

La fotosintesi

I.1. Generalità

Questo capitolo illustra e sintetizza i principi ed i principali meccanismi del processo fotosintetico. Le informazioni contenute provengono dai più importanti testi di fisiologia vegetale disponibili sul mercato, a cui rimandiamo per ulteriori approfondimenti (Hall e Rao, 1999; Lawlor, 2001; Taiz e Zeiger, 2009; Hopkins e Hüner, 2008, 2009).

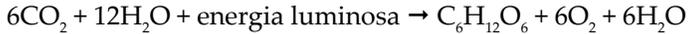
La fotosintesi è il più importante processo bioenergetico che si genera sul nostro pianeta, e permette l'esistenza della vita e della biosfera. Gli organismi fotosintetici sono in grado di sfruttare l'energia luminosa per produrre composti organici, utilizzando una varietà di substrati come donatori e come accettori di elettroni. Negli organismi aerobici il donatore e l'accettore di elettroni sono, rispettivamente, l'acqua (H_2O) e l'anidride carbonica (CO_2), mentre i prodotti finali della fotosintesi sono l'ossigeno (O_2), l'acqua e i carboidrati. Questo tipo di fotosintesi avviene nelle piante, nelle alghe, nei licheni e in alcuni gruppi di batteri, fra cui i cianobatteri.

Nelle piante l'apparato fotosintetico è situato all'interno dei cloroplasti, e il processo fotosintetico viene svolto nei tilacoidi e nello stroma. La cattura della luce, e tutti gli eventi connessi al trasporto degli elettroni, avvengono nella membrana e nel lumen dei tilacoidi (*fase luminosa*), mentre il ciclo di Calvin-Benson e la conseguente riduzione del carbonio con formazione di carboidrati (detta anche fase delle reazioni enzimatiche, o *fase oscura*) avviene nello stroma. La Fig. 1.1 mostra uno schema riassuntivo delle reazioni generali della fotosintesi. La fase luminosa è strettamente dipendente dall'esposizione alla luce, il Ciclo di Calvin non è dipendente dalla luce, anche se questa è comunque necessaria per il rifornimento di ATP e NADPH.

La fotosintesi è un processo molto complesso che si svolge attraverso numerosi passaggi, durante i quali l'energia luminosa dei fotoni assorbiti

14 Misurare la vitalità delle piante per mezzo della fluorescenza della clorofilla

viene convertita nell'energia chimica contenuta nei composti organici. In termini generali, la fotosintesi può essere descritta per mezzo della seguente reazione semplificata:



Il processo fotosintetico consiste nell'assorbimento, trasformazione e immagazzinamento dell'energia luminosa, ed è costituito da quattro fasi principali:

1. l'assorbimento della luce da parte dei pigmenti antenna e trasferimento dell'energia verso i centri di reazione;
2. il trasferimento dell'energia (sotto forma di elettroni e protoni) dai centri di reazione eccitati alla catena di trasporto, attraverso la riduzione del plastochinone (PQ), che costituisce l'accettore primario;
3. la trasformazione dell'energia degli elettroni eccitati e dei protoni nel corso di reazioni di ossidoriduzione (redox) e produzione di ATP e NADPH;
4. la sintesi e la dislocazione dei prodotti finali della fotosintesi.

1.2. Struttura dell'apparato fotosintetico

I cloroplasti (Fig. 1.2) sono organuli di forma lenticolare che, nelle piante, si trovano nelle cellule delle foglie e di tutte le altre parti verdi come, per esempio, i giovani fusti. I cloroplasti sono delimitati da una doppia membrana lipoproteica. Essi contengono una sostanza amorfa all'interno (stroma), nella quale si trovano i tilacoidi, costituiti da strutture lenticolari (i grana) e raggruppati in pile. I tilacoidi sono circondati da membrane semplici, nelle quali sono immersi i pigmenti fotosintetici (in particolare le clorofille), e le proteine che formano i adibiti alla cattura della luce (complessi chiamati antenne) nei fotosistemi (fotosistema 2 - PSII, e fotosistema 1 - PSI). Sono comprese anche le proteine delle catene di trasporto degli elettroni, fra cui il complesso del citocromo (cyt b_6f), ed il complesso adibito alla produzione di ATP (ATP-sintasi). Sulla membrana dei tilacoidi si svolge la fase luminosa della fotosintesi, mentre il ciclo di Calvin-Benson avviene nello stroma. I cloroplasti contengono DNA e RNA.

Le proteine immerse nella membrana dei tilacoidi sono di natura idrofoba o anfotera (contenente cioè sia la parte idrofila che quella idrofoba), mentre le proteine che si trovano sulla superficie della membrana (come la plastocianina e la ferredossina) sono idrofile. I lipidi costituiscono il 35 – 40% delle membrane, e i più diffusi sono i galattolipidi, che rappresentano circa il 75% di tutti i lipidi presenti. Sono inoltre presenti i fosfolipidi, che costituiscono il doppio strato della membrana, i solfolipidi, i plastochinoni, l' α -tocoferolo e la vitamina K. Le membrane dei tilacoidi contengono

Figura 1.1 – Le due fasi della fotosintesi e la loro interazione all'interno del cloroplasto. Gli eventi luce-dipendenti (fase luminosa) si verificano nella membrana dei tilacoidi e portano alla produzione di NADPH e ATP, utilizzati nel ciclo di Calvin, in cui si verifica l'organizzazione della CO₂ con la produzione di zuccheri (composti organici) (da <http://www.cartage.org.lb/en/themes/sciences/BotanicalSciences/Photosynthesis/Photosynthesis/psoverview.gif>. Ridisegnato da Janusz Golik)

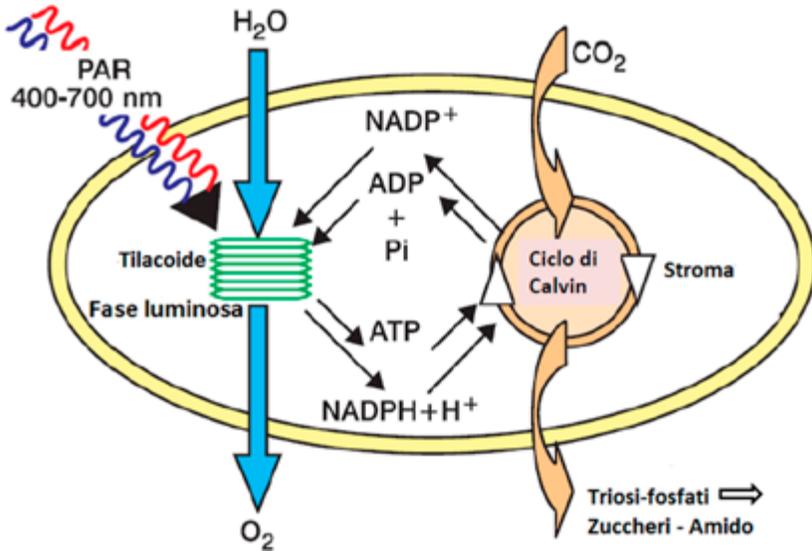
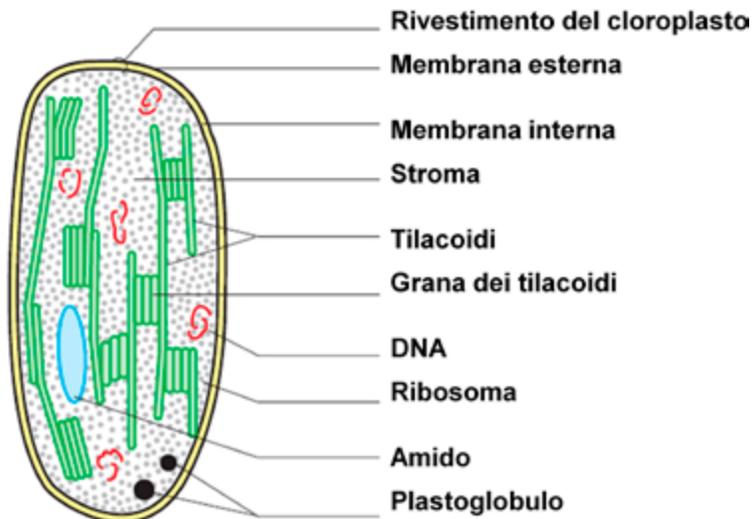


