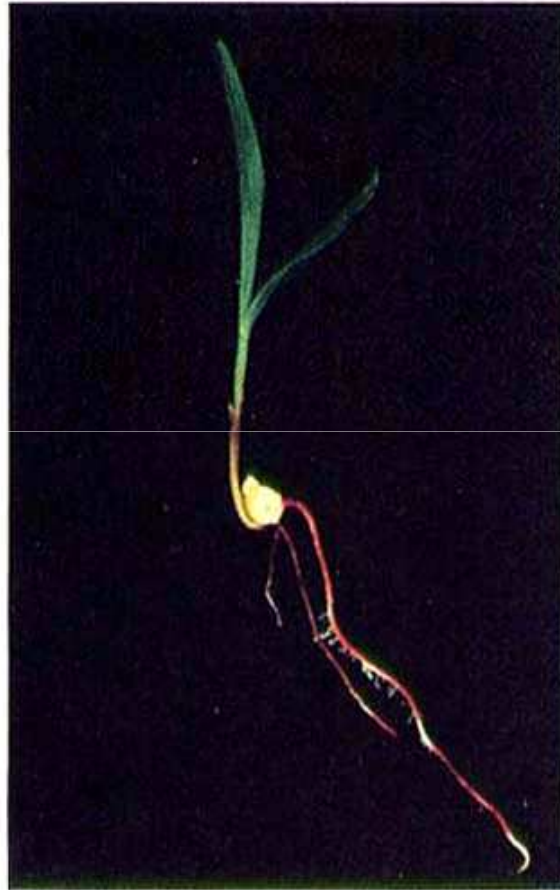
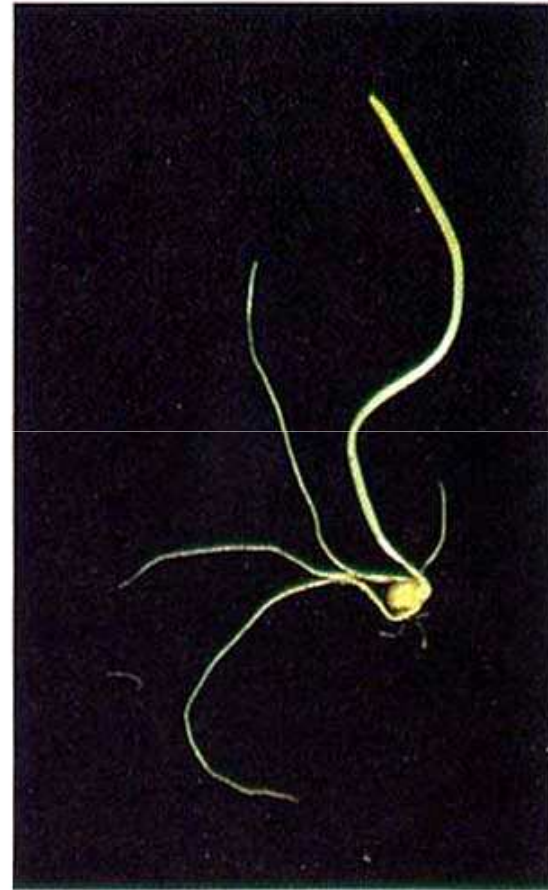




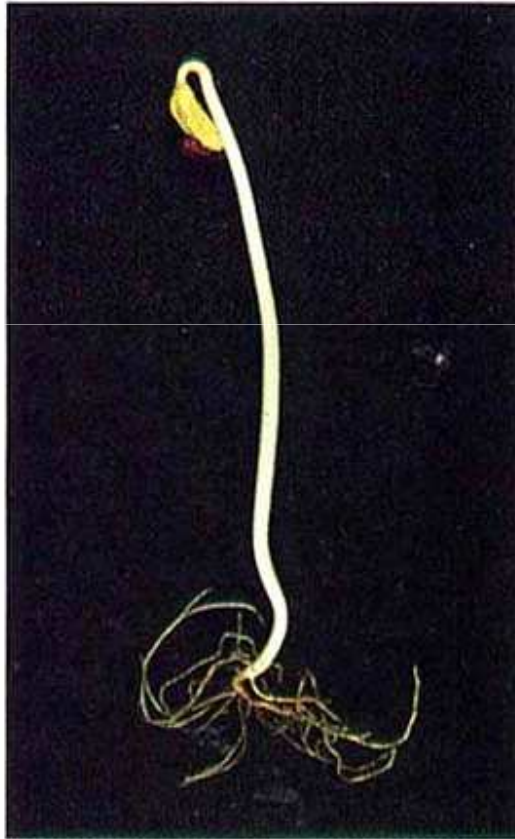
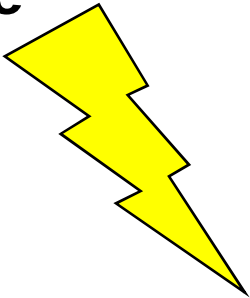
(A) Light-grown corn



(B) Dark-grown corn



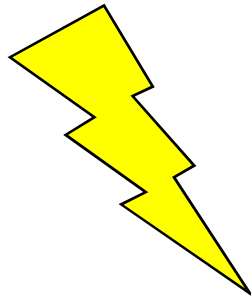
luce



**decremento della velocità di
allungamento del fusto**

sviluppo foglie

sintesi pigmenti fotosintetici



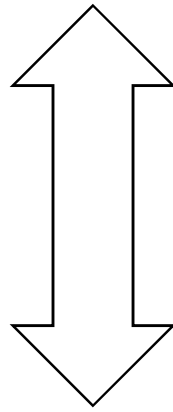
fotorecettore



risposta fisiologica

anni '30

luce rossa
(650-680 nm)



luce rossa-lontano
(710-740 nm)

Tabella 17.1 Risposte fotoreversibili tipiche indotte dal fitocromo in una varietà di piante superiori e inferiori.

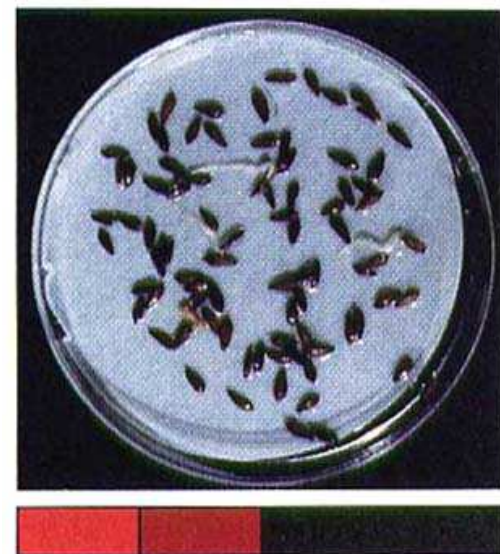
Gruppo	Genere	Stadio di sviluppo	Effetti della luce rossa
Angiosperme	<i>Lactuca</i> (lattuga)	Seme	Promuove la germinazione
	<i>Avena</i> (avena)	Pianticelle (eziolate)	Promuove la de-eziolatura (ma anche lo srotolamento della foglia)
	<i>Sinapis</i> (senape)	Pianticelle	Promuove la formazione dei primordi fogliari, lo sviluppo delle foglie primarie e la produzione di antocianine.
	<i>Pisum</i> (pisello)	Adulto	Inibisce l'allungamento dell'internodo
	<i>Xanthium</i> (lappola)	Adulto	Inibisce la fioritura (risposta fotoperiodica)
Gimnosperme	<i>Pinus</i> (pino)	Pianticelle	Aumenta la velocità di accumulo della clorofilla
Pteridofite	<i>Onoclea</i> (felce sensibile)	Giovane gametofito	Promuove l'accrescimento
Briofite	<i>Polytrichum</i> (muschio)	Germoglietto	Promuove la replicazione plastidiale
Clorofite	<i>Mougeotia</i> (alga)	Gametofito maturo	Promuove l'orientamento del cloroplasto in risposta a una luce debole direzionale



Dark



Red



Red Far-red



Red Far-red Red



Red Far-red Red Far-red

IPOTESI I

**esistono due fotorecettori, uno che assorbe la luce rossa,
l'altro che assorbe la luce rossa-lontano**

IPOTESI II

**un unico fotorecettore esiste in due forme interconvertibili, una
forma che assorbe la luce rossa, l'altra che assorbe la luce rossa-
lontano**

**nelle piante eziolate il fitocromo esiste in una forma
in grado di assorbire la luce rossa**

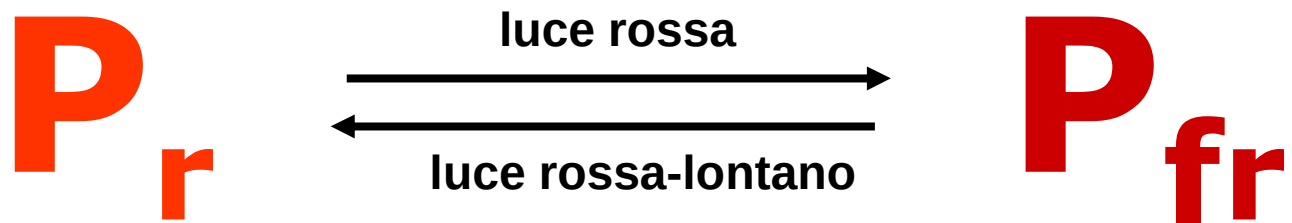
P_r

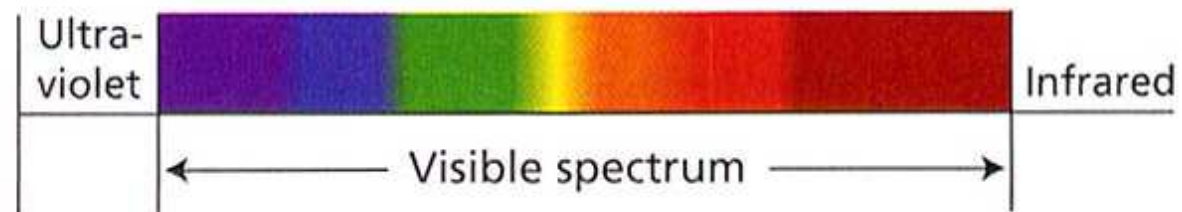
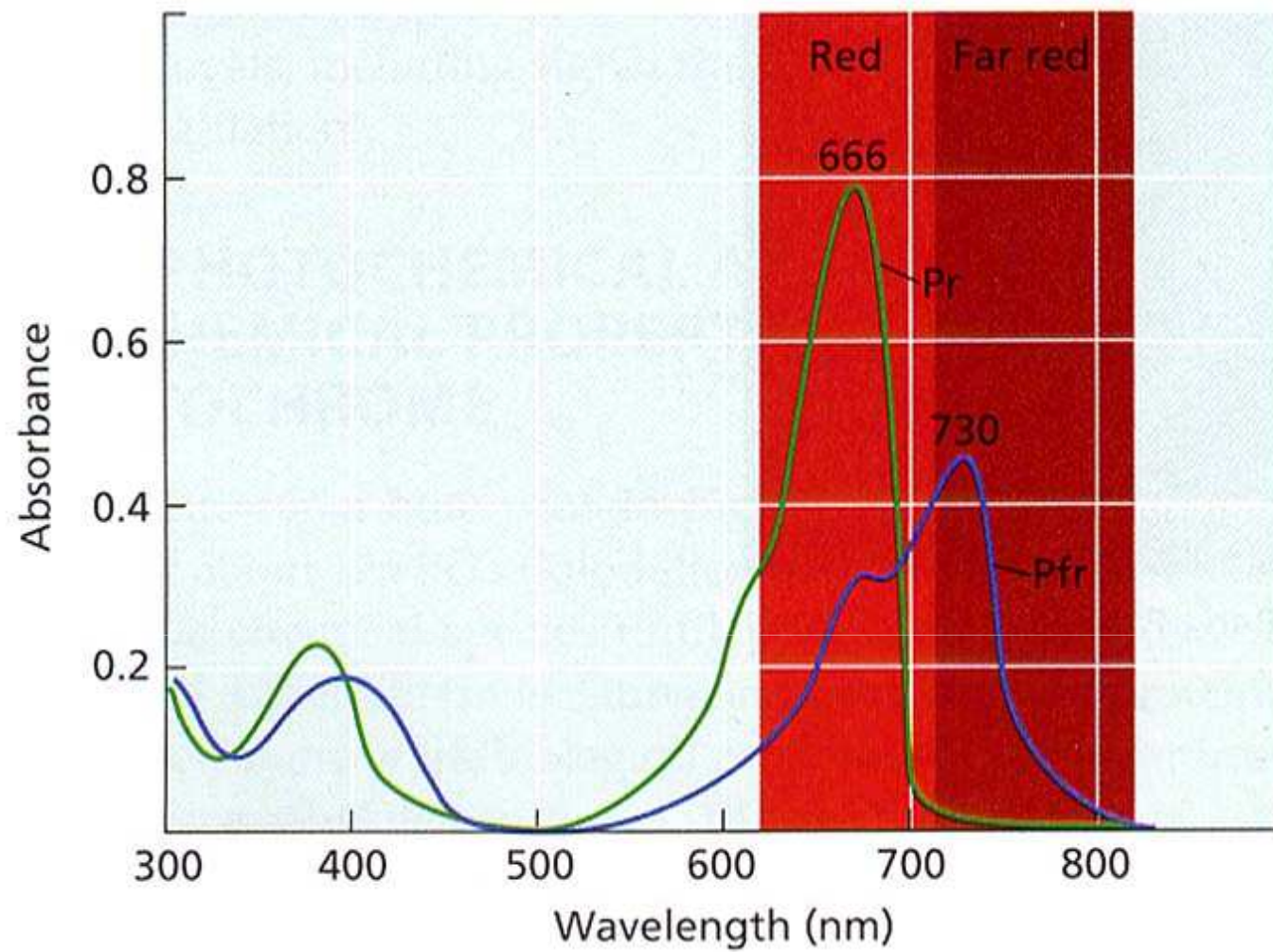
**la forma P_r è convertita dalla luce rossa in una forma
in grado di assorbire la luce rossa-lontano**

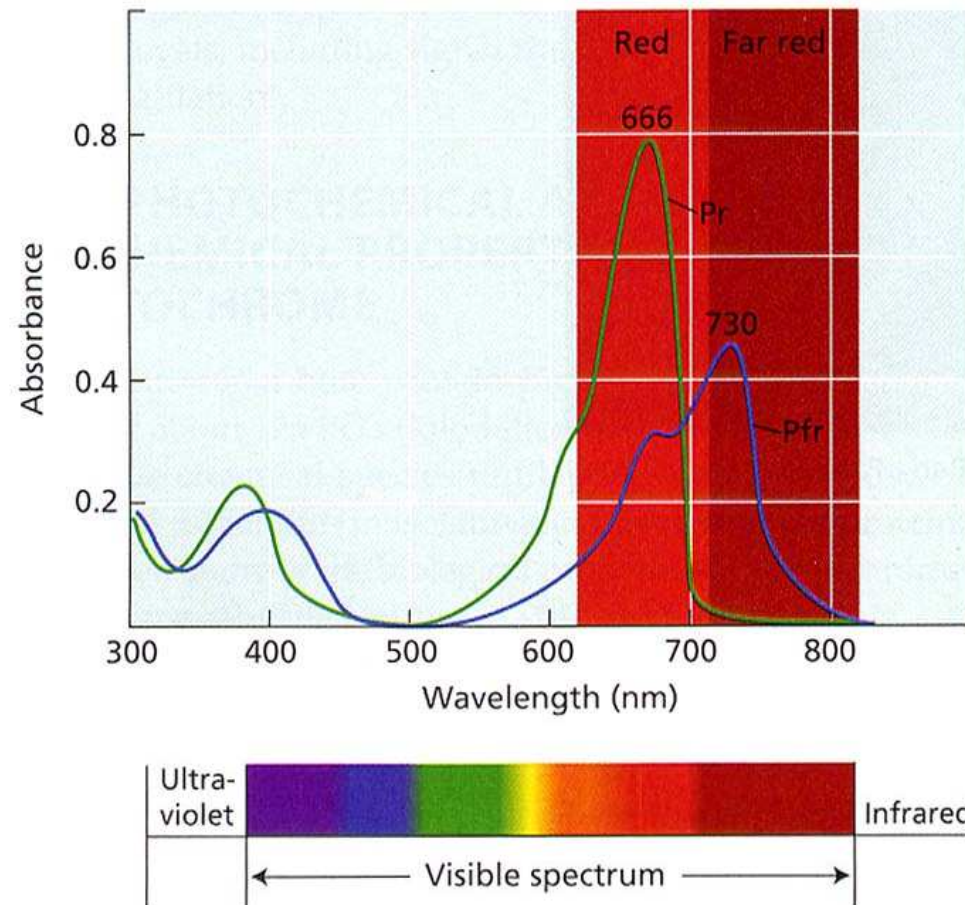
P_{fr}

la forma P_{fr} è in grado di assorbire la luce
rossa-lontano

la forma P_{fr} è convertita dalla luce rossa-
lontano nella forma P_r







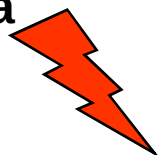
entrambe le forme assorbono nel blu

il P_{fr} assorbe anche nel rosso

il P_r assorbe nel rosso-lontano

EQUILIBRIO FOTOSTAZIONARIO

luce
rossa



85% P_{fr}
15% P_r

luce
rossa-lontano



97% P_r
3% P_{fr}

luce rossa  **risposta**

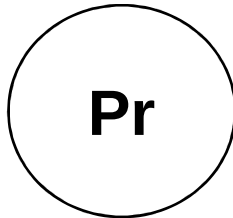
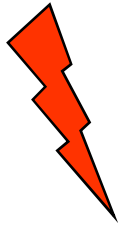
luce rossa  **converte P_r in P_{fr}**

qual è la forma attiva del fitocromo?

