



ITALIAN NATIONAL RESEARCH COUNCIL
"NELLO CARRARA" INSTITUTE FOR APPLIED PHYSICS
CNR FLORENCE RESEARCH AREA
Italy

TECHNICAL, SCIENTIFIC AND RESEARCH REPORTS

Vol. 1 - n. 64-12 (2009)

Paolo Matteini, Giovanni Agati

**Indagine sugli effetti provocati
da un eccesso di radiazione UV-B
su foglie di *Populus Alba L.*
mediante miscrospettrofluorimetria e
microimaging di fluorescenza**

CNR-IFAC-TR-09-3/009

ISSN 2035-5831



Istituto di Fisica Applicata “Nello Carrara”- CNR
Via Madonna del Piano 10
50019 Sesto Fiorentino

ISSN 2035-5831

Commessa: SP.P08.014 -Tecnologie e
processi laser nel manufacturing

Indagine sugli effetti provocati da un eccesso di radiazione UV-B su foglie di *Populus Alba L.* mediante miscrospettrofluorimetria e microimaging di fluorescenza

Paolo Matteini e Giovanni Agati

Foglie di *Populus Alba L.* (pioppo bianco) sottoposte a trattamento UV-B ($280 \text{ nm} < \lambda < 315 \text{ nm}$) sono state analizzate mediante tecniche di microscopia a trasmissione, di microspettrofluorimetria e di microimaging di fluorescenza e confrontate con analoghe foglie di controllo prelevate da piante mantenute a livelli standard di irraggiamento. I campioni fogliari impiegati per l'esperimento sono stati prelevati a partire dal quindicesimo giorno di accrescimento da piante fatte sviluppare in vivaio. Il trattamento UV (12 h al giorno) realizzato in camera di crescita si è protratto per un massimo di 7 giorni a partire dal quindicesimo giorno di accrescimento. La radiazione UV-B applicata aveva una densità di energia pari a 0.15 Wm^{-2} stimata con uno spettroradiometro a scansione SUV 100 (Biospherical Instruments, San Diego, CA). La strumentazione impiegata per le misure consisteva in un microscopio invertito a epifluorescenza (Diaphoto, Nikon, Japan) equipaggiato con una lampada a mercurio e filtri interferenziali di 10 nm (Andover Corporation, Salem, NH), dotato di ruota portafiltri e CCD per l'acquisizione delle immagini di fluorescenza.

L'analisi dei dati ottenuti durante il periodo di trattamento si articola in tre punti principali:

- 1) studio delle modificazioni cellulari
- 2) analisi delle caratteristiche di fluorescenza
- 3) analisi dei valori di intensità di fluorescenza a tempi crescenti di trattamento.

1. Studio delle modificazioni cellulari

La principale evidenza dell'eccesso di radiazione UV a cui sono stati sottoposti i campioni di foglie durante l'esperimento è una drastica variazione della morfologia cellulare. Dalle immagini di microscopia ottenute in trasmissione emerge infatti la presenza di un elevato impaccamento delle cellule del palizzata e di quelle dell'epidermide superiore (Fig 1). Queste ultime presentano un marcato effetto di compressione con perdita della normale geometria ovale e assunzione di una forma irregolare e allungata.

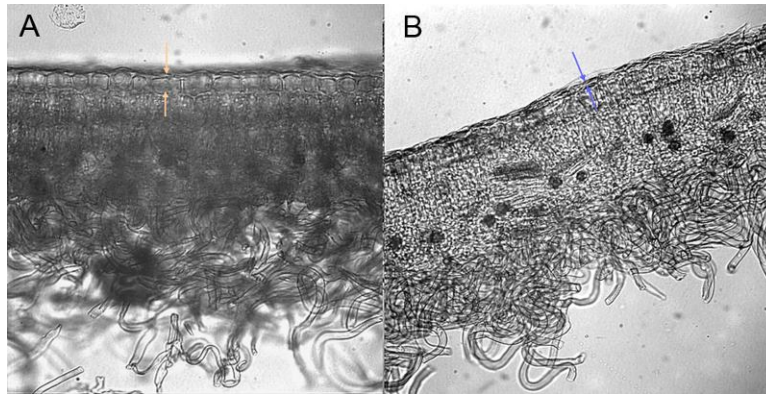


Fig 1. Cambiamenti morfologici dell'epidermide superiore (lo spessore è delimitato da frecce) in foglie trattate con radiazione UV (B). Campione di controllo (A).

