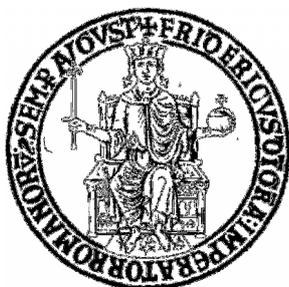


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”



Scuola Politecnica e delle Scienze di Base

Dottorato di ricerca in Biologia Applicata

XXVIII Ciclo

Tesi di Dottorato

Effetti delle radiazioni ionizzanti ad alto e basso LET
(Linear Energy Transfer) sulle piante superiori

Effects of high and low LET (Linear Energy Transfer) ionizing
radiation on higher plants

Coordinatore
Ch.mo Prof.
Ezio Ricca

Candidato
Dott.ssa
Pia Rosa Cataletto

Tutor
Dott.ssa
Carmen Arena

INDICE

ELENCO DELLE FIGURE	1
ELENCO DELLE TABELLE	8
ABBREVIAZIONI	9
PREMESSA	10
CAP. 1 – INTRODUZIONE	13
1.1 Le radiazioni ionizzanti	13
1.1.1 Grandezze dosimetriche delle radiazioni ionizzanti	16
1.1.2 Radiazione ionizzante ed effetto biologico sugli organismi viventi	18
1.1.3 Lo studio delle radiazioni ionizzanti nella biologia vegetale	22
1.2 Le radiazioni ionizzanti sulla Terra: sorgenti naturali ed antropiche	24
1.2.1 La radioecologia	25
1.3 Le radiazioni ionizzanti nello spazio extraterrestre	27
1.3.1 Le piante nei Sistemi Biologici Rigenerativi	29
1.3.2 La luce LED per la coltivazione delle piante nello Spazio	31
1.4 Interazione radiazioni ionizzanti/piante superiori	34
1.4.1 Effetti sul materiale genetico	35
1.4.2 Effetti sulla crescita e sulle caratteristiche morfo-anatomiche	38
1.4.3 Effetti sull'apparato fotosintetico	39
1.4.4 Effetti benefici delle radiazioni: l'ormesi	42
CAP. 2 – SCOPO DELLA RICERCA	45
CAP. 3- Risposta della specie <i>Phaseolus vulgaris</i> L. a radiazioni ionizzanti a basso LET: crescita e stress ossidativo	48

3.1 Premessa e disegno sperimentale	48
3.2 Materiali e metodi	49
3.2.1 Coltivazione delle piante e condizioni di crescita	49
3.2.2 Procedura d'irraggiamento	49
3.2.3 Misure morfometriche	50
3.2.4 Determinazione del contenuto di pigmenti fotosintetici, della massima efficienza fotochimica del PSII e dell'attività dell'enzima Rubisco	51
3.2.5 Determinazione della capacità antiossidante	52
3.2.6 Saggio di attività della Poli ADP-ribosio polimerasi (PARP)	53
3.2.7 Analisi statistica	53
3.3 Risultati e discussione	54
3.3.1 Crescita ed efficienza fotochimica in funzione della dose	54
3.3.2 Meccanismi di radioresistenza	57
3.4 Conclusioni	60
CAP. 4- Effetti dell'irraggiamento con ioni pesanti C e Ti su semi della specie <i>Dolichos melanophthalmus</i> DC.: confronto tra prima e seconda generazione di piante	63
4.1 Premessa e disegno sperimentale	63
4.2 Materiali e metodi	64
4.2.1 La specie studiata	64
4.2.2 Procedura d'irraggiamento e condizioni di crescita	66
4.2.3 Studio della germinazione	67
4.2.4 Monitoraggio della crescita e misure allometriche	67
4.2.5 Misure di emissione di fluorescenza	68
4.2.6 Quantificazione dei pigmenti fotosintetici	72
4.2.7 Identificazione e quantificazione della proteina D1 e Rubisco mediante SDS-PAGE e Western blotting	72

4.2.8 Estrazione e determinazione di AsA ed H ₂ O ₂	73
4.2.9 Saggio di attività della Poli ADP-ribosio polimerasi (PARP)	74
4.2.10 Analisi statistica	74
4.3 Risultati e discussione	75
4.3.1 Effetto degli ioni C e Ti sulla crescita	75
4.3.2 Effetti sulla funzionalità dell'apparato fotosintetico	80
4.3.3 Risposta antiossidante	88
4.4 Conclusioni	91
CAP. 5- Effetto dei raggi X sulla specie <i>Solanum lycopersicum</i> L. “Micro-Tom” in risposta a differenti fasi del ciclo fenologico e alla diversa età fogliare	95
5.1 Premessa e disegno sperimentale	95
5.2 Materiali e metodi	96
5.2.1 La specie studiata	96
5.2.2 Procedura d'irraggiamento e condizioni di crescita	98
5.2.3 Osservazioni morfologiche ed analisi biometriche	100
5.2.4 Misure di emissione di fluorescenza della clorofilla <i>a</i>	100
5.2.5 Quantificazione dei pigmenti fotosintetici	101
5.2.6 Identificazione e quantificazione della proteina D1 mediante SDS-PAGE e Western blotting	101
5.2.7 Determinazione dei fenoli di membrana e dell'acido ascorbico (AsA) nel tessuto fogliare	102
5.2.8 Analisi del DNA genomico mediante RAPD-PCR	102
5.2.9 Analisi statistica	104
5.3 Risultati e discussione	105
5.3.1 Influenza dell'irraggiamento sulla crescita delle piante nelle diverse fasi fenologiche	105
5.3.2 Effetto dei raggi X sulla fotosintesi in rapporto alla fase fenologica della pianta e al grado di sviluppo fogliare	110

5.3.3 Risposta antiossidante in tessuti fogliari a diverso grado di sviluppo ed effetti dello stress ossidativo sul DNA genomico	117
5.4 Conclusioni	122
CAP. 6- Effetti della radiazione ionizzante ad alto LET sul ciclo vitale della specie <i>Solanum lycopersicum</i> L. ‘Micro-Tom’	125
6.1 Premessa e disegno sperimentale	125
6.2 Materiali e metodi	127
6.2.1 Procedura d’irraggiamento e condizioni di crescita	127
6.2.2 Germinazione e misure biometriche	128
6.2.3 Stima della biomassa	128
6.2.4 Misure di fluorescenza della clorofilla <i>a</i>	128
6.2.5 Determinazione dei pigmenti fotosintetici	130
6.2.6 SDS-PAGE e Western blotting della proteina D1	131
6.2.7 Attività antiossidante in foglie e frutti	131
6.2.8 Valutazione dell’attività fotosintetica in risposta a stress luminoso da elevata irradianza	131
6.2.9 Analisi statistica	132
6.3 Risultati e discussione	132
6.3.1 Effetti degli ioni pesanti sulla germinazione e crescita delle piante	132
6.3.2 Effetti dell’irraggiamento sull’efficienza del processo fotosintetico	137
6.3.3 Risposta antiossidativa in foglie e frutti	140
6.3.4 Efficienza fotosintetica in piante controllo ed irraggiate sottoposte a stress luminoso	141
6.4 Conclusioni	145
CAP. 7- Effetto della diversa qualità della luce sulla crescita, la fotosintesi ed il contenuto di antiossidanti in <i>Solanum lycopersicum</i> L. ‘Micro-Tom’	147

7.1 Premessa e disegno sperimentale	147
7.2 Materiali e metodi	149
7.2.1 Coltivazione delle piante e condizioni di crescita	149
7.2.2 Monitoraggio della crescita	149
7.2.3 Determinazione delle caratteristiche fogliari funzionali	150
7.2.4 Scambi gassosi ed emissione della fluorescenza della clorofilla <i>a</i>	150
7.2.5 Analisi western blotting della proteina D1 e Rubisco	151
7.2.6 Contenuto di antiossidanti nei frutti	151
7.2.7 Analisi statistica	152
7.3 Risultati e discussione	152
7.3.1 Crescita delle piante in funzione della qualità della luce	152
7.3.2 Effetti della qualità della luce sulla fotosintesi	155
7.3.3 Contenuto di antiossidanti nei frutti	159
7.4 Conclusioni	161
CAP. 8- CONCLUSIONI GENERALI	164
CAP. 9- BIBLIOGRAFIA	170

ELENCO DELLE FIGURE

CAPITOLO 1

Fig.1: Differenza tra radiazione ionizzante e non ionizzante.

Fig.2: Frequenza e localizzazione spaziale degli eventi di ionizzazioni prodotti lungo il percorso dalle radiazioni ionizzanti a basso ed alto LET (Linear Energy Transfer).

Fig.3: Meccanismi d'azione della radiazione ionizzante sulla molecola di DNA.

Fig.4: Rappresentazione in percentuale delle sorgenti di radiazioni in natura.

Fig.5: Risultati dei calcoli di modellazione relativi all'emissione nucleare dalla centrale nipponica di Fukushima-Daiichi e relativo fallout.

Fig.6: Analogie tra gli ecosistemi terrestri (A) e le BLSSs (B) (Da Arena et al., 2012).

Fig.7: Piante di lattuga coltivate in camere con illuminazione LED sulla Stazione Spaziale Internazionale (ISS), Nasa, Maggio 2014.

Fig.8: Effetti delle radiazioni ionizzanti sulle piante in funzione della dose da: http://www.asi.it/files/LISS-_Spazio_alle_piante.pdf

Fig.9: Le curve dose-risposta ad U dritta e rovesciata (Calabrese e Baldwin, 2001a).

CAPITOLO 3

Fig.1: (a) piante di *Phaseolus vulgaris* L. coltivate in camera di crescita; e (b) irraggiamento della pianta con il generatore di raggi X, in cui sono evidenti la prima foglia trifogliata completamente espansa (L1) e la seconda foglia in via di sviluppo (L3).

Fig.2: piante di *Phaseolus vulgaris* L. dopo 22 giorni dall'esposizione a diverse dosi di raggi X (0.3, 10, 50 e 100 Gy)

Fig.3: (a) Altezza della pianta, espressa come aumento in percentuale rispetto al valore iniziale, misurata dopo 12 e 22 giorni dall'irraggiamento (GDI – giorni dopo l'irraggiamento); e (b) area fogliare (cm²) misurata 22 giorni dopo l'irraggiamento delle foglie L1 ed L3 di piante di *P.vulgaris* esposte a diverse dosi di raggi X. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P<0.05)

Fig.4: (a) Contenuto totale di clorofilla (Chl a+b), e (b) di carotenoidi (Car x+c), in foglie L1 e L3 irraggiate con diverse dosi di raggi X. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P<0.05)

Fig.5: Massima efficienza del fotosistema II (Fv/Fm) misurata in foglie L1 e L3 esposte a dosi di 50 e 100 Gy di raggi X. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P<0.05)

Fig.6: Attività dell'enzima Rubisco misurata come mmol di NADH ossidato per area fogliare in foglie L1 e L3 dopo esposizione a 50 e 100 Gy di raggi X. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P<0.05).

Fig.7: Concentrazione di acido ascorbico (nmol g⁻¹ FW) in foglie L1 e L3 dopo esposizione a diverse dosi di raggi X. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P<0.05)

Fig.8: Attività della Poli ADP-ribosio polimerasi (PARP) in foglie L1 e L3 dopo esposizione a diverse dosi di raggi X. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P<0.05)

Fig.9: (a) Concentrazione di acido ascorbico; e (b) attività della Poli ADP-ribosio polimerasi (PARP) in foglie L1 esposte a 50 Gy di raggi X, valutate 3, 10, 12 e 20 giorni dopo l'irraggiamento (GDI). Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P<0.05)

CAPITOLO 4

Fig.1: (a) pianta di *Dolichos melanophthalmus* DC.; e (b) baccelli e semi.

Fig.2: (a) Procedura di irraggiamento dei semi con ioni C e Ti presso il GSI (Darmstadt, Germany); e (b) piante di *D. melanophthalmus* coltivate in camera di crescita.

Fig.3: Misura dell'area fogliare mediante fotografia digitale.

Fig.4: Fluorimetro JUNIOR PAM (Walz, Germany) munito di cuvette di misura dove viene alloggiata la foglia. Nell'esempio la misurazione viene condotta su una pianta di pomodoro. E' visibile la fibra ottica di 2 mm di diametro.

Fig.5: Metodo del saturation pulse.

Fig.6: Percentuale di germinazione a 7 giorni dalla semina nella prima (a) nella seconda generazione (b) di semi di *D. melanophthalmus*. La prima generazione di semi è stata sottoposta ad irraggiamento con ioni carbonio (C) e titanio (Ti) alle dosi di 1 Gy e 10 Gy. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Ciascun punto rappresenta la media \pm ES di n=5. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P<0.05).

Fig.7: Seconda generazione di piante di *D. melanophthalmus* alla fine del ciclo colturale. Da sinistra verso destra: Controllo, C 1Gy, C 10Gy, Ti 1Gy, Ti 10Gy.

Fig.8: Altezza della pianta (a), numero di foglie (b) e area fogliare (c), misurate al termine del ciclo vitale in piante di *D. melanophthalmus* della prima generazione, sviluppate da semi controllo e semi irraggiati con ioni carbonio (C) e titanio (Ti) alle dosi 1 Gy e 10 Gy, e della seconda generazione. Ciascun punto rappresenta la media \pm ES di n=5. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P<0.05).

Fig.9: Numero di baccelli(a), e di semi (b) prodotti da piante di *D. melanophthalmus* di prima generazione sviluppate da semi controllo e semi irraggiati con ioni carbonio (C) e titanio (Ti) alle dosi 1 Gy e 10 Gy e della seconda generazione. Ciascun punto rappresenta la media \pm ES di n=5. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P<0.05).

Fig.10: Curve di risposta alla luce per gli indici fotochimici ÖPSII, ETR, NPQ e Fv/Fm misurati in foglie completamente espanse di piante di *D. melanophthalmus*, germinate da semi di seconda generazione. Ciascun punto rappresenta la media \pm ES di n=4. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P<0.05).

Fig.11: Contenuto totale di clorofilla (a) e carotenoidi (b) misurato in foglie completamente espanse di *D. melanophthalmus* di prima generazione, irraggiate con ioni pesanti allo stadio di seme, e (b) di seconda generazione. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P<0.05).

Fig.12: Analisi densitometrica (a sinistra) dei profili Western blot (a destra) della proteina D1 in foglie *D. melanophthalmus* di piante di prima generazione irraggiate allo stadio di seme (a) e di seconda generazione (b). Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 3).

Fig.13: Analisi densitometrica (a sinistra) dei profili Western blot (a destra) della proteina Rubisco in foglie *D. melanophthalmus* di piante di prima generazione irraggiate allo stadio di seme (a) e di seconda generazione (b). Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 3).

Fig.14: Concentrazione di H₂O₂ (a) e di acido ascorbico (b) in foglie *D. melanophthalmus* appartenenti a piante di prima generazione, irraggiate allo stadio di seme con ioni pesanti, e di seconda generazione. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P<0.05).

Fig.15: Attività della Poli ADP-ribosio polimerasi (PARP) in foglie *D. melanophthalmus* appartenenti a piante di prima generazione, irraggiate allo stadio di seme con ioni pesanti, e di seconda generazione. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P<0.05).

CAPITOLO 5

Fig.1: Pianta di *Solanum lycopersicum* L. "Micro-Tom"

Fig.2: Capsule Petri con semi e piante di *Solanum lycopersicum* L. "Micro-Tom" in fase vegetativa S1 e riproduttiva S2 posizionate all'interno del generatore di raggi X, nella superficie destinata all'irraggiamento.

Fig.3: Coltivazione delle piante in serre semi-controllate presso il Dipartimento di Agraria dell'Università degli Studi di Napoli Federico II

Fig.4: Schema del campionamento del tessuto fogliare utilizzato nelle diverse analisi

Fig.5: Andamento temporale dell'altezza della pianta (a) e del numero di foglie(b) durante la crescita; area fogliare per pianta (c) e numero di frutti totali prodotti (d) in piante di *S. lycopersicum* L. 'Micro-Tom' germinate da semi irraggiati alle diverse dosi di raggi X. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative. La freccia indica il momento dell'irraggiamento.

Fig.6: Andamento temporale dell'altezza della pianta (a) e del numero di foglie(b) durante la crescita; area fogliare per pianta (c) e numero di frutti totali prodotti (d) in piante di *S. lycopersicum* L. 'Micro-Tom' irraggiate alle diverse dosi di raggi X allo stadio vegetativo. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative. La freccia indica il momento dell'irraggiamento.

Fig.7: Andamento temporale dell'altezza della pianta (a) e del numero di foglie(b) durante la crescita; area fogliare per pianta (c) e numero di frutti totali prodotti (d) in piante di *S. lycopersicum* L. 'Micro-Tom' irraggiate alle diverse dosi di raggi X allo stadio riproduttivo. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative. La freccia indica il momento dell'irraggiamento.

Fig.8: Resa quantica del trasporto elettronico (Φ PSII) (a), attività di trasporto elettronico (ETR) (b), quenching non fotochimico (NPQ) (c) e massima resa quantica del PSII (Fv/Fm) (d) misurati ad una irradianza di 500 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$, in foglie L1 di piante di *S. lycopersicum* irraggiate in differenti fasi fenologiche con dosi crescenti di raggi X. Ciascuna misura rappresenta la media \pm es (n=4).

Fig.9: Resa quantica del trasporto elettronico (Φ PSII) (a), attività di trasporto elettronico (ETR) (b), quenching non fotochimico (NPQ) (c) massima resa quantica del PSII (Fv/Fm) (d) misurati ad una irradianza di 500 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$, in foglie L1 ed L3, di piante di *S. lycopersicum* irraggiate nelle fasi fenologiche S1 ed S2 con dosi crescenti di raggi X. Ciascuna misura rappresenta la media \pm es (n=4).

Fig.10: Contenuto totale di clorofilla (a) e carotenoidi (b) in foglie L1 ed L3 di piante di *S. lycopersicum* irraggiate con dosi crescenti di raggi X nelle fasi fenologiche S1 ed S2. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4).

Fig.11: Analisi densitometrica (con il software Quantity One, Bio-Rad) ed espressione della proteina D1 (mediante Western blot) in foglie L1 ed L3 di piante di *S. lycopersicum* irraggiate in fase vegetativa S1 con dosi crescenti di raggi X. Ciascun istogramma rappresenta la media \pm es (n = 3).

Fig.12: Analisi densitometrica (con il software Quantity One, Bio-Rad) ed espressione della proteina D1 (mediante Western blot) in foglie L1 ed L3 di piante di *S. lycopersicum* irraggiate in fase riproduttiva S2 con dosi crescenti di raggi X. Ciascun istogramma rappresenta la media \pm es (n = 3).

Fig.13: Percentuale di sostanze fenoliche in foglie L1 ed L3 di piante di *S. lycopersicum* irraggiate con dosi crescenti di raggi X nelle fasi fenologiche S1 ed S2. Ciascun istogramma rappresenta la media \pm es (n = 4).

Fig.14: Concentrazione di Acido ascorbico (AsA) in foglie L1 ed L3 di piante di *S. lycopersicum* irraggiate con dosi crescenti di raggi X nelle fasi fenologiche S1 ed S2. Ciascun istogramma rappresenta la media \pm es (n = 4).

Fig.15: Dendrogramma basato sul metodo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) sviluppato dai profili RAPD di foglie L3 di piante irraggiate in fase riproduttiva S2

CAPITOLO 6

Fig.1: Piante di *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom' collocate in camera di crescita.

Fig.2: Misura dell'area fogliare, mediante fotografia digitale, di foglie di *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom'.

Fig.3: Il fluorimetro FluorPen FP100max (Photon System Instruments, Czech Republic)

Fig.4: Fluorimetro JUNIOR PAM (Walz-Germany) munito di cuvetta di misura dove è alloggiata la foglia appartenente ad una pianta di *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom'.

Fig.5: Percentuale di germinazione di semi di *Solanum lycopersicum* 'Micro-Tom' controllo ed irraggiati con ioni C alla dose di 25 Gy dopo 4 e 7 giorni dalla semina – DAS (Days After Sowing). Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 40). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

Fig.6: Andamento temporale dell'altezza delle piante di *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom' sviluppate da semi controllo ed irraggiati con ioni C alla dose di 25 Gy. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 10). T-test $P < 0.01$.

Fig.7: Andamento temporale del numero di foglie in piante di *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom' sviluppate da semi controllo ed irraggiati con ioni C alla dose di 25 Gy. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti

Fig.8: Andamento temporale dell'area fogliare totale in piante di *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom' germinate da semi controllo ed irraggiati con ioni C alla dose di 25 Gy. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

Fig.9: Andamento temporale del numero di fiori (a) e numero di frutti totali (b) in piante di *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom' germinate da semi controllo e irraggiati con ioni C alla dose di 25 Gy. I valori riportati rappresentano la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

Fig.10: Biomassa secca di piante di *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom' germinate da semi controllo e da semi irraggiati con ioni C alla dose di 25 Gy. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

Fig.11: Resa quantica del trasporto elettronico del PSII (Φ PSII), attività di trasporto elettronico (ETR), quenching-non fotochimico (NPQ) e massima resa quantica del PSII (Fv/Fm) misurati in piante di *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom' germinate da semi controllo e irraggiati. Le misure sono state condotte in camera di crescita a PPFD di $125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ciascun punto rappresenta la media \pm es (n=5). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le piante.

Fig.12: Contenuto totale di clorofilla (a) e di carotenoidi (b) in foglie di piante sviluppate da semi controllo e irraggiati con ioni C alla dose di 25 Gy. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le piante.

Fig.13: analisi densitometrica (a sinistra) dei profili Western blot (a destra) della proteina D1 in foglie di piante germinate da semi controllo e irraggiati con ioni C alla dose di 25 Gy. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 3). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le piante.

Fig.14: Contenuto di acido ascorbico (a) e attività dell'enzima catalasi (b) in foglie di piante germinate da semi controllo ed irraggiati con ioni C alla dose di 25 Gy. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

Fig.15: Contenuto di acido ascorbico(a) e attività dell'enzima catalasi (b) in frutti rossi di piante germinate da semi controllo ed irraggiati con ioni C alla dose di 25 Gy. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

Fig.16: Curve veloci di risposta alla luce per gli indici fotochimici \square PSII, ETR, NPQ misurate in assenza di stress e dopo lo stress luminoso in piante di *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom' germinate da semi controllo ed irraggiati con ioni C alla dose di 25 Gy. Ciascun punto della curva rappresenta la media \pm es (n=5). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le piante. T-test $P < 0.01$.

Fig.17: Massima resa quantica del PSII (Fv/Fm) misurata in piante di *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom' germinate da semi controllo e irraggiati, in assenza di stress luminoso (no stress), dopo 30' dallo stress e dopo 24 ore dallo stress. Ciascun punto della curva rappresenta la media \pm es (n=5). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le piante.

Fig.18: Analisi densitometrica ed espressione della proteina D1 in piante non irraggiate (a) e piante irraggiate (b). In figura sono mostrate le densitometrie ed i profili di espressione proteica in foglie in assenza di stress luminoso (no stress), dopo 30' dallo stress e dopo 24 ore dallo stress. Ciascun punto della curva rappresenta la media \pm es (n=3). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le piante.

CAPITOLO 7

Fig.1: Colture in camere di crescita con luce LED. Sono visibili all'interno delle camere i trattamenti luminosi RGB (A) e RB (B).

Fig.2: Altezza delle piante (a), numero di foglie (b), numero di fiori (c) e numero di frutti (d) in piante di *S. lycopersicum* L. 'Micro-Tom' cresciute ai regimi luminosi WL (controllo), RGB (red-green-blue) e RB (red-blue). Ciascun istogramma rappresenta la media \pm es (n = 5). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

Fig.3: Peso fresco di frutti, foglie e fusti misurato al termine del ciclo vitale in piante di *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom' cresciute ai regimi luminosi WL (controllo), RGB (red-green-blue) e RB (red-blue). Ciascun istogramma rappresenta la media \pm es (n = 5). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

Fig.4: Area fogliare, LA (a), area fogliare specifica, SLA (b), contenuto idrico relativo, RWC (c) e contenuto fogliare di sostanza secca, LDMC (d) in piante di *S. lycopersicum* L. 'Micro-Tom' cresciute ai trattamenti luminosi WL (controllo), RGB (red-green-blue) e RB (red-blue). Ciascun istogramma rappresenta la media \pm es (n = 5). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

Fig.5: Resa quantica del trasporto elettronico del PSII (\square PSII), attività di trasporto elettronico (ETR), quenching-non fotochimico (NPQ) e massima resa quantica del PSII (Fv/Fm) in piante di *S. lycopersicum* L. 'Micro-Tom' cresciute ai trattamenti luminosi WL (controllo), RGB (red-green-blue) e RB (red-blue). Ciascun punto rappresenta la media \pm es (n=5). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

Fig.6: Fotosintesi netta (a) e conduttanza stomatica (b) in foglie di piante di *S. Lycopersicum* 'Micro-Tom' cresciute ai trattamenti luminosi: WL (controllo), RGB (red-green-blue) e RB (red-blue). Ciascun istogramma rappresenta la media \pm es (n=4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

Fig.7: analisi densitometrica (a) dei profili Western blot (b) della proteina D1 in foglie di piante di *S. Lycopersicum* 'Micro-Tom' cresciute ai trattamenti luminosi: WL (controllo), RGB (red-green-blue) e RB (red-blue). Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 3). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

Fig.8: analisi densitometrica (a) dei profili Western blot (b) dell'enzima Rubisco in foglie di piante di *S. Lycopersicum* 'Micro-Tom' cresciute ai trattamenti luminosi: WL (controllo), RGB (red-green-blue) e RB (red-blue). Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 3). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

Fig.9: Attività dell'enzima SOD (a), CAT (b), e contenuto di AsA (c) in frutti di piante di *S. Lycopersicum* 'Micro-Tom' cresciute a tre diversi trattamenti luminosi: WL (controllo), RGB (red-green-blue) e RB (red-blue). Ciascun istogramma rappresenta la media \pm es (n=4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

ELENCO DELLE TABELLE

CAPITOLO 1

Tab.1: Valori dei fattori di ponderazione WR per tipo di radiazione, stabiliti nelle Raccomandazioni 2007 della Commissione Internazionale per la Protezione Radiobiologica (ICRP) nella Pubblicazione 103.

CAPITOLO 3

Tab.1: Presenza di fiori, baccelli, clorosi fogliare e necrosi in piante di *P.vulgaris* esposte a diverse dosi di raggi X. Le osservazioni sono state effettuate 22 giorni dopo l'irraggiamento.

CAPITOLO 5

Tab.1: Concentrazioni e volumi dei componenti utilizzati nel mix di reazione per PCR

Tab.2: Sequenza 5' → 3' dei primers OPB (Sigma-Aldrich)

Tab.3: Protocollo utilizzato per la Reazione a Catena della Polimerasi (PCR)

Tab.4: Misure di distanza genetica tra i campioni calcolate secondo Nei (1972)

ABBREVIAZIONI

AsA	Acido ascorbico
BLSS	Sistemi biorigenerativi di supporto alla vita
Car	Carotenoidi
CAT	Catalasi
Chl	Clorofilla
ETR	Attività di trasporto elettronico attraverso il PSII
Fv/Fm	Massima efficienza fotochimica del PSII
GCR	Radiazione cosmica galattica
GDI	Giorni dopo l'irraggiamento
GDS	Giorni dalla semina
Gs	Conduttanza stomatica
Gy	Grey
H ₂ O ₂	Perossido di idrogeno
HZE	Nuclei di alta energia e alto numero atomico
IR	Radiazioni ionizzanti
LED	Diodo a emissione luminosa
LET	Trasferimento di energia lineare
LHC	Complesso antenna
NIR	Radiazioni non ionizzanti
NPQ	Quenching non-fotochimico
O ₂ ⁻	Ione superossido
PAR	Radiazione fotosinteticamente attiva
PARP	Poli ADP-ribosio polimerasi
PCR	Reazione a catena della polimerasi
PPFD	Densità del flusso fotonico fotosintetico
PSII	Fotosistema II
RAPD PCR	Random Amplified Polymorphic DNA-PCR
RBE	Efficacia biologica relativa
ROS	Specie reattive dell'ossigeno
RUBISCO	Ribuloso-1,5-bisfosfato carbossilasi/ossigenasi
SOD	Superossido dismutasi
ÖPSII	Resa quantica del trasporto elettronico lineare del PSII

PREMESSA

Lo studio degli effetti della radiazione ionizzante sulle piante è un campo di indagine molto interessante per la biologia poiché è al centro di numerosi interessi scientifici che riguardano i programmi di miglioramento genetico delle colture per massimizzare la produttività (Maity et al., 2005; Yu et al., 2005; Mudibu et al., 2011); studi di radioecologia per comprendere le conseguenze della diffusione di radionuclidi e sostanze radioattive negli ecosistemi (Aleksakhin et al., 2006.); e la possibilità di coltivare le piante in Sistemi Bio-Rigenerativi per il supporto alla vita umana nello Spazio (BLSSs - *Bioregenerative Life Support Systems*), (Wheeler et al., 2008).

Nell'ambito della biologia spaziale vegetale comprendere il comportamento delle piante superiori in un ambiente ostile come quello dello Spazio, rappresenta indubbiamente una difficile sfida per gli scienziati, e risulta estremamente importante in un'ottica futuristica della colonizzazione spaziale, in cui le piante potrebbero giocare un ruolo fondamentale come sostegno fisico e psicologico per gli astronauti durante le missioni di lunga durata (Williams, 2002; Wheeler et al., 1996; De Micco et al., 2009). Nel contesto delle BLSSs le piante svolgerebbero un ruolo chiave sottraendo CO₂ e producendo O₂ attraverso la fotosintesi, rigenerando dunque l'aria, e fornendo al contempo cibo fresco per l'equipaggio; inoltre la presenza di piante potrebbe rappresentare un valido supporto psicologico per gli astronauti mitigando lo stress dovuto alla distanza dalla Terra (De Micco et al., 2011).

Tuttavia in ambiente spaziale le piante sarebbero soggette ad una serie di limitazioni imposte dagli stessi fattori ambientali che agiscono sulla Terra (temperatura, umidità, luce e pressione) seppur con una diversa intensità, oltre che all'azione di nuovi fattori, quali ridotta microgravità, elevati livelli di radiazioni cosmiche e campi magnetici modificati (Arena et al., 2013).

Attualmente i rischi legati alle radiazioni costituiscono il limite maggiore per le esplorazioni spaziali e la colonizzazione umana del sistema solare (Zeitlin et al., 2013; Cucinotta et al., 2013).

I dati in letteratura, riguardanti gli effetti delle radiazioni ionizzanti sugli organismi vegetali, sono spesso contrastanti e non si prestano ad interpretazioni univoche. In generale, la gravità degli effetti delle radiazioni ionizzanti dipende sia da fattori legati alla radiazione stessa (ad esempio, il LET della radiazione, la dose totale, il tasso di dose) e sia dalle caratteristiche della pianta (ad esempio, la specie, la cultivar, l'età della pianta, la struttura dell'organo o tessuto, il livello di ploidia), (Holst and Nagel, 1997; De Micco et al., 2011).

Generalmente le radiazioni ad alto LET (Linear Energy Transfer), protoni e ioni pesanti, sono molto più dannose delle radiazioni a basso LET (raggi X e gamma) nell'indurre danni cellulari e mutazioni letali; generalmente la pericolosità della radiazione ionizzante risulta differente a seconda dello stadio fenologico in cui la pianta riceve l'irraggiamento. Il seme, rappresenta lo stadio più resistente, grazie alle sue caratteristiche strutturali e metaboliche mentre le giovani plantule, risultano essere più vulnerabili in particolare per quanto riguarda l'apparato fotosintetico (De Micco et al., 2011).

Generalmente, le radiazioni ionizzanti possono danneggiare le molecole biologiche attraverso un'azione diretta, interagendo direttamente con la molecola bersaglio, o un'azione indiretta, dove, a causa dei processi di radiolisi dell'acqua, si ha la produzione di elevate quantità di radicali liberi. Entrambi questi meccanismi possono alterare le normali funzioni cellulari determinando un danno sufficiente a causare morte cellulare e/o mutazioni del DNA con conseguenze più o meno gravi (Goodhead, 1994).

La capacità della pianta di attivare meccanismi di protezione e/o riparazione in grado di annullare o mitigare gli effetti dello stress ossidativo causato dalle radiazioni ionizzanti, è alla base della radioresistenza di una determinata specie, proprietà estremamente importante nell'ottica di un possibile utilizzo delle piante nei Sistemi Biologici Rigenerativi per il supporto alla vita umana nello spazio (Esnault et al., 2010).

In questo contesto, la ricerca proposta mira a valutare gli effetti di differenti dosi di radiazioni ionizzanti a basso ed alto LET (Linear Energy Transfer) su diverse specie di piante superiori mediante un approccio multidisciplinare che prevede la valutazione di caratteristiche morfologiche, eco-fisiologiche e genetiche a seguito di

esposizione della pianta a radiazioni ionizzanti nelle diverse fasi del suo sviluppo. Particolare attenzione è stata rivolta alla regolazione dell'apparato fotosintetico e ai meccanismi messi in atto dalle piante per fronteggiare e/o evitare i danni radio indotti.

Questi esperimenti ampliando le attuali conoscenze scientifiche sull'effetto che le radiazioni ionizzanti, di differente qualità ed intensità, possono determinare sulle piante superiori a livello di cellula, tessuto ed organo hanno permesso di identificare, per le specie studiate, i valori soglia al di sopra dei quali gli effetti benefici della radiazione (o fenomeni ormetici) si trasformano in danni irreversibili a livello funzionale e strutturale. Tali informazioni si rivelano di grande utilità per suggerire una possibile utilizzazione di queste specie a bordo delle BLSSs.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 Le radiazioni ionizzanti

Il termine “radiazione” indica la modalità con cui l’energia si propaga da un punto all’altro dello spazio, senza il trasporto di quantità macroscopiche di materia.

Le radiazioni si distinguono in non ionizzanti (NIR) o ionizzanti (IR) in base alla loro capacità di produrre o meno la ionizzazione del mezzo attraversato.

Quando le radiazioni attraversano la materia, cedono ad essa, tutta o parte dell’energia che posseggono, e possono produrre lungo il loro percorso alterazioni a livello atomico e molecolare.

Nello specifico, l’interazione iniziale delle radiazioni con la materia dipende, quantitativamente e qualitativamente, dalla natura, dalla massa, dalla carica e dall’energia delle radiazioni prese in considerazione.

L’energia delle radiazioni si misura in elettronVolt (eV) dove un elettronvolt è l’energia che acquista una particella elementare nell’attraversare una differenza di potenziale di 1 volt; i suoi multipli sono il KeV, il MeV ed il GeV.

Le radiazioni con energia sino a 10 eV non riescono a produrre ionizzazione poiché tale valore corrisponde all’energia di legame degli elettroni più esterni degli atomi e quindi sono definite non ionizzanti (NIR).

Invece, tutte le radiazioni con energia superiore a 10 eV, riescono ad indurre fenomeni di ionizzazione in quanto l’energia rilasciata nel mezzo è superiore all’energia minima di legame dell’elettrone all’atomo. In questo caso, le radiazioni sono in grado di provocare il rilascio dell’elettrone nel mezzo e vengono quindi definite radiazioni ionizzanti (IR) (Figura 1).

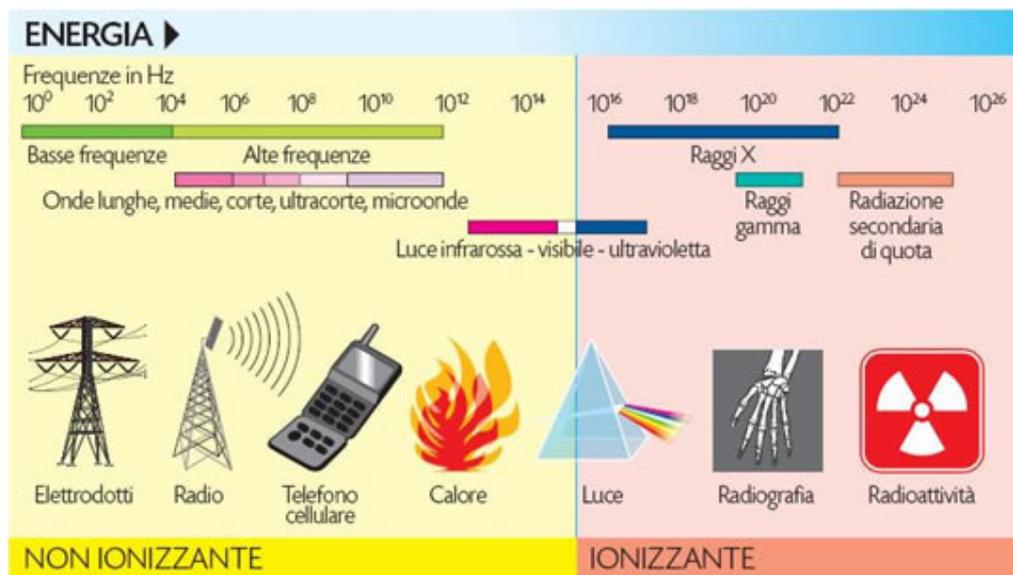


Figura 1: differenza tra radiazione ionizzante e non ionizzante.

Le radiazioni ionizzanti, a loro volta, vengono classificate in:

- Radiazioni direttamente ionizzanti;
- Radiazioni indirettamente ionizzanti.

Le radiazioni direttamente ionizzanti comprendono le particelle α (o adroni carichi), i protoni, gli ioni e gli elettroni (detti anche particelle β se derivanti da processi di disintegrazione).

Le radiazioni direttamente ionizzanti interagiscono a livello atomico con la materia mediante meccanismi di eccitazione e ionizzazione.

Nelle eccitazioni, l'energia rilasciata è inferiore a 10 eV, energia necessaria ad espellere dall'atomo uno dei suoi elettroni di valenza (elettroni dell'orbitale più esterno). In seguito all'interazione di queste radiazioni a bassa energia, l'atomo passa dallo stato fondamentale ad uno stato eccitato per spostamento di orbitale di uno o più elettroni. Nelle ionizzazioni l'energia ceduta dalle radiazioni è maggiore dell'energia di legame dell'elettrone di valenza che quindi viene espulso dall'atomo di appartenenza. A seguito di tale evento si crea una coppia di ioni rappresentata dall'elettrone, o ione negativo, e dall'atomo, che perdendo l'elettrone diventa un ione positivo.

Delle radiazioni indirettamente ionizzanti fanno parte neutroni, Raggi X e Raggi γ (o fotoni); tali radiazioni, a differenza di quelle direttamente ionizzanti, quando

interagiscono con la materia determinano fenomeni di ionizzazione attraverso dei meccanismi “indiretti”. In particolare, i neutroni interagiscono con la materia mediante collisione diretta con i nuclei atomici. In base all’energia posseduta si distinguono neutroni lenti (da 0 a 1 keV), neutroni veloci (da 0,5 a 10 MeV), e neutroni intermedi, la cui energia è compresa fra quella dei neutroni lenti e veloci. I neutroni lenti interagiscono essenzialmente penetrando nei nuclei atomici, mentre i neutroni veloci principalmente per collisioni elastiche con i nuclei.

I raggi X ed i raggi γ sono radiazioni elettromagnetiche composte da fasci di fotoni, che interagendo con la materia sono capaci di produrre ionizzazioni attraverso tre processi:

1) Assorbimento o effetto fotoelettrico: questo processo prevede l’assorbimento del fotone in un orbitale, e ciò provoca l’espulsione dell’elettrone dalla sua orbita, che dopo un breve intervallo di tempo verrà occupata da un’altro elettrone con emissione di radiazione caratteristica. E’ la modalità prevalente per i fotoni di bassa energia (< 25 keV).

2) Diffusione ed effetto Compton: questo processo si verifica quando l’energia dei fotoni aumenta (da 25 keV a 25 MeV).

In questo caso durante la collisione tra il fotone e l’elettrone dell’atomo non vi è perdita di energia e così all’elettrone di rimbalzo viene ceduta energia mentre il fotone si allontana con un’energia diminuita. Il fotone diffuso può ulteriormente interagire con la materia o per effetto Compton o per effetto fotoelettrico in rapporto alla sua energia residua.

3) Produzione di coppie (o effetto fotonucleare): questo processo può verificarsi per fotoni di energia superiore a 1,02 MeV. Nel campo elettrico che circonda il nucleo, il fotone si trasforma in un elettrone e in un positrone (con massa uguale all’elettrone). L’energia del fotone di 1,02 MeV è ripartita tra le particelle prodotte come energia cinetica.

Il positrone, circondato da una nube di elettroni quando attraversa un mezzo, dopo alcune interazioni, che sottraendogli energia lo fanno rallentare, collide con un elettrone e viene annichilito, ovvero vengono emessi due fotoni di energia pari a 0,51 MeV, detti radiazioni (γ) di annichilazione.

1.1.1 Grandezze dosimetriche delle radiazioni ionizzanti

Nonostante tutte le radiazioni ionizzanti interagiscano con la materia in modo analogo, i diversi tipi di radiazioni differiscono nella loro capacità o efficacia di recar danno ai sistemi biologici. Quindi, per caratterizzare il campo di radiazione e il suo effetto sul tessuto biologico, in radiobiologia si utilizzano una serie di grandezze dette dosimetriche.

In particolare per definire la qualità della radiazione viene utilizzata come grandezza il LET (Linear Energy Transfer); per indicare la quantità e il rateo di radiazione assorbita dalla materia si fa riferimento alla dose assorbita, ed infine per indicare gli effetti biologici indotti dalla radiazione in un organismo si utilizzano grandezze quali la dose equivalente e l'Efficacia Biologica Relativa (RBE).

Il LET (Linear Energy Transfer), termine introdotto da Zirkle nel 1940, indica l'energia trasferita dalla radiazione per unità di percorso. L'unità di misura più utilizzata è il keV/ μm . Questa grandezza "qualifica" le radiazioni in base alla frequenza e alla localizzazione spaziale degli eventi di ionizzazioni prodotti lungo il percorso. Alcune radiazioni provocano ionizzazioni multiple, ravvicinate nello spazio, lungo un percorso più o meno rettilineo mentre altre provocano eventi di ionizzazione separati, distribuiti in maniera omogenea all'interno della materia che attraversano. Il LET aumenta all'aumentare della frequenza e della vicinanza degli eventi di rilascio d'energia lungo il percorso (Figura 2). Per le radiazioni indirettamente ionizzanti, il LET si calcola considerando l'energia cinetica degli elettroni secondari prodotti. Questa tipologia di radiazioni, presenta bassi valori di LET (0.3 e 2.5 keV/ μm) in quanto provoca eventi di ionizzazione meno frequenti e disposti in maniera omogenea nella materia, e sono chiamate sparsamente ionizzanti. Per le radiazioni direttamente ionizzanti, il valore del LET si basa sull'energia e sulla carica delle particelle primarie. In questo caso vi sono sia ioni leggeri con bassi valori del LET, ma anche ioni pesanti che raggiungono valori del LET molto alti. Quando i valori del LET sono superiori a 50-100 keV/ μm la radiazione è definita densamente ionizzante.

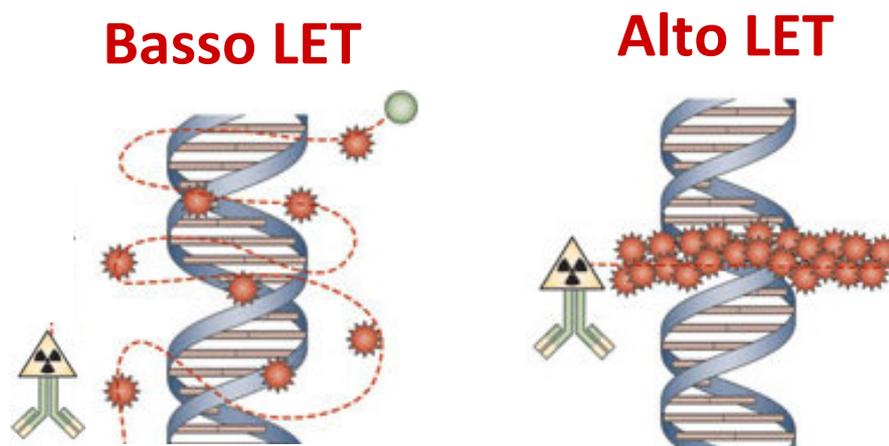


Figura 2: Frequenza e localizzazione spaziale degli eventi di ionizzazioni prodotti lungo il percorso dalle radiazioni ionizzanti a basso ed alto LET (Linear Energy Transfer).

La dose assorbita, invece, è l'energia media dE ceduta dalle radiazioni ionizzanti in un elemento volumetrico di massa dm :

$$D = dE/dm$$

Questa grandezza definisce l'energia assorbita per unità di massa, ed è espressa in $J\ kg^{-1}$, unità nota come gray (Gy) nel SI.

La dose assorbita, quindi indica la "quantità" di radiazioni che hanno colpito il tessuto, indipendentemente dalla "qualità". Tuttavia l'effetto biologico delle radiazioni dipende anche dalla qualità della radiazione ionizzante. Quindi per confrontare dosi di radiazioni di diversa qualità, è stata introdotta un'altra grandezza: la dose equivalente (H). L'unità di misura di questa grandezza è il sievert (Sv) che ha le stesse dimensioni della dose assorbita, ovvero energia per unità di massa ($1Sv=1J/1Kg$). Rispetto alla dose assorbita e alla sua unità di misura gray, che indicano in assoluto una dose di energia assorbita da una unità di massa, la dose equivalente indica piuttosto gli effetti biologici della radiazione sull'organismo. I diversi tipi di radiazione infatti, a parità di dose assorbita, possono avere effetti più o meno dannosi per l'organismo. La dose equivalente di una radiazione $H_{T,R}$ è definita come il prodotto tra la dose assorbita media nel tessuto o nell'organo T di quella radiazione $D_{T,R}$ in Gy, per il fattore adimensionale di ponderazione di quella radiazione stessa W_R stabilito dalla legge:

$$H_{T,R} = D_{T,R} \times W_R$$

Il fattore di ponderazione della radiazione W_R è stato ricavato da dati sperimentali ed epidemiologici e può assumere valori che vanno da 1, per radiazioni a basso LET

(raggi X e γ), a 20, per radiazioni ad alto LET (ioni pesanti), cioè la stessa dose assorbita può avere effetti che sono 20 volte maggiori a seconda della qualità della radiazione ionizzante. Un'apposita commissione internazionale, la ICRP (International Commission for Radiation Protection) stabilisce periodicamente delle tabelle dove, per ogni tipo di radiazione, sono riportati i relativi fattori di ponderazione:

Tabella 1: Valori dei fattori di ponderazione W_R per tipo di radiazione, stabiliti nelle Raccomandazioni 2007 della Commissione Internazionale per la Protezione Radiobiologica (ICRP) nella Pubblicazione 103.

Tipo di radiazione	Fattore di ponderazione della radiazione, W_R
Fotoni	1
Elettroni e muoni	1
Protoni e pioni carichi	2
Particelle alfa, frammenti di fissione e ioni pesanti	20
Neutroni	Funzione continua dell'energia del neutrone

Per paragonare qualità diverse di radiazioni ionizzanti nella loro efficacia di induzione di un determinato effetto, è stata introdotta la grandezza RBE, ovvero l'Efficacia Biologica Relativa. L'RBE di una radiazione indica il rapporto tra la dose di una radiazione di riferimento, in genere raggi X, necessaria per produrre un certo effetto biologico, e la dose della radiazione in esame in grado di produrre lo stesso effetto biologico. Questa grandezza permette di stabilire il rischio biologico associato all'esposizione ad una certa radiazione. L'RBE è proporzionale al LET e cresce al crescere del LET della radiazione.

1.1.2 Radiazione ionizzante ed effetto biologico sugli organismi viventi

Le radiazioni ionizzanti interagendo con la materia che incontrano nel loro percorso sono in grado di indurre alterazioni transitorie o permanenti delle

caratteristiche chimiche e fisiche dei materiali irradiati. Per quanto riguarda la materia vivente, le radiazioni sono in grado di modificare le strutture biologiche, tra cui la cellula, unità biologica fondamentale organizzata in tessuti ed organi. L'azione delle radiazioni si ripercuote su tutti le componenti subcellulari della cellula stessa. La ionizzazione provocata dalle radiazioni, innesca nelle cellule una serie di modificazioni fisico-chimiche tali da determinare un'alterazione delle loro funzioni vitali.

L'insorgenza del danno biologico passa attraverso diversi stadi:

- in primo luogo si verifica la formazione di ioni con successiva produzione di molecole reattive (Stadio fisico-chimico);
- successivamente le molecole create si reagiscono con le strutture biologiche della cellula (Stadio chimico);
- infine si verificano e si manifestano alterazioni cellulari (Stadio biologico).

La manifestazione degli effetti biologici è preceduta da un periodo di latenza la cui durata può variare da pochi minuti a decenni, a seconda della dose di irraggiamento e della radiosensibilità intrinseca dell'organismo. Dosi molto elevate di radiazioni possono causare la morte immediata o danni irreversibili alle cellule, mentre l'irraggiamento acuto o cronico con basse dosi può portare allo sviluppo di tumori anche dopo decenni dall'esposizione (Mettler, 2012).

Inoltre, l'effetto biologico delle radiazioni ionizzanti può anche coinvolgere le generazioni successive. Tuttavia, gli effetti transgenerazionali delle radiazioni sembrano dipendere molto dal tipo di organismo preso in considerazione. Ad esempio, è stato dimostrato che nei topi, l'esposizione alle radiazioni può comportare un aumento della frequenza di mutazioni nelle cellule germinali, con conseguenti malformazioni e mutazioni letali nella prole (Nakamura et al., 2013). Al contrario, negli esseri umani non è ancora stata riportata nessuna prova di effetti ereditari causati dalle radiazioni (Tawn et al., 2002).

L'interazione della radiazione con le cellule è estremamente complessa, e può avvenire attraverso un duplice meccanismo:

- Diretto, in cui le macromolecole cellulari, subiscono effetti di ionizzazione ed eccitazione essendo esse stesse bersaglio delle radiazioni;

- Indiretto, in cui le alterazioni a carico delle macromolecole sono dovute all'attacco ossidativo da parte dei radicali chimici reattivi ROS (Reacting Oxygen Species) prodotti dalla radiolisi dell'acqua, che rappresenta la maggior componente molecolare delle cellule viventi (Figura 3).

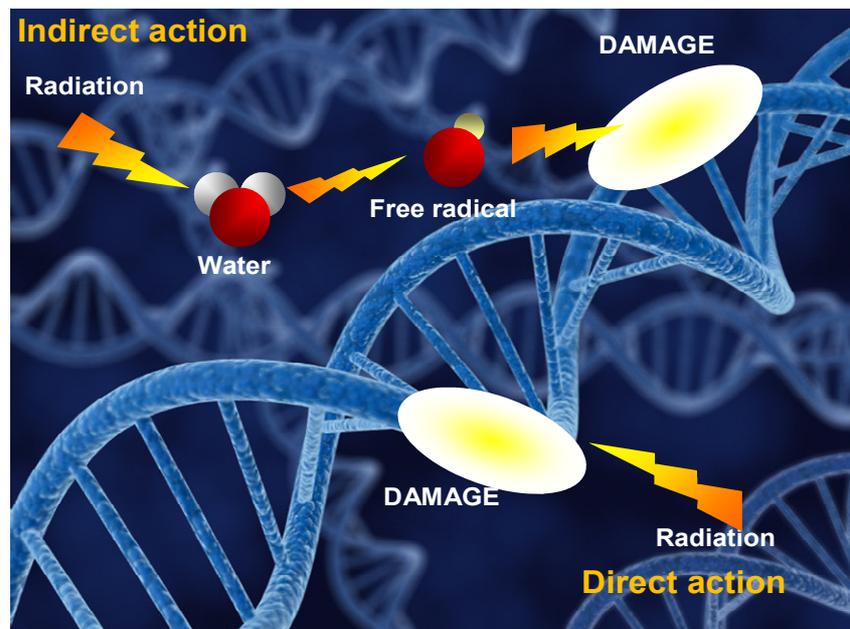


Figura 3: Meccanismi d'azione della radiazione ionizzante sulla molecola di DNA.

E' importante specificare che i meccanismi di risposta e di resistenza alle radiazioni ionizzanti risultano essere differenti nei diversi organismi, in particolare tale risposta dipende dalla qualità e dalla dose della radiazione oltre che dalle caratteristiche intrinseche del sistema vivente. Le macromolecole, in particolare il DNA, sono i principali bersagli cellulari delle radiazioni, anche se vi è una forte differenza tra danni che possono insorgere in cellule di piante e mammifero. Le differenze nella struttura e nel metabolismo tra i due tipi di cellule risultano in una maggiore resistenza delle cellule vegetali rispetto alle cellule di mammifero; ne consegue che il termine "alte dosi" può assumere un'accezione diversa a seconda se si riferisce a cellule vegetali o di mammifero (Real et al., 2004). È stato recentemente dimostrato che dosi di raggi X fino a 10 Gy non inducono effetti negativi all'anatomia fogliare di fagiolo quando l'irraggiamento è diretto su tessuti maturi (De Micco et al., 2014). Al contrario, nell'uomo, dosi simili possono causare la morte

entro giorni o settimane, a causa delle infezioni derivanti dalla deplezione dei globuli bianchi.

Per quanto riguarda gli effetti sui tessuti umani, la dose soglia al di sotto della quale non si verificano effetti deterministici, è di 0,1 Gy sia per radiazioni a basso LET (Linear Energy Transfer) che alto LET (ICRP Publication 103, 2007). Pertanto, nell'ambito dei programmi finalizzati alla radioprotezione umana, dosi superiori a 0,1 Gy sono considerate biologicamente critiche. Tuttavia, nonostante le evidenti differenze tra i due sistemi cellulari, uno dei più importanti effetti comuni è l'interruzione del ciclo cellulare. In cellule animali, l'esposizione a radiazioni, anche a dosi inferiori a 0,1 Gy, induce una temporanea interruzione del ciclo cellulare, mentre dosi più elevate possono causare mutazioni del DNA e riarrangiamenti cromosomici che possono comportare la completa interruzione della divisione cellulare (Huang et al, 2004). A causa della loro natura fisica, le radiazioni ionizzanti ad alto LET (ad esempio protoni e ioni pesanti) sono più pericolose di quelle a basso LET (ad esempio raggi X e gamma), generando più eventi di mutazione e morte cellulare sia nelle cellule vegetali che di mammifero (Durante and Cucinotta, 2008; De Micco et al., 2011; Wei et al., 2006)

In generale, all'aumentare del LET, aumenta anche l'efficacia biologica relativa (RBE) delle radiazioni. Queste osservazioni implicano che radiazioni ad alto LET non solo possono arrecare danni più gravi alla cellula, ma anche attivare diversi meccanismi di risposta.

A seconda del tipo di danno al DNA, le cellule possono innescare diversi meccanismi di riparazione. I principali tipi di danno al DNA causati dalle radiazioni ionizzanti sono la formazione di basi anomale e rottura a singolo filamento (SSB), che possono essere eliminati dal sistema di riparazione per escissione di base (BER), e le rotture a doppio filamento (DSB) aggiustate da meccanismi di riparazione per ricombinazione omologa, HR (Homologous recombination) e non omologa NHEJ, (Non Homologous End Joining) (Jackson, 2002; Van Gent et al, 2001).

Generalmente, la rottura a singolo filamento (SSB), come pure anomalie di singole basi possono essere normalmente riparate, mentre le rotture a doppio filamento (DSB) sono di norma considerate più gravi poiché inducono con maggiore

probabilità l'insorgenza di aberrazioni cromosomiche e instabilità genomica (Hada and Georgakilas, 2008; Wyman and Kanaar, 2006; Bedford and Phil, 1997).