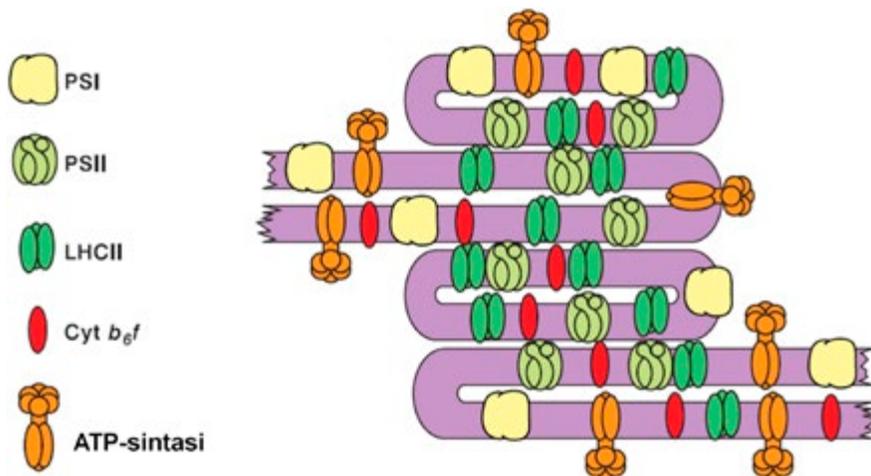
Figura 1.2 – Struttura del cloroplasto nelle piante superiori (da: <http://www.plantandsoil.unl.edu>. Ridisegnato da Janusz Golik)



inoltre acidi grassi polinsaturi e tracce di steroli che conferiscono alla membrana proprietà liquide, in modo da facilitare il movimento laterale delle proteine lungo la membrana stessa.

La fase luminosa della fotosintesi coinvolge i due fotosistemi PSI e PSII. Essi costituiscono la struttura principale dell'apparato fotosintetico, assieme al complesso del citocromo ed i trasportatori di elettroni. Tutte queste strutture si trovano nella membrana dei tilacoidi (Fig. 1.3). Il complesso antenna del PSII, assieme alle altre strutture adibite alla cattura della luce (chiamate LHCII - *Light Harvesting Complex of PSII*) si trova nella membrana dei tilacoidi non in contatto con lo stroma. Il PSI ed il complesso adibito alla produzione di ATP (ATP-sintasi) si trovano, invece, sulle membrane tilacoidali in contatto con lo stroma. Il complesso del citocromo (cyt b_6f) si trova sulle membrane sia in contatto che non in contatto con lo stroma. Infine, associato al PSII, è presente il sistema di fotolisi dell'acqua (OEC - *Oxygen Evolving Complex*).

Figura 1.3 – Distribuzione dei complessi proteici nelle membrane dei tilacoidi (da Steffen, 2003. Ridisegnato da Janusz Golik). PSI e ATP-sintasi sono distribuiti nella membrana a contatto con lo stroma, mentre il PSII non è a contatto con lo stroma e il complesso cyt b_6f è in tutte le parti dei tilacoidi.



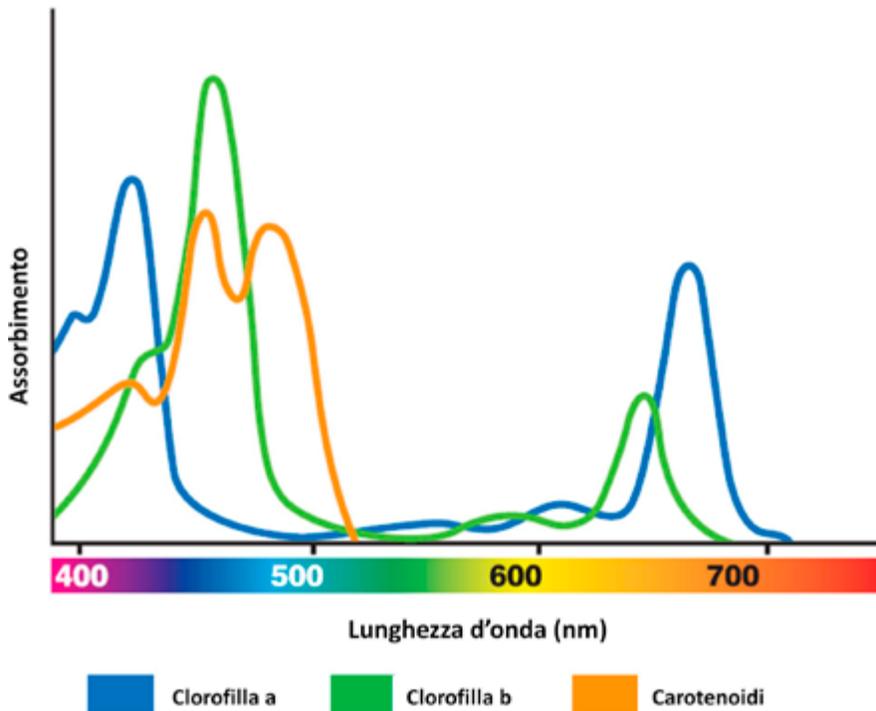
1.2.1. I pigmenti fotosintetici nelle piante superiori

I principali pigmenti fotosintetici, adibiti alla cattura della luce, sono rappresentati dalle clorofille, che conferiscono il colore verde alle foglie, e rappresentano circa il 4% del peso secco dei cloroplasti. Le piante verdi contengono due tipi di clorofilla: la clorofilla *a* (Chl_a), e la clorofilla *b* (Chl_b) (Fig. 1.4). Quest'ultima è circa 1/3 rispetto alla quantità di Chl_a .

18 Misurare la vitalità delle piante per mezzo della fluorescenza della clorofilla

Nelle alghe si possono trovare alcune varianti strutturali rispetto alla forma tipo della clorofilla. Queste varianti sono indicate con lettere consecutive dell'alfabeto. Ad esempio, la clorofilla *c* (Chl_c), e la clorofilla *d* (Chl_d) sono presenti nelle rodofite. Le differenze strutturali di questi pigmenti determinano le differenze nei loro spettri di assorbimento.