L'effetto è tale da creare una struttura schiacciata “ad incastro” accompagnata da un notevole decremento del volume cellulare. Tale effetto può essere attribuito ad una duplice fenomeno. Da una parte un livello eccessivo di luce UV potrebbe avere provocato un danno strutturale irreversibile alla foglia con perdita di turgidità cellulare (in particolare nelle cellule dell'epidermide superiore in quanto direttamente esposte alla radiazione). Dall'altra è possibile ipotizzare l'attivazione (mediata dallo stress UV-B) di un processo di *signaling* tale da indurre un aumento di compattezza nello strato maggiormente esposto all'irraggiamento (epidermide superiore) allo scopo di minimizzare il danno ai tessuti sottostanti. In questo caso infatti la struttura compatta dell'epidermide costituirebbe una sorta di schermo adatto sia a riflettere maggiormente la luce incidente, sia ad assorbire efficientemente, grazie alle sostanze polifenoliche ivi presenti, proprio le lunghezze d'onda nella regione spettrale ultravioletta.

2. Analisi delle caratteristiche di fluorescenza

Sono state acquisite immagini di autofluorescenza e di fluorescenza indotta tramite fluorofori esogeni di sezioni trasversali di foglie trattate con luce UV e di controllo (in particolare sono state analizzate foglie a 36 ore e a 7 giorni di trattamento).

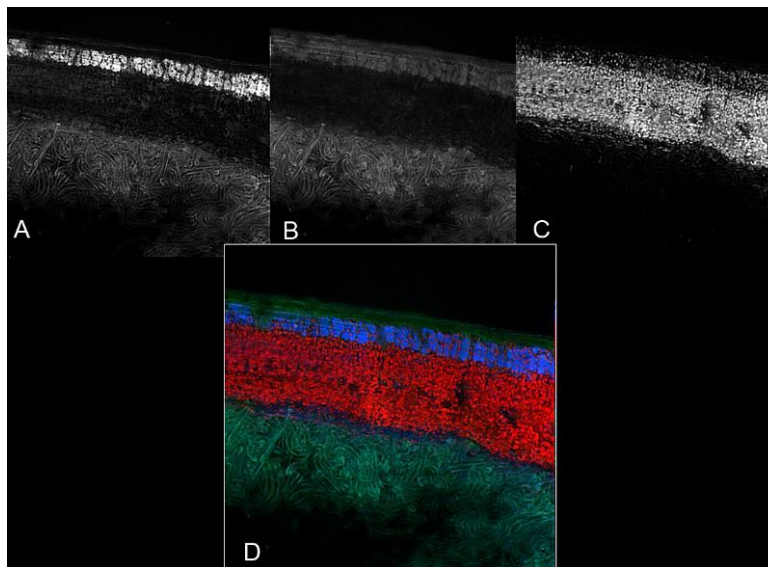


Fig.2. Immagini di autofluorescenza di una sezione di foglia sottoposta a 36 h di trattamento UV ottenute con eccitazione a 365 nm e filtri di emissione a 470 nm (A), 580 nm (B) e 680 nm (C). (D) Combinazione dei tre contributi di autofluorescenza.

L'intensa fluorescenza blu ($\lambda_{em} = 470$ nm) ottenuta con eccitazione a 365 nm e localizzata nelle cellule del palizzata, sia di sezioni di foglie trattate che di controllo, evidenzia la presenza di acidi idrossicinnamici con localizzazione vacuolare. Il contributo blu associato alle pareti cellulari è caratteristico invece di acidi idrossicinnamici legati (ferulico, caffeico, etc). La fluorescenza rossa (680 nm) è da ascrivere alla clorofilla presente in prevalenza nel palizzata e nello strato lacunoso. Nelle cellule dell'epidermide superiore di foglie trattate si osserva anche un debole contributo di fluorescenza a 580 nm. Dalla combinazione del canale blu (associato alla $\lambda_{em} = 470$ nm), verde (associato alla $\lambda_{em} = 580$ nm) e rosso (associato alla $\lambda_{em} = 680$ nm) si ottiene un quadro esauriente della relativa distribuzione dei vari fluorofori nella sezione (Fig. 2).