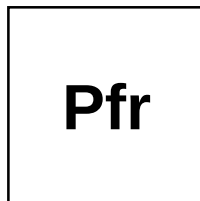
Ipotesi 1

Il Pr è la forma attiva

R



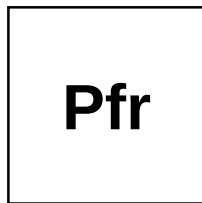
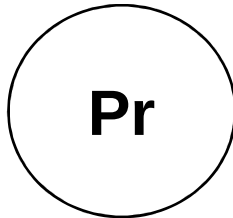
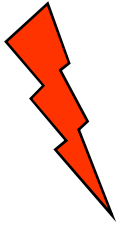
fotomorfogenesi



Ipotesi 2

Il Pfr è la forma attiva

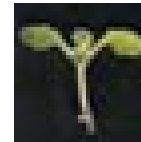
R



fotomorfogenesi

analisi di mutanti con risposte fotomorfogenetiche alterate

wild type: crescita ipocotile inibita



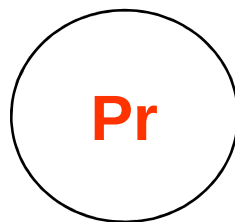
mutanti (*hy*): crescita non inibita



i mutanti *hy3* non sintetizzano il fitocromo



no



no



in un mutante privo di fitocromo

se fosse vera l'ipotesi 1

Non è presente il Pr, un inibitore della fotomorfogenesi



fotomorfogenesi

se fosse vera l'ipotesi 2

Non è presente il Pfr, un attivatore della fotomorfogenesi



NO
fotomorfogenesi

mutanti hy



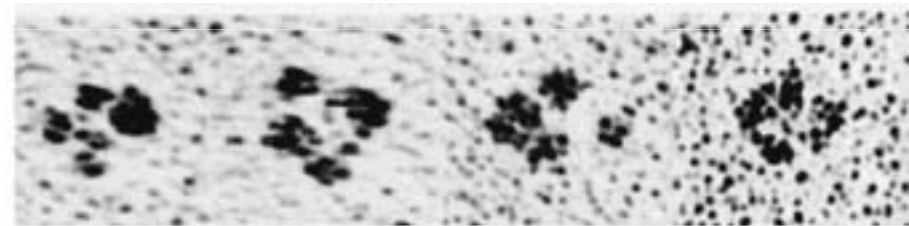
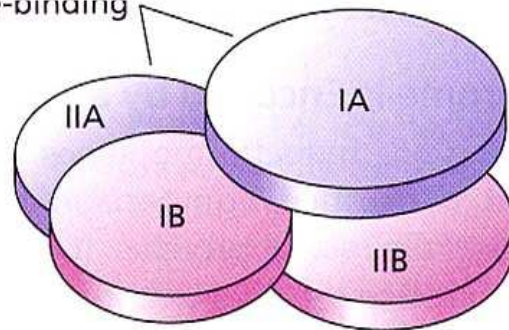
NO
fotomorfogenesi

il Pfr è la forma attiva

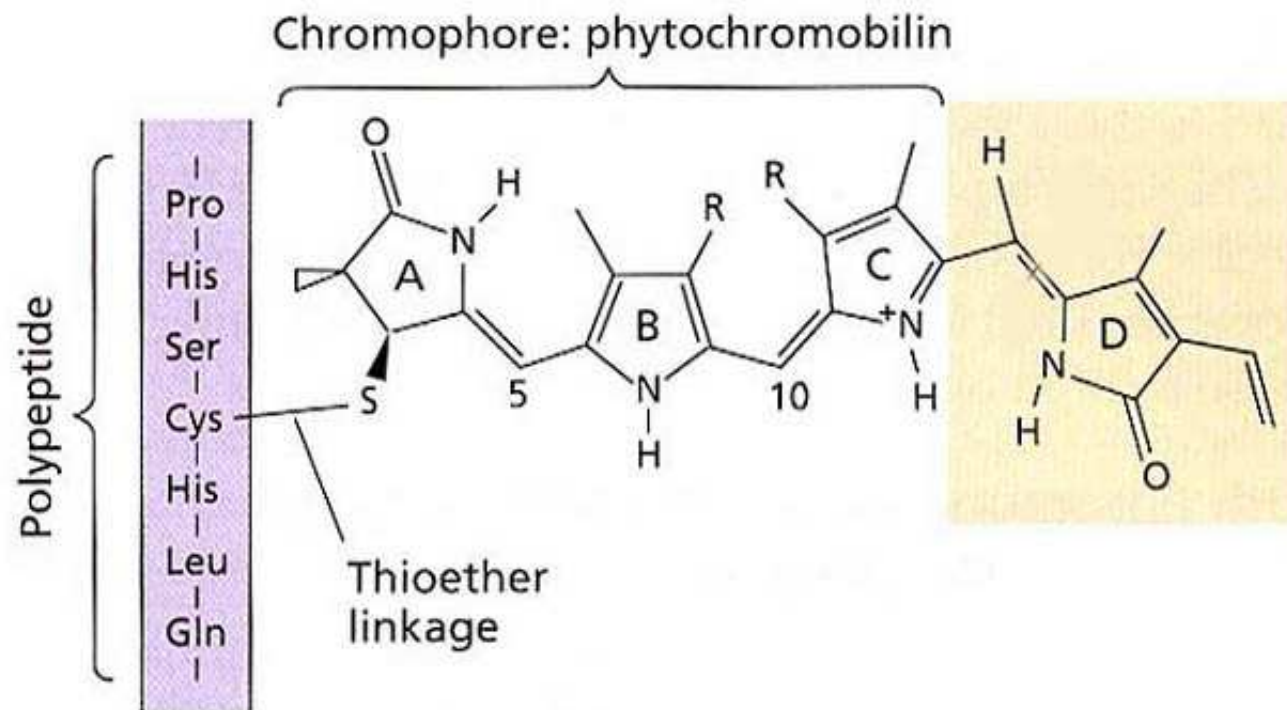
STRUTTURA FITOCROMO

omodimero di circa 250 kDa contenente un gruppo cromoforo, la fitocromobilina

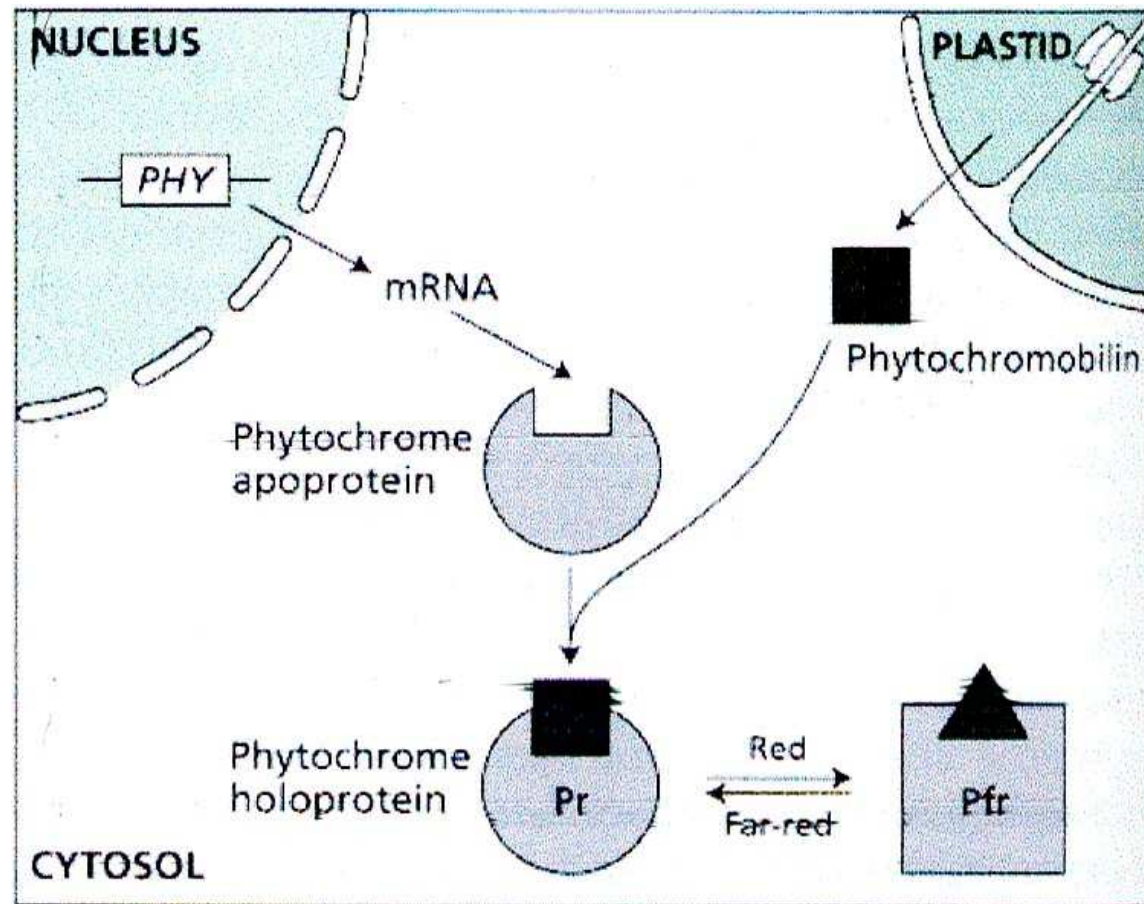
Chromophore-binding domains



N-term	→	70 kDa	→	cromoforo
C-term	→	55 kDa	→	sito di dimerizzazione



viene sintetizzata dai plastidi a partire dall'acido 5-aminilevulinico



primi tentativi di purificazione (avena)



FITOCROMO DI TIPO I E DI TIPO II

piante **eziolate**
piante **verdi**

tipo I / tipo II 9:1
tipo I / tipo II 1:1

IL FITOCROMO È CODIFICATO DA UNA FAMIGLIA MULTIGENICA

Arabidopsis
PHYA, PHYB, PHYC, PHYL, PHYE



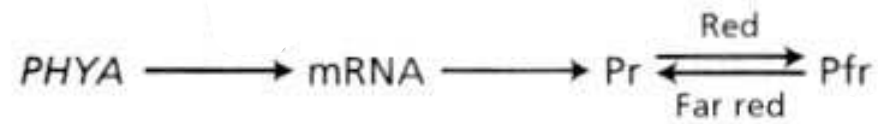
**analizzati i livelli di espressione
(mRNA e proteina)**



studio funzione dei geni

PHYA  **tipo I**

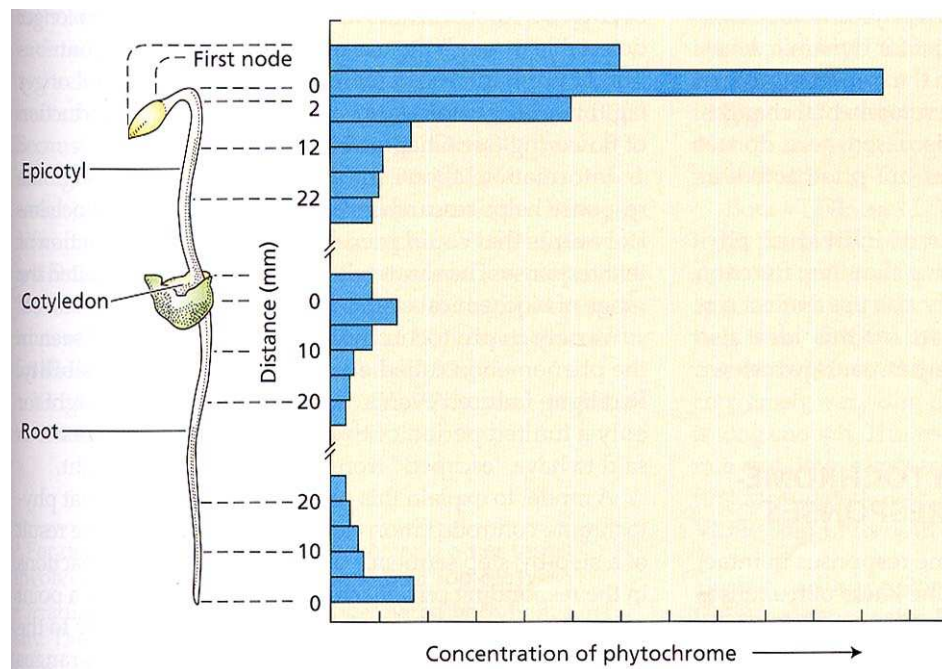
PHYB-E  **tipo II**



studi di localizzazione del fitocromo

metodo spettrofotometrico

si analizzano le variazioni dello spettro di assorbimento dopo irradiazione con luce R e luce FR



localizzazione in tessuti e cellule

geni reporter

luce

PHYB-GUS



PHYD-GUS



PHYE-GUS



buio

PHYB-GUS



PHYD-GUS



PHYE-GUS



CARATTERISTICHE DELLE RISPOSTE INDOTTE DAL FITOCROMO

le risposte indotte dal fitocromo possono essere distinte
in base alla quantità di luce richiesta

VLFR **VERY LOW-FLUENCE RESPONSE** (0.1-50 nmol/m²)

LFR **LOW FLUENCE RESPONSE** (1-1000 μmol/m²)

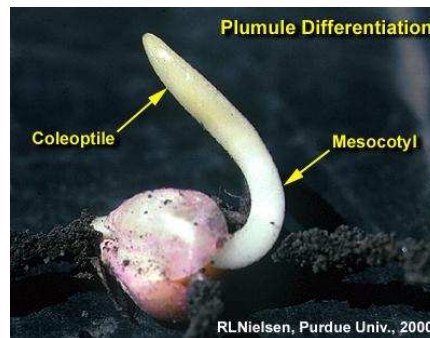
HIR **HIGH IRRADIANCE RESPONSE** (10 mmol/m²→t lunghi)

VLFR

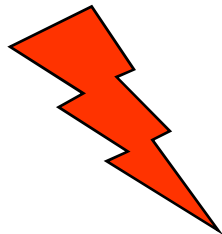
**germogli di avena
cresciuti al buio**

R
→
 0.1 nmol.m^{-2}

**stimolo crescita coleotile
inibizione crescita mesocotile**



VLF



P_r



P_{fr}

99.98%

0.02%

P_{fr}



P_r

97%

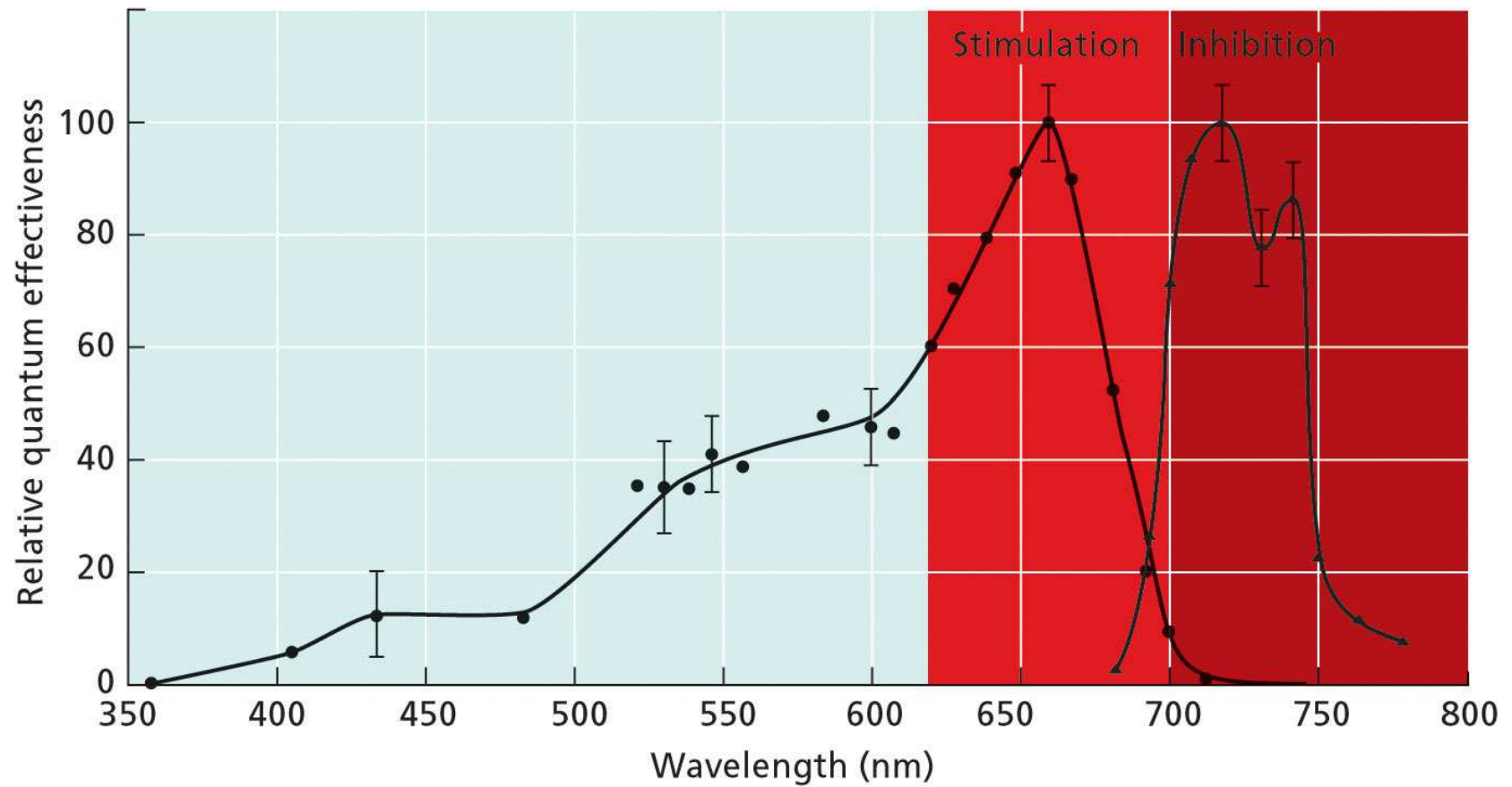
P_{fr}

3%

le VLFR non sono fotoreversibili

LFR

promozione germinazione semi di *Arabidopsis*



HIR

sono indotte da fluenze 100 volte maggiori delle LFR

TABLE 17.2
Some plant photomorphogenic responses induced by high irradiances

Synthesis of anthocyanin in various dicot seedlings and in apple skin segments
Inhibition of hypocotyl elongation in mustard, lettuce, and petunia seedlings
Induction of flowering in henbane (*Hyoscyamus*)
Plumular hook opening in lettuce
Enlargement of cotyledons in mustard
Production of ethylene in sorghum