Figura 1.5 – Spettro di assorbimento dei principali pigmenti fotosintetici (da Szweykowska 1997. Ridisegnato da Janusz Golik)



Tutte le clorofille assorbono le radiazioni nella gamma di lunghezze d'onda 400 – 700 nm ed hanno due principali bande di assorbimento: la radiazione del blu (con maggiore energia) e la radiazione del rosso (con energia di livello inferiore).

Le soluzioni di clorofilla e solventi organici presentano massimi di assorbimento a circa 420 nm e 660 nm per la Chl_a e a 435 nm e 642 nm per la Chl_b (Fig. 1.5). Nei complessi pigmento-proteina, che si trovano nei cloroplasti, i massimi di assorbimento sono spostati verso lunghezze d'onde maggiori.

Oltre alle clorofille, nelle membrane dei tilacoidi sono inseriti altri pigmenti in grado di assorbire l'energia dei fotoni. Questi pigmenti sono i ca-

rotenoidi, presenti nelle piante superiori e nella maggior parte delle alghe, e le ficobiline che si trovano in alcuni gruppi di alghe e batteri.

I carotenoidi sono pigmenti di colore giallo-arancio e comprendono il carotene, il licopene e le xantofille. Questi pigmenti assorbono la radiazione solare a lunghezze d'onda diverse rispetto alla clorofilla: i carotenoidi assorbono la luce nel viola e nel blu. Agiscono sinergicamente con Chl_a e Chl_b per aumentare l'efficienza di assorbimento della luce (Fig. 1.6). Essi hanno tre massimi di assorbimento che si trovano, a seconda del tipo di carotenoide, a 420 – 425 nm, 440 – 450 nm ed a 470 – 480 nm.

Un'altra funzione importante dei carotenoidi è quella di proteggere i lipidi dei cloroplasti dalla fotossidazione, causata da alta intensità di radiazione luminosa. I carotenoidi possono catturare l'energia in eccesso dalle molecole di clorofilla eccitate impedendo la formazione di singoletti di ossigeno e di ROS (*Reactive Oxygen Species*). Differentemente dalla clorofilla, carotenoidi e ficobiline sono solubili in acqua.

1.2.2. I complessi antenna del PSII

L'assorbimento della radiazione fotosinteticamente attiva (PAR, *Photosynthetic Active Radiation*, lunghezze d'onda 400 – 700 nm) da parte dei pigmenti fotosintetici (clorofilla e carotenoidi) avviene tramite i complessi antenna dei fotosistemi, all'interno delle membrane tilacoidali (Fig. 1.6). Nei complessi antenna i pigmenti fotosintetici sono legati a proteine. I complessi antenna del PSII possono essere suddivisi in:

- antenne interne, costituite da complessi clorofilla-proteina, in particolare le proteine CP43 e CP47 che legano la clorofilla e il β -carotene. Queste antenne si trovano a contatto con il centro di reazione, a cui trasmettono l'eccitazione (vedi paragrafo successivo);
- antenna esterna tripartita, costituita da complessi pigmento-proteina per la cattura della luce (LHCII) e contenenti clorofilla *a* (Chl_a), clorofilla *b* (Chl_b) e xantofille.

Inoltre sono state caratterizzate tre proteine minori il cui ruolo sembra essere quello di legare fra loro Chl_a , Chl_b e le xantofille nel sistema antenna e la parte centrale del PSII.

I complessi pigmento-proteina del LHCII sono dei trimeri, i cui monomeri sono costituiti da una catena peptidica di 232 amminoacidi, otto molecole di Chl_a , sei molecole di Chl_b e quattro carotenoidi. Questi complessi hanno la possibilità di muoversi lateralmente nelle membrane dei tilacoidi a seconda del loro stato di fosforilazione. I complessi che acquisiscono lo stato fosforilato possono trasmettere l'energia al centro di reazione del PSII.

1.2.3. La struttura del fotosistema 2 (PSII)

Normalmente nei cloroplasti il PSII è più abbondante del PSI, con un rapporto stechiometrico di 1:5. Tuttavia tale rapporto può cambiare a seconda delle condizioni ambientali (la quantità di PSI aumenta in condizioni di forte illuminazione). Il PSII è localizzato nella membrana dei tilacoidi, non a contatto con lo stroma (Fig. 1.7), ed è costituito dalle antenne interne, l'antenna esterna (LHCII), e un centro di reazione costituito da due molecole di clorofilla con massimo assorbimento della luce a 680 nm (per questo motivo il centro di reazione del PSII è detto P680), la feofitina (Feo), la proteina D1 (cui si associa il plastochinone Q_B) e la proteina D2, che è invece associata al plastochinone Q_A .

Il PSII comprende anche il complesso che opera la fotolisi dell'acqua e il rilascio dell'ossigeno (OEC - *Oxygen Evolving Complex*). Esso si trova sulla superficie interna della membrana dei tilacoidi, a contatto con il lumen. L'OEC è il sito dell'ossidazione dell'acqua. È un sistema metallo-oxo (le specie metallo-oxo sono formate per l'ossidazione di metalli o complessi metallo-ossigeno da parte di agenti come il perossido di idrogeno) che contiene 4 ioni di manganese in uno stato di ossidazione da +3 a +5, e uno ione di calcio bivalente. Quando l'acqua viene ossidata, producendo O_2 e protoni, esso invia in sequenza 4 elettroni dall'acqua alla tirosina e, successivamente, al centro di reazione P680. La struttura dell'OEC è ancora oggetto di studio.

1.2.4. Il complesso del citocromo (cyt b_6f)

Il complesso del citocromo (cyt b_6f) rappresenta la connessione tra il PSII ed il PSI. È da questo complesso che transitano gli elettroni che serviranno per ridurre il NADP a NADPH, oppure verranno utilizzati per altre reazioni di riduzione. Esso si compone di 4 unità secondarie: il citocromo b_6 , il citocromo f; una proteina ferro-zolfo di Rieske ed una unità secondaria detta IV. In un primo momento l'idrochinone Q_BH_2 trasferisce la propria coppia di elettroni al complesso del citocromo: un elettrone viene donato alla proteina ferro-zolfo ed un altro elettrone al citocromo b_6 . La proteina ferro-zolfo, a sua volta, cede l'elettrone al citocromo f che lo trasferisce alla plastocianina (PC). L'altro elettrone viene ceduto al citocromo b_6 che lo veicola su un chinone B. A questo punto esiste una molecola radicalica $Q_B\bullet$ che, in quanto tale, è potenzialmente dannosa per la cellula vegetale. Per ridurre il rischio ossidativo derivante da $Q_B\bullet$, quando una ulteriore molecola di idrochinone arriva al citocromo, un nuovo elettrone viene trasferito alla proteina ferro-zolfo. Al contempo un altro elettrone termina la riduzione della specie radicalica ($Q_B\bullet$) che si era appena formata mettendo a disposizione una nuova molecola di idrochinone. In altre parole un chinone Q_B dapprima viene ridotto a radicale $Q_B\bullet$ e successivamente viene ridotto a Q_BH_2 .