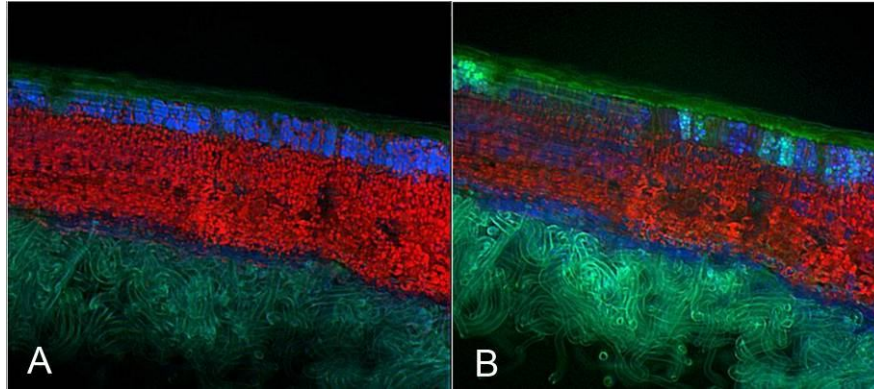


Fig. 3. Immagini combinate di autofluorescenza (A) e dopo colorazione alcalina (B) di una sezione sottoposta a 36 h di trattamento UV. $\lambda_{ex}=365$ nm - $\lambda_{em}=470$ nm (blu), $\lambda_{ex}=365$ nm - $\lambda_{em}=580$ nm (verde), $\lambda_{ex}=365$ nm - $\lambda_{em}=680$ nm (rosso)

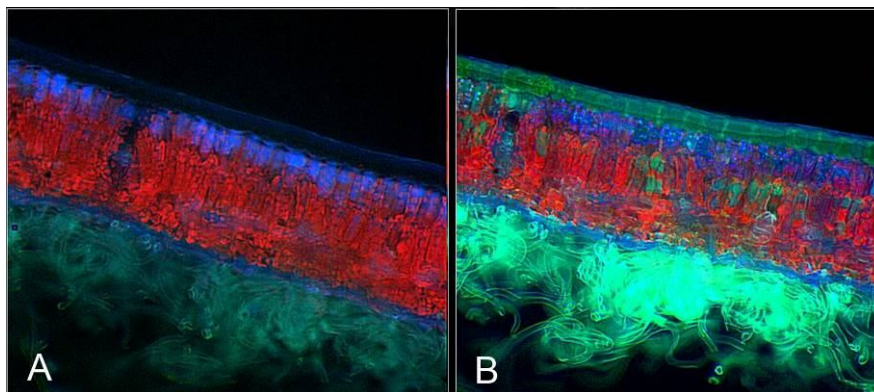


Fig. 4. Immagini combinate di autofluorescenza (A) e dopo colorazione alcalina (B) di una sezione di controllo. (A) $\lambda_{ex}=365$ nm - $\lambda_{em}=470$ nm (blu), $\lambda_{ex}=365$ nm - $\lambda_{em}=580$ nm (verde), $\lambda_{ex}=365$ nm - $\lambda_{em}=680$ nm (rosso)

Le sezioni sono quindi state trattate con una soluzione allo 0.5 % (v/v) di idrossido d'ammonio (NH_4OH). L'alcalinizzazione causata dall' NH_4OH genera una fluorescenza giallo-verde in presenza di polifenoli. Le immagini combinate mostrano una differente distribuzione della fluorescenza indotta tra campione trattato (Fig. 3) e campione di controllo (Fig. 4), in particolare a livello delle cellule dell'epidermide superiore. Sono state quindi acquisite delle immagini a maggior ingrandimento dell'epidermide prima e dopo colorazione con NH_4OH (Fig. 5). Oltre alle modificazioni morfologiche a carico delle cellule, come già precedentemente osservato (vedi Fig. 1), si osserva un aumento di fluorescenza indotta dal trattamento alcalino e co-localizzata all'autofluorescenza.

