrow range over a broad range of light intensities. *Photosynthesis Research* 70: 299–310.
- Rotenberg D., Macguidwin A., Saeed I., Rouse D. (2004).** Interaction of spatially sseparated *Pratylenchus penetrans* and *Verticillium dahliae* on potato measured by impaired photosynthesis. *Plant Pathol.*, 53: 294–302.
- Rout G.R., Samantary S., Das P. (2000).** Effects of chromium and nickel on germination and growth in tolerant and no tolerant population of *Echinocloa* (L.) Link. *Chemosphere* 40: 855–859.
- Rouxel T., Chupeau Y., Fritz R., Kollmann A., Bousquet J. (1988).** Biological effects of sirodesmin PL, a phytotoxin produced by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Sci.*, 57: 118–129.
- Ruley A.T., Sharma N.C., Sahi S.V. (2004).** Antioxidant defense in a lead accumulating plant, *Sesbania deummondii*. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 899–906.
- Salt D.E., Prince R.C., Pickering I.J., Raskin I. (1995).** Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiol.* 109: 1427–1433.
- Salt D.E., Smith R.D., Raskin I. (1998).** Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology* 49: 643–668.
- Scandalios J.G. (1997).** Molecular genetics of superoxide dismutases in plants. In: Scandalios J.G. (ed.) *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defences*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York pp. 527.
- Scarascia-Mugnozza G., Ceulemans R., Heilman P.E., Isebrands J.G., Stettler R.F., & Hinckley T.M. (1997).** Production physiology and morphology of *Populus* species and their hybrids grown under short rotation. II. Biomass components and harvest index of hybrid and parental species clones. *Canadian Journal of Forest Research*, 27, 285–294.
- Scholes J.D., Rolfe S.A. (1996).** Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust ( *Puccinia coronata* ): Quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *Planta*, 199: 573–582.
- Scholes J.D., Rolfe S.A. (1995).** How do biotrophic pathogens affect the photosynthetic metabolism of their hosts? *Aspects Appl. Biol.*, 42: 91–99.

- Scholes J.D., Rolfe S.A. (1996).** Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust ( *Puccinia coronata* ): Quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *Planta*, 199: 573-582.
- Schreiber U. (2004).** Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) Fluorometry and Saturation Pulse Method: An Overview. In: *Chlorophyll a Fluorescence. A signature of Photosynthesis*. Papageorgiou and Govindjee, (Eds.), Springer. Pp. 279-319.
- Schreiber U., Bilger W. and Neubauer C. (1994).** Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. In: Schulze E-D, Caldwell M (eds) *Ecophysiology of Photosynthesis*, pp 49–70 Springer-Verlag, Berlin
- Schreiber U., Bilger W., Hormann H. and Neubauer C. (1998).** Chlorophyll fluorescence as diagnostic tool: Basics and some aspects of practical relevance. In: Raghavendra AS (ed) *Photosynthesis. A Comprehensive Treatise*. pp. 320-336. Cambridge University Press, Cambridge
- Schreiber U., Schliwa U., Bilger W. (1986).** Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* **10**: 51-62,.
- Sgardelis S., Cook C.M., Pantis J.D. & Lanaras T. (1994).** Comparison of chlorophyll fluorescence and some heavy metal concentrations in *Sonchus* spp. and *Taraxacum* spp. along an urban pollution gradient. *Science of the Total Environment*, **158**: 157–164.
- Shtienberg D. (1992).** Effects of foliar diseases on gas exchange processes: a comparative study *Phytopathol.*, **82**: 760-765.
- Sidorova S. (1983).** Crop wilting under verticillium and fusarium wilts. Moscow: Kolos, 1983.
- Sighicelli M., Patsayeva S., Lai A. (2005).** Characterization of citrus fruit quality using reflectance spectroscopy”. 31<sup>th</sup> International Symposium on Remote Sensing of Environment, Saint Petersburg.
- Soledade M., Pedras C., Biesenthal C. (1998).** Production of the host-selective phytotoxin phomalide by isolates of *Leptosphaeria maculans* and its correlation with sirodesmin PL production. *Can. J. Microbiol.*, **44**: 547–553.
- Soukupova J., Smatanova S., Nedbal L., Jegorov A. (2003).** Plant response to destruxins visualized by imaging of chlorophyll fluorescence. *Physiol. Plantar.*, **118**: 399-405.
- Stangarlin J., Pascolati S. (2000).** Atividades de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (rubisco), clofilase,  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase e contendo de clorofila em cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) infectados com *Uromyces appendiculatus*. *Summa Phytopathol.* **26**: 34-42.
- Stern V.O. and Volmer M. (1919).** On the quenching-time of fluorescence. *Physik. Zeitschr.* **20**: 183-188