La natura del danno cromosomico è diversa a seconda se sia stato causato dalle radiazioni sparsamente o densamente ionizzanti. Quest'ultime, infatti, inducono riarrangiamenti cromosomici notevolmente più complessi in linfociti umani dopo l'esposizione che portano, con elevata probabilità, a morte cellulare (Anderson et al., 2002; Johannes et al., 2004; Lee et al., 2011; George et al., 2003).

È interessante notare che basse dosi di radiazioni ionizzanti (nell'intervallo o leggermente superiori ai livelli naturali) possono addirittura rivelarsi vantaggiose per i sistemi biologici, in quanto possono stimolare l'attivazione di meccanismi di protezione e riparo, un fenomeno conosciuto come ormesi (Feinendegen, 2005).

Un modello che sostiene il possibile effetto benefico delle radiazioni ionizzanti sugli animali è il modello di risposta adattativa, che è stato descritto per la prima volta mediante un esperimento in cui linfociti umani in coltura trattati con basse concentrazioni di timidina radioattiva mostravano meno aberrazioni cromosomiche rispetto alle colture cresciute in assenza di timidina radioattiva, in risposta ad una dose elevata di radiazioni (Olivieri et al., 1984). A conferma di ciò, diversi studi in vitro ed in vivo hanno mostrato che il danno al DNA e l'insorgenza di tumori è ridotta quando l'esposizione a dosi elevate di raggi X o gamma è preceduta da esposizioni a dosi acute o croniche più basse (da 1 a 100 mGy) (Hosoi and Sakamoto, 1993; Azzam et al., 1994; Redpath et al., 2003; Ina et al., 2005).

1.1.3 Lo studio delle radiazioni ionizzanti nella biologia vegetale

Lo studio degli effetti della radiazione ionizzante sulle piante è un campo di indagine al centro di numerosi interessi scientifici. Da un lato, elevati livelli di radiazione ionizzante possono alterare la normale crescita delle piante nello spazio, o sulla terra, nel caso di disastri nucleari come quello di Chernobyl e Fukushima (Real et al., 2004; De Micco et al., 2011). Dall'altro lato, le radiazioni ionizzanti possono essere utilizzate come strumento per indurre un ampio spettro di mutazioni in programmi di miglioramento genetico delle colture (breeding programs) oppure per

lo sviluppo di nuovi metodi di decontaminazione microbica (Kumari et al., 2009; Tanaka et al., 2010). La maggior parte degli esperimenti che prevedono l'esposizione delle piante alle radiazioni ionizzanti è finalizzata ad analizzare l'effetto di un singolo tipo di radiazione con un'ampia gamma di dosi al fine di costruire delle curve dose-risposta e per testare la radioresistenza della pianta (De Micco et al., 2011). Generalmente, la risposta a basse dosi (cioè, fino a 10 Gy) interessa gli studi nell'ambito della biologia spaziale, mentre l'impiego di dosi più elevate è importante non solo per il loro ruolo come controlli positivi ma anche in quanto fornisce informazioni utili per applicazioni terrestri nell'ambito della radioecologia (De Micco et al., 2011; Durante and Kronenberg, 2005).

Per quanto riguarda l'esplorazione umana dello spazio, le missioni di lunga durata si basano sulla possibilità di rigenerare le risorse nei Sistemi Biologici Rigenerativi (BLSSs, Bioregenerative Life Support Systems) dove le piante possono svolgere un ruolo chiave (Hu et al., 2010; De Micco et al., 2009). Tuttavia, anche se le piante risultano essere più resistenti rispetto ad altri organismi a specifici fattori spaziali (tra cui la ridotta gravità e le radiazioni cosmiche), vi sono anche evidenze di una crescita alterata e ridotta capacità riproduttiva (Halstead and Dutcher, 1987; De Micco et al., 2014). Molti studi hanno indicato la presenza di fenomeni positivi o negativi in piante esposte a radiazioni ionizzanti a basso LET (ad esempio, raggi X e γ) ed alto LET (ad esempio, protoni e ioni pesanti) (De Micco et al., 2011). Sicuramente, in molti esperimenti effettuati nello Spazio, le piante sono state esposte contemporaneamente a varie combinazioni di gravità e radiazioni. La ricerca a Terra è quindi utile per distinguere le reazioni vegetali innescate da ognuno dei due fattori. Sulla Terra, riprodurre lo spettro di radiazione spaziale risulta impossibile a causa della sua complessità, anche se i diversi tipi di radiazione possono essere prodotti singolarmente da acceleratori di particelle (Bennett et al., 2013). L'esposizione radioattiva che gli organismi possono incontrare nello Spazio dipende dalle caratteristiche della schermatura dei veicoli spaziali e/o piattaforme planetarie nonché dall'evoluzione del ciclo solare durante la permanenza nello spazio; tuttavia, si può stimare che una permanenza di un anno nello Spazio esporrebbe gli organismi ad una dose inferiore a 10 Gy (Bennett et al., 2013; Hassler et al., 2014). Nello Spazio, una grande frazione della dose di esposizione è dovuta ai protoni (circa

87%), che sono particelle a basso LET con efficacia simile ai raggi X. Pertanto, gli studi iniziali possono sfruttare i raggi X come radiazione di riferimento per ottenere dati che sono la base necessaria per il futuro confronto con fasci di ioni accelerati (Durante and Cucinotta, 2008; Arena et al., 2014a).

1.2 Le radiazioni ionizzanti sulla Terra: sorgenti naturali ed antropiche

La radioattività è una normale componente dell'ambiente naturale. Animali e piante, fin dalla loro comparsa sulla terra sono stati costantemente esposti alle radiazioni di origine naturale e queste sono rimaste l'unica fonte radioattiva fino a poco meno di un secolo addietro. Ancora oggi, nonostante l'ampio impiego di sostanze radioattive artificiali, la radioattività naturale continua a fornire il maggior contributo alla dose ricevuta dagli organismi.

Alla radioattività naturale contribuisce una componente di origine terrestre e una componente di origine extra-terrestre (Figura 4). La prima è data da radionuclidi primordiali presenti in diverse quantità nelle rocce e nei minerali della crosta terrestre. La seconda è costituita dai raggi cosmici e dai radionuclidi cosmogenici. Tutte queste sorgenti determinano il fondo naturale di radiazioni. I radionuclidi primordiali prevalenti sono il K-40 (potassio), il Rb-87 (Rubidio), U-238 (Uranio) e il Th-232 (Torio). I livelli di radionuclidi naturali nel suolo e nelle rocce variano profondamente da luogo a luogo in rapporto alla conformazione geologica delle diverse aree. I valori di concentrazioni di attività nel suolo sono compresi tra 100 e 700 Bq.kg⁻¹ per il K-40, e tra 10 e 50 Bq.kg⁻¹ per i radionuclidi U-238 e Th-232. Nell'aria, la radiazione naturale è dovuta principalmente ai gas radon e toron, che variano fortemente a seconda delle condizioni ambientali. Anche le acque contengono una certa quantità di radioattività, dovuta sia alle piogge che trasportano le sostanze radioattive dell'aria, sia alle acque di drenaggio che convogliano nei bacini idrici sostanze radioattive presenti nelle rocce e nel suolo.

I raggi cosmici provenienti dallo spazio, invece sono costituiti principalmente da particelle cariche (protoni e nuclei pesanti), che giungendo in prossimità della terra, risentono dell'azione del campo magnetico terrestre. Inoltre vi è una

componente solare che origina dalle esplosioni nucleari sul sole e consiste di protoni e particelle cariche positive. L'interazione di queste particelle di ad alta energia (raggi cosmici primari) con l'atmosfera terrestre determina l'emissione di numerosi prodotti secondari, quali ad esempio elettroni, fotoni, protoni e neutroni che a loro volta possono creare altre particelle secondarie.

Ai poli il contributo di dose dovuto ai raggi cosmici è maggiore rispetto alle zone equatoriali, per effetto dell'azione del campo magnetico terrestre, così come il livello di dose aumenta all'aumentare dell'altitudine, poiché si riduce lo spessore d'aria che fa da schermo. A 10 km di altitudine, ad esempio, l'esposizione alla radiazione cosmica è quasi 100 volte più elevata di quella a livello del mare. Oltre alla radioattività naturale, che fornisce da sempre il maggior contributo alla dose ricevuta dagli organismi, bisogna anche considerare le sorgenti di radiazioni ionizzanti artificiali, diffuse in particolare con lo sviluppo delle nuove tecnologie degli ultimi 60-70 anni. Attualmente, in assenza di specifici eventi (esplosioni nucleari o incidenti), è possibile individuare due settori di utilizzo, industriale e sanitario.

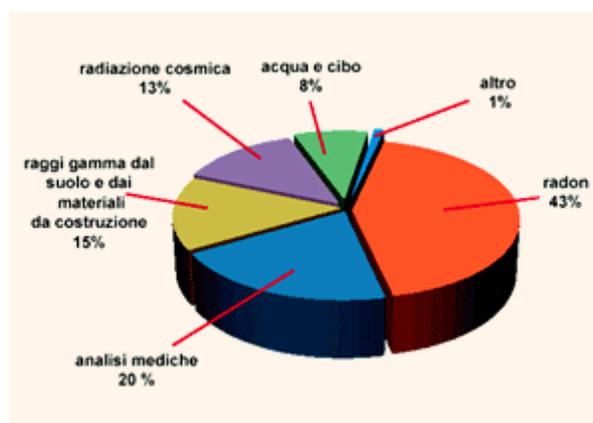


Figura 4: Rappresentazione in percentuale delle sorgenti di radiazioni in natura

1.2.1 La radioecologia

Lo studio dell'impatto di sostanze radioattive nell'ambiente, sia di origine naturale, sia di origine artificiale controllata, che accidentale, sono alla base della ricerca radioecologica.

I primi studi della radioecologia sono iniziati alla fine degli anni 50, quando i livelli atmosferici di elementi radioattivi provenienti da test nucleari sono diventati un motivo di preoccupazione per le autorità nazionali. In quegli anni, l'interesse principale era comprendere i livelli di radioattività che provocavano effetti negativi sulla salute umana, ragion per cui la maggioranza degli studi si concentrava su agro ecosistemi e dunque su piante eduli. Attualmente, la radioecologia estende il suo campo di interesse non solo agli effetti dell'inquinamento da radiazioni sulle colture, ma anche sulla vegetazione naturale a seguito di incidenti come quelli di Chernobyl e Fukushima, avvenuti rispettivamente il 26 aprile 1986 e l'11 Marzo 2011.

Questi studi si rivelano fondamentali per prevedere l'evoluzione degli ecosistemi e valutare la sicurezza alimentare delle coltivazioni in caso di rischio nucleare, al fine di pianificare azioni di protezione per un'efficace gestione del territorio.

Numerosi sono i dati raccolti a riguardo nelle zone circostanti gli impianti nucleari di Chernobyl e Fukushima in seguito agli incidenti nucleari (Figura 5).



Figura 5: risultati dei calcoli di modellizzazione relativi all'emissione nucleare dalla centrale nipponica di Fukushima-Daiichi e relativo fallout.

I risultati di questi studi hanno fornito informazioni dettagliate sulla risposta all'esposizione cronica e acuta di piante e animali in relazione alle dosi assorbite nelle aree dei disastri.

Uno studio condotto da Kozubov e Taskaev nel 2002 ha identificato diverse zone nella foresta in prossimità della centrale nucleare di Chernobyl, che variavano in base all'entità dei danni subiti dagli organismi vegetali in rapporto alla dose

assorbita: una zona letale in cui il livello di dose assorbita dagli alberi, dopo circa un anno dal disastro nucleare, variava da 60 a 100 Gy, e che è risultata essere devastante per molte specie vegetali; una zona in cui si registravano dosi fino a 30-40 Gy, dove sono stati osservati fenomeni di inibizione della crescita con necrosi del meristema apicale del germoglio nel 90-95% degli alberi di pino analizzati; ed infine una zona della foresta in cui i livelli di dose assorbita variavano da 0,5 a 6 Gy dove sono stati registrati danni biologici soprattutto a carico degli organi riproduttivi.

Anche studi condotti presso le aree forestali distanti 3 Km dalla centrale nucleare di Fukushima, hanno riportato che alberi di cedro rosso del Giappone (*Cryptomeria japonica*) manifestavano danni da radiazione a livello delle strutture riproduttive (Xu et al., 2015).

Altri studi sulla struttura genetica delle popolazioni di *Arabidopsis* hanno dimostrato che alti livelli di contaminazione radioattiva determinano con il tempo, una diminuzione della diversità genetica delle popolazioni (Abramov et al., 1992). Da questo punto di vista la contaminazione radioattiva può essere considerata come un fattore ecologico che potenzia l'azione della selezione naturale eliminando i genotipi radiosensibili.

E' stato dimostrato infatti, che i semi di queste popolazioni resistono maggiormente ad alte concentrazioni di mutageni chimici e ad ulteriori esposizioni di radiazioni- γ . Le piante che si sviluppano da questi semi mostrano un significativo aumento dell'espressione di enzimi ad azione antiossidante e di enzimi coinvolti nei processi di riparazione del DNA (Kovalchuk et al., 2004). Questi dati suggeriscono che l'esposizione cronica alle radiazioni può determinare un adattamento delle specie esposte.

1.3 Le radiazioni ionizzanti nello spazio extraterrestre

Nello spazio extraterrestre, il campo di radiazione cambia notevolmente rispetto a quello terrestre. La radiazione spaziale comprende protoni di alta energia (Z) e nuclei di alta energia e alto numero atomico, chiamati HZE (da High Z and High Energy).

In particolare la radiazione cosmica si compone di:

1. *Particelle intrappolate nelle fasce di Van Allen.* Sono particelle, principalmente elettroni e protoni di energie intermedie, intrappolate nelle fasce di Van Allen, ossia due regioni generate dal campo geomagnetico terrestre.

2. *Radiazione cosmica galattica (GCR, da Galactic Cosmic Radiation).* Questa è costituita principalmente da protoni (87%) e nuclei di elio (12%). Una piccola parte (1%) è costituita da nuclei di alta energia ed alto numero atomico. L'origine di queste particelle non è ben chiara.

3. *Protoni solari.* Costituiti principalmente da protoni e, in piccola parte, da ioni di elio e nuclei pesanti. L'origine di questa radiazione sono gli eventi solari come i brillamenti solari e le eiezioni di massa dalla corona (Durante, 2002).

La diversa composizione del campo di radiazione extraterrestre determina quindi effetti biologici differenti negli organismi esposti durante le missioni spaziali. Al fine di comprendere tali effetti vengono effettuati esperimenti principalmente di tre tipi: esperimenti a terra, che simulano le condizioni di volo (ad esempio con voli parabolici); esperimenti in volo, quindi durante le missioni spaziali ed infine esperimenti sincroni a terra e in volo con il successivo confronto tra i risultati ottenuti. Le problematiche nella realizzazione di questi programmi sperimentali sono molteplici. Tra queste, la difficoltà data dall'uso di una strumentazione complicata (e di possibili effetti delle radiazioni anche su di essa); il problema di gestire campioni biologici e la difficoltà di correlare l'effetto alla causa, cioè di stabilire con certezza che un effetto sia attribuibile all'azione delle radiazioni ionizzanti e non ad un'altra causa concomitante. Infatti nello Spazio oltre alla diversa composizione del campo di radiazione, vi sono anche altri fattori ambientali che influenzano la vita degli organismi: per es. la diversa temperatura, e la condizione di microgravità.

Per comprendere quindi gli effetti biologici delle radiazioni extraterrestri, le possibili soluzioni adottate sono l'utilizzo di una strumentazione semplice il più possibile; l'utilizzo di organismi semplici facili da gestire, come semi di piante, piante o insetti ed infine la stretta connessione spaziale tra i rivelatori di radiazioni e i contenitori dei campioni biologici.

Alcuni tra questi esperimenti, sono focalizzati sulla possibilità di coltivare le piante nello spazio, al fine di utilizzarle come "produttori" all'interno di ecosistemi

artificiali, i cosiddetti “Sistemi Biorigenerativi di supporto alla Vita” (Bioregenerative Life Support System, BLSS).

1.3.1 Le piante nei Sistemi Biologici Rigenerativi

Attualmente per missioni spaziali di breve durata, le risorse necessarie alle esigenze dell’equipaggio sono trasportate dalla Terra, tuttavia ciò non è possibile per le missioni che superano i 2-3-anni di durata (Ferlet et al., 2002). E’ stato stimato che per una missione di un anno, un equipaggio di 3 astronauti necessiterebbe di circa 33 tonnellate tra cibo, acqua ed ossigeno. Pertanto il rifornimento dalla Terra sarebbe estremamente costoso e tecnicamente difficile da effettuare. Di conseguenza, è di fondamentale importanza, per le missioni spaziali future, lo sviluppo di sistemi che consentano il riciclo continuo delle risorse: i Sistemi Biorigenerativi di Supporto alla Vita (Bioregenerative Life Support System, BLSS) o Sistemi Ecologici Controllati di Supporto alla Vita (Controlled Ecological Life Support Systems, CELSS).

I BLSSs, sono sistemi modulari chiusi basati sullo scambio di materiali ed energia tra i vari compartimenti, destinati all’uomo e alle diverse componenti biologiche, in un ciclo ideale in cui ciascun compartimento utilizza i prodotti di scarto dell’altro. In tale contesto, le piante rappresentano un’ottima componente biologica in quanto sono in grado di: rigenerare l’aria mediante il consumo di CO₂ e l’emissione di O₂ attraverso il processo fotosintetico; purificare l’acqua mediante la traspirazione, riciclare parte dei prodotti di scarto dell’equipaggio ed inoltre rappresentano una fonte di cibo fresco utile per integrare la dieta dell’equipaggio, mentre le parti vegetali incommestibili e i rifiuti organici umani possono fornire nutrienti per la crescita delle piante stesse, dopo il processo di digestione mediato da microrganismi presenti in speciali bioreattori (Wheeler et al., 2003).

Questi sistemi autosufficienti, sono quindi ecosistemi artificiali paragonabili a quelli terrestri, dove l’unico input necessario affinché l’intero sistema funzioni è rappresentato dall’energia luminosa. Negli ecosistemi terrestri, la maggior parte dell’energia entra nella biosfera attraverso il processo fotosintetico operato dalle piante (produttori) e viene poi trasferita, attraverso vari passaggi lungo la catena trofica ai consumatori (carnivori e erbivori). Quando produttori e consumatori

muoiono, i detritivori e i decompositori (batteri e funghi) degradano le sostanze organiche in elementi e composti inorganici che entreranno di nuovo nel ciclo diventando nutrienti per le piante (Figura 6).

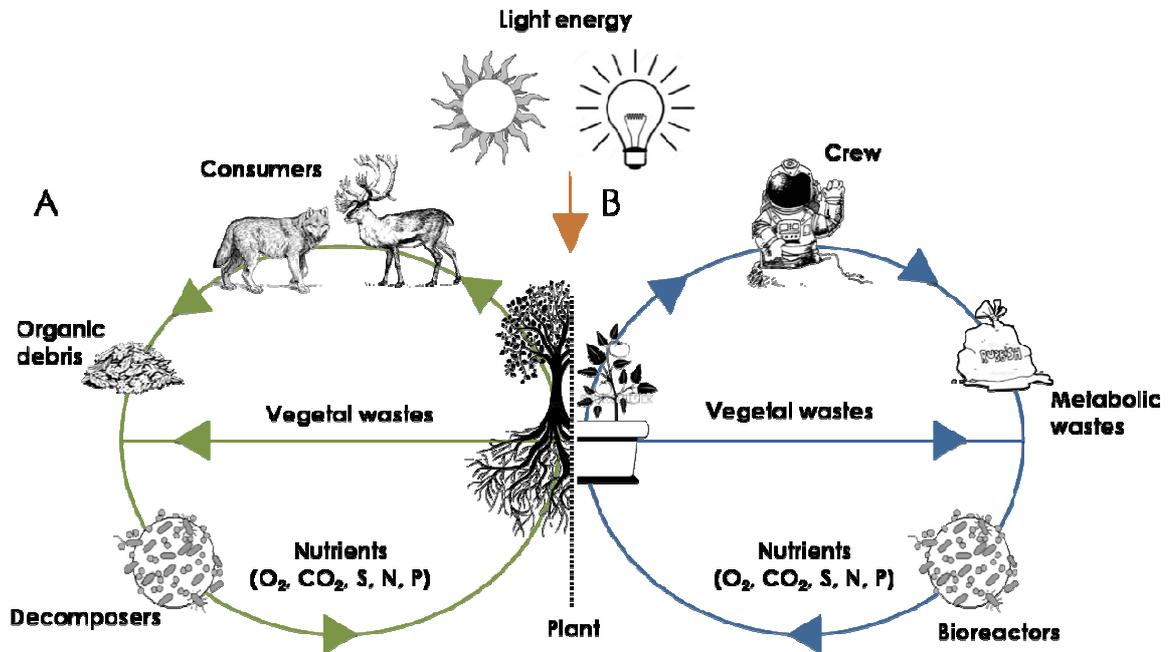


Figura 6: Analogie tra gli ecosistemi terrestri (A) e le BLSSs (B) (Da Arena et al., 2012).

I primi studi sulla scelta della componente biologica da utilizzare nelle BLSS sono stati intrapresi negli anni '50 e '60 prima dall'aeronautica statunitense, e successivamente dalla NASA. Inizialmente i moduli biologici si incentravano sull'utilizzo di batteri, mentre a partire dagli anni '80, sono iniziate le sperimentazioni anche con le piante. Tuttavia, la crescita delle piante nei BLSSs è tuttora ancora una sfida aperta per la ricerca spaziale non solo per la necessità di sviluppare nuove tecnologie dedicate, ma anche perché l'effetto dell'ambiente spaziale sulle piante non è stato ancora completamente chiarito.

1.3.2 La luce LED per la coltivazione delle piante nello Spazio

Attualmente numerosi esperimenti finalizzati alla progettazione di BLSS hanno come obiettivo quello di stabilire le condizioni ottimali per la coltivazione delle piante in opportune camere di crescita. Infatti, per ottimizzare la crescita e garantire la massima produttività delle colture, è necessario regolare e stabilire con precisione parametri di fondamentale importanza, come i livelli di intensità luminosa, concentrazione di CO₂, temperatura ed umidità relativa.

Tra i parametri menzionati, la luce è un fattore ambientale determinante per la crescita e lo sviluppo delle piante. Le piante utilizzano la luce con lunghezze d'onda comprese tra 400 e 700 nm come fonte di energia per la fotosintesi con cui formano carboidrati a partire da anidride carbonica (CO₂) e acqua (H₂O); in particolare, la luce rossa (650-700 nm) e la luce blu (460-480 nm) costituiscono le lunghezze d'onda più efficienti per il processo fotosintetico. L'intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 400 e 700 nm costituisce circa la metà della radiazione solare incidente al suolo e, essendo la fonte di energia della fotosintesi, definisce la radiazione fotosinteticamente attiva o PAR (Photosynthetic Active Radiation).

Oltre che come fonte di energia per la fotosintesi, la luce svolge anche una importante funzione di regolazione per i fenomeni fotomorfogenetici che si verificano nei diversi stadi di crescita della pianta. In particolare gli spettri di emissioni della luce ai quali si hanno maggiori risposte sono luce rossa, luce blu, UV-A, UV-B e luce rosso lontana: le componenti blu e rossa, sbilanciando il rapporto citochinine/auxine a favore delle citochinine, favorisce la schiusa di gemme ascellari e quindi la moltiplicazione dei germogli, con una forte riduzione della dominanza apicale (Hilman, 1984); la radiazione ultravioletta induce riduzione della taglia delle piante e della superficie fogliare, distruzione dei carotenoidi, aumento di spessore della lamina fogliare e accumulo di antociani nei tessuti (Teramura, 1983).

Risposte fotomorfogeniche, possono essere indotte anche da altre qualità di luce come ad esempio le lunghezze d'onda del giallo e del verde. La luce gialla (580-600 nm) sembra sopprimere l'accrescimento, impedendo la formazione della clorofilla o

dei cloroplasti (Dougher and Bugbee, 2001). Invece i risultati ottenuti da studi sulla luce verde (500-580 nm) sono tuttora controversi poiché considerati in alcuni casi come inibitori e in altri come stimolanti per la crescita (Folta, 2004; Frechilla et al., 2000).

Le risposte fotomorfogeniche delle colture possono, dunque, apparire a volte contraddittorie ma ciò dipende dalla specie studiata e dalle condizioni ambientali e nutrizionali della coltura.

Oltre alla diversa qualità della luce bisogna tener conto anche dell'intensità luminosa. Per intensità luminosa si intende la quantità di energia luminosa che raggiunge la coltura e si misura come flusso radiante per unità di superficie ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). In generale, maggiore è l'intensità luminosa o irradianza, migliore è lo sviluppo dei germogli, ma oltre una certa quantità di luce fornita, i germogli subiscono un calo della crescita con chiari segni di senescenza e ingiallimento delle foglie. La soglia limite dipende comunque dal tipo di specie.

Le esigenze luminose delle diverse specie vegetali in termini di qualità ed intensità, all'interno delle camere di crescita dei BLSSs potrebbero essere soddisfatte con l'utilizzo della luce artificiale dei dispositivi LED (Light Emitting Diodes).

Questi semiconduttori luminescenti, infatti consentono di avere una fonte di luce "fredda" che non interferisce con l'esigenza di ottenere un microclima controllato all'interno delle camere di crescita. Inoltre, i LED rispetto alle altre fonti di luce elettrica, presentano numerosi vantaggi che includono un minore ingombro grazie alle loro piccole dimensioni, una lunga durata, una maggiore sicurezza e affidabilità, e la possibilità di selezionare specifiche lunghezze d'onda per ottenere risposte mirate da parte delle colture vegetali.

Attualmente sono disponibili dei LED con una specifica composizione chimica che permettono di ottenere emissioni di radiazioni con picchi di lunghezza d'onda vicino al picco di intervallo spettrale di massima azione per la fotosintesi (rosso e blu) e consentono così una più elevata utilizzazione dei "fotoni" emessi in termini di efficienza fotosintetica, rispetto a quella di lampade con produzione spettrale diffusa per tutta la gamma delle lunghezze d'onda fotosinteticamente attive.

A partire dagli anni 90' numerosi studi sono stati condotti sull'utilizzo dei LED come unica fonte d'illuminazione o come fonte supplementare per la crescita delle piante nello spazio (Figura 7).

Alcuni studi hanno dimostrato che l'utilizzo di sola luce rossa è sufficiente per la coltivazione delle piante anche se con delle limitazioni evidenti. Successivamente ricercatori dell'Università del Wisconsin, hanno suggerito la necessità di integrare ai LED rossi anche luce blu per migliorare la crescita delle piante (Hoenecke et al., 1992).

E' confermato che la luce blu ha una varietà di ruoli importanti nelle piante, tra cui il controllo degli stomi (Schwartz and Zeiger, 1984) che determina lo scambio di CO₂, l'allungamento dello stelo (Cosgrove, 1981), e il fototropismo (Blaauw and Blaauw-Jansen, 1970). Nello specifico la luce blu ha un ruolo importante nella formazione della clorofilla, nello sviluppo dei cloroplasti, nell'apertura degli stomi, nella sintesi degli enzimi del ciclo di Calvin, nell'attivazione del ritmo circadiano della fotosintesi, e nella fotomorfogenesi (Wheeler et al., 1991).

Oltre all'uso di luce rossa e blu (RB), sono stati effettuati esperimenti che prevedevano la coltivazione delle piante con l'integrazione di una piccola quantità di luce verde.

Di recente è stato dimostrato che piante di lattuga coltivate con luce rossa-verde-blu (RGB) presentavano pesi freschi e secchi più elevati, oltre ad una maggiore superficie fogliare, rispetto a piante coltivate con luce RB (Kim et al., 2004). Kim et al. (2006) hanno poi riassunto gli esperimenti con la luce verde concludendo che le sorgenti luminose composte con oltre il 50% di luce verde causano una riduzione significativa nella crescita delle piante, mentre le combinazioni RGB con luce verde fino al 24% tendono a favorire la crescita di alcune specie.

I risultati di questi studi hanno permesso di selezionare i tipi di LED adatti alle risposte fisiologiche desiderate a seconda del tipo di coltura ed hanno consentito di migliorare la coltivazione delle piante all'interno delle camere di crescita che hanno volato a bordo degli shuttle della NASA (Barta et al., 1992) e che sono stati utilizzati per coltivare il grano (*Triticum aestivum* L.), piantine di *Brassica rapa* L. (Morrow et

al., 1995), di patate (*Solanum tuberosum* L.) di *Arabidopsis thaliana* (Stankovic et al., 2002), e soia (*Glycine max* (L.) Merr) (Zhou, 2005).

Nel caso specifico di una coltura a bordo di uno shuttle o all'interno di una Stazione Spaziale è possibile ottenere, grazie alla nuova tecnologia dei LED, un sistema di illuminazione, selezionando specifiche lunghezze d'onda, tale da poter mitigare gli effetti deleteri derivanti dall'azione delle radiazioni ionizzanti e della microgravità che caratterizzano l'ambiente spaziale.



Figura 7: Piante di lattuga coltivate in camere con illuminazione LED sulla Stazione Spaziale Internazionale (ISS), Nasa, Maggio 2014.

1.4 Interazione radiazioni ionizzanti/piante superiori

Come riportato nei capitoli precedenti, le piante, grazie alla loro organizzazione cellulare, risultano essere più tolleranti alle radiazioni ionizzanti rispetto agli animali.

Tuttavia, vi sono differenti risposte alle radiazioni anche all'interno del Regno Plantae; infatti l'effetto biologico delle radiazioni ionizzanti sulle piante varia in base alla qualità della radiazione (LET), alla dose, al tipo di esposizione (acuta o cronica) e in base alle caratteristiche dell'organismo esposto: specie, cultivar, e stadio fenologico al momento dell'irraggiamento (De Micco et al., 2011).

In generale la risposta delle piante alle radiazioni ionizzanti è dose-dipendente (Kranz et al., 1994), con effetti stimolatori a basse dosi (Feinendegen, 2005), conseguenze dannose a livelli intermedi e danni irreversibili ad alte dosi (De Micco et al., 2011; Arena et al., 2014a) (Figura 8).

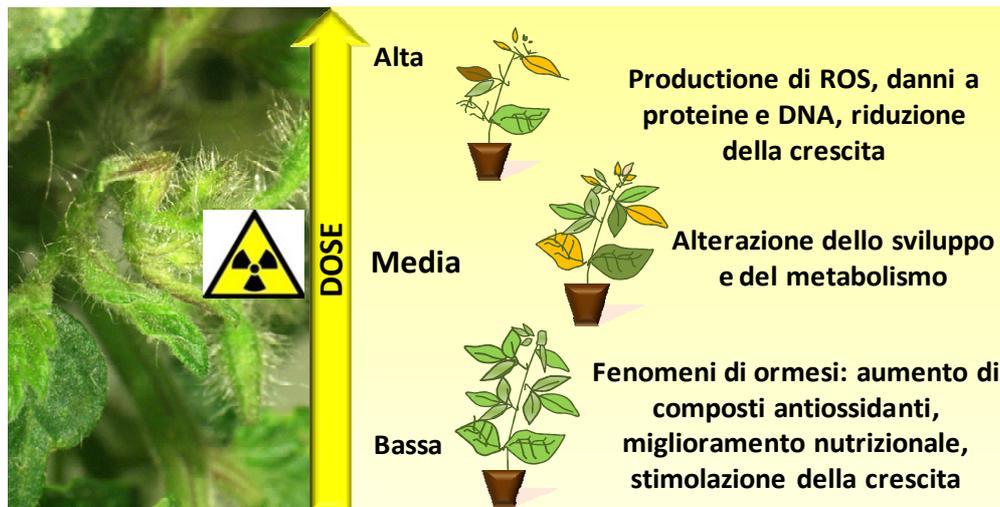


Figura 8: Effetti delle radiazioni ionizzanti sulle piante in funzione della dose da: http://www.asi.it/files/LISS-_Spazio_alle_piante.pdf

1.4.1 Effetti sul materiale genetico

Lo studio degli effetti indotti dalle radiazioni ionizzanti a livello genetico sulle piante ha come scopo da un lato la determinazione della dose-soglia, il cui superamento comporta l'insorgenza degli effetti dannosi, e dall'altro la ricerca della dose efficace nell'indurre un miglioramento genetico che si esplica con un aumento di produttività.

Il nucleo delle cellule vegetali è considerato il principale sito bersaglio delle radiazioni ionizzanti (Sparrow, 1962), qui i danni maggiori sono riscontrabili nel DNA e provocano squilibri delle funzioni biologiche ad esso legate.

Le modifiche chimiche nella molecola di DNA esposta all'azione delle radiazioni ionizzanti ad alto e basso LET sono le seguenti:

1. modificazioni o perdita delle basi azotate causate dalla rottura dei legami glucosidici;
2. rottura dei legami a idrogeno tra le coppie di basi appaiate;
3. rottura dello scheletro pentoso-fosfato di un singolo filamento (ssb) o di entrambi i filamenti del DNA (dsb);

4. rottura dei filamenti nucleotidici e formazione di legami crociati all'interno di una stessa molecola di DNA o tra due molecole di DNA o tra il DNA e altre molecole.

Gli effetti di queste modificazioni chimiche possono ripercuotersi sui processi biologici quando la cellula non riesce ad attivare i meccanismi di riparazione o quando la riparazione non viene completata, e quindi la sequenza nucleotidica originale non viene ripristinata fedelmente prima che il DNA si replichi. In questo caso l'alterazione può trasmettersi alle cellule figlie fissandosi permanentemente nel genoma con l'insorgenza di mutazioni. Quando i meccanismi di riparazione funzionano correttamente, invece, le alterazioni a carico del DNA risultano biologicamente ininfluenti.

Nelle piante, eventuali tratti negativi di mutazioni radioindotte, possono essere mascherati dalla poliploidia ovvero la presenza di più di due copie di ogni cromosoma nel genoma. Molte piante sono poliploidi, per cui se una copia di un gene viene danneggiata, la ridondanza genica assicura l'espressione delle copie non danneggiate e quindi la corretta funzionalità delle proteine ad esso associate.

Il numero di cromosomi di una specie, quindi determina la suscettibilità di una pianta alle radiazioni, infatti le specie poliploidi mostrano una diminuita sensibilità alle radiazioni rispetto a quelle monoploidi o diploidi. La condizione di poliploidia conferisce una maggiore stabilità fenotipica contro le mutazioni deleterie e in natura rappresenta un vantaggio evolutivo (Paterson et al., 2012; Jia et al., 2013; Ramsey and Schemske, 2002; Comai, 2005).

Per quanto riguarda la frequenza di mutazione, bisogna tener presente che essa varia in base al LET della radiazione ed in base alla dose.

Alcuni studi riportano che l'irraggiamento di cellule con ioni pesanti determina un aumento significativo della frequenza di mutazione rispetto all'irraggiamento con raggi X (Tanaka et al., 2010; Kazama et al., 2011); infatti così come per le cellule di mammifero, le radiazioni ad alto LET nelle cellule vegetali inducono soprattutto DSB che possono provocare riarrangiamenti cromosomici letali (Hoglund et al., 2000; Yokota et al., 2007).

Gli effetti negativi delle mutazioni deleterie includono morte allo stato embrionale, ridotta capacità riproduttiva, insorgenza di malformazioni, aumento della suscettibilità alle malattie, alterazioni della crescita e diminuzione della durata

del ciclo vitale nonché comparsa di alterazioni metaboliche derivate dalle azioni difensive messe in atto dalla cellula vegetale contro la radiazione (De Micco et al., 2011). Infatti, quando la radiazione colpisce la cellula, aumenta la sintesi sia dei fenoli di membrana, che agiscono da schermo naturale contro la radiazione, sia degli enzimi deputati alla rimozione dei radicali liberi, responsabili di danni ossidativi letali alle membrane cellulari.

Anche il tipo di esposizione alle radiazioni, acuto (breve periodo) o cronico (lungo periodo) influenza l'entità del danno biologico; infatti è stato riportato che campioni sottoposti a radiazioni croniche sono maggiormente danneggiati rispetto a campioni esposti a radiazione acuta (Tanaka et al., 2010). Numerosi autori per individuare le alterazioni a carico del DNA indotte dalle radiazioni ionizzanti come raggi γ , raggi X e ioni pesanti, si sono avvalsi della metodica RAPD PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA PCR) (Danylchenko e Sorochinsky, 2004; Al-Zahrani, 2012; Shahrtash et al., 2010; Al-Qurainy et al., 2010), un tipo di PCR basata sull'utilizzo di brevi primers (8–12 nucleotidi) a composizione arbitraria, che non richiede alcuna conoscenza della sequenza di DNA del genoma da analizzare, e che permette di ottenere, in seguito alla fase di amplificazione, una serie di frammenti di segmenti casuali di DNA genomico con i quali è possibile approssimare un profilo genetico dell'organismo in analisi. Sebbene il suo potere di risoluzione sia più basso di quello di metodi basati sull'utilizzo di sequenze specie-specifiche, come l'analisi dei microsatelliti, tale metodica viene utilizzata per individuare alterazioni nel DNA indotte da agenti genotossici sia chimici che fisici, come le radiazioni ionizzanti, ma anche per effettuare mappature genetiche e per valutare la diversità genetica tra le specie (Ezekiel et al., 2011).

Le radiazioni ionizzanti possono indurre anche modificazioni epigenetiche, (modificazioni ereditabili che variano l'espressione genica non alterando la sequenza del DNA) come: modificazioni post-traduzionali degli istoni, metilazione della citosina, silenziamento genico (Ou et al., 2009).

Un altro danno è la formazione di micronuclei, che si formano durante la divisione cellulare quando un cromosoma o un frammento di un cromosoma non è incorporato in uno dei nuclei figli. Uno studio riporta che nelle cellule vegetali, all'aumentare della dose aumenta la formazione di micronuclei (Mei et al., 1994). Comunque va

specificato che per quanto riguarda la formazione di micronuclei esiste una differente radiosensibilità specie-specifica (Wei et al., 1995).

Al contrario dosi molto basse di radiazioni ionizzanti possono portare ad una vasta gamma di mutazioni non letali o addirittura vantaggiose, un fenomeno chiamato “ormesi da radiazione”.

1.4.2 Effetti sulla crescita e sulle caratteristiche morfo-anatomiche

A differenza degli effetti a livello genetico, l’influenza delle radiazioni ionizzanti su aspetti morfo-anatomici è meno documentata. La maggior parte degli esperimenti è stata condotta confrontando la crescita di piante derivanti da semi irraggiati e semi controllo non irraggiati.

Per quanto riguarda il processo di germinazione, a seconda del tipo di irraggiamento e della specie esposta, le risposte possono essere differenti, infatti la percentuale di germinazione può aumentare, diminuire o restare invariata (Bayonove et al., 1984; Wei et al., 1995; Zimmermann et al., 1996; Huang et al., 1997; Hase et al., 1999; Kumagai et al., 2000).

In genere, un aumentato tasso di germinazione si riscontra quando l’irraggiamento viene effettuato su semi secchi in quanto l’assenza di acqua limita i fenomeni di radiolisi e la conseguente produzione di radicali liberi dannosi per i tessuti; tuttavia se la dose ed il LET della radiazione sono elevati, la percentuale di germinazione risulta ridotta anche per semi secchi al momento dell’esposizione.

Oltre a germinazione ridotta, tra gli effetti negativi imputabili alle alte dosi, vi sono letalità embrionale e difficoltà ad ottenere stadi di sviluppo avanzati (che comporta il mancato raggiungimento della fase riproduttiva), nanismo, modificazioni a livello della morfologia florale, con conseguente alterazione della fertilità. Le cause della ridotta crescita e capacità riproduttiva sono ascrivibili alle elevate dosi di radiazioni che inducono inibizione dei processi di mitosi e meiosi cellulare.

A basse dosi invece, si può avere un incremento del tasso di germinazione, che viene attribuito ad una maggiore porosità dei tegumenti, che porta ad un aumento nella capacità di assorbimento di acqua e nutrienti da parte dei semi (Hammond et al.,

1996). Effetti stimolatori sono stati osservati sulla crescita (intesa come dimensioni della pianta), sul successo riproduttivo (per es. maggiore numero di semi prodotti) e sulla capacità di resistere agli stress ambientali (per es. deficit idrico).

Alcuni autori utilizzando lo stesso tipo di radiazione ionizzante a differenti dosi sulla stessa specie, sono stati in grado di definire una dose-soglia, al di sotto della quale gli effetti, sui processi di crescita e riproduzione, risultavano positivi o reversibili, mentre al di sopra negativi e irreversibili, (Maity et al., 2005; Thiede et al., 1995).

Per quanto riguarda gli aspetti anatomici e citologici, è stato dimostrato che l'irraggiamento con raggi X e γ , nonché con raggi cosmici, induce un aumento dell'attività degli enzimi responsabili della degradazione delle pectine, che si trovano principalmente nella lamella mediana, modificando le caratteristiche della parete cellulare. Ulteriore conseguenza è l'autolisi dei polisaccaridi e l'indebolimento della matrice della parete con conseguente alterazione della disposizione delle microfibrille di cellulosa. Tutti questi fenomeni comportano variazione della resistenza meccanica delle pareti cellulari e possono determinare, a livello macroscopico alterazione della consistenza di tessuti e organi o anche aumento delle dimensioni delle cellule.

E' importante tener presente che i diversi stadi fenologici della pianta mostrano una differente radiosensibilità così come i diversi tessuti: i semi sono più resistenti rispetto alle fasi pre-riproduttiva e post-riproduttiva (Zhou et al., 2006; Shikazono et al., 2002), mentre per quanto riguarda i tessuti, quelli meristemati in attiva divisione cellulare (per es. apici vegetativo e radicale, cellule riproduttive) risultano più sensibili alle radiazioni rispetto ai tessuti che hanno completato il processo di differenziamento.

1.4.3 Effetti sull'apparato fotosintetico

La fotosintesi risulta un processo estremamente sensibile alla radiazione ionizzante. Il processo fotosintetico può essere alterato sia nella fase luminosa, compromettendo i complessi LHC (light-harvesting complex) per la cattura della luce costituiti da pigmenti e proteine (CAB - Chlorophyll a/b-binding protein) ed i componenti della catena di trasporto degli elettroni, sia nella fase oscura, alterando il

funzionamento degli enzimi chiave del ciclo di Calvin (tra cui la Rubisco), grazie ai quali avvengono le reazioni di assimilazione ed organizzazione della CO₂ atmosferica (Fan et al., 2014).

La maggior parte degli studi volti a valutare l'effetto delle radiazioni ionizzanti sulla fotosintesi sono stati eseguiti su cianobatteri o su piante sviluppate da semi irraggiati.

In generale, sia nel cloroplasto delle piante superiori che dei cianobatteri, il fotosistema II (PSII) è la componente più sensibile ai danni indotti dalle radiazioni (Angelini et al., 2001; Rea et al., 2008). Il principale bersaglio è la proteina D1 del centro di reazione del PSII, un polipeptide integrale di membrana che insieme alla proteina D2 rappresentano il core del PSII (Melis, 1999). Tale proteina media il trasferimento degli elettroni tra il donatore primario di elettroni e l'accettore secondario. L'entità del danno dipende dalla dose erogata con perdita di funzionalità principalmente a dosi elevate (Zaka et al., 2002).

E' stato dimostrato che alte dosi di raggi gamma (37,5 o 112,5 Gy) determinano, in piante di fagiolo e soia una diminuzione del contenuto di clorofilla (Chl) e del tasso di trasporto elettronico (Ursino et al., 1977; Stoeva e Bineva, 2001). Una significativa diminuzione nel contenuto totale di Chl e carotenoidi, nonché una riduzione dell'attività dell'enzima Rubisco sono stati riscontrati anche in piante di fagiolo dopo irraggiamento con elevate dosi di raggi X pari a 50 e 100 Gy (Arena et al., 2014b).

Le radiazioni ionizzanti possono anche danneggiare la struttura delle membrane dei cloroplasti, alcuni autori, infatti, hanno dimostrato che fasci di ioni pesanti inducono danni quali dilatazione delle membrane dei tilacoidi e perdita degli impilamenti che costituiscono i grana inibendo così la formazione del complesso antenna del foto sistema II, LHCI (Kovács e Keresztes, 2002; Abe et al., 2002). I complessi LHC di cattura della luce risultano essere particolarmente sensibili alle radiazioni ionizzanti sia a basso LET che ad alto LET, con conseguente diminuzione del rapporto clorofilla a/b (Cheng and Chandlle, 1999). La diminuzione di clorofilla determina una riduzione dell'assorbanza fotonica, e quindi la perdita di funzionalità dell'intero complesso antenna (Palamine et al., 2005; Arena et al., 2013).

È interessante notare che il danno indotto ai componenti dell'apparato fotosintetico varia in base alla fase di sviluppo delle piante al momento dell'irraggiamento ed in particolare gli organismi in uno stadio di sviluppo giovanile risultano più sensibili rispetto allo stadio adulto.

È stato dimostrato che piante di *Arabidopsis* in fase riproduttiva hanno un apparato fotosintetico in grado di tollerare dosi fino a 200 Gy di raggi gamma (Kim et al., 2011). Inoltre, foglie mature di fagiolo irraggiate con elevate dosi di raggi X (ovvero 50 e 100 Gy) durante lo stadio adulto, risultano essere meno sensibili alle radiazioni rispetto a quelle giovani (Arena et al., 2014b).

Il danno alle diverse componenti dell'apparato fotosintetico sembra essere strettamente legato all'elevata produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Zaka et al., 2002), indotta da fenomeni di radiolisi dell'acqua (De Vita et al., 1993). L'aumento di ROS, determina da un lato una risposta locale con lo scopo di contenere e limitare i danni il più velocemente possibile, e dall'altro induce una risposta sistemica attraverso la produzione di specifiche sostanze in grado di proteggere i tessuti ancora integri (Leon et al., 1995).

L'abilità della pianta di attivare meccanismi di protezione e di riparazione dal danno da radiazione, costituiscono i presupposti della radioresistenza per una determinata specie. A livello biochimico, per neutralizzare o limitare il danno ossidativo, vi è un aumento della sintesi di enzimi che rimuovono i radicali liberi oltre ad un incremento del contenuto di fenoli ed altri composti antiossidanti.

I principali antiossidanti enzimatici nelle piante, coinvolti nella rimozione di radicali liberi, includono gli enzimi superossido dismutasi (SOD), glutatione perossidasi (GPX), catalasi (CAT), il ciclo dell'ascorbato-glutatione e il ciclo acqua-acqua (Foyer and Mullineaux, 1994). Quando però, i sistemi antiossidanti non sono in grado di rimuovere l'eccessivo accumulo di ROS, si manifesta il danno ossidativo. Il danno ossidativo può determinare la perossidazione dei lipidi di membrana, provocando un aumento della permeabilità nei tilacoidi, e dunque alterando la funzionalità della catena di trasporto elettronico fotosintetica.

Al termine dello stress indotto da dosi non letali di radiazioni, la normale attività fotosintetica può essere ripristinata attraverso l'attivazione di meccanismi a breve termine, come la transizione del complesso antenna LHCII da un fotosistema

all'altro (Anderson et al., 1998; Angelopoulos et al., 1996; Melis, 1999), o meccanismi a lungo termine, come la sintesi di nuove proteine dei centri di reazione, (Allen, 2003; Horton et al., 2005). Entrambi i meccanismi sono mediati dallo stato redox dei trasportatori di elettroni. Lo stato redox, quindi, è un importante indicatore dell'attività dei cloroplasti (Aro and Ohad, 2003). In particolare in condizioni di stress si verifica un eccesso di potere riducente, causato dalla limitazione di assimilazione di CO₂, che determina la totale riduzione dei trasportatori della catena di trasporto elettronico e la successiva canalizzazione dell'energia luminosa in processi che favoriscono la produzione di ROS.

Se lo stress persiste ed i sistemi di protezione cellulare non sono sufficienti o adeguati, l'apparato fotosintetico non riesce ad utilizzare tutta l'energia luminosa ricevuta e può andare incontro a fenomeni fotoinibitori e fotoossidativi anche a basse irradianze.

1.4.4 Effetti benefici delle radiazioni: l'ormesi

Le radiazioni ionizzanti quando vengono somministrate in dosi molto basse e non letali per l'organismo possono generare effetti positivi sui processi cellulari, un fenomeno conosciuto con il termine di "ormesi".

Si definisce ormesi l'effetto bifasico che una sostanza provoca, a seconda della dose somministrata.

Nel 1887 il ricercatore H. Schulz facendo reagire alcune sostanze chimiche con il lievito notò un fenomeno, secondo il quale dapprima l'azione espletata era di crescita e di benessere, poi, all'aumentare della concentrazione, l'evento diveniva tossico. In un secondo momento Schulz insieme a R. Arndt formularono una legge (legge di Arndt-Schulz) che ben descrive il fenomeno dell'ormesi: "Stimoli di debole intensità accelerano modestamente l'attività vitale, di media intensità la incrementano, di forte intensità la bloccano in parte, di elevatissima intensità la sopprimono completamente". L'ormesi può quindi essere considerata una funzione adattativa caratterizzata da una risposta bifasica dose-dipendente, che si manifesta come

conseguenza dell'esposizione a un intervallo molto ampio di stimoli (Calabrese e Baldwin, 2002).

Riguardo il fenomeno ormetico ed il suo significato biologico non vi sono attualmente riscontri univoci.

Esistono risposte adattative o ormetiche a perturbazioni di qualunque tipo; gli organismi sembrano pre-adattati a molti stimoli nocivi. In sostanza, i meccanismi di controllo omeostatico e ormetico sono presenti in tutti i sistemi biologici, rispondendo autonomamente a cambiamenti di stato o ad alterazione di meccanismi regolati indotti da agenti esogeni (Stebbing, 1997). Le risposte ormetiche, in genere, mostrano una modesta stimolazione alle basse dosi (maggiore del 30-60% del controllo) e un'inibizione alle alte dosi. Perciò, affinché sia soddisfatta la definizione "qualitativa" dell'ormesi, devono necessariamente essere presenti tanto la dimensione stimolatoria quanto quella inibitoria. La curva di risposta ormetica può essere rappresentata da una parabola, una U dritta o rovesciata in relazione all'endpoint considerato: si ottiene una risposta a U dritta se si misura un danno all'organismo, come l'aumento della mortalità o l'alterazione di qualche funzione fisiologica; si ottiene una risposta a U rovesciata se si misurano funzioni fisiologiche quali accrescimento o sopravvivenza (Figura 9).

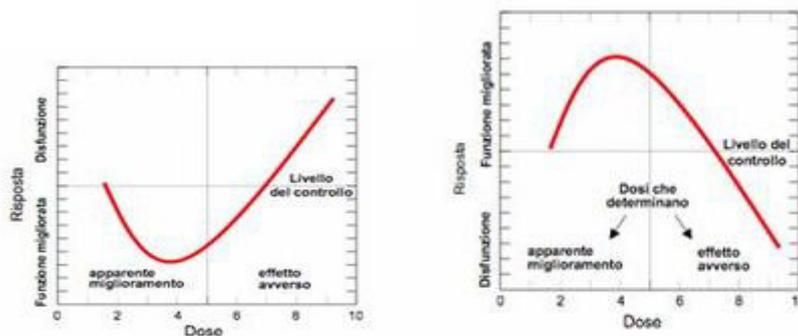


Figura 9. Le curve dose-risposta ad U dritta e rovesciata (Calabrese e Baldwin, 2001a)

Anche per le radiazioni ionizzanti è stata riscontrata risposta ormetica. L'ormesi si può definire, in questo caso, come la capacità da parte di cellule e tessuti di sviluppare una radioresistenza a dosi di una certa intensità, dopo aver subito l'esposizione a basse dosi.

E' stato osservato che dosi molto basse di radiazioni considerate dannose per gli animali possono avere invece effetti positivi su molte specie vegetali (Casarett 1968; Luckey 1980; Kumagai et al. 2000; Real et al. 2004). In relazione soprattutto alla dose utilizzata si possono osservare fenomeni ormetici per la fotosintesi, come anche per altri processi (Kurimoto et al. 2007). E' stato dimostrato che l'esposizione di piantine della specie *Arabidopsis* a basse dosi di raggi gamma (1 o 2 Gy) è in grado di stimolare la crescita (Wi et al. 2007) e di provocare un aumento dei tassi di fotosintesi, respirazione e trasporto elettronico (Kim et al. 2004; Kurimoto et al. 2010). Inoltre, è stato osservato che l'irraggiamento di semi di lattuga con dosi di raggi gamma pari a 30 Gy provocava un aumento nel contenuto dei pigmenti fotosintetici: clorofilla a, clorofilla b e carotenoidi (Marcu et al. 2013).

Allo stato attuale delle conoscenze, non vi sono spiegazioni conclusive sui meccanismi alla base del fenomeno ormetico, tuttavia, è stato ipotizzato che basse dosi di radiazioni possono influenzare la crescita alterando il sistema di segnale ormonale oppure provocando un aumento della capacità antiossidante della cellula al fine di contrastare gli effetti di fattori ambientali limitanti (Kim et al. 2004).

CAPITOLO 2

SCOPO DELLA RICERCA

Questa tesi esplora la risposta delle piante superiori alle radiazioni ionizzanti. Tali studi si inseriscono nel filone di ricerca della biologia vegetale spaziale che si pone tra i principali obiettivi quello di comprendere gli effetti delle radiazioni ionizzanti sugli organismi vegetali, per individuare le specie con le caratteristiche più idonee a poter essere utilizzate nei sistemi biorigenerativi di supporto alla vita umana nello Spazio (BLSSs –Bioregenerative Life Support Systems).

Al di là del contesto spaziale, i risultati prodotti da questi studi possono fornire importanti informazioni anche in altri campi della biologia vegetale che riguardano la possibilità di usare radiazioni ionizzanti per ottenere mutazioni favorevoli al fine di massimizzare la produttività delle colture (Maity et al., 2005; Yu et al., 2005; Mudibu et al., 2011), e/o ottenere risposte per valutare le conseguenze della contaminazione delle piante da radionuclidi nell'ambito della ricerca radioecologica ambientale (Aleksakhin et al., 2006).

Studi pregressi hanno dimostrato che la radiazione ionizzante sortisce sugli organismi vegetali risultati contrastanti poiché la risposta dipende da una moltitudine di caratteristiche tra cui specie, stadio di sviluppo della pianta o dell'organo irraggiato, dose e qualità della radiazione (De Micco et al., 2014), di conseguenza il comportamento di una determinata specie e la sua attitudine a sviluppare o meno meccanismi di radioresistenza resta una questione sempre aperta.

Utilizzando come modello sperimentale piante superiori di interesse agroalimentare, lo scopo generale di questa ricerca mira a valutare l'effetto di radiazioni ionizzanti di diversa qualità (alto e basso Linear Energy Transfer - LET) su specie destinate a poter essere utilizzate a bordo delle piattaforme spaziali come supporto alla vita umana nelle missioni extra-terrestri di lunga durata. Durante i 3 anni di attività di ricerca sono stati effettuati diversi esperimenti, nei quali è stato utilizzato un approccio multidisciplinare che ha previsto analisi eco-fisiologiche, biochimiche e genetiche per valutare alterazioni nella crescita e nello sviluppo delle piante e studiare i meccanismi di radioresistenza.

