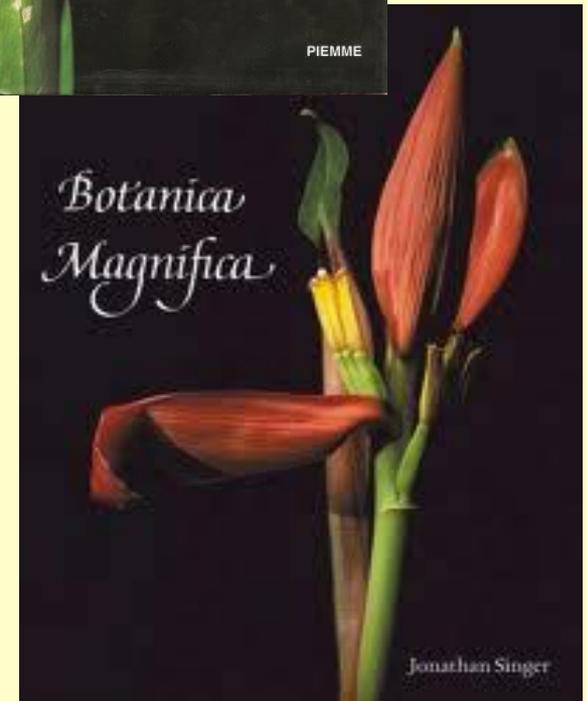
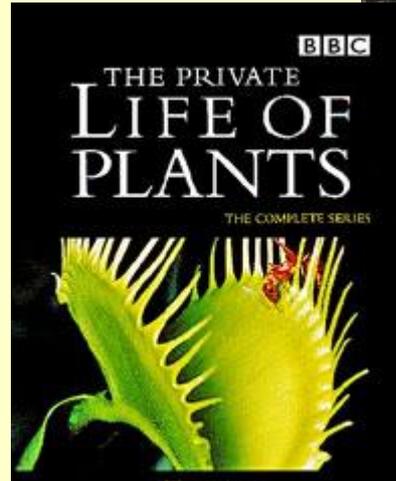
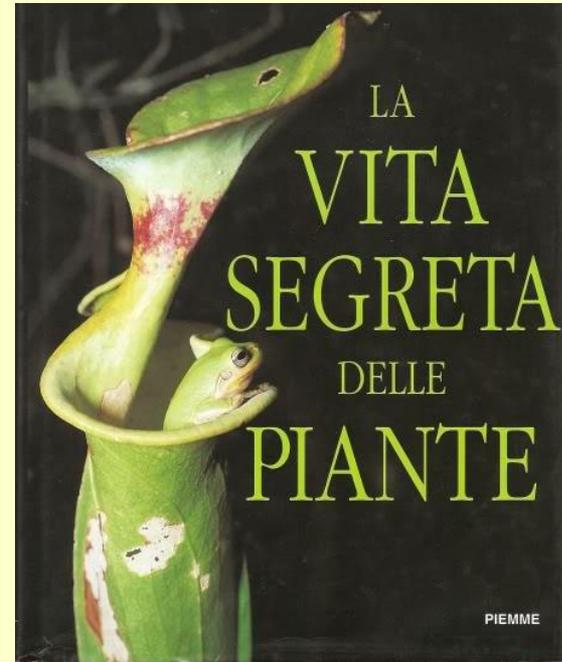
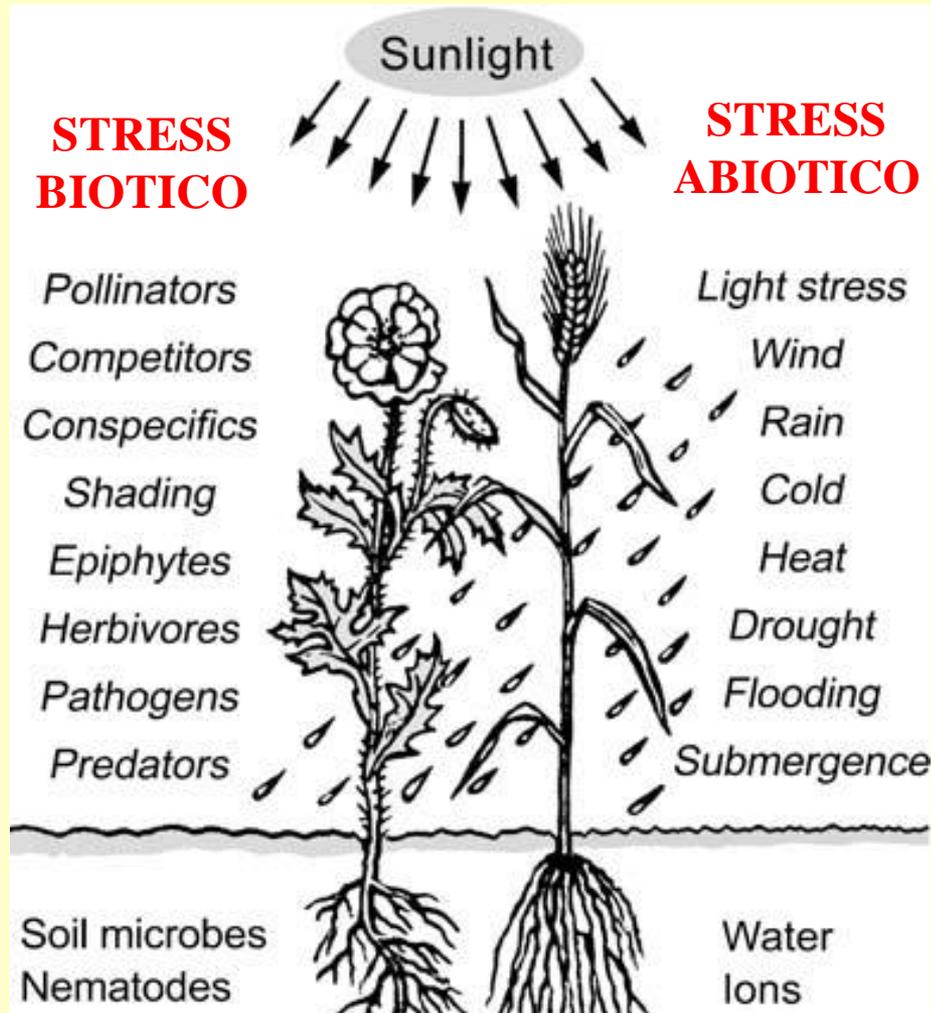