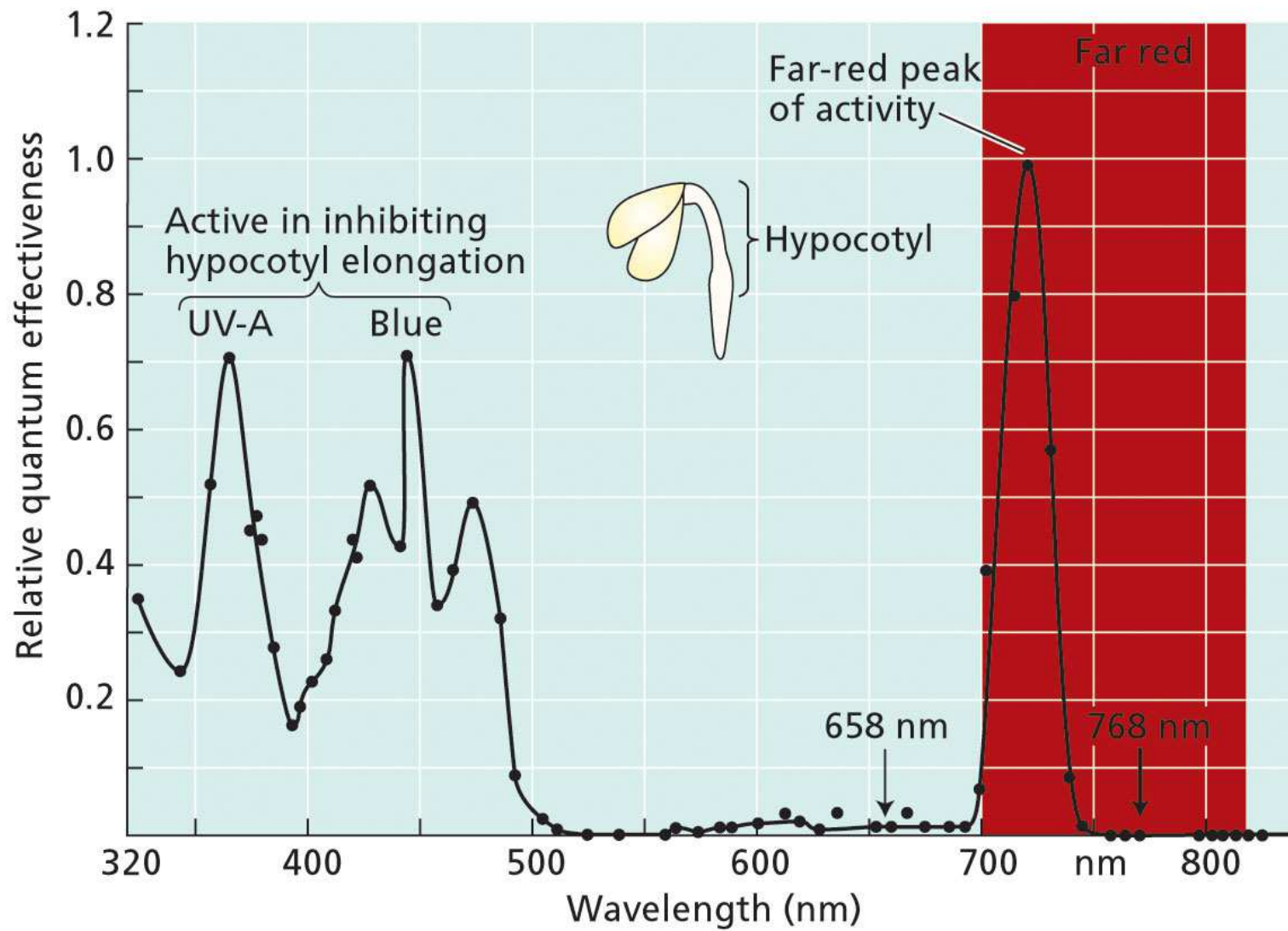
+LFR

non sono fotoreversibili

- esposizione prolungata a luce debole
- esposizione breve a luce intensa



NO HIR



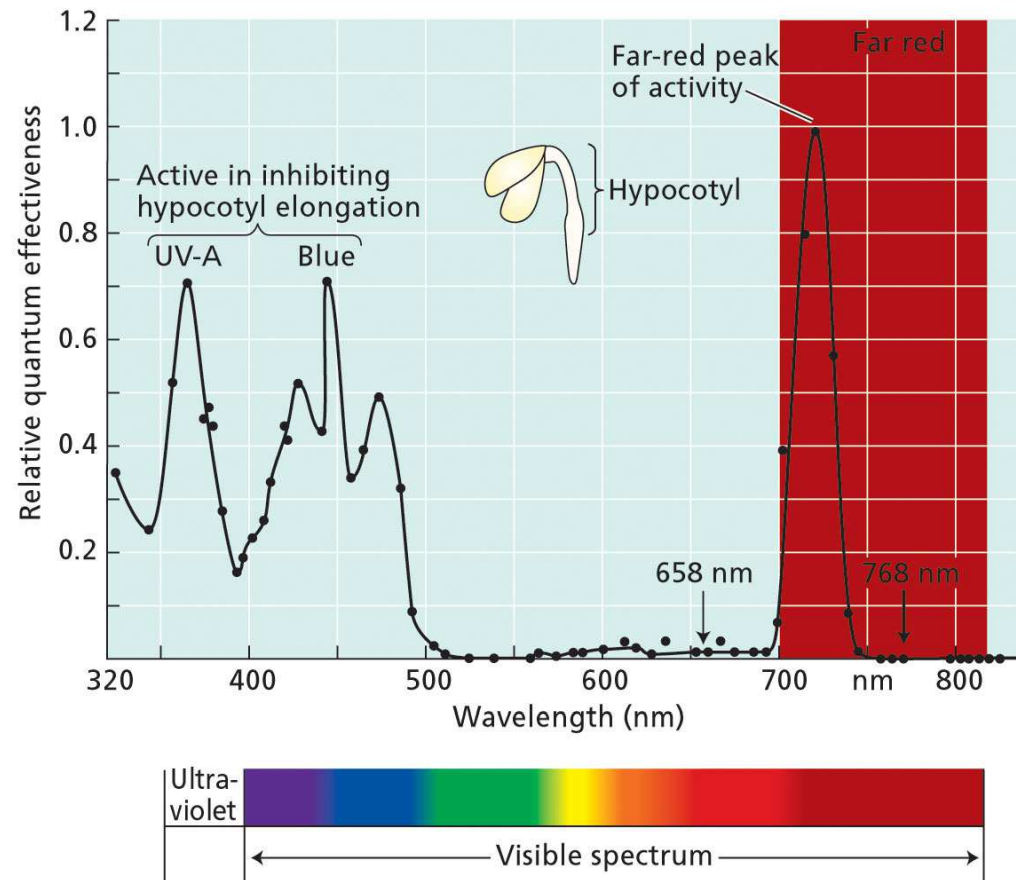
fotorecettore diverso dal fitocromo?

**studio risposte ad alte
irradianze nei mutanti *hy2***
(fitocromi non funzionali)



**non risponde a
FR**

**normale risposta alla luce
UV-A e blu**



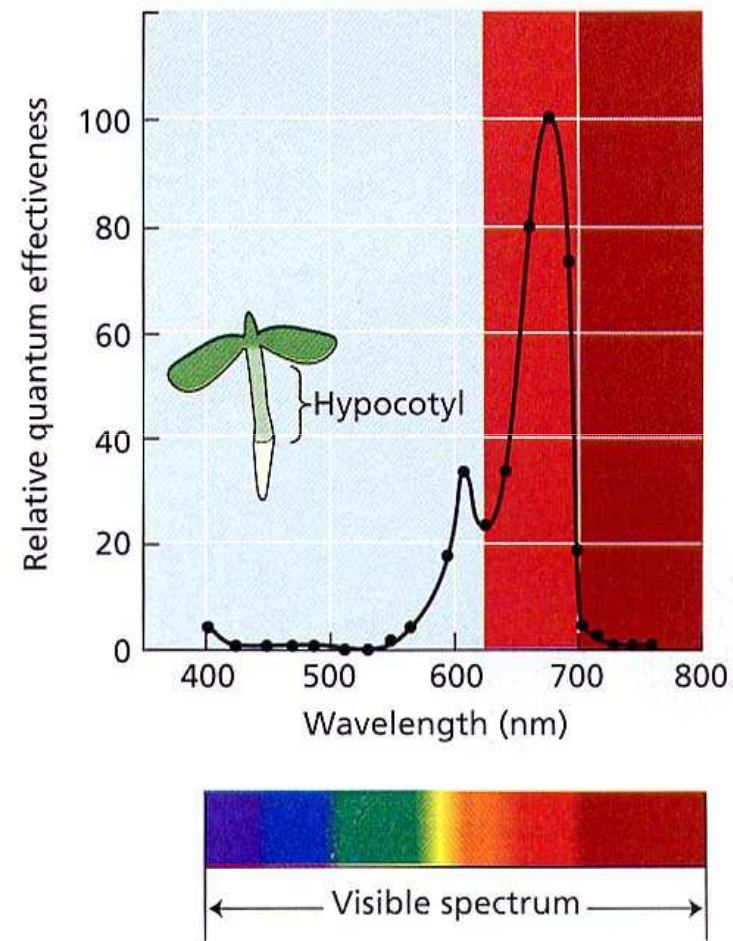
PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 17.9 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

658 nm + 768 nm $\longrightarrow$ risposta

$$\frac{658 \text{ nm}}{768 \text{ nm}} \quad P_{\text{fr}}/P_{\text{tot}} = 0.03$$

$$720 \text{ nm} \quad P_{\text{fr}}/P_{\text{tot}} = 0.03$$

**la risposta alla luce FR diminuisce quando i
germogli diventano verdi**



luce



**degradazione fitocromo tipo I
(phyA)**

HIR piante eziolate



phyA

HIR piante verdi



phyB

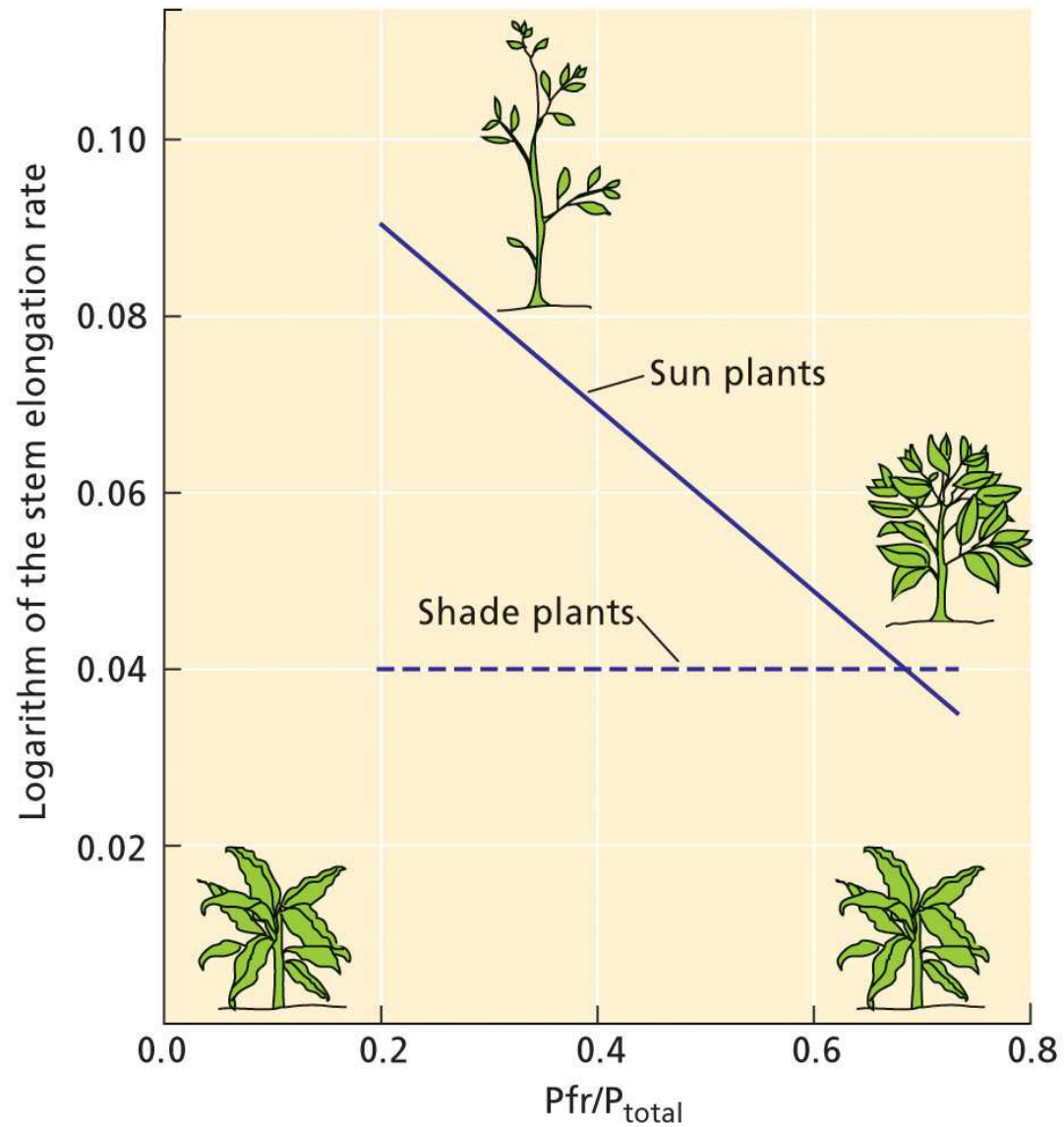
**recettore
luce R/FR**

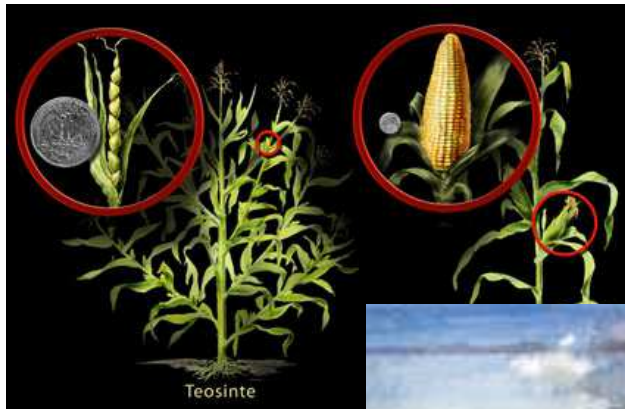
**quali condizioni ambientali modificano i livelli
relativi di luce R e FR?**