In particolare l'attenzione è stata focalizzata sulle conseguenze a livello di cellula, tessuto ed organo e sulla identificazione dei valori soglia al di sopra dei quali gli effetti benefici della radiazione (o fenomeni ormetici) si trasformano in danni irreversibili a livello funzionale e strutturale per le specie oggetto di studio. La ricerca è stata condotta irraggiando piante a differenti stadi fenologici per valutare se gli effetti della radiazione potessero essere, oltre che specie-specifici, anche dipendenti dallo stadio di sviluppo della pianta.

L'obiettivo generale di questo lavoro è stato perseguito attraverso 5 diversi esperimenti illustrati nei capitoli 3-7.

I capitoli 3 e 5 si concentrano sullo studio degli effetti di 5 differenti dosi di raggi X (radiazioni ionizzanti a basso LET) 0, 0.3, 10, 20, 50 e 100 Gy su piante di *Phaseolus vulgaris* L. (fagiolo nano) e *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom' (pomodoro nano) in funzione dello stadio fenologico della pianta e del grado di sviluppo dell'organo fotosintetico al momento dell'irraggiamento; nello specifico, sono state costruite curve di risposta in funzione della dose per una serie di parametri fisiologici e biochimici e indagata l'insorgenza di danni genotossici e l'efficacia dei meccanismi di protezione dal danno da radiazione.

I capitoli 4 e 6 si focalizzano sullo studio degli effetti di ioni pesanti carbonio e titanio (radiazioni ionizzanti ad alto LET) sulle specie vegetali *Dolichos melanophtalmus* DC. (fagiolino dolico nano) e *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom' irraggiate in fase di seme. In particolare, nel capitolo 4, l'osservazione degli effetti della radiazione si è concentrato su due generazioni di *Dolichos melanophtalmus*: un primo studio su piante germinate da semi irraggiati con ioni carbonio e titanio forniti a due diverse dosi (1 e 10 Gy), ed un secondo studio su semi germinati dalla prima generazione di piante irraggiate. L'osservazione di due generazioni può rivelarsi particolarmente interessante se si considera che gli effetti biologici della radiazione spesso non si limitano solo agli organismi direttamente esposti, ma coinvolgono anche le future generazioni a causa della natura ereditaria del patrimonio genetico di un organismo (Müller, 1964).

Nel capitolo 6, invece, l'attenzione è stata incentrata sullo studio dell'apparato fotosintetico di piante di 'Micro-Tom', germinate da semi irraggiati con ioni carbonio alla dose di 25 Gy e sottoposte a stress luminoso al fine di verificare se la

funzionalità dell'apparato fotosintetico potesse essere stata compromessa e/o stimolata dalla radiazione. Particolare interesse è stato devoluto anche all'analisi dei frutti prodotti da piante irraggiate in termini di composti antiossidanti utili per la salute umana.

Infine nel capitolo 7 è stata valutata la performance fotosintetica di piante di 'Micro-Tom' in funzione della qualità della luce, conducendo esperimenti su piante cresciute a tre regimi luminosi qualitativamente differenti ovvero luce bianca (WL - white light) utilizzata come controllo, luce rossa-verde-blu (RGB - red-green-blue) ed luce rossa-blu (RB - red-blue), per valutare la combinazione di lunghezze d'onda in grado di ottimizzare le caratteristiche fisiologiche, biochimiche ed anatomiche alla base della migliore performance fotosintetica, nell'ottica di migliorare le prestazioni fisiologiche di specie destinate ad integrare la dieta umana sia in ambiente terrestre che extra-terrestre.

CAPITOLO 3

Risposta della specie *Phaseolus vulgaris* L. a radiazioni ionizzanti a basso LET: crescita e stress ossidativo

3.1 Premessa e disegno sperimentale

L'abitazione a lungo termine delle stazioni spaziali prevede l'utilizzo delle piante come parte fondamentale dei Sistemi biologici rigenerativi (BLSS) per supportare le esigenze dell'equipaggio.

Tuttavia, la crescita delle piante nello Spazio può essere alterata da diversi fattori: tra questi le radiazioni ionizzanti possono pregiudicare gravemente le cellule vegetali a livello morfologico, fisiologico e biochimico.

A causa di vincoli tecnici ed economici che limitano lo svolgimento di esperimenti nello Spazio, per studiare gli effetti delle radiazioni spaziali sulle piante sono necessari esperimenti a Terra basati sull'esposizione degli organismi ad irraggiamenti controllati che riproducano quanto più fedelmente possibile le condizioni spaziali. Nello Spazio, la gran parte della dose di radiazioni a cui gli organismi sono esposti è dovuta ai protoni a bassa energia, la cui efficacia non è diversa dai fotoni, per cui è possibile riprodurre, in parte, le radiazioni spaziali con raggi X o raggi gamma (fotoni), considerati le radiazioni di riferimento per esplorare l'intervallo di dose necessario a produrre un certo effetto biologico.

In questo studio sono state valutate la crescita, le caratteristiche fisiologiche e la risposta antiossidante di piante di fagiolo nano (*Phaseolus vulgaris* L.) esposte a dosi crescenti di raggi X, al fine di comprendere se e come questa specie sia in grado di contrastare i possibili effetti deleteri delle radiazioni ionizzanti. Inoltre per valutare se la risposta della pianta potesse dipendere dallo stadio di sviluppo fogliare le analisi sono state condotte su due tipologie di foglie presenti al momento dell'irraggiamento: foglie L1 completamente espanse e foglie L3 ovvero foglie allo stato embrionale. In particolare le piante sono state esposte a quattro differenti dosi di raggi X (0,3, 10, 50 e 100 Gy) per costruire una curva dose-risposta per diversi parametri biologici. In seguito all'irraggiamento è stata valutata la crescita delle piante mediante misure morfometriche, mentre il contenuto di pigmenti fotosintetici,

la massima resa quantica del PSII (Fv/Fm) e l'attività enzimatica della ribuloso 1,5-bisfosfato carbossilasi (Rubisco) sono stati analizzati per valutare l'integrità dell'apparato fotosintetico. Inoltre, le variazioni degli antiossidanti totali e dell'attività della Poli ADP-ribosio polimerasi (PARP) sono stati utilizzati come marcatori per la valutazione dello stress ossidativo radioindotto.

3.2 Materiali e metodi

3.2.1 Coltivazione delle piante e condizioni di crescita

Semi di *Phaseolus vulgaris* L. sono stati posti a germinare al buio su carta assorbente imbibita con acqua distillata in capsule Petri. Successivamente, i semi germinati sono stati trapiantati in vasi dal diametro di 10 cm riempiti con terriccio ammendato con torba (1/1). Le piante sono state coltivate in camere di crescita in condizioni controllate di temperatura, umidità relativa e luce (Figura 1a). In particolare, le piante sono state esposte ad un fotoperiodo di 12 h, giorno/notte, temperatura di 25/20 °C, umidità relativa del 60/75% (giorno /notte), e densità di flusso fotonico fotosintetico (PPFD) di 90-100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La luce è stata fornita da tubi fluorescenti 58 W (Philips TLD 54 e 84) e lampade alogene (Philips HPI-T 400 W). La PPFD è stata misurata con misuratore quantico (Li-Cor 185, Li-Cor, Lincoln, NE, Stati Uniti d'America). Durante il periodo di crescita, le piante sono state regolarmente innaffiate per reintegrare l'acqua persa per evapotraspirazione.

3.2.2 Procedura d'irraggiamento

Le piante sono state esposte a quattro dosi di raggi X (0,3, 10, 50 e 100 Gy) fornite da un generatore di raggi X (Siemens, Forchheim, Germania) con un rateo di dose assorbita di 1 Gy/min, energia erogata 200 kVp, LET 1 keV/ μm . La dosimetria è stata effettuata per mezzo di una camera ionizzante (Harshaw 3500, Thermo Fisher Scientific Inc., Erlangen, Germania). Al momento dell'irraggiamento, ogni pianta presentava la prima foglia trifogliata completamente espansa (L1), e la seconda foglia trifogliata in fase iniziale di sviluppo (L3) (Figura 1b). Ogni trattamento ha

previsto l'utilizzo di una singola pianta per ciascuna dose, per evitare effetti cumulativi della radiazione sullo stesso campione (Kurimoto et al., 2010), per un totale di 5 piante irraggiate per dose. Dopo l'irraggiamento, da ogni pianta sono state prelevate foglie L1 per le analisi morfologiche, fisiologiche e biochimiche; mentre le foglie L3 sono state raccolte 10 giorni dopo l'irraggiamento al fine di permettere il completamento dello sviluppo fogliare, per operare un confronto con le foglie L1. Dopo l'esposizione alle radiazioni le piante sono state poste nella camera di crescita alle stesse condizioni controllate pre-irraggiamento.

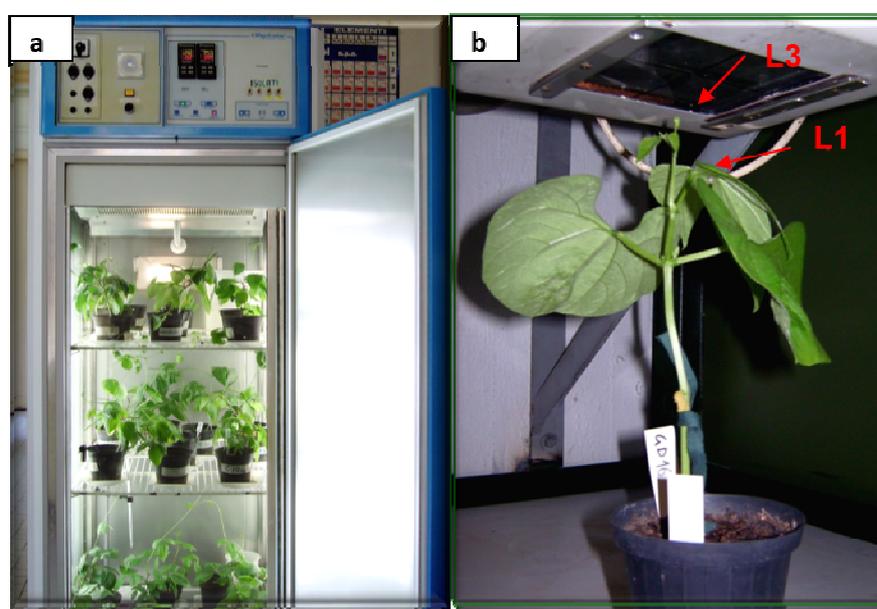


Figura 1: (a) piante di *Phaseolus vulgaris* L. coltivate in camera di crescita; e (b) irraggiamento della pianta con il generatore di raggi X, in cui sono evidenti la prima foglia trifogliata completamente espansa (L1) e la seconda foglia in via di sviluppo (L3).

3.2.3 Misure morfometriche

Dopo l'esposizione alle diverse dosi di raggi X, l'altezza delle piante (espressa come aumento in percentuale rispetto al valore iniziale) è stata misurata 12 e 22 giorni dopo l'irraggiamento, mentre l'area fogliare e la presenza di fiori e semi, così come la comparsa di fenomeni di clorosi e necrosi, sono stati valutati dopo 22 giorni dall'esposizione dei tessuti fogliari alle diverse dosi di raggi X (Figura 2).

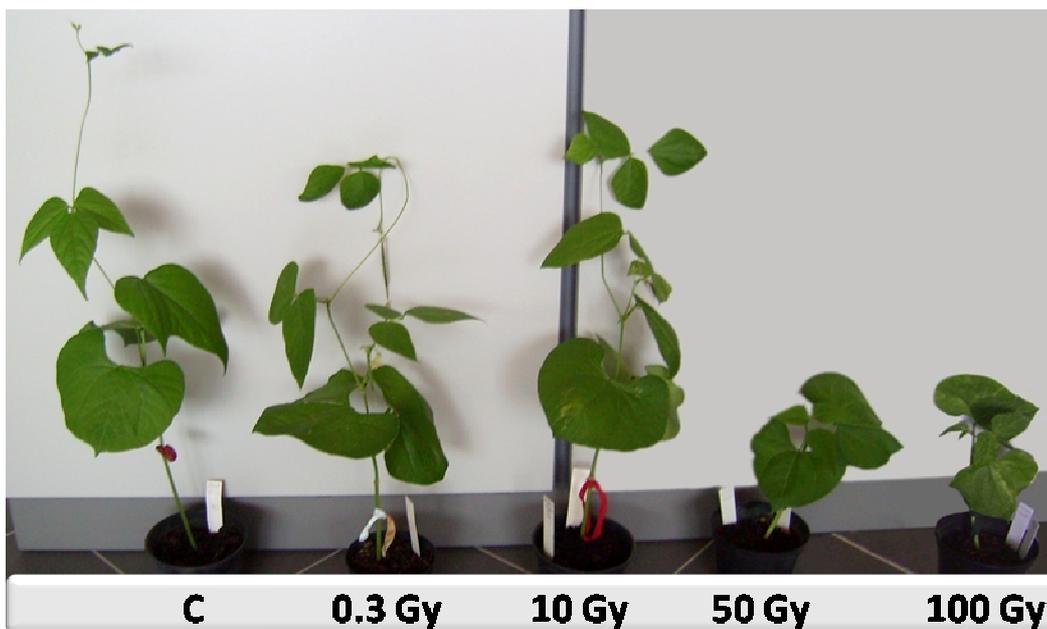


Figura 2: piante di *Phaseolus vulgaris* L. dopo 22 giorni dall'esposizione a diverse dosi di raggi X (0.3, 10, 50 e 100 Gy)

3.2.4 Determinazione del contenuto di pigmenti fotosintetici, della massima efficienza fotochimica del PSII e dell'attività dell'enzima Rubisco

Per la determinazione del contenuto totale di clorofilla (a+b) e carotenoidi (x+c), sono stati raccolti dischetti di tessuto da foglie L1 e L3 esposte a diverse dosi di raggi X. I pigmenti sono stati estratti meccanicamente in ambiente refrigerato mediante mortaio e pestello, utilizzando come sovente di estrazione acetone 100%, e quantificati, previa centrifugazione, con uno spettrofotometro (UV-VIS Cary 100, Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA) a 662, 645 e 470 nm, secondo le equazioni e la procedura descritta da Liechtenthaler (1987).

La massima efficienza fotochimica del PSII è stata valutata analizzando il rapporto Fv/Fm. Tale indice fotochimico in condizioni ottimali di crescita, presenta un valore intorno a 0,83 (Johnson et al. 1993) che diminuisce significativamente in condizioni di stress. Le misure sono state effettuate tramite un fluorimetro portatile a luce modulata (JUNIOR PAM, Walz, Germany) equipaggiato con una speciale cuvette

che consente il monitoraggio simultaneo delle condizioni di temperatura e luce sulla foglia al momento della misura.

Per la misurazione dell'attività dell'enzima Rubisco, campioni di foglia sono stati triturati in azoto liquido e rapidamente estratti in 2 ml di tampone contenente Tris-bicina (pH 8.0) 100 mmol/L, MgCl₂ 5 mmol/L, 1% β -mercaptoetanololo (v/v), fenilmetilsulfonil fluoride 2 mmol/L, e 30 mg di polivinilpirrolidone (PVPP). Gli estratti sono stati centrifugati a 12000 g a 4°C per 10 min. L'estratto ottenuto è stato aggiunto alla miscela di reazione contenente Tris-bicine 100 mM (pH 8.0), MgCl₂ 10 mmol/L, EDTA 0,2 mM, ditiotreitolo (DTT) 5 mM, NaHCO₃ 40 mmol/L, ATP 4 mmol/L, NADH 0,2 mmol/L, ribulosio 1-5 bifosfato (RuBP) 0.2 mmol/L e un'unità enzimatica di 3-fosfoglicerato chinasi (PGK) e 3-fosfogliceraldeideidrogenasi (3-PGADH). L'attività dell'enzima è stata misurata spettrofotometricamente a 340 nm, a 30 °C per 10 min (UV-vis Cary 100, Agilent Technologies, USA).

I valori di assorbanza sono stati convertiti in concentrazione di NADH utilizzando un coefficiente di estinzione di 6.22 (mmol/L)⁻¹. L'attività è stata espressa come mmol di NADH ossidato su cm⁻² di area fogliare (Ouerghi et al., 2000).

3.2.5 Determinazione della capacità antiossidante

Il saggio per la determinazione degli antiossidanti si basa sulla riduzione di Mo(VI) a Mo(V) da parte dei campioni analizzati con conseguente formazione del complesso verde fosfato/Mo(V) a pH acido (Prieto et al., 1999). I campioni fogliari (0,3g) sono stati congelati con azoto liquido e sminuzzati meccanicamente utilizzando pestello e mortaio. Sono stati aggiunti 1 ml/g di acqua, e il materiale è stato omogeneizzato e conservato tutta la notte al buio. L'estratto è stato centrifugato a 10,000g per 15 min. Il pellet è stato risospeso nel solvente e centrifugato ancora. I due surnatanti ottenuti sono stati conservati a 4°C. Per la determinazione allo spettrofotometro, 1 ml di miscela di reazione (0.6 mol/L acido solforico, 28 mmol/L fosfato di sodio, e 4 mol/L molibdato d'ammonio) è stato aggiunto alle aliquote dei campioni (0,1 ml), che sono state poi incubate a 95°C per 90 min. L'assorbanza della soluzione è stata misurata ad un lunghezza d'onda di 695 nm. La soluzione del bianco conteneva 1 ml della miscela di reazione; un volume appropriato dello stesso

solvente utilizzato per i campioni è stato incubato alle stesse condizioni come per il resto dei campioni. Nelle stesse condizioni dell'esperimento, è stato determinato il valore α [(mol/L)⁻¹ cm⁻¹] della soluzione di acido ascorbico (1 mol/L). La capacità antiossidante è stata espressa come quantità di acido ascorbico (nmol g⁻¹ FW).

3.2.6 Saggio di attività della Poli ADP-ribosio polimerasi (PARP)

L'attività dell'enzima PARP è stata misurata su frazioni nucleari di foglie L1 ed L3 in condizioni di saggio standard. La miscela di reazione (Tris-HCl 0,5 M, pH 7.5, MgCl₂ 50 mM, DTT 10 mM), dal volume finale 50 μ l e, contenente l'omogenato (20 μ g), è stata incubata in presenza di [³²P] NAD 0,01 mM (10.000 cpm/nmoli). Dopo un'incubazione di 20 minuti, alla temperatura di 30° C, la reazione è stata bloccata in ghiaccio per 30 minuti, mediante l'aggiunta di TCA 20%. Il precipitato così ottenuto è stato filtrato mediante carta Millipore del tipo HAWP000IO (0,45 μ m) e lavato con 20-30 volumi di TCA 10% freddo. La radioattività associata al filtro è stata misurata in uno scintillatore in fase liquida (Bechman LS 1701), dopo l'aggiunta di 5 ml di liquido di scintillazione (Lipofluor, Lumac). L'attività enzimatica è espressa in mUnità, dove 1 mU rappresenta la quantità di enzima richiesto per trasformare 1 nanomole di NAD⁺ in ADPR in un minuto, al valore di pH e temperatura ottimali.

3.2.7 Analisi statistica

I dati sperimentali sono stati analizzati statisticamente per poter valutare la significatività delle differenze tra i diversi trattamenti nel tempo. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante ANOVA, seguita dal post-hoc test Student-Newman-Keuls (Sigma-Stat 3.0 package, Jandel Scientific, USA). La differenza è stata valutata significativa per P<0.05. I dati riportati sono medie \pm es (n=4) per ciascun trattamento.

3.3 Risultati e discussione

3.3.1 Crescita ed efficienza fotochimica in funzione della dose

Nelle piante di fagiolo, l'irraggiamento a dosi elevate di raggi X, vale a dire 50 e 100 Gy ha determinato la riduzione della crescita inibendo l'allungamento dello stelo (Figura 3a) e l'espansione della lamina fogliare (Figura 3b). In particolare il confronto dell'area fogliare tra le foglie L1 ed L3 dopo 22 giorni dal trattamento indica che l'espansione della foglia L3 è stata fortemente influenzata dalle alte dosi. Fino a dosi di 10 Gy l'area fogliare di L1 ed L3 non mostra differenze significative, mentre dopo l'esposizione a 50 e 100 Gy, le foglie L3 risultano essere significativamente più piccole rispetto alle L1 ($P < 0.001$). Dosi basse di raggi X (0,3 e 10 Gy), invece, stimolano la crescita delle foglie in modo significativo ($p < 0,01$) rispetto alle foglie controllo non irraggiate, sia in L1 che in L3.

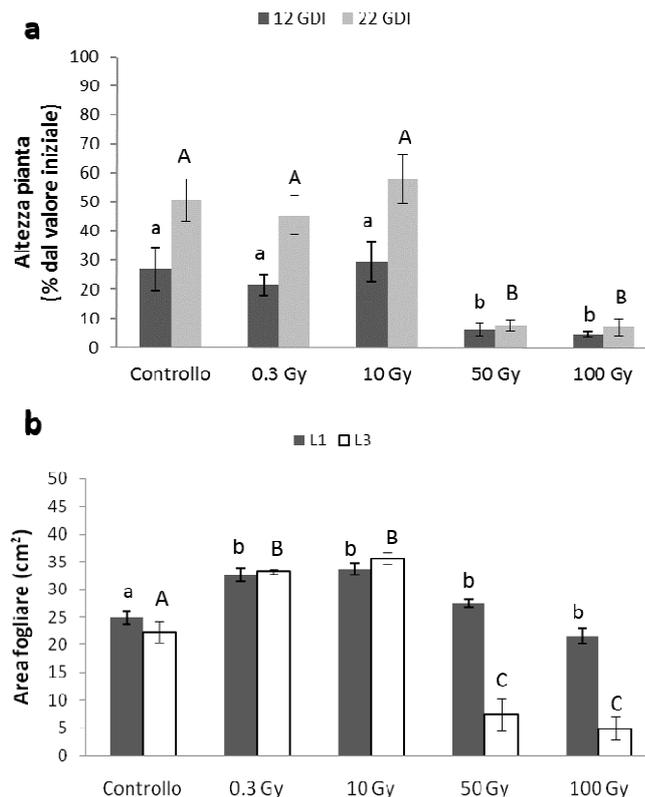


Figura 3: (a) Altezza della pianta, espressa come aumento in percentuale rispetto al valore iniziale, misurata dopo 12 e 22 giorni dall'irraggiamento (GDI – giorni dopo l'irraggiamento); e (b) area fogliare (cm²) misurata 22 giorni dopo l'irraggiamento delle foglie L1 ed L3 di piante di *P. vulgaris* esposte a diverse dosi di raggi X. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti ($P < 0.05$)

Ulteriori osservazioni hanno dimostrato che, dopo l'irraggiamento a 50 e 100 Gy, le piante non hanno prodotto fiori e baccelli; e a 100 Gy alcune foglie hanno mostrato segni di clorosi ma non necrosi tissutale (Tabella 1).

Tabella 1: Presenza di fiori, baccelli, clorosi fogliare e necrosi in piante di *P.vulgaris* esposte a diverse dosi di raggi X. Le osservazioni sono state effettuate 22 giorni dopo l'irraggiamento.

Dose (Gy)	Flori	Semi	Clorosi	Necrosi
0	+	+	-	-
0,3	+	+	-	-
10	+	+	-	-
50	-	-	-	-
100	-	-	+	-

L'effetto dei raggi X sulle clorofille e carotenoidi è rappresentato in Figura 4. Sia le foglie L1 che L3, irraggiate con dosi di 0,3 e 10 Gy mostrano un contenuto totale di clorofilla (a+b) e carotenoidi (x+c) simile al controllo, mentre a dosi più elevate (50 e 100 Gy), la clorofilla e i carotenoidi risultano essere significativamente inferiori ($P < 0,01$) rispetto ai valori misurati a dosi inferiori e nelle foglie controllo (Figura 4a e 4b).

Per valutare se la diminuzione del corredo pigmentario riscontrata dopo irraggiamento a 50 e 100 Gy avesse influenzato l'efficienza del fotosistema II, sono stati misurati, sia nelle foglie L1 che L3 i valori di F_v/F_m , in quanto indicatore dello stato di salute della pianta e dell'insorgenza di condizioni di stress. La figura 5 mostra sia in L1 che L3 esposte a dosi di 50 e 100 Gy, una diminuzione significativa dei valori di F_v/F_m rispetto al controllo, che diventa più marcata per le foglie L3.

Inoltre per comprendere se le elevate dosi di radiazioni ionizzanti potessero aver compromesso la capacità delle piante di fissare la CO_2 durante la fotosintesi, è stata misurata l'attività della Rubisco come mmoli di NADH ossidato, sia in foglie L1 che L3.

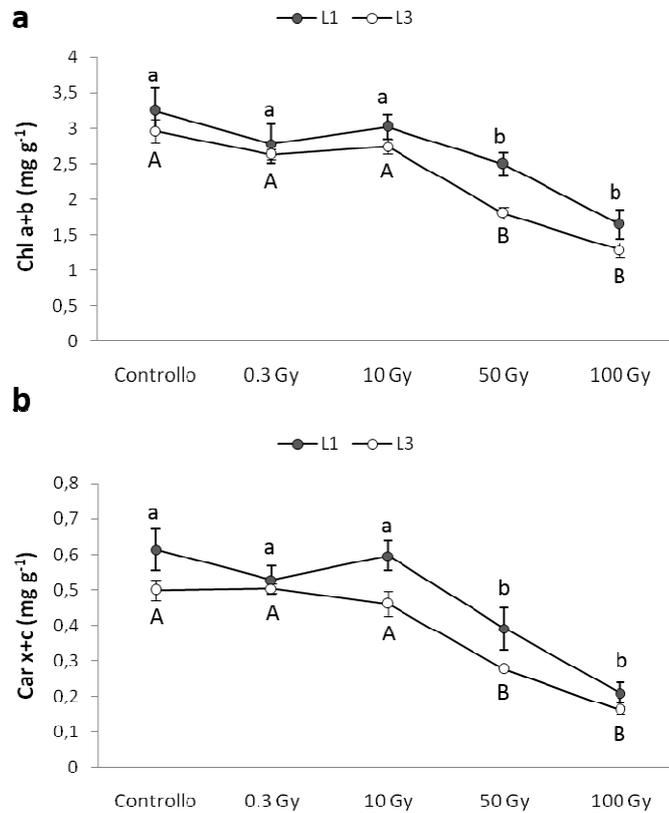


Figura 4: (a) Contenuto totale di clorofilla (Chl a+b), e (b) di carotenoidi (Car x+c), in foglie L1 e L3 irraggiate con diverse dosi di raggi X. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P<0.05)

Nelle foglie L1, elevate dosi di raggi X non influenzano in modo significativo l'attività enzimatica, mentre nelle foglie L3 si osserva una significativa diminuzione (P <0,01) dell'ossidazione del NADH (Figura 6).

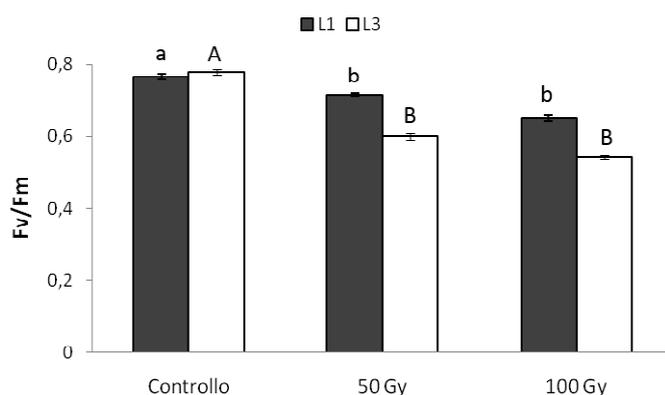


Figura 5: Massima efficienza del fotosistema II (Fv/Fm) misurata in foglie L1 e L3 esposte a dosi di 50 e 100 Gy di raggi X. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P<0.05)

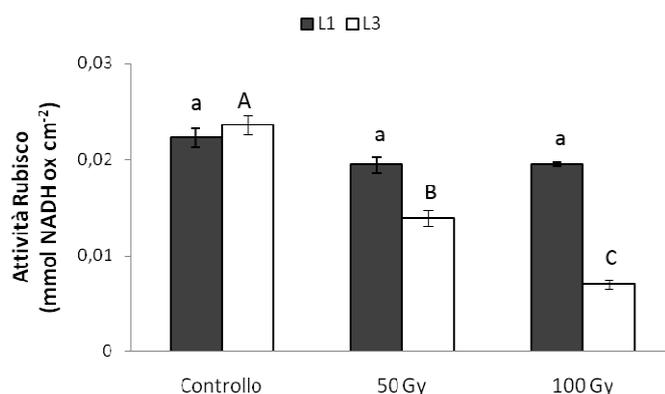


Figura 6: Attività dell'enzima Rubisco misurata come mmol di NADH ossidato per area fogliare in foglie L1 e L3 dopo esposizione a 50 e 100 Gy di raggi X. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P<0.05).

3.3.2 Meccanismi di radioresistenza

Per verificare se l'esposizione del tessuto fogliare ai raggi X potesse aver causato stress ossidativo e per verificare se l'entità di tale stress potesse essere differente in base all'età dei tessuti fogliari, è stato analizzato il contenuto di antiossidanti idrosolubili totali sia in foglie L1 che L3, misurato come quantità di acido ascorbico. I risultati mostrano che l'irraggiamento sia di tessuti fogliari adulti che giovani induce una diminuzione della capacità antiossidante in maniera dose

dipendente. In particolare, alte dosi di raggi X (50 and 100 Gy) riducono le difese antiossidanti solubili rispettivamente del 90,4 % e 90 % nelle foglie L1 e del 72% e 75% nelle foglie L3 (Figura 7).

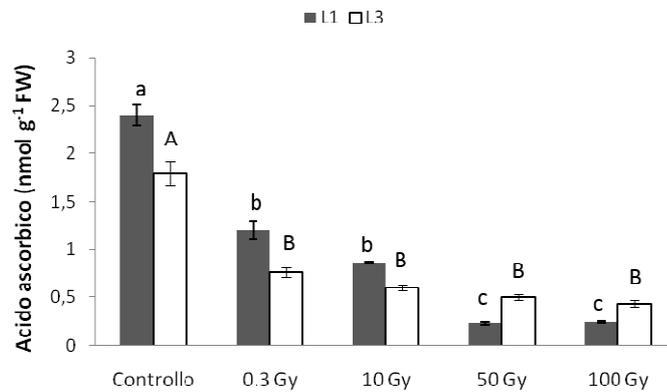


Figura 7: Concentrazione di acido ascorbico (nmol g⁻¹ FW) in foglie L1 e L3 dopo esposizione a diverse dosi di raggi X. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P<0.05)

Quando le difese antiossidanti sono insufficienti a contrastare le specie reattive dell'ossigeno (ROS), un loro accumulo può determinare danni ossidativi a carico del DNA. Quindi sono stati eseguiti saggi di attività dell'enzima PARP, la cui attivazione suggerisce la presenza di rotture nella molecola di DNA.

Nelle foglie L1 l'irraggiamento produce un aumento costante dell'attività enzimatica fino a dosi di 10 Gy. I più alti livelli di attività PARP (P <0,01) sono stati misurati dopo esposizione a 50 Gy, mentre dosi di raggi X più elevate (100 Gy) non producono un ulteriore aumento dell'attività enzimatica. Nelle foglie L3, invece la PARP risulta fortemente attiva solo dopo esposizione a 100 Gy, in cui si raggiunge il più alto valore di attività (P <0,001); dosi più basse di raggi X, invece non inducono alterazioni significative dell'enzima rispetto al controllo (Figura 8).

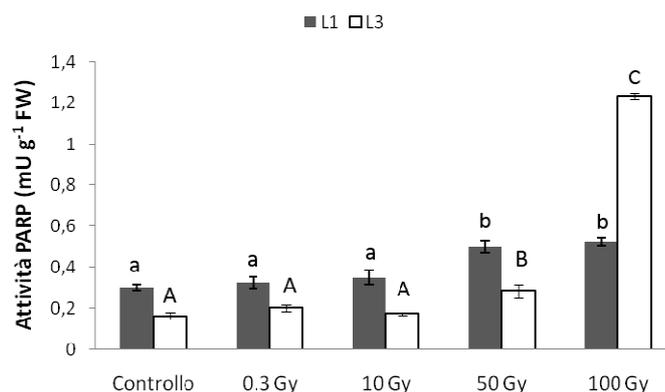


Figura 8: Attività della Poli ADP-ribosio polimerasi (PARP) in foglie L1 e L3 dopo esposizione a diverse dosi di raggi X. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P<0.05)

I dati nel loro complesso indicano una maggiore vulnerabilità dei tessuti giovani alla radiazione. Infatti, sebbene la forte riduzione di acido ascorbico e l'aumento di attività PARP si verifica in entrambi i tipi di foglie, suggerendo la presenza indiretta di danni indotti da un aumento di specie reattive dell'ossigeno, la foglia L1 sopravvive alle alte dosi di raggi X utilizzate nel presente studio, mentre la foglia L3 muore e si stacca dallo stelo.

Per comprendere le ragioni della maggiore radio resistenza delle foglie che hanno ricevuto la radiazione a sviluppo completo, ovvero le foglie L1 è stata seguita nel tempo il comportamento della foglia dopo l'irraggiamento a 50 Gy per quanto concerne il contenuto di acido ascorbico e l'attività dell'enzima PARP. In particolare la capacità antiossidante e l'attività della PARP sono state monitorate dopo 3, 10, 12 e 20 giorni dall'irraggiamento. I risultati indicano che l'attività della PARP (Figura 9a) e il contenuto di antiossidanti solubili (Figura 9b) ritornano al valore del controllo dopo 10 giorni dall'irraggiamento.

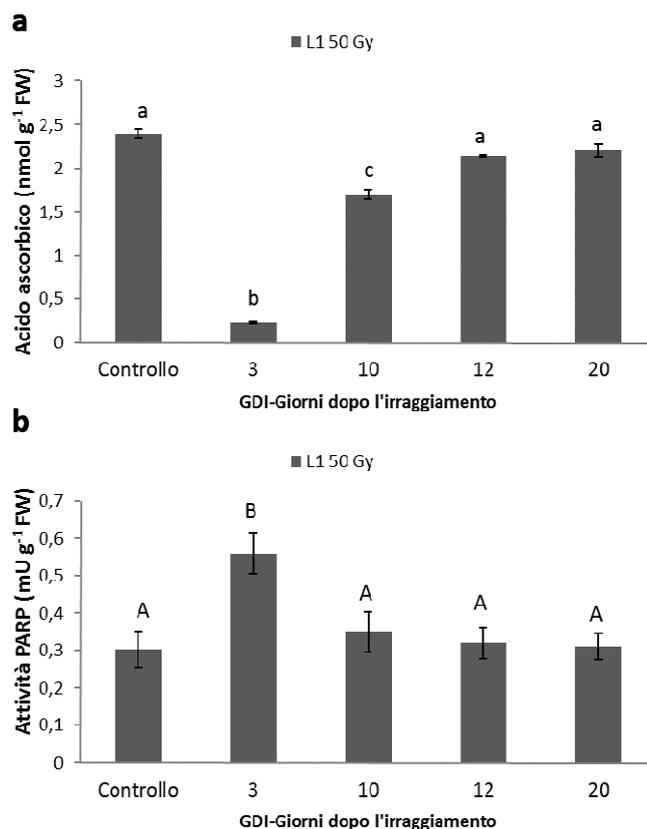


Figura 9: (a) Concentrazione di acido ascorbico; e (b) attività della Poli ADP-ribosio polimerasi (PARP) in foglie L1 esposte a 50 Gy di raggi X, valutate 3, 10, 12 e 20 giorni dopo l'irraggiamento (GDI). Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P<0.05)

3.4 Conclusioni

L'esposizione ai raggi X influisce significativamente sullo sviluppo di piante di *P. vulgaris* L. e gli effetti oltre ad essere dose-dipendente, sono anche fortemente influenzati dall'età della foglia.

I cambiamenti dell'area fogliare appaiono evidenti 22 giorni dopo l'irraggiamento. In questo caso le foglie L1, che ricevono la radiazione in fase di pieno sviluppo, mostrano una resistenza superiore ai raggi X rispetto alle foglie L3 in via di sviluppo, indipendentemente dalla dose. Per quanto riguarda il corredo pigmentario, si riscontra un effetto dose dipendente in entrambi i tipi di foglia.

Fino a 10 Gy, il contenuto totale di clorofilla e carotenoidi non varia, ma dosi di 50 e 100 Gy inibiscono fortemente la sintesi sia di clorofilla che di carotenoidi, in accordo con precedenti studi condotti con dosi elevate di raggi X (Al-Enezi e Al-Khayri 2012; Alzahrani 2012; Arena et al 2013). La riduzione del contenuto di pigmenti fotosintetici a seguito dell'esposizione ad alte dosi di raggi X può essere attribuita all'effetto nocivo dello stress ossidativo indotto dalla sovrapproduzione di radicali liberi (ROS) causata dalle radiazioni ionizzanti (Mortazavi et al. 2003).

La significativa riduzione del contenuto di pigmenti fotosintetici in foglie L1 a 50 e 100 Gy è accompagnata da una diminuzione, seppur lieve, del rapporto Fv/Fm indicando un decremento di efficienza fotochimica del PSII, che non si accompagna ad un calo nell'attività dell'enzima Rubisco rispetto al controllo; ciò suggerisce una forte stabilità nella funzione dell'enzima che ne garantisce la funzionalità. Al contrario, le stesse dosi di raggi X minano fortemente la funzionalità del PSII e l'attività della Rubisco nelle foglie L3; qui infatti la riduzione dei pigmenti fotosintetici si verifica in concomitanza con la diminuzione del valore di Fv/Fm e dell'attività enzimatica, indicando la perdita di funzionalità della proteina, con conseguenze dannose per la fotosintesi. Questo risultato è coerente con i dati riportati da Ling et al. (2008), in cui l'irraggiamento di piante con alte dosi di raggi gamma altera gli scambi gassosi e l'attività enzimatica della Rubisco.

La conseguenza più immediata all'esposizione di un sistema biologico alle radiazioni ionizzanti è l'aumento dei radicali liberi, che possono essere responsabili di varie forme di danno cellulare, alterando numerosi processi biologici (Esnault, et al., 2010). Queste specie sono in grado di reagire rapidamente con vari tipi di macromolecole, tra lipidi, proteine e DNA, che generalmente è considerato il sito primario di danni da radiazioni (Devasagayam, et al., 2004).

In particolare, la rottura del DNA radioindotta può generare sia alterazioni genomiche che cromosomiche (Roldàn-Arjona e Ariza, 2009). I dati ottenuti circa l'attività della PARP insieme alla valutazione della capacità antiossidante totale hanno fornito informazioni utili sulla dose soglia di raggi X responsabili del danno ossidativo al DNA e alle membrane cellulari, nei tessuti vegetali giovani e maturi. I risultati indicano che in entrambi i tessuti fogliari analizzati, a basse dosi di raggi X, vale a dire 0,3 e 10 Gy si verifica una riduzione significativa degli antiossidanti

solubili anche se l'attività della PARP aumenta solo a dosi molto elevate di raggi X (50 e 100 Gy).

È ragionevole ipotizzare che fino a dosi di 10 Gy la modulazione del sistema di difesa antiossidante sia efficace nel mantenere l'equilibrio dei ROS nella cellula evitando danni ossidativi, mentre a dosi elevate di raggi X i livelli di antiossidanti diventano insufficienti per neutralizzare i ROS causando stress ossidativo che induce l'attivazione della PARP (Ame et al. 2004).

I risultati ottenuti dimostrano che l'attività PARP è significativamente influenzata sia dall'intensità della radiazione e sia dallo stadio di sviluppo fogliare. L'attività più elevata in assoluto dell'enzima nelle foglie L3, a seguito dell'irraggiamento a 100 Gy, suggerisce l'instaurarsi di importanti danni al DNA che le cellule cercano di riparare, e indica una maggiore vulnerabilità dei tessuti giovani rispetto a quelli adulti alle lesioni radioindotte.

Le analisi degli antiossidanti e dell'attività della PARP, effettuati in funzione del tempo hanno consentito di comprendere che la sopravvivenza delle foglie L1 anche a dosi elevate di raggi X, è assicurata dalla capacità di recupero dalle lesioni radioindotte. Infatti, dopo 10 giorni dall'esposizione a 50 Gy, si verifica un aumento degli antiossidanti solubili simile al controllo e il ripristino dell'attività della PARP.

Il ritorno di attività della PARP a valori prossimi a quelli misurati nel controllo conferma il successo nella riparazione del DNA essenziale per la sopravvivenza della foglia dopo lo stress, mentre il recupero dei livelli di antiossidanti dopo l'irraggiamento, garantisce il mantenimento dei normali livelli energetici intracellulari, richiesti per un buono stato di salute delle piante.

In conclusione i dati complessivi suggeriscono che la specie *P.vulgaris* L. risulta essere radioresistente ai raggi X, in accordo con la sopravvivenza delle piante dopo esposizione a tutte le dosi di radiazioni testate, anche se l'assenza di fiori e baccelli a dosi elevate di 50 e 100 Gy indica un effetto nocivo sulla capacità riproduttiva delle piante.

CAPITOLO 4

Effetti dell'irraggiamento con ioni pesanti C e Ti su semi della specie *Dolichos melanophthalmus* DC.: confronto tra prima e seconda generazione di piante.

4.1 Premessa e disegno sperimentale

In questo capitolo vengono analizzati gli effetti dell'irraggiamento ad alto LET, utilizzando fasci di ioni carbonio (C) e titanio (Ti), sul sistema seme, che dalla letteratura è noto essere lo stadio fenologico più resistente per quanto concerne le piante. La scelta di utilizzare fasci di ioni pesanti è dovuta al fatto che la radiazione spaziale, a causa del suo complesso spettro e delle sue numerose componenti, è difficile da riprodurre in esperimenti condotti sulla Terra, perché avrebbe costi molto elevati e sarebbe di difficile attuazione. Dunque studi preliminari possono essere condotti usando particelle cariche di alta energia che cominciano a fornire una base necessaria per future sperimentazioni direttamente a bordo di speciali facilities nello Spazio.

In particolare, si è scelto di utilizzare ioni C e Ti perché sono tra i radionuclidi tra i più utilizzati in medicina nucleare, inoltre le dosi impiegate in questo studio 1 e 10 Gy per entrambi i radioisotopi, rappresentano sicuramente quantità letali per le cellule di mammifero o animali in genere, ma non per le cellule vegetali, le quali, per caratteristiche intrinseche, risultano molto più resistenti alla radiazione (Arena et al., 2014a). Basse dosi di radiazioni ionizzanti sono da tempo utilizzate nei programmi di miglioramento genetico per indurre caratteristiche favorevoli in specifiche cultivars di piante destinate al mercato alimentare, così nel contesto della biologia spaziale, livelli non letali di radiazioni ionizzanti, come quelli che si avrebbero a bordo delle stazioni spaziali, opportunamente schermate, potrebbero stimolare caratteristiche fisiologiche e morfologiche in alcune specie tali da aumentare la loro attitudine ad essere coltivate nello spazio.

Il “candidato più idoneo” deve infatti soddisfare molteplici requisiti tecnici ed economici, tra cui: taglia ridotta a causa dei volumi limitati a disposizione per la coltivazione, elevata produttività in termini di resa colturale, miglioramento delle

caratteristiche nutrizionali (aumento del contenuto proteico e di sostanze antiossidanti) e una notevole capacità di resistere agli stress ambientali (per es. deficit idrico).

In questa sperimentazione semi di *Dolichos melanophtalmus* DC. (fagiolino nano) sono stati esposti a fasci di ioni pesanti C e Ti ciascuno fornito a due diverse dosi (1 Gy e 10 Gy), con lo scopo di verificare se tali livelli di radiazione potessero stimolare la crescita delle piante e/o opportune caratteristiche da suggerire l'utilizzazione di questa specie a bordo delle BLSSs. Le analisi allometriche, ecofisiologiche e biochimiche sono state condotte su due generazioni di piante: la prima derivante da semi irraggiati, la seconda da piante germinate dagli stessi semi irraggiati.

Dopo l'irraggiamento dei semi, è stata effettuato un confronto tra le piante di prima e di seconda generazione per valutare la risposta biologica alle radiazioni e la comparsa di eventuali cambiamenti dello sviluppo e della fisiologia delle piante. In particolare le alterazioni nella crescita e nello sviluppo della pianta sono state seguite attraverso una serie di misure morfometriche (variazione in altezza, numero di foglie ed area, presenza di fiori e strutture riproduttive), mentre l'efficienza dell'apparato fotosintetico è stata stimata mediante misure di emissione di fluorescenza, contenuto di pigmenti fotosintetici ed espressione e livelli della proteina D1 e dell'enzima Rubisco. La presenza di un eventuale stress ossidativo è stata valutata mediante analisi del contenuto di H₂O₂ ed acido ascorbico. Come indicatore del danno a livello del DNA, a seguito di stress ossidativo, è stata determinata, inoltre, anche l'attività della poli-ADP ribosio polimerasi, (PARP) enzima in grado di riconoscere il DNA danneggiato e di reclutare sui siti di danno i complessi enzimatici deputati alla riparazione del DNA (Amor et al. 1998).

4.2 Materiali e metodi

4.2.1 La specie studiata

Dolichos melanophtalmus DC. conosciuta anche come *Dolichos unguiculata*, è una specie erbacea appartenente alla famiglia delle leguminose, fabaceae, originaria dell'Africa e dell'Asia (Figura 1a). Questa specie, a portamento nano, raggiunge

un'altezza di circa 40–50 cm, presenta un apparato radicale a fittone, con radici secondarie che presentano le caratteristiche nodosità delle leguminose, dovute alla presenza dei batteri azotofissatori (*Rhizobium leguminosarum*). Le foglie sono articolate in tre lembi appuntiti che compongono la foglia trifoliata e si presentano di un colore verde lucido. I fiori, solitamente di colore bianco, si aprono durante le prime ore del mattino e si chiudono a metà giornata e solo una parte di essi riesce a produrre i baccelli; questi sono di forma cilindrica, lunghi 15-25 cm e di colore verde intenso. I semi contenuti nel baccello, sono di colore bianco crema con una caratteristica macchia di colore scuro in corrispondenza del punto di inserzione sul baccello (Figura 1b). Proprio a causa di questa macchia scura («occhio») presente sul seme, questa specie viene chiamata fagiolo dall'occhio o dolico. Il ciclo di coltivazione in pieno campo varia dai 70 ai 90-100 giorni, ma in condizioni controllate, può essere più veloce.

Le piante del genere *Dolichos* sono simili al fagiolo comune del genere *Phaseolus* ma differiscono da questo per non avere la carena contorta a spirale e per prediligere un clima più caldo con terreni tendenti all'asciutto e ben concimati, mentre le caratteristiche alimentari del seme sono uguali a quelle degli altri tipi di fagiolo. I fagioli sono un alimento indispensabile per la salute e il benessere umano in quanto, essendo legumi, sono ricchi di lecitina, un fosfolipide che favorisce l'emulsione dei grassi, evitandone l'accumulo nel sangue e riducendo di conseguenza il livello di colesterolo. Inoltre i fagioli hanno un'elevata concentrazione proteica (le proteine rappresentano circa il 23% del peso secco), numerosi elementi minerali e diverse vitamine, e possiedono un'elevata quantità di fibre (circa il 18%). I semi utilizzati in questo esperimento sono stati forniti da “Hortus Sementi” s.r.l. (Longiano, FC, Italia).

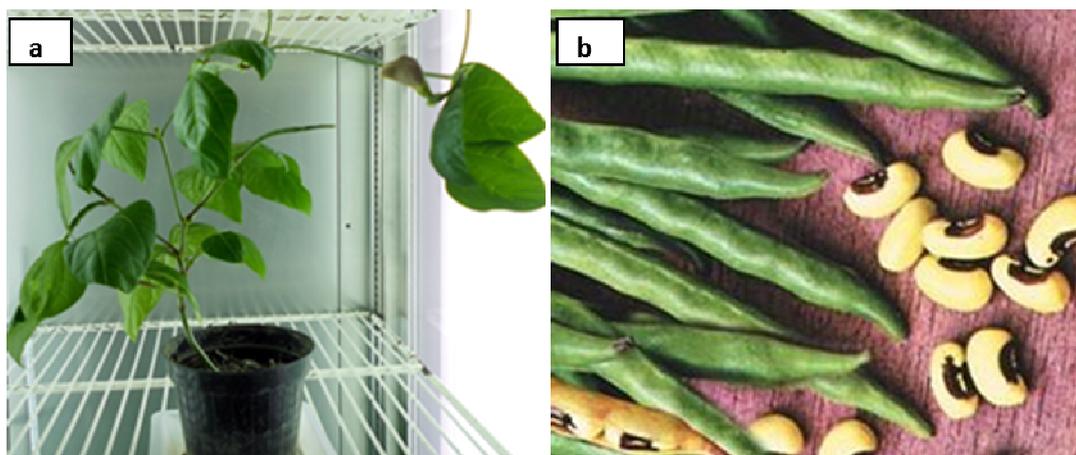


Figura 1: (a) pianta di *Dolichos melanophtalmus* DC.; e (b) baccelli e semi.

4.2.2 Procedura d'irraggiamento e condizioni di crescita

Semi secchi di *Dolichos melanophtalmus* DC. stati esposti ad un fascio di ioni carbonio (LET: 80 keV/im) ed un fascio di ioni titanio (LET: 108 keV/im) a due differenti dosi per ciascuno ione: 1 Gy e 10 Gy. Per ciascuna delle dosi sono stati irraggiati n=50 semi secchi. I valori delle dosi, considerati bassi per la fase fenologica di seme, sono stati scelti al fine di ottenere possibili effetti ormetici. La procedura d'irraggiamento è stata svolta presso il GSI in Germania (Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH, Darmstadt, Hesse), un centro specializzato in ricerche su ioni pesanti (Figura 2a).

Dopo il trattamento i semi sono stati trasportati in Italia presso l'università di Napoli Federico II, dove sono state poi effettuate tutte le analisi successive.

La germinazione dei semi è avvenuta su dischi di carta da filtro imbibita con acqua distillata all'interno di capsule Petri, incubate al buio a 20°C. In seguito i germinelli sono stati posti ad 1-2 cm di profondità in vasi di 15 cm di diametro riempiti con terreno comune. La coltivazione delle piante è avvenuta in una camera di crescita in condizioni controllate di temperatura (25±1 °C), umidità relativa (RH 60%) e luce (Photosynthetic Photon Flux Density, PPF, 170-200 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$), (Figura 2b).

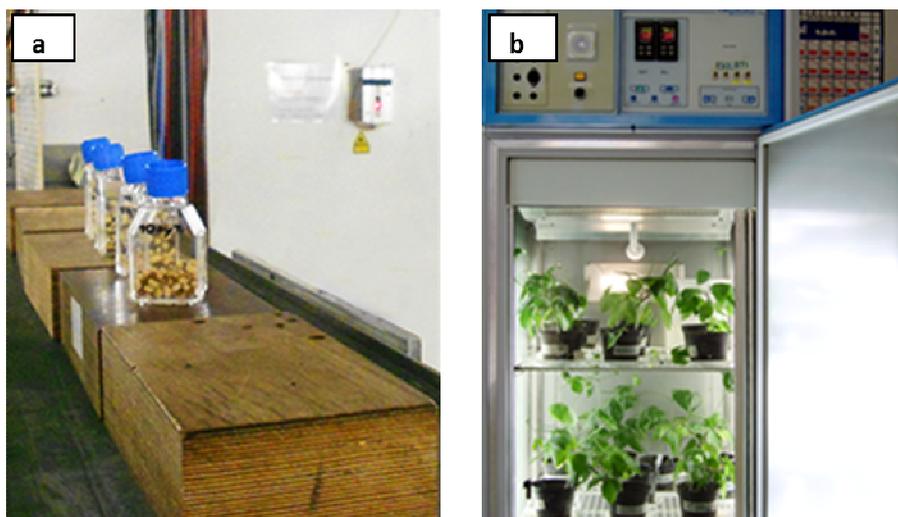


Figura 2: (a) Procedura di irraggiamento dei semi con ioni C e Ti presso il GSI (Darmstadt, Germany); e (b) piante di *D. melanophthalmus* coltivate in camera di crescita.

Durante la crescita, le piante sono state regolarmente irrigate per reintegrare l'acqua persa per evapotraspirazione. La crescita delle piante è stata seguita per circa 60 giorni, fino al completamento del ciclo vitale. I semi prodotti da questa prima generazione di piante sono stati poi raccolti e fatti germinare nuovamente. Le piante di seconda generazione così ottenute sono state coltivate in maniera analoga a quanto descritto per le piante di prima generazione e su di esse è stata condotta la stessa batteria di analisi.

4.2.3 Studio della germinazione

Semi irraggiati della prima generazione di piante e semi non irraggiati della seconda generazione sono stati posti a germinare al buio ad una temperatura di 20°C su carta da filtro imbibita, in piastre Petri sterili. Dopo sette giorni è stata calcolata la percentuale finale di germinazione (FGP final germination percent), secondo la seguente formula:

(FGP) a 7 giorni:

$(\text{Numero di semi germinati dopo 7 giorni} / \text{Numero totale di semi}) \cdot 100$

4.2.4 Monitoraggio della crescita e misure allometriche

La crescita delle piante è stata monitorata fino al completamento del ciclo vitale, circa 60 giorni, al fine di osservare eventuali cambiamenti nel normale sviluppo delle piante dovuto all'azione delle radiazioni ionizzanti. In particolare sono state analizzate, per entrambe le due generazioni di piante, con cadenza settimanale, le seguenti caratteristiche morfometriche: altezza della pianta espressa in mm, misurata con cadenza settimanale come altezza dello stelo principale; numero di foglie; area fogliare, espressa in cm^2 , numero di baccelli e numero di semi. L'area fogliare è stata determinata mediante fotografia digitale (Figura 3) e quantificata tramite il software per le analisi di immagini, Image-J. Per semplicità nei risultati saranno riportati e confrontati solo i rilievi raccolti al termine del ciclo vitale di ciascuna generazione.



Figura 3: Misura dell'area fogliare mediante fotografia digitale.

4.2.5 Misure di emissione di fluorescenza

Al fine di ottenere informazioni sulla capacità fotosintetica e sullo stato fisiologico di entrambe le generazioni di piante, sono stati determinati alcuni indici fotochimici con la tecnica dell'emissione di fluorescenza da parte della clorofilla *a*

del fotosistema II (PSII). Si tratta di una metodologia d'indagine non invasiva e non distruttiva per l'organismo vegetale che permette di valutare l'efficienza di conversione della luce ai centri di reazione, fornendo un'indicazione sulla funzionalità dell'apparato fotosintetico nelle reazioni della fase luminosa della fotosintesi (Schreiber et al. 1994). Il principio su cui si basa l'analisi fluorimetrica prevede che l'energia luminosa assorbita dalle molecole di clorofilla in una foglia possa andare incontro a tre destini:

- essere utilizzata per le reazioni fotochimiche della la fotosintesi (dissipazione fotochimica);
- essere dissipata come calore se in eccesso (dissipazione termica),
- essere riemessa come fluorescenza.

Questi tre processi sono in competizione tra loro, e dato che la loro somma rappresenta la percentuale totale dell'energia assorbita, l'incremento di uno di essi, determinerà il decremento degli altri due. Pertanto misurando la resa della fluorescenza, è possibile ottenere informazioni relative alla variazione di efficienza fotochimica ed alla dissipazione termica. Le misure di fluorescenza sono state effettuate tramite un fluorimetro portatile a luce modulata (JUNIOR PAM, Walz, Germany) (Figura 4).