*Il metabolismo
secondario delle
piante e non
solo....*



LE PIANTE SONO ORGANISMI SESSILI

Le piante devono **crescere** con un determinato fenotipo e durante la loro vita **adattarsi** a moltissimi tipi di stress sia biotici che abiotici, tutto questo stando ferme....



Inoltre, le piante riescono a vivere in ambienti molto diversi....



Photo: Peter Ryser



...le piante sentono l'ambiente e si adattano!!!!!!!!!!!!

Gli ambienti non sono solo diversi fra loro ma anche altamente variabili nel tempo, perfino in una singola giornata: l'adattamento deve essere continuo...



Dato che le piante non si possono muovere, **l'unica alternativa ai cambiamenti ambientali è un rapido adattamento...**

Che può avvenire solo attraverso una fine segnalazione!
Questa può essere di due tipi:

Comunicazione chimica:

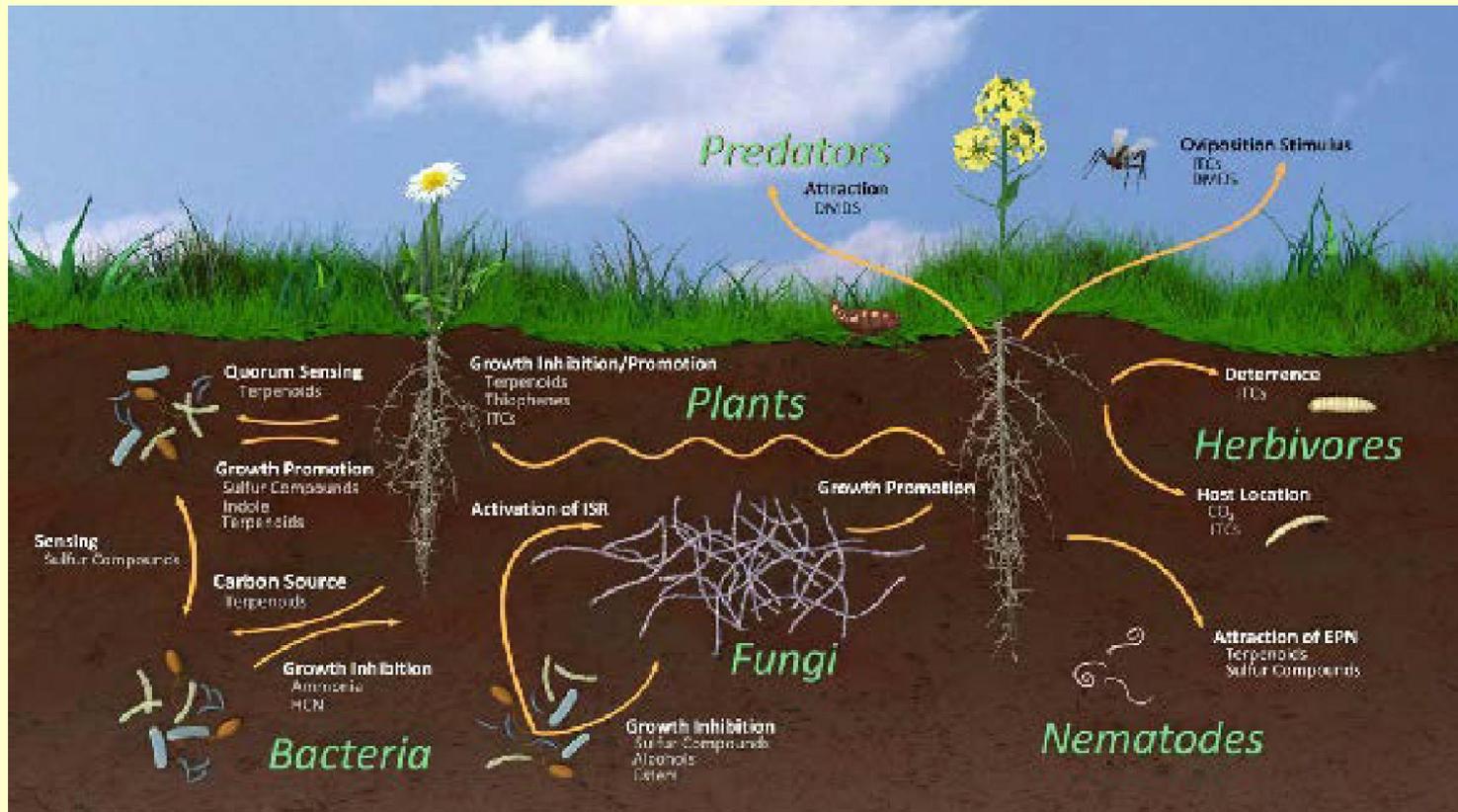
Varie molecole segnale: NO, ROS, etilene, ecc...