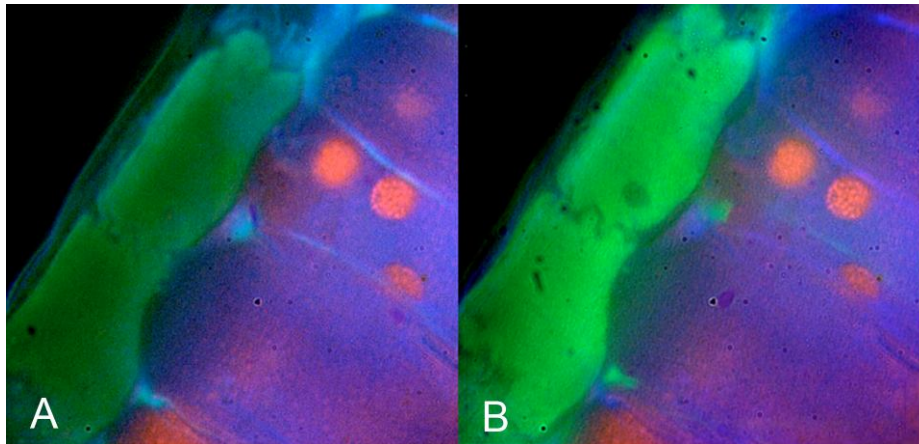


Fig. 5. Particolare di cellule dell'epidermide superiore di una foglia sottoposta a 36 h di stress UV. (A) autofluorescenza, (B) dopo trattamento alcalino. $\lambda_{ex}=365$ nm - $\lambda_{em}=470$ nm (blu), $\lambda_{ex}=365$ nm - $\lambda_{em}=580$ nm (verde), $\lambda_{ex}=365$ nm - $\lambda_{em}=680$ nm (rosso)

L'eccitazione a 436 nm con acquisizione a 580 nm di sezioni trattate con NH_4OH può essere impiegata per evidenziare la fluorescenza originata dai flavonoidi e distinguerla da quella degli altri polifenoli (ottenuta acquisendo alla stessa lunghezza d'onda ed eccitando a 365 nm, vedi figure 3, 4, 5). In figura 6 vengono riportate immagini di fluorescenza ottenute con questa combinazione di lunghezze d'onda al fine di stimare la presenza di flavonoidi in campioni di controllo e trattati (a 7 giorni). Ancora una volta è possibile osservare la presenza nell'epidermide superiore di debole autofluorescenza (580 nm) che aumenta notevolmente d'intensità dopo trattamento alcalino. Il controllo mostra viceversa fluorescenza vacuolare solo dopo trattamento con NH_4OH .

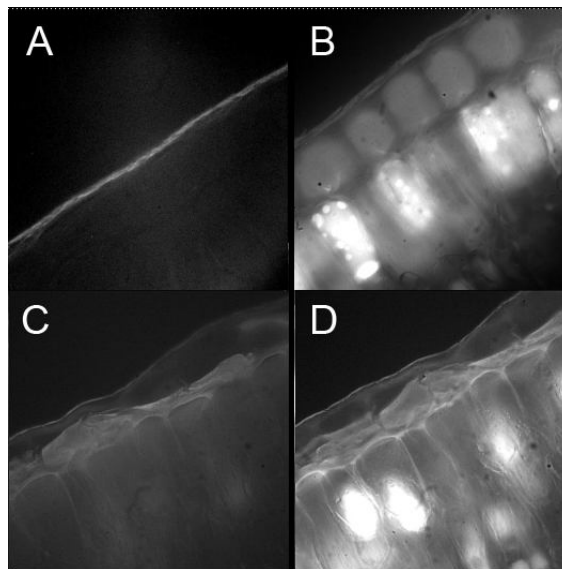


Fig. 6. Immagini di autofluorescenza (A, C) e dopo colorazione alcalina (B, D) di una sezione di controllo (A, B) e di una sottoposta a 36 h di trattamento UV (C, D). $\lambda_{ex}=436$ nm - $\lambda_{em}=580$ nm

Possiamo dunque affermare che, oltre alle differenze morfologiche già osservate (vedi Fig. 1), trattato e controllo si caratterizzano anche per differenti proprietà di fluorescenza e in particolare per la presenza di un contributo di autofluorescenza a 580 nm che è co-localizzato alla fluorescenza dei flavonoidi ma risulta, al momento, di difficile attribuzione. Tale contributo di autofluorescenza è indotto dallo stress imposto e cresce

progressivamente a partire dalle 12 ore di esposizione alla radiazione UV fino a raggiungere un plateau dopo 36 ore.