Figura 1.6 – Schema semplificato del flusso energetico di elettroni nell'antenna del fotosistema 2 (PSII) (da Szweykowska, 1997. Ridisegnato da Janusz Golik).

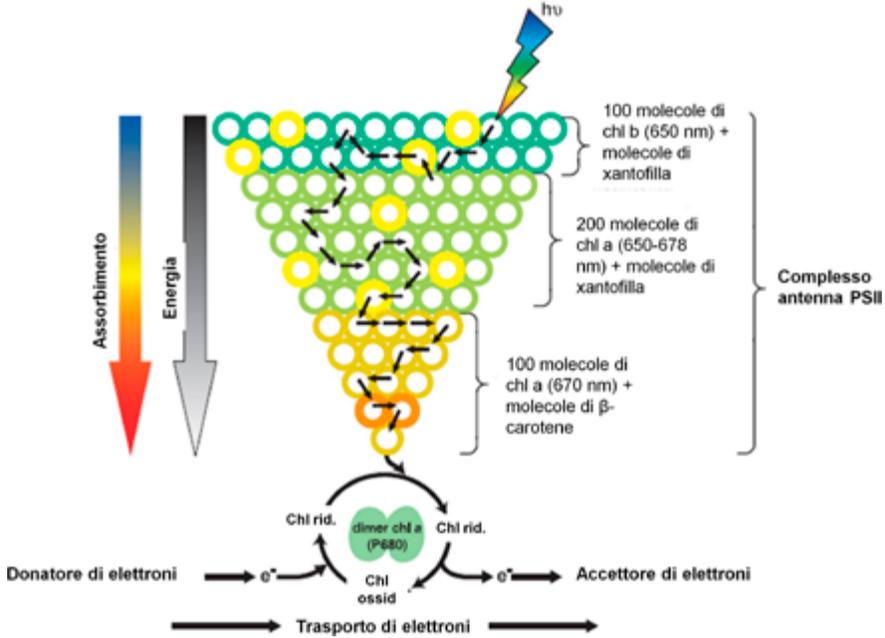
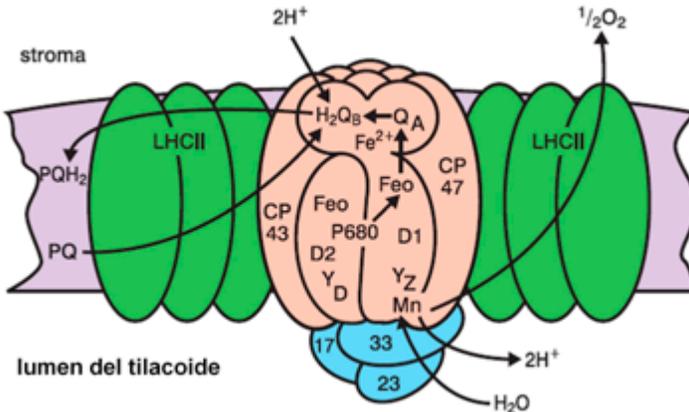


Figura 1.7 – Struttura del fotosistema 2 (PSII). LHCII = complesso antenna (Light Harvesting Complex) clorofilla-proteine; CP43, CP47 = proteine che legano la clorofilla alla struttura centrale dell'antenna del PSII; Feo = feofitina; 17, 23 e 33: complessi polipeptidici dell'OEC (Oxygen Evolving Complex); P680 = centro di reazione del PSII; D1 e D2 proteine del centro di reazione; Q_A = plastochinone A; H₂Q_B: plastochinone B ridotto e successivamente protonato; Y_D, Y_Z = tirosina associata rispettivamente alle proteine D1 e D2 (da Steffen, 2003. Ridisegnato da Janusz Golik).



1.2.5. La struttura del fotosistema I (PSI)

Il fotosistema 1 è situato sulla membrana del tilacoide a contatto con lo stroma. Fa parte del PSI il complesso antenna LHCI, contenente Chl_a e Chl_b nel rapporto 4: 1, carotenoidi e polipeptidi. Il centro di reazione è formato da due molecole di Chl_a con massimo assorbimento a 700 nm (per questo motivo il centro di reazione del PSI è detto P700), una clorofilla monomeriche che agisce da accettore immediato dell'elettrone proveniente dal PSII, due molecole di fillochinone (vitamina K1) che è il probabile accettore secondario del PSI, una proteina ferro-zolfo, una plastocianina (PC) e una ferredossina (Fd). Quest'ultima è l'accettore finale degli elettroni eccitati. Sul lato esterno della membrana del tilacoide, a contatto con lo stroma, si trova la ferredossina (Fd) e l'enzima Fd NADP⁺ reductasi (FNR), che catalizza il trasferimento di elettroni da Fd a NADP⁺ (Fig. 1. 8).

1.2.6. L' ATP-sintasi

L'ATP-sintasi della membrana del tilacoide è chiamata anche complesso CF_1 - CF_0 . Il componente CF_0 è idrofobo ed è inserito nella membrana del tilacoide. Esso trasporta protoni dallo stroma allo spazio interno dei tilacoidi (lumen) e forma un canale costituito da 6 catene proteiche appartenenti ad almeno tre differenti tipi. Il componente CF_1 , è costituito da almeno 5 tipi differenti di catene (2 unità principali α , β e 3 subunità γ , δ , ϵ) ed è situato sul lato esterno del tilacoide a contatto con lo stroma (Fig. 1.9). Esso contiene il centro catalitico per la formazione di ATP a partire da ADP.

1.3. I processi della fase luminosa della fotosintesi

1.3.1. L'assorbimento della radiazione fotosinteticamente attiva

Quando una molecola di clorofilla o di altri pigmenti fotosintetici situati nell'antenna LHCI del PSII viene colpita dalla luce, essa assorbe fotoni e passa da un livello energetico di base ad un livello superiore. In questo stato la clorofilla entra in risonanza, trasmettendo l'energia alle molecole di clorofilla vicine, e tornando così al livello energetico di base (de-eccitazione). Tale trasferimento di energia è sempre associato ad una perdita energetica. Più piccola è la distanza tra le molecole di pigmento, maggiore è la probabilità del trasferimento di energia. L'efficienza del trasferimento di energia tra molecole di clorofilla è vicina al 100%, ed è inferiore quando vi è un trasferimento tra molecole di clorofilla e carotenoidi. La perdita di energia a livello dell'antenna da origine al fenomeno della fluorescenza (vedi capitolo 2).