Comunicazione fisica:

Segnali elettrici, idraulici e meccanici

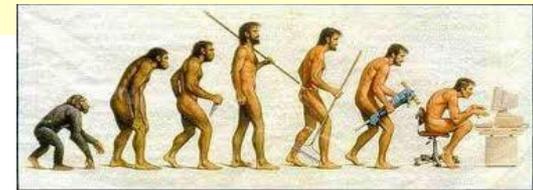
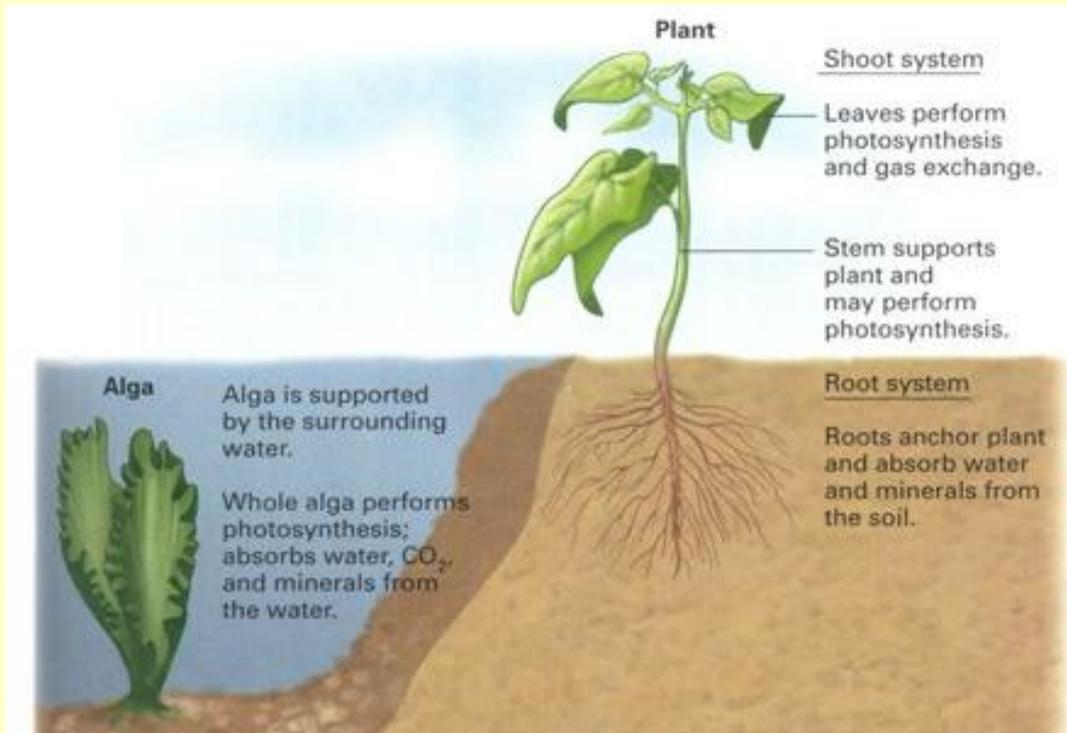
L'ambiente scatena un segnale per la comunicazione fra cellule all'interno della stessa pianta e con:

altre piante, funghi, nematodi, batteri, virus, insetti, animali predatori...



Ma che cosa è l'adattamento???

Struttura anatomica, processo fisiologico, tratto comportamentale ecc... di un organismo evoluto **in un certo periodo di tempo** come processo della selezione naturale, in maniera tale da **aumentare il successo riproduttivo** di tale organismo (**nelle determinate condizioni ambientali in cui l'organismo si trova**).



◀ **Figure 19-2** While algae live entirely in water, a plant lives in two environments: air and soil. A plant's organ systems are adapted to these two environments.

Cosa è l'adattamento per una pianta?

L'adattamento è tutto ciò che può aumentare l'efficienza nel procurarsi o utilizzare le

risorse fondamentali

quali **aria, luce, acqua e nutrienti**, permettere di sopportare determinate

condizioni fisiche difficili

quali **basse o elevate temperature e l'assenza o l'eccesso di luce** o aumentare la capacità di difendersi da un