Figura 4: Fluorimetro JUNIOR PAM (Walz, Germany) munito di cuvette di misura dove viene alloggiata la foglia. Nell'esempio la misurazione viene condotta su una pianta di pomodoro. E' visibile la fibra ottica di 2 mm di diametro.

Prima di procedere all'analisi fluorimetrica le piante sono state acclimate al buio per 30 minuti. Quando una foglia adattata al buio viene illuminata, si instaura una cinetica particolare chiamata "Effetto Kautsky" (Kautsky et al. 1960). Il primo evento che si osserva è un rapido incremento della fluorescenza dal valore di base (F_0) ad un valore massimo (F_m), seguito da una lenta diminuzione fino al raggiungimento di un livello stazionario di fluorescenza (F'). L'emissione di fluorescenza viene osservata quando i centri di reazione del Fotosistema II sono "chiusi", ciò accade quando il plastochinone Q_A , avendo accettato un elettrone non può accettarne altri e si trova in uno stato ridotto (Maxwell e Johnson, 2000). Proseguendo con l'illuminazione, nel giro di pochi minuti, il livello di fluorescenza diminuisce progressivamente (Schreiber et al. 1994).

Tale fenomeno è chiamato "quenching" o smorzamento della fluorescenza e può essere ricondotto a due cause. Una parte dell'energia assorbita dalla foglia può essere dissipata fotochimicamente dando origine ad un "quenching fotochimico della fluorescenza" (qP), un'altra parte può essere dissipata sotto forma di calore, questo secondo processo è chiamato "quenching non-fotochimico" (qN o NPQ). Uno dei metodi più utilizzati per separare le componenti del quenching fotochimico (qP) da quelle del quenching non-fotochimico (qN) è il metodo del "saturation pulse" (Figura 5).

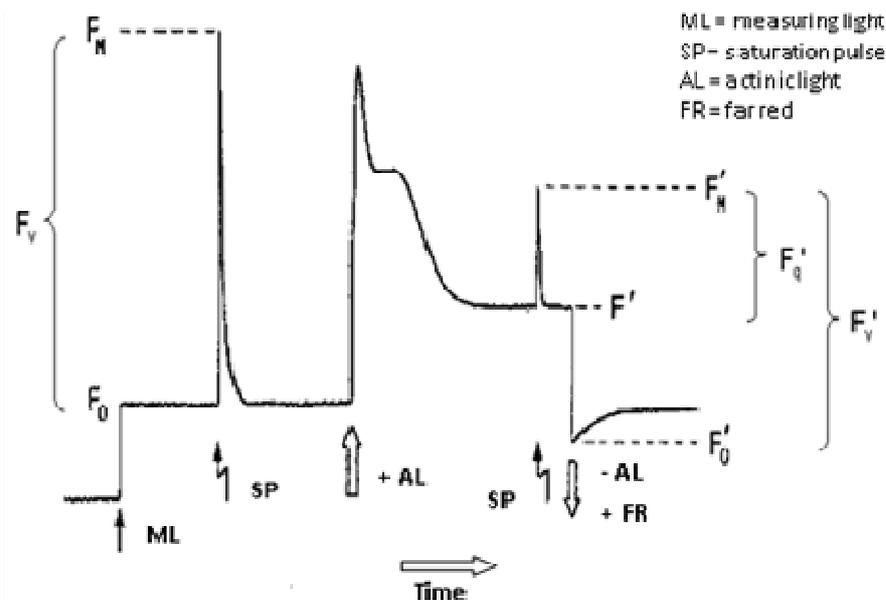


Figura 5: Metodo del saturation pulse.

Alla foglia adattata al buio viene applicato un flash di luce molto intenso (saturante) così da chiudere (o ridurre) i centri di reazione del PSII e determinare una riduzione completa di Q_A . Quando ciò si verifica, la fluorescenza passa dal valore di base (F_0) ad un valore massimo (F_m), tutta l'attività fotochimica è soppressa ed il quenching fotochimico (q_P) è = 0. La differenza tra F_m e F_0 rappresenta la fluorescenza variabile al buio (F_v) ed il rapporto F_v/F_m indica la massima efficienza fotochimica del PSII in una foglia adattata al buio. Il rapporto F_v/F_m è un indice molto usato in ecofisiologia per valutare l'efficienza fotochimica potenziale dei fotosistemi (Krause e Weis 1991). In condizioni ottimali di crescita, la maggior parte delle specie vegetali presenta un valore di F_v/F_m intorno a 0,83 (Johnson et al. 1993) che diminuisce significativamente in condizioni di stress.

Illuminando di nuovo la foglia, l'emissione di fluorescenza raggiunge un altro picco che velocemente diminuisce fino ad un livello stazionario F' . L'abbassamento della fluorescenza è dovuto alla riossidazione di Q_A . Applicando un nuovo flash di luce saturante, si raggiunge la fluorescenza massima alla luce (F_m'). La diminuzione di F_m' rispetto ad F_m è dovuta all'instaurarsi di processi non fotochimici (q_N o NPQ). La differenza tra F_m' ed F' è indicata da F_q' ed il rapporto F_q'/F_m' o Φ_{PSII} indica l'entità dei processi fotochimici nell'estinzione della fluorescenza. Se al buio si applica alla foglia un pulse di luce nel rosso lontano si ottiene la rapidissima riossidazione del Q_A e si raggiunge il valore minimo di fluorescenza alla luce (F_0'). Conoscendo F_0' è possibile calcolare i coefficienti q_N , q_P e F_v'/F_m' (ovvero l'efficienza di cattura della luce da parte dei centri di reazione aperti del PSII).

In questo studio sono stati misurati sulle foglie pienamente espanse di fagiolino nano di piante di prima e seconda generazione i seguenti indici fotochimici:

- Massima efficienza fotochimica del PSII calcolata come:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m \text{ (Kitajima e Butler 1975)}$$

- Resa quantica del trasporto elettronico lineare del PSII (Φ_{PSII} o Y_{II}) espressa come:

$$\Phi_{PSII} = (F_m' - F') / F_m' \text{ (Genty et al., 1989)}$$

Questi due indici stimano il lavoro fatto dal PSII indicando la frazione di quanti di luce assorbiti, usati per una separazione di carica stabile nei centri di reazione del PSII;

- Attività di trasporto elettronico attraverso il PSII (ETR) espressa come:

$$ETR = \ddot{O}PSII * PPF D * 0.5 * 0.84 \text{ (Maxwell e Johnson 2000)}$$

Dove PPF D (Photosynthetic Photon Flux Density) è la densità di flusso fotonico, 0.84 rappresenta la percentuale media di luce incidente realmente assorbita dalla foglia e 0.5 il fattore che tiene conto dell'uguale ripartizione dell'energia tra i 2 fotosistemi;

- Quenching non-fotochimico (NPQ) indice del grado di dissipazione termica, espresso come con l'equazione di Stern-Volmer:

$$NPQ = F_m - F_m' / F_m' \text{ (Bilger e Björkman 1990)}$$

Nel disegno sperimentale utilizzato in questo esperimento, le analisi fotochimiche sono state eseguite sulla prima foglia trifogliata completamente espansa per entrambe le generazioni di piante. Le foglie sono state previamente oscurate per 30 minuti al fine di calcolare F_v/F_m e successivamente sottoposte ad intervalli di intensità luminosa crescente (da 0 a $1500 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) per ottenere curve veloci di risposta alla luce (*fast-kinetic light response curves*) per tutti i parametri fotochimici.

4.2.6 Quantificazione dei pigmenti fotosintetici

La quantificazione dei pigmenti fotosintetici è stata effettuata immediatamente dopo l'analisi fluorimetrica sulle stesse foglie appartenenti a piante sia di prima che seconda generazione. Per i materiali e metodi utilizzati si rimanda al capitolo 3.2.4.

4.2.7 Identificazione e quantificazione della proteina D1 e Rubisco mediante SDS-PAGE e Western blotting

L'identificazione delle proteine D1 e dell'enzima Rubisco è stata condotta su tessuto fogliare di piante della prima e seconda generazione di fagiolino nano. Le proteine della frazione citoplasmatica totale di ogni foglia esaminata e le proteine standard D1 o RbcL sono state sottoposte a elettroforesi denaturante (SDS PAGE) (Laemmli, 1970).

Per l'analisi è stato utilizzato un gel di poliacrilammide al 12 % in presenza di sodio dodecil solfato (SDS) 0.1%. I campioni denaturati sono stati sottoposti a un campo elettrico di 20 mA per 120 min in una vasca per elettroforesi (Bio-Rad). Per l'analisi western i polipeptidi separati sono stati trasferiti su una membrana PVDF (Bio Rad) a 200 mA per 2 ore a 4°C. Dopo il trasferimento la membrana PVDF è stata dapprima trattata con la soluzione di bloccaggio (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, Tween 20, 0.1 % (v/v), Milk 10%), e successivamente incubata per 1 h a temperatura ambiente con l'anticorpo primario. Per l'identificazione della proteina D1 è stato utilizzato l'anticorpo chicken anti-PsbA (Agriserà, 1:5000 v/v), mentre per l'enzima Rubisco l'anticorpo rabbit anti-RbcL (Agriserà, 1:10000, v/v).

I peptidi di interesse sono stati identificati mediante incubazione con anticorpo secondario [goat anti-chicken coniugato con perossidasi di rafano (HRP) per la D1; goat anti-rabbit, coniugato con perossidasi di rafano (HRP) per la Rubisco; Agriserà]. La rivelazione è stata effettuata utilizzando il kit per la chemiluminescenza (ECL Western Blotting Analysis System, Ge Healthcare) utilizzando l'apparato Chemidoc (Bio-Rad). Per ottenere un'informazione quantitativa associata alle singole bande, è stata effettuata un'analisi densitometrica mediante il software Quantity One (Bio-Rad).

4.2.8 Estrazione e determinazione di AsA ed H₂O₂

Per analizzare la risposta delle piante allo stress ossidativo indotto dalle radiazioni ionizzanti sono state valutate, per le foglie sia di prima che di seconda generazione, le variazioni intracellulari di acido ascorbico (AsA), un antiossidante ad

azione non enzimatica. Lo stress ossidativo è stato misurato in termini di incremento di concentrazione di H_2O_2 . I campioni utilizzati per l'estrazione dell'AsA e dell' H_2O_2 sono stati lavati con acqua distillata, asciugati con carta da filtro e immediatamente congelati in azoto liquido a $-80^\circ C$. I tessuti congelati sono stati triturati in azoto liquido usando un mortaio e un pestello e la polvere ottenuta è stata immediatamente utilizzata per le analisi.

La concentrazione di acido ascorbico (AsA) è stata determinata mediante l'utilizzo dell'Ascorbic Acid Assay Kit II (Sigma-Aldrich). Il kit si basa su un test colorimetrico in cui la concentrazione di antiossidante nell'estratto è letta attraverso una misura spettrofotometrica a 593 nm. La concentrazione di AsA espressa in $ng/\mu L$ è determinata in base ad una curva standard.

I livelli di perossido di idrogeno (H_2O_2) sono stati determinati in base al procedimento di Sergiev et al. (1997). I campioni sono stati omogeneizzati in 5 ml di TCA 0,1% (w/v). L'omogenato è stato centrifugato a 12 000 g per 15 minuti e sono stati recuperati 0,5 ml di surnatante a cui sono stati aggiunti 0,5 ml di tampone potassio fosfato 10 mM (pH 7,0) e 1 ml di KI 1 M. L'assorbanza del surnatante è stata letta a 390 nm e il contenuto di H_2O_2 è stato determinato in riferimento ad una curva standard.

4.2.9 Saggio di attività della Poli ADP-ribosio polimerasi (PARP)

L'attività dell'enzima PARP è stata misurata su frazioni nucleari di tessuto fogliare. Le analisi sono state condotte sulla prima foglia trifogliata completamente espansa di piante della prima generazione. Per i materiali e metodi utilizzati si rimanda al capitolo 3.2.6.

4.2.10 Analisi statistica

Per l'analisi statistica dei dati sperimentali si rimanda al capitolo 3.2.7.

4.3 Risultati e discussione

4.3.1 Effetto degli ioni C e Ti sulla crescita

In figura 6 è riportata la percentuale di germinazione dopo 7 giorni dalla semina, per la prima (Figura 6a) e la seconda generazione (Figura 6b) di piante. I dati indicano che il trattamento con ioni carbonio (C) influisce negativamente sul processo di germinazione nei semi di prima generazione che hanno subito direttamente l'irraggiamento. Tale fenomeno sembra essere legato anche alla dose assorbita; infatti l'irraggiamento dei semi con C 1 Gy riduce la germinazione dell'85% rispetto al controllo non irraggiato, mentre l'esposizione dei semi a C 10 Gy riduce la germinazione dell'80%. Nella seconda generazione, il comportamento è differente: solo la dose Titanio 10 Gy causa una riduzione significativa della germinazione pari al 70% rispetto al controllo. Dati in letteratura riportano che in seguito all'assorbimento di radiazioni ionizzanti la capacità di germinazione può diminuire, in accordo con i risultati ottenuti in questo studio; tuttavia essa può anche aumentare, o restare invariata (Bayonove et al. 1984; Wei et al. 1995; Zimmermann et al. 1996; Huang et al. 1997; Hase et al. 1999; Kumagai et al. 2000). Generalmente l'effetto inibitorio della radiazione sulla germinazione è da attribuirsi all'aumento delle specie reattive dell'ossigeno che si generano per radiolisi dell'acqua; mentre l'incremento dei tassi di germinazione viene attribuito a ragioni strutturali come un aumento nella porosità dei tegumenti che porta ad un aumento nella capacità di assorbimento di acqua e nutrienti da parte dei semi (Hammond et al. 1996).

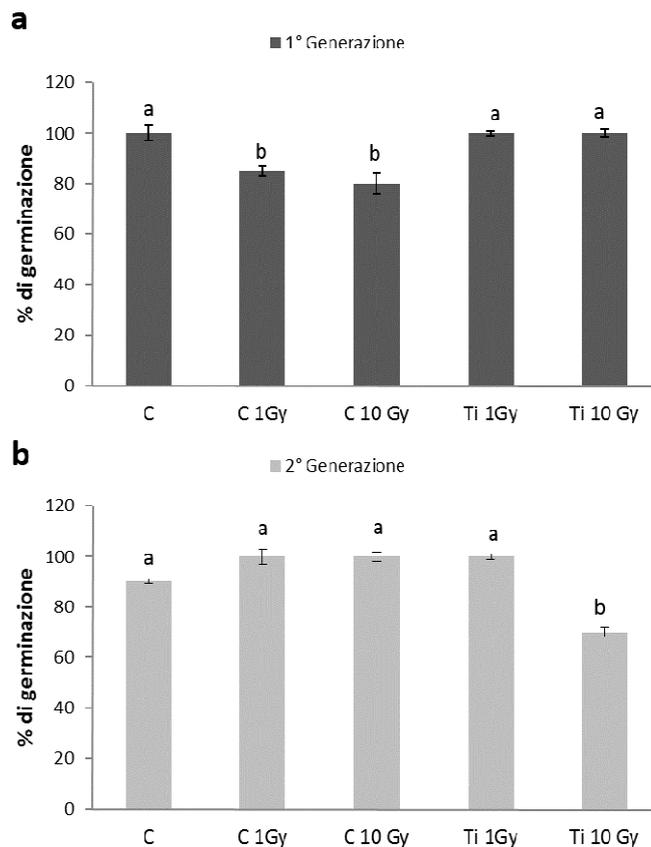


Figura 6: Percentuale di germinazione a 7 giorni dalla semina nella prima (a) nella seconda generazione (b) di semi di *D. melanophtalmus*. La prima generazione di semi è stata sottoposta ad irraggiamento con ioni carbonio (C) e titanio (Ti) alle dosi di 1 Gy e 10 Gy. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Ciascun punto rappresenta la media \pm ES di n=5. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P<0.05).

L'esposizione dei semi a fasci di ioni carbonio e titanio, ha influenzato significativamente la crescita delle piante di prima generazione, ripercuotendosi anche sulla seconda generazione di piante non direttamente irraggiate.

In Figura 7, sono raffigurate le piante di seconda generazione a 60 giorni, ovvero al termine del ciclo vegetativo. La crescita delle piante di prima e seconda generazione, valutata in termini di altezza del fusto, numero di foglie ed area fogliare sono riportati in Figura 8.

Per quanto riguarda l'altezza, la seconda generazione ha mostrato valori più elevati rispetto alla prima, specialmente per le piante germinate da semi irraggiati con Ti, sia alla dose di 1 che di 10 Gy per le quali è stato osservato un significativo (P<0.05) aumento dell'allungamento dello stelo rispetto al controllo (Figura 8a).

La dose C 10 Gy è quella che in entrambe le generazioni ha determinato una riduzione significativa ($P < 0.05$) dell'altezza dello stelo rispetto al controllo e alle altre dosi (Figura 8a).

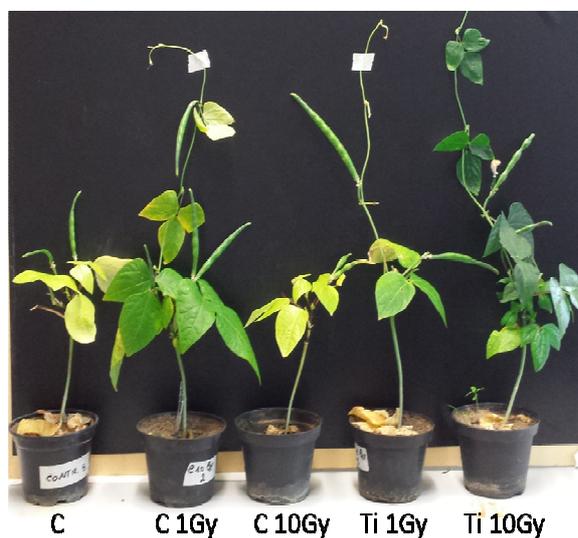


Figura 7: Seconda generazione di piante di *D. melanophtalmus* alla fine del ciclo culturale. Da sinistra verso destra: Controllo, C 1Gy, C 10Gy, Ti 1Gy, Ti 10Gy.

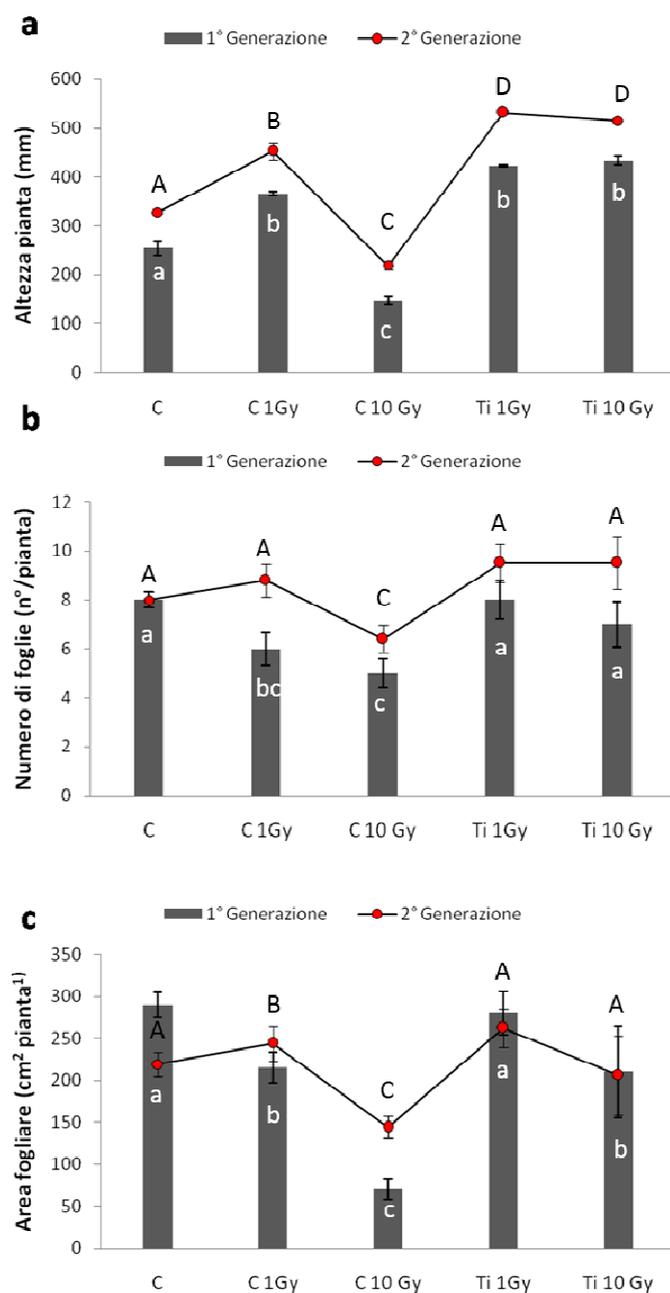


Figura 8: Altezza della pianta (a), numero di foglie (b) e area fogliare (c), misurate al termine del ciclo vitale in piante di *D. melanophthalmus* della prima generazione, sviluppate da semi controllo e semi irraggiati con ioni carbonio (C) e titanio (Ti) alle dosi 1 Gy e 10 Gy, e della seconda generazione. Ciascun punto rappresenta la media \pm ES di n=5. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P<0.05).

In entrambe le generazioni, le piante C 10 Gy hanno evidenziato, in accordo alla minore elongazione del fusto, anche un numero inferiore di foglie (P<0.05) rispetto a tutte le altre piante (Figura 8b). Oltre a determinare una riduzione dell'elongazione del fusto ed una limitazione dello sviluppo di nuove foglie, è stato

osservato che l'irraggiamento dei semi con C 10 Gy ha provocato un effetto negativo anche sullo sviluppo della lamina fogliare, riducendone, in entrambe le generazioni, in maniera significativa ($P < 0.05$) la superficie rispetto alle piantine controllo e a tutti gli altri trattamenti (Figura 8c).

E' interessante notare che pur non ricevendo direttamente la radiazione, anche la seconda generazione piante ha mostrato una risposta analoga a quella osservata nella prima generazione. Probabilmente l'arresto dello sviluppo fogliare, in termini di numero di foglie e area fogliare, nelle piante della prima generazione è dovuto ad un effetto delle radiazioni sulla mitosi cellulare mentre l'effetto sulla seconda generazione potrebbe essere legato ad aberrazioni cromosomiche che si sono fissate nella linea cellulare. E' infatti noto che anche piccole dosi di ioni pesanti possono alterare il normale sviluppo dei meristemi e dunque la formazione di nuovi organi sia attraverso l'interazione diretta con le strutture cellulari, sia inducendo mutazioni dei geni che controllano l'organogenesi (Hirono et al., 1970).

Al fine di valutare se le piante sviluppatesi da semi irradiati fossero in grado di completare il loro ciclo vitale e/o se l'esposizione alle dosi di ioni pesanti utilizzate in questo studio potesse aver influenzato la capacità riproduttiva delle piante, è stata monitorata la comparsa di baccelli e semi (Figura 9). I risultati di quest'analisi hanno dimostrato che tutte le piante germinate da semi irraggiati completano il loro ciclo vitale, sviluppando baccelli e semi vitali capaci di dare origine ad una seconda generazione di piante.

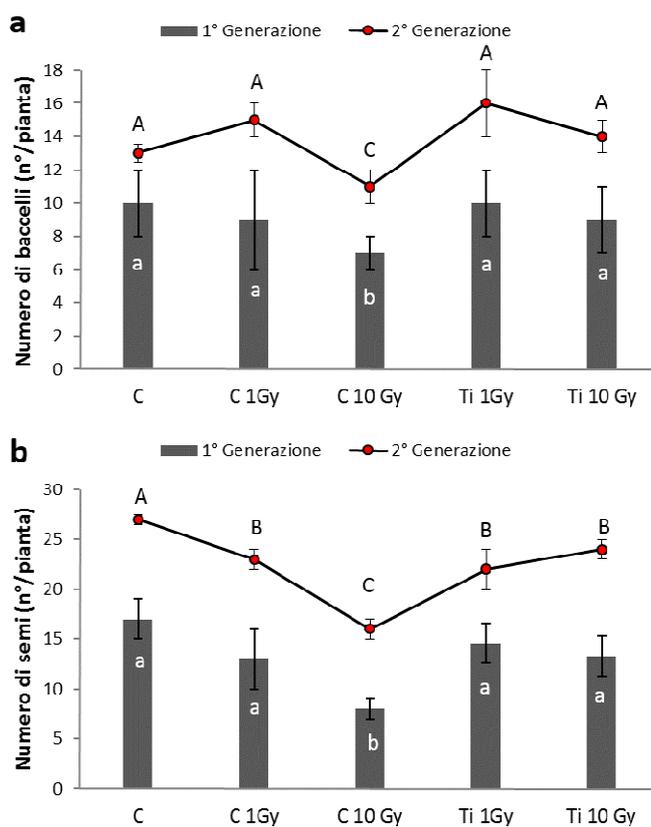


Figura 9: Numero di baccelli(a), e di semi (b) prodotti da piante di *D. melanophthalmus* di prima generazione sviluppate da semi controllo e semi irraggiati con ioni carbonio (C) e titanio (Ti) alle dosi 1 Gy e 10 Gy e della seconda generazione. Ciascun punto rappresenta la media \pm ES di $n=5$. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti ($P<0.05$).

Tuttavia è opportuno notare, per entrambe le generazioni, che le piante nate da semi irraggiati con C 10 Gy, risultano avere il minor ($P<0.05$) numero di baccelli (Figura 9a) e semi (Figura 9b) rispetto al controllo e a tutti gli altri trattamenti, mentre nessuna differenza è emersa tra controllo e tutti gli altri trattamenti.

4.3.2 Effetti sulla funzionalità dell'apparato fotosintetico

La funzionalità dell'apparato fotosintetico è stata valutata analizzando il contenuto in pigmenti fotosintetici, l'efficienza delle reazioni fotochimiche (attraverso misure di emissione di fluorescenza della clorofilla *a*), l'espressione ed il contenuto delle proteine D1 del fotosistema II e della Rubisco.

Le curve veloci di risposta alla luce per gli indici fotochimici: resa quantica del trasporto elettronico lineare (\ddot{O}_{PSII}), attività di trasporto elettronico (ETR) e quenching non-fotochimico (NPQ), hanno permesso di valutare nelle piante di prima (Figura 9) e seconda generazione (Figura 10) l'efficacia con cui l'apparato fotosintetico è in grado di convertire la luce ai centri di reazione in processi assimilativi e dissipativi della fotosintesi.

Nella prima generazione di piante, le curve in funzione dell'irradianza hanno evidenziato per le foglie C 10 Gy valori di \ddot{O}_{PSII} , ETR ed NPQ significativamente più bassi ($P < 0.01$) rispetto al controllo e a tutti gli altri trattamenti; per alti valori di irradianza, le foglie C 1 Gy sono risultate più efficienti, come dimostrano i valori più alti ($P < 0.05$) di \ddot{O}_{PSII} e ETR a irradianze superiori a 1000 PPFD. Per il coefficiente di dissipazione termica NPQ sono state riscontrate le maggiori differenze tra gli irraggiamenti: le foglie C 1 Gy risultano avere l'NPQ più elevato e simile al controllo, le foglie Ti 1 e 10 Gy valori intermedi, mentre C 10 Gy i valori più bassi ($P < 0.01$); tali comportamenti suggeriscono una diversa capacità dell'apparato fotosintetico di dissipare l'eccesso di energia luminosa che non viene utilizzata nella fotosintesi. L'irraggiamento dei semi con ioni C 10 Gy ha determinato anche una significativa riduzione ($P < 0.05$) della massima efficienza fotochimica, F_v/F_m , rispetto a tutti gli altri trattamenti.

Nel complesso generale lo ione C è quello che maggiormente ha influenzato le reazioni fotochimiche della fotosintesi, con un effetto dose-dipendente. In molti studi è stato dimostrato che le radiazioni ionizzanti, a basso ed alto LET, condizionano l'efficienza dell'apparato fotosintetico in funzione della dose, con effetti stimolatori o nulli a basse dosi ed effetti dannosi a dosi elevate (Fan et al. 2014; Jia e Li 2008; Kim et al. 2005; Kim et al. 2004).

L'effetto negativo esercitato dallo ione C a dosi di 10 Gy potrebbe essere legato alla mancata attivazione, durante le prime fasi di sviluppo della pianta, dei processi di detossificazione e neutralizzazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). È noto, infatti, che le radiazioni ionizzanti sono in grado di causare una perdita di funzionalità del PSII dovuta per lo più ad un'iperproduzione di ROS responsabili della fotoossidazione delle membrane dei tilacoidi, sede dei processi di conversione dell'energia luminosa (De Micco et al. 2011).

Analogamente nelle piante di seconda generazione, prodotte con i semi irraggiati dalle piante di prima generazione, sono stati monitorati gli stessi indici fotochimici in funzione della luce (Figura 10). Anche in questo caso, la dose C 10 Gy, contrariamente a tutte altre, ha avuto ripercussioni negative sull'efficienza fotochimica, infatti le piante C 10 Gy hanno mostrato sia una significativa riduzione ($P < 0.05$) di \dot{O}_{PSII} , ETR ed NPQ in tutto l'intervallo di intensità luminose saggiate, sia un significativo decremento ($P < 0.05$) di F_v/F_m .

Il comportamento dunque, per quanto concerne le reazioni fotochimiche della fotosintesi è risultato analogo nelle due generazioni successive di *D. melanophthalmus*, indicando che un eventuale effetto mutagenico scatenato dagli ioni C 10 Gy, che ha comportato una diminuzione di resa dell'apparato fotosintetico si è trasferito alla seconda generazione.

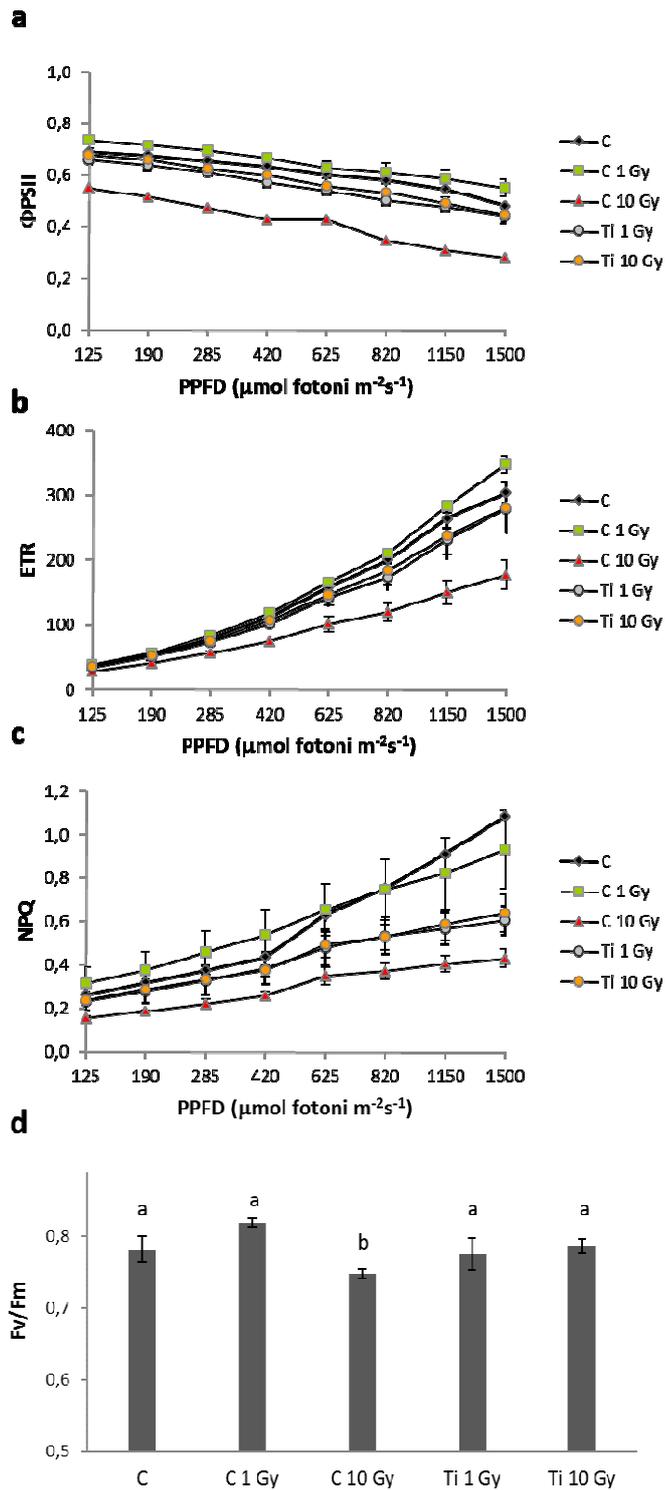


Figura 9: Curve di risposta alla luce per gli indici fotochimici Φ_{PSII} , ETR, NPQ e F_v/F_m misurati in foglie completamente espanse di piante di *D. melanophthalmus* germinate da semi irraggiati, prima generazione. Ciascun punto rappresenta la media \pm ES di $n=4$. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti ($P<0.05$).

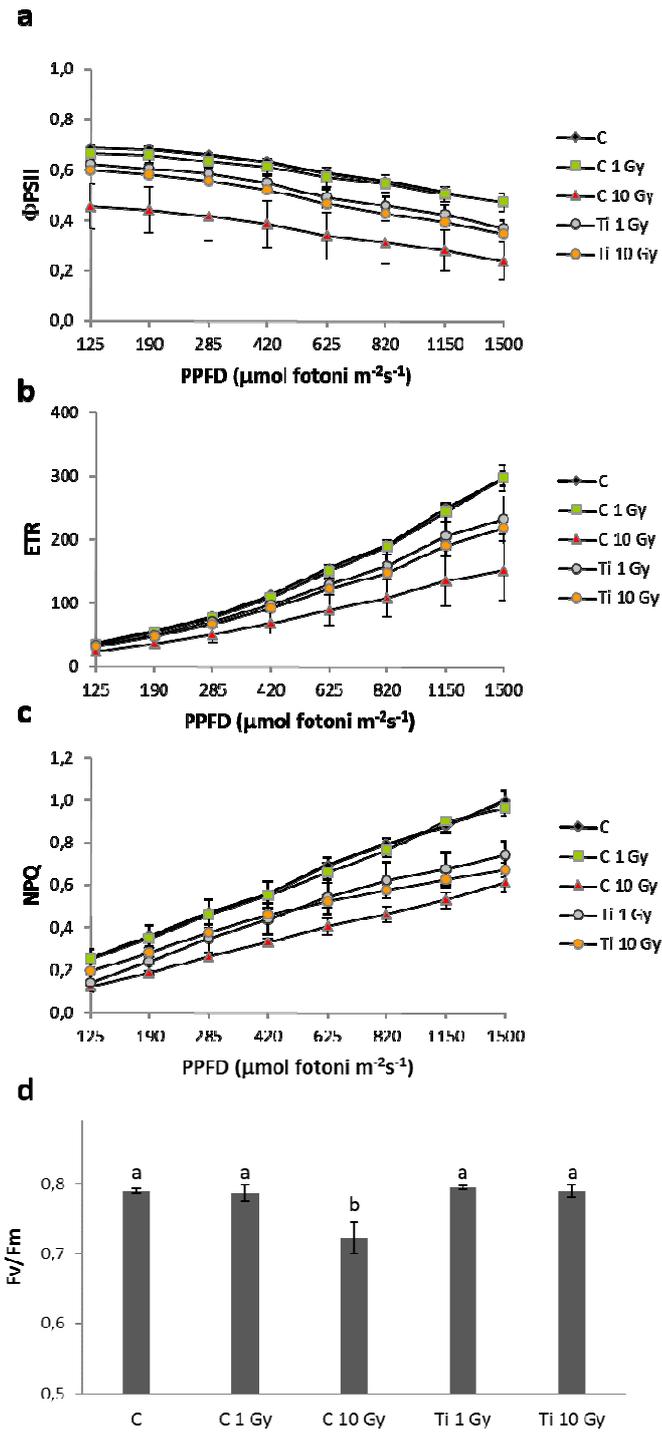


Figura 10: Curve di risposta alla luce per gli indici fotochimici Φ_{PSII} , ETR, NPQ e F_v/F_m misurati in foglie completamente espanse di piante di *D. melanophthalmus*, germinate da semi di seconda generazione. Ciascun punto rappresenta la media \pm ES di $n=4$. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti ($P<0.05$).

Per valutare se la diminuzione di attività del PSII misurata nelle foglie C 10 Gy, potesse dipendere da una limitazione del contenuto di pigmenti fotosintetici, è stato analizzato, in entrambe le generazioni di piante, il contenuto totale di clorofilla (a+b) e carotenoidi (x+c) (Figura 11).

I dati ottenuti hanno mostrato che l'irraggiamento dei semi con C 10 Gy, sia nella prima che nella seconda generazione, ha indotto un significativo decremento ($P < 0.05$) della concentrazione totale di clorofilla (a+b). Nessuna differenza è emersa tra le due generazioni di piante. È interessante notare che solo nella seconda generazione, le piante germinate da semi irraggiati con C e Ti 1 Gy hanno mostrato valori significativamente più elevati ($P < 0.05$) di clorofilla totale rispetto al controllo, evidenziando un effetto positivo di tali dosi sul corredo pigmentario (Figura 11a).

Le concentrazioni di carotenoidi totali hanno mostrato lo stesso andamento delle clorofille, sia nelle piante di prima che di seconda generazione, con valori significativamente più bassi ($P < 0.05$) di carotenoidi totali a C 10 Gy rispetto al controllo (Figura 11b). Questi risultati fanno supporre che la riduzione dell'efficienza fotosintetica, riscontrata in entrambe le generazioni alle dosi di C 10 Gy, possa essere dovuta, tra le altre cause, anche alla riduzione del contenuto di pigmenti che indebolirebbe la capacità di intercettazione della luce da parte dell'antenna del fotosistema.

Diversamente, l'aumento della concentrazione di clorofilla totale riscontrato nelle foglie C e Ti 1 Gy potrebbe essere legato ad una stimolazione nella sintesi di pigmenti indotta dall'esposizione dei semi a dosi non letali di ioni pesanti. Tale fenomeno sembra essere una risposta comune in piante irraggiate con basse dosi di radiazioni ionizzanti (Kim et al. 2004; Borzouei et al. 2010; Marcu et al. 2013); in molti studi, infatti, è stato dimostrato che l'esposizioni a bassissime dosi di radiazione può provocare apprezzabili benefici, conosciuti con il nome di "effetti ormetici" (Arena et al., 2014b).

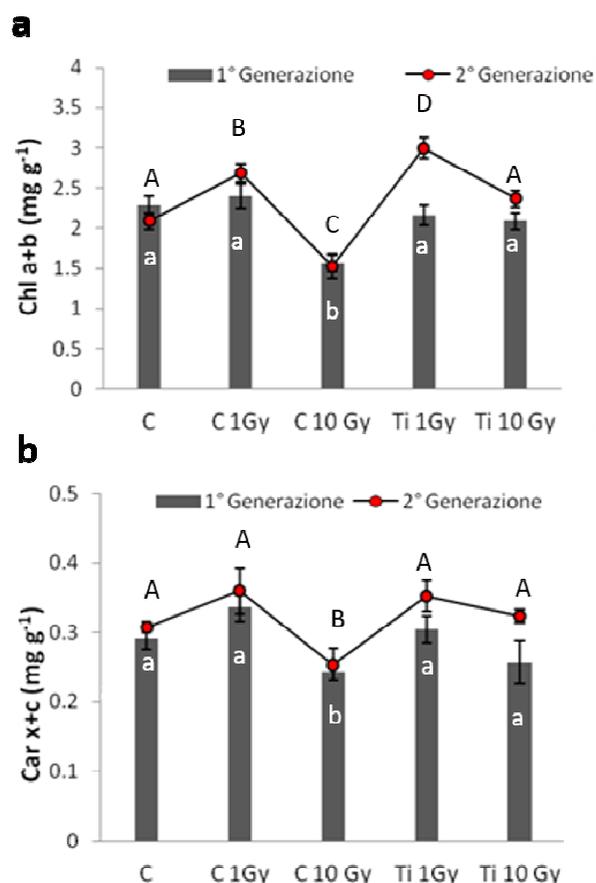


Figura 11: Contenuto totale di clorofilla (a) e carotenoidi (b) misurato in foglie completamente espanse di *D. melanophthalmus* di prima generazione, irraggiate con ioni pesanti allo stadio di seme, e (b) di seconda generazione. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P<0.05).

L'analisi della funzionalità dell'apparato fotosintetico è stata completata analizzando i livelli della proteina D1 del centro di reazione del PSII (Figura 12) e della Rubisco (Figura 13) nelle foglie di prima generazione, irraggiate con ioni pesanti allo stadio di seme, e di seconda generazione.

In Figura 12 sono mostrati il Western blot e l'analisi densitometrica della proteina D1 in foglie appartenenti a piante di prima (figura 12a) e seconda generazione (Figura 12b). Nella prima generazione di piante l'analisi densitometrica ha mostrato un effetto degli ioni sull'espressione proteica che è dose dipendente; infatti, in seguito al trattamento con dosi di 1 Gy per entrambi gli ioni, i livelli di proteina D1 non hanno presentato variazioni rispetto al controllo, mentre sono diminuite alle dosi più alte di 10 Gy. Nella seconda generazione di piante, lo ione

Carbonio alla dose di 1 Gy ha indotto effetti stimolatori sui livelli di D1, rispetto al controllo, ed una diminuzione alla dose di 10 Gy. Lo ione Titanio, indipendentemente dalla dose, non determinò variazioni nei livelli proteici di D1 rispetto al controllo.

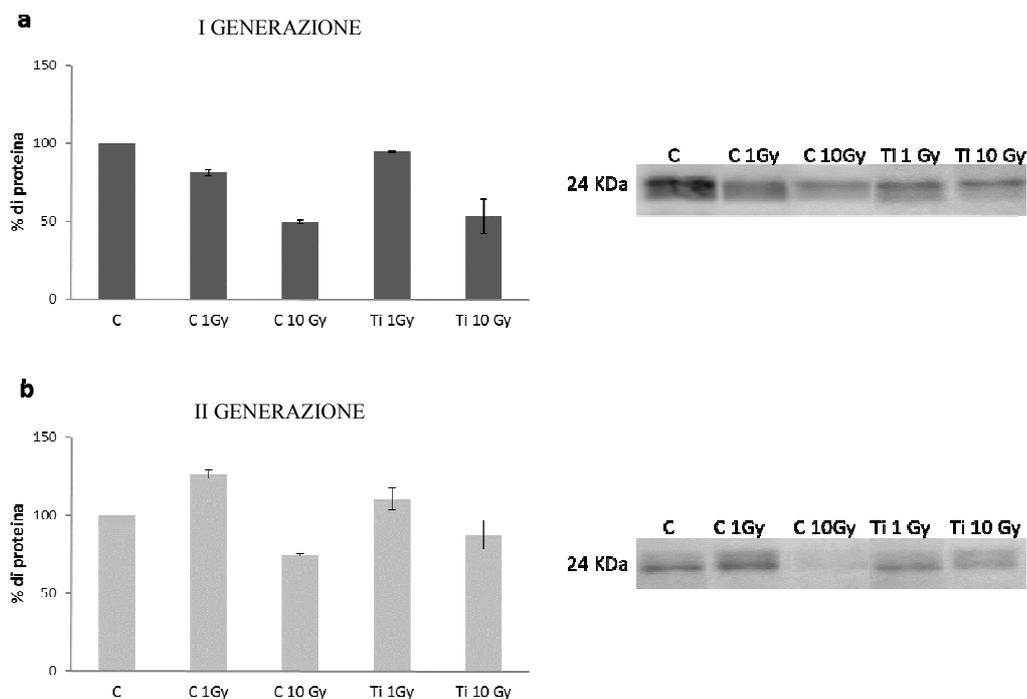


Figura 12: Analisi densitometrica (a sinistra) dei profili Western blot (a destra) della proteina D1 in foglie *D. melanophthalmus* di piante di prima generazione irradiate allo stadio di seme (a) e di seconda generazione (b). Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 3).

L'analisi dell'enzima Rubisco ha evidenziato nelle foglie di piante di prima generazione, irradiate allo stadio di seme, una diminuzione dell'espressione proteica a tutte le dosi e per entrambi gli ioni (Figura 13a) rispetto al controllo. La riduzione dei livelli enzimatici è risultata particolarmente evidente alla dose C 10 Gy. Anche nella seconda generazione è stata osservata una riduzione dell'espressione dell'enzima Rubisco nelle foglie di piante C 10 Gy, rispetto ai controlli. In queste piante, tuttavia è stata anche evidenziata una stimolazione a Ti 1 Gy rispetto ai livelli proteici dei controlli (Figura 13b). La riscontrata diminuzione nell'efficienza fotochimica nelle piante C 10 Gy, rispetto ai controlli, potrebbe dunque essere attribuita sia al ridotto corredo pigmentario, sia ai livelli più bassi

delle proteine D1 e Rubisco. Limiti nella conversione della luce ai centri di reazione, così come nella fissazione della CO₂ potrebbero, infine, essere anche la causa della ridotta crescita osservata per le piante C 10 Gy rispetto a tutte le altre.

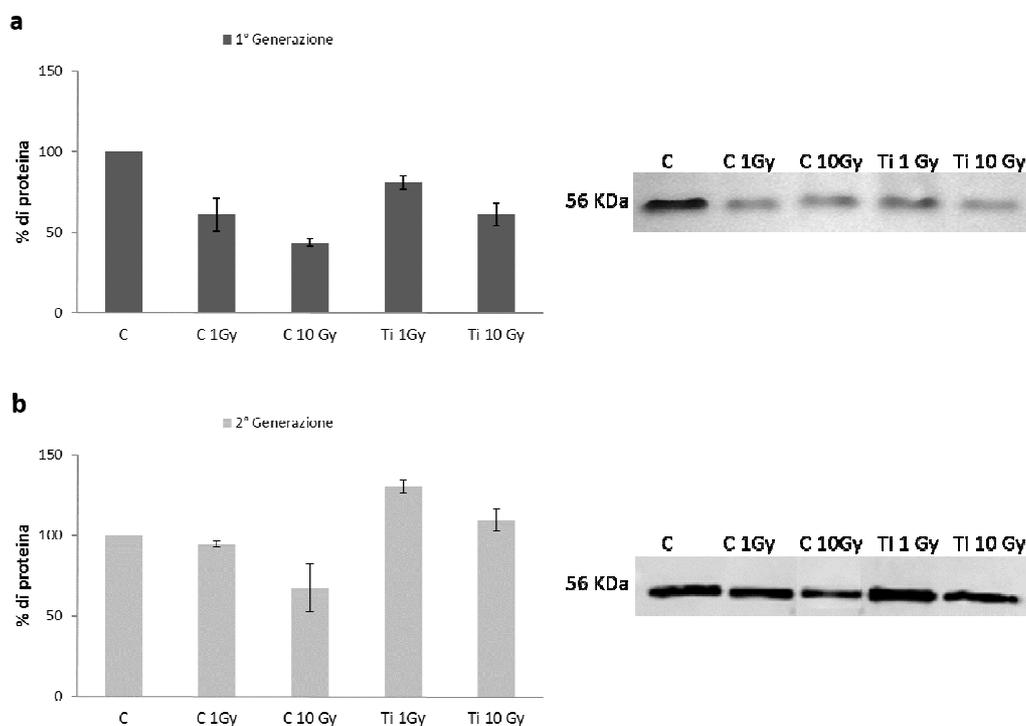


Figura 13: Analisi densitometrica (a sinistra) dei profili Western blot (a destra) della proteina Rubisco in foglie *D. melanophthalmus* di piante di prima generazione irraggiate allo stadio di seme (a) e di seconda generazione (b). Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 3).

4.3.3 Risposta antiossidante

Per valutare in che misura l'irraggiamento dei semi con ioni pesanti potesse causare nella pianta adulta stress ossidativo e nell'eventualità che nelle piante figlie potesse ancora sussistere o meno la condizione di stress, sono state valutate sia le variazioni intracellulari di acido ascorbico (AsA), un antiossidante ad azione non enzimatica, che le variazioni di concentrazioni di H₂O₂, potente ossidante che in quantità molto basse svolge un'azione di "segnale" per l'attivazione di risposte contro i danni indotti da vari stress (Orozco-Cárdenas et al., 2001; Stone e Yang,

2006). È stata indagata, inoltre, nelle foglie delle piante germinate dai semi irraggiati con C e Ti, e nella successiva seconda generazione, anche l'attività della poli-ADP ribosio polimerasi (PARP), enzima che interviene nella cellula per riparare eventuali danni ossidativi garantendo la sopravvivenza cellulare.

In Figura 14a sono mostrate le concentrazioni H_2O_2 misurate nelle foglie delle piante di prima generazione, soggette direttamente ai diversi irraggiamenti, e nelle piante di seconda generazione, indirettamente coinvolte dall'irraggiamento. È interessante notare che un aumento significativo del contenuto di H_2O_2 ($P < 0.05$) è stato registrato alla dose 10 Gy, per entrambi gli ioni ed in entrambe le generazioni di *D. melanophtalmus*, mentre gli stessi ioni alla dose più bassa di 1 Gy non hanno indotto apprezzabili cambiamenti rispetto ai rispettivi controlli.

Contemporaneamente all'aumento delle concentrazioni di H_2O_2 , alla dose C e Ti 10 Gy, è stato misurato anche un significativo incremento dei livelli di acido ascorbico (AsA), nelle due generazioni di piante, come si può osservare nella Figura 14b. Questi dati suggeriscono che l'accumulo di H_2O_2 nelle piante C e Ti 10 Gy ha indotto un aumento della sintesi di acido ascorbico che opera come meccanismo di difesa volto a riportare le quantità di ROS a livelli fisiologici non dannosi per le cellule. È noto che le radiazioni ionizzanti possono portare ad una sovrapproduzione di ROS, oppure ad un'insufficienza di difese antiossidanti che si traduce in uno stato di stress ossidativo dannoso per l'intero organismo. Quando si verificano queste condizioni le piante per regolare le quantità di ROS presenti nei tessuti, attivano sistemi di difesa antiossidanti (Zaka et al., 2002). Tra questi l'acido ascorbico (AsA) agisce da substrato per l'enzima ascorbato perossidasi (APX) il cui ruolo è quello di detossificare per riduzione il perossido d'idrogeno.

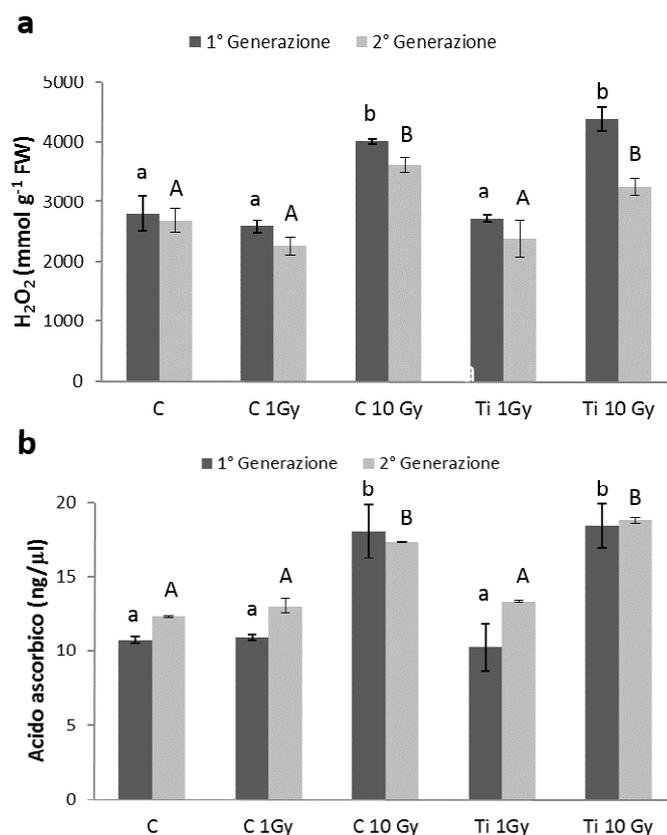


Figura 14: Concentrazione di H₂O₂ (a) e di acido ascorbico (b) in foglie *D. melanophthalmus* appartenenti a piante di prima generazione, irraggiate allo stadio di seme con ioni pesanti, e di seconda generazione. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P<0.05).

Per valutare se le difese antiossidanti messe in atto dalle piante fossero state sufficienti per evitare danni ossidativi a carico del DNA, sono stati eseguiti in foglie appartenenti a piante della prima e seconda generazione, saggi di attività dell'enzima PARP, la cui attivazione indica la presenza di rotture nella molecola di DNA.

I risultati ottenuti suggeriscono che l'irraggiamento dei semi con ioni C e Ti a dosi di 10 Gy produce, nelle piante della prima generazione, un aumento significativo dell'attività enzimatica, indicando la presenza di danni al materiale genomico. Lo stesso andamento si riscontra anche nelle piante della seconda generazione (Figura 15), tuttavia se messe a confronto le due generazioni, mostrano un diverso grado di attività della PARP, con una minore attivazione enzimatica nelle piante della seconda generazione, indicando che gli effetti indiretti dell'irraggiamento risultano essere meno dannosi per il DNA.

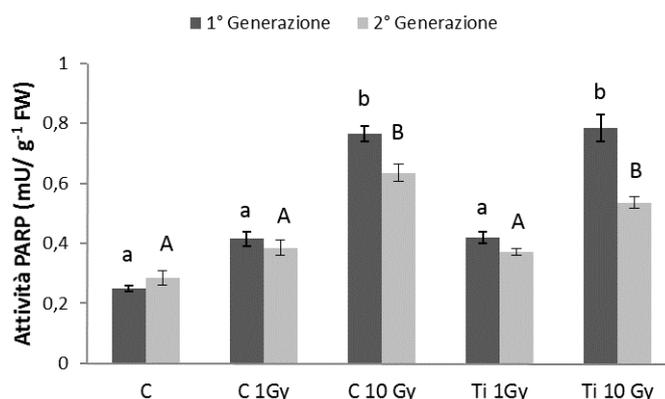


Figura 15: Attività della Poli ADP-ribosio polimerasi (PARP) in foglie *D. melanophthalmus* appartenenti a piante di prima generazione, irraggiate allo stadio di seme con ioni pesanti, e di seconda generazione. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti ($P < 0.05$).

4.3 Conclusioni

Come ampiamente riportato in letteratura, le radiazioni ionizzanti agiscono sugli organismi vegetali a diverse scale di livello (organismo-organo-cellula) influenzando la crescita, la riproduzione e la vita stessa delle piante (De Micco et al., 2011).

I risultati ottenuti in questo studio hanno fornito un ulteriore contributo alle attuali conoscenze sugli effetti che le radiazioni ionizzanti ad alto LET possono determinare sulla fisiologia e lo sviluppo delle piante utilizzando come specie modello *Dolichos melanophthalmus* DC (fagiolino nano dall'occhio), al fine di testarne l'idoneità per la coltivazione a bordo delle BLSSs. A tal scopo sono state seguite due generazioni successive di piante, la prima originatasi da semi irraggiati con ioni pesanti C e Ti, la seconda prodotta dai semi della prima generazione. In questo modo è stato delineato un quadro degli effetti diretti ed indiretti della radiazione sul sistema *Dolichos melanophthalmus*. Le evidenze sperimentali di questo caso studio sono da ritenersi incoraggianti nell'ottica di un possibile impiego del fagiolino nano nei Sistemi Biorigenerativi: infatti alle dosi di radiazioni utilizzate nell'esperimento, seppur sono state riscontrate variazioni nella crescita delle piante

di prima e seconda generazione, il dato rilevante è il completamento del ciclo vitale da seme a seme in entrambe le generazioni.