Quando l'energia è trasmessa al centro di reazione P680 l'elettrone viene trasferito all'accettore primario feofitina (Feo), una molecola con strut-

Figura 1.8 – Struttura del PSI. LHCI = complesso antenna (Light Harvesting Complex) clorofilla-proteine, contenente polipeptidi Lhca 1-4; A, B ... N = polipeptidi legati all'antenna; P700 = centro di reazione del PSI; A₀ = molecola di clorofilla; A₁ = fillochinone (vitamina K1); proteine ferro-zolfo F_x, F_A e F_B; PC = plastocianina; Fd = ferredossina; FNR = ferredossina-riduttasi (da <http://www.absoluteastronomy.com/topics/Photosystem>. Ridisegnato da Janusz Golik)

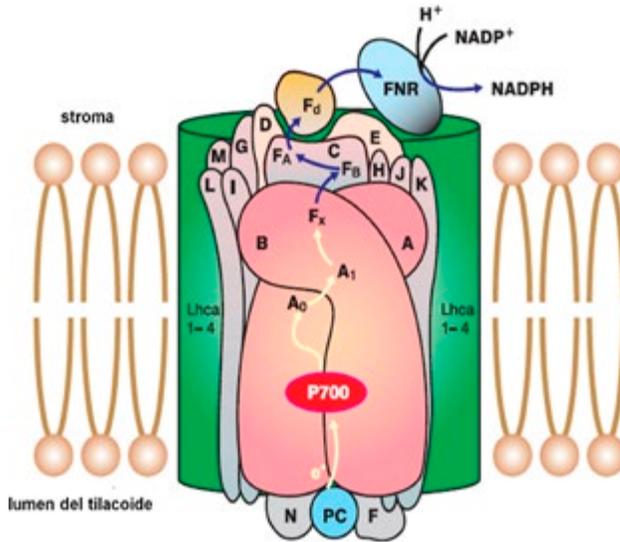
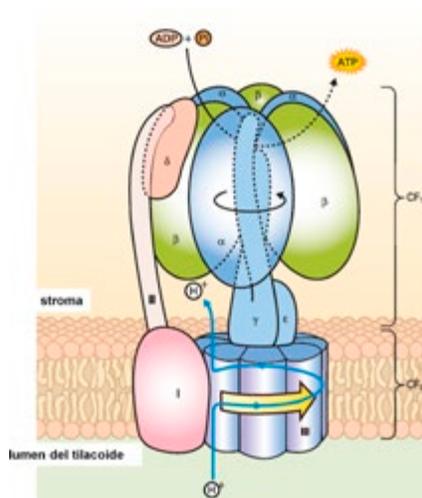


Figura 1.9 - Struttura dell'ATP-sintasi. CF₀ = componente idrofobo, inserito nella membrana del cloroplasto; CF₁ = componente idrofilo, inserito nello stroma, dove avviene l'attività catalitica. Le lettere e i numeri indicano le subunità della struttura (da Boyer, 1997. Ridisegnato da Janusz Golik).



24 Misurare la vitalità delle piante per mezzo della fluorescenza della clorofilla

tura simile a quella della clorofilla. La reazione di separazione di carica avviene secondo il seguente schema:



Tale reazione è estremamente veloce (avviene in un tempo di circa 0.4 nanosecondi).

L'energia si trasferisce al plastochinone PQ_A , che è situato sulla proteina D2 ed è il primo accettore di elettroni stabile del PSII. La molecola di clorofilla ossidata $P680^+$ è successivamente neutralizzata da un elettrone ricevuto dalla tirosina (TyrZ), proveniente dal complesso di ossidazione dell'acqua (OEC) ($\text{TyrZ } P680^+ \rightarrow \text{TyrZ}^+ P680$).

1.3.2. Il trasporto degli elettroni non ciclico e fotofosforilazione

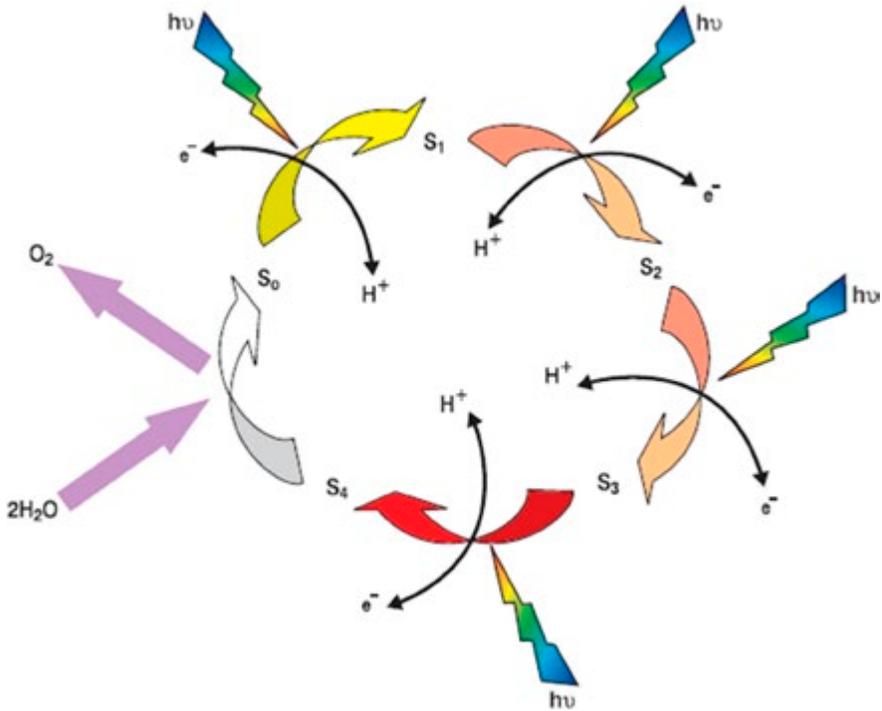
Si definisce lineare, o non ciclico, il meccanismo di trasporto degli elettroni che prende inizio con la dissociazione dell'acqua nell'*Oxygen Evolving Complex* (OEC) presso il PSII, e si conclude con la riduzione degli accettori finali oltre il PSI.

I primi eventi connessi al trasporto non ciclico degli elettroni avvengono nel PSII, ad opera del complesso di fotolisi dell'acqua, che è situato sulla parte interna della superficie della membrana tilacoidale. Questo complesso è formato da 4 atomi di manganese, la tirosina 161 connessa con la proteina D1, e un gruppo di proteine. Durante la fotolisi, da due molecole di acqua vengono sottratti 4 elettroni che, a loro volta, vengono trasmessi al centro di reazione ossidato del PSII ($^+P680$).

Il modello di fotossidazione dell'acqua è conosciuto come "meccanismo dello stato S'' ", e consiste in una serie di 5 stati (da S_0 a S_4), costituenti forme sempre più ossidate dell'OEC (Fig. 1.10). Impulsi luminosi sequenziali fanno avanzare il sistema fino allo stato di ossidazione S_4 . S_4 produce O_2 senza ulteriore bisogno di luce, e quindi fa tornare il sistema allo stato di ossidazione iniziale (S_0). I protoni si accumulano all'interno del lumen, aumentando il gradiente di concentrazione attraverso la membrana tilacoidale, formando in tal modo la forza trainante del processo di produzione di ATP. L'ossigeno prodotto viene diffuso al di fuori del cloroplasto. In questo modo gli organismi fotosintetici possono utilizzare l'acqua come fonte di elettroni e ioni idrogeno (il gradiente H^+ è necessario per la sintesi di ATP) necessari per la riduzione della CO_2 e per la produzione di O_2 .