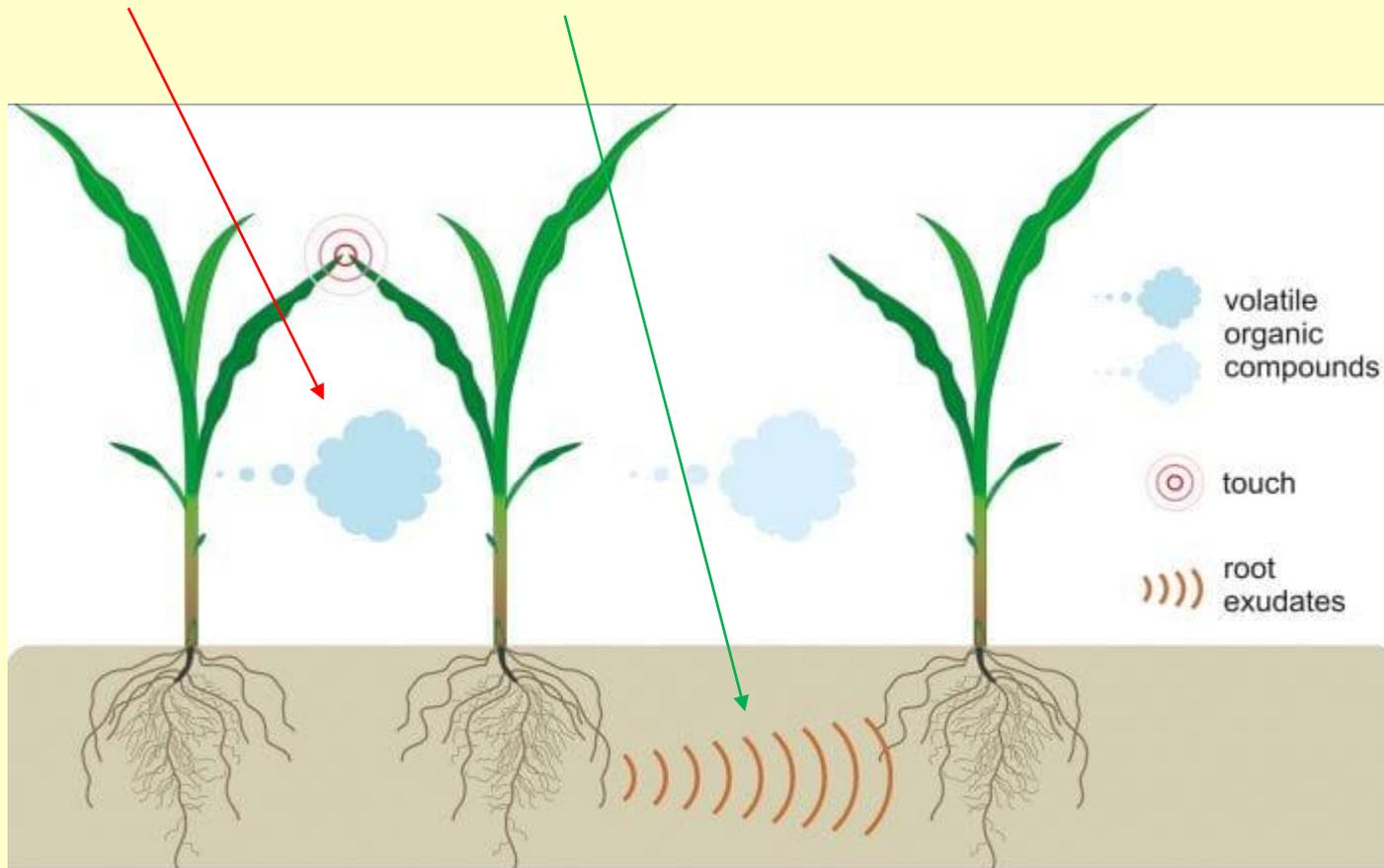
predatore.

Alcuni esempi delle scelte apparenti che una pianta deve saper fare per adattarsi all'ambiente:

- Quando e dove andare alla ricerca di nutrienti
- In quali parti dell'organismo allocare tali nutrienti e le molecole organiche derivate
- Quando e quali organi generare o far andare incontro a senescenza
- Quando e quanto riprodursi
- Quando difendersi contro un attacco ed in che organo
- Quando e dove trasmettere segnali chimici agli altri organismi...

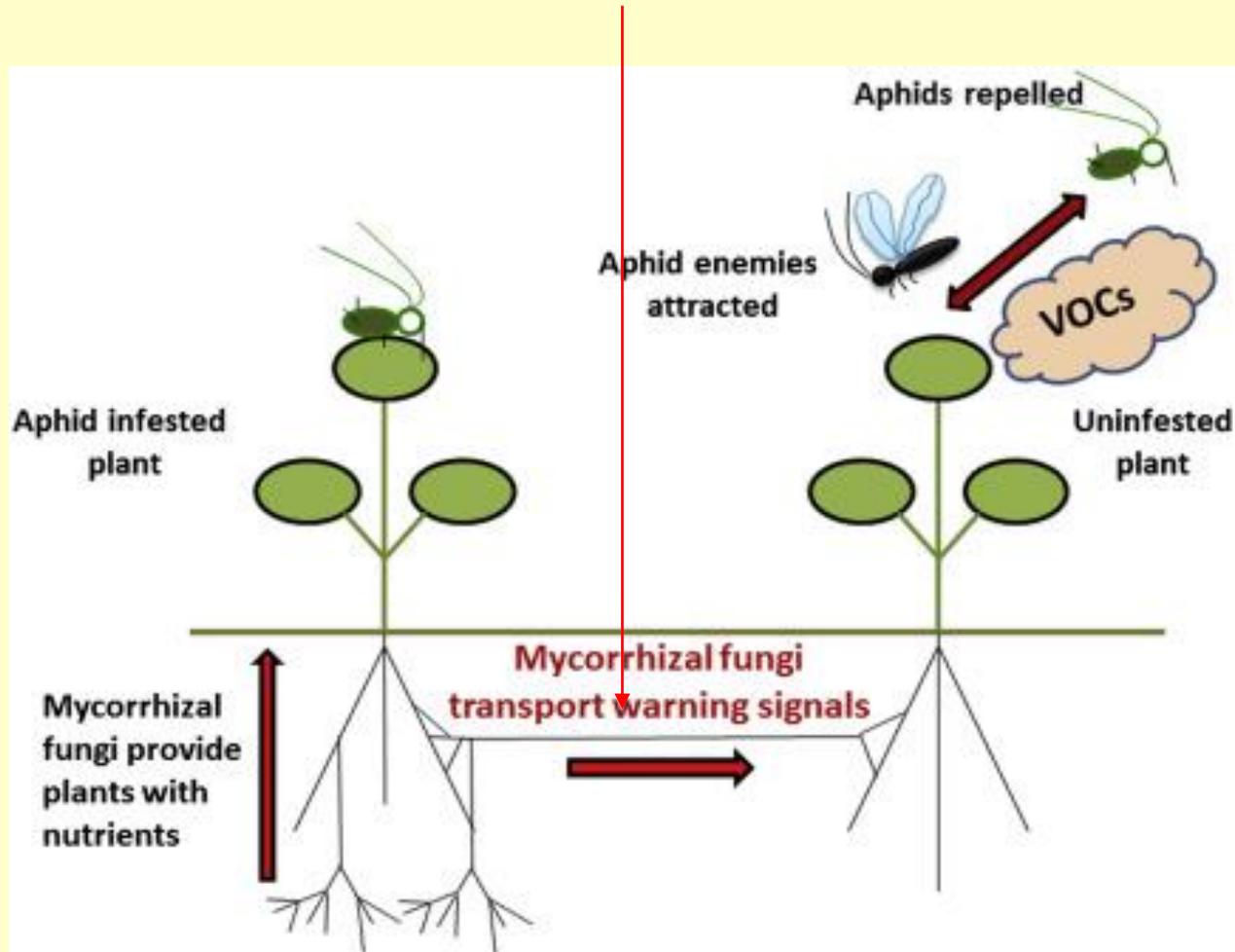
Tutto questo grazie alla capacità di comunicazione **fra cellule dello stesso organismo e fra organismi diversi**, svolta da vari tipi di metaboliti secondari....