La prima generazione, direttamente esposta all'effetto della radiazione, ha mostrato una significativa riduzione della crescita e della fotosintesi solo alla dose di C 10Gy, effetti che sono perdurati nella seconda generazione, pur non comportando un danno fisiologico al livello di pianta. Questo risultato non sorprende dal momento che in letteratura è noto che l'irraggiamento di semi con ioni Carbonio induce mutazioni letali quando si utilizzano su seme secco dosi di 250-450 Gy con LET 22-30 keV/ μm (Kazama et al. 2011).

La presenza delle stesse alterazioni dei parametri di crescita, sia nella prima che nella seconda generazione, è indice del fatto che la dose C 10 Gy, oltre a causare una perturbazione diretta alle strutture cellulari, è anche responsabile di mutazioni non letali a carico del DNA delle cellule riproduttive, con effetti che si trasmettono alle generazioni successive. In particolare la dose C 10Gy, impiegata in questo studio, ha influenzato la fotosintesi a diversi livelli: corredo pigmentario, reazioni di trasduzione della luce, fissazione del carbonio.

La riduzione dell'attività fotochimica che si verifica a questa specifica dose, rispetto al controllo, è stata attribuita sia ad un decremento della quantità di pigmenti fotosintetici, e dunque ad una minore efficienza di cattura della luce, sia ad un più basso livello della proteina D1, responsabile del corretto funzionamento del PSII, in accordo con quanto riportato da altri autori (Giardi et al., 2013).

Nel presente studio, le specie reattive dell'ossigeno, possono aver determinato una riduzione nei livelli di proteina D1 alla dose C 10Gy, limitando e/o impedendo la sua sintesi nel cloroplasto e dunque il normale ciclo di riparazione del PSII (Nishiyama et al., 2006).

Questa ipotesi trova conferma nel maggiore contenuto di H_2O_2 misurato nelle piante C 10 Gy e Ti 10Gy.

L'analisi dell'espressione e della quantificazione dell'enzima Rubisco, identifica, ancora una volta la dose C 10 Gy come la condizione potenzialmente più pericolosa per l'apparato fotosintetico, in entrambe le generazioni di piante. In quest'ottica la minore quantità di Rubisco, rinvenuta in piante C 10 Gy per entrambe

le generazioni, spiegherebbe la ridotta crescita dovuta ad una minore capacità di fissare carbonio per produrre biomassa.

Nonostante i ridotti tassi fotosintetici, tuttavia, le piante C 10 Gy sopravvivono, grazie a meccanismi di difesa cellulare volti a mitigare e/o contrastare l'insorgenza di danni ossidativi dovuti ad iperproduzione di ROS. Infatti, contestualmente all'incremento di H₂O₂, nei tessuti fogliari delle piante C e Ti 10 Gy si verifica anche un aumento di acido ascorbico (AsA) ed una maggiore attivazione dell'enzima Poli ADP-ribosio polimerasi (PARP). L'aumento di attività degli enzimi PARPs costituisce, a livello molecolare, una delle risposte più immediate al danno del DNA causato dai ROS; tali enzimi, infatti, sono in grado di riconoscere e mediare la riparazione di danni al materiale genomico, salvaguardando l'omeostasi cellulare (Amor et al. 1998).

La produzione di ROS, seppur tossica per l'apparato fotosintetico e per tutta la cellula, quando è mantenuta a bassi livelli è indispensabile in numerosi processi associati alla crescita e allo sviluppo delle piante (Schroeder et al. 2001; Foreman et al. 2003). La formazione di ROS durante lo stress può costituire un importante segnale per l'attivazione di vie di difesa o di risposta (Knight and Knight 2001). Nel caso delle piante C e Ti 10 Gy, dunque, l'irraggiamento con ioni pesanti potrebbe aver provocato variazioni nei normali livelli di H₂O₂ non tali da uccidere la cellula, ma in quantità sufficienti ad attivare le difese antiossidanti per ripristinare il normale equilibrio cellulare.

In questo contesto, l'aumento delle concentrazioni di AsA e di attività PARP in piante Ti e C 10 Gy può essere interpretato come una immediata reazione alla radiazione volto ad impedire danni importanti alle strutture cellulari.

Nelle piante Ti 10 Gy la strategia sembra funzionare poiché non si riscontrano effetti negativi sulla crescita e sulla fotosintesi. Diversamente nelle piante C 10 Gy ciò non sembra essere sufficiente poiché esse manifestano una limitazione nello sviluppo e nel processo fotosintetico.

I dati ottenuti per la prima e la seconda generazione di piante, nel loro insieme, indicano *D. melanophthalmus* DC. come una specie resistente alle radiazioni ionizzanti ad alto LET, utilizzate nel presente studio, e supportano la specie come candidato idoneo per i Sistemi Biorigenerativi di Supporto alla Vita umana nello

spazio (BLSS). Il completamento del ciclo vitale garantirebbe infatti la produzione di cibo fresco per l'equipaggio e l'attività fotosintetica, non compromessa dalla radiazione, la rigenerazione dell'aria all'interno dei moduli pressurizzati.

Va inoltre precisato che, grazie ad opportune tecnologie di *shielding*, nei moduli e sulle piattaforme spaziali la radiazione ionizzante non raggiunge mai dosi più elevate di quelle utilizzate in questo studio.

CAPITOLO 5

Effetto dei raggi X sulla specie *Solanum lycopersicum* L. “Micro-Tom” in risposta a differenti fasi del ciclo fenologico e alla diversa età fogliare

5.1 Premessa e disegno sperimentale

Nelle piante superiori dosi acute di raggi X o raggi γ o ioni pesanti sono in grado di indurre modificazioni importanti nella crescita e nello sviluppo di radici, fusti, foglie e fiori. Generalmente gli effetti sono deleteri alle alte dosi, sebbene specie vegetali differenti mostrino una elevata variabilità nella sensibilità alla radiazione. La risposta di una determinata specie o di uno specifico organo ad alti livelli di radiazione include alterazioni del ciclo cellulare e del metabolismo che spesso comportano inibizione della crescita e anomalie morfologiche e genetiche spesso incompatibili con la vita. In particolare il DNA può essere direttamente o indirettamente danneggiato per una eccessiva produzione di radicali liberi che comportano rotture nella doppia elica del DNA (Yokota *et al.* 2007). Generalmente i tessuti in attiva crescita e gli organi in formazione risultano essere molto radiosensibili, poichè la proliferazione cellulare viene alterata per difetti nella mitosi (De Micco *et al.* 2011). Anche se le piante sono in grado di sopravvivere a dosi di radiazioni letali per gli animali (Arena *et al.* 2014b), l'insorgenza di modificazioni cellulari che compromettono le normali funzioni fisiologiche diventa ricorrente ad alte dosi, pur considerando che l'entità del danno può essere diversa nelle diverse specie o all'interno nella stessa pianta nei differenti stadi del suo sviluppo.

A complicare questa enorme fonte di variabilità c'è anche il fatto che un'ampia gamma di effetti stimolatori sulla crescita e su alcune funzioni vitali è riportata a seguito dell'irraggiamento di semi e piantine con dosi specifiche di raggi X o altri tipi di radiazione ionizzante (Bayonove *et al.* 1984).

Il presente esperimento mira a dare un contributo alle attuali conoscenze su una serie di aspetti legati all'interazione “piante superiori-radiazione ionizzante” e nello specifico è stato condotto al fine di valutare come ed in che misura l'effetto dei raggi X potesse dipendere, oltre che dalla dose, anche dalla fase fenologica della pianta e

dal diverso stadio di sviluppo della foglia al momento dell'irraggiamento. I risultati di questo studio hanno permesso di definire, per la specie target *Solanum lycopersicon* L. "Micro-Tom" in momenti diversi del suo ciclo vitale, le dosi soglia, oltre le quali gli effetti positivi sulla crescita e sulla fotosintesi si trasformano in danni irreparabili a carico delle strutture cellulari, compromettendo la vitalità della pianta, informazioni essenziali per proporre la crescita a bordo dei Sistemi Biorigenerativi.

Per perseguire tali obiettivi sono stati effettuati due tipi di esperimenti: il primo finalizzato a comprendere in che modo gli effetti dell'irraggiamento con radiazioni a basso LET potessero dipendere dalle fasi fenologiche delle piante; il secondo per valutare se e quanto diversa potesse essere la risposta al livello strutturale e funzionale dello stesso organo irraggiato a diverse fasi del suo sviluppo.

Per rispondere al primo quesito la specie *Solanum lycopersicon* L. "Micro-Tom" è stata esposta a dosi crescenti (0.3, 10, 20, 50, 100 Gy) di raggi X, in tre momenti del ciclo suo vitale: seme, fase giovanile o vegetativa caratterizzata dalla presenza sullo stelo principale di 4 foglie vere (S1) e fase riproduttiva con la presenza sulla pianta di fiori in boccio e aperti (S2).

Per soddisfare la seconda domanda, ciascuna pianta è stata irraggiata tenendo conto, al momento dell'irraggiamento con le diverse dosi, della presenza sullo stelo principale di due tipologie di foglie caratterizzate da un differente grado di sviluppo: L1- foglie pienamente espanse al momento dell'irraggiamento; L3 - primordio fogliare al momento dell'irraggiamento.

A seguito di vari irraggiamenti sono state effettuate tutta una serie di analisi per valutare nelle piante: sviluppo e produzione di biomassa, efficienza del processo fotosintetico, risposta antiossidante e presenza di alterazione del DNA genomico. Sono stati poi confrontati tutti i risultati tra loro per comprendere le possibili relazioni tra la presenza di polimorfismi radioindotti, le variazioni nella crescita e nello sviluppo fogliare della pianta e la funzionalità del processo fotosintetico.

5.2 Materiali e metodi

5.2.1 La specie studiata

La specie *Solanum lycopersicum* L. “Micro-Tom” (Figura 1) è una specie coltivata di pomodoro nano da mensa a sviluppo determinato, appartenente alla famiglia delle Solanaceae e nativa della zona dell’America centrale, del Sudamerica e della parte meridionale dell’America Settentrionale compresa tra Messico e Perù. Questa cultivar fu inizialmente prodotta per fini ornamentali mediante l’incrocio delle cultivars ‘Florida Basket’ e ‘Ohio 4013-3’ (Scott e Harbaugh, 1989), mentre oggi, grazie alle sue caratteristiche, è considerata un organismo modello adatta ad indagini genetiche e di biologia molecolare. Micro-Tom presenta taglia ridotta e compatta con un’un’altezza di circa 15 cm, il fenotipo nano è il risultato di due mutazioni recessive: dwarf (d) and miniature (mnt) (Meissner et al., 1997). Inoltre è stato anche suggerito che la cultivar presenta una mutazione nel gene SELF-PRUNING (SP), responsabile della crescita continua del meristema apicale (Pnueli et al. 1998). Il ciclo vitale è di breve durata e varia dai 70 ai 90 giorni. Le foglie sono costituite da tre lembi con una disposizione sugli steli alterna.



Figura 1: Pianta di *Solanum lycopersicum* L. “Micro-Tom”

I fiori, di colore giallo, sono ermafroditi, riuniti in infiorescenze a racemo portate lungo il fusto o sulle ramificazioni più grosse. Il frutto è una bacca di grandezza e

forma molto variabile, di colore rosso di diversa tonalità sino al giallo-bianco. Il buon valore nutrizionale dei frutti maturi, hanno reso il pomodoro fra i più importanti alimenti di base della Dieta Mediterranea. Le sue proprietà benefiche per la salute sembrano essere correlate al contenuto di antiossidanti, in particolare carotenoidi (licopene, luteina e β -carotene), acido ascorbico e composti fenolici, che contrastano gli effetti negativi dovuti alle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Frusciante, 2007). Infatti, recentemente è stato dimostrato che metaboliti secondari quali composti fenolici, acido ascorbico (vitamina C) e altre molecole antiossidanti appartengono a un importante gruppo di fitonutrienti responsabili, in parte, dell'effetto protettivo contro alcune malattie croniche e degenerative (Demming-Adams e Adams 2002).

5.2.2 Procedura d'irraggiamento e condizioni di crescita

La specie *Solanum lycopersicum* L. "Micro-Tom" è stata esposta a dosi crescenti di raggi X (0.3, 10, 20, 50, 100 Gy) in diverse fasi fenologiche, erogati a energia 250 kVp, LET 2 keV/ μ m, (Figura 2).



Figura 2: Capsule Petri con semi e piante di *Solanum lycopersicum* L. "Micro-Tom" in fase vegetativa S1 e riproduttiva S2 posizionate all'interno del generatore di raggi X, nella superficie destinata all'irraggiamento.

In particolare i semi utilizzati per l'esperimento, dopo aver effettuato un test di germinazione al fine di verificarne la germinabilità, sono stati divisi in 4 gruppi:

- Controllo: costituito da semi non destinati all'irraggiamento ma utilizzati per far crescere piante controllo (non irraggiate) da confrontare con i semi/piante irraggiate nelle altre fasi fenologiche;

- S0: costituito da semi destinati all'irraggiamento;
- S1: costituito da semi destinati alla produzione di piante da irraggiare in fase vegetativa;
- S2: costituito da semi destinati alla produzione di piante da irraggiare in fase riproduttiva.

L'irraggiamento è stato effettuato presso il Dipartimento di Fisica dell'Università degli Studi di Napoli Federico II, utilizzando un generatore di raggi X (Siemens, Forchheim, Germany). Le diverse dosi di raggi X sono state somministrate alla velocità di 1.5 Gy/min, utilizzando una camera a ionizzazione e dosimetri a termoluminescenza (Harshaw 3500) al fine di calcolare il dose rate e verificare l'omogeneità del fascio di raggi X nell'area utile dove sono stati posizionati semi e piante.

L'irraggiamento delle piante è stato più complesso rispetto a quello dei semi, data la loro diversa altezza nelle due differenti fasi di sviluppo (S1 e S2). Ciò ha comportato una dosimetria ad hoc per ciascuna pianta, essendo la distanza del bersaglio dal fascio di radiazione un parametro fondamentale al fine dei calcoli del dose rate. Per ogni dose sono state irraggiate n=50 semi e n=8 piante. Le piante sono state esposte ai raggi X singolarmente per evitare effetti cumulativi che avrebbero potuto mascherare l'effetto causato dalle singole dosi (Kurimoto et al., 2010).

Dopo l'irraggiamento, i semi e le piante sono stati trasportati presso il Dipartimento di Agraria dell'Università degli Studi di Napoli Federico II, dove sono state coltivate.

La germinazione è avvenuta in capsule Petri contenenti carta da filtro imbibita con acqua distillata. Le capsule sono state incubate al buio a 20°C fino all'emergenza della radichetta. A tale stadio di maturazione, le plantule sono state trapiantate in contenitori di polistirolo alveolati su terriccio ammendato con torba neutra di sfagno. Le piantine sono state coltivate in serre semi-controllate rivestite con film in polietilene e rete ombreggiante in plastica nera (70% di protezione) dove i valori medi di temperatura sono stati 28,4 / 21.6 °C (giorno / notte) e l'intensità della luce registrata a mezzogiorno è stata in media 446 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3). Durante tutto il periodo di crescita, le piante sono state regolarmente irrigate per reintegrare l'acqua persa per evapotraspirazione.

Le piante destinate all'irraggiamento in fase vegetativa e riproduttiva, dopo il trattamento con i raggi X, sono state riportate nelle serre semi-controllate e la coltivazione è stata seguita per 95 giorni fino a completamento del ciclo vitale.



Figura 3: Coltivazione delle piante in serre semi-controllate presso il Dipartimento di Agraria dell'Università degli Studi di Napoli Federico II

5.2.3 Osservazioni morfologiche ed analisi biometriche

Dopo l'esposizione alle diverse dosi di raggi X la crescita delle piante ed eventuali anomalie morfologiche sono state monitorate fino al completamento del ciclo vitale delle piante. Le osservazioni morfologiche e le analisi biometriche sono state annotate con cadenza settimanale. Per i materiali e metodi utilizzati si rimanda al capitolo 4.2.3.

5.2.4 Misure di emissione di fluorescenza della clorofilla *a*

Per ogni fase fenologica della pianta e per ogni stadio di sviluppo fogliare, dopo l'esposizione ai raggi X, sono state eseguite curve veloci di risposta alla luce nell'intervallo di irradianza $0-1500 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ per gli indici fotochimici

Φ PSII, ETR, NPQ ed è stata misurata dopo 30' di buio la massima efficienza fotochimica del fotosistema II (Fv/Fm). Successivamente, i valori dei diversi indici fotochimici sono stati confrontati ad una intensità luminosa di $500 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ poiché questo valore rappresenta l'irradianza di crescita delle piante in serra. Per i materiali e metodi utilizzati si rimanda al capitolo 4.2.5.

5.2.5 Quantificazione dei pigmenti fotosintetici

Il contenuto totale di clorofilla (a+b) e di carotenoidi (x+c) è stato misurato su foglie L1 ed L3 di piante irraggiate in fase vegetativa S1 e riproduttiva S2, sulle stesse foglie sulle quali è stata effettuata l'analisi di emissione di fluorescenza. Per i materiali e metodi utilizzati si rimanda al capitolo 3.2.4.

5.2.6 Identificazione e quantificazione della proteina D1 mediante SDS-PAGE e Western blotting

L'identificazione della proteina D1 è stata effettuata su foglie L1 ed L3 di piante irraggiate in fase vegetativa S1 e riproduttiva S2 sulle stesse foglie sulle quali sono stati misurati i parametri fotochimici ed il contenuto di pigmenti fotosintetici. Per i materiali e metodi utilizzati si rimanda al capitolo 4.2.7. In figura 4 è riportato uno schema della foglia e delle parti campionate per le analisi biochimiche.

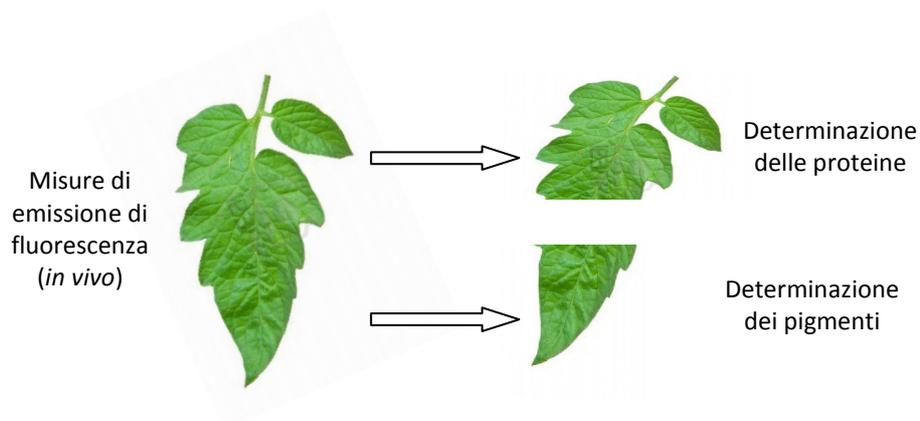


Figura 4: Schema del campionamento del tessuto fogliare utilizzato nelle diverse analisi

5.2.7 Determinazione dei fenoli di membrana e dell'acido ascorbico (AsA) nel tessuto fogliare

La risposta delle piante allo stress ossidativo indotto dai raggi X è stata valutata in foglie L1 ed L3 di piante irraggiate in diverse fasi fenologiche (vegetativa S1 e riproduttiva S2) mediante la misurazione di fenoli e acido ascorbico, antiossidanti ad azione non-enzimatica. Le foglie prescelte sono di età e morfologia comparabile a quelle usate per le determinazioni di pigmenti fotosintetici e proteine. Per la determinazione dei fenoli le foglie sono state dissezionate, prelevando una porzione di lamina (5x5 mm) a ridosso della nervatura principale. I campioni sono stati disidratati attraverso una serie di passaggi in etanolo a concentrazioni crescenti fino a 95%, e inclusi nella resina JB4® (Polysciences, Germany). Successivamente i campioni in resina solidificata sono stati sezionati con un microtomo rotativo per ottenere sezioni trasversali della lamina fogliare con uno spessore di 5 micron. Le sezioni sono state osservate al microscopio ad epifluorescenza (Olympus, BX60 e BX61) impostato con filtri per l'osservazione delle sostanze fenoliche (filtro di eccitazione 450–490 nm, specchio dicroico >495 nm, filtro di emissione 500–530 nm). Il contenuto e la localizzazione delle sostanze fenoliche è stata misurata con il software Olympus AnalySIS® 3.2 come percentuale di tessuto occupata da sostanze autofluorescenti.

Per i materiali e metodi utilizzati per la determinazione di acido ascorbico si rimanda al capitolo 4.2.8.

5.2.8 Analisi del DNA genomico mediante RAPD-PCR

L'analisi RAPD-PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA) è stata condotta su foglie L3 di piante irraggiate in fase riproduttiva S2 e piante controllo non trattate al fine di valutare se e a che livello, i raggi X potessero indurre mutagenesi in tessuti in attiva espansione. E' stato infatti dimostrato che questa semplice tecnica, previa specifica ottimizzazione, possiede la potenzialità di identificare vari tipi di danni e mutazioni del DNA (Jhang e Shasany 2012).

La metodica prevede una prima fase di estrazione del DNA dai tessuti da analizzare; l'amplificazione dei frammenti di DNA mediante PCR con primers decamerici a sequenza casuale, ed infine separazione dei frammenti tramite elettroforesi su gel di agarosio. Il DNA è stato estratto con il kit 'DNeasy Plant Mini Kit' (Qiagen) secondo le istruzioni fornite dalla casa produttrice.

La concentrazione e la purezza del DNA sono state determinate mediante lo spettrofotometro NanoDrop (Thermo scientific, Wilmington USA). Le reazioni di PCR sono state eseguite in 25 microlitri di mix di reazione (Tabella 1):

Tabella 1: Concentrazioni e volumi dei componenti utilizzati nel mix di reazione per PCR

Componenti	Concentrazione	Volume (25 μL)
DNA stampo	2.0 ng/ μ L	2,5
Buffer	10 x	2,5
Primer OPB	5 μ M	4
dNTP	10 mM	0,5
Taq DNApol	5 U/ μ L	0,2
H ₂ O		15,3

Per l'amplificazione dei frammenti di DNA sono stati utilizzati 12 primers decamerici forniti da Sigma-Aldrich (Saint Louis Missouri, USA) (Tabella 2).

La RAPD-PCR è stata effettuata in un termociclatore MyCycler (Bio-Rad, Hercules, USA) secondo i parametri riportati nella Tabella 3.

I frammenti amplificati sono stati separati su gel di agarosio 1,5% in tampone Tris-acetato-EDTA (TAE). I frammenti di DNA sono stati visualizzati mediante l'uso di bromuro di etidio, addizionato alla matrice del gel, che si intercala tra le basi del DNA, rendendo le bande fluorescenti sotto illuminazione UV. I risultati sono stati documentati utilizzando il software Gel Doc™ XR System (Bio-Rad).

Per ottenere amplificazioni riproducibili, tutte le reazioni di PCR sono state ripetute due volte. Le alterazioni osservate nei profili RAPD sono state valutate in termini di apparizione e scomparsa di bande in riferimento ai controlli; per ciascun primer le bande polimorfiche sono state segnate come (1) presente o (0) assente (Lynch e Milligan, 1994). Infine, mediante il software v1.31 POPGENE (Yeh et al, 1997), è stato costruito un dendrogramma basato sui coefficienti di similarità genetica di Nei (NEI, 1978).

Tabella 2: Sequenza 5' → 3' dei primers OPB (Sigma-Aldrich)

Primer	Sequenza 5' → 3'
OPB-1	GTT TCG CTC C
OPB-2	TGA TCC CTG G
OPB-4	GGA CTG GAG T
OPB-5	TGC GCC CTT C
OPB-6	TGC TCT GCC C
OPB-7	GGT GAC GCA G
OPB-8	GTC CAC ACG G
OPB-9	TGG GGG ACT C
OPB-10	CTG CTG GGA C
OPB-11	GTA GAC CCG T
OPB-12	CCT TGA CGC A
OPB-13	TTC CCC CGC T

Tabella 3: Protocollo utilizzato per la Reazione a Catena della Polimerasi (PCR)

N° Cicli	Fase	Temperatura (°C)	Tempo
-	Denaturazione iniziale	94	4 min
40	Denaturazione Annealing Estensione	94 36 72	45 sec 45 sec 1 min
-	Estensione finale	72	8 min

5.2.9 Analisi statistica

Per l'analisi statistica dei dati sperimentali si rimanda al capitolo 3.2.7.

5.3 Risultati e discussione

5.3.1 Influenza dell'irraggiamento sulla crescita delle piante nelle diverse fasi fenologiche

Le piante germinate da semi irraggiati, nei primi 40 giorni dalla semina (GDS), hanno mostrato valori di altezza comparabili a quelli riscontrati in piante controllo (Figura 5a), mentre dopo 85 GDS, le piante esposte alla dose di 10 Gy sono risultate più alte ($P < 0.05$) rispetto al controllo ed alle piante di tutte le altre dosi. Ciò potrebbe essere dovuto ad un effetto ormetico per il quale dosi molto basse di radiazioni ionizzanti stimolano positivamente la crescita delle piante (Ajayi e Fakorede 2000).

Per dosi di raggi X superiori a 10 Gy l'effetto dose-risposta risulta essere proporzionale, per cui all'aumentare della dose di radiazione assorbita si verifica una diminuzione dell'altezza delle piante. Per quanto riguarda il numero di foglie (Figura 5b) e l'area fogliare (Figura 5c), le piante irraggiate allo stadio di seme hanno mostrato un aumento di entrambi i parametri biometrici per tutte le dosi d'irraggiamento e in particolar modo a 10 Gy ($P < 0.05$). La diminuzione dell'altezza insieme all'aumento del numero di foglie e dell'area fogliare a dosi elevate di raggi X, possono essere considerati dei tratti positivi, in quanto soddisfano il requisito tecnico di limitata disponibilità di volume per la coltivazione nei BLSSs. Inoltre, il numero dei frutti totali prodotti nelle piante esposte alle radiazioni in fase di seme è risultato essere tendenzialmente più elevato per tutte le dosi tranne che a 50 e 100 Gy (Figura 5d). Anche l'aumento di produttività in termini di parti vegetali edibili contribuisce a rendere Micro-Tom adatta alla coltivazione nei BLSSs.

Nel caso delle piante irraggiate in fase vegetativa, il monitoraggio post irraggiamento ha evidenziato che l'altezza delle piante esposte a dosi di 20 Gy è risultata significativamente maggiore ($P < 0.05$) rispetto al controllo, mentre dosi di 50 e 100 Gy hanno determinato l'arresto della crescita e la morte delle piante in accordo con dati riportati in letteratura (Sidler et al. 2015), (Figura 6a). Inoltre l'irraggiamento con dosi di 50 Gy ha determinato un iniziale rallentamento dell'organogenesi fogliare in termini di formazione di nuove foglie (Figura 6b) ed un aumento dell'area fogliare (Figura 6c), seguito da un totale arresto dello sviluppo fogliare, che per le piante esposte a dosi di 100 Gy, si è verificato subito dopo

l'irraggiamento. Il numero dei frutti totali prodotti, invece ha mostrato una progressiva riduzione, rispetto al controllo, fino a 20 Gy. Le piante irraggiate alle dosi di 50 e 100 Gy non hanno prodotto frutti poiché il ciclo vitale si è arrestato prima di raggiungere la fase riproduttiva (Figura 6d).

Per le piante irraggiate in fase riproduttiva, dosi di 10 Gy hanno provocato una crescita maggiore in altezza ($P < 0.05$) rispetto al controllo; mentre tutte le altre dosi hanno determinato una diminuzione dell'altezza delle piante, fino all'arresto totale della crescita nelle piante esposte a dosi di 50 e 100 Gy (Figura 7a). Dosi superiori a 20 Gy hanno prodotto una diminuzione del numero di foglie e valori di area fogliare simili al controllo (Figura 7b; 7c). Per quanto riguarda i frutti, le piante esposte fino a 20 Gy hanno mostrato una produzione di bacche paragonabile al controllo mentre le piante irraggiate a 50 e 100 Gy sono entrate in senescenza precoce, per cui non hanno formato frutti (Figura 7d).

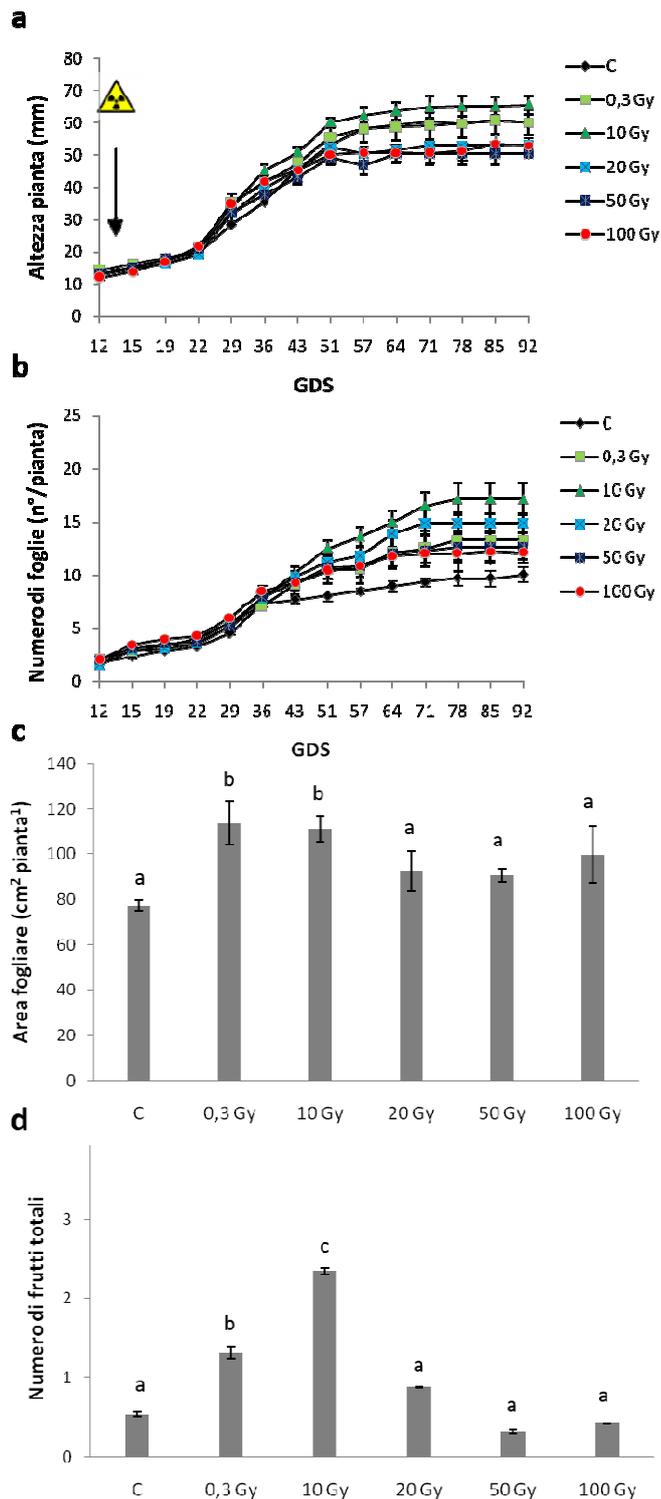


Figura 5: Andamento temporale dell'altezza della pianta (a) e del numero di foglie(b) durante la crescita; area fogliare per pianta (c) e numero di frutti totali prodotti (d) in piante di *S. lycopersicum* L. 'Micro-Tom' germinate da semi irraggiati alle diverse dosi di raggi X. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative. La freccia indica il momento dell'irraggiamento.

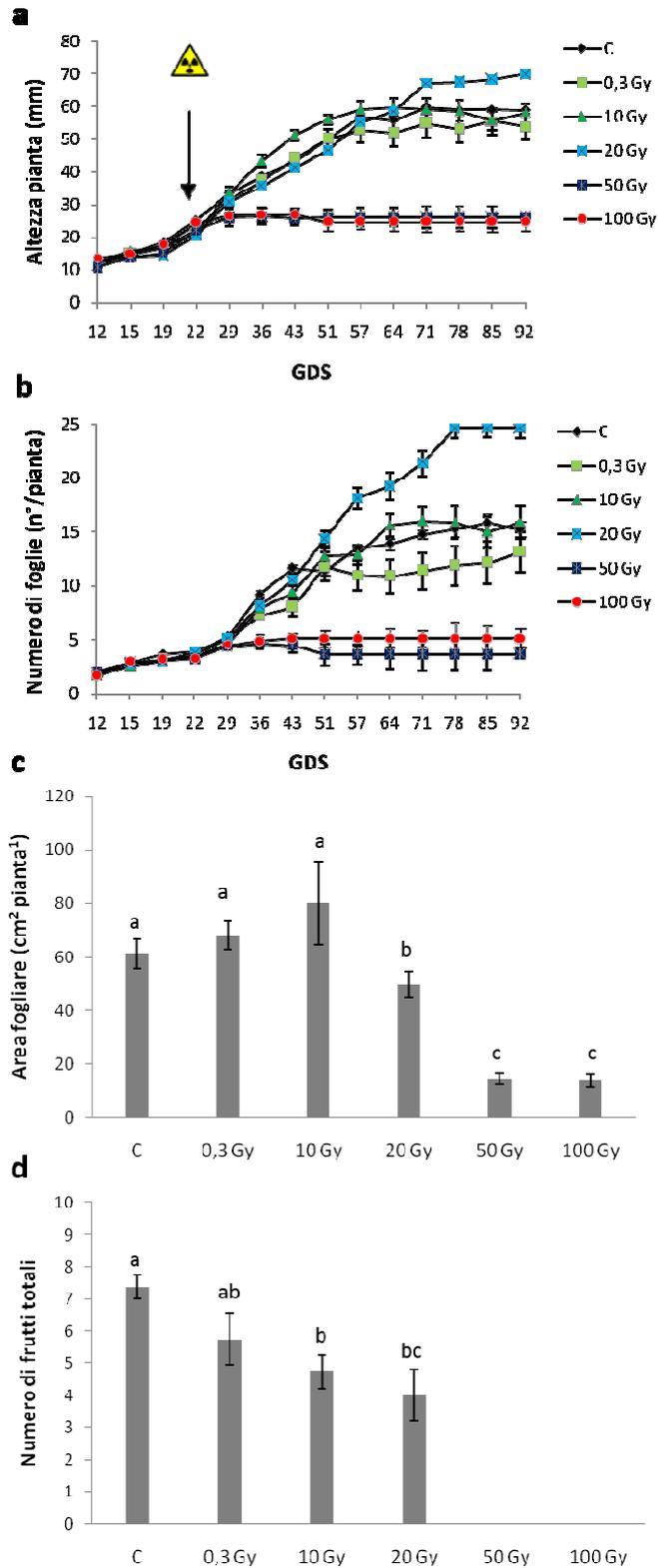


Figura 6: Andamento temporale dell'altezza della pianta (a) e del numero di foglie(b) durante la crescita; area fogliare per pianta (c) e numero di frutti totali prodotti (d) in piante di *S. lycopersicum* L. 'Micro-Tom' irraggiate alle diverse dosi di raggi X allo stadio vegetativo. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative. La freccia indica il momento dell'irraggiamento.

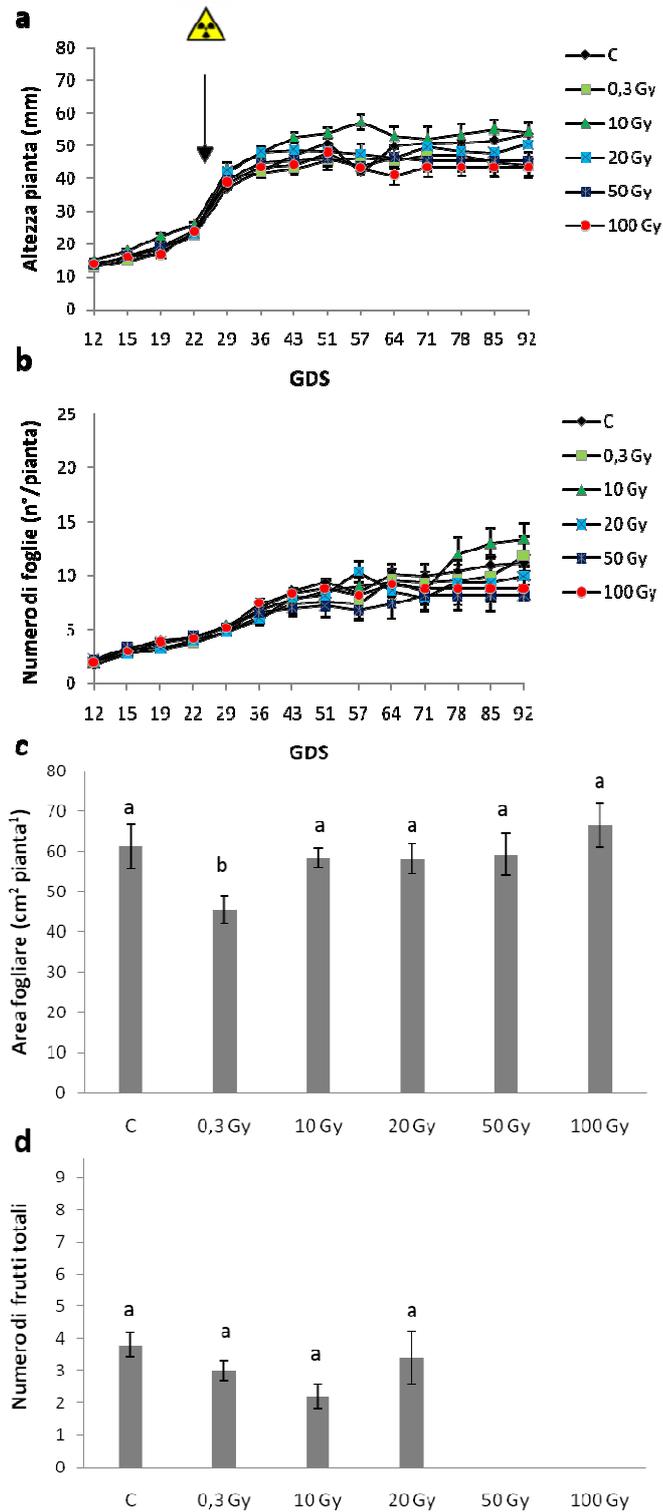


Figura 7: Andamento temporale dell'altezza della pianta (a) e del numero di foglie(b) durante la crescita; area fogliare per pianta (c) e numero di frutti totali prodotti (d) in piante di *S. lycopersicum* L. 'Micro-Tom' irraggiate alle diverse dosi di raggi X allo stadio riproduttivo. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative. La freccia indica il momento dell'irraggiamento.

5.3.2 Effetto dei raggi X sulla fotosintesi in rapporto alla fase fenologica della pianta e al grado di sviluppo fogliare

Per comprendere se ed in che modo l'esposizione a raggi X possa dipendere dallo stadio di sviluppo della pianta irraggiata e/o dall'età dell'organo esposto alla radiazione sono stati effettuati due tipi di esperimenti in vivo sulle piante, utilizzando la tecnica dell'emissione di fluorescenza della clorofilla *a* ed analizzando gli indici fotochimici: massima resa quantica del PSII (F_v/F_m), resa quantica del PSII (Φ_{PSII}), attività di trasporto elettronico (ETR), e quenching non-fotochimico (NPQ).

Per rispondere alla prima domanda "*raggi X-fasi fenologiche*" dopo l'esposizione a ciascuna dose di raggi X, sono state eseguite per ogni fase fenologica della pianta curve veloci di risposta alla luce per nell'intervallo di irradianza 0-1500 $\mu\text{mol fotoni m}^2 \text{s}^{-1}$ e misurata al buio la massima efficienza fotochimica del fotosistema II (F_v/F_m). Le misure sono state effettuate su foglie pienamente sviluppate e dunque già presenti sul fusticino al momento dell'irraggiamento (foglie L1). Tali indagini hanno permesso di testare l'efficienza di utilizzazione dell'energia luminosa da parte dei fotosistemi nella fase luminosa della fotosintesi ed al contempo valutare la percentuale di luce utilizzata nei processi assimilativi e dissipativi a carico dell'apparato fotosintetico. Per semplicità sono stati estrapolati dalle curve soltanto i valori puntiformi degli indici fotochimici misurati ad una intensità luminosa di 500 $\mu\text{mol fotoni m}^2 \text{s}^{-1}$ poiché questo valore rappresenta l'irradianza alla quale sono state esposte le piante durante la loro nelle serre. I risultati del confronto tra le diverse fasi fenologiche sono riportati nella Figura 8.

Per le piante sviluppate da semi irraggiati non sono state evidenziate differenze significative per i parametri fotochimici analizzati in risposta alle diverse dosi di raggi X. Questi dati indicano che l'irraggiamento a livello di seme, anche in seguito all'assorbimento di elevate dosi di raggi X (50 e 100 Gy) non condiziona negativamente l'efficienza del PSII nelle piante.

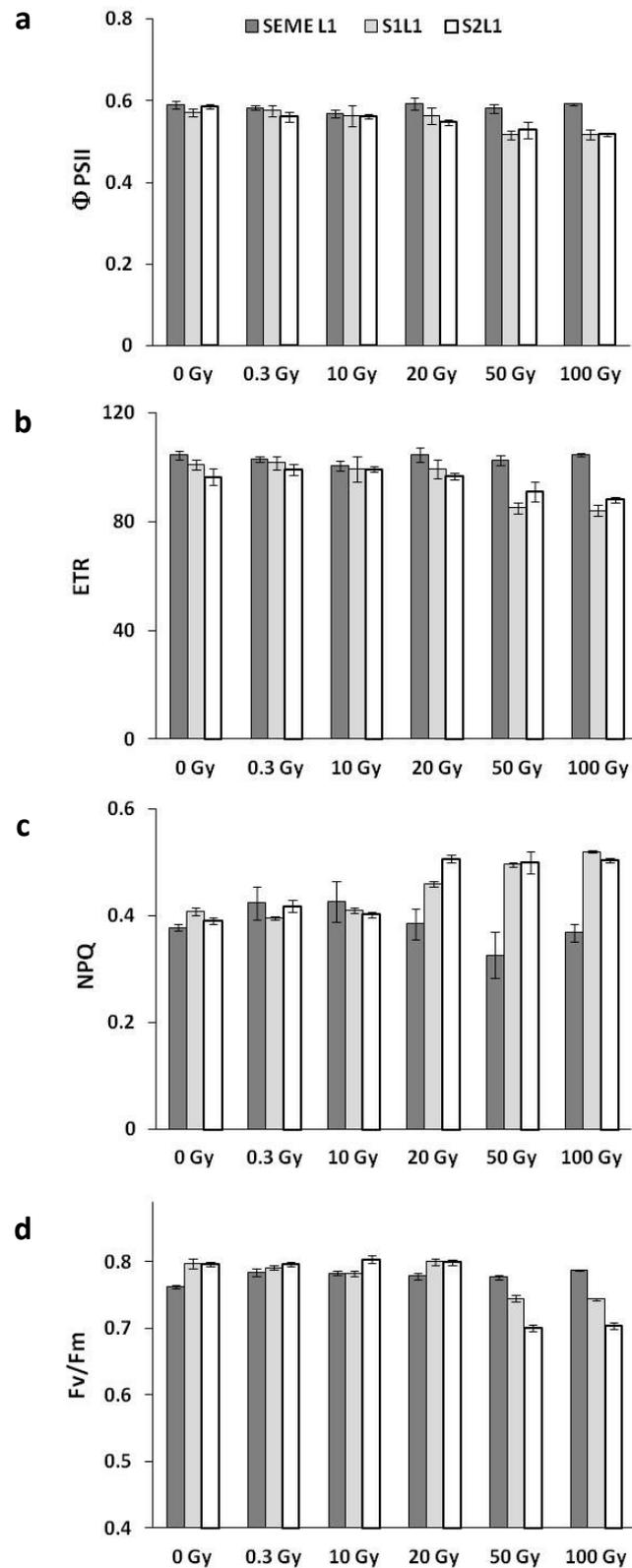


Figura 8: Resa quantica del trasporto elettronico (Φ PSII) (a), attività di trasporto elettronico (ETR) (b), quenching non fotochimico (NPQ) (c) e massima resa quantica del PSII (Fv/Fm) (d) misurati ad una irradianza di $500 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$, in foglie L1 di piante di *S. lycopersicum* irraggiate in differenti fasi fenologiche con dosi crescenti di raggi X. Ciascuna misura rappresenta la media \pm es (n=4).

Nelle fasi S1-vegetativa e S2-riproduttiva, invece, i valori di Φ_{PSII} , ETR ed Fv/Fm mostrano un significativo decremento ($P < 0.05$) alle dosi di 50 e 100 Gy di raggi X (Figura 8a, b, d) rispetto al controllo e alle dosi più basse, indicando una limitazione nell'efficienza di conversione della luce ai centri di reazione.

Contestualmente alla riduzione della fotochimica, a partire da dosi di 20 Gy i valori di NPQ tendono ad aumentare significativamente ($P < 0.05$) rispetto al controllo (Figura 8c), indicando un aumento dei processi di dissipazione termica che l'apparato fotosintetico mette in atto per proteggersi dalla fotoinibizione in condizioni di stress (Demming-Adams et al., 1990). In questo contesto, infatti, i più elevati ($P < 0.05$) valori di NPQ osservati a 50 e 100 Gy per S1 ed S2 potrebbero indicare l'attivazione del ciclo delle xantofille con produzione del pigmento zeaxantina nei sistemi antenna per ovviare allo stress da elevati livelli di radiazione (Morosinotto et al., 2003).

Per rispondere alla seconda domanda, ovvero se l'effetto dei raggi X sull'efficienza fotosintetica dipendesse dallo stadio di sviluppo dell'organo al momento dell'irraggiamento, nel nostro caso della foglia, sono state prese in considerazione per le fasi fenologiche S1 ed S2, foglie L1 pienamente espanse al momento dell'irraggiamento e foglie L3 presenti allo stato embrionale sullo stelo principale della pianta. I risultati degli indici fotochimici misurati: Φ_{PSII} , ETR, NPQ, Fv/Fm per le foglie L1 ed L3 sono riportati nella Figura 9.

Per dosi di raggi X superiori a 20 Gy, è stata osservata una riduzione dell'efficienza fotochimica per le foglie L1 in entrambe le fasi fenologiche S1 e S2 di pari entità, come hanno dimostrato i valori di Φ_{PSII} , ETR, Fv/Fm più bassi rispetto ai controlli (Figura 9a, b, d). Contestualmente è stato evidenziato un aumento significativo dell'indice di dissipazione termica NPQ, modalità con cui le foglie pienamente sviluppate cercano di foto-proteggersi dall'eccesso di radiazioni ionizzanti ricevute (Figura 9c). Questi risultati dimostrano che quando ad essere esposte a dosi elevate di raggi X sono le foglie pienamente sviluppate, non si registrano differenze nella radiosensibilità tra le fasi fenologiche vegetativa e riproduttiva.

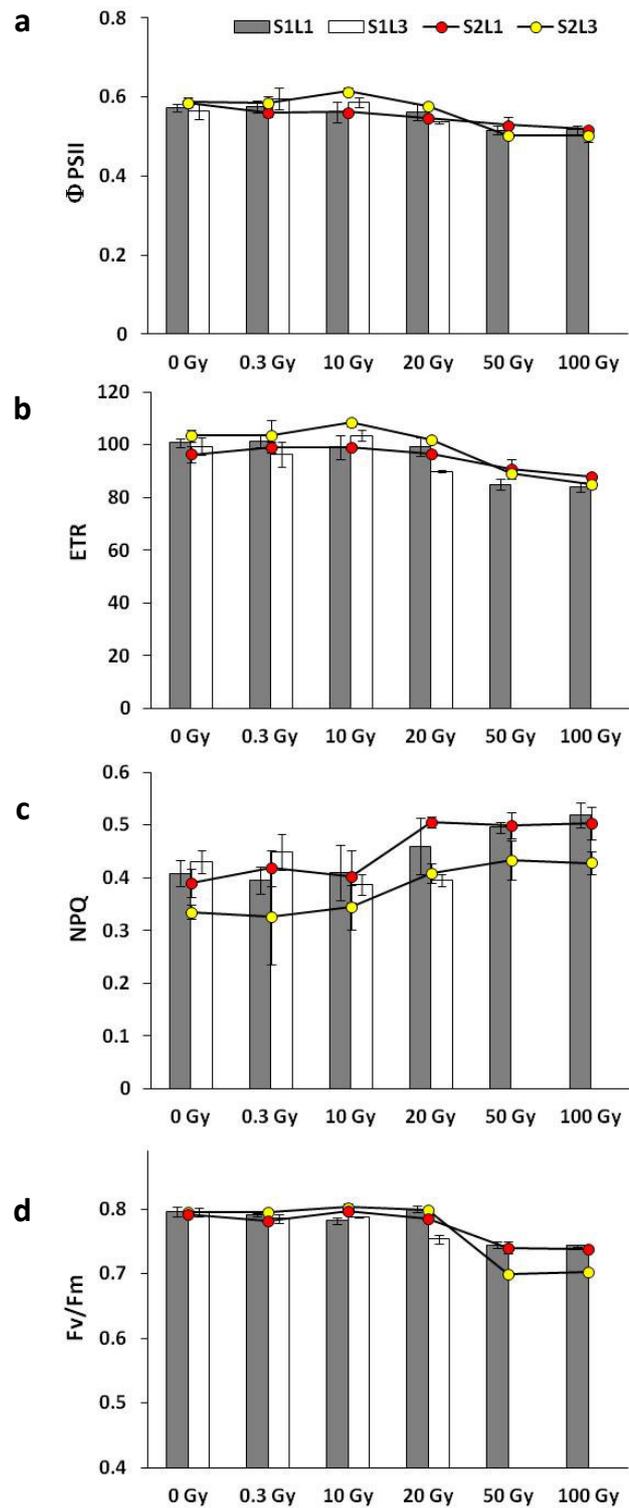


Figura 9: Resa quantica del trasporto elettronico (Φ_{PSII}) (a), attività di trasporto elettronico (ETR) (b), quenching non fotochimico (NPQ) (c) massima resa quantica del PSII (F_v/F_m) (d) misurati ad una irradianza di $500 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$, in foglie L1 ed L3, di piante di *S. lycopersicum* irraggiate nelle fasi fenologiche S1 ed S2 con dosi crescenti di raggi X. Ciascuna misura rappresenta la media \pm es (n=4).

Il confronto tra le foglie L3 ovvero quelle che hanno ricevuto la radiazione allo stadio embrionale è stato possibile tra le fasi S1 ed S2 solo fino a 20 Gy, infatti come si evince dal grafico, nella fase fenologica S1, mancano le misure relative alle foglie L3 per le dosi 50 e 100 Gy, poiché l'irraggiamento ad alte dosi ha comportato l'arresto totale dello sviluppo di nuove foglie.

Le foglie L3 di entrambi gli stadi fenologici S1 e S2, hanno mostrato fino alla dose di raggi X pari a 20 Gy valori di Φ PSII, ETR, NPQ ed Fv/Fm non differenti tra loro e comparabili ai rispettivi controlli, indicando una buona stabilità dell'apparato fotosintetico. Le alte dosi di 50 e 100 Gy hanno invece provocato sull'apparato fotosintetico delle foglie L3 dello stadio fenologico S2, una forte condizione di stress che si è manifestata con una significativa riduzione dell'efficienza fotochimica (Φ PSII, ETR, Fv/Fm) rispetto al controllo e con un importante aumento di dissipazione termica (NPQ). È importante notare che se si confrontano le foglie L1 ed L3 delle piante in fase riproduttiva (S2_L1 vs S2_L3), si evince che le foglie L3 sono più vulnerabili ai danni da radiazione poiché manifestano una maggiore riduzione ($P < 0.01$) della massima resa quantica del PSII (Fv/Fm) rispetto alle foglie L1.

Una delle ragioni potrebbe essere attribuita alla loro più bassa capacità di dissipare l'energia non impiegata nella fotochimica termicamente. Infatti, rispetto alle foglie mature, le foglie che ricevono la radiazione allo stato embrionale presentano coefficienti di dissipazione termica più bassi ($P < 0.05$) per tutto l'intervallo di dosi saggiate. Tuttavia è plausibile che altre cause concorrano alla riduzione dell'efficienza fotosintetica alle alte dosi di raggi X nelle foglie L1 ed in maniera ancora più evidente nelle L3. È noto che una caduta dell'attività del PSII può essere conseguente a numerosi eventi di protezione o di danno del fotosistema. Essa, ad esempio, può dipendere dalla riduzione da una diminuzione del contenuto di pigmenti fotosintetici, e/o può essere correlata ad un reale danno subito dal centro di reazione del fotosistema, e più precisamente dalla proteina D1, che è la componente del PSII più sensibile a tutte le condizioni di stress.

Al fine di comprendere la causa della minore efficienza fotosintetica alle alte dosi di raggi X, sono stati quantificati i pigmenti fotosintetici (clorofilla e carotenoidi totali)

e determinati i livelli di proteina D1 in le foglie L1 ed L3 di piante irraggiate nelle fasi fenologiche S1 ed S2.

In Figura 10 è riportato il contenuto totale di clorofilla (a+b) e di carotenoidi (x+c) nelle foglie L1 ed L3 di piante irraggiate in fase S1 ed S2 del ciclo vitale di *S. lycopersicum*.

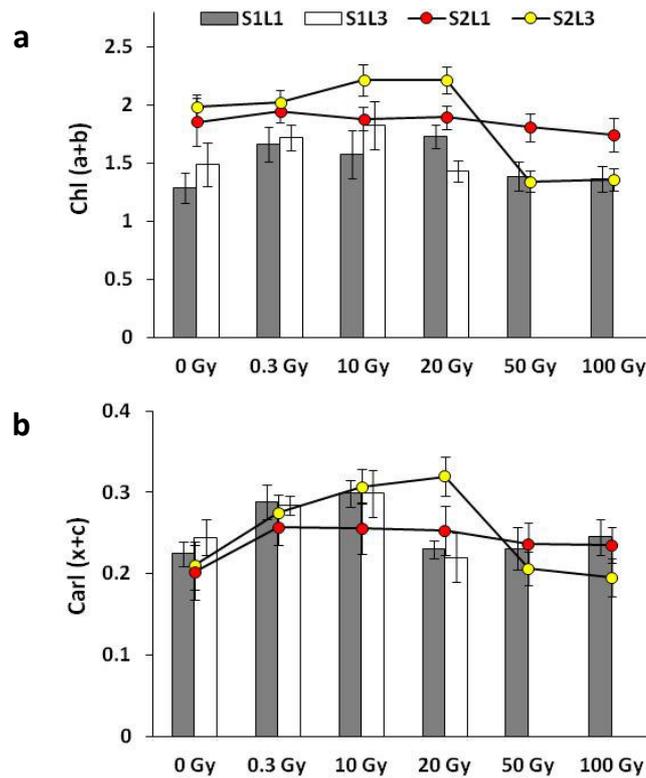


Figura 10: Contenuto totale di clorofilla (a) e carotenoidi (b) in foglie L1 ed L3 di piante di *S. lycopersicum* irraggiate con dosi crescenti di raggi X nelle fasi fenologiche S1 ed S2. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4).