3. Analisi dei valori di fluorescenza a tempi crescenti di trattamento

Le variazioni nei livelli di fluorescenza prodotta con eccitazione blu (a 436nm) in sezioni sottoposte a colorazione alcalina di campioni di controllo e durante sette giorni di applicazione di stress UV sono state monitorate tramite la registrazione di spettri di fluorescenza. La registrazione degli spettri è avvenuta impiegando un obiettivo ad alto ingrandimento (100×) con fuoco preso al centro dei vacuoli delle cellule dell'epidermide superiore. Per ogni trattamento (durata dello stress) sono state analizzate almeno due foglie e tre sezioni per foglia. Per ogni sezione sono stati registrati 15 spettri acquisiti in successione tramite scansione lungo le cellule dell'epidermide.

Come riportato in figura 7, si osserva un progressivo aumento della fluorescenza a partire dalle 12 ore fino ai 7 giorni di trattamento. Le intensità di fluorescenza dei controlli mostrano invece variazioni poco rilevanti.

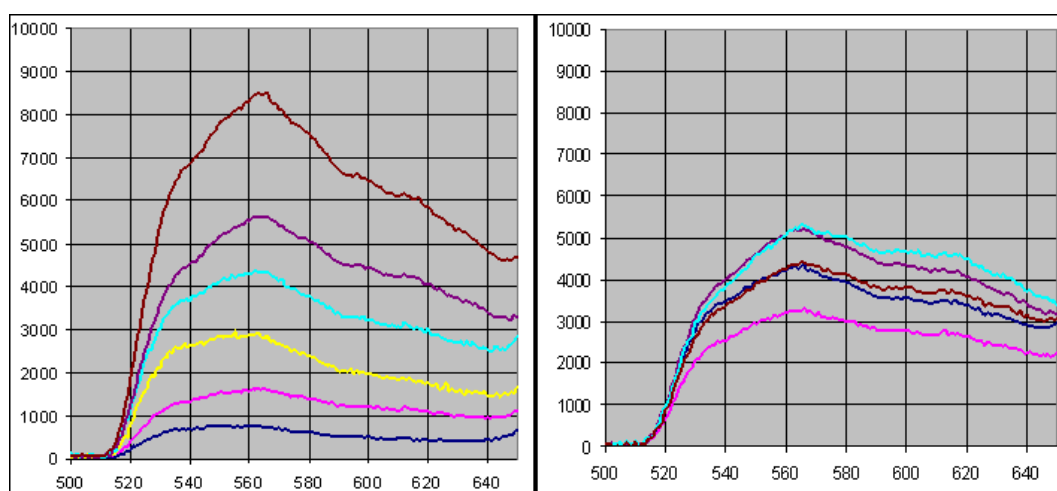


Fig. 7. Spettri di fluorescenza ($\lambda_{ex} = 436 \text{ nm}$) di cellule dell'epidermide superiore di campioni sottoposti a stress UV (sinistra) per tempi pari a: 12 h (blu), 24 h (rosa), 30 h (giallo), 36 h (celeste), 48 h (viola) e 7 d (bordeaux). (destra) campioni di controllo. Le sezioni sono state colorate con NH_4OH .

Le immagini di fluorescenza (Fig. 8) confermano i risultati dell'analisi spettrale. Le immagini riportate in figura 8 derivano da una combinazione ottenuta utilizzando $\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$ con $\lambda_{em} = 470 \text{ nm}$ (in blu) per localizzare gli acidi idrossicinnamici di parete e $\lambda_{ex} = 436 \text{ nm}$ con $\lambda_{em} = 580 \text{ nm}$ (in giallo) per localizzare la fluorescenza dei flavonoidi. Vengono anche riportate immagini a minor ingrandimento ($\lambda_{ex} = 436 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 580 \text{ nm}$) per descrivere la distribuzione dei flavonoidi nella sezione. Il trattato a 7 giorni mostra una fluorescenza circa doppia rispetto al controllo.

E' possibile avanzare due ipotesi a riguardo dell'aumento di fluorescenza osservato nei campioni soggetti a stress UV-B. Da una parte si può pensare ad un incremento sostanziale di flavonoidi provocato dallo stress imposto, in accordo con precedenti osservazioni riportate in letteratura. Dall'altra è necessario osservare che l'aumento di fluorescenza potrebbe anche essere ascrivito al cambiamento morfologico delle cellule: una drastica riduzione del volume cellulare, infatti, farebbe aumentare la concentrazione dei flavonoidi ivi presenti e quindi anche la fluorescenza ad essi attribuita.