Nel caso di organismi diversi, questi possono essere **sostanze organiche volatili** o **essudati radicali**.

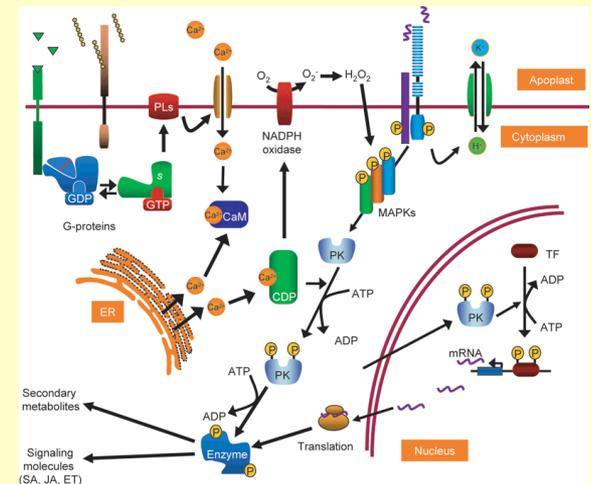
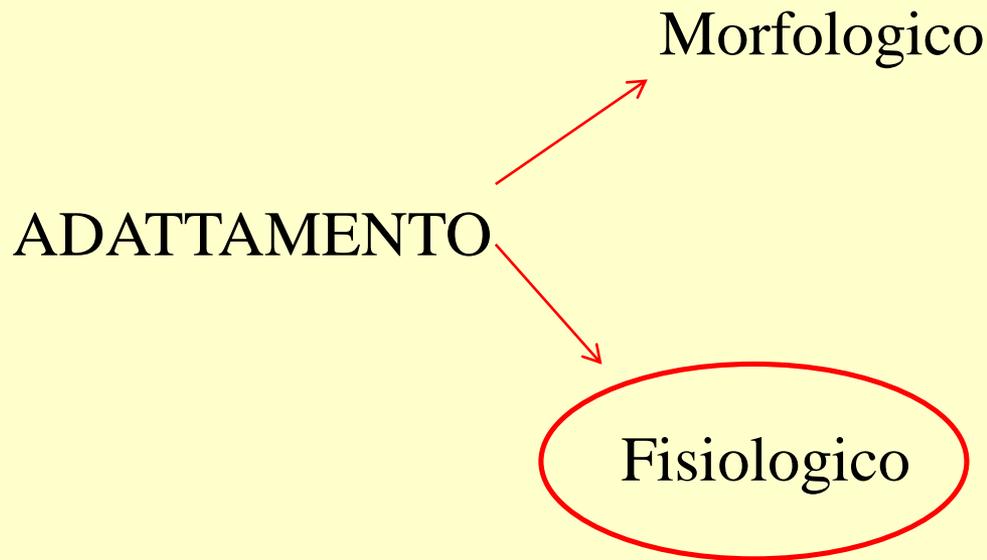
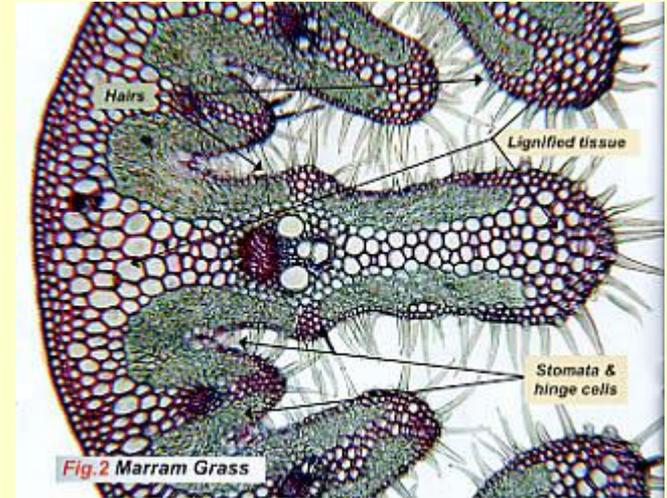


Inoltre, la comunicazione può anche essere facilitata attraverso altri organismi...

Es. le micorrize!



Comunque... vi sono due livelli di adattamento, fra loro interconnessi e cooperanti:



Come si realizza l'adattamento?