Nelle foglie L1 sia della fase S1 che S2 il contenuto di clorofille e carotenoidi totali non ha mostrato differenze significative rispetto ai controlli, nemmeno alle dosi più elevate di raggi X, ovvero 50 e 100 Gy, indicando che i complessi antenna delle foglie pienamente sviluppate, indipendentemente dallo stadio fenologico della pianta, non risultano compromessi dalla radiazione (Figura 10a, b). Nelle foglie L3 della fase S2 è stato riscontrato un forte decremento ($P < 0.05$) delle clorofille e dei carotenoidi totali a 50 e 100 Gy rispetto ai controlli ed alle foglie L1 della stessa fase fenologica. Questo dato suggerisce che quando i tessuti fogliari in attiva crescita ricevono alte dosi di radiazione, ne scaturiscono danni che si manifestano durante lo

sviluppo che compromettono la sintesi di pigmenti, limitando non solo l'efficienza di cattura della luce, ma anche la capacità dell'apparato fotosintetico di convertirla, in accordo ai valori più bassi di efficienza fotochimica riscontrati in queste foglie.

La possibilità che la bassa efficienza fotochimica, alle dosi più elevate di radiazione ionizzante, potesse essere dovuta anche ad un danno a carico della proteina D1 del PSII, è stata valutata analizzando l'espressione ed i livelli proteici in foglie L1 ed L3 negli stadi fenologici S1 ed S2.

Nelle piante irraggiate in fase vegetativa S1, le foglie L1 hanno mostrato un progressivo decremento del contenuto e dell'espressione della proteina D1, rispetto al controllo, con valori prossimi allo zero alle dosi di 50 e 100 Gy. Anche nelle foglie S1_L3 i livelli di proteina alle dosi di 20 Gy sono risultati molto bassi rispetto al controllo (Figura 11).

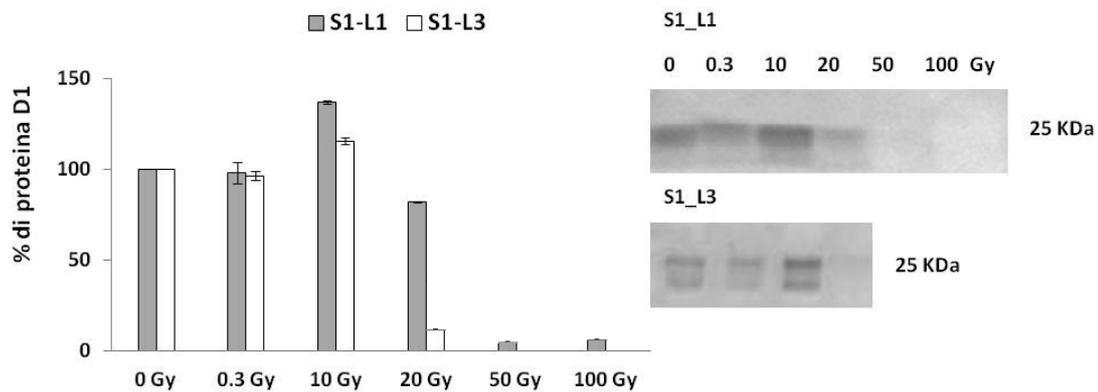


Figura 11: Analisi densitometrica (con il software Quantity One, Bio-Rad) ed espressione della proteina D1 (mediante Western blot) in foglie L1 ed L3 di piante di *S. lycopersicum* irraggiate in fase vegetativa S1 con dosi crescenti di raggi X. Ciascun istogramma rappresenta la media \pm es (n = 3).

In fase riproduttiva S2, le foglie L1 ed L3 di piante irraggiate hanno mostrato un analogo comportamento per quanto la proteina D1 caratterizzato da un forte decremento del contenuto proteico dopo esposizione a dosi di 50 e 100 Gy rispetto ai controlli (Figura 12).

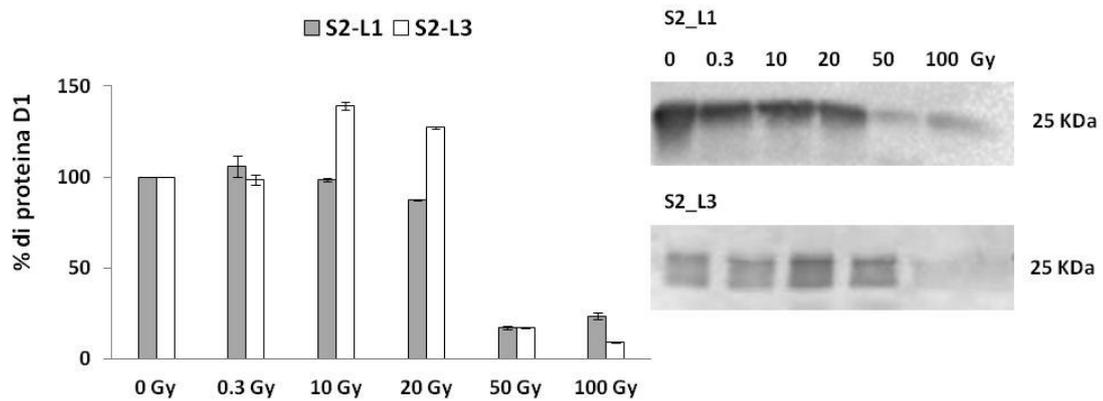


Figura 12: Analisi densitometrica (con il software Quantity One, Bio-Rad) ed espressione della proteina D1 (mediante Western blot) in foglie L1 ed L3 di piante di *S. lycopersicum* irraggiate in fase riproduttiva S2 con dosi crescenti di raggi X. Ciascun istogramma rappresenta la media \pm es (n = 3).

La riduzione dei livelli di D1 insieme alla diminuzione di efficienza fotochimica (Φ PSII, Fv/Fm) potrebbe essere interpretato come un danno ai centri di reazione dovuto al mancato e/o lento turnover della proteina D1 che, mediante il suo continuo ciclo di riparazione, assicura il buon funzionamento del PSII (Murata et al., 2007). Il danno alla proteina D1 potrebbe essere dovuto all'eccesso di radicali liberi che vengono prodotti nei tessuti vegetali in seguito all'esposizione a forti dosi di radiazione e che provocano per ossidazione delle membrane e danni al materiale genomico (Das e Roychoudhury, 2014). E' però da evidenziare che, sebbene i livelli di D1 risultino paragonabili in entrambi i tipi di foglie, le foglie L3 sono meno attive fotochimicamente, probabilmente in virtù di altre ragioni che ne determinano la maggiore radiosensibilità, come potrebbe essere ad esempio una minore efficienza dei sistemi di detossificazione cellulare.

5.3.3 Risposta antiossidante in tessuti fogliari a diverso grado di sviluppo ed effetti dello stress ossidativo sul DNA genomico

E' noto che l'esposizione delle piante a radiazioni ionizzanti determina un aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) responsabili del danno ossidativo alle strutture della cellula vegetale (Esnault, et al., 2010). In queste condizioni, le

piante attivano meccanismi di difesa aumentando il contenuto di composti antiossidanti.

Le analisi seguenti mirano ad evidenziare la capacità delle foglie di *S. lycopersicum* irraggiate ad un diverso stadio di sviluppo a mettere in atto sistemi di difesa antiossidanti per contrastare gli effetti deleteri dei raggi X.

In particolare, è stato misurato il contenuto di sostanze fenoliche (Figura 13), nelle membrane cellulari, e la quantità di acido ascorbico (Figura 14) in foglie L1 ed L3 di piante irraggiate in fase vegetativa S1 e fase riproduttiva S2.

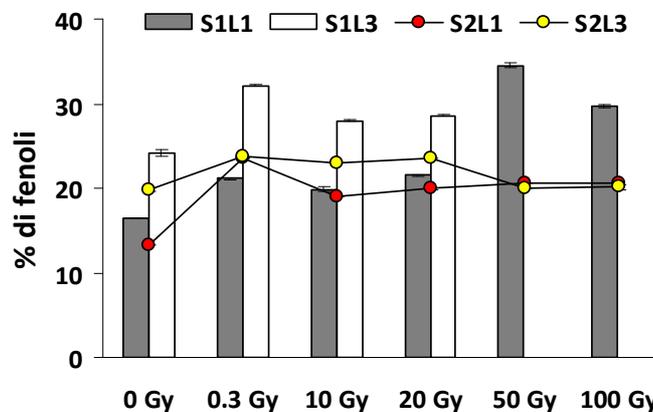


Figura 13: Percentuale di sostanze fenoliche in foglie L1 ed L3 di piante di *S. lycopersicum* irraggiate con dosi crescenti di raggi X nelle fasi fenologiche S1 ed S2. Ciascun istogramma rappresenta la media \pm es (n = 4).

Come si evince dalla Figura 13, le foglie S1_L1, hanno mostrato un accumulo di composti fenolici in funzione della dose di raggi X assorbita. In particolare l'esposizione a dosi di 50 e 100 Gy, ha provocato come immediata reazione nelle foglie pienamente espanse al momento dell'irraggiamento, un significativo incremento ($P < 0.01$) della percentuale di sostanze fenoliche nella membrana cellulare. Nelle foglie L3, non ancora del tutto sviluppate al momento dell'irraggiamento, tale aumento è stato osservato già a dosi di 0.3 Gy, indicando una minore suscettibilità allo stress ossidativo radioindotto dei tessuti fogliari adulti rispetto a quelli giovani. Dal confronto tra S1_L1 e S1_L3 si evince che il contenuto di fenoli è significativamente maggiore nelle foglie L3. Si può supporre che livelli

più alti di composti fenolici nelle foglie più giovani siano dovuti all'azione protettiva che queste sostanze svolgono nella fase iniziale di sviluppo della foglia. Nelle piante irraggiate in fase riproduttiva S2, invece, la percentuale delle sostanze fenoliche, sia nelle foglie L1 che L3, ha subito solo un leggero aumento rispetto alle foglie controllo, per tutte le dosi di raggi X; inoltre anche in questa fase del ciclo vitale delle piante le foglie più giovani hanno mostrato un contenuto di fenoli più elevato rispetto alle foglie adulte che potrebbe essere interpretato come una maggiore esigenza di protezione da parte di tessuti giovanili (Figura 13).

Le foglie L1 ed L3 di piante irraggiate in fase vegetativa S1 hanno mostrato un aumento del contenuto di acido ascorbico in seguito al trattamento con raggi X, già a partire da dosi di 0.3 Gy, con valori più elevati a 50 e 100 Gy. Anche le foglie mature e giovani della fase fenologica S2 hanno mostrato lo stesso comportamento, ossia un incremento di acido ascorbico dose-dipendente che raggiunge i valori più alti in assoluto alle dosi di 50 e 100 Gy di raggi X.

I dati delle concentrazioni di acido ascorbico (AsA) misurati nelle due differenti tipologie di foglie (adulta e in via di sviluppo) in piante irraggiate nelle fasi fenologiche vegetativa e riproduttiva (Figura 14), sembrano confermare l'insorgenza nelle foglie giovani di un maggiore stress ossidativo e dunque di una più grande necessità da parte di queste, di aumentare le difese antiossidanti per ripristinare l'equilibrio cellulare perduto (Foyer e Noctor, 2009; Garg e Manchanda 2009).

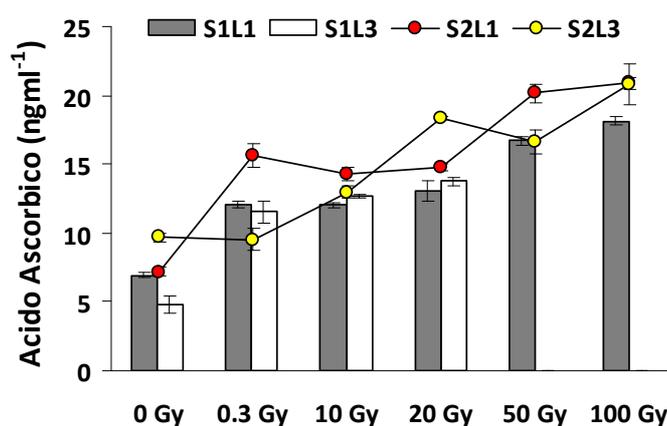


Figura 14: Concentrazione di Acido ascorbico (AsA) in foglie L1 ed L3 di piante di *S. lycopersicum* irraggiate con dosi crescenti di raggi X nelle fasi fenologiche S1 ed S2. Ciascun istogramma rappresenta la media \pm es (n = 4).

La maggior parte degli effetti biologici mostrati dalle piante in seguito all'assorbimento delle radiazioni ionizzanti è il risultato di alterazioni genetiche. La molecola di DNA, è infatti il bersaglio principale dell'azione diretta o indiretta (mediata dai ROS) delle radiazioni ionizzanti (Devasagayam, et al., 2004). Per valutare l'insorgenza di mutazioni indotte dalle diverse dosi di raggi X sul DNA, sono state condotte analisi genetiche per mezzo della tecnica RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) che permette di individuare danni al DNA e vari tipi di mutazioni, anche non visibili a livello fenotipico (Danylchenko e Sorochinsky, 2004; Atienzar e Jha, 2006; Cenkci, 2009; Shahrtash et al., 2010; Al-Qurainy et al., 2010; Al-Zahrani, 2012). Il potenziale di questa tecnica è legato al fatto che i diversi profili RAPD-PCR sono il risultato di differenze genetiche tra i campioni associate alla diversa composizione in basi in alcuni punti del DNA.

Negli studi di genetica delle popolazioni che utilizzano tale metodica, l'approccio comune è quello di utilizzare i prodotti di PCR per produrre una matrice di distanza, al fine di valutare la somiglianza genetica dei campioni in una popolazione. Dal momento che le modifiche analizzate in questo studio non sono associate a dinamiche genetiche della popolazione, si è ritenuto più opportuno utilizzare i valori di distanza come parametro metrico.

Le analisi sono state condotte su foglie in attivo accrescimento L3, appartenenti a piante irraggiate in fase riproduttiva S2. Le analisi sono state eseguite dopo 11 giorni dall'irraggiamento, per permettere alle foglie di raggiungere la piena espansione. La fase riproduttiva e lo stadio di sviluppo fogliare L3 sul quale è stata effettuata l'analisi, sono stati scelti al fine di valutare se eventuali mutazioni venissero trasmesse lungo la linea cellulare.

In seguito sono riportati i valori delle distanze genetiche tra i campioni (Tabella 4) e il relativo dendrogramma (Figura 15).

Tabella 4: Misure di distanza genetica tra i campioni calcolate secondo Nei (1972)

Dose	Ctrl	0.3 Gy	10 Gy	20 Gy	50 Gy	100 Gy
0.3 Gy	0.1818182					
10 Gy	0.1818182	0.0000000				
20 Gy	0.2727273	0.3000000	0.3000000			
50 Gy	0.3636364	0.2222222	0.2222222	0.1250000		
100 Gy	0.3636364	0.2222222	0.2222222	0.1250000	0.0000000	

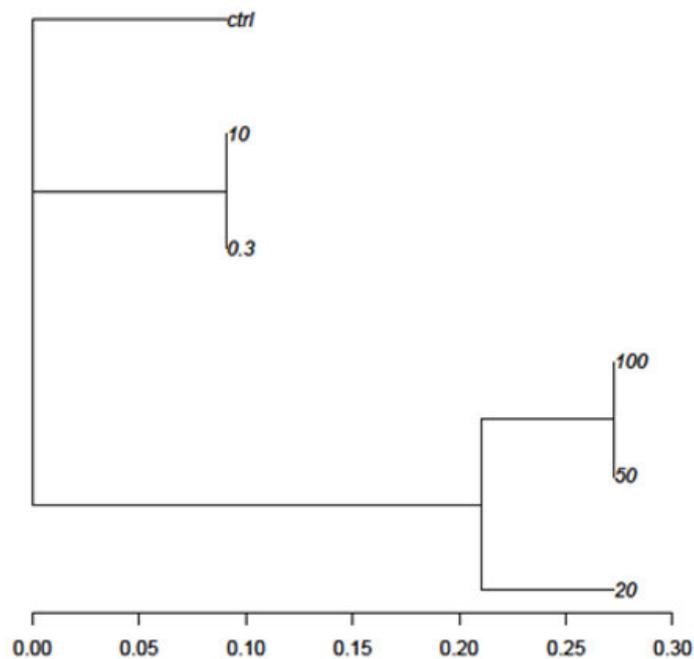


Figura 15: Dendrogramma basato sul metodo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) sviluppato dai profili RAPD di foglie L3 di piante irraggiate in fase riproduttiva S2

La matrice delle distanze (Tabella 4) ed il dendrogramma (Figura 15), costruiti sulla base dei dati ottenuti dalla RAPD-PCR hanno mostrato che tra le cinque dosi di raggi X utilizzate in questo studio, dosi di 0.3 Gy possono essere considerate pari a 10 Gy ($d = 0$), ed entrambe risultano vicine al controllo ($d = 0,182$), mentre dosi di 50 e 100 Gy sembrano ugualmente simili tra loro, e separate dalle altre dosi. Infine, la dose di 20 Gy può essere classificata simile ($d = 0,125$) alle alte dosi (50 e 100 Gy).

La dissimilarità nei profili RAPD-PCR suggerisce un aumento della mutagenesi e/o di danni al DNA in tutte le foglie irraggiate rispetto al controllo: dosi di 0.3 e 10 Gy hanno un basso potere nell'indurre alterazioni del DNA, mentre a dosi pari a 20 Gy tale potere aumenta, raggiungendo il massimo a 50 e 100 Gy.

I risultati della matrice delle distanze e del dendrogramma hanno indicato effetti fortemente mutageni a dosi elevate di raggi X che potrebbero essere alla base delle alterazioni che si manifestano a carico dell'apparato fotosintetico delle foglie L3 (Danylchenko e Sorochinsky 2005).

Tuttavia i raggi X a basse dosi, pur non comportando cambiamenti a livello fenotipico, inducono alterazioni del DNA che si trasmettono lungo la linea cellulare. L'analisi RAPD indica che i polimorfismi riscontrati alla dose di 20 Gy di raggi X sono paragonabili a quelli rilevati alle più alte dosi di 50 e 100 Gy, anche se tale dose non determina cambiamenti visibili nelle foglie. Le alterazioni riscontrate nella molecola di DNA a 20 Gy, potrebbero essere responsabili di mutazioni a carico dei geni che codificano per proteine coinvolte nel processo fotosintetico con conseguente diminuzione dei livelli proteici. Dosi di 20 Gy sembrano, quindi segnare i livelli soglia tra l'insorgenza di alterazioni genetiche ed il limite della resistenza dell'apparato fotosintetico alla radiazione, che proprio da 20 Gy in poi riduce in modo significativo la sua efficienza.

5.4 Conclusioni

Gli esperimenti condotti fino ad oggi con le radiazioni ionizzanti indicano che le modifiche strutturali subite dalle piante dipendono dalla complessità dell'organismo stesso, dal suo grado di sviluppo al momento in cui riceve la radiazione ed all'età dell'organo irraggiato. I risultati ottenuti dall'irraggiamento di *Solanum Lycopersicum L.* "Micro-Tom" contribuiscono a descrivere la risposta di questa cultivar a diverse dosi di raggi X e i relativi meccanismi di difesa sviluppati durante differenti fasi fenologiche, per tollerare livelli dannosi di radiazioni ionizzanti.

Evidenze sperimentali hanno confermato che i processi di crescita e riproduzione, nonché la capacità di fotosintesi e l'efficienza dei fotosistemi, sono caratterizzati da

diversa radioresistenza. Questa proprietà dipende da caratteristiche intrinseche della specie e dalla fase fenologica in cui avviene l'irraggiamento.

I raggi X somministrati a dosi crescenti su seme secco non influenzano la crescita delle piante permettendo il completamento del ciclo vitale e la formazione di frutti sani. E' interessante notare piuttosto che l'esposizione dei semi a basse dosi di radiazioni, esercita uno stimolo positivo sulla crescita delle piante, promuovendo lo sviluppo di un numero maggiore di foglie e frutti.

Al contrario, nelle fasi vegetativa e riproduttiva, le piante hanno mostrato una differente radiosensibilità, in relazione alle dosi di raggi X assorbite. In particolare, fino a dosi di 20 Gy, le piante irraggiate sia in fase vegetativa che in fase riproduttiva presentano una buona tolleranza alla radiazione, mentre subiscono danni evidenti se esposte a dosi di 50 e 100 Gy. Tali dosi hanno comportato il mancato completamento del ciclo vitale con un arresto dello sviluppo fogliare nelle piante irraggiate in fase vegetativa, e fenomeni di senescenza precoce con mancata produzione di frutti nelle piante irraggiate in fase riproduttiva.

A livello fotosintetico, le elevate dosi di raggi X provocano una diminuzione di efficienza fotochimica che in foglie giovani risulta essere più marcata rispetto alle foglie adulte, indipendentemente dallo stadio fenologico della pianta al momento dell'irraggiamento. Questa situazione di stress a carico dell'apparato fotosintetico può essere dovuta a diverse cause: una limitazione nel turnover della proteina D1 del centro di reazione del PSII, una riduzione del contenuto di pigmenti fotosintetici, una minore efficienza dei sistemi di detossificazione cellulare.

I dati relativi alla percentuale di sostanze fenoliche ed alle concentrazioni di acido ascorbico (AsA) più elevati in foglie in via di sviluppo rispetto a quelle adulte, in entrambe le fasi fenologiche vegetativa e riproduttiva, ancora una volta sembrano indicare una maggiore vulnerabilità dei tessuti giovani ai danni da radiazione, probabilmente attribuibili all'insorgenza di uno stress ossidativo più severo. Come reazione le foglie giovani incrementano le difese antiossidanti per ripristinare l'equilibrio cellulare perduto. La strategia, pur non sufficiente a garantire alle alte dosi di radiazione una performance fisiologica ottimale, sembra tuttavia essere valida per evitare danni irreparabili.

Dosi elevate di raggi X oltre ad agire direttamente sulle strutture cellulari, determinano anche un'alterazione dell'espressione genica che si trasmettono lungo la linea cellulare, pur non comportando alterazioni a livello fenotipico. I risultati ottenuti dalla RAPD-PCR su tessuti fogliari giovani appartenenti a piante irraggiate in fase riproduttiva, indicano che il maggior numero di alterazioni genetiche si riscontra a partire da dosi di 20 Gy. Probabilmente i cambiamenti strutturali del DNA, riscontrati a questa dose non hanno influito negativamente sull'espressione di geni fondamentali per i processi di crescita e riproduzione delle piante mentre a dosi di 50 e 100 Gy l'effetto mutageno dei raggi X ha comportato la comparsa di danni irreversibili.

In conclusione si può osservare che l'esposizione a basse dosi di raggi X (fino a 20 Gy) in tutte le fasi fenologiche analizzate, e specialmente in fase di seme, porta ad un'intensificazione del carattere nano, con formazione di piante dal portamento molto compatto accentuando l'adattabilità di questa cultivar ai volumi ridotti disponibili nei moduli pressurizzati nello Spazio, e determinando un aumento della produttività che viene tradotto in risparmio economico a parità di risorse investite (De Micco et al, 2014). Altro requisito che supporta l'impiego di questa cultivar nello Spazio è l'aumento del contenuto di sostanze antiossidanti a seguito dei trattamenti soprattutto a dosi medio-basse. In conclusione, l'elevata radioresistenza, insieme alla taglia ridotta, alla brevità del ciclo culturale e all'elevato contenuto di antiossidanti, rendono 'Micro-Tom' un candidato ideale per la coltivazione nei sistemi biorigenerativi di supporto alla vita.

CAPITOLO 6

Effetti della radiazione ionizzante ad alto LET sul ciclo vitale della specie *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom'

6.1 Premessa e disegno sperimentale

Questo esperimento, finalizzato ad indagare l'effetto dell'irraggiamento con ioni pesanti sulla specie Micro-Tom, completa il quadro delle conoscenze acquisite nel capitolo precedente dove l'attenzione è stata focalizzata sulle risposte della stessa specie ad irraggiamento con raggi X. Lo studio proposto si inserisce nel quadro generale di ricerche finalizzate ad indagare l'effetto delle radiazioni ionizzanti sullo sviluppo delle piante eduli finalizzato a: 1) comprendere i meccanismi alla base della radioresistenza; 2) massimizzare l'efficienza di crescita delle piante nell'ottica di un loro impiego nei sistemi biorigenerativi di supporto alla vita (BLSS) nello Spazio; 3) produrre cibo fresco a bordo delle piattaforme spaziali per integrare la dieta degli astronauti (Wheeler et al., 2008).

E' noto che gli organismi vegetali sono più tolleranti rispetto agli animali nei confronti delle radiazioni ionizzanti (Arena et al., 2014a). La maggiore radioresistenza delle piante è tutt'oggi una questione dibattuta poiché può essere attribuita sia a caratteristiche genetiche intrinseche della specie, e dunque peculiari per ogni organismo, sia a meccanismi biochimici e molecolari messi a punto dalle piante per riparare il danno genotossico. Composti chimici, come antiossidanti e vitamine, trasferibili agli astronauti come cibo fresco prodotto a bordo, potrebbero ridurre i rischi di danni ossidativi causati dall'incremento di radicali liberi indotto dalle radiazioni (Arora et al., 2005; Maurya et al., 2006). Questo aspetto assume una notevole importanza in missioni di lunga durata, che espongono il corpo umano a rischio di cancro per fenomeni di ossidazione e degenerazione cellulare (Durante e Cucinotta, 2008). Dunque specie vegetali con elevata fotosintesi e capacità di produrre più antiossidanti e vitamine nelle parti eduli sono guardate con maggiore attenzione.

Un aspetto da non trascurare è che tutti gli organismi nello Spazio sono soggetti a livelli di radiazioni ionizzanti più elevati rispetto alla Terra e che tali situazioni sono percepite dalla pianta come uno stress. L'esposizione alle radiazioni ionizzanti può determinare tutta una serie di risposte fisiologiche, come l'aumento di sostanze fenoliche ed altri composti antiossidanti, che potenziano nelle cellule la capacità di tollerare lo stress ossidativo indotto dalla radiazione (Alscher et al., 1997). Tali composti potrebbero essere trasferite anche all'uomo attraverso la dieta. Inoltre bassi livelli di radiazione possono anche indurre effetti ormetici su crescita e metabolismo con risvolti positivi sulla produzione di biomassa (Luckey, 1980).

L'esperimento che segue si propone di studiare l'effetto degli ioni Carbonio, somministrati alla dose di 25 Gy, sullo sviluppo delle piante di pomodoro cv Micro-Tom, una delle specie selezionate dalle agenzie spaziali internazionali per la crescita nei BLSS. A tal proposito piante derivanti da semi irraggiati e non, sono state coltivate fino alla fruttificazione e confrontate, durante la crescita, sulla base di parametri morfologici, eco-fisiologici, biochimici e nutrizionali. I cambiamenti nella crescita e nello sviluppo della pianta sono stati stimati attraverso una serie di rilievi morfologici e biometrici, la funzionalità dell'apparato fotosintetico è stata valutata mediante misure di emissione di fluorescenza, determinazione del contenuto di pigmenti fotosintetici ed analisi biochimiche relative alla proteina D1 del PSII; infine la risposta allo stress ossidativo radioindotto è stata stimata attraverso misure quantitative di molecole antiossidanti ad azione enzimatica e non in foglie e frutti.

Un ulteriore obiettivo del presente esperimento ha riguardato lo studio della regolazione dell'apparato fotosintetico di piante di Micro-Tom, germinate da semi irraggiati e non, in condizioni di stress luminoso. Partendo dal presupposto che l'attività fotosintetica delle piante può essere alterata dall'esposizione alle radiazioni ionizzanti a diversi livelli (De Micco et al., 2011), piante controllo ed irraggiate sono state sottoposte a stress da elevate irradianze per verificare se ed in che misura la capacità dell'apparato fotosintetico di regolare l'energia luminosa, potesse essere stata compromessa e/o stimolata dalla radiazione.

6.2 Materiali e metodi

6.2.1 Procedura d'irraggiamento e condizioni di crescita

Semi secchi (n=50) di *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom', forniti da Holland online vof (Driebanstraat 19, 1024 CG Amsterdam The Netherlands, <http://fromhollandonline.com/EN/>) sono stati irraggiati in Germania, presso il GSI (Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH, Darmstadt, Hesse), utilizzando un fascio di ioni carbonio (LET: 180 keV/im), somministrato alla dose di 25 Gy. La dose di radiazione, considerata bassa per lo stadio fenologico di seme, è stata scelta per stimolare possibili effetti ormetici. Dopo l'irraggiamento, i semi sono stati trasportati in Italia presso il Dipartimento di Biologia dell'Università di Napoli Federico II, dove sono state effettuate tutte le successive analisi.

I semi irraggiati ed i rispettivi controlli non irraggiati sono stati fatti germinare in vasi di 15 cm di diametro, riempiti con terreno comune e collocati in una camera di crescita in condizioni controllate di temperatura (25 ± 1 °C), umidità relativa (60%) e luce ($100-125$ $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Figura 1).



Figura 1: Piante di *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom' collocate in camera di crescita.

Durante il ciclo vitale, le piante sono state regolarmente irrigate per reintegrare l'acqua persa per evapotraspirazione. L'esperimento è stato ripetuto 2 volte.

6.2.2 Germinazione e misure biometriche

La percentuale finale di germinazione è stata calcolata dopo 4 e 7 giorni dalla semina su n=20 semi irraggiati e n=20 semi controllo. Per la procedura utilizzata si rimanda al capitolo 4.2.3. La crescita delle piante è stata seguita per un periodo di 90 giorni fino al completamento del ciclo vitale “da seme a seme” annotando, di volta in volta, le caratteristiche biometriche (altezza delle piante, area fogliare, numero delle foglie, fiori e frutti). Per i materiali e metodi utilizzati si rimanda al capitolo 4.2.4.



Figura 2: Misura dell'area fogliare, mediante fotografia digitale, di foglie di *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom'.

6.2.3 Stima della biomassa

La biomassa delle piante sviluppate da semi controllo e semi irraggiati è stata determinata alla fine del ciclo vitale. Ciascuna pianta intera, per un totale di 4 piante per trattamento, con foglie fusto e radici è stata seccata in stufa a 75 °C per 48 h e pesata per la determinazione del peso secco.

6.2.4 Misure di emissione di fluorescenza della clorofilla *a*

In questo esperimento, le misure di emissione di fluorescenza della clorofilla *a* sono state condotte in due tempi con due differenti fluorimetri.

In un primo momento sono state eseguite, su foglie pienamente espanse di piante allo stadio vegetativo, misure puntiformi di fotochimica direttamente in cella climatica per verificare lo stato dei fotosistemi. Tali misure sono state eseguite con un fluorimetro portatile FluorPen FP100max fluorometer, munito di un sensore quantico (Photon System Instruments, Brno, Czech Republic) (Figura 3).



Figura 3: Il fluorimetro FluorPen FP100max (Photon System Instruments, Czech Republic)

Gli indici fotochimici monitorati sono stati: la massima efficienza fotochimica del PSII (F_v/F_m), la resa quantica del PSII (Φ_{PSII}) ed il quenching non-fotochimico (NPQ). La fluorescenza di base F_o è stata misurata in foglie adattate al buio per 30' da una debole luce di misura blu di circa $1-2 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La fluorescenza massima al buio, F_m , è stata indotta da un pulse di luce saturante di intensità pari a $3.000 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La massima resa quantica del fotosistema II, F_v/F_m , è stata calcolata come $(F_m - F_o)/F_m$.

Per le misure di fluorescenza alla luce, la resa quantica del PSII, è stata determinata per mezzo di una apposita cuvette aperta in condizioni luminose di crescita in accordo con Genty et al. (1989). Il quenching non-fotochimico (NPQ) è stato calcolato secondo Bilger and Björkman (1990): $\text{NPQ} = (F_m/F_m') - 1$.

Successivamente, sulle piante allo stadio riproduttivo (con presenza di strutture fiorali) sono state eseguite curve veloci di risposta alla luce (light fast-kinetic response curves) per gli indici fotochimici F_v/F_m , Φ_{PSII} , ETR ed NPQ per valutare eventuali differenze nella capacità di conversione dell'energia luminosa al PSII, indotte dalla radiazione ionizzante.

L'analisi *light fast-kinetic response curves* è stata condotta tramite il fluorimetro a luce modulata JUNIOR PAM (Walz-Germany), (Figura 4). Il protocollo ha previsto l'oscuramento delle foglie per 30 min per calcolare F_v/F_m e successivamente l'esposizione del tessuto fotosintetico a step di intensità luminosa crescente (da 0 a $1500 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Per il calcolo degli indici fotochimici mediante fluorimetro Junior-PAM si rimanda al capitolo 4.2.5.



Figura 4: Fluorimetro JUNIOR PAM (Walz-Germany) munito di cuvetta di misura dove è alloggiata la foglia appartenente ad una pianta di *Solanum lycopersicum L.* 'Micro-Tom'.

6.2.5 Determinazione dei pigmenti fotosintetici

La determinazione dei pigmenti fotosintetici è stata effettuata su tessuti di foglia appartenenti a piante germinate da semi controllo e semi irraggiati. Per i materiali e metodi utilizzati si rimanda al capitolo 3.2.4.

6.2.6 SDS-PAGE e Western blotting della proteina D1

L'identificazione e la quantificazione della proteina D1 è stata condotta su foglie pienamente espanse prelevate da piante germinate da semi controllo e semi irraggiati. Per i materiali e metodi utilizzati si rimanda al capitolo 4.2.7.

6.2.7 Attività antiossidante in foglie e frutti

Per analizzare se l'irraggiamento dei semi con C 25Gy potesse indurre nelle piante e nei frutti un aumento di composti antiossidanti, sono state valutate l'attività dell'enzima catalasi (CAT) e le variazioni intracellulari di acido ascorbico (AsA). Le analisi sono state effettuate su foglie pienamente espanse e frutti maturi prelevati da piante controllo e piante sviluppate da semi irraggiati.

L'attività della catalasi (CAT) è stata misurata in base al procedimento fornito dal kit Catalase Assay Kit (Sigma-Aldrich). La determinazione dell'attività enzimatica si basa su un metodo colorimetrico per cui la decomposizione di H_2O_2 in H_2O e O_2 , catalizzata dall'enzima, viene seguita per via spettrofotometrica mediante la diminuzione di A_{520} . Un'unità di attività CAT è definita come la quantità di enzima che decompone 1 μ mol di H_2O_2 al minuto, a pH 7.0, a 25°C.

Per i dettagli sui materiali e metodi utilizzati per la determinazione di acido ascorbico si rimanda al capitolo 4.2.8.

6.2.8 Valutazione dell'attività fotosintetica in risposta a stress luminoso da elevata irradianza

Dopo aver eseguito le curve veloci dei parametri fotochimici in risposta ad intensità luminosa crescente, le foglie misurate sono state etichettate e le rispettive piante, controllo ed irraggiate, sono state esposte a stress luminoso della durata di 50 min ad una densità di flusso fotonico (PPFD) pari a 2500 μ mol fotoni $m^{-2} s^{-1}$. Dopo lo stress luminoso le foglie marcate sono state nuovamente sottoposte al protocollo *light fast-kinetic response curves* per valutare l'effetto dell'elevata irradianza sull'apparato fotosintetico. Al termine delle curve, le foglie sono state nuovamente

oscurate e F_v/F_m di nuovo misurato per verificare l'insorgenza di fenomeni fotoinibitori. Il parametro F_v/F_m è stato monitorato dopo 30 min di buio (tempo $T=30'$ dallo stress luminoso) e dopo 24 ore di buio ($T=24h$) a seguito dello stress luminoso per ottenere informazioni sulla capacità di recupero delle piante, controllo ed irraggiate, dallo stress luminoso.

Contestualmente sono stati prelevati campioni di tessuto fogliare per l'analisi della proteina D1 del PSII mediante western blotting. La proteina D1 è il principale bersaglio dei danni che si verificano ai fotosistemi per eccesso di luce, un fenomeno noto come fotoinibizione (Murata et al., 2007). Essa presenta il maggior tasso di turn-over tra le proteine tilacoidali. In seguito a danni foto-ossidativi e/o danni fotoinibitori della D1, il centro di reazione del PSII viene inattivato; l'attività del complesso viene ripristinata attraverso il ciclo di riparo, che permette la sostituzione della subunità D1 danneggiata con una sintetizzata ex-novo (Sundby et al., 1994). L'esperimento è stato ripetuto su $n=5$ piante controllo e $n=5$ piante irraggiate.

6.2.9 Analisi statistica

Per l'analisi statistica dei dati sperimentali si rimanda al capitolo 3.2.7.

6.3 Risultati e discussione

6.3.1 Effetti degli ioni pesanti sulla germinazione e crescita delle piante

L'esposizione dei semi a fasci di ioni C alla dose di 25 Gy ha determinato un iniziale rallentamento dei tassi di germinazione (4 giorni dopo la semina - GDS). Tuttavia, dopo 7 giorni, la percentuale di germinazione dei semi irraggiati è risultata comparabile al controllo (Figura 5). L'effetto ritardante esercitato dagli ioni C è risultato evidente anche sulla crescita delle piante in termini di altezza del fusto. In

particolare, durante i 90 giorni di monitoraggio è stato osservato un progressivo allungamento del fusto sia nelle piante germinate da semi controllo che da semi irraggiati, ma in quest'ultime l'altezza del fusto appare significativamente ridotta rispetto a quella riscontrata nelle piante controllo (Figura 6).

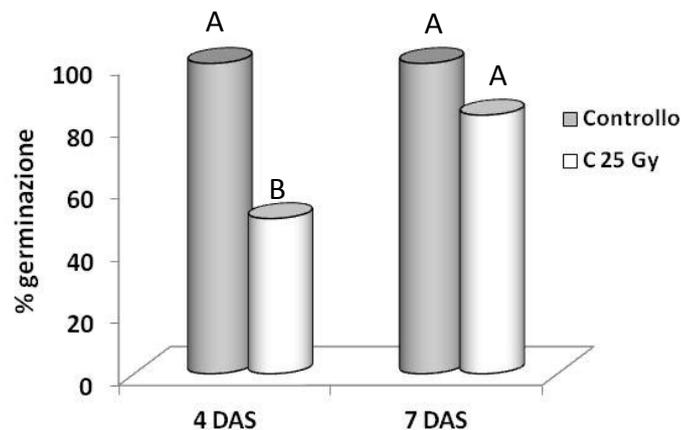


Figura 5: Percentuale di germinazione di semi di *Solanum lycopersicum* 'Micro-Tom' controllo ed irraggiati con ioni C alla dose di 25 Gy dopo 4 e 7 giorni dalla semina – DAS (Days After Sowing). Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 40). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

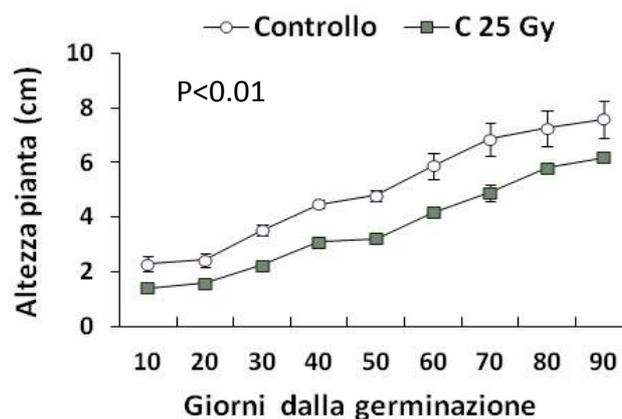


Figura 6: Andamento temporale dell'altezza delle piante di *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom' sviluppate da semi controllo ed irraggiati con ioni C alla dose di 25 Gy. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 10). T-test P<0.01.

La comparsa di nuove foglie, monitorata nel periodo compreso tra 20 e 90 giorni dalla germinazione è risultata in progressivo aumento sia nelle piante controllo

che irraggiate. Tuttavia, come si evince dal grafico in Figura 7, si evidenzia una differenza temporale nell'incremento del numero di foglie tra campioni controllo e trattati: le piante controllo presentano il massimo numero di foglie già a 70 GDS, mentre quelle irraggiate lo raggiungono dopo 80 giorni, con valori paragonabili al controllo.

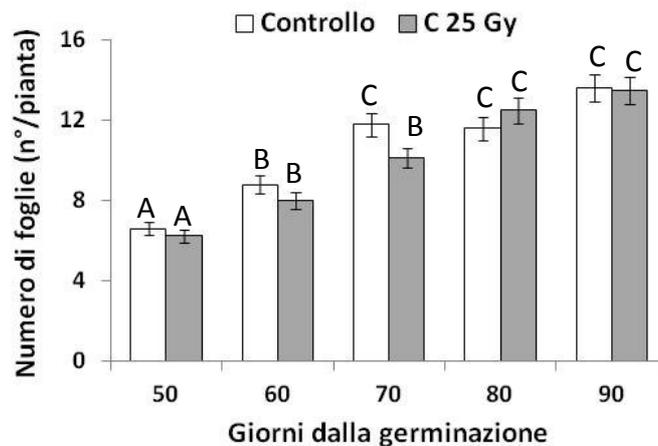


Figura 7: Andamento temporale del numero di foglie in piante di *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom' sviluppate da semi controllo ed irraggiate con ioni C alla dose di 25 Gy. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

L'effetto ritardante la crescita degli ioni C è stato osservato anche per quanto riguarda l'incremento dell'area fogliare (Figura 8). Dal 45° giorno dopo la semina, il valore dell'area fogliare totale aumenta progressivamente sia in piante controllo che in quelle irraggiate, tuttavia fino al 75° giorno i controlli hanno mostrato valori significativamente più elevati rispetto a quelli trattati. Solo dopo questo periodo l'area fogliare totale è risultata comparabile per i due gruppi di piante.

Per verificare se l'esposizione dei semi alle radiazioni ad alto LET avesse alterato la capacità riproduttiva delle piante, è stata monitorata, la comparsa di fiori e frutti sia in piante controllo che irraggiate. I risultati mostrano che a partire dal 65° fino al 90° giorno dalla germinazione la comparsa dei fiori aumenta progressivamente sia nelle piante controllo che in quelle irraggiate.

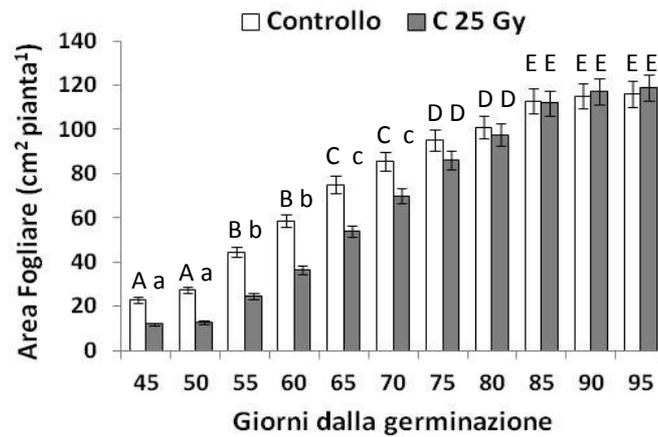


Figura 8: Andamento temporale dell'area fogliare totale in piante di *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom' germinate da semi controllo ed irraggiate con ioni C alla dose di 25 Gy. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

Tuttavia, al termine del periodo di osservazione, nelle piante controllo è stato rilevato un significativo aumento delle strutture fiorali rispetto ai trattati (Figura 9a). Le differenze nel numero di fiori hanno trovato riscontro nel numero dei frutti prodotti alla fine del ciclo vegetativo (Figura 9b). Infatti, pur completando entrambe il ciclo vitale, le piante controllo hanno mostrato una maggiore produzione di bacche rispetto a quelle irraggiate.

L'analisi distruttiva, condotta al termine del ciclo vitale di ciascuna pianta, ha fatto registrare un maggiore accumulo di biomassa nelle piante controllo, indicando una maggiore produzione di tessuti, in accordo con crescita più elevata riscontrata in queste piante (Figura 10).

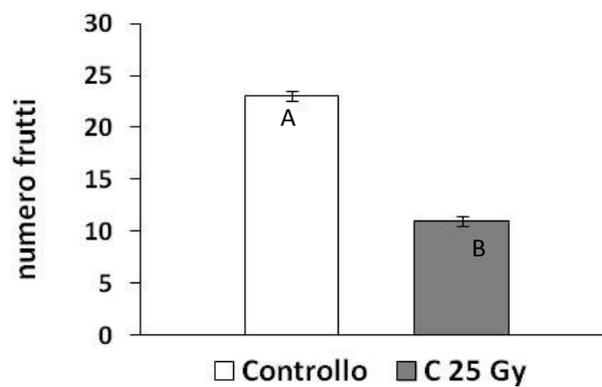
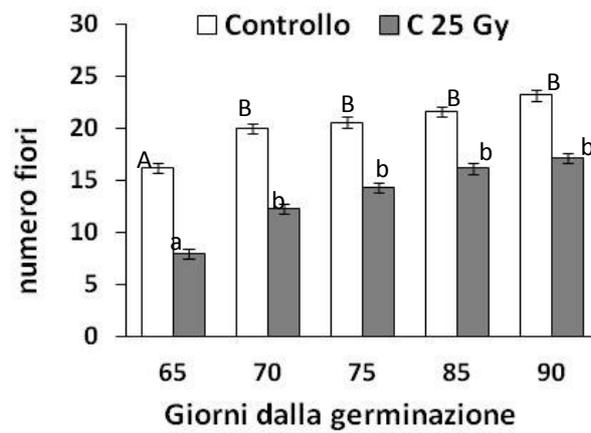


Figura 9: Andamento temporale del numero di fiori (a) e numero di frutti totali (b) in piante di *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom' germinate da semi controllo e irraggiati con ioni C alla dose di 25 Gy. I valori riportati rappresentano la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

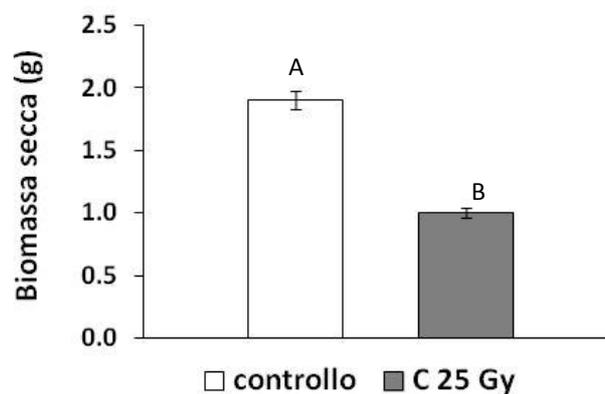


Figura 10: Biomassa secca di piante di *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom' germinate da semi controllo e da semi irraggiati con ioni C alla dose di 25 Gy. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

6.3.2 Effetti dell'irraggiamento sull'efficienza del processo fotosintetico

In figura 11 sono riportate le misure puntiformi di emissione di fluorescenza ad irradianza di crescita, ovvero $150 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ condotte su foglie pienamente sviluppate di piante germinate da semi controllo e semi irraggiati. Quest'analisi ha evidenziato che nelle piante sviluppate da semi irraggiati i valori di ΦPSII ed F_v/F_m sono risultati significativamente più alti rispetto a quelli misurati nelle piante controllo, indicando che l'irraggiamento con ioni C alla dose di 25 Gy ha avuto un effetto positivo sull'attività del PSII. Dati in letteratura riportano che dosi molto basse di radiazioni possono avere effetti ormetici per il processo fotosintetico, come l'aumento dei tassi di fotosintesi, respirazione e trasporto elettronico (Kim et al. 2004; Kurimoto et al. 2010).

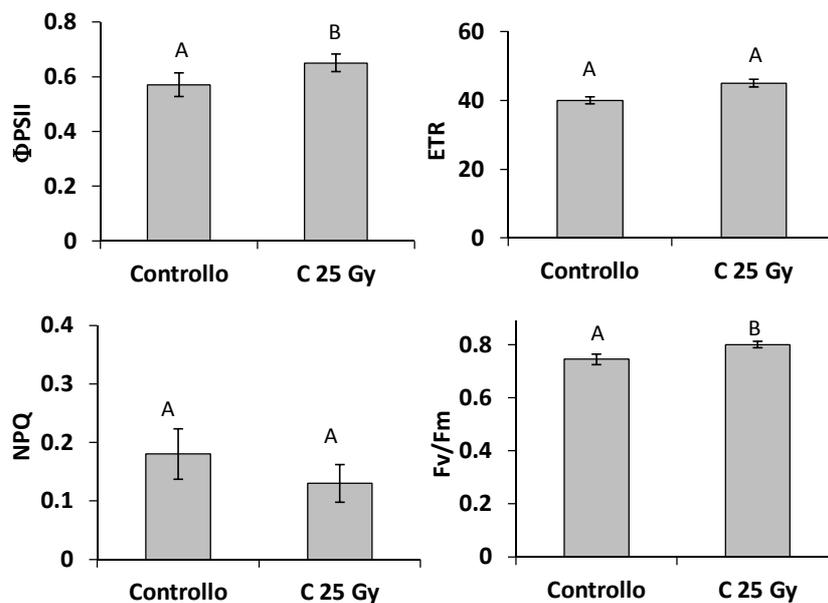


Figura 11: Resa quantica del trasporto elettronico del PSII (ΦPSII), attività di trasporto elettronico (ETR), quenching-non fotochimico (NPQ) e massima resa quantica del PSII (F_v/F_m) misurati in piante di *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom' germinate da semi controllo e irraggiati. Le misure sono state condotte in camera di crescita a PPFD di $125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ciascun punto rappresenta la media \pm es (n=5). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le piante.

Successivamente alle misure di fluorescenza, sono state effettuate analisi per la valutazione del contenuto di pigmenti fotosintetici e dei livelli della proteina D1 sulle stesse foglie usate per le misure di fotochimica.

In figura 12 sono riportati il contenuto totale di clorofilla (a+b) e carotenoidi (x+c). I risultati ottenuti, mostrano anche in questo caso un effetto ormetico dell'irraggiamento, con un aumento significativo dei pigmenti fotosintetici nelle foglie delle piante sviluppate da semi irraggiati rispetto ai controlli. Questi dati trovano riscontro con risultati riportati in letteratura per altre specie, in cui l'irraggiamento di semi di lattuga con dosi di raggi gamma pari a 30 Gy provoca un aumento nel contenuto di clorofilla a, clorofilla b e carotenoidi (Marcu et al. 2013).

L'analisi *western-blot* della proteina D1 mostra un aumento dei livelli proteici nelle foglie delle piante sviluppate da semi irraggiati, rispetto ai controlli, suggerendo che la dose C 25 Gy stimola la sintesi della proteina D1; ciò potrebbe spiegare l'aumento di efficienza fotosintetica del PSII, riscontrata in queste piante (Figura 13).

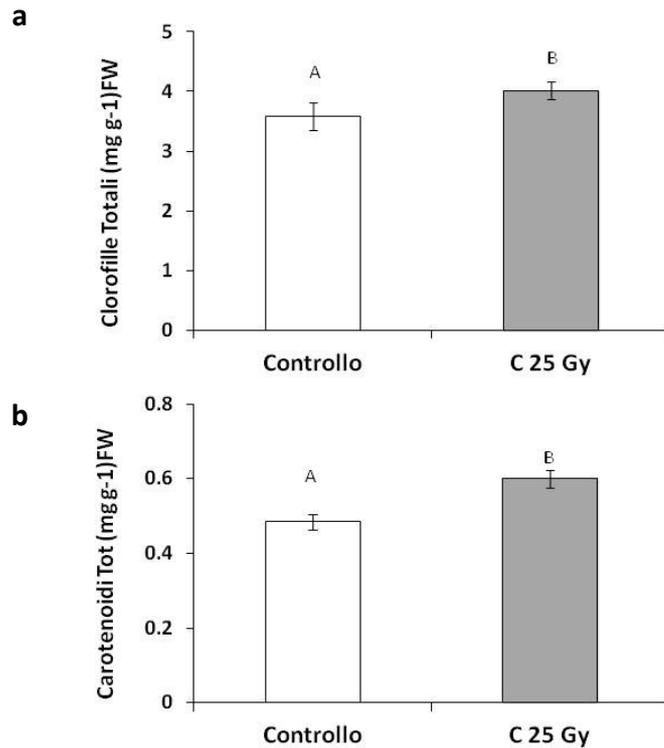


Figura 12: Contenuto totale di clorofilla (a) e di carotenoidi (b) in foglie di piante sviluppate da semi controllo e irraggiati con ioni C alla dose di 25 Gy. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le piante.

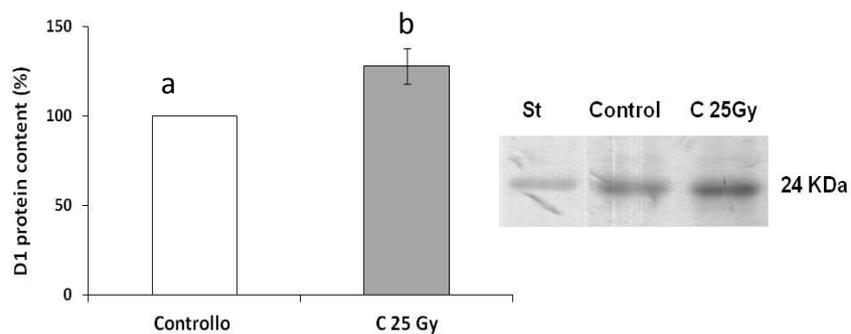


Figura 13: analisi densitometrica (a sinistra) dei profili Western blot (a destra) della proteina D1 in foglie di piante germinate da semi controllo e irraggiati con ioni C alla dose di 25 Gy. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 3). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le piante.

6.3.3 Risposta antiossidante in foglie e frutti

La risposta delle piante allo stress ossidativo radioindotto è stata valutata in foglie e frutti mediante la determinazione del contenuto di acido ascorbico (AsA) molecola antiossidante ad azione non enzimatica e l'attività dell'enzima catalasi (CAT). Quest'ultima catalizza la conversione di H_2O_2 in acqua e ossigeno molecolare (O_2) svolgendo un ruolo importante nella risposta antiossidante delle piante (Noctor e Foyer, 1998).

Dal confronto tra foglie di piante germinate da semi controllo ed irraggiati non emergono differenze significative nel contenuto di acido ascorbico e nell'attività dell'enzima CAT (Figura 14), indicando che dosi di 25 Gy di ioni C non causano un aumento di radicali liberi nei tessuti fotosintetici.

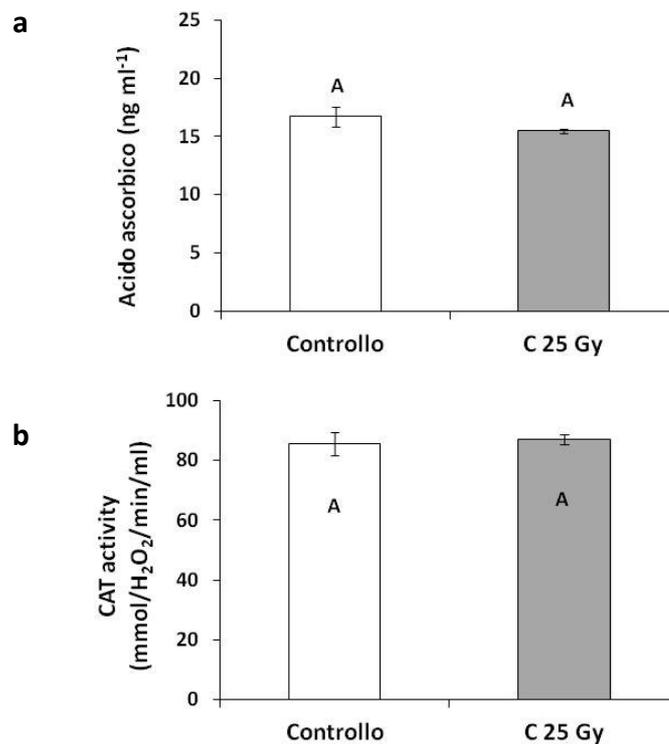


Figura 14: Contenuto di acido ascorbico (a) e attività dell'enzima catalasi (b) in foglie di piante germinate da semi controllo ed irraggiati con ioni C alla dose di 25 Gy. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

Al contrario, le stesse analisi eseguite sui frutti maturi mostrano un aumento significativo della quantità di acido ascorbico rispetto al controllo (Figura 15). L'aumento della sintesi di acido ascorbico a seguito dell'irraggiamento rappresenta una risposta positiva della pianta per la difesa delle strutture cellulari dal danno ossidativo. L'acido ascorbico, infatti svolge un ruolo prevalentemente protettivo contro l'ossidazione delle componenti cellulari (Sharma et al., 2012).