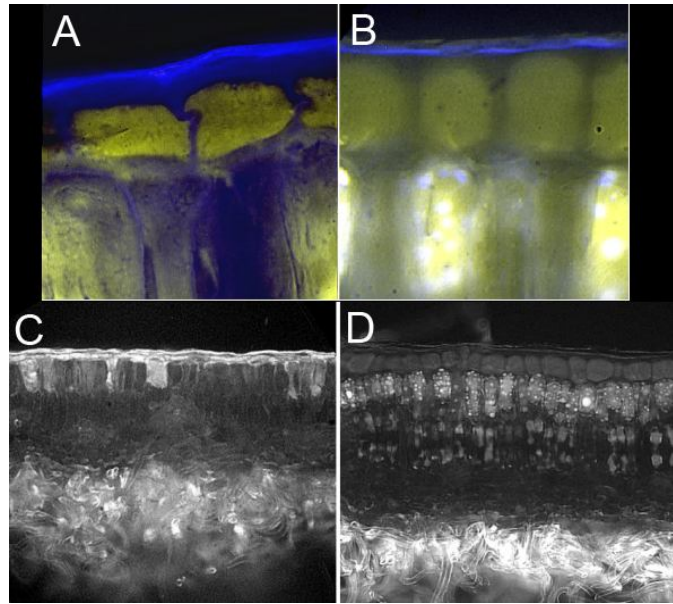


Fig. 8. Immagini di fluorescenza dopo colorazione alcalina di un campione sottoposto a 7 giorni di stress UV (A,C) e di uno di controllo (B, D). (A, B) $\lambda_{ex}=365$ nm - $\lambda_{em}=470$ nm (blu), $\lambda_{ex}=436$ nm - $\lambda_{em}=580$ nm (giallo). (C, D) $\lambda_{ex}=436$ nm - $\lambda_{em}=580$ nm

Riferimenti bibliografici:

- Agati G, Galardi C, Gravano E, et al. Flavonoid distribution in tissues of *Phillyrea latifolia* L. leaves as estimated by microspectrofluorometry and multispectral fluorescence microimaging. *Photochemistry and Photobiology* 76 (3): 350-360 2002
- Gould KS, Markham KR, Smith RH, et al. Functional role of anthocyanins in the leaves of *Quintinia serrata* A. Cunn. *Journal of Experimental Botany* 51 (347): 1107-1115 2000
- Greenberg, BM; Wilson, MI; Gerhardt, KE; et al. Morphological and physiological responses of *Brassica napus* to ultraviolet-B radiation: Photomodification of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and potential acclimation processes *Journal of Plant Physiology* 148 (1-2): 78-85 1996
- Hofmann, RW; Campbell, BD; Fountain, DW; et al. Multivariate analysis of intraspecific responses to UV-B radiation in white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant, Cell and Environment* 24 (9): 917-927 2001
- Hoque E, Remus G Natural UV-screening mechanisms of Norway spruce (*Picea abies* [L] Karst) needles. *Photochemistry and Photobiology* 69 (2): 177-192 1999
- Hrazdina G, Marx GA, Hoch HC. Distribution of secondary plant metabolites and their biosynthetic enzymes in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. Anthocyanins and flavonol glycosides. *Plant Physiology* 70 (3): 745-748 1982
- Hutzler P, Fischbach R, Heller W, et al. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Experimental Botany* 49 (323): 953-965 1998
- Kolb CA, Kaser MA, Kopecky J, et al. Effects of natural intensities of visible and ultraviolet radiation on epidermal ultraviolet screening and photosynthesis in grape leaves. *Plant Physiology* 127 (3): 863-875 2001
- Mackerness SAH, Surplus SL, Jordan BR, Thomas B. Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthetic transcripts at different stages of leaf development and light levels in pea (*Pisum sativum* L.): role of active oxygen species and antioxidant enzymes. *Photochemistry and Photobiology* 68 (1): 88-96 1998
- Schnabl H, Weissebock G, Scharf H. In vivo microspectrophotometric characterization of flavonol glycosides in *Vicia Faba* guard and epidermal cells. *Journal of Experimental Botany* 37 (174): 61-72 1986
- Wilson KE, Thompson JE, Huner NPA, et al. Effects of ultraviolet-A exposure on ultraviolet-B-induced accumulation of specific flavonoids in *Brassica napus*. *Photochemistry and Photobiology* 73 (6): 678-684 2001