RISPOSTA

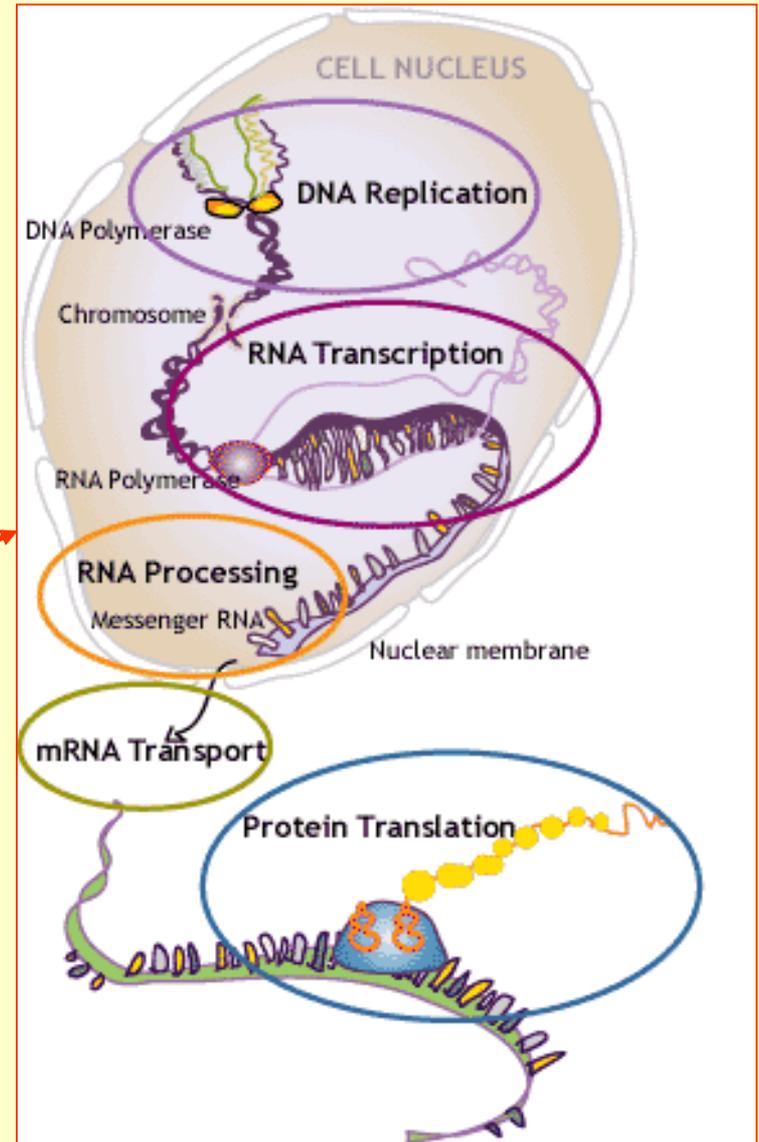


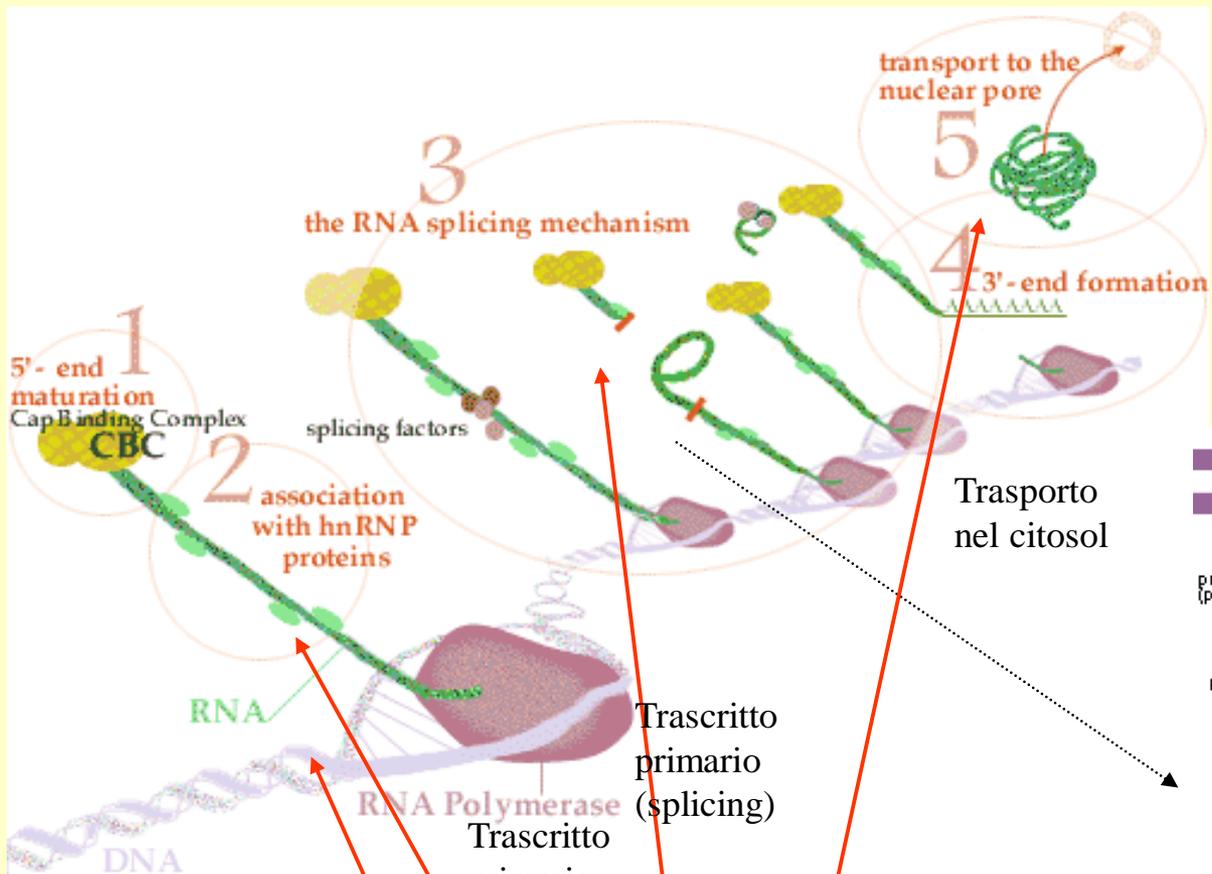
**REGOLAZIONE
DELL'ESPRESSIONE GENICA!**