Esiste un carrier di elettroni, genericamente indicato come Y_z , che opera fra l'OEC e il centro di reazione del PSII ($P680$). Questo carrier, che ha una spiccata capacità a trattenere gli elettroni, è un radicale formato da un residuo di tirosina nella proteina D1. Il primo accettore di elettroni del PSII è la feofitina (Feo), che li trasmette ai due plastochinoni PQ_A e PQ_B .

Figura 1.10 - Schema rappresentante l'ossidazione del manganese nel processo di dissociazione dell'acqua (stati di ossidazione del complesso del manganese, S_0, S_1, \dots, S_4 , produzione di idrogeno H^+ e rilascio dell'ossigeno (da: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/thumb/e/e7/Oxygen_evolution. Ridisegnato da Janusz Golik)



La riduzione dell'accettore PQ_A^- impedisce un'ulteriore separazione di carica nel centro di reazione PSII, aumentando così l'emissione di fluorescenza della clorofilla. In queste condizioni il centro di reazione è definito chiuso (*close center*). La trasmissione degli elettroni da PQ_A a PQ_B ($PQ_A^- \rightarrow PQ_B$), quest'ultimo situato sulla proteina D1, comporta la riapertura del centro di reazione e la diminuzione dell'intensità di fluorescenza. Acquisendo poi due elettroni dalla parte stromatica della membrana, da PQ_B viene formata una molecola di plastoidrochinone ($PQ_B^{2-} + 2H^+ \rightarrow PQH_2$). Questa molecola si separa dalla proteina D1 ed entra nella porzione idrocarburica della membrana, trasferendo i suoi due elettroni al complesso del citocromo $cyt\ b_6/f$. Come risultato, vengono liberati due protoni che sono trasferiti nel lumen del tilacoide. Il complesso $cyt\ b_6/f$ interagisce così con il pool del plastochinone agendo come una pompa protonica. Ciò comporta un aumento di acidità nel lumen dei tilacoidi. Di conseguenza è intensificata l'azione della pompa protonica attraverso la membrana tilacoideale, che è la forza trainante del processo di produzione di ATP.

Gli elettroni provenienti dal complesso del citocromo sono convogliati alla plastocianina (PC), che è un trasportatore mobile di elettroni contenente rame. L'elettrone viene trasportato dallo ione rame, che passa da una forma ossidata (Cu^{++}) ad una forma ridotta (Cu^+). Questa proprietà permette alla plastocianina di trasferire gli elettroni al centro di reazione ossidato P700^+ , a seguito dell'eccitazione del PSI. La riduzione del P700^+ da parte della PC avviene in un tempo che varia da 20 a 200 microsecondi.

La sequenza di reazioni di ossidoriduzione consente il trasferimento di elettroni tra trasportatori successivi, aumentando il loro potenziale di ossidoriduzione. La trasmissione di elettroni ad alta energia, lungo una catena di trasporto situata fra i complessi PSII e PSI, e la successiva riduzione degli accettori finali è parte essenziale del trasporto non ciclico. L'attività del PSII interagisce strettamente con quella del PSI. L'energia luminosa assorbita dai pigmenti nelle antenne del PSI viene trasferita al centro di reazione P700 in maniera analoga a quanto già descritto per il PSII. L'eccitazione del P700 causa una separazione di carica fra il P700^+ ossidato e gli elettroni eccitati.

Il centro di reazione ossidato del PSI (P700^+) acquista un elettrone da PC^- , e viene così ridotto. Nel tempo di 15 picosecondi, l'elettrone è trasferito ad una molecola di clorofilla (A_0) che funge da accettore iniziale, riducendola ad A_0^- . In questo modo viene stabilizzata la separazione di carica nel P700 . Gli elettroni ad alta energia, nei successivi 50 picosecondi, vengono trasferiti lungo una catena di trasportatori, che comprende A1 (fillochinone, proteina K1) ed una serie di proteine ferro-zolfo, fino a ridurre la ferredossina (Fd). L'accettore finale si trova sul lato esterno della membrana tilacoidale. In prossimità della ferredossina è situato l'enzima ferredossina NADP^+ riduttasi (FNR), che catalizza il trasferimento di elettroni da Fd a NADP^+ per produrre NADPH , prelevando un protone dallo stroma. Il tempo di trasferimento di elettroni da P700 a Fd è di circa 100 microsecondi. La reazione di riduzione del NADP^+ può essere riassunta in:

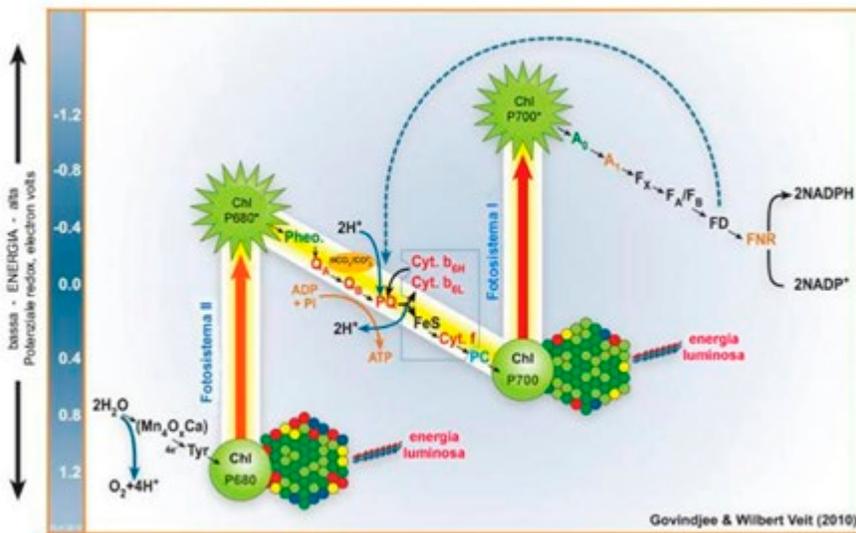


Durante il trasporto non ciclico degli elettroni, si verifica un gradiente di carica protonica fra i due lati della membrana tilacoidale. L'immissione di protoni nel lumen dei tilacoidi, compresi quelli generati dalla fotolisi dell'acqua, ne provoca l'acidificazione (fino ad un pH 3, 5), a fronte di pH relativamente alto (basico) nello stroma. Questo gradiente favorisce il deflusso di protoni, dal lumen allo stroma, attraverso l'ATP-sintasi con conseguente produzione di ATP, proporzionalmente alla intensità e alla velocità del trasporto degli elettroni. Un gradiente protonico troppo elevato può limitare il trasporto di elettroni nel complesso del citocromo b_6f , bloccando il loro trasporto al PSI.

La descrizione delle fasi degli eventi bioenergetici che vanno dalla fotolisi dell'acqua alla riduzione del NADP^+ sono sintetizzati in un diagram-

ma noto come “Schema Z” (Fig. 1.11). Il trasporto degli elettroni avviene da sinistra a destra nel grafico tramite la riduzione di accettori successivi, secondo la pendenza raffigurata fra il PSI e il PSII la quale, sulle ordinate rappresenta la perdita del potenziale di ossidoriduzione (potenziale redox). Il trasporto degli elettroni avviene spontaneamente secondo questa direzione (dall’alto verso il basso, da sinistra verso destra). Elettroni ad alta energia vengono generati nei centri di reazione di entrambi i fotosistemi eccitati dalla luce. Le frecce verticali rappresentano i centri di reazione eccitati P680 e P700.