TABLE 17.3
Ecologically important light parameters

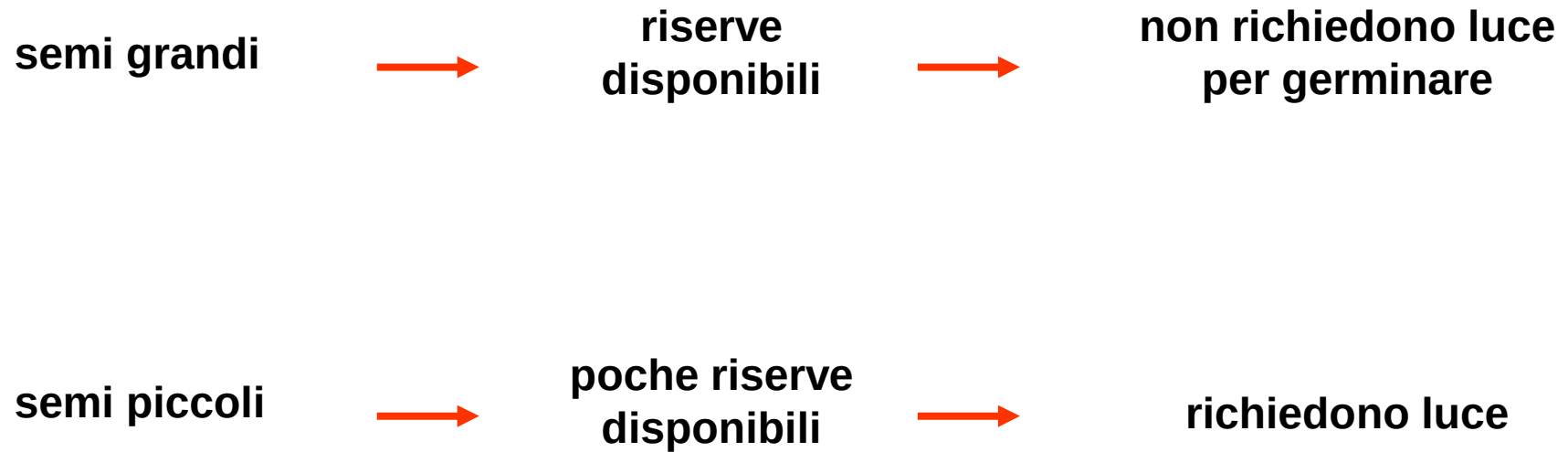
	Photon flux density ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	R/FR ^a
Daylight	1900	1.19
Sunset	26.5	0.96
Moonlight	0.005	0.94
Ivy canopy	17.7	0.13
Lakes, at a depth of 1 m		
Black Loch	680	17.2
Loch Leven	300	3.1
Loch Borralie	1200	1.2
Soil, at a depth of 5 mm	8.6	0.88

la “fuga” dall’ombra





il fitocromo induce la germinazione dei semi fotoblastici



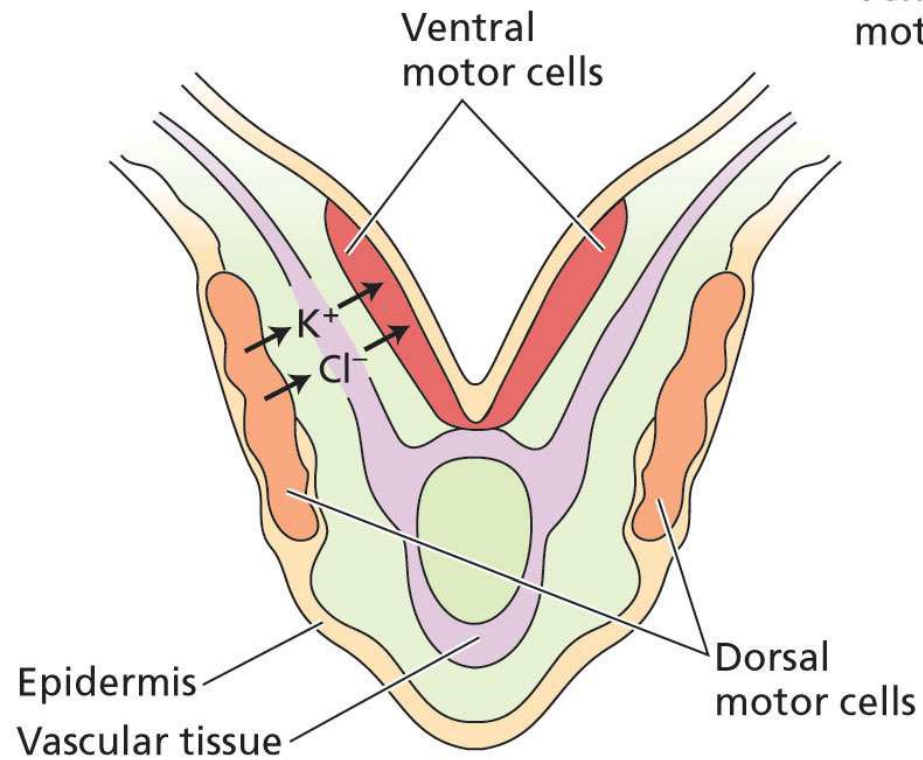
ritmi circadiani

processi con fasi a bassa ed alta attività

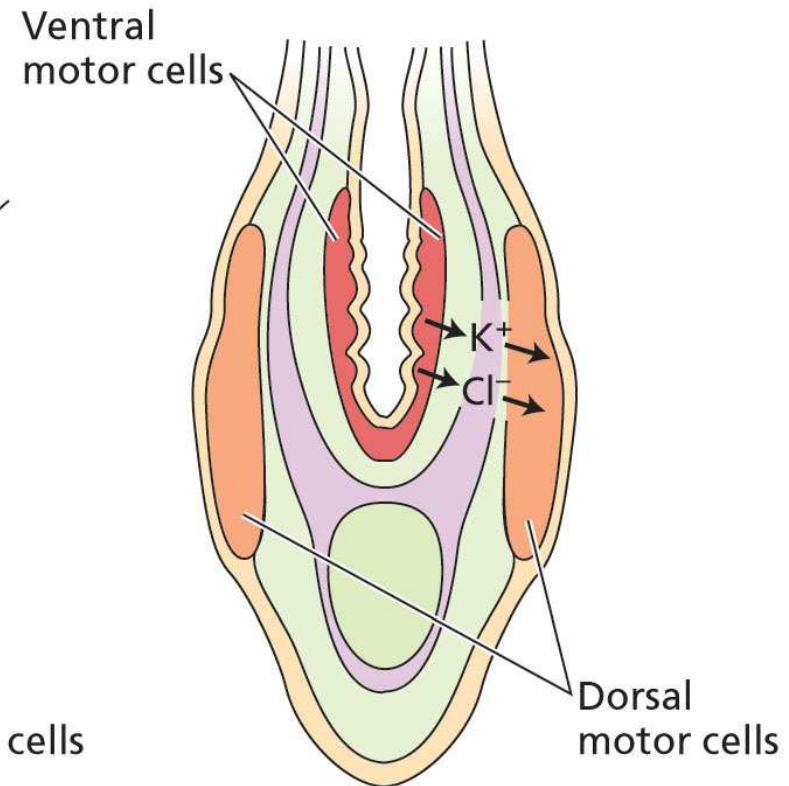




(A) Open



(B) Closed



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 17.14 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

**la luce regola
questo processo**

luce blu

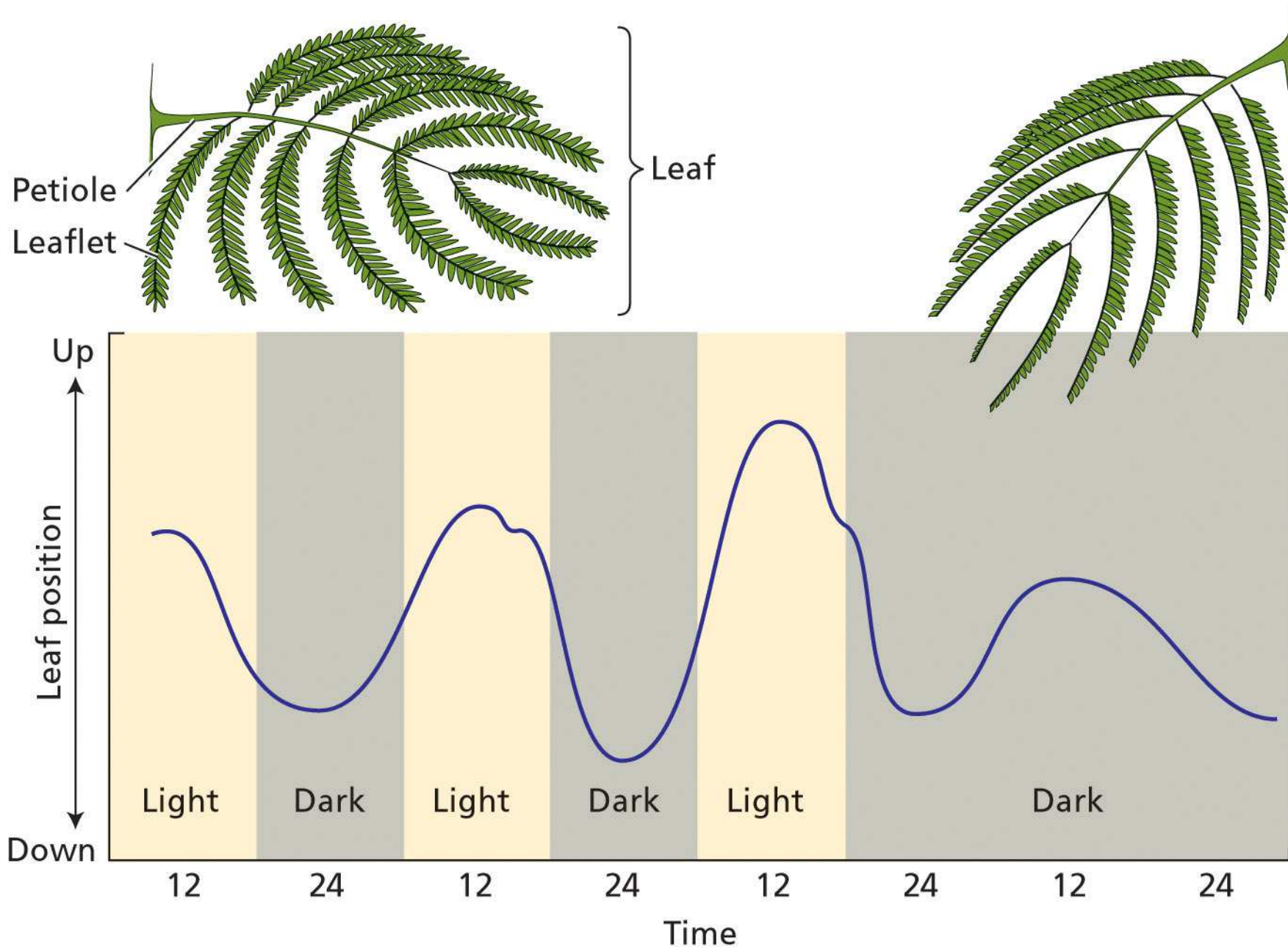


**stimola
apertura**

**luce rossa +
buio**



**stimola
chiusura**





espressione genica e ritmi circadiani

LHCB

mRNA



giorno



notte

FR prima del
buio



livelli mRNA

FR+R prima del
buio

=

livelli mRNA

FOTOPERIODISMO

**il cambiamento della lunghezza del giorno può determinare
l'inizio di un determinato processo**

inizio fioritura

sviluppo fiori

riproduzione asessuale

formazione organi di riserva

dormienza

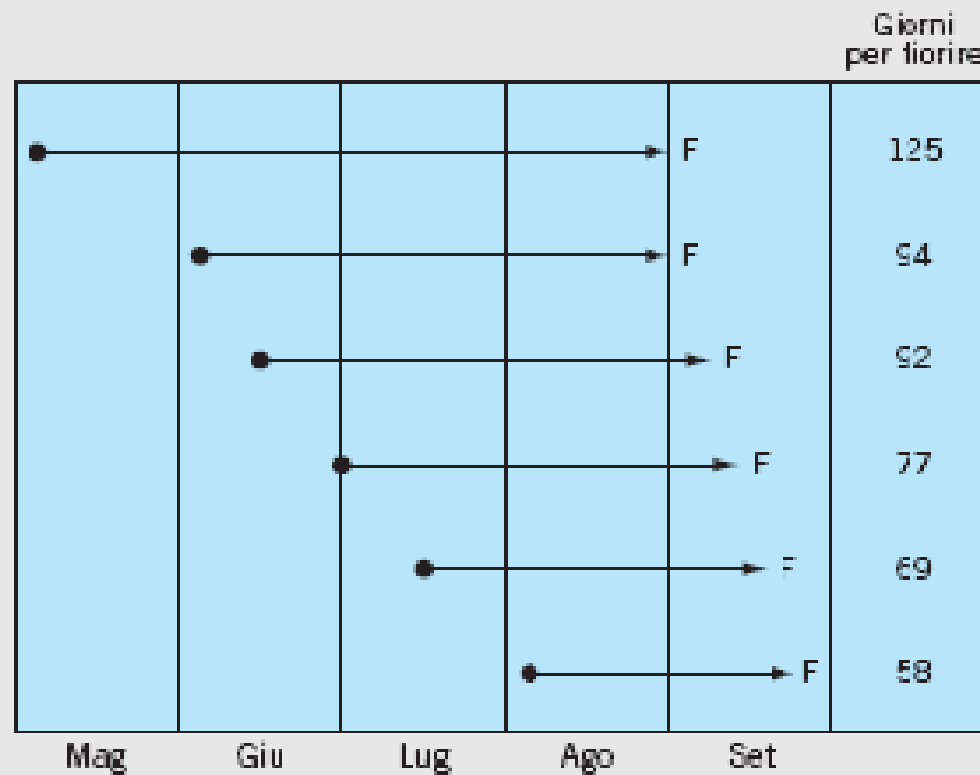


FIGURA 19.1 Piante di soia (*Glycine max*) seminate in diversi momenti lungo un periodo di tre mesi fioriscono tutte in settembre entro tre settimane.