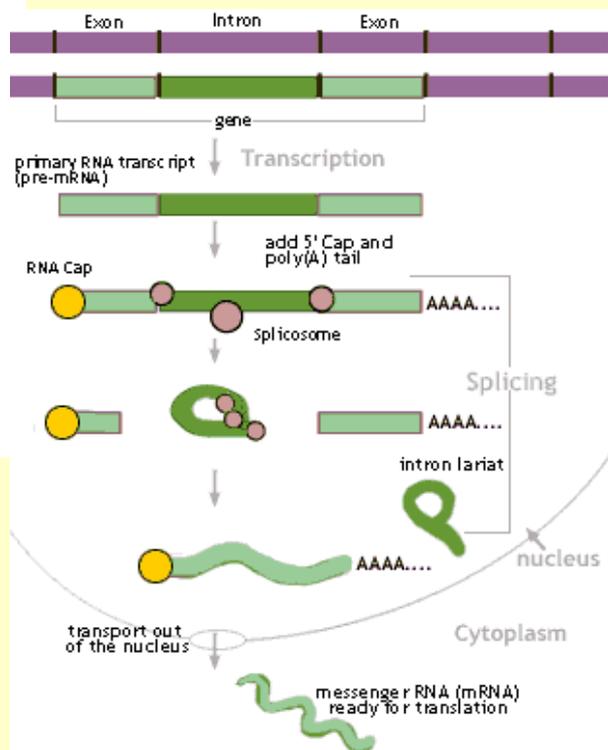
**Sintesi di opportune proteine
capaci di mediare la
“risposta”**

Trascrizione e traduzione genica sono processi che si articolano in più punti ed ognuno di questi può essere “regolato” per **variare quali-quantitativamente le proteine espresse secondo necessità.**

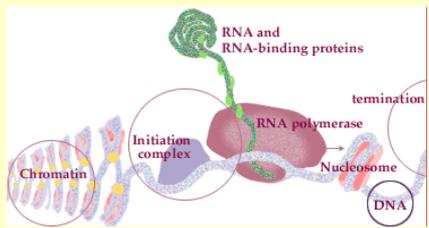




Trasporto nel citosol



Start:
Fattori trascrizionali
Decondensazione della cromatina
Ecc...

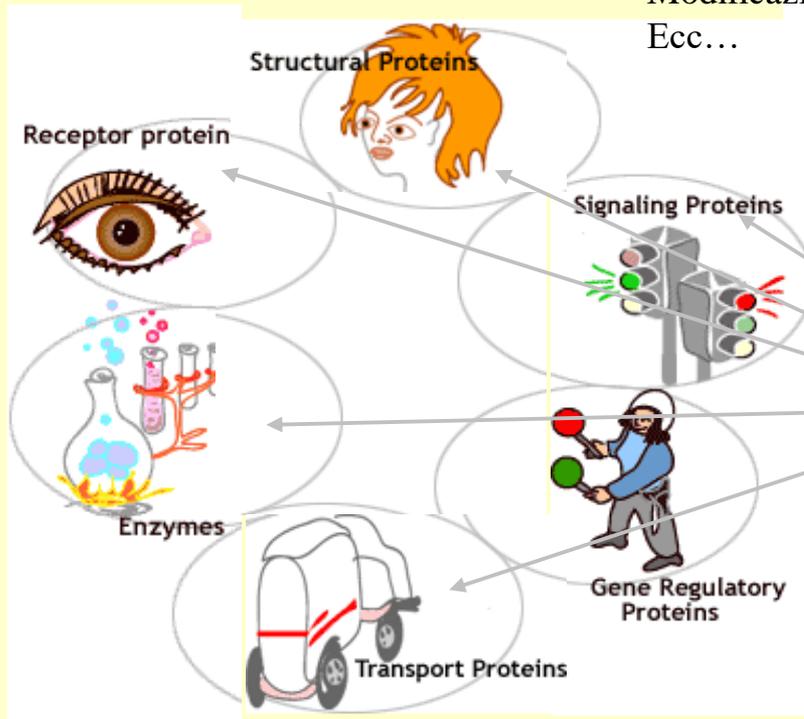
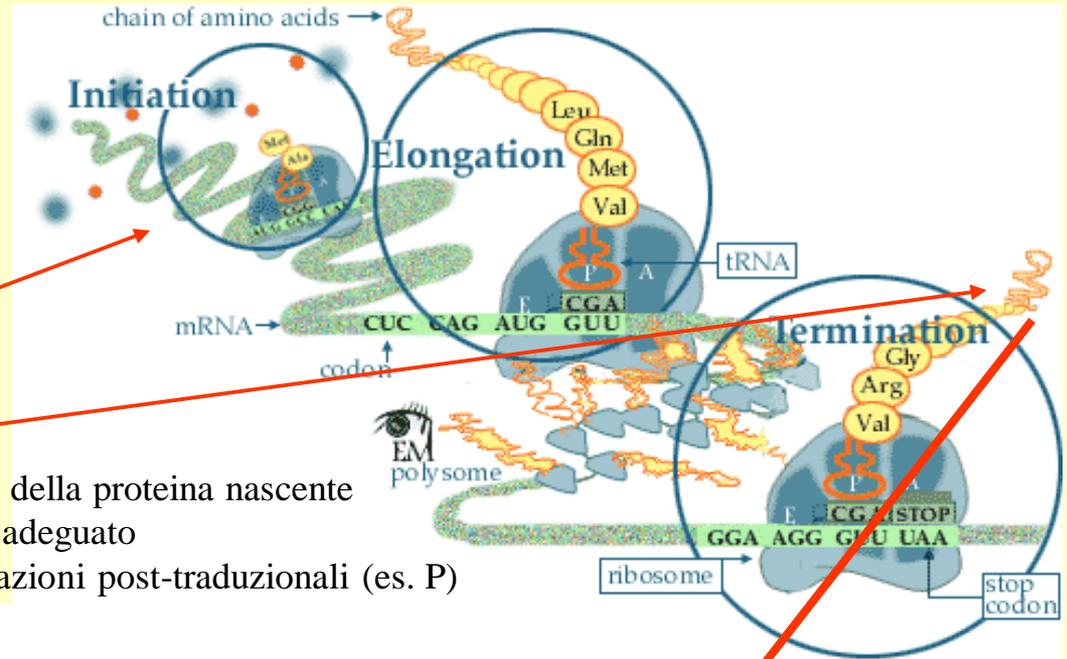