- Stiborova M., Dubravova M., Brezinova A. (1988).** Mechanism of action of  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Co}^{++}$ , and  $\text{Zn}^{++}$  on ribulose-1,5-biphosphate carboxylase from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Photosynthetica* 22: 161-167.
- Stiborova M., Dubravova M., Brezinova A., Friedrich A. (1986).** Effect of heavy metal ions on growth and biochemical characteristics of photosynthesis of barley. *Photosynthetica* 20: 418-425.
- Sziraki I., Mustardy L.A., Faludi-Daniel A. and Kiraly Z. (1984).** Alterations in chloroplast ultrastructure and chlorophyll content in rust-infected pinto beans at different stages of disease development. *Phytopathology* 74: pp. 77–84.
- Taiz L, Zeiger E. (1998).** Mineral nutrition. In: Taiz L, Zeiger E, eds. *Plant physiology*, 2nd edn. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates, Inc, Publishers, 103–124.
- Taiz L. and Zeiger E. (2002).** *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 690 p.
- Thordal-Christensen H., Zhang Z., Wei Y., Collinge D. (1997).** Subcellular localization of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in plants.  $\text{H}_2\text{O}_2$  accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.*, 11: 1187-1194.
- Tognetti R., Sebastiani L., Minnocci A. (2004).** Gas exchange and foliage characteristics of two poplar clones grown in soil amended with industrial waste. *Tree Physiol.* 24, 75–82.
- Trissl H., Gao Y., Wulf K. (1993).** Theoretical fluorescence induction curves derived from coupled differential equations describing the primary photochemistry of Photosystem II by an exciton/radical pair equilibrium. *Biophys. J.*, 64: 984-998.
- Valcke R., Ciscato M., Heisel F., Mieke J., Sowinska M. (1999).** Analysis of heavy-metal stressed plants by fluorescence imaging. In: Kamerman GW, Werner C (eds) *Proc SPIE*, 13th Annual International Symposium on Aerosense 3707:82–90, Orlando
- Van Assche F. and Clijsters H. (1986).** Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentration of zinc: effect on ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase. *Journal of Plant Physiology* 125: 355–360.
- van Kooten O., Snel J.F.H. (1990).** The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth. Res.* 25: 147-150
- Wainwright S.J. and Woolhouse H.W. (1975).** Physiological mechanism of heavy metals tolerance in plants. *British Ecological Society Symposium* 15: 231-258.
- Watanabe T. and Kobayashi M. (1988).** Chlorophylls as functional molecules in photosynthesis. Molecular composition *in vivo* and physical chemistry *in vitro*. *Special Articles on Coordination Chemistry of Biologically Important Substances* 4: 383-395.

- Watmough S.A., Gallivan C.C., Dickinson N.M. (1995).** Induction of zinc and nickel resistance in *Acer pseudoplatanus* L. (sycamore) callus cell lines. *Environmental and Experimental Botany* 35: 465–473.
- Welch R.M. (1995).** Micronutrient nutrition of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 14: 49–82.
- West J., Kharbanda M., Barbetti M., Fitt B. (2001).** Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant Pathol.*, 50: 1-10.
- Willson R.I. (1988).** Zinc and iron in free radical pathology and cellular control. In: Mills CF, ed. *Zinc in human biology*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 147–172.
- Wilson K., Huner N. (2000).** The role of growth rate, redox-state of the plastoquinone and the trans-thylakoid  $\Delta pH$  in photoacclimation of *Chlorella vulgaris* to growth irradiance and temperature. *Planta*, 212: 93-102.
- Wohlgemuth H., Mittelstrass K., Kschieschan S., Bender J., Weigel H.-J., Overmyer K., Kangasjärvi J., Sandermann H., Langebartels C. (2002).** Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant, Cell & Environment* 25: 717–726.
- Yruela I., Pueyo J.J., Alonso P.J., Picorel R. (1996).** Photoinhibition of photosystem II from higher plants: effect of copper inhibition. *J Biol Chem.* 271: 27408–27415
- Zacchini M., Pietrini F., Scarascia Mugnozza G., Iori V., Pietrosanti L., Massacci A. (2009).** Metal tolerance, accumulation and translocation in poplar and willow clones treated with cadmium in hydroponics. *Water Air Soil Pollut* 197: 23-34.
- Zayed A., Gowthaman S., & Terry N. (1998).** Phytoaccumulation of trace elements by wetlands plants: I. Duckweed. *Journal of Environmental Quality*, 27, 715-721.
- Zenk M.H. (1996).** Heavy metal detoxification in higher plant – a review. *Gene* 179: 21-30.