FIORITURA

piante brevidiurne

la fioritura avviene durante i giorni brevi

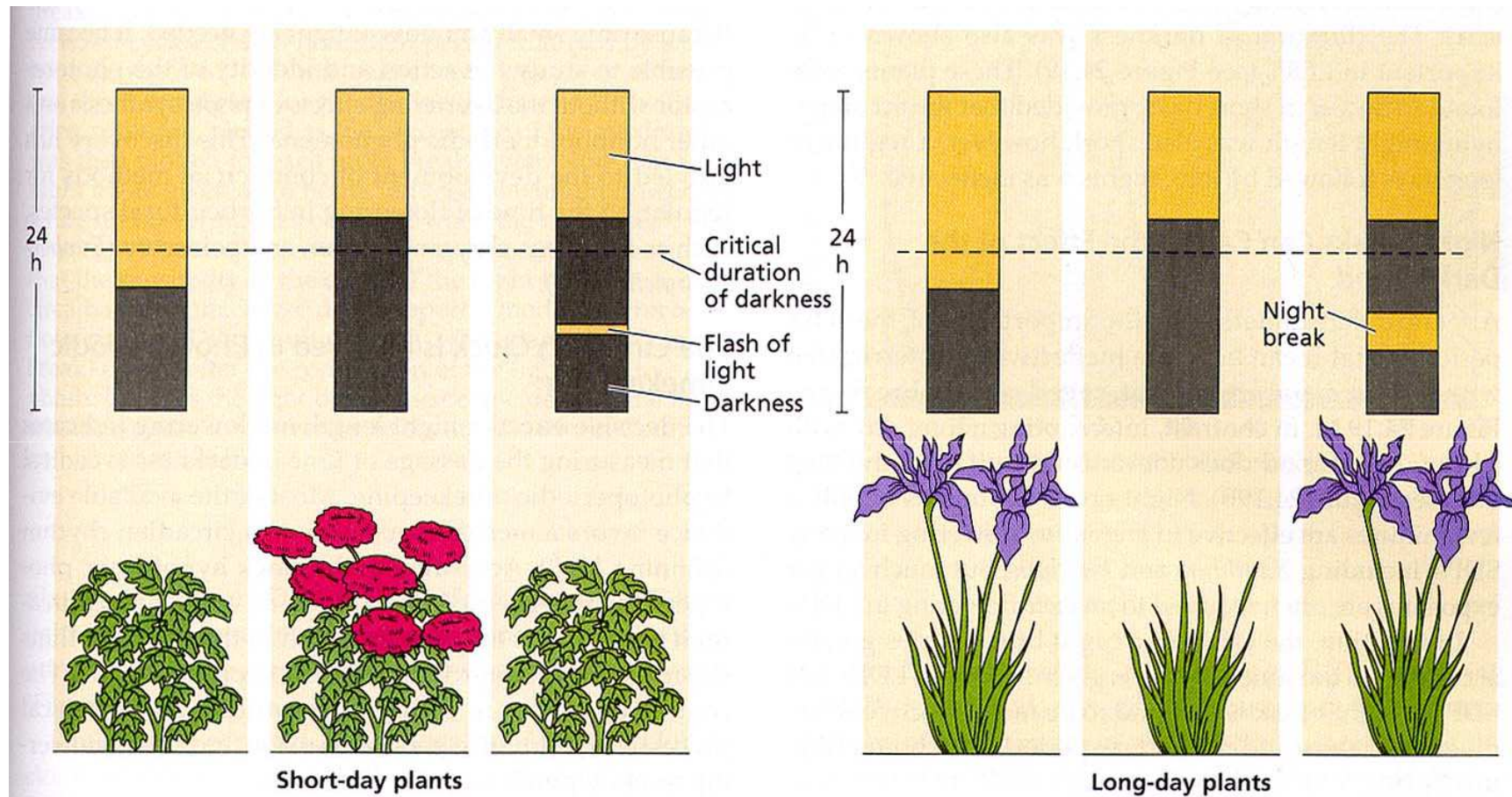
piante longidiurne

la fioritura avviene durante i giorni lunghi

piante intermediodiurne

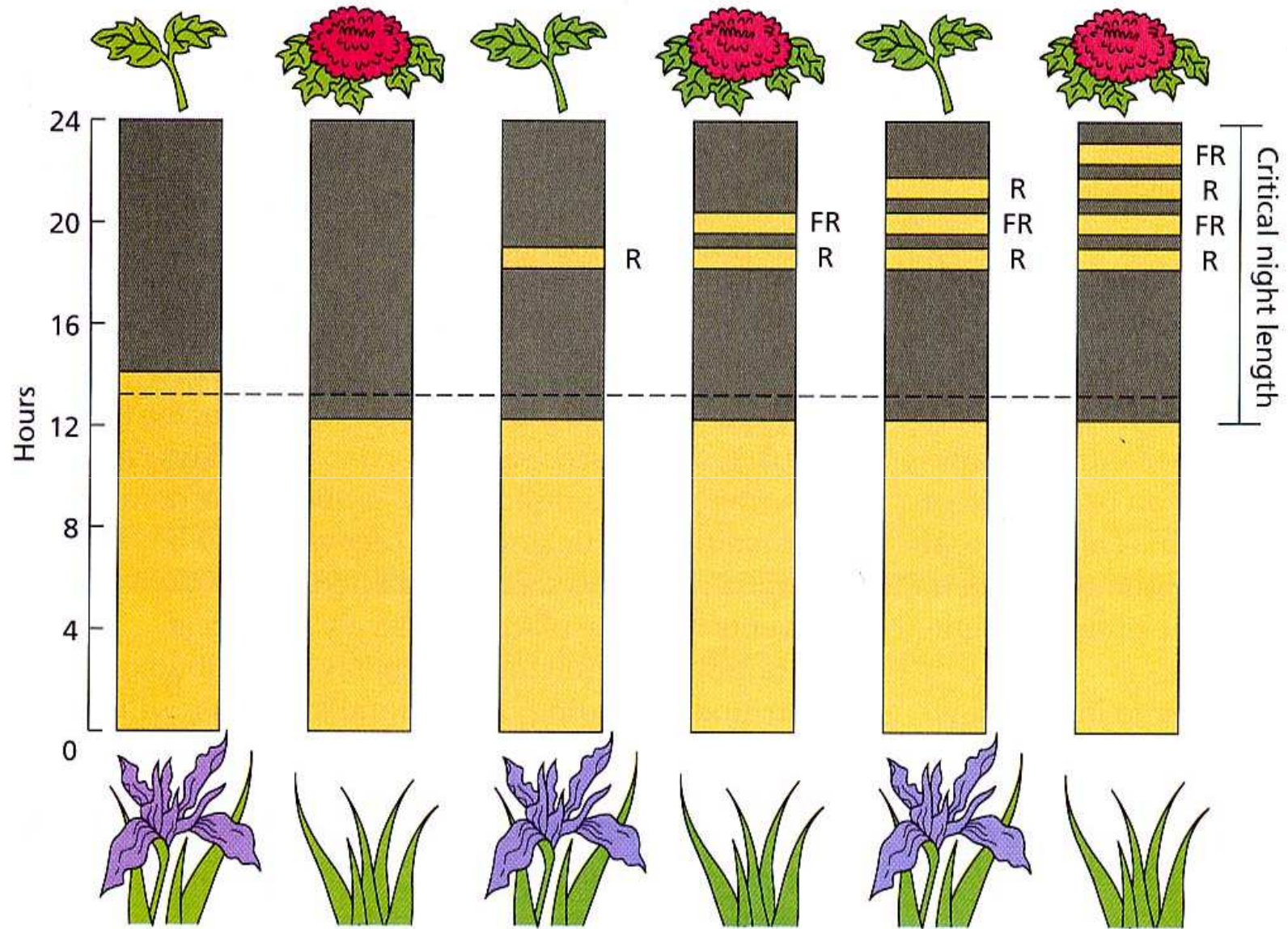
**la fioritura avviene tra limiti precisi di
lunghezza del giorno e della notte**

la pianta misura la durata della notte



il processo è controllato dal fitocromo

Long-day (short-night) plant



funzioni fitocromo B



wt



hy3

mutanti *hy* di Arabidopsis

- cromoforo

-phy (*hy3*)

PHYB mutato

-mRNA
-proteina

le altre forme del fitocromo non sono in grado di prevenire l'accorciamento dell'ipocotile in risposta alla luce bianca

hy3 (phyB)

mancata riduzione allungamento ipocotile

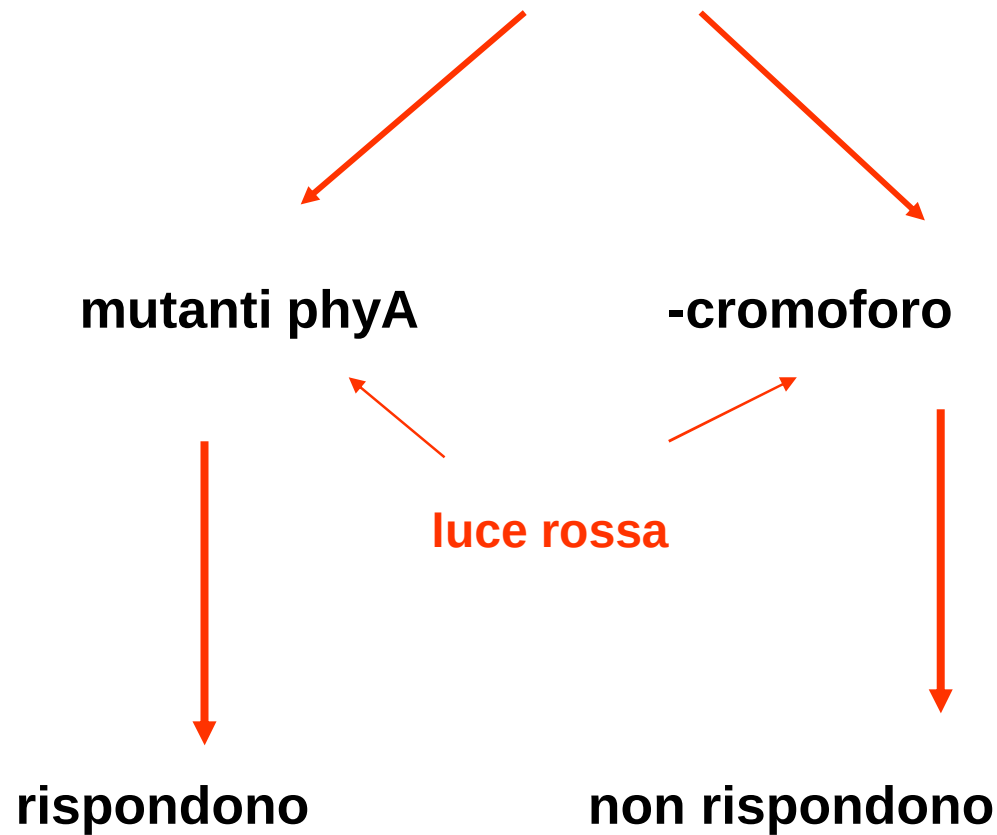
ridotti livelli clorofilla

ridotti livelli mRNA proteine sviluppo cloroplasti

germinazione: non rispondono a LF

identificazione mutanti phyA

screening per la capacità di rispondere a luce FR



mutanti phyA

normale risposta a luce bianca

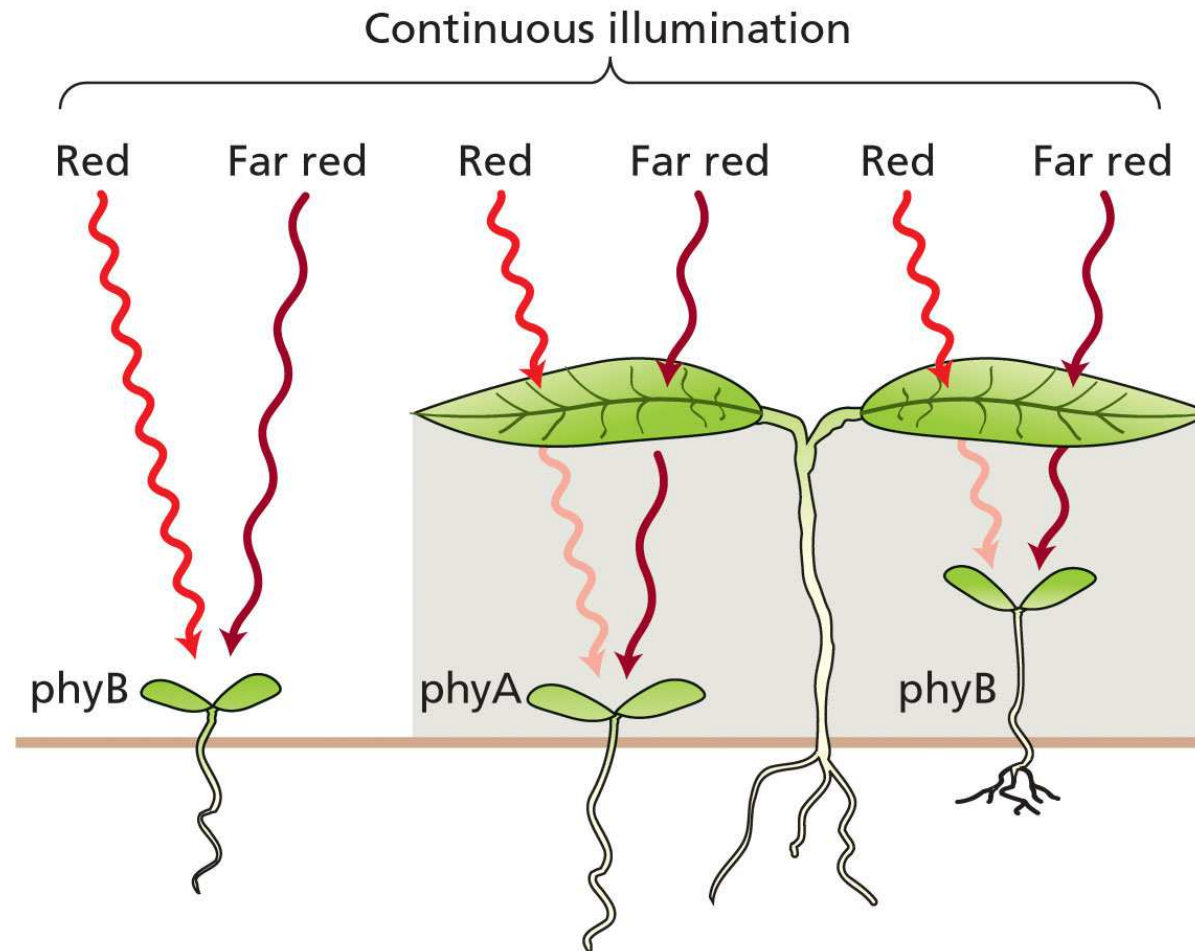
alterata risposta a luce FR



wt

mutante phyA

(B)



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 17.15 (Part 2) © 2002 Sinauer Associates, Inc.

**il phyA ha un ruolo limitato nella
fotomorfogenesi
(de-eziolatura)**

funzione phyC, phyD e phyE

singole mutazioni nei geni PHYC, PHYD E PHYE non determinano la comparsa di un fenotipo alterato

fotomorfogenesi alterata è presente in doppi/tripli mutanti in cui ci sia una mutazione a livello dei geni PHYA o PHYB

i geni PHYC, PHYD E PHYE hanno funzioni ridondanti e sovrapposte rispetto a PHYA e PHYB

RELAZIONI STRUTTURA-FUNZIONE

**quale parte di phyA e di phyB determina la loro azione
in relazione alla luce R/FR?**



(phyAB)



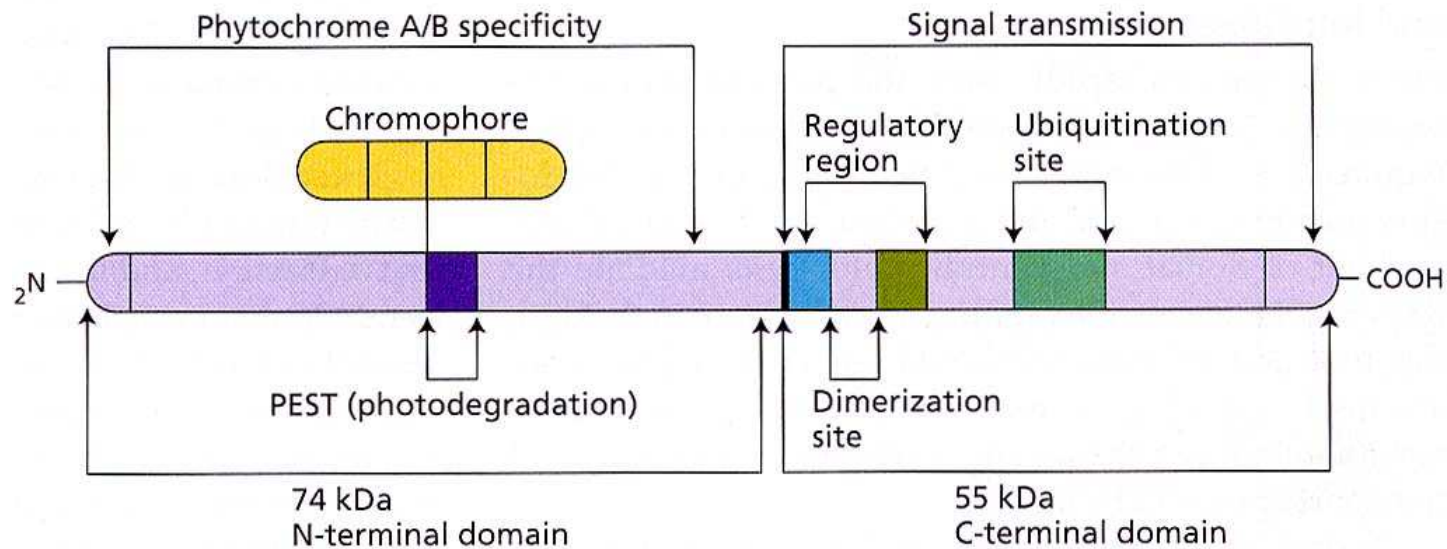
(phyBA)



risponde a luce FR



risponde a luce R



il phyAB è fotolabile



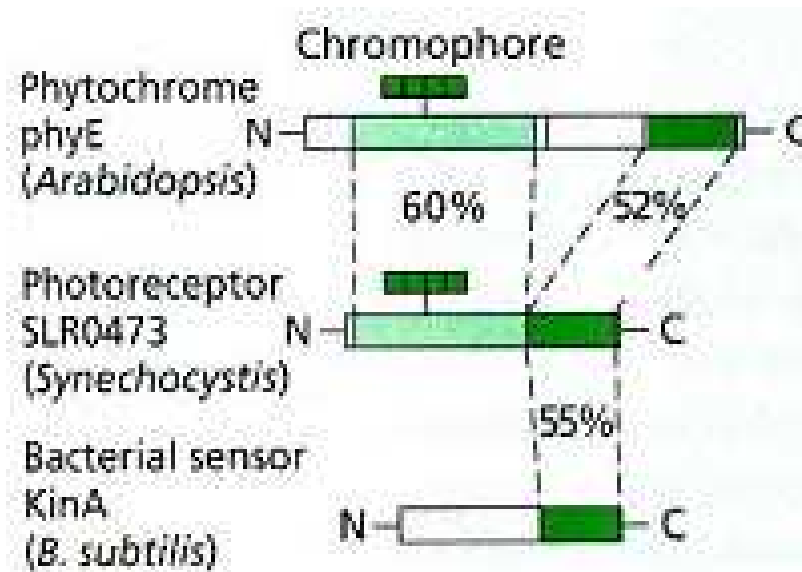
**N-term ha un ruolo nella
fotodegradazione
(PEST)**