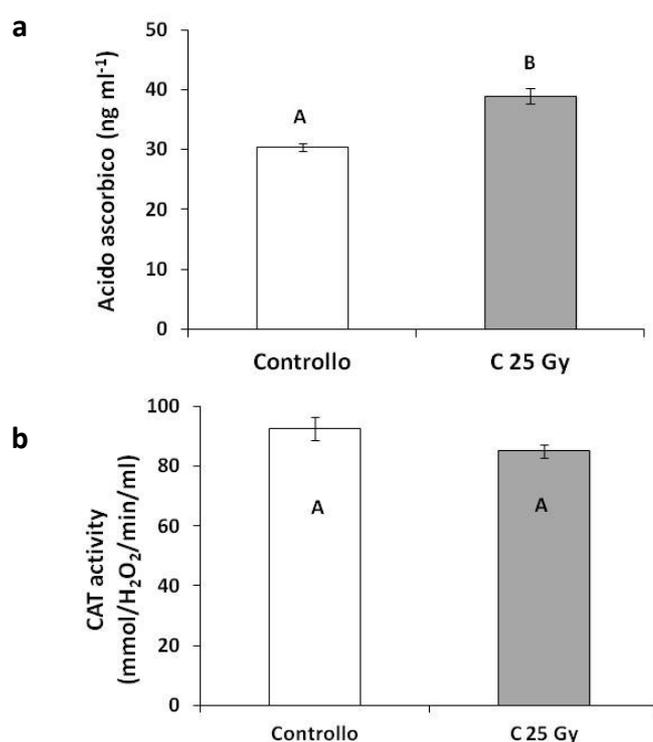


Figura 15: Contenuto di acido ascorbico (a) e attività dell'enzima catalasi (b) in frutti rossi di piante germinate da semi controllo ed irraggiati con ioni C alla dose di 25 Gy. Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

6.3.4 Efficienza fotosintetica in piante controllo ed irraggiate sottoposte a stress luminoso

Per ottenere indicazioni sulla funzionalità dell'apparato fotosintetico e sull'efficienza di conversione della luce ai centri di reazione, sono state eseguite curve veloci di risposta alla luce per i parametri fotochimici: resa quantica del trasporto elettronico lineare (ÖPSII), attività di trasporto elettronico (ETR),

quenching non-fotochimico (NPQ) e massima efficienza fotochimica del PSII (F_v/F_m) ed effettuato un confronto tra piante controllo ed irraggiate prima e dopo l'esposizione allo stress luminoso ($2500 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ per 50 minuti).

In Figura 16 sono mostrati gli andamenti di $\dot{O}PSII$, ETR, NPQ in piante germinate da semi controllo e irraggiate in funzione di valori crescenti. Dai grafici 16a, b, c si evince che in assenza di stress luminoso, non si evidenziano differenze nei parametri $\dot{O}PSII$, ETR tra piante controllo e trattate, mentre NPQ mostra valori più elevati, da 400 PFD in poi, per piante controllo. L'aumento dei valori di NPQ indica che l'apparato fotosintetico di tali piante ad elevate irradiazioni attiva meccanismi di dissipazione termica per smaltire l'eccesso di energia luminosa. I grafici 16d, e, f mostrano gli andamenti parametri degli indici fotochimici delle piante controllo ed irraggiate subito dopo lo stress luminoso. In questo caso i valori di $\dot{O}PSII$ ed ETR risultano più elevati alle alte irradiazioni nelle piante irraggiate, rispetto ai controlli, indicando una migliore capacità dell'apparato fotochimico di utilizzare l'energia luminosa. Per quanto riguarda NPQ, esso continua a mantenersi significativamente più elevato nei controlli.

In Figura 17 è riportato il rapporto F_v/F_m , misurato sulla stessa foglia al buio in assenza di stress luminoso, dopo 30 minuti dallo stress e dopo 24 ore dallo stress. I tempi di misura dilazionati hanno avuto lo scopo di verificare il recupero dell'efficienza fotochimica, indice di assenza di danni irreparabili al PSII, dopo le condizioni di elevate irradiazione. In assenza di stress sia le piante controllo che quelle irraggiate mostrano gli stessi valori di massima resa quantica del PSII, dopo appena 30' dallo stress luminoso si verifica un significativo decremento ($P < 0.01$) dei valori di F_v/F_m sia in piante controllo che irraggiate, che è risultato più marcato per le piante controllo. Dopo 24 ore dallo stress luminoso, vengono ripristinati i valori iniziali di F_v/F_m (valori in assenza di stress) per entrambi i tipi di piante. Il totale recupero della massima resa quantica del PSII dopo 24 ore dallo stress luminoso, indica che l'apparato fotosintetico è in grado di ripristinare la sua integrità riparando eventuali danni subiti. Tuttavia bisogna evidenziare che le piante irraggiate mantengono, subito dopo lo stress, valori più elevati di F_v/F_m ($P < 0.05$) rispetto ai controlli, suggerendo una minore suscettibilità alla fotoinibizione.

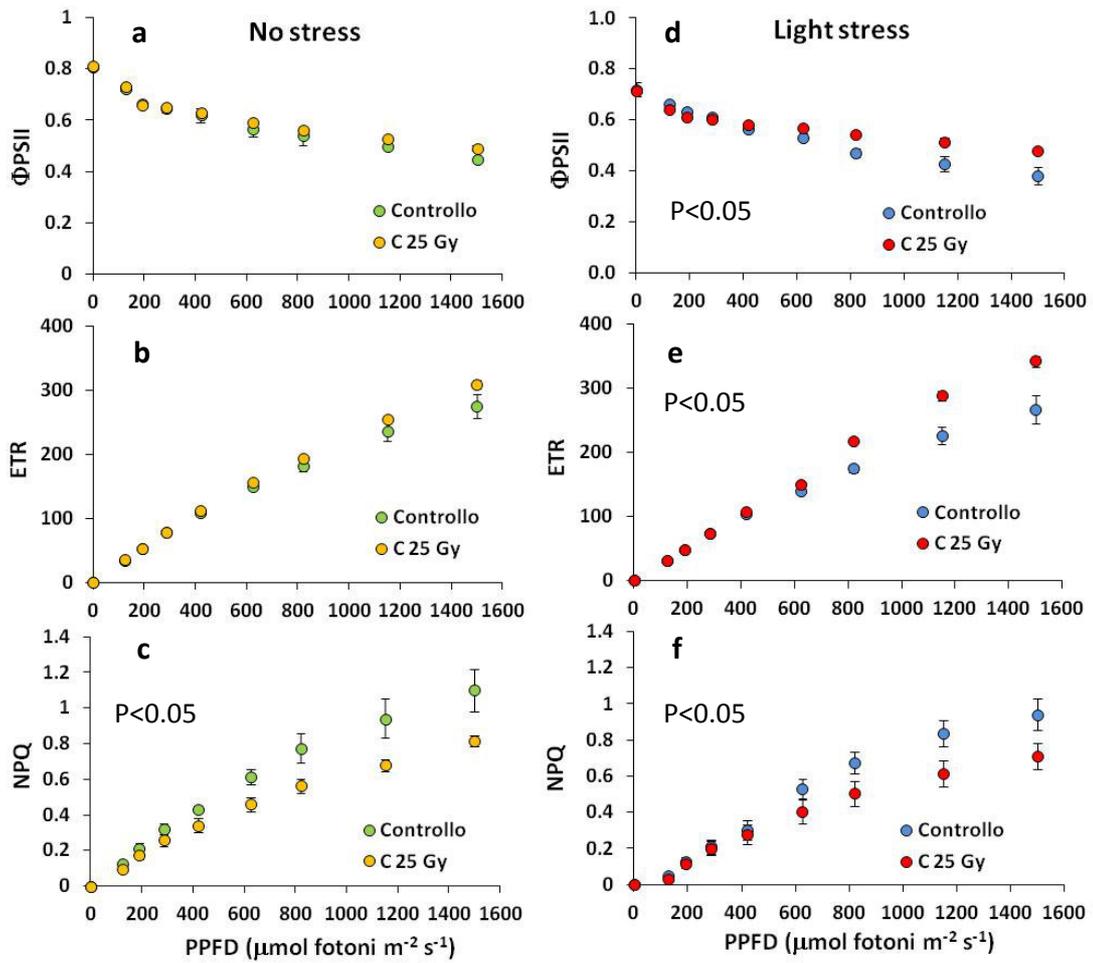


Figura 16: Curve veloci di risposta alla luce per gli indici fotochimici Φ_{PSII} , ETR, NPQ misurate in assenza di stress e dopo lo stress luminoso in piante di *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom' germinate da semi controllo ed irraggiati con ioni C alla dose di 25 Gy. Ciascun punto della curva rappresenta la media \pm es (n=5). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le piante. T-test $P < 0.05$.

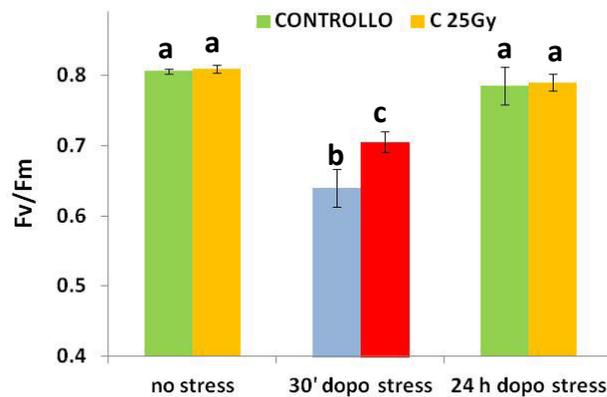


Figura 17: Massima resa quantica del PSII (F_v/F_m) misurata in piante di *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom' germinate da semi controllo e irraggiati, in assenza di stress luminoso (no stress), dopo 30' dallo stress e dopo 24 ore dallo stress. Ciascun punto della curva rappresenta la media \pm es (n=5). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le piante.

Per verificare tale ipotesi, sono stati valutati i livelli di espressione della proteina D1, sulle stesse foglie in tre momenti diversi: in assenza di stress luminoso, 30 minuti dopo lo stress e nelle successive 24 ore dallo stress, seguendo la stessa tempistica delle misure di F_v/F_m (Figura 18). I risultati mostrano livelli più bassi ($P < 0.05$) di proteina D1 nei 30 minuti dopo lo stress, sia nelle piante controllo che irraggiate, rispetto alle condizioni iniziali, in accordo con la riduzione di F_v/F_m .

Nelle piante controllo i livelli di espressione proteica non recuperano dopo 24 ore dallo stress (Figura 18a), mentre nelle piante irraggiate essi mostrano un recupero parziale (Figura 18b). Sia il mancato che il parziale recupero dei livelli di D1 indicano l'instaurarsi di fenomeni fotoinibitori. Dati in letteratura riportano che il grado di danno al PSII può dipendere da un rallentamento nel ciclo di riparazione della proteina D1 del centro di reazione del PSII (Giardi et al., 1997; Esposito et al., 2006). Si può ipotizzare l'insorgenza di uno stress ossidativo da elevate irradiazioni ai centri di reazione in entrambe le piante controllo ed irraggiate, tuttavia il parziale recupero della D1 in piante irraggiate, può indicare la maggiore resistenza di quest'ultime allo stress luminoso dovuto probabilmente ad un turnover più veloce della proteina D1.

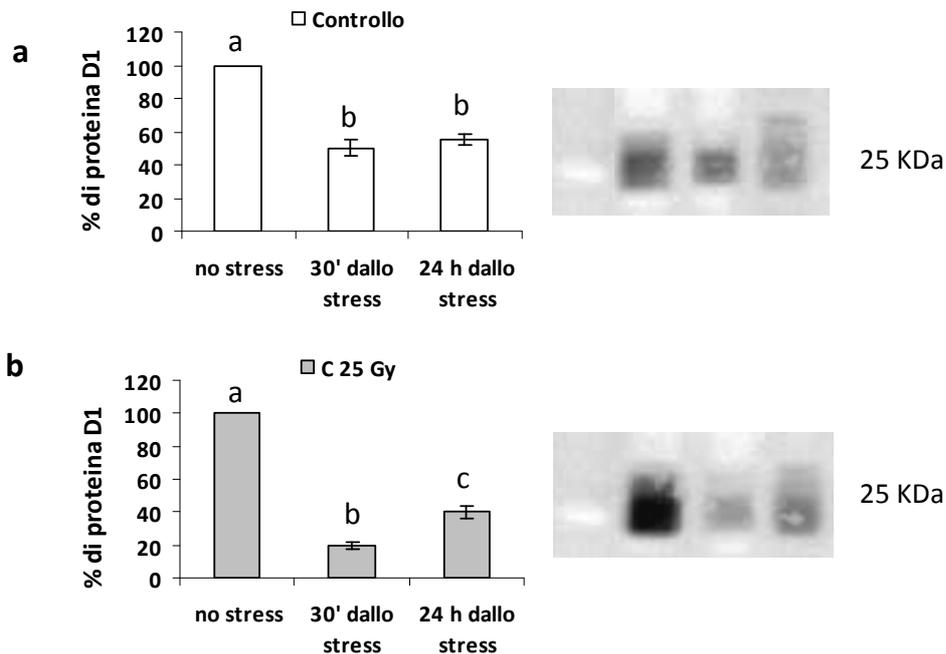


Figura 18: Analisi densitometrica ed espressione della proteina D1 in piante non irraggiate (a) e piante irraggiate (b). In figura sono mostrate le densitometrie ed i profili di espressione proteica in foglie in assenza di stress luminoso (no stress), dopo 30' dallo stress e dopo 24 ore dallo stress. Ciascun punto della curva rappresenta la media \pm es (n=3). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le piante.

6.4 Conclusioni

I risultati ottenuti in questo studio suggeriscono che la specie *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom', in fase di seme, è caratterizzata da un'elevata resistenza alle radiazioni ionizzanti ad alto LET, utilizzate nel presente esperimento. Infatti, l'irraggiamento con ioni carbonio alla dose di 25 Gy, ritarda ma non inibisce i processi di germinazione e crescita delle piante, che riescono a completare il ciclo vitale analogamente alle piante controllo sviluppate da semi non irraggiati.

Seppur non influenzando il ciclo vitale, la formazione di nuove foglie e la capacità riproduttiva, l'irraggiamento con ioni C 25 Gy ha indotto una significativa riduzione dell'altezza delle piante irraggiate rispetto alle piante controllo. Questo risultato è in accordo con dati in letteratura che indicano come effetto generale

dell'esposizione a radiazioni ionizzanti, l'induzione ad una crescita nana o semi-nana (Mei et al., 1994).

La crescita più compatta può essere considerata un fattore positivo per la coltivazione nei sistemi biorigenerativi per la limitata disponibilità di volume a disposizione per la crescita delle piante (De Micco et al., 2009; Monje et al., 2003; De Micco et al., 2006). L'irraggiamento dei semi di "Micro-Tom", quindi, potrebbe promuovere ulteriormente la crescita nana, che già caratterizza questa cultivar (De Micco et al., 2012).

Aspetto importante per questa specie si è rivelata essere anche la stabilità del processo fotosintetico. Infatti, sia in condizioni di irradianza di crescita, che in situazioni di stress luminoso, l'apparato fotosintetico *Solanum lycopersicum* L. manifesta una buona efficienza di cattura ed utilizzazione dell'energia luminosa assorbita, come dimostrano i dati relativi agli indici fotochimici misurati, in piante controllo ed irraggiate. La maggiore efficienza fotochimica, riscontrata in condizioni di stress luminoso per le piante irraggiate, potrebbe essere dovuta ad un più veloce turnover della proteina D1 del PSII, dal cui ciclo di riparazione dipende la stabilità e la funzionalità dello stesso PSII.

Infine, l'aumento della sintesi di acido ascorbico riscontrato nei frutti maturi delle piante irraggiate, costituisce ulteriore carattere di elezione per questa specie ad essere utilizzata come risorsa nei sistemi biologici rigenerativi per il supporto alla vita umana nello spazio, poiché tali composti potrebbero essere trasferiti agli astronauti con la dieta sostituendo integratori vitaminici (Barry e Halliwell, 1996).

CAPITOLO 7

Effetto della diversa qualità della luce sulla crescita, la fotosintesi ed il contenuto di antiossidanti in *Solanum lycopersicum* L. ‘Micro-Tom’

7.1 Premessa e disegno sperimentale

La qualità della luce gioca un ruolo di primaria importanza nell’aspetto e nella produttività di piante di interesse agronomico, come pure nel miglioramento della tolleranza delle piante agli stress ambientali. E’ noto che la componente rossa dello spettro luminoso è importante per lo sviluppo dell’apparato fotosintetico e può determinare un aumento dell’accumulo dei carboidrati di riserva (Saebo et al., 1995); la componente blu è essenziale per la crescita e lo sviluppo delle plantule perché è implicata in eventi di fotomorfogenesi (Briggs and Huala 1999, Christie and Briggs 2001), ed inoltre promuove le reazioni fotochimiche della fotosintesi risultando in una maggiore efficienza dell’attività di trasporto elettronico rispetto alla luce bianca e a luce monocromatica verde (Su et al., 2014). Evidenze sperimentali dimostrano che la componente blu aggiunta a quella rossa stimola in molte specie la produzione di biomassa promuovendo l’apertura stomatica (Sharkey and Raschke 1981, Goins et al. 1997, Zeiger and Zhu 1998), e la risposta antiossidante inducendo un aumento di polifenoli (Johkan et al., 2010), vitamina C (Li et al., 2012), carotenoidi e antociani (Li and Kubota 2009). Tuttavia, la risposta delle piante ai cambiamenti nella qualità spettrale della luce in termini di morfogenesi e prestazione fotosintetica risulta essere specie-specifica (Yorio et al. 2001).

Attualmente nell’ambito della biologia spaziale gli studi sulla qualità della luce ed i possibili benefici che le piante potrebbero ricavare dalle apposite “ricette luminose” è un campo di indagine molto esplorato al fine di ottenere e/o enfatizzare nelle piante alcune caratteristiche favorevoli (i.e. alta velocità di fotosintesi, aumento di rese colturali, miglioramento delle qualità nutrizionali) che conferirebbero vantaggi alla loro utilizzazione nei BLSS.

Recentemente grande importanza hanno assunto le ricerche mirate allo sviluppo di sistemi vegetali alimentari per lo Spazio basati su sistemi di illuminazione modulabile a LED (Campiotti et al., 2009). Il termine *LED* è l'acronimo di Light Emitting Diode ovvero un dispositivo detto diodo che, grazie alle proprietà di alcuni materiali semiconduttori, emette fotoni se attraversato da corrente diretta. I LED presentano numerosi vantaggi rispetto alle forme tradizionali d'illuminazione tra cui le piccole dimensioni, la lunga durata, la bassa dispersione termica, la sorgente quasi puntiforme e la possibilità di selezionare determinate lunghezze d'onda in grado di ottimizzare in modo specie-specifico le caratteristiche fisiologiche, biochimiche ed anatomiche delle piante (Yelton, 2014).

In questo contesto, l'obiettivo del presente esperimento è stato valutare l'influenza della diversa qualità della luce, ossia della modulazione di specifiche bande del visibile, ottenute selezionando luci LED ad opportune lunghezze d'onda, sulla crescita di *Solanum lycopersicum* L., c.v. Micro-Tom. In particolare è stata analizzata la possibilità che l'acclimatazione a lungo termine delle piante a luce di diversa qualità poteva determinare cambiamenti a livello fenologico e funzionale, nonché nella qualità delle bacche, in termini di antiossidanti nell'ottica di un possibile utilizzo di questa cultivar a bordo dei BLSSs.

Per perseguire tale obiettivo piante di Micro-Tom sono state coltivate in apposite camere di crescita, mantenendo la stessa intensità luminosa ma modulando lo spettro luminoso, scegliendo tre diversi trattamenti: Controllo WL (White Light), RGB (Red 33%, Green 33%, Blue 33%) e RB (Red 66%, Blue 33%). Per avere un quadro esaustivo degli effetti dei differenti trattamenti luminosi sono state effettuate misure di crescita, misure di attività fotosintetica con analisi in vivo ed analisi molecolari, ed analizzato il contenuto di antiossidanti nei frutti per valutare la possibilità che regimi di luce appropriati possano modificare la qualità nutrizionale della bacca. Un riscontro positivo in tal senso aumenterebbe i vantaggi nell'utilizzare Micro-tom a bordo delle piattaforme spaziali, come alimento funzionale per potenziare le normali difese fisiologiche degli astronauti.

7.2 Materiali e metodi

7.2.1 Coltivazione delle piante e condizioni di crescita.

Semi di *Solanum lycopersicum* L. “Micro-Tom”, sono stati fatti germinare in camere di crescita a differenti qualità spettrali di luce LED dove sono state cresciute anche le piante (Figura 1). La qualità della luce è stata modulata modificando la percentuale di radiazioni rosse, blu e verdi per ottenere tre differenti trattamenti luminosi: Controllo WL (white light), RGB (Red 33%, Green 33%, Blue 33%) e RB (Red 66%, Blue 33%).

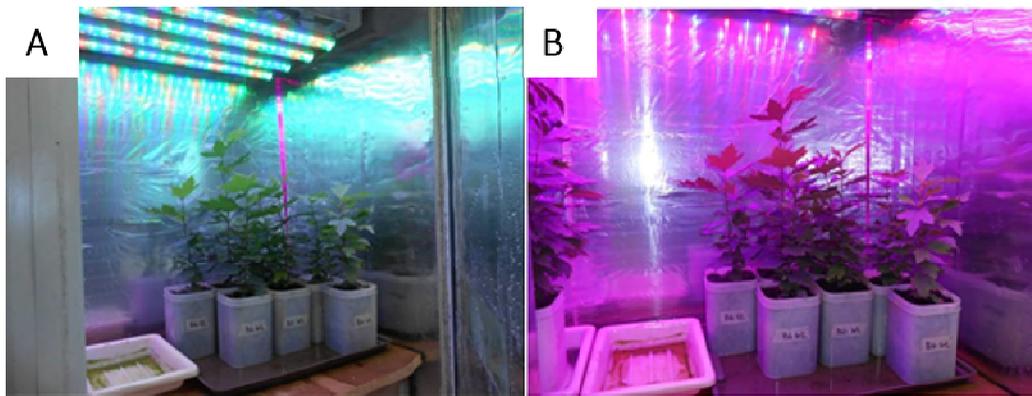


Figura 1: Colture in camere di crescita con luce LED. Sono visibili all'interno delle camere i trattamenti luminosi RGB (A) e RB (B).

Le percentuali di rosso, verde e blu sono state prodotte da LED a diverse lunghezze d'onda nel visibile: 600-640 nm (rosso), 495-570 nm (verde), 400 nm (blu), mentre la luce bianca è stata prodotta da tubi neon fluorescenti (Lumilux L360W/640 and L360W/830, Osram, Germany).

La crescita delle piante è avvenuta in condizioni idriche non limitanti, ed in presenza dei seguenti parametri ambientali: intensità luminosa di 300 PPFD (Photosynthetic Photon Flux Densities), temperatura dell'aria $27^{\circ}\text{C} \pm 1$, umidità relativa 80%, fotoperiodo 12 ore.

7.2.2 Monitoraggio della crescita

Per ogni trattamento, al termine del ciclo vitale è stata valutata la crescita delle piante. In particolare sono state misurate altezza, numero di foglie, numero di fiori, frutti e peso fresco delle piante per la determinazione della biomassa. Per i dettagli sui materiali e metodi si rimanda ai capitoli 4.2.4 e 6.2.3.

7.2.3 Determinazione delle caratteristiche fogliari funzionali

Le caratteristiche fogliari funzionali sono state determinate seguendo i metodi riportati da Cornelissen et al. (2003). Le misure sono state eseguite su foglie adulte, pienamente espanse in numero di 5 foglie per trattamento. In particolare sono stati misurati: il contenuto idrico relativo (RWC), l'area fogliare specifica (SLA) stimata come rapporto tra area e peso secco fogliare ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$); l'area fogliare (LA) misurata con uno scanner mediante il software Image J 1.45 (Image Analysis Software); e il contenuto di sostanza secca (LDMC) espresso come rapporto tra peso secco fogliare e peso a saturazione (g g^{-1}). Per la determinazione del peso secco le foglie sono state essiccate in stufa a 75°C fino a raggiungimento del peso costante. Per il peso a saturazione, le foglie appena recise sono state collocate con i piccioli in acqua distillata per 48 ore e tenute in una camera termostata a 15°C .

7.2.4 Scambi gassosi ed emissione della fluorescenza della clorofilla *a*

L'influenza dei trattamenti luminosi sulla *performance* fotosintetica delle piante è stata valutata alla fine del periodo sperimentale in termini di fotosintesi scambi gassosi ed efficienza dei fotosistemi.

Il tasso fotosintetico netto e la conduttanza stomatica sono stati misurati con sistema portatile (LCpro+, ADC BioScientific, UK). Le misure sono state effettuate in condizioni controllate nella cuvette di misura fogliare: intensità luminosa $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD, temperatura $25 \pm 2^\circ \text{C}$, umidità relativa 50-60% e concentrazione di CO_2 ambientale pari a 400 ppm.

Subito dopo le misure degli scambi gassosi, sono state eseguite, misure di fotochimica con un sistema di monitoraggio della fluorescenza (FMS, Hansatech Instruments, Re di Lynn, UK). Gli indici fotochimici monitorati sono stati: la massima efficienza fotochimica del PSII (F_v/F_m), la resa quantica del PSII (Φ_{PSII}) ed il quenching non-fotochimico (NPQ). La fluorescenza di base F_o è stata misurata su foglie adattate al buio per 20' da una debole luce di misura blu di circa $1-2 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La fluorescenza massima al buio, F_m , è stata indotta da un pulse di luce saturante di intensità pari a $6.000 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La massima resa quantica del fotosistema II, F_v/F_m , è stata calcolata come $(F_m - F_o)/F_m$. Per le misure di fluorescenza alla luce, la resa quantica del PSII, è stata determinata in accordo con Genty et al. (1989). Il quenching non-fotochimico (NPQ) è stato calcolato secondo Bilger e Björkman (1990) come: $\text{NPQ} = (F_m/F_m') - 1$.

7.2.5 Analisi western blotting della proteina D1 e Rubisco

Subito dopo le misure di scambi gassosi e fluorescenza della clorofilla a, le foglie sono state prelevate per l'identificazione e la quantificazione della proteina D1 e dell'enzima Rubisco mediante analisi western blotting. Per i materiali e metodi utilizzati si rimanda al capitolo 4.2.7.

7.2.6 Contenuto di antiossidanti nei frutti

Al termine del ciclo vitale, da ogni pianta sono stati prelevati i frutti per la determinazione degli antiossidanti. In particolare sono stati valutati il contenuto di acido ascorbico (AsA), e l'attività degli antiossidanti enzimatici catalasi (CAT) e superossido dismutasi (SOD). Per i dettagli sui materiali e metodi utilizzati per la determinazione di acido ascorbico e l'attività della catalasi si rimanda ai capitoli 4.2.8. e 6.2.7.

L'attività dell'enzima superossido dismutasi (SOD) è stata determinata con il SOD Assay Kit (Sigma-Aldrich) secondo le istruzioni fornite dalla casa produttrice. Il kit utilizza un metodo colorimetrico che si basa sulla reazione di riduzione dell' O_2^- con la trasformazione di blu di tetrazolio (NBT) incolore, in formazano, di colore blu.

SOD è in grado di inibire la formazione del formazano, per cui l'attività SOD viene determinata misurando la capacità dell'estratto enzimatico di inibire la riduzione di NBT a blu formazano. Il colore blu sviluppato nella reazione è misurato per via spettrofotometrica a 440 nm. Il volume del campione che causa il 50% di inibizione nella comparsa del colore è considerato come un'unità di attività SOD.

7.2.7 Analisi statistica

Per l'analisi statistica dei dati sperimentali si rimanda al capitolo 3.2.7.

7.3 Risultati e discussione

7.3.1 Crescita delle piante in funzione della qualità della luce

L'analisi dei parametri allometrici ha mostrato che la crescita delle piante ai differenti regimi luminosi WL, RGB e RB ha determinato significative variazioni nello sviluppo delle piante di *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom'.

Rispetto crescita alla condizione WL, i trattamenti RGB e RB inducono una riduzione dell'altezza della pianta (Figura 2a), ed un aumento del numero di foglie (Figura 2b), e fiori (Figura 2c). Tuttavia l'aumento del numero di fiori nelle piante sottoposte ai trattamenti RGB e RB non trova riscontro nel numero dei frutti prodotti alla fine del ciclo vegetativo. Infatti, le piante controllo WL hanno mostrato una maggiore produzione di frutti rispetto a quelle cresciute con regimi di luce RGB e RB (Figura 2d).

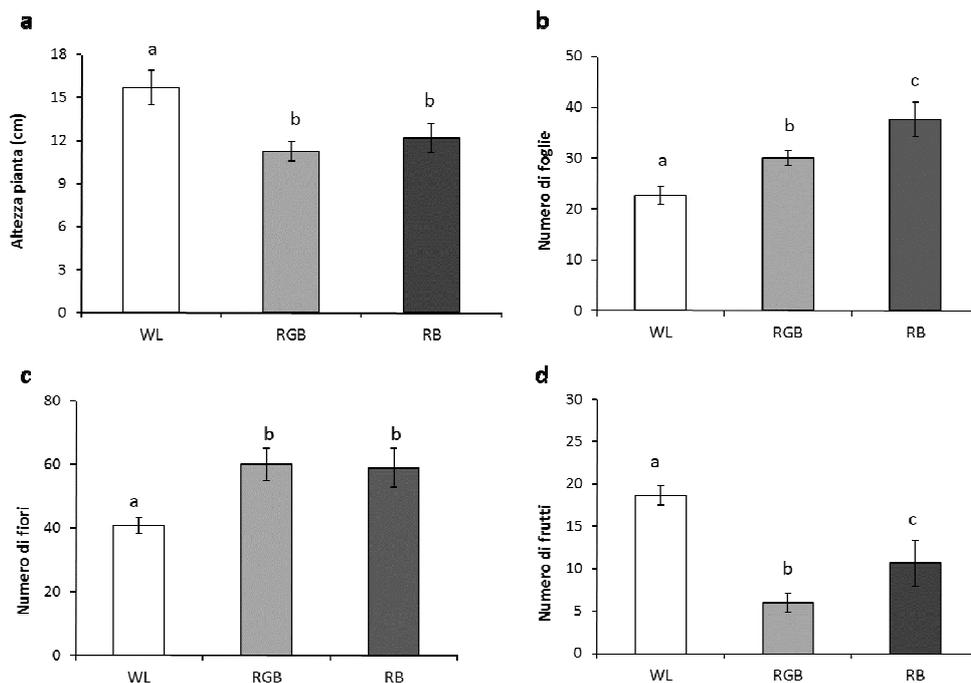


Figura 2: Altezza delle piante (a), numero di foglie (b), numero di fiori (c) e numero di frutti (d) in piante di *S. lycopersicum* L. 'Micro-Tom' cresciute ai regimi luminosi WL (controllo), RGB (red-green-blue) e RB (red-blue). Ciascun istogramma rappresenta la media \pm es (n = 5). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

L'analisi distruttiva, condotta al termine del ciclo vitale, ha fatto registrare un diverso accumulo di biomassa fresca in funzione dei trattamenti luminosi in cui sono state cresciute le piante. In particolare, le piante cresciute con luce RGB hanno mostrato un minor accumulo di biomassa nei frutti e nei fusti rispetto alle piante controllo WL, mentre nelle piante RB è stato evidenziato un basso valore della biomassa dei fusti, ma non dei frutti il cui peso è risultato comparabile a quello delle piante controllo WL. Invece, per quanto riguarda il peso fogliare totale, non sono emerse differenze tra i diversi regimi luminosi testati (Figura 3).

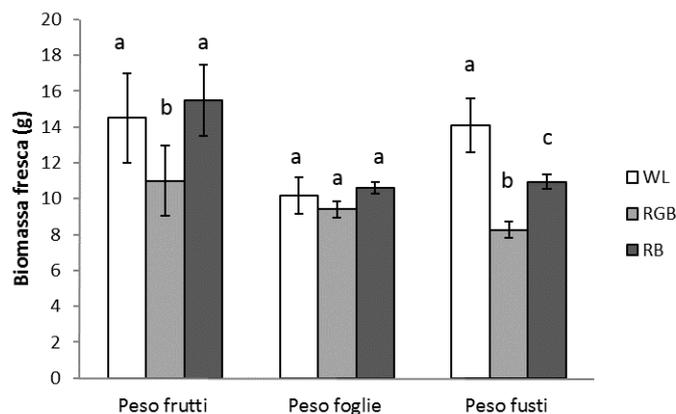


Figura 3: Peso fresco di frutti, foglie e fusti misurato al termine del ciclo vitale in piante di *Solanum lycopersicum* L. ‘Micro-Tom’ cresciute ai regimi luminosi WL (controllo), RGB (red-green-blue) e RB (red-blue). Ciascun istogramma rappresenta la media \pm es (n = 5). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

Per quanto concerne le caratteristiche fogliari funzionali, le foglie di piante controllo WL e le foglie di piante esposte al trattamento RB hanno presentato un’area fogliare (LA) significativamente maggiore rispetto ai valori riscontrati nelle foglie RGB (Figura 4a), mentre l’area fogliare specifica (SLA) è risultata significativamente minore nei controlli WL rispetto alle piante RGB e RB, per le quali sono stati riscontrati valori confrontabili (Figura 4b). Al contrario, il contenuto idrico (RWC), non ha mostrato differenze significative per nessuno dei trattamenti luminosi (Figura 4c). Infine, le differenze statisticamente significative a carico del parametro LDMC hanno indicato che l’esposizione alla luce di diversa qualità produce variazioni nella quantità di materia secca fogliare prodotta dalla pianta, con valori più elevati nelle foglie controllo WL rispetto a RGB e RB (Figura 4d).

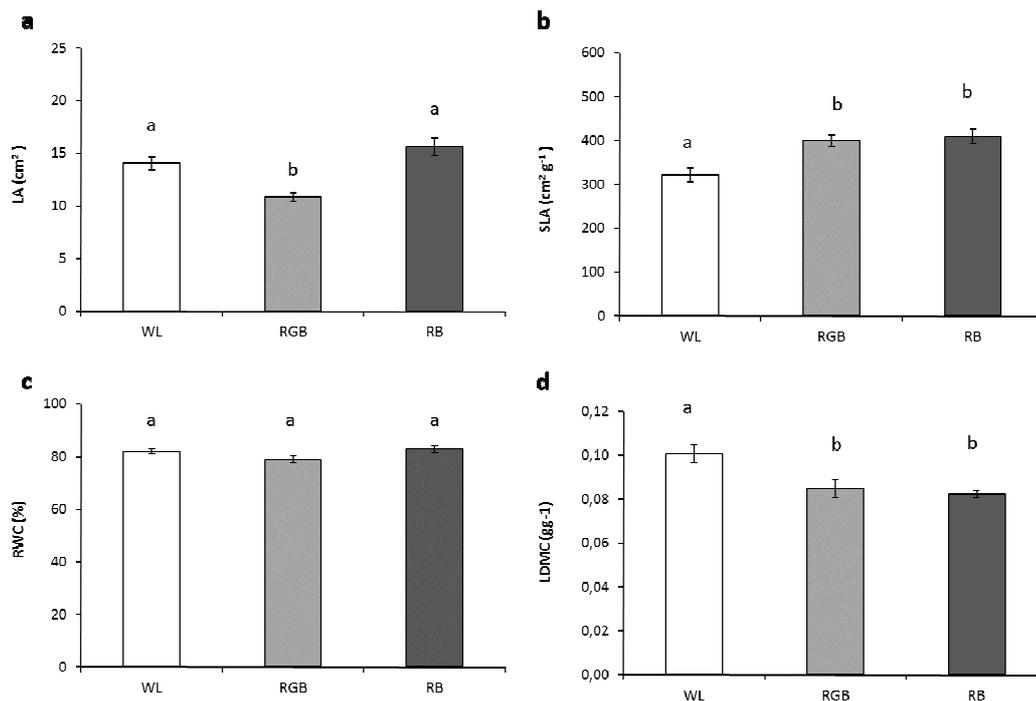


Figura 4: Area fogliare, LA (a), area fogliare specifica, SLA (b), contenuto idrico relativo, RWC (c) e contenuto fogliare di sostanza secca, LDMC (d) in piante di *S. lycopersicum* L. 'Micro-Tom' cresciute ai trattamenti luminosi WL (controllo), RGB (red-green-blue) e RB (red-blue). Ciascun istogramma rappresenta la media \pm es (n = 5). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

7.3.2 Effetti della qualità della luce sulla fotosintesi

Dall'analisi degli indici fotochimici (Figura 5) si evince che la crescita delle piante a diversa qualità di luce influenza notevolmente l'efficienza del fotosistema II; in particolare le piante RB, rispetto a quelle WL e RGB mostrano una significativa riduzione della resa quantica del PSII (Φ PSII e Fv/Fm) e una ridotta attività di trasporto elettronico (ETR). Al contrario nessuna differenza si riscontra nel comportamento fotochimico tra le piante cresciute ai trattamenti WL e RGB.

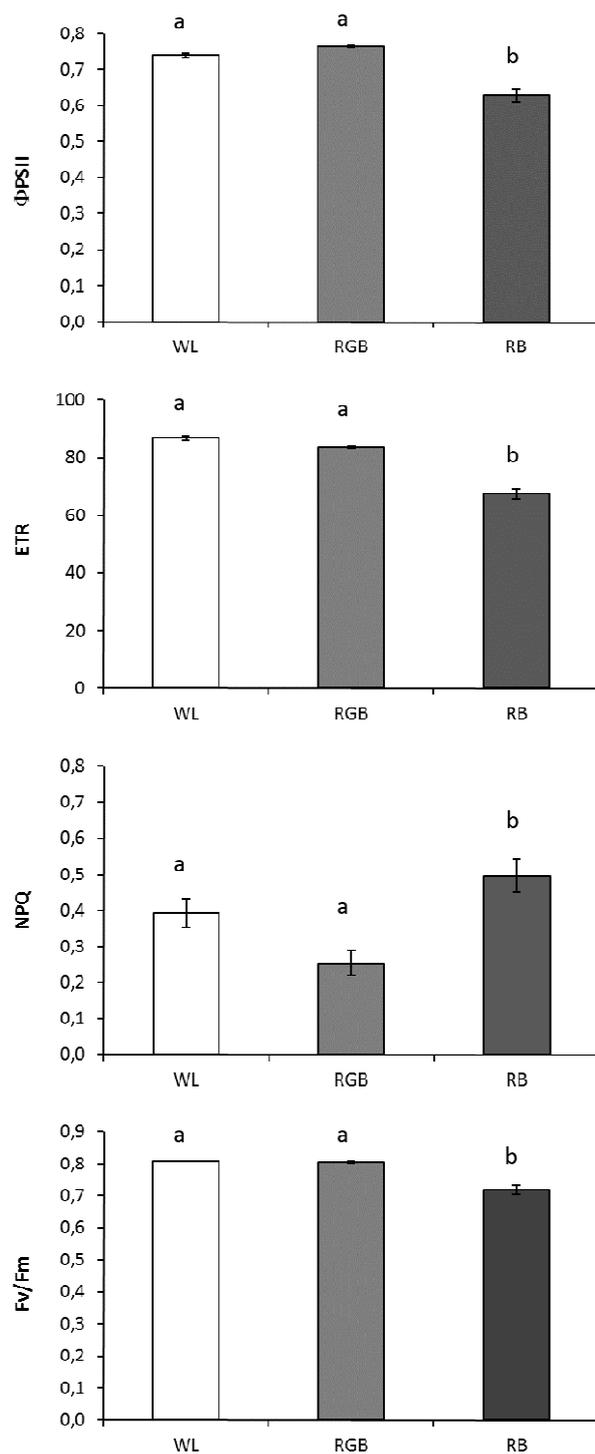


Figura 5: Resa quantica del trasporto elettronico del PSII (Φ_{PSII}), attività di trasporto elettronico (ETR), quenching-non fotochimico (NPQ) e massima resa quantica del PSII (Fv/Fm) in piante di *S. lycopersicum* L. 'Micro-Tom' cresciute ai trattamenti luminosi WL (controllo), RGB (red-green-blue) e RB (red-blue). Ciascun punto rappresenta la media \pm es (n=5). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

Questi risultati indicano che nelle piante cresciute ai regimi luminosi WL e RGB gran parte della luce assorbita è stata utilizzata nelle reazioni fotochimiche, mentre nelle piante RB la maggior parte dell'energia assorbita è stata dissipata mediante processi non-fotochimici in accordo con valori di NPQ più elevati riscontrati in queste piante, suggerendo che la componente verde è importante nelle reazioni luminose della fotosintesi.

Le misure di scambi gassosi hanno evidenziato una significativa riduzione dei valori di fotosintesi netta e conduttanza stomatica (g_s) nelle piante RB rispetto a quelle RGB che hanno fatto registrare valori simili al controllo WL (Figura 6).

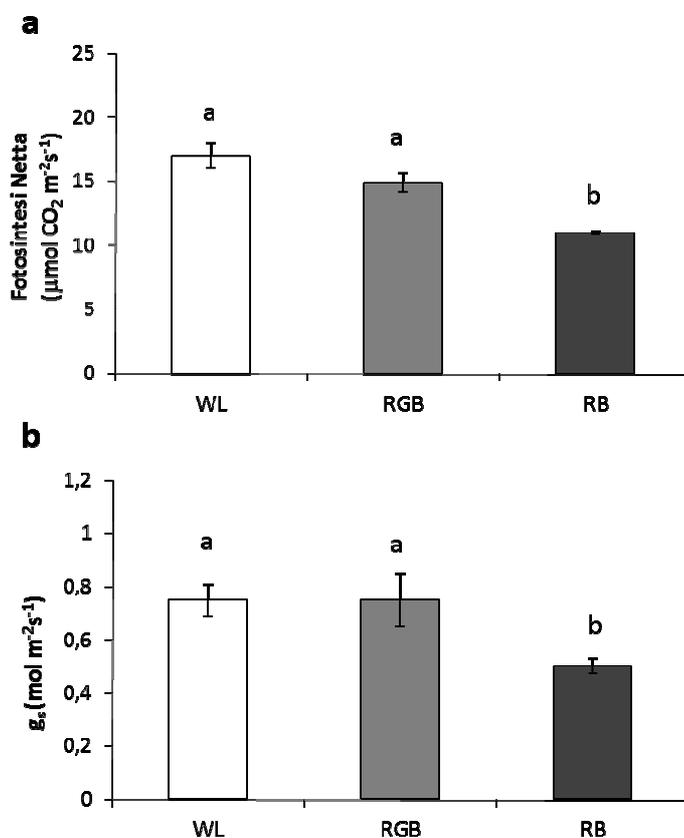


Figura 6: Fotosintesi netta (a) e conduttanza stomatica (b) in foglie di piante di *S. Lycopersicum* ‘Micro-Tom’ cresciute ai trattamenti luminosi: WL (controllo), RGB (red-green-blue) e RB (red-blue). Ciascun istogramma rappresenta la media \pm es (n=4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

Questi dati sono consistenti con i rilievi fotochimici. In questo contesto, i valori significativamente più bassi del rapporto F_v/F_m , accompagnati dalla diminuzione di g_s , indicano che la ridotta attività del PSII riscontrata nelle piante RB non è la sola

causa della limitazione della fotosintesi ma che in essa sono coinvolti anche meccanismi di tipo stomatico.

Nel complesso, le misure di fluorescenza della clorofilla *a* in simultanea a quelle di scambi gassosi che indicano che l'apparato fotosintetico delle piante WL e RGB utilizza la luce nella fotosintesi in maniera più efficiente rispetto alle piante RB. Ricerche condotte da numerosi autori hanno dimostrato che la componente blu dello spettro luminoso in aggiunta a quella rossa influenza positivamente la capacità fotosintetica delle piante (Leong and Anderson 1984, Eskins et al. 1991, Matsuda et al. 2004, Su et al., 2014 Sharkey and Raschke 1981, Goins et al. 1997, Zeiger and Zhu 1998), contrariamente a quanto riportato per la luce verde (Sowbiya et al., 2014). I risultati ottenuti nella cultivar Micro-Tom, invece mostrano un miglioramento della performance fotosintetica quando alla componente rossa e blu viene aggiunta quella verde fornendo evidenze del ruolo importante della componente verde e confermando che la risposta delle piante alla qualità di luce è specie-specifica.

La funzionalità dell'apparato fotosintetico è stata anche analizzata per quanto concerne l'espressione di due delle principali proteine coinvolte nel processo fotosintetico: la proteina D1 del centro di reazione del PSII (Figura 7) e l'enzima Rubisco (Figura 8).

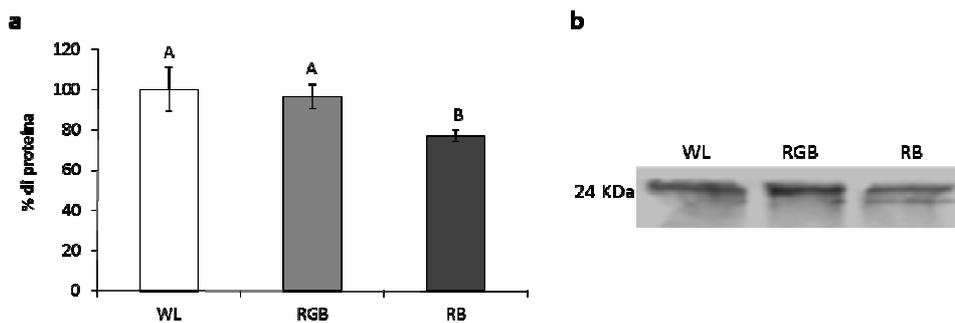


Figura 7: analisi densitometrica (a) dei profili Western blot (b) della proteina D1 in foglie di piante di *S. Lycopersicum* 'Micro-Tom' cresciute ai trattamenti luminosi: WL (controllo), RGB (red-green-blue) e RB (red-blue). Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 3). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

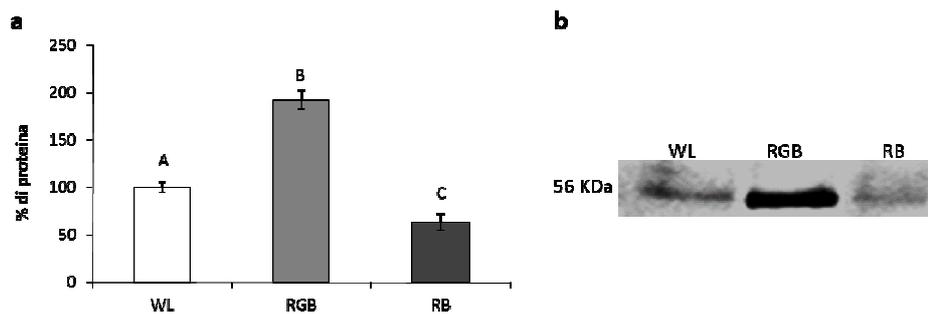


Figura 8: analisi densitometrica (a) dei profili Western blot (b) dell'enzima Rubisco in foglie di piante di *S. Lycopersicum* 'Micro-Tom' cresciute ai trattamenti luminosi: WL (controllo), RGB (red-green-blue) e RB (red-blue). Ciascun valore rappresenta la media \pm es (n = 3). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

I dati evidenziano che il trattamento luminoso RB ha influito negativamente sulla sintesi della proteina D1 e dell'enzima Rubisco. L'analisi western blot ha rivelato, infatti, una notevole riduzione dei livelli proteici in queste foglie rispetto ai valori riscontrati nelle foglie appartenenti a piante RGB e WL. E' interessante notare che nelle piante RGB i livelli proteici di Rubisco sono risultati i più elevati in assoluto, mostrando una sovra espressione della proteina rispetto alle foglie WL e RB. Questo sottolinea ancora una volta l'importanza della componente verde nel processo fotosintetico.

7.3.3 Contenuto di antiossidanti nei frutti

Al fine di comprendere il meccanismo di interazione tra la qualità della luce e la risposta antiossidante, è stata valutata l'attività degli antiossidanti enzimatici superossido dismutasi (SOD) e catalasi (CAT), e la concentrazione di acido ascorbico (AsA) nei frutti delle piante cresciute ai tre diversi regimi luminosi WL, RGB e RB.

I frutti appartenenti a piante RB mostrano, rispetto a quelli relativi alle piante WL e RGB, un aumento significativo dell'attività degli enzimi SOD (Figura 9a) e CAT (Figura 9b), ed una diminuzione altrettanto significativa del contenuto di acido ascorbico (Figura 9c).

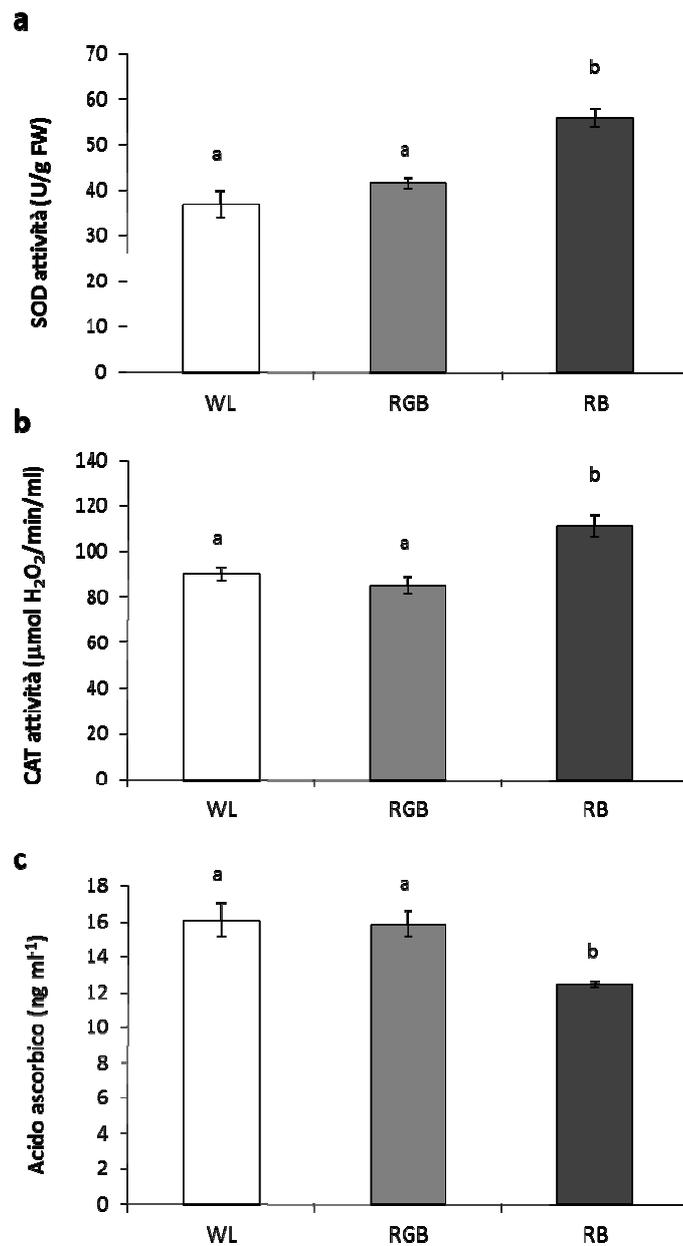


Figura 9: Attività dell'enzima SOD (a), CAT (b), e contenuto di AsA (c) in frutti di piante di *S. Lycopersicum* 'Micro-Tom' cresciute a tre diversi trattamenti luminosi: WL (controllo), RGB (red-green-blue) e RB (red-blue). Ciascun istogramma rappresenta la media \pm es (n=4). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

I dati indicano che il trattamento luminoso RB induce frutti nelle bacche di Micro-Tom l'attivazione di un meccanismo antiossidante che coinvolge l'azione concertata degli enzimi SOD, CAT e dell'acido ascorbico. L'aumento dell'attività dell'enzima SOD, il cui ruolo è quello di fornire una protezione immediata dagli

effetti dello stress ossidativo, è necessario per catalizzare la reazione di dismutazione dello ione superossido (O_2^-) a perossido (H_2O_2); in tal modo si determina da un lato l'attivazione della catalasi e dall'altro una diminuzione dei livelli di acido ascorbico, entrambi necessari per la conversione di H_2O_2 in acqua e ossigeno molecolare (O_2).

7.4 Conclusioni

Questo esperimento conferma la modulazione della qualità di luce come un mezzo potenziale per indurre nelle piante specifiche caratteristiche per concerne ciò che riguarda il processo fotosintetico, la crescita e la modulazione del corredo antiossidante.

In risposta alla diversa qualità della luce, le piante possono, infatti, modificare una serie di caratteristiche morfologiche, anatomiche e biochimiche volte ad ottimizzare l'utilizzazione della luce disponibile, limitando i processi non assimilativi dell'energia luminosa. Sebbene dati in letteratura dimostrano che le lunghezze d'onda nel rosso e nel blu dello spettro visibile sono quelle più importanti nel regolare le reazioni fotochimiche della fotosintesi e gli scambi gassosi, le evidenze sperimentali fornite da questo studio dimostrano che la componente verde ha un ruolo importante nel modulare non solo la crescita, inducendo dimensioni più ridotte ed un'architettura più compatta nella pianta, ma anche l'efficienza di conversione della luce ai centri di reazione e lo scambio gassoso.

Tuttavia non è possibile generalizzare poiché le risposte fisiologiche ai cambiamenti spettrali variano in funzione della specie e dipendono anche dall'intensità luminosa alla quale le foglie sono esposte. In questo esperimento sono stati studiati gli effetti che comporta la crescita della specie *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom' a tre differenti trattamenti luminosi, opportunamente selezionati, con l'intento di scegliere il regime luminoso più adatto da poter utilizzare nei moduli-serra dei BLSSs, per migliorare alcune caratteristiche favorevoli per la coltivazione di Micro-Tom nello Spazio. In particolare i risultati ottenuti dalle analisi dei parametri allometrici evidenziano che i trattamenti RGB e RB influiscono sull'allungamento del fusto delle plantule, limitandone l'estensione, nonché sul

numero di foglie e fiori, determinando un aumento di questi organi a cui però non corrisponde una maggiore produzione di frutti.

Per quanto concerne le caratteristiche fogliari funzionali, l'esposizione ai regimi luminosi RGB e RB determina, un aumento dell'area fogliare specifica (SLA) e una diminuzione del contenuto di materia secca (LDMC), indice di una ridotta densità del tessuto fogliare. Al contrario, nessuna differenza è stata riscontrata per il parametro RWC, indicando che i cambiamenti della qualità spettrale della luce non hanno rappresentato un fattore limitante nei confronti della regolazione del bilancio idrico.