Figura 1.11 – “Schema Z”, rappresentazione schematica delle fasi e dei processi del trasporto fotosintetico degli elettroni (da <http://www.life.illinois.edu/govindjee/>, Govindjee and Wilbert Veit 2010). Tyr: tirosina. Chl P680, Chl P700: centri di reazione rispettivamente dei fotosistemi PSII e PSI. Chl P680* e Chl P700*: centri di reazione dei due fotosistemi allo stato eccitato. Pheo: feofitina. Q_A e Q_B : molecole di plastochinone A e B. PQ: pool dei plastochinoni. Cyt f: citocromo f; Cyt b6: citocromo b6 nella forma ad alta (H) e bassa (L) energia. PC: plastocianina. A_0 : molecola di clorofilla, accettore primario di PSI. A_1 : vitamina K. F_X , F_A e F_B : proteine ferro-zolfo. FD: ferredossina. FNR: ferredossina NADP⁺ riduttasi per la formazione di NADPH (Spiegazione dei processi nel testo).



1.3.3. Il trasporto ciclico di elettroni

Un’alternativa al trasporto di elettroni non ciclico è rappresentata dal trasporto ciclico e dalla fotofosforilazione associata. Il trasporto ciclico si verifica quando la disponibilità di NADP⁺ è insufficiente, come ad esempio in condizioni di eccessiva radiazione luminosa. Questa via alternativa include il PSI e trasportatori di elettroni quali la ferredossina, i plastochinoni,

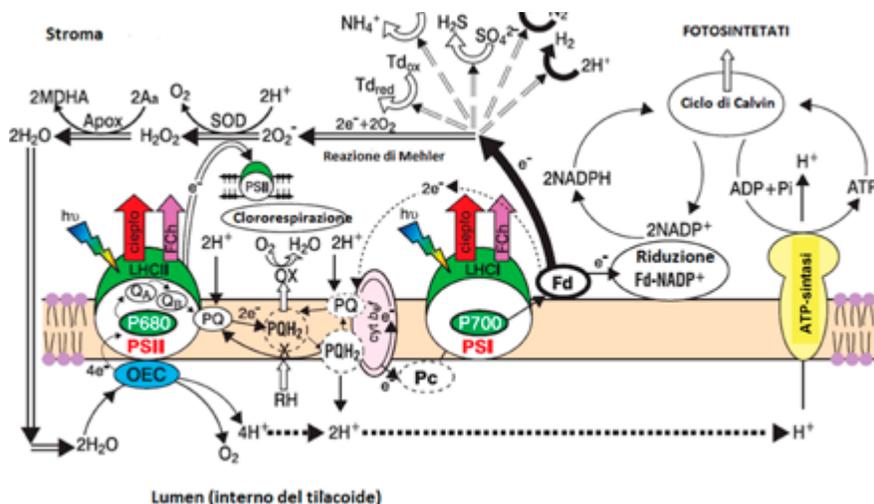
28 Misurare la vitalità delle piante per mezzo della fluorescenza della clorofilla

il complesso del citocromo b_6/f e la plastocianina. Anziché ridurre il $NADP^+$, la ferredossina trasmette l'elettrone a $cyt\ b_6/f$ consentendo il trasferimento di protoni dallo stroma al lumen. L'elettrone torna poi a PC che lo invia nuovamente al centro di reazione $P700^+$.

Questo processo può essere ripetuto, aumentando ogni volta il gradiente protonico fra il lumen dei tilacoidi e lo stroma. Ciò permette la sintesi di ATP da parte del complesso ATP-sintasi (fotofosforilazione ciclica).

Tramite il trasporto di elettroni non ciclico vengono sintetizzati NADPH e ATP. Il trasporto ciclico, d'altra parte, ha come unico prodotto l'ATP (Fig. 1.12).

Figura 1.12 – Trasporto e trasformazione dell'energia luminosa nei cloroplasti. PSII e PSI: fotosistema I (centro di reazione P680) e II (centro di reazione P700). OEC: oxygen evolving complex. Q_A e Q_B^- : sito del plastoquinone A sulla proteina D2, e del plastoquinone B sulla proteina D1. PQ e PQH_2^- : plastoquinone e plastochinolo (forma ridotta del plastoquinone). PC: plastocianina. Fd: ferredossina. Td(ox) e Td(red): forma ossidata e ridotta della tioredossina. LHCII e LHCI: Light Harvesting Complex al PSII e al PSI. SOD: superossido dismutasi. Aa: acido ascorbico. Apox: ascorbato perossidasi. MDHA: monodeidro-ascorbato. Fch: fluorescenza della clorofilla.



1.3.4. Il trasporto pseudociclico di elettroni e fosforilazione pseudociclica

La fosforilazione pseudociclica e il trasporto pseudociclico degli elettroni avvengono quando gli elettroni trasportati dalla ferredossina oltre il PSI non vanno a ridurre il $NADP^+$, ma riducono delle molecole di ossige-

no provenienti dalla fotolisi dell'acqua ($2e^- + 2O_2 \rightarrow 2O_2^-$). Questo ciclo è noto anche come reazione di Mehler, e comporta la formazione di anioni $2O_2^-$ (radicale perossido) e, in una fase successiva, di H_2O_2 . Queste sostanze chimiche fanno parte delle cosiddette ROS (*Reactive Oxygen Species*), e sono forti ossidanti, quindi composti pericolosi per la cellula.

Il trasporto pseudociclico costituisce una forma di fotoinibizione perché impedisce il trasporto di elettroni verso il ciclo di Calvin-Benson, e quindi inibisce l'assimilazione della CO_2 .

Una sintesi complessiva delle reazioni che si verificano nella fase luminosa della fotosintesi è mostrata nella Figura 1.12.

1.4. Il ciclo di Calvin-Benson e la fissazione di CO_2 (la "fase oscura della fotosintesi")

La radiazione fotosinteticamente attiva (PAR) assorbita dai pigmenti viene utilizzata per la sintesi di ATP e NADPH. Questi due prodotti della fase luminosa sono utilizzati per la sintesi degli zuccheri, a partire da CO_2 e H_2O , nel ciclo di Calvin-Benson. Il ciclo di Calvin-Benson (detto anche "fase oscura" perché consiste di reazioni enzimatiche non dipendenti dalla luce) consiste nella fissazione di anidride carbonica (CO_2) e la sintesi degli zuccheri mediante reazioni di ossidoriduzione che implicano l'uso dell'ATP e NADPH prodotti durante la fase luminosa.

La fissazione dell'anidride carbonica (carbossilazione) avviene su un substrato organico (ribulosio-1, 5-bisfosfato, RuBP) a 5 atomi di carbonio. Questa reazione è catalizzata da un enzima chiamato ribulosio-1, 5-bisfosfato carbossilasi ossidasi (Rubisco), e avviene nello stroma del cloroplasto. La Rubisco è considerata un enzima inefficiente perché agisce molto lentamente. Per questo motivo la pianta necessita di grandi quantità di questo enzima. La Rubisco rappresenta da sola circa il 50% delle proteine implicate nella fotosintesi, ed è probabilmente la proteina più abbondante della biosfera.