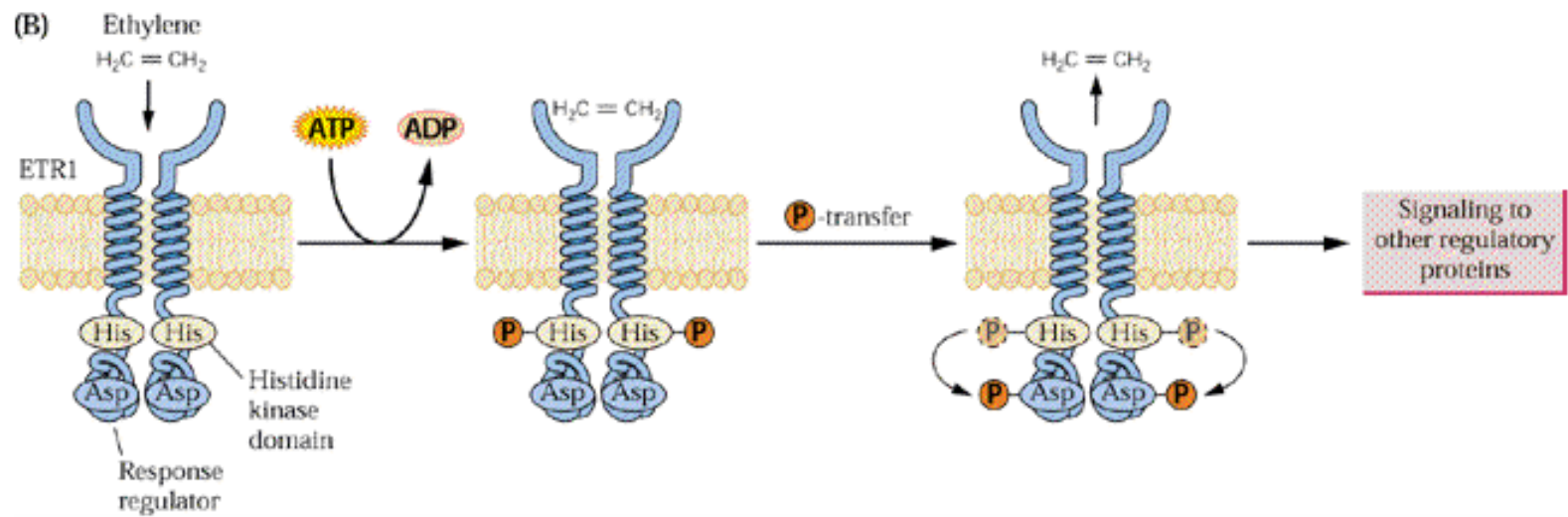
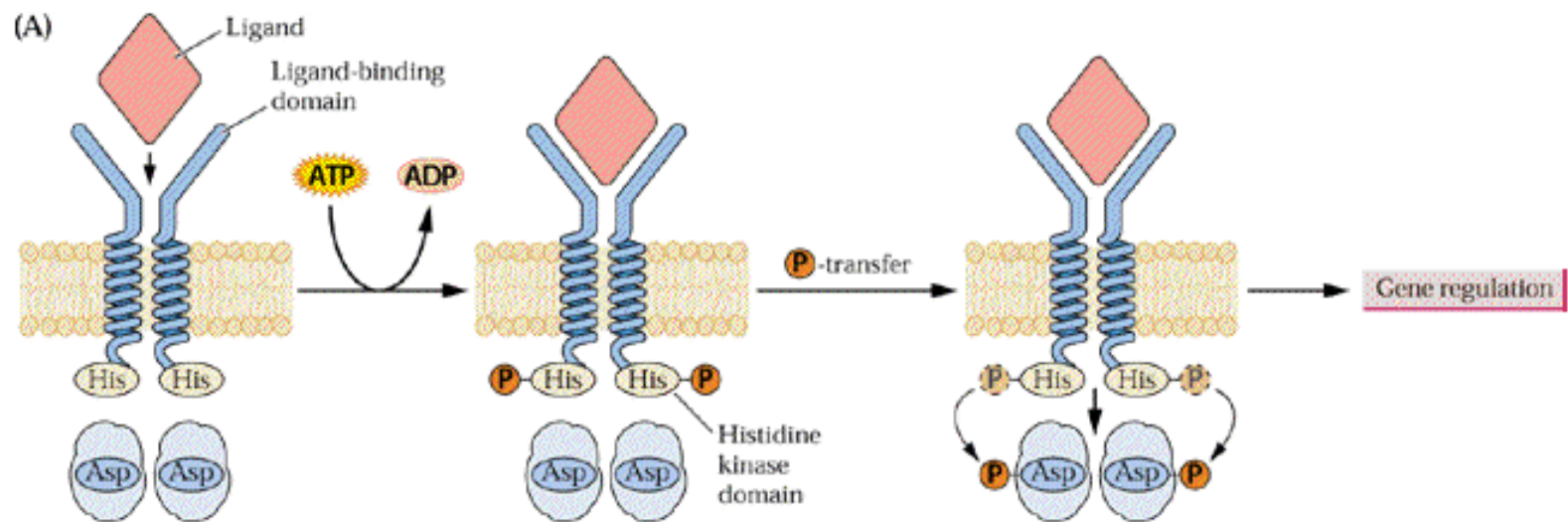
**N-term del phyA da solo
è stabile**

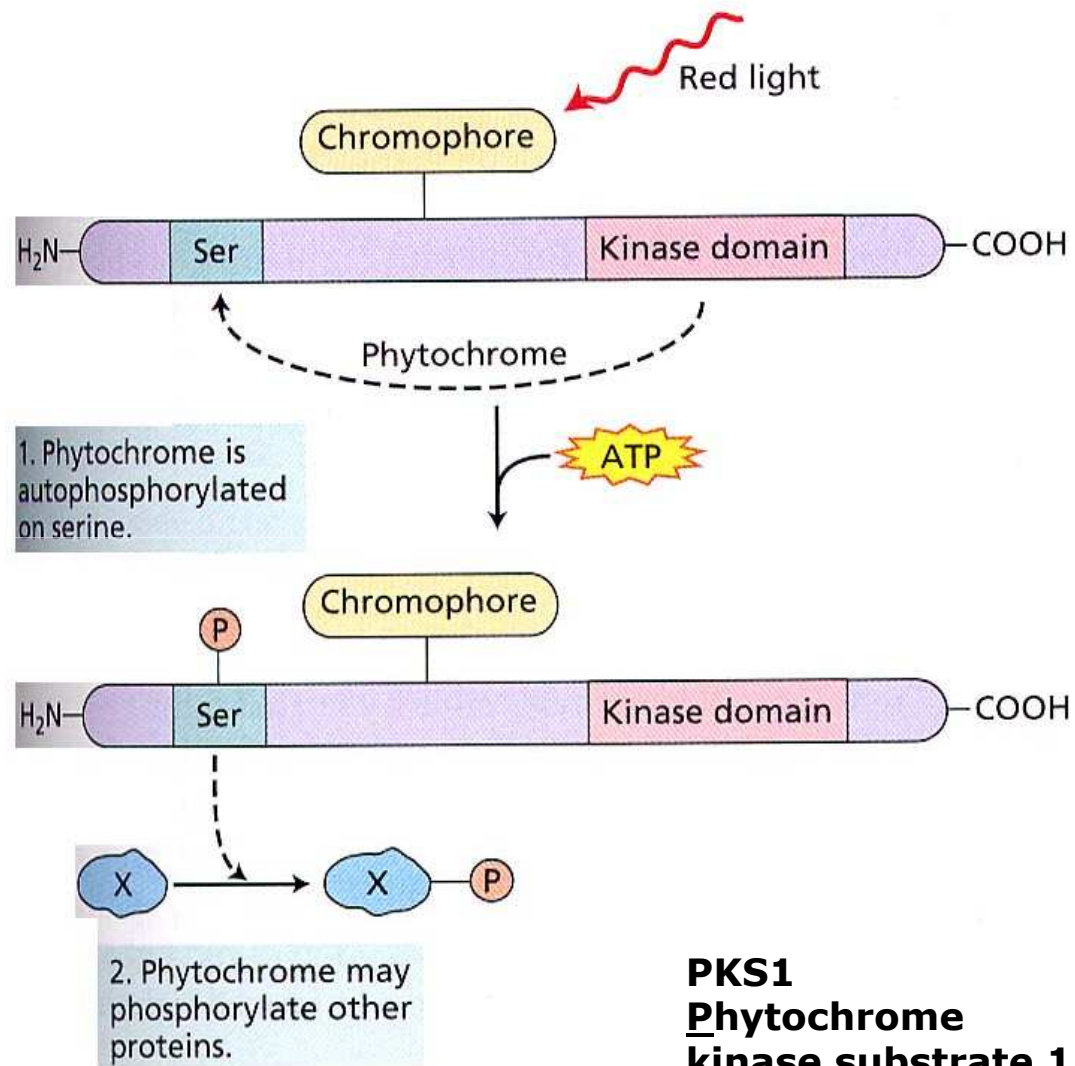


**il C-term del phyA è necessario per
la fotodegradazione**

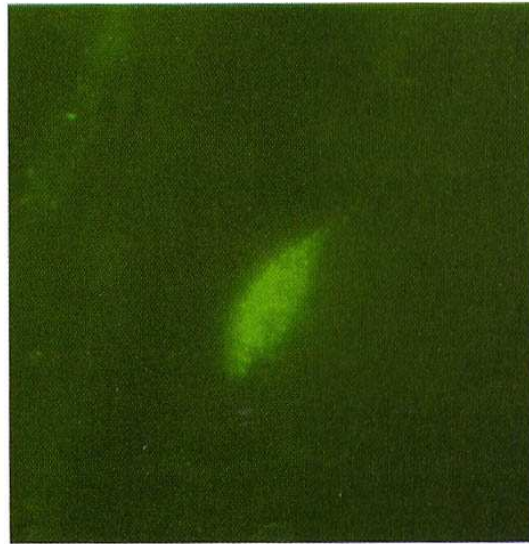
il fitocromo è omologo alle istidine chinasi batteriche





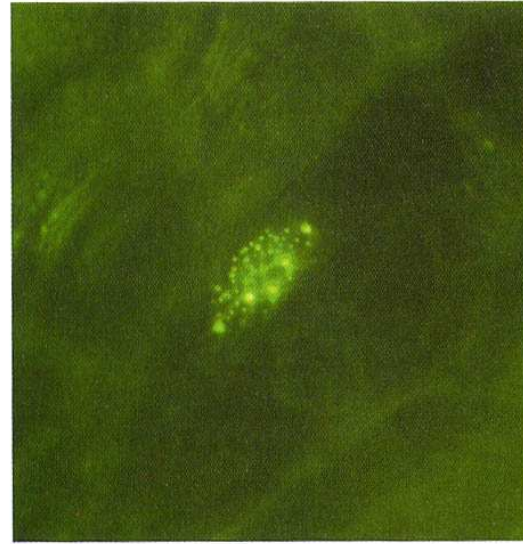


Pr + Pfr



phyA-GFP

Pfr



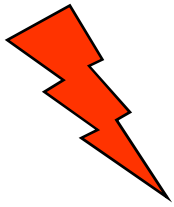
phyB-GFP

10 μ m

RISPOSTE INDOTTE DAL FITOCROMO

- EVENTI BIOCHIMICI**
- REGOLAZIONE ESPRESSIONE GENICA**

R



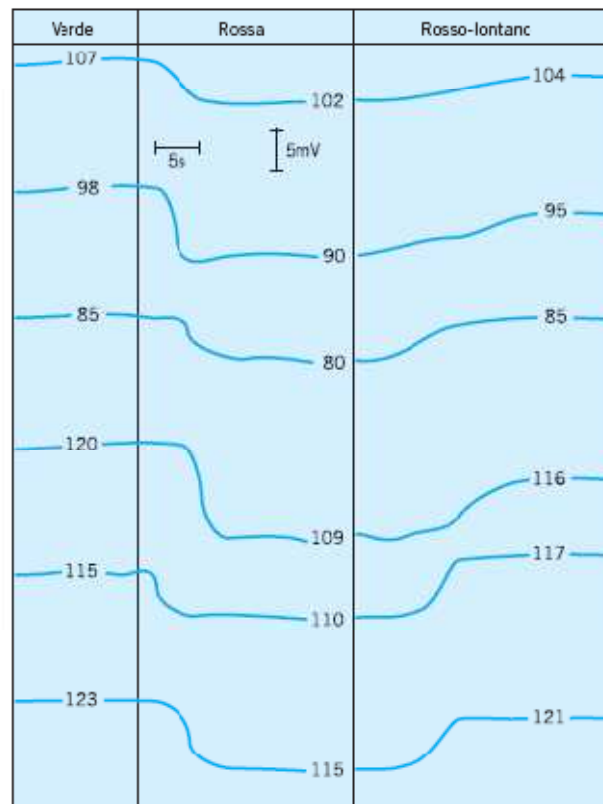
EVENTI BIOCHIMICI

induzione depolarizzazione membrana plasmatica

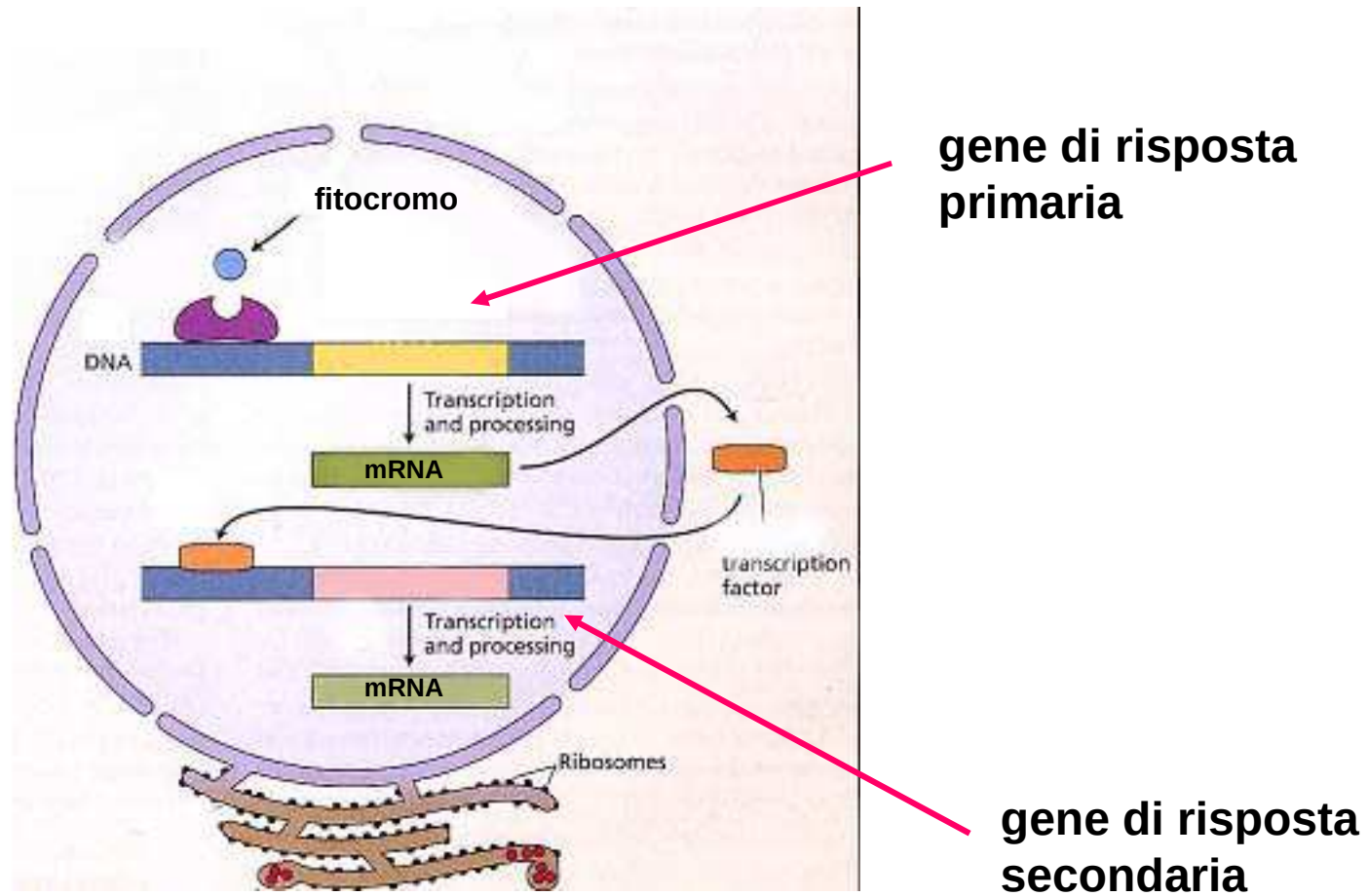
***Nitella* (1.7 s)**

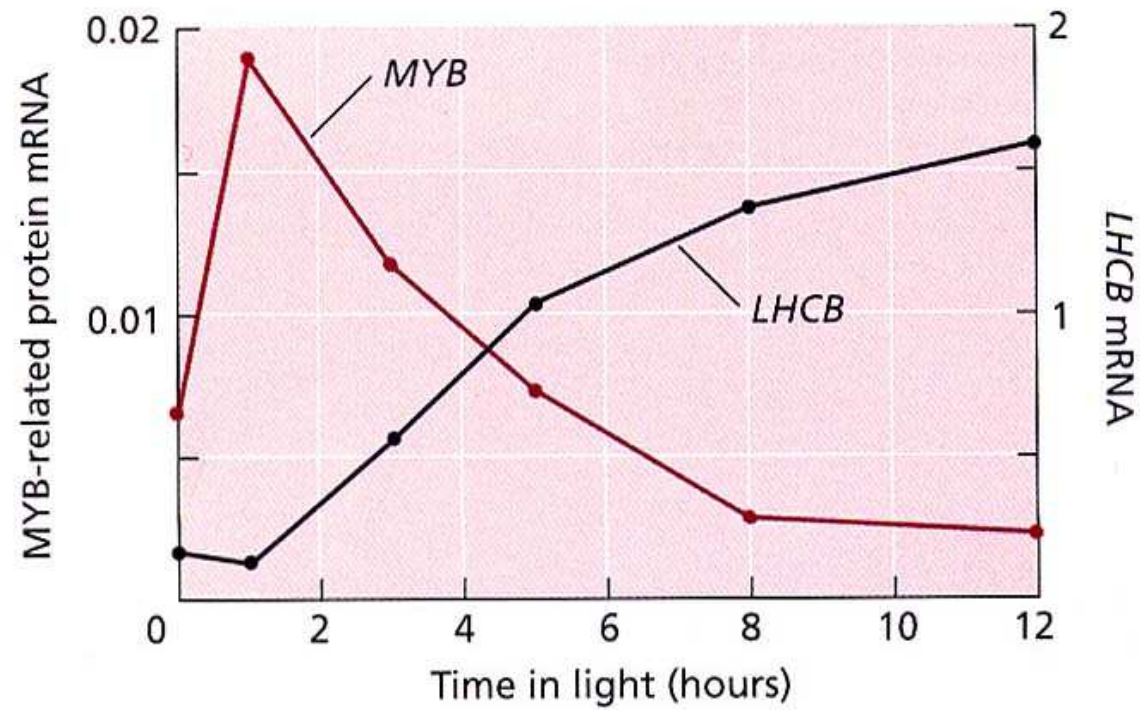
induzione iperpolarizzazione membrana plasmatica