Vari livelli di "controllo" a livello della trascrizione
Segnale e poi attivazione di proteine che interagiscono con gli ac. nucleici e con i vari "fattori trascrizionali"

Anche a livello della **traduzione** vi sono **vari livelli** di **“controllo”**

Stabilità del messaggero
Ecc...

Stabilità della proteina nascente
Folding adeguato
Modificazioni post-traduzionali (es. P)
Ecc...



In ultima analisi, ciò che viene regolato è il **“corredo” proteico** della cellula in quantità e qualità:

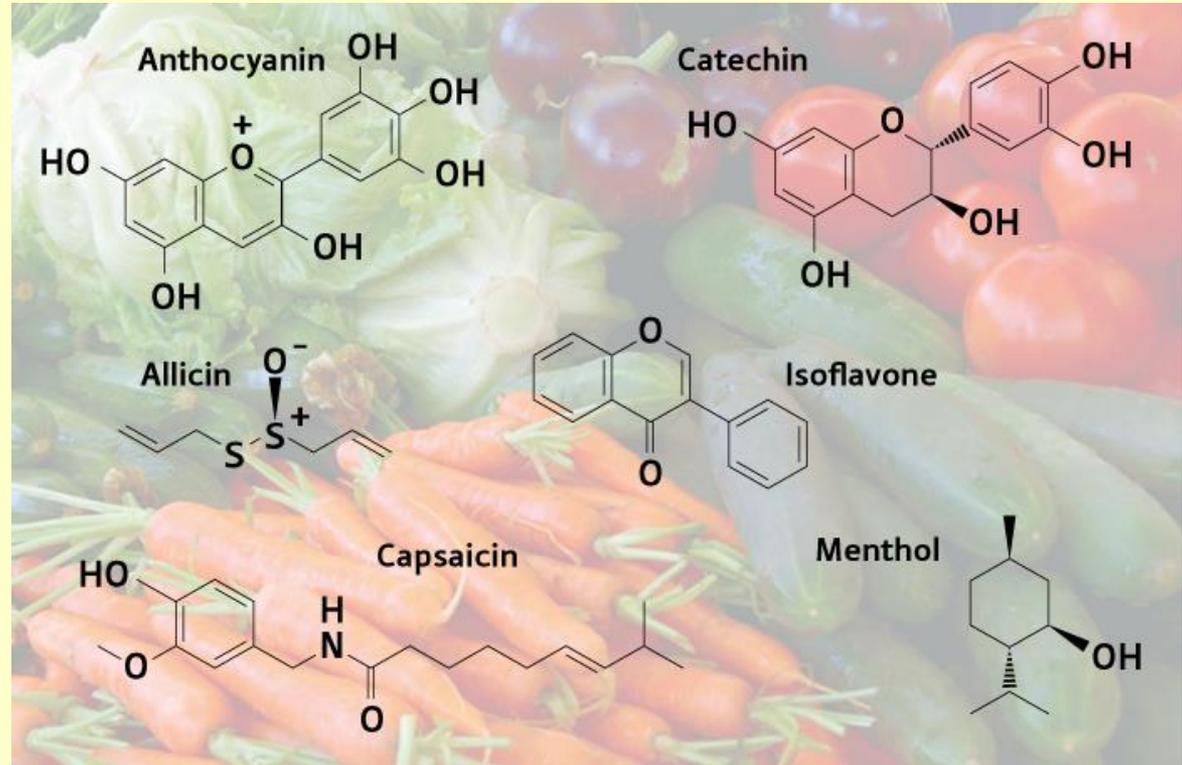
Δ [proteine funzionali]

e quindi del metabolismo cellulare in base alla risposta che deve essere generata.

Adattamento fisiologico



Variazione delle
proteine per una
determinata via
metabolica



Induzione della produzione dei cosiddetti “**metaboliti secondari**”

Infatti le piante, essendo sessili, non possono fare altro che **difendersi** dagli stress producendo:

Tossine

Deterrenti alimentari