Variazioni sono state riscontrate anche in relazione alle reazioni fotochimiche, e agli scambi gassosi con una minore efficienza fotosintetica delle piante cresciute con luce RB. Tali piante hanno mostrato, infatti, rispetto alle piante controllo WL e RGB, una diminuzione dei valori di resa quantica del PSII (Φ_{PSII} e F_v/F_m), una ridotta attività del trasporto elettronico (ETR), nonché una diminuzione dei valori di fotosintesi netta e conduttanza stomatica (g_s). La minor attività fotosintetica riscontrata sembrerebbe essere legata, a livello molecolare ad una ridotta quantità sia della proteina D1 del PSII sia dell'enzima Rubisco. E' noto, infatti, che l'attività fotosintetica può essere regolata da meccanismi multipli, in risposta a variazioni dell'intensità e della qualità della luce.

Studi effettuati da Loreto e collaboratori (2009) relativi agli effetti della luce blu sulla fotosintesi, e sulla conduttanza del mesofillo hanno dimostrato che l'efficienza del processo fotosintetico tende a diminuire in seguito all'aumento della frazione nel blu della luce incidente. Inoltre la fotosintesi sarebbe limitata anche dall'efficienza fotochimica, che a sua volta potrebbe influenzare la conduttanza del mesofillo. Tuttavia nonostante i numerosi lavori disponibili in letteratura, vi è la necessità di molti ulteriori studi poiché la risposta delle piante alla diversa qualità della luce risulta essere specie-specifica.

Anche i risultati ottenuti nei frutti dall'analisi degli enzimi SOD, CAT e dell'acido ascorbico mostrano che la risposta antiossidante è caratterizzata da una diversa sensibilità ai cambiamenti della qualità della luce, evidenziando che la crescita delle piante WL e RGB stimola nei frutti una maggiore sintesi di acido ascorbico.

In conclusione i risultati ottenuti suggeriscono che il trattamento luminoso RGB potrebbe essere utilizzato nei moduli-serra dei BLSSs per la crescita della specie *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom', in quanto promuove nella pianta un'architettura più compatta che si manifesta con una densa riduzione della taglia rispetto agli altri due regimi luminosi. Ciò può rivelarsi utile per permettere l'ottimizzazione dei volumi limitati adibiti alla coltivazione delle piattaforme spaziali; stimola positivamente l'attività fotosintetica necessaria per la rigenerazione dell'aria, e determina una migliore qualità nutrizionale dei frutti con un aumento del contenuto di vitamina C, che potrebbe ridurre i rischi dei danni ossidativi causati dall'incremento di ROS indotto dalle radiazioni (Arora et al., 2005; Maurya et al., 2006) specialmente in missioni di lunga durata, che espongono il corpo umano a rischio di cancro per fenomeni di ossidazione e degenerazione cellulare (Durante e Cucinotta, 2008).

Tutte queste caratteristiche risultano quindi positive per la coltivazione di Micro-Tom nei sistemi biorigenerativi di supporto alla vita umana nello Spazio.

CAPITOLO 8

CONCLUSIONI GENERALI

Questo progetto di dottorato si inserisce nel quadro di ricerche finalizzate ad indagare l'effetto delle radiazioni ionizzanti sulle piante superiori al livello strutturale e funzionale. Comprendere la risposta delle piante ai diversi livelli e qualità di radiazione ionizzante resta una delle principali sfide della biologia vegetale spaziale. Generalmente gli studi sulle radiazioni ionizzanti hanno diverse finalità tra cui: capire i meccanismi alla base della radioresistenza; massimizzare la crescita per la realizzazione di sistemi biorigenerativi di supporto alla vita (BLSS) nello Spazio; 3) produrre cibo fresco a bordo delle piattaforme spaziali per integrare la dieta degli astronauti. L'acquisizione di questo tipo di conoscenze ha anche ampie ricadute per la ricerca radioecologica terrestre, aiutando a prevedere le conseguenze di rischi di contaminazione nucleare (es. incidente di Chernobyl in Ucraina e Fukushima in Giappone) sugli organismi vegetali, al fine di programmare azioni di salvaguardia del territorio.

Il lavoro presentato ha come obiettivo lo studio degli effetti delle radiazioni ionizzanti a basso ed alto LET (Linear Energy Transfer) su specie vegetali di interesse agronomico con lo scopo di testarne l'idoneità per la coltivazione nei sistemi biologici rigenerativi BLSSs (Bioregenerative Life Support Systems) per il supporto alla vita umana nelle missioni spaziali di lunga durata.

Le specie vegetali, richieste per la realizzazione di serre spaziali devono possedere caratteristiche tali da assicurare una continua produzione di cibo, rispettando sia le esigenze nutrizionali degli astronauti e sia i vincoli tecnici che si riscontrano in un "modulo-serra" di un BLSS.

Per quanto riguarda le limitazioni tecniche, essendo queste strettamente legate al ridotto volume dei veicoli e delle piattaforme spaziali, vengono preferite colture caratterizzate da taglia compatta con una esigua esigenza di spazio e ciclo culturale breve. Inoltre la scelta delle specie tiene conto dell'alta velocità di fotosintesi, produttività elevata, (anche intesa come rapporto biomassa edibile/residui non edibili) ed alto contenuto nutrizionale delle parti edibili. Il contenuto dei nutrienti dei

diversi prodotti vegetali deve soddisfare i fabbisogni alimentari dell'equipaggio, fornendo alimenti con elevato contenuto energetico e/o proteico e/o di antiossidanti che aiutino ad avere una dieta equilibrata. Cibi ricchi di composti antiossidanti, potrebbero favorire l'induzione naturale nell'organismo dei meccanismi di difesa necessari per contrastare lo stress ossidativo causato dall'esposizione prolungata del corpo umano alle radiazioni cosmiche presenti nello Spazio (Mortazavi et al., 2015). Oltre a tali caratteristiche la specie deve essere radioresistente, ovvero deve essere in grado di attivare meccanismi di protezione e riparazione cellulare tali da mitigare o annullare gli effetti dannosi dovuti all'azione delle radiazioni ionizzanti.

Nonostante le piante presentino una radioresistenza intrinseca dovuta alla caratteristica composizione delle cellule vegetali, i dati in letteratura riguardanti gli effetti delle radiazioni ionizzanti sugli organismi vegetali sono contrastanti poiché dipendono da una molteplicità di fattori tra cui: dose, tipo di radiazione (alto o basso LET- Linear Energy Transfer) specie, cultivar, organizzazione genomica, stadio del ciclo vitale e grado di sviluppo dell'organo e tessuto (Arena et al. 2014a).

Esperimenti in volo, quindi durante le missioni spaziali, ed esperimenti a terra che simulano le condizioni di volo, vengono effettuati al fine di comprendere la risposta delle diverse specie vegetali agli elevati livelli di radiazioni ionizzanti che caratterizzano l'ambiente spaziale.

Tuttavia la realizzazione di esperimenti direttamente a bordo delle navicelle spaziali presenta delle problematiche sia di carattere economico, legate agli elevati costi, sia di interpretazione scientifica in quanto risulta difficile la correlazione tra l'effetto e la causa, ovvero stabilire con certezza che un effetto sia attribuibile all'azione delle radiazioni ionizzanti e non ad altri fattori ambientali che caratterizzano lo spazio come ad esempio la condizione di ridotta microgravità.

Nello Spazio, la maggior parte della dose di radiazioni assorbita dagli organismi è rappresentata da protoni a bassa energia (circa 87%), la cui efficacia è analoga a quella dei fotoni, per cui studi iniziali con esperimenti a terra possono riprodurre in parte le radiazioni spaziali, con radiazioni ionizzanti a basso LET come raggi X o raggi gamma, che rappresentano la radiazione di riferimento per ottenere dati necessari per un futuro confronto utilizzando radiazioni ionizzanti ad alto LET, come ioni pesanti (Durante and Cucinotta, 2008; De Micco et al., 2014b).

In questa tesi, attraverso la realizzazione di esperimenti a terra ‘*ground-based*’ si è cercato di dare un contributo alle attuali conoscenze sugli effetti che hanno le radiazioni ionizzanti ad alto e basso LET sulla fisiologia e lo sviluppo di specie di interesse agronomico, utilizzando un approccio integrato che comprende analisi morfologiche, eco fisiologiche, biochimiche e molecolari.

I risultati ottenuti nel primo caso studio hanno concentrato l’attenzione su una varietà nana delle specie *Phaseolus vulgaris* L. L’esperimento ha confermato che gli effetti dei raggi X su questa specie, oltre a dipendere dalla dose, sono anche legati all’età della foglia che riceve la radiazione. E’ stato infatti appurato che, l’esposizione di foglie giovani e mature a massicce dosi di raggi X (50 e 100 Gy), comporta nelle prime una maggiore vulnerabilità dell’apparato fotosintetico al danno che si manifesta con una riduzione del contenuto di pigmenti fotosintetici ed una diminuzione di attività dell’enzima Rubisco. E’ stato osservato che la maggiore radioresistenza delle foglie adulte rispetto a quelle giovani, alle alte dosi di raggi X, è dovuta ad una diversa modulazione del sistema di difesa antiossidante. In risposta a dosi elevate di raggi X, al fine di contrastare lo stress ossidativo, in entrambi i tipi di foglie, si verifica una diminuzione della concentrazione di antiossidanti e un aumento dell’attività dell’enzima PARP (Poli ADP-ribosio polimerasi), coinvolto nel processo di riparazione del DNA. Tuttavia, mentre nelle foglie adulte, dopo 10 giorni dall’irraggiamento, i valori ritornano prossimi a quelli misurati nel controllo assicurando la sopravvivenza dei tessuti, nelle foglie giovani la crescita si arresta del tutto, indicando che le difese antiossidanti messe in atto risultano insufficienti per neutralizzare l’eccesso di ROS (Reactive Oxygen Species). E’ noto infatti, che l’esposizione di un sistema biologico alle radiazioni ionizzanti provoca un aumento dei radicali liberi, che possono essere responsabili di varie forme di danno cellulare, qualora i sistemi di difesa antiossidanti non risultino efficaci nel mantenere il giusto equilibrio dei ROS (Esnault, et al., 2010).

Nel secondo esperimento, sono state valutate le conseguenze dell’irraggiamento con ioni pesanti su due generazioni consecutive di piante germinate da semi irraggiati, utilizzando come specie modello il fagiolino nano dall’occhio *Dolichos melanophthalmus* DC. I risultati hanno indicato che, nonostante siano state riscontrate alterazioni nella crescita delle piante di prima e seconda

generazione, il ciclo vitale da seme a seme viene comunque portato a termine nelle due generazioni consecutive. Gli effetti diretti della radiazione sulla prima generazione di piante, hanno causato una riduzione della crescita e della fotosintesi solo alla dose di C 10 Gy, effetti che si sono manifestati anche nella seconda generazione, senza danni fenotipici apparenti al livello di pianta. La comparsa delle stesse alterazioni dei parametri di crescita, sia nella prima che nella seconda generazione, ha indicato che la dose C 10 Gy è responsabile di danni diretti alle strutture cellulari, oltre che di mutazioni non letali al DNA. A livello funzionale, la dose C 10 Gy, ha determinato una diminuzione dell'efficienza fotosintetica legata ad una riduzione dei pigmenti fotosintetici e ad un abbassamento dei livelli delle proteine D1 e Rubisco. L'ipotesi dell'insorgenza di stress ossidativo alla dose C 10 Gy, trova conferma nelle più elevate concentrazioni di H₂O₂ riscontrate al livello cellulare. Condizione alla quale le piante rispondono con un aumento di acido ascorbico (AsA) ed una maggiore attivazione dell'enzima PARP grazie ai quali viene assicurata la sopravvivenza cellulare.

Nel terzo, quarto e quinto esperimento l'attenzione è stata focalizzata sulla specie *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom' per testare la sua idoneità ad essere coltivata nei BLSSs. Ciascun esperimento ha messo in luce aspetti diversi e parimenti importanti del comportamento di questa cultivar nei riguardi della radiazione ionizzante (ad alto e basso LET) e della crescita a diversa qualità di luce.

In particolare i risultati del terzo esperimento, nel quale piante di Micro-Tom sono state irraggiate con differenti dosi di raggi X (0, 0.3, 10, 20, 50 e 100 Gy) in diversi stadi fenologici, hanno indicato che gli effetti della radiazione dipendono fortemente dalla fase di sviluppo in cui si trova la pianta al momento dell'irraggiamento, oltre che dall'età dell'organo colpito. Dosi crescenti di raggi X su seme secco non influenzano la crescita delle piante consentendo il completamento del ciclo vitale con formazione di frutti sani. Piuttosto l'esposizione dei semi a basse dosi di radiazioni, induce effetti ormetici stimolando lo sviluppo di un numero maggiore di foglie e frutti. Tra le fasi vegetativa e riproduttiva, invece, la prima risulta più vulnerabile. Fino alla dose di raggi X pari a 20 Gy, gli effetti delle radiazioni sono ben tollerati da entrambe le fasi; livelli superiori di radiazione, pari a 50 e 100 Gy, comportano l'arresto della crescita e dello sviluppo fogliare nelle piante

irraggiate in fase vegetativa, e fenomeni di senescenza precoce in quelle irraggiate in fase riproduttiva. In entrambi i casi non vengono prodotti frutti. A livello fotosintetico, dosi di 50 e 100 Gy causano una maggiore riduzione di efficienza fotochimica nelle foglie in via di sviluppo rispetto a quelle adulte. La più alta vulnerabilità alla radiazione delle foglie in via di sviluppo, può essere riconducibile ad una limitazione nel turnover della proteina D1 del fotosistema II, ad una riduzione del contenuto di pigmenti fotosintetici e ad una minore efficienza dei meccanismi di detossificazione e riparazione del danno cellulare. Inoltre, i risultati ottenuti dalla RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR) fanno ipotizzare che dosi elevate di raggi X inducano in foglie in via di sviluppo, non solo danni alle strutture cellulari, ma anche un'alterazione dell'espressione genica accentuando la manifestazione degli effetti negativi per dosi superiori a 20 Gy.

Per quanto concerne il quarto esperimento, in cui semi di *Solanum lycopersicum* L. 'Micro-Tom', sono stati irraggiati con ioni carbonio alla dose di 25 Gy, i risultati ottenuti pongono in risalto l'elevata radioresistenza di questa cultivar che riesce a completare lo sviluppo da seme a seme, mostrando un'architettura più compatta, in accordo con altri autori che indicano come effetto generale dell'esposizione a radiazioni ionizzanti, l'induzione di una crescita nana (Mei et al., 1994). Aspetto importante per questa specie si è rivelata essere anche la stabilità del processo fotosintetico in condizioni di stress luminoso nelle piante nate da semi irraggiati. Questa caratteristica può essere verosimilmente attribuita ad un più veloce turnover della proteina D1 del PSII, dal cui ciclo di riparazione dipende la stabilità e la funzionalità dello stesso PSII.

Infine, l'aumento della sintesi di acido ascorbico riscontrato nei frutti maturi delle piante irraggiate, costituisce ulteriore vantaggio nell'utilizzare questa specie poiché tali composti potrebbero essere trasferiti agli astronauti con la dieta sostituendo integratori vitaminici.

I risultati dell'ultimo esperimento in cui è stata valutata la risposta di Micro-Tom a tre trattamenti luminosi qualitativamente differenti (luce bianca_WL; luce rossa-verde-blu_RGB; luce rossa-blu_RB) confermano l'importanza della modulazione della qualità della luce come mezzo per indurre nelle piante specifiche

caratteristiche riguardanti il processo fotosintetico, la crescita e la regolazione del corredo antiossidante.

I dati prodotti indicano che il trattamento luminoso RGB promuove nella pianta un'architettura più compatta che si manifesta con una densa riduzione della taglia rispetto agli altri due regimi luminosi, inoltre stimola positivamente l'attività fotosintetica necessaria per la rigenerazione dell'aria nei moduli pressurizzati delle piattaforme spaziali, e determina una migliore qualità nutrizionale dei frutti incrementando il contenuto di vitamina C, che potrebbe essere assunto dall'equipaggio con la dieta.

In conclusione, i risultati complessivi di questo progetto di dottorato fissano alcuni concetti chiave dell'interazione piante superiori-radiazioni ionizzanti primo fra tutti la specie-specificità delle risposte e costituiscono un buon substrato di partenza per una eventuale sperimentazione futura, da realizzarsi "in volo", che tenga conto non soltanto della radiazione ionizzante ma anche dell'interazione di questa con altre caratteristiche dell'ambiente spaziale, come la alterata gravità.

CAPITOLO 9

BIBLIOGRAFIA

Abe T., Matsuyama T., Sekido S., Yamaguchi I., Yoshida S., Kameya T. 2002. Chlorophyll-deficient mutants of rice demonstrated that deletion of a DNA fragment by heavy-ion irradiation. *J. Radiat. Res.* 43: S157–S161.

Abramov V.I., Fedorenko O.M., Shevchenko V.A. 1992. Genetic consequences of radioactive contamination for populations of *Arabidopsis*. *Sci. Total Environ.* 112: 19–28.

Agarwal S. 2007. Increased antioxidant capacity in *Cassia* seedlings under UV-B radiation. *Biologia Plantarum* 51(1): 157-160.

Ajayi S.A e Fakorede M.A.B. 2000. Physiological maturity effects on seed quality, seedling vigour and mature plant characteristics of maize in a tropical environment. *Seed Science and Technology.* 28: 301-319.

Aleksakhin R.M., Sanzharova N.I., Fesenko S.V. 2006. Radioecology and the accident at the Chernobyl nuclear power plant. *Atomic Energy.* 100:257-263.

Al-Enezi N.A., Al-Khayri J.M. 2012. Alterations of DNA, Ions and Photosynthetic Pigments Content in Date Palm Seedlings Induced by X-Irradiation. *International Journal of Agriculture and Biology* 14: 329–336.

Allen J.F. (2003). State transitions - a question of balance. *Science* 299:1530-1532.

Allen R.G, and Tresini M. 2000. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med.* 28 (3): 463-99.

Al-Qurainy F., Alameri A.A. and Khan S. 2010. RAPD profile for the assessment of genotoxicity on a medicinal plant; *Eruca sativa*. *Journal of Medicinal Plants Research* 4(7): 579-586.

- Alscher R.G., Donahue J.L., Cramer C.L. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiologiae Plantarum*. 100: 224–233.
- Al-zahrani N.H. 2012. Mutagenic effect of X-rays on *Vicia faba* plant. *Journal of American Science*. 8: 703–707.
- Ame J.C., Spenlehauer C., de Murcia G. 2004. The PARP superfamily. *BioEssays*, 26: 882–893.
- Amor Y., Babiychuk E., Inze D., Levine A. 1998. The involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in the oxidative stress responses in plants. *FEBS*. 440:1-7
- 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.
- Anderson R.M., Stevens D.L., Goodhead D.T. 2002. M-FISH analysis shows that complex chromosome aberrations induced by alpha-particle tracks are cumulative products of localized rearrangements, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 12167-12172.
- Angelini G., Ragni P., Esposito D., Giardi P., Pompili M.L., Moscardelli R., Giardi M.T. 2001. A device to study the effect of space radiation on photosynthetic organisms. *Phys. Med.* 17:267–268.
- 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.
- Arena C., De Micco V., Aronne G., Pugliese M., Virzo De Santo A., De Maio A. 2013. Response of *Phaseolus vulgaris* L. plants to low-let ionizing radiation: growth and oxidative stress. *Acta Astronautica*. 91: 107–114.
- Arena C., De Micco V., De Maio A. 2014. Growth alteration and leaf biochemical responses in *Phaseolus vulgaris* exposed to different doses of ionising radiation. *Plant Biol.* 16:194-202.

Arena C., De Micco V., Virzo De Santo A. 2012. Bioregenerative Life Support Systems in the Space (BLSS): Effects of radiation on plants. Review article. *Annales Kinesiologiae* 3: 87-98.

Arena C., Mistretta C., Natale E., Faraone Mennella M.R., Virzo De Santo A., De Maio A. 2011. Characterization and role of poly (ADP-ribosyl) ation in the Mediterranean species *Cistus incanus* L. under different temperature conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 49: 435-440.

Aro E.M. and Ohad I. 2003. Redox regulation of thylakoid protein phosphorylation. *Antioxidants Redox Signaling.* 5: 55-67.

Arora R., Gupta D., Chawla R., Sagar R., Sharma A., Kumar R., Prasad J., Singh, S., Samanta N., Sharma K. 2005. Radioprotection by plant product: present status and future prospects. *Phytoterapy Research.* 19: 1-22.

Arora R., Gupta D., Chawla R., Sagar R., Sharma A., Kumar R., Prasad J., Singh, S., Samanta N., Sharma K. 2005. Radioprotection by plant product: present status and future prospects. *Phytoterapy Res.* 19: 1-22.

Atienzar F.A., Venier P., Jha A.N., Depledge M.H. 2002. Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations. *Mutat. Res.* 521:151-163.

Azzam E.I., Raaphorst G.P, Mitchel R.E. 1994. Radiation-induced adaptive response for protection against micronucleus formation and neo- plastic transformation in C3H10T1/2 mouse embryo cells. *Radiat. Res.* 138: 28–31.

Barbara Demmig-Adams and William W. Adams III. 2006. Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New phytologist.* 172:11-21.

Barta, D.J., Tibbitts, T.W., Bula, R.J., Morrow R.C. 1992. Evaluation of light emitting diode characteristics for space-based plant irradiation source. *Adv. Space Res.* 12:141–149.

Bayonove J., Burg M., Delpoux M., Mir A. 1984. Biological changes observed on rice and biological and genetic changes observed on Tobacco after space flight in the orbital station Salyut-7 (Biobloc III experiment). *Adv. Space Res.* 4:97–101.

Bayonove J., Burg M., Delpoux M., Mir A. 1984. Biological changes observed on rice and biological and genetic changes observed on Tobacco after space flight in the orbital station Salyut-7 (Biobloc III experiment). *Adv. Space Res.* 4: 97-101.

Bedford J.S., Phil D. 1997. Sublethal damage, potentially lethal damage, and chromosomal aberrations in mammalian cells exposed to ionizing radiations. *Int. J. Radiat. Biol.* 71: 649–655.

Bennett C.J., Pirim C., and Orlando T.M. 2013. Space-Weathering of Solar System Bodies: A Laboratory Perspective. *Chemical Reviews.* 113: 9086-9150.

Bilger W., Björkman O. 1990. Role of xanthophyll cycle and energy dissipation in differently oriented faces of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research.* 25: 173–185.

Bilger W., Schreiber U., Bock M. 1995. Determination of quantum efficiency of photosystem II and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia.* 102: 425-432.

Bjorkman O., Demming B. 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta.* 170: 489-504.

Blaauw, O., Blaauw-Jansen, G. 1970. The phototropic responses of *Avenacoleoptiles*. *Acta Botan. Neer.* 19: 755–763.

Briggs, W.R., Huala, E. 1999. Blue-light photoreceptors in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15: 33–62.

Calabrese E.J., Baldwin L.A. 2002. “Defining hormesis”. *Human and Experimental Toxicology.* 21: 91-97.

- Campiotti C.A., Bernardini A., Di Carlo F., Scoccianti M. 2009. Accrescimento delle piante con luce LED. ENEA-Dipartimento Biotecnologie, Agroindustria e protezione della Salute- Centro Ricerche Casaccia, Roma.
- Casarett A.P. 1968. Effects of radiation on higher plants and plant communities. *Ann. N Y Acad. Sci.* 59: 514.
- Cenkci S., Yýldýz M., Cigçerci I.H., Konuk M., Bozdag A. 2009. Toxic chemicals-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA (RAPD) in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Chemosphere* 76: 900–906.
- Cheng T.S., Chandlee J.M. 1999. The structural, biochemical, and genetic characterization of a new radiation-induced variegated leaf mutant of soybean *Glycine*. *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China B.* 23:27–37.
- Christie, J.M. and Briggs, W.R. 2001. Blue light sensing in higher plants. *J. Biol. Chem.* 276: 11457-11460.
- Comai L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid, *Nat. Rev. Genet.* 6: 836–846.
- Cornelissen J.H.C., Lavorel A., Garnier E., Diaz S., Buchmann N., Gurvich D.E., Reich P.B., Steege H., Morgan H.D., van der Heijden M.G.A., Pausas J.G., Poorter H. 2003. A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany.* 51: 335-380.
- Cosgrove, D.J. 1981. Rapid suppression of growth by blue light. *Plant Physiol.* 67: 584–590.
- Cucinotta F.A, Kim M-H.Y., Chappell L.J., Huff J.L. 2013. How safe is safe enough? Radiation risk for a human mission to Mars. *PLoS ONE.* 8 e74988.
- Danylchenko O. and Sorochinsky B. 2005. Use of RAPD assay for the detection of mutation changes in plant DNA induced by UV-B and α -rays. *BMC Plant Biology.* 5, (1): 59.

Das K., Roychoudhury A. 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants *Front. Environ. Sci.* <http://dx.doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>

De Micco V., Arena C., Pignalosa D., Durante M. 2011. Effects of sparsely and densely ionizing radiation on plants. *Rad. Env. Biophys.* 50:1-19.

De Micco V., Paradiso R., Aronne G., De Pascale S., Quarto M., and Arena C. 2014. "Leaf anatomy and photochemical behaviour of *Solanum lycopersicum* L. plants from seeds irradiated with low-LET ionising radiation". *The Scientific World Journal*. 2014 Article ID 428141, 13 pages.

De Micco V.; Aronne G.; Colla G.; Fortezza R.; De Pascale S. 2009. Agro-biology for bioregenerative Life Support Systems in long-term Space missions: General constraints and the Italian efforts. *Journal of plant interaction*. 4: 241-252.

De Micco V.; Aronne G.; Scala M.; Castagnolo D.; Fortezza R. 2006. Growth-support system for seedling development onboard of unmanned spacecrafts. *Space Technology (ST)*. 25: 1-8.

De Vita V.T Jr, Samuel H., Rogemberg S.A. 1993. *Cancer, principle and practice of oncology*. 4th edn. Lippincott Co, Philadelphia.

Demming-Adams B., Adams W., Heber U., Neimanis S. 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.

Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Bloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S., Lele, R.D. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future. *J. Assoc. Physicians India*. 52: 794-804.

Dougher and Bruce Bugbee. 2001. Evidence for Yellow Light Suppression of Lettuce Growth. *Photochemistry and Photobiology*. 73(2): 208–212.

- Dreschel T.W., Knott W.M., Corey K.A. 1996. NASA's biomass production chamber: a test bed for bioregenerative life support studies. *Adv. Space Res.* 18: 215-224.
- Durante M. 2002. Radiation protection in space *Riv. Nuovo Cimento* 25: 1-70.
- Durante M., Cucinotta F.A. 2008. Heavy ion carcinogenesis and human space exploration. *Nat. Rev. Cancer.* 8:465–472.
- Durante M., Kronenberg A. 2005. Ground-based research with heavy ions for space radiation protection. *Adv. Space Res.* 35:180–184.
- Eskins K., Jiang C.Z. and Shibles R. 1991. Light-quality and irradiance effects on pigments, light-harvesting proteins and Rubisco activity in a chlorophyll- and light-harvesting-deficient soybean mutant. *Physiol. Plant.* 83: 47–53.
- Esnault M.A., Legue F., Chenal C. 2010. Ionizing radiation: advances in plant response. *Environmental and Experimental Botany.* 68. 231–237.
- Esposito D., Faraloni C., Margonelli A., Pace E., Torzillo G., Zanini A., and Giardi M. T. 2006. “The effect of ionising radiation on photosynthetic oxygenic microorganisms for survival in space flight revealed by automatic photosystem II-based biosensors”. Z-Tec Publishing, Bremen Microgravity science technology XVIII-3/4.
- Ezekiel C.N., Nwangburuka C.C., Ajibade O.A. and Odebode A.C. 2011. Genetic diversity in 14 tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) varieties in Nigerian markets by RAPD-PCR technique. *African Journal of Biotechnology.* 10(25):. 4961-4967.
- Fan J., Shi M., Huang J.Z., Xu J., Wang Z.D., Guo D.P. 2014. Regulation of photosynthetic performance and antioxidant capacity by ⁶⁰Co g-irradiation in *Zizania latifolia* plants. *Journal of Environmental Radioactivity.* 129:33-42.
- Feinendegen L.E. 2005. Evidence for beneficial low level radiation effects and radiation hormesis. *Br. J. Radiol.* 78: 3-7.

- Ferlet-Cavrois V., Marcandella C., Giraud G., Gasiot G., Colladant T., Musseau O., Fenouillet C., De Poncharra J. 2002. Characterization of the Parasitic Bipolar Amplification in SOI Technologies Submitted to Transient Irradiation. In IEEE TRANSACTIONS ON NUCLEAR SCIENCE NS. 49(3): 1456-1461.
- Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth, *Nature* 27: 442–446.
- Foyer C.H., Mullineaux P. 1994. Causes of photooxidative stress and amelioration of defence systems in plants. CRC Press, Boca Raton.
- Foyer C.H., Noctor G. 2011. Ascorbate and Glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology*. 155: 2-18.
- Frechilla S., Talbott L.D., Bogomolni R.A., Zeiger E. 2000. Reversal of blue light-stimulated stomatal opening by green light. *Plant Cell Physiol*. 41: 171–176.
- Frusciante L., Carli P., Ercolano M.R., Pernice R., Di Matteo A., Fogliano V., Pellegrini N. 2007. Antioxidant nutritional quality of tomato. *Molecular Nutrition & Food Research*. 51(5). 609-617.
- Garg N. & Manchanda G. 2009. ROS generation in plants: boon or bane? *Plant Biosystems*. 143(1): 81-96.
- George K., Durante M., Wu H., Willingham V., Cucinotta F.A. 2003. In vivo and in vitro measurements of complex-type chromosomal exchanges induced by heavy ions. *Adv. Space Res*. 31:1525–1535.
- Giardi M.T., Masojidek J., Godde D. 1997. Discussion on the stresses affecting the turnover of the D1 reaction centre II protein. *Physiol Plant*. 101: 635–642.
- Goins G.D., Yorio N.C., Sanwo M.M. and Brown C.S. 1997. Photomorphogenesis, photosynthesis, and seed yield of wheat plants grown under red light emitting diodes (LEDs) with and without supplemental blue lighting. *J. Exp. Bot*. 48: 1407-1413.

- Goodhead D.T. 1994. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: Clustered damage in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* 65: 7-17.
- Hada M., Georgakilas A.G. 2008. Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review, *J. Radiat. Res.* 49: 203–210.
- Halliwell B. 1996. Antioxidants in Human Health and Disease. *Annual Review of Nutrition.* 16: 33-50.
- Halstead T. W. and Dutcher F. R. 1987. “Plants in space,” *Annual Review of Plant Physiology* 38: 317–345.
- Hammond E.C., Bridgers K., Berry F.D. 1996. Germination, growth rates, and electron microscope analysis of tomato seeds flown on the LDEF. *Radiat. Meas.* 26: 851–861.
- Hase Y., Shimono K., Inoue M., Tanaka A., Watanabe H. 1999. Biological effects of ion beams in *Nicotiana tabacum* L. *Radiat. Environ. Biophys.* 38: 111–115.
- Hassler D. M., Zeitlin C., Wimmer-Schweingruber R. F. 2014. Mars’ surface radiation environment measured with the Mars Science Laboratory’s Curiosity Rover. *Science.* 343: 6169.
- Hillman J. 1984. Apical dominance. In M. Wilkins [ed.], *Advanced plant physiology*, 127–148.
- Hirono Y., Smith H.H., Lyman J.T., Thompson K.H., Baum J.W. 1970. Relative biological effectiveness of heavy ions in producing mutations, tumors, and growth inhibition in the crucifer plant, *Arabidopsis*. *Radiat. Res.* 44: 204–223.
- Hoenecke, M.E., Bula R.J., Tibbitts T.W. 1992. Importance of blue photon levels for lettuce seedlings grown under red-light-emitting diodes. *Hort Science.* 27: 427–430.
- Hoglund E., Blomquist E., Carlsson J., Stenerlow B. 2000. DNA damage induced by radiation of different linear energy transfer: initial fragmentation. *Int.J. Radiat. Biol.* 76: 539–547.

- Holst R.W., Nagel D.J. 1997. Radiation effects on plants. In: Wang W, Gorsuch JW, Hughes JS (eds) *Plants for environmental studies*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 37–81.
- 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.
- Hosoi Y., Sakamoto K. 1993. Suppressive effect of low dose total body irradiation on lung metastasis: dose dependency and effective period, *Radiother. Oncol.* 26: 177–179.
- Hu E., Bartsev S. I., and Liu H. 2010. “Conceptual design of a bioregenerative life support system containing crops and silkworms,”. *Advances in Space Research*, vol. 45(7): 929–939.
- Huang R.Q, Gu R.Q., Li Q. 1997. Application of SSNTDs in radiobiological investigations aboard recoverable satellites. *Radiat. Meas.* 28: 451–454.
- Ina Y., Tanooka H., Yamada T., Sakai K. 2005. Suppression of thymic lymphoma induction by life-long low-dose-rate irradiation accompanied by immune activation in C57BL/6 mice. *Radiat. Res.* 163: 153–158.
- Jackson S.P. 2002. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*. 23: 687-696.
- Jia C.F., Li A.L. 2008. Effect of gamma radiation on mutant induction of *Fagopyrum dibotrys* Hara. *Photosynthetica*. 46 (3): 363-369.
- Jia J., Zhao S., Kong X., Li Y., Zhao G., He W., Appels R., Pfeifer M., Tao Y., Zhang X., Jing R., Zhang C., Ma Y., Gao L., Gao C., Spannagl M., Mayer K.F.X, Li, D. Pan S., Zheng F., Hu Q., Xia X., Li J., Liang Q., Chen J. 2013. *Aegilops tauschii* draft genome sequence reveals a gene repertoire for wheat adaptation. *Nature* 496: 91–95.

- Johannes C., Horstmann M., Durante M., Chudoba I., Obe G. 2004. Chromosome intrachanges and interchanges detected by multi-color banding in lymphocytes: searching for clastogen signatures in the human genome. *Radiat.Res.*161: 540–548.
- Johkan M., Shoji K., Goto F., Hashida S., Yoshihara T. 2010. Blue light-emitting diode light irradiation of seedlings improves seedling quality and growth after transplanting in red leaf lettuce. *HortScience* 45: 1809-1814.
- Johnson G.N., Young A.J., Scholes J.D., Horton P. 1993. The dissipation of excess excitation energy in British plant species. *Plant Cell and Environment* 16: 673–679.
- Kautsky H., Appel W., Amann H. 1960. Chlorophyll fluoreszenz und Kohlensaure assimilation. XIII. Die Fluoreszenz Kurve und die Photochemie der Pflanze. *Biochem. Z.* 277-332.
- Kazama Y., Hirano T., Saito H., Liu Y., Ohbu S., Hayashi Y., Abe T. 2011. Characterization of highly efficient heavy-ion mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*, *BMC Plant. Biol.* 11:161.
- Kevin M. Folta. 2004. Green Light Stimulates Early Stem Elongation, Antagonizing Light-Mediated Growth Inhibition. *Plant Physiology.* 135 (3): 1407-1416.
- Kim J.H., Baek M.H., Chung B.Y., Wi S.G., Kim J.S. 2004. Alterations in the photosynthetic pigments and antioxidant machineries of red pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings from gamma-irradiated seeds. *J. Plant Biol.* 47: 314-321.
- Kim J.H., Moon Y.R., Lee M.H., Kim J.H., Wi S.G., Park B.J., Kim C.S, Chung B.Y. 2011. Photosynthetic capacity of *Arabidopsis* plants at the reproductive stage tolerates γ irradiation. *Radiat. Res.*52: 441–449.
- Kitajima M., Butler W.L. 1975. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochim Biophys Acta.* 376(1): 105–115.
- Knight H., Knight M.R. 2001. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk, *Trends Plant Sci.* 6: 262–267.

- Kovacs E., Keresztes A. 2002. Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. *Micron* 33:199–210.
- Kovalchuk I., Abramov V., Pogribny I., Kovalchuk O. 2004. Molecular aspects of plant adaptation to life in the Chernobyl zone. *Plant Physiology*. 135: 357–363.
- Kranz A.R., Gartenbach K.E., Zimmermann M.W. 1994. Initial approach to comparative studies on the evolutionary potentials of space radiation effects in a plant system. *Adv. Space Res.* 14(10): 383–388.
- Krause G.H., Weis E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basic. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42: 313-349.
- Kumagai J., Katoh H., Kumada T., Tanaka A., Tano S., Miyazaki 2000. Strong resistance of *Arabidopsis thaliana* and *Raphanus sativus* seeds for ionizing radiation as studied by ESR, ENDOR, ESE spectroscopy and germination measurement: effect of long-lived and super-long-lived radicals. *Radiat. Phys. Chem.* 57: 75–83.
- Kumari R., Agrawal S.B., Singh S., Dubey N.K. 2009. Supplemented ultraviolet -B induced changes in essential oil composition and total phenolics of *Acorus calamus* L. (Sweet flag). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72: 2013-2019.
- Kurimoto T., Constable J.V.H., Huda A. 2010. Effects of Ionizing Radiation Exposure on *Arabidopsis thaliana*. *Health Phys.* 99: 49-57.
- Kurimoto U., Constable J.V.H., Hood S., Huda A. 2007. Response of *Arabidopsis thaliana* to ionizing radiation CP958. In: Crranja C, Leroy C, Stekl I (eds) *Nuclear physics methods and accelerators in biology and medicine*. American Institute of Physics, USA.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lattanzio V., Kroon P.A., Quideaus S. 2008. Plant phenolics – secondary metabolites with diverse functions. In: Daay F., Lattanzio V. (Eds), *Recent advances in polyphenol research*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp 1–35.

- Lee R., Sommer S., Hartel C., Nasonova E., Durante M., Ritter S. 2010. Complex exchanges are responsible for the increased effectiveness of C-ions compared to X-rays at the first post-irradiation mitosis. *Mutat. Res.* 701: 52–59.
- Leon J., Lawton M.A., Raskin I. 1995. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 108: 1673–1678.
- Leong, T-Y. and Anderson J.M. 1984. Effect of light quality on the composition and function of thylakoid membranes in *Atriplex triangularis*. *Biochim. Biophys. Acta* 766: 533–541.
- Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C.J. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583–593.
- Li H. Tang C., Xu Z., Liu X., Han X. 2012. Effects of different light sources on the growth of non-heading chinese cabbage (*Brassica campestris* L.). *Journal of Agricultural Science.* 4: 262-273.
- Li Q., Kubota C. 2009. Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce. *Environmental and Experimental Botany.* 67: 59-64.
- Lichtenthaler H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology.* 148: 350–382.
- Ling A.P.K., Lai A.G., Hussein S., Harun A.R. 2008. Physiological responses of *Orthosiphon stamineus* plantlets to gamma irradiation. *American-Eurasian. Journal of Sustainable Agriculture.* 2. 135–149.
- Loreto F., Tsonev T., Centritto M. 2009. The impact of blue light on leaf mesophyll conductance. *Journal of Experimental Botany.* 60 (8): 2283–2290.
- Luckey T.D. 1980. Hormesis with ionizing radiation. CRC Press Inc, Boca Raton.
- Lynch M. and Milligan B.G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.* 3: 91–99.

- Maity J.P., Mishra D., Chakraborty A., Saha A., Santra S.C., Chanda S. 2005. Modulation of some quantitative and qualitative characteristics in rice (*Oryza sativa* L.) and mung (*Phaseolus mungo* L.) by ionizing radiation. *Radiat. Phys. Chem.* 74: 391-394.
- Marcu D., Cristea V., Daraban L. 2013. Dose-dependent effects of gamma radiation on lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata*) seedlings. *Int. J. Rad. Biol.* 89: 219-223.
- Matsuda R., Ohashi-Kaneko K., Fujiwara K., Goto E., Kurata K. 2004. Photosynthetic characteristics of rice leaves grown under red light with or without supplemental blue light. *Plant Cell Physiol.* 45(12): 1870-1874.
- Maurya D.K., Devasagayam T.P.A., Nair C.K.K. 2006. Some novel approaches for radioprotection and the beneficial effects of natural products. *Indian Journal of Experimental Biology.* 44: 93-114.
- Maurya D.K., Devasagayam T.P.A., Nair C.K.K. 2006. Some novel approaches for radioprotection and the beneficial effects of natural products. *Indian J. Exp. Biol.* 44: 93-114.
- Maxwell K., Johnson G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany.* 345: 659-668.
- Mei M., Deng H., Lu Y., Zhuang C., Liu Z., Qiu Q., Qiu Y., Yang T.C. 1994. Mutagenic effects of heavy ion radiation in plants. *Adv. Space Res.* 14: 363-372.
- Melis A. 1999. Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage in vivo? *Trends Plant Sci.* 4: 130-135.
- Mettler F.A. 2012. Medical effects and risks of exposure to ionising radiation, *J. Radiol. Prot.* 32: 1386-1395.
- Monje O., Stutte G.W., Goins G.D., Porterfield D.M. and Bingham G.E. 2003. Farming in Space: Environmental and biophysical concerns. *Adv Space Res.* 31(1): 151-167.

- Morosinotto T., Castelletti S., Breton J., Bassi R., and Croce R. 2002. Mutation analysis of Lhca1 antenna complex. *J. Biol. Chem.* 277: 36253–36261.
- Morrow, R.C., Duffie, N.A., Tibbitts, T.W., Bula, R.J., Barta, D.J., Ming, D.W., Wheeler, R.M., Porterfield, D.M. 1995. Plant response in the ASTROCULTURE flight experiment unit (SAE Technical Paper 951624).
- Mortazavi S., Mehdi P., Tanavardi M. 2003. The biopositive effects of diagnostic doses of X-rays on growth of *Phaseolus vulgaris* plant: a possibility of new physical fertilizers. *Asian Journal of Experimental Science.* 20. 27–33.
- Mortazavi S.M.J., Foadi M., Mozdarani H., Haghani M., Mosleh-Shirazi M.A, Abolghasemi P., Nematollahi S., Sharifzadeh S. 2015. Future role of vitamin C in radiation mitigation and its possible applications in manned deep space missions: survival study and the measurement of cell viability. *International Journal of Radiation Research.* 13(1): 55-60.
- Mudibu J., Nkongolo K.K.C., Mehes-Smith M., Kalonji-Mbuyi A. 2011. Genetic Analysis of a Soybean Genetic Pool Using ISSR Marker: Effect of Gamma Radiation on Genetic Variability, *Int. J. Plant Breeding genetics.* 5: 235-245.
- Müller H. 1964. Radiation and Heredity. *Am. J. Public Health.* 54: 42-50.
- Murata N., Takahashi S., Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I. 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta.*1767(6): 414–421
- Murata N., Takahashi S., Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I. 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta.*1767(6): 414–421
- Nakamura N., Suyama A., Noda A., Kodama Y. 2013. Radiation effects on human heredity, *Annu. Rev. Genet.* 47: 33–50.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583–590.

Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I., Murata N. 2006. "A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II". *Biophysica et Biochimica Acta – Bioenergetics*. 1757 (7): 742–749.

Olivieri G., Bodycote J., Wolff S. 1984. Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science* 223: 594–597.

Orozco-Cárdenas M. L., Narváez-Vásquez J., Ryan C.A. 2001. Hydrogen Peroxide Acts as a Second Messenger for the Induction of Defense Genes in Tomato Plants in Response to Wounding, Systemin, and Methyl Jasmonate. *The Plant Cell*. 13: 179–191.

Ou X., Long L., Zhang Y., Xue Y., Liu J., Lin X., Liu B. 2009. Spaceflight induces both transient and heritable alterations in DNA methylation and gene expression in rice (*Oryza sativa* L.). *Mutat. Res.* 662: 44–53.

Ouerghi Z., Cornic G., Roudani A., Ayadi A., Brulfert J. 2000. Effect of NaCl on photosynthesis of two wheat species (*T. durum* and *T. aestivum*) differing in their sensitivity to salt stress, *J. Plant Physiol.* 156: 335–340.

Palamine M.T., Cureg R.G.A., Marbella L.J., Lapade A.G., Domingo Z.B., Deocarís C.C. 2005. Some biophysical changes in the chloroplasts of a *Dracaena* radiation-mutant. *Philippine J. Sci.* 134:121.

Paterson A.H., Wendel J.F., Gundlach H., Guo H., Jenkins J., Jin D., Llewellyn D., Showmaker K.C., Shu S., Udall J., Yoo M.-j., Byers R., Chen W., Doron-Faigenboim A., Duke M.V., Gong L., Grimwood J., Grover C., Grupp K., Hu G., Lee T-h, Li J., Lin L., Liu T., Marleret S. 2012. Repeated polyploidization of *Gossypium* genomes and the evolution of spinnable cotton fibres. *Nature* 492: 423–427.

Pnueli L., Carmel-Goren L., Hareven D., Gutfinger T., Alvarez J., Ganai M., Zamir D., Lifschitz E. 1998. The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1. *Development* 125: 1979–1989.

- Prieto P., Pineda M., Aguilar M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybde-num complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.* 269: 337–341.
- Ramsey J., Schemske D.W. 2002. Neopolyploidy in flowering plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 33: 589–639.
- Rea G., Esposito D., Damasso M., Serafini A., Margonelli A., Faraloni C., Torzillo G., Zanini A., Bertalan I., Johanningmeier U., Giardi M. 2008. Ionizing radiation impacts photochemical quantum yield and oxygen evolution activity of photosystem II in photosynthetic microorganisms. *Int. J. Radiat. Biol.* 84: 867–877.
- Real A., Sundell-Bergman S., Knowles J.F., Woodhead D.S., Zinger I. 2004. Effects of ionising radiation exposure on plants, fish and mammals: relevant data for environmental radiation protection. *J. Radiol. Protection.* 24: 123-137.
- Redpath J.L., Lu Q., Lao X., Molloy S., Elmore E. 2003. Low doses of diagnostic energy X-rays protect against neoplastic transformation in vitro, *Int. J. Radiat. Biol.* 79: 235–240.
- Roldan-Arjona T., Ariza R.R. 2009. Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. *Mutation Research/Review Mutation Research.* 681: 169–179.
- Sæbø A., Krekling T., Appelgren M. 1995. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 41(2): 177-185.
- Schreiber U., Bilger W., Neubauer C. 1994. Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze E-D, Caldwell MM (eds), *Ecophysiology of Photosynthesis 1*: 49-70.
- Schroeder J.I., Kwak J.M., Allen G.J. 2001. Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature.* 410: 327–330.
- Schwartz A., Zeiger E. 1984. Metabolic energy for stomatal opening: Roles of photophosphorylation and oxidative phosphorylation. *Planta.* 161:129–136.

Scott J.W., Harbaugh B.K. 1989. Micro-Tom. A miniature dwarf tomato. Florida Agricultural Experimental Station Circular. 370. 1–6.

Shahrtash M., Mohsenzadeh S. and Mohabatkar H. 2010. Cadmium-induced genotoxicity detected by the random amplification of polymorphism DNA in the maize seedling roots. *Journal of Cell and Molecular Research*. 2 (1): 42-48.

Sharkey, T.D. and Raschke, K. 1981. Effect of light quality on stomatal opening in leaves of *Xanthium strumarium* L. *Plant Physiol*. 68: 1170-1174.

Sharma P., Jha A.B., Dubey R. S., Pessarakli M. 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* 2012, Article ID 217037, 26 pages doi:10.1155/2012/217037

Shikazono N., Tanaka A., Kitayama S., Watanabe H., Tano S. 2002. LET dependence of lethality in *Arabidopsis thaliana* irradiated by heavy ions. *Radiat. Environ. Biophys*. 41: 159–162.

Sidler C., Li D., Kovalchuk O., Kovalchuk I. 2015. Development-dependent expression of DNA repair genes and epigenetic regulators in *Arabidopsis* plants exposed to ionizing radiation. *Radiat. Res*. 183: 219–232.

Sowbiya M., Eun J.K., Jeong S.P., and Jeong H.L. 2014. Influence of Green, Red and Blue Light Emitting Diodes on Multiprotein Complex Proteins and Photosynthetic Activity under Different Light Intensities in Lettuce Leaves (*Lactuca sativa* L.) *Int. J. Mol. Sci*. 15(3): 4657–4670.

Sparrow A.H., Schwemmer S.S. 1974. Correlations between nuclear characteristics, growth inhibition, and survival-curve parameters (LD_n, whole plant D₀ and D_q) for whole-plant acute gamma irradiation of herbaceous species. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med*. 25:565–581.

Stankovic, B., Zhou, W., Link, B.M. 2002. Seed to seed growth of *Arabidopsis thaliana* on the International Space Station (SAE Technical Paper 01-2284).

- Stoeva N., Bineva T.Z. 2001. Physiological response of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to gamma-irradiation treatment. I. Growth, photosynthesis rate and contents of plastid pigments, *J. Environ. Protect. Ecol.* 2: 299–303.
- Stone J. R., Yang S. 2006. Hydrogen Peroxide: A Signaling Messenger. *Antioxidants & Redox Signaling.* 8(3-4): 243-270
- Su N., Wu Q., Shen ZG., Xia K., Cu J. 2014. Effects of light quality on the chloroplastic ultrastructure and photosynthetic characteristics of cucumber seedlings. *Plant Growth Regulation.* 73 (3): 227-235.
- Sundby C., McCaffery S., Anderson J.M. 1993. Turnover of the photosystem II D1 protein in higher plants under photoinhibitory and nonphotoinhibitory irradiance. *J. Biol. Chem.* 268: 25476-25482.
- Taheri P., Irannejad A., Goldani M., Tarighi S. 2014. Oxidative burst and enzymatic antioxidant systems in rice plants during interaction with *Alternaria alternata*. *Eur. J. Plant Pathol.* 140: 829–839.
- Tanaka A., Shikazono N., Hase Y. 2010. Studies on biological effects of ion beams on lethality, molecular nature of mutation, mutation rate, and spectrum of mutation phenotype for mutation breeding in higher plants. *J. Radiat. Res.* 51: 223–233.
- Tawn E.J. 2002. Hereditary effects of radiation, UNSCEAR 2001 report to the general assembly, with scientific annex. *J. Radiol. Prot.* 22: 121.
- Teramura A.H. 1983. Effects of ultraviolet-B radiation on the growth and yield of crop plants. *Physiologia Plantarum* 58. 415–427.
- Thiede M.E., Link S.O., Fellows R.J., Beedlow P.A. 1995. Effects of gamma radiation on stem diameter growth, carbon gain biomass partitioning in *Helianthus annuus*. *Env. Exp. Bot.* 35(1):33–41.
- Ursino D.J., Schefski H., McCabe J. 1977. Radiation-induced changes in photosynthetic CO₂ uptake in soybean plants, *Environ. Exp. Bot.* 17: 27–34.

- Van Gent D.C., Hoeijmakers J.H. e Kanaar R. 2001. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat. Rev.Genet.*, 2: 196-206.
- Wei L.J., Yang Q., Xia H.M., Furusawa Y., Guan S.H., Xin P., Sun Y.Q. 2006. Analysis of cytogenetic damage in rice seeds induced by energetic heavy ions on-ground and after spaceflight. *J Radiat. Res.* 47: 273–278.
- Wei Z., Liu Y., Wang G., Chen X., Li H., Yang H., Wang L., Gao Q., Wang C., Wang Y. 1995. Biological effects of carbon ions with medium energy on plant seeds. *Radiat. Res.* 141: 342–344.
- Wheeler R.M., Mackowiak C.L., Stutte G.S., Yorio N.C., Ruffe L.M., Sager J.C., Prince R.P., Knott W.M. 2008. Crop productivities and radiation use efficiencies for bioregenerative life support. *Advances in Space Research.* 41: 706-713.
- Wheeler R.M., Mackowiak C.L., Stutte G.W., Sager J.C., Yorio N.C., Ruffe L.M., Fortson R.E., Dreschel T.W., Knott W.M., Corey K.A. 1996. NASA's biomass production chamber: a testbed for bioregenerative life support studies. *Adv. Space Res.* 18: 215–224.
- Wheeler R.M., Sager J.C., Prince R.P., Knott W.M. 2003. Crop production for advanced life support system - Observations from Kennedy Space Center (Breadboard Project). Washington D.C.
- Wi S.G., Chung B.Y., Kim J.S., Kim J.H., Baek M.H., Lee J.W., Kim Y.S. 2007. Effect of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants. *Micron.* 38: 553-564.
- Williams, D.R. 2002. Isolation and integrated testing: an introduction to the Lunar–Mars life support test project. In: Lane, H.W., Sauer, R.L., Feedback, D.L. (Ed.), *Isolation—NASA Experiments in Closed-Environment* (pp. 1-6). Living, Science and Technology Series, vol. 104, San Diego: Univelt Incorporated.
- Wyman C., Kanaar R. 2006. DNA double-strand break repair: all' swell that end swell, *Annu. Rev. Genet.* 40: 363–383.

Xu S., Cook G.T., Cresswell A.J., Dunbar E., Freeman S.P., Hastie H., Hou X., Jacobsson P., Naysmith P., Sanderson D.C. 2015. Radiocarbon concentration in modern tree rings from Fukushima, Japan. *J Environ Radioact.* 146: 67-72.

Yeh F.C., Boyle T.J.B. 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian J. Bot.* 129: 157.

Yokota Y., Yamada S., Hase Y., Shikazono N., Narumi I., Tanaka A., Inoue M. 2007. Initial yields of DNA double-strand breaks and DNA fragmentation patterns depend on linear energy transfer in tobacco BY-2 protoplasts irradiated with helium, carbon and neon ions. *Radiat. Res.* 167: 94-101.

Yokota Y., Yamada S., Hase Y., Shikazono N., Narumi I., Tanaka A., Inoue M. 2007. Initial yields of DNA double-strand breaks and DNA Fragmentation patterns depend on linear energy transfer in tobacco BY-2 protoplasts irradiated with helium, carbon and neon ions. *Radiat. Res.* 167:94–101.

Yorio N.C., Goins G.D., Kagie H.R., Wheeler R.M. and Sager J.C. 2001. Improving spinach, radish, and lettuce growth under red light-emitting diodes (LEDs) with blue light supplementation. *HortScience.* 36: 380-383.

Yu Z.L. 2005. The progress of ion beam bioengineering in China. *Solid State Phenomena.* 107. 25–30.

Zaka R., Vendecastele C.M., Misset M.T. 2002. Effects of low chronic doses of ionizing radiation on antioxidant enzymes and G6PDH activities in *Stipa capillata* (Poaceae). *J. Exp. Bot.* 53:1979–1987.

Zeiger E., Zhu J. 1998. Role of zeaxanthin in blue light photoreception and the modulation of light-CO₂ interactions in guard cells. *J. Exp. Bot.* 49: 433-442.

Zeitlin C., Hassler D.M., Cucinotta F.A., Ehresmann B., Wimmer Schweingruber R.F., Brinza D.E., Kang S., Weigle G., Böttcher S., Böhm E., Burmeister S., Guo J., Köhler J., Martin C., Posner A., Rafkin S., Reitz G. 2013. Measurements of energetic particle radiation in transit to Mars on the Mars Science Laboratory. *Science.* 340:1080–1084.

Zhou L., Li L., Lixia Y., Li P., Li Q., Shuang M.A., Dong X., Zhou G., Leloup C. 2006. Linear energy transfer dependence of the effects of carbon ion beams on adventitious shoot regeneration from in vitro leaf explants of *Saintpaulia ionantha*. *Int J. Radiat. Bio.* 82(7): 473–48.

Zhou, W. 2005. Advanced Astroculture plant growth unit: Capabilities and performances. SAE Technical Paper 01-2840.

Zimmermann M.W., Gartenbach K.E., Kranz A.R., Baican B., Schopper E., Heilmann C., Reitz G. 1996. Recent results of comparative radiobiological experiments with short and long term expositions of *Arabidopsis* seed embryos. *Adv. Space Res.* 18(12): 205–213.