***Avena* (4.5 s)**



REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA

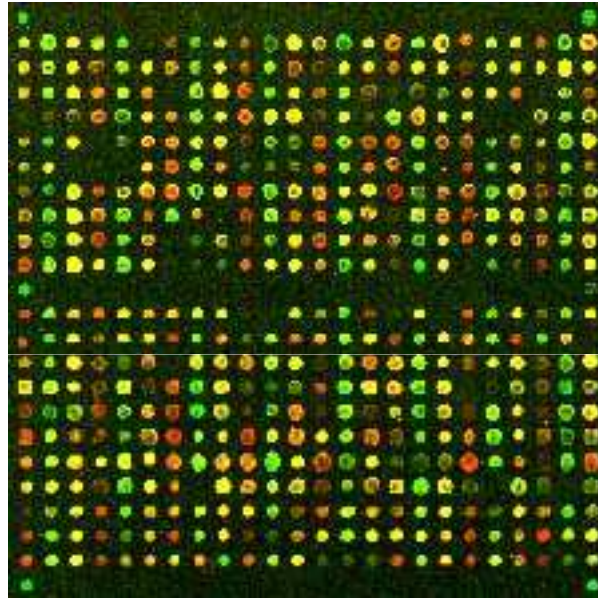




MYB → gene di risposta primaria

LHCB → gene di risposta secondaria

**molti geni indotti dal fitocromo sono
stati individuati**



**analisi microarray Arabidopsis su piante wild
type e mutanti null-phyA**

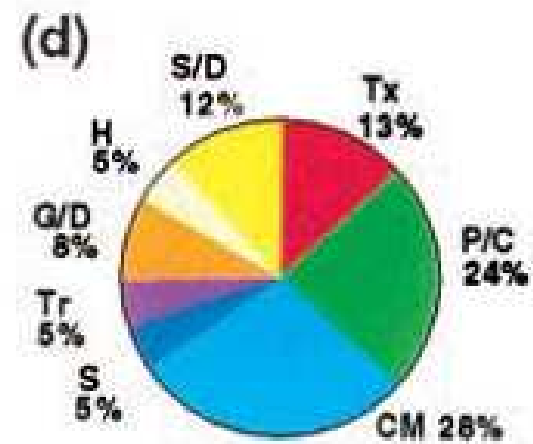
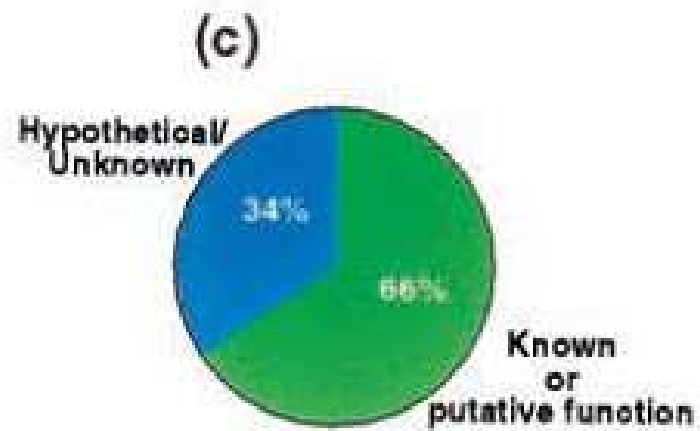
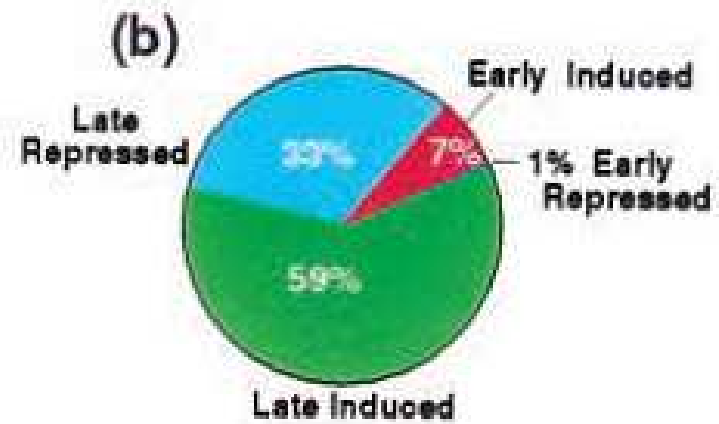
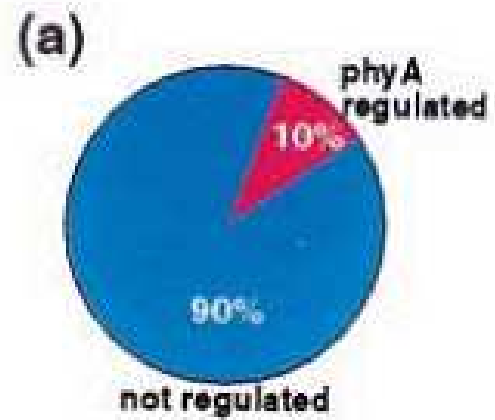


Table 1. Number of phyA-regulated genes categorized by functional class and temporal expression pattern

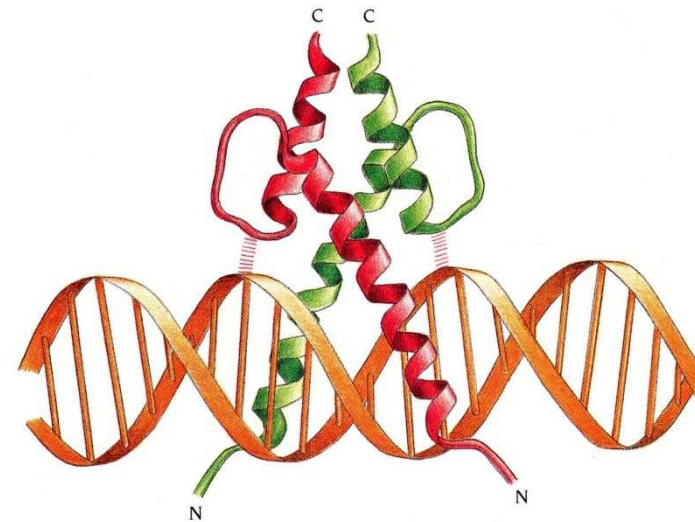
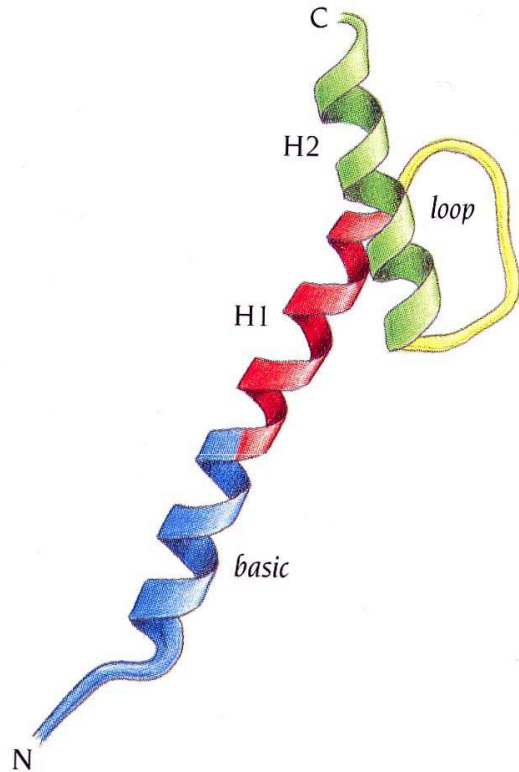
Functional classification	Early-response genes (1 h)		Late-response genes (3–24 h)		Total
	Induced	Repressed	Induced	Repressed	
Transcription (Tx)	18	3	20	29	70
Photosynthesis/Chloroplast (P/C)	7	0	115	4	126
Cellular Metabolism (CM)	5	0	93	54	152
Signaling (S)	4	0	13	8	25
Transporters (Tr)	6	0	11	8	25
Growth and Development (G/D)	0	2	18	25	45
Hormone-pathway related (H)	1	0	6	20	27
Stress/Defense (S/D)	2	0	32	30	64
Hypothetical/Unknown (H/U)	13	1	178	86	278
Totals	56	6	486	264	812

Genes represented on the microarray whose mRNA abundance was either increased (induced) or decreased (repressed) 2-fold or more under phyA control within 1 h (early) or between 3 and 24 h (late) of the start of FRc irradiation were scored and classified into the broad functional categories shown, according to established or putative function in the plant.

Cosa succede nel nucleo?

Nel nucleo il Pfr lega Pif3

PIF3 è un fattore di trascrizione di tipo bHLH



i fattori di trascrizione bHLH si legano alle G-BOX

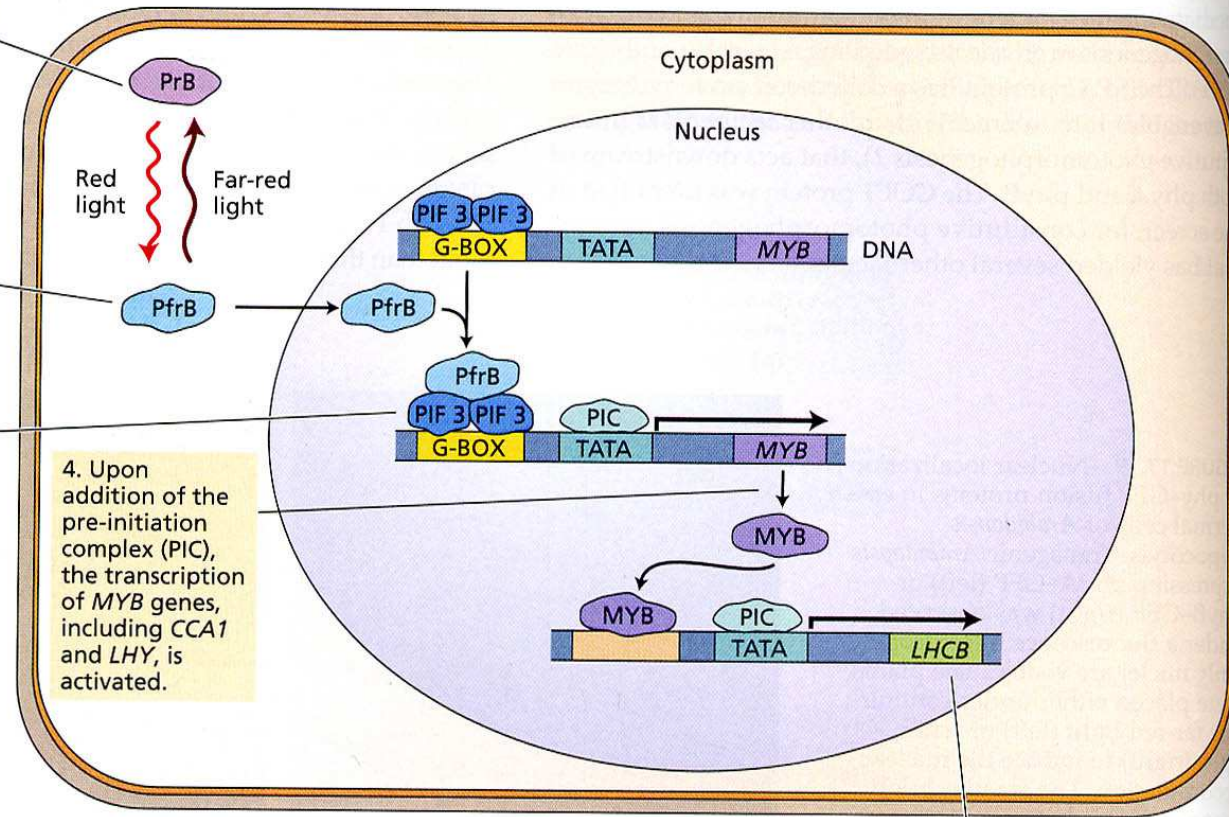
1. PhyB is synthesized in the cytoplasm in the inactive PrB form.

2. When converted to the active PfrB form by red light, it moves into the nucleus.

3. PfrB binds to a dimer of the transcription factor, PIF3, which is bound to the G-BOX elements of *MYB* gene promoter.

4. Upon addition of the pre-initiation complex (PIC), the transcription of *MYB* genes, including *CCA1* and *LHY*, is activated.

5. MYB transcription factors in turn activate the transcription of other genes, such as *LHCB*.



mutanti cop
(constitutive
photomorphogenesis)

mutanti det
(de-etiolated)

mancanza di risposte al buio



**cop
det**



**mutazioni
recessive**



**mutazioni *loss of function* di
proteine coinvolte nella
fotomorfogenesi**

**inattivazione regolatore
negativo**



**attivazione
processo**

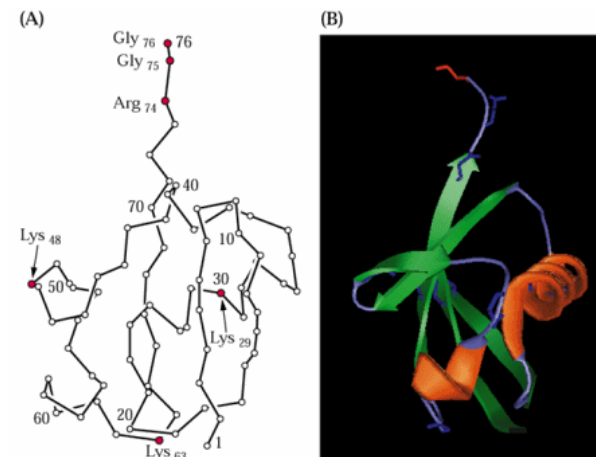
proteasoma 26S

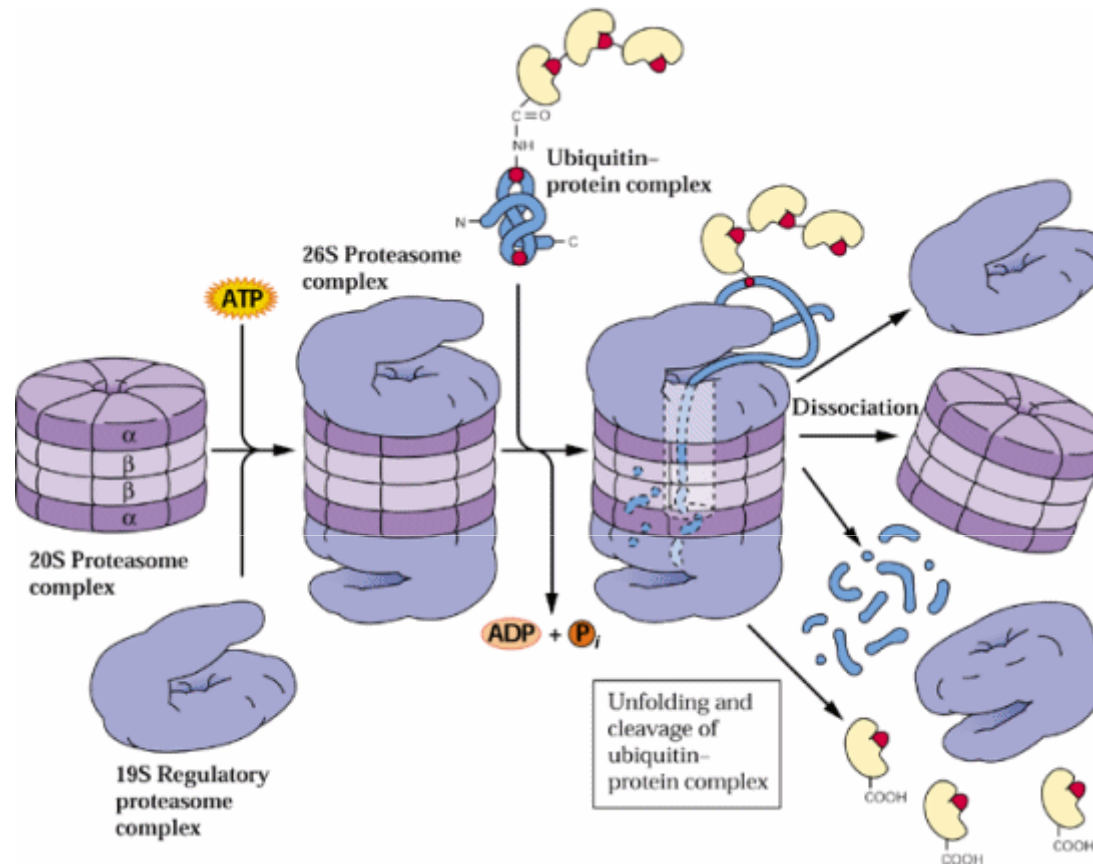
responsabile della degradazione della maggior parte delle
proteine nucleari e citoplasmatiche