La fissazione del carbonio e la produzione di glucosio avviene attraverso un ciclo di reazioni enzimatiche (ciclo di Calvin-Benson). L'intero ciclo è descritto in tre fasi (carbossilazione, riduzione e rigenerazione), nel corso delle quali viene prodotto l'acido 3-fosfoglicerico (PGA), necessario per la sintesi degli zuccheri e, al termine del ciclo stesso, viene ricostituito il prodotto di partenza (RuBP).

La carbossilazione del ribulosio-1, 5-bisfosfato porta alla formazione di un composto instabile a 6 atomi di carbonio che si divide velocemente in due molecole a 3 atomi di carbonio, l'acido 3-fosfoglicerico (PGA). Da 3 molecole di RuBP carbossilato si ottengono 6 molecole di PGA. Queste 6 molecole vengono ridotte ottenendo 6 molecole di gliceraldeide-3-fosfato (GAP). Di queste, 1 esce dal ciclo per andare a formare del glucosio (per una molecola di glucosio occorrono 6 molecole di PGA), mentre le altre 5 vanno a riformare il RuBP per la cattura di una successiva molecola di CO_2 .

Gli zuccheri prodotti possono essere utilizzati per la sintesi di saccarosio, amido, e molti altri composti organici. Nella maggior parte delle piante i primi prodotti della incorporazione di CO_2 nel ciclo di Calvin-Benson sono composti a tre atomi di carbonio (PGA) e quindi questo ciclo fotosintetico è chiamato C3.

Nelle piante con ciclo fotosintetico C3 la Rubisco può operare in due modi: come carbossilasi e come ossigenasi. In quest'ultimo caso, a seguito dell'ossidazione del RuBP, si forma acido 3-fosfoglicerico e fosfoglicolato. Questo prodotto alimenta il processo della fotorespirazione, con un consumo netto di carbonio organicato. La fotorespirazione è un processo di tipo respiratorio, dipendente dalla luce. Attraverso vari passaggi, partendo da 2 molecole di fosfoglicolato, viene formato acido glicerico e CO_2 con dispendio di ATP. Il glicerato, quindi, può ritornare al cloroplasto, dove viene riconvertito in PGA. La fotorespirazione è quindi un processo dissipativo, ed ha una duplice funzione: (i) consente di mantenere una elevata concentrazione di CO_2 all'interno dei cloroplasti in condizioni di chiusura stomatica (quando cioè la CO_2 intercellulare viene consumata e si instaura un ambiente ossidativo); (ii) è un meccanismo che utilizza i ROS (*Reactive Oxygen Species*) riducendo pertanto i rischi che derivano da questi composti.

Alle condizioni standard (temperatura di 25°C , con 21% di O_2 e 0,039% di CO_2) l'attività enzimatica di carbossilazione della Rubisco è quasi tre volte più elevata dell'attività di ossigenazione. La Rubisco ha un'affinità più elevata per la CO_2 rispetto all' O_2 , per questo motivo, la concentrazione intracellulare di CO_2 è di primaria importanza nell'attivazione dell'enzima. Per effetto della maggiore concentrazione atmosferica di O_2 rispetto alla CO_2 , nella fase oscura il rapporto carbossilazione/ossigenazione è in genere variabile da 3:1 a 4:1. In altre parole circa il 25% dell'attività della Rubisco è dedicata alla fotorespirazione. Rapporti più svantaggiosi vengono raggiunti in presenza di elevate temperature poiché, in queste condizioni, l'ossigenazione aumenta più rapidamente della carbossilazione e l'assimilazione diminuisce per effetto della rallentata rigenerazione di RuBP.

1.4.1. La fotosintesi C4

Alcune piante hanno sviluppato adattamenti all'aridità che implicano la fissazione della CO_2 per mezzo di un enzima diverso dalla Rubisco. In queste piante l'anidride carbonica è fissata su un substrato organico a tre atomi di carbonio (acido fosfoenolpiruvico, PEP) tramite un enzima chiamato PEP-carbossilasi (PEPc). La fissazione della CO_2 avviene nelle cellule del mesofillo e provoca la formazione di un primo composto stabile a 4 atomi di carbonio (ossalacetato). Per questo motivo il processo fotosintetico qui descritto è chiamato C4. Sono piante C4 il granturco, il sorgo, la canna da zucchero e molte piante erbacee. L'ossalacetato, sintetizzato nelle cellule del mesofillo, viene poi ridotto ad acido malico per l'azione di NADPH,

e in questa forma viene trasferito nelle cellule della guaina del fascio che, nelle piante C₄, hanno una particolare anatomia, detta anatomia Kranz. In queste cellule l'acido malico viene decarbossilato a piruvato con il conseguente rilascio di CO₂.

Ci sono tre differenti meccanismi usati dalle piante C₄ per trasportare il carbonio all'interno delle cellule della guaina del fascio e rigenerare la PEP_C. Queste vie sono note come NAD-ME, NADP-ME e PEPCK, a seconda del principale enzima usato per la decarbossilazione (enzima malico NAD-specifico, enzima malico NADP specifico e fosfoenolpiruvato carbossichinasi). Di questi, NAD-ME e NADP-ME sono i meccanismi più comuni e hanno la maggiore distribuzione nei gruppi tassonomici dei vegetali.

La CO₂ liberata nelle cellule della guaina del fascio è immediatamente fissata dalla Rubisco dando inizio al ciclo di Calvin-Benson. In queste cellule la concentrazione di O₂ è molto bassa. Per cui l'attività di ossigenasi della Rubisco (e la fotorespirazione) è vicina a zero, aumentando la resa fotosintetica. La fotosintesi netta (P_N) è uguale a ($P_L - P_R$), dove P_L è la fotosintesi lorda e P_R è la fotorespirazione. In tal modo le piante C₄ sfruttano meglio la CO₂ rispetto a quelle C₃, e ciò conferisce loro una maggiore efficienza nell'utilizzazione delle risorse.

Le piante C₄ sono meglio adattate all'aridità delle C₃ perché la CO₂ viene fissata sul substrato PEP_C quando sono attivi gli scambi gassosi fra la foglia e l'atmosfera (cioè quando gli stomi sono aperti), e viene resa disponibile per il ciclo di Calvin-Benson anche in condizione di stomi chiusi. In tal modo le piante C₄ sono in grado di fotosintetizzare anche in condizioni di stress idrico, a differenza di quanto avviene nelle piante C₃. Un altro tipo di processo fotosintetico è la cosiddetta fotosintesi CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*), o metabolismo acido delle *Crassulaceae*. Allo scopo di limitare le perdite idriche, queste piante tengono gli stomi aperti di notte e chiusi di giorno. Di notte avviene la carbossilazione dell'acido fosfoenolpiruvico (PEP) e la riduzione dell'ossalacetato a malato, che si accumula nei vacuoli. Durante il giorno, in modo simile alle piante C₄, il malato viene decarbossilato e la CO₂ derivante è utilizzata nel ciclo di Calvin-Benson.