1.5 MDa

100 geni coinvolti

le proteine destinate alla degradazione vengono inviate
verso il proteasoma mediante un meccanismo che
coinvolge l'ubiquitina



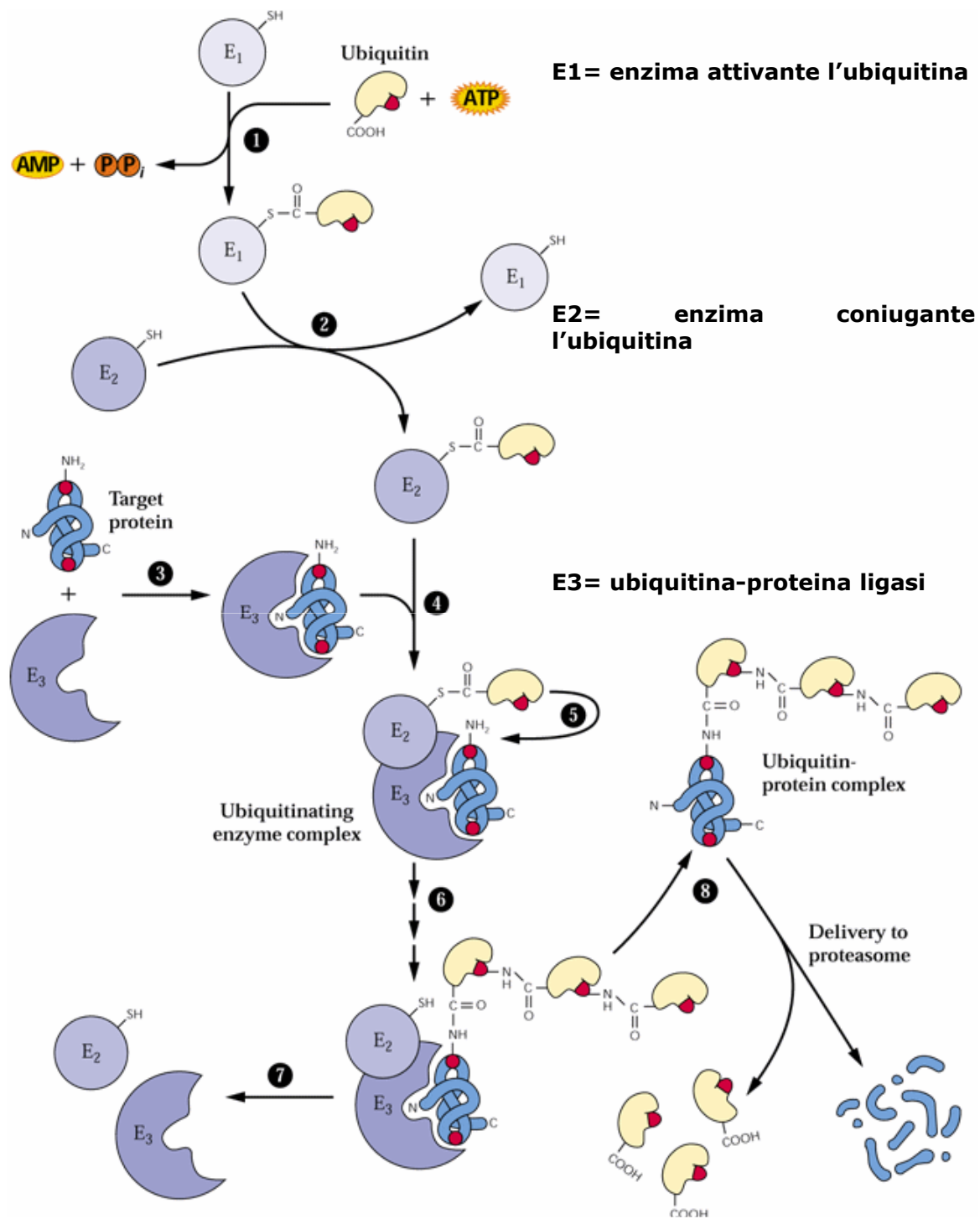


core 20 S

4 anelli impilati, ciascuno composto da 7 subunità

lid 19 S

regola l'accesso al core



11 mutanti con fotomorfogenesi costitutiva

cop1
det1
cop10



segnali localizzazione nucleare

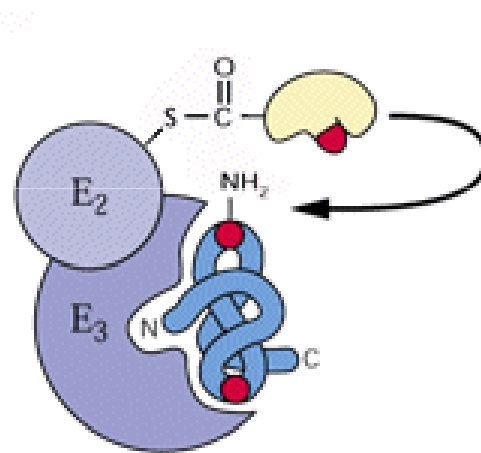
COP1



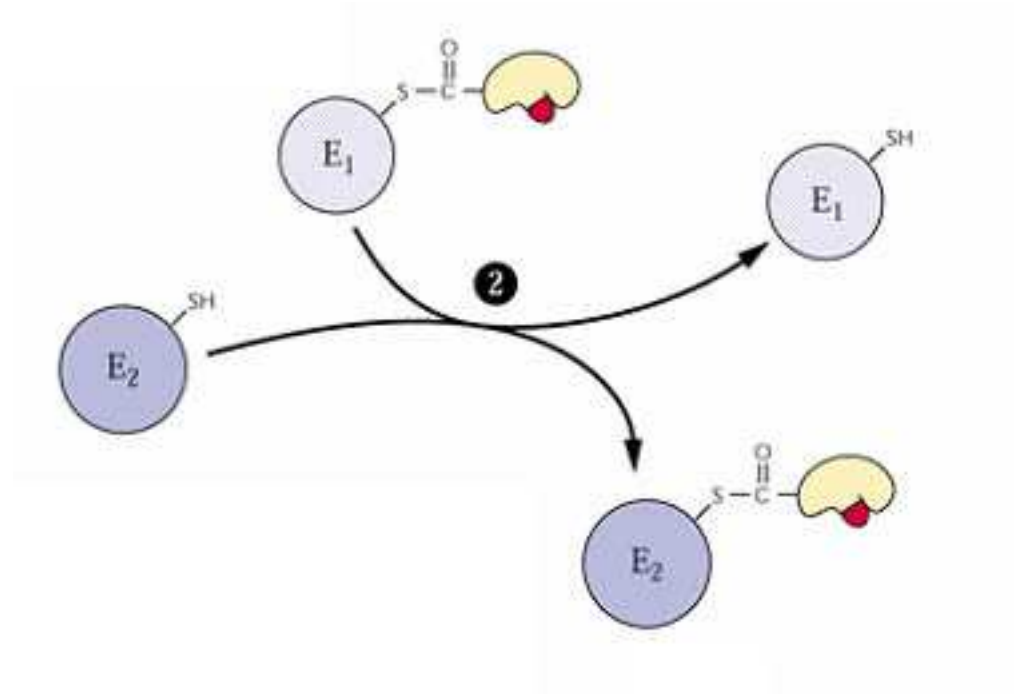
RING-finger zinc
binding domain

WD-40 repeat motif

COP1 = E3, ubiquitina-proteina ligasi



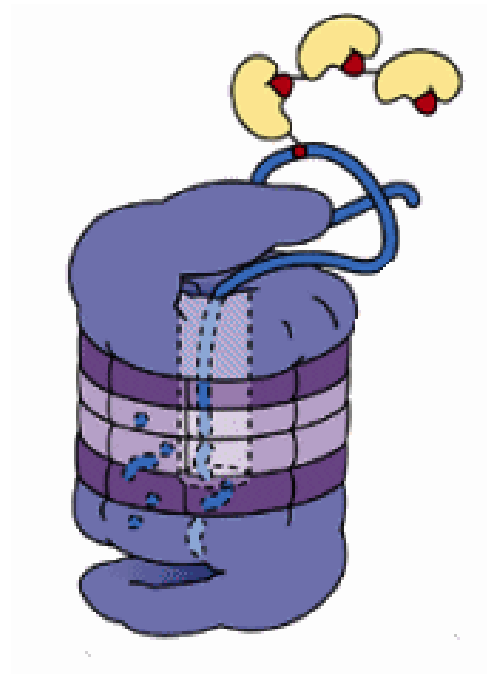
COP10 = E2, enzima coniugante l'ubiquitina



altri mutanti

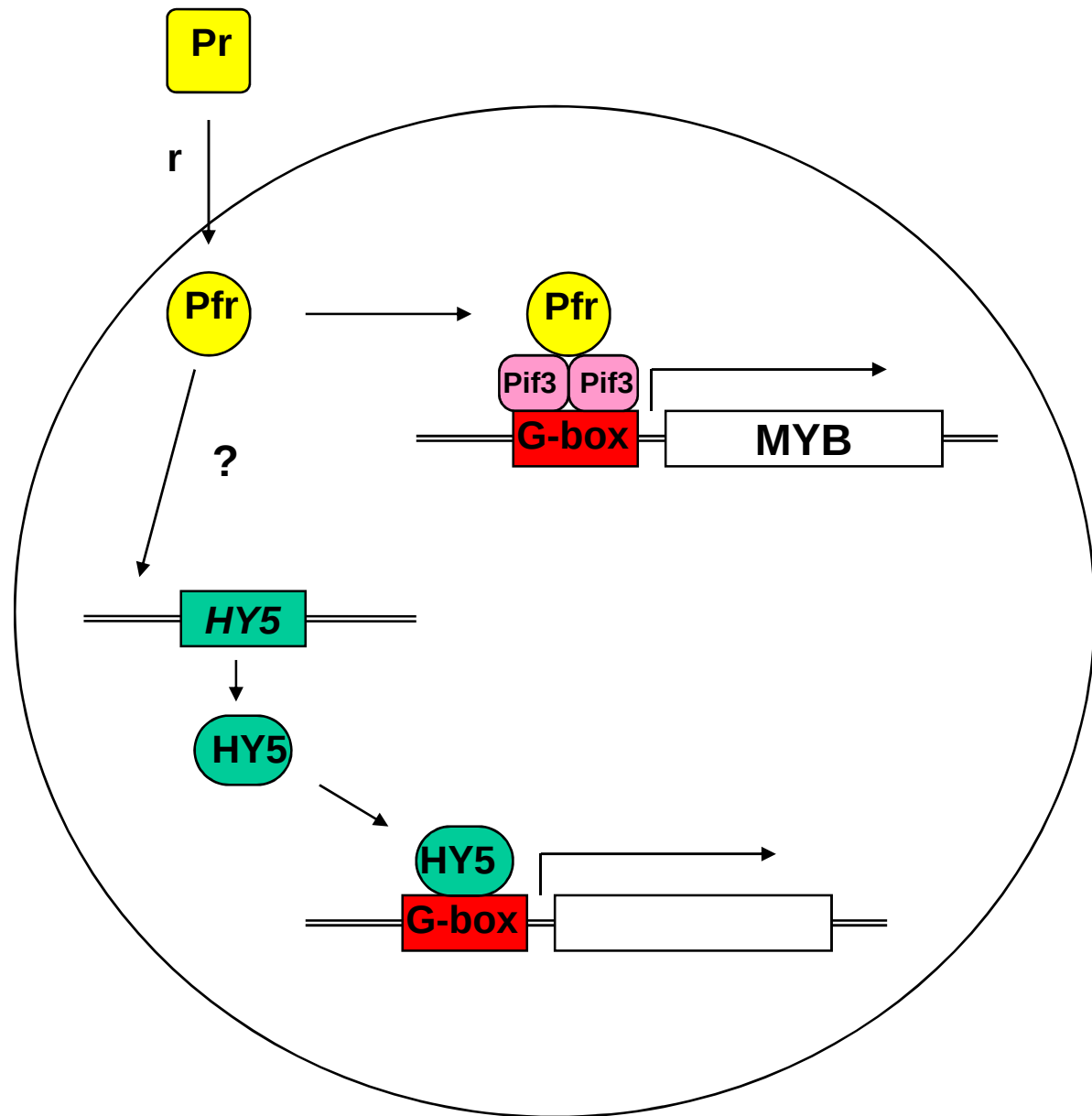


proteine con alta omologia componenti "lid" 19S

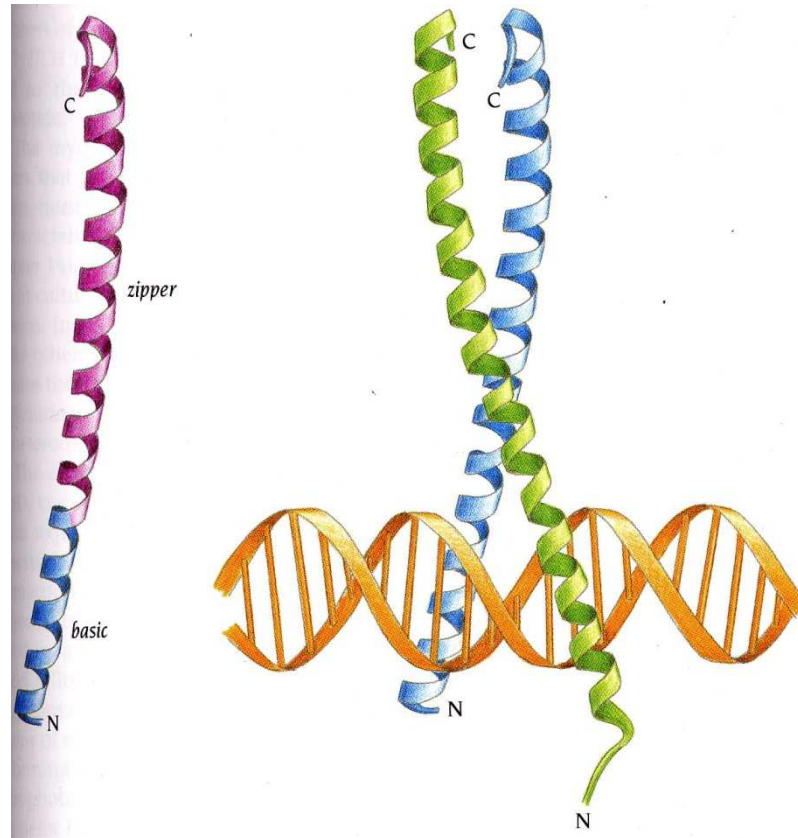


**signalosoma COP9
(CSN)**

come interviene la proteolisi nella regolazione dei
geni indotti dalla luce?



**hy5 è un fattore di trascrizione tipo
bZIP**



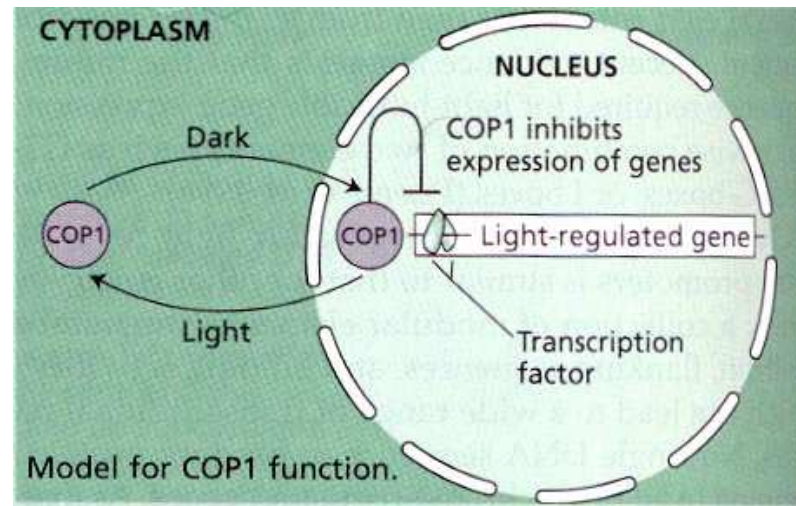
L'espressione di hy5 è costitutiva

tuttavia...

bassi livelli al buio

alti livelli alla luce

localizzazione COP1



cop1 lega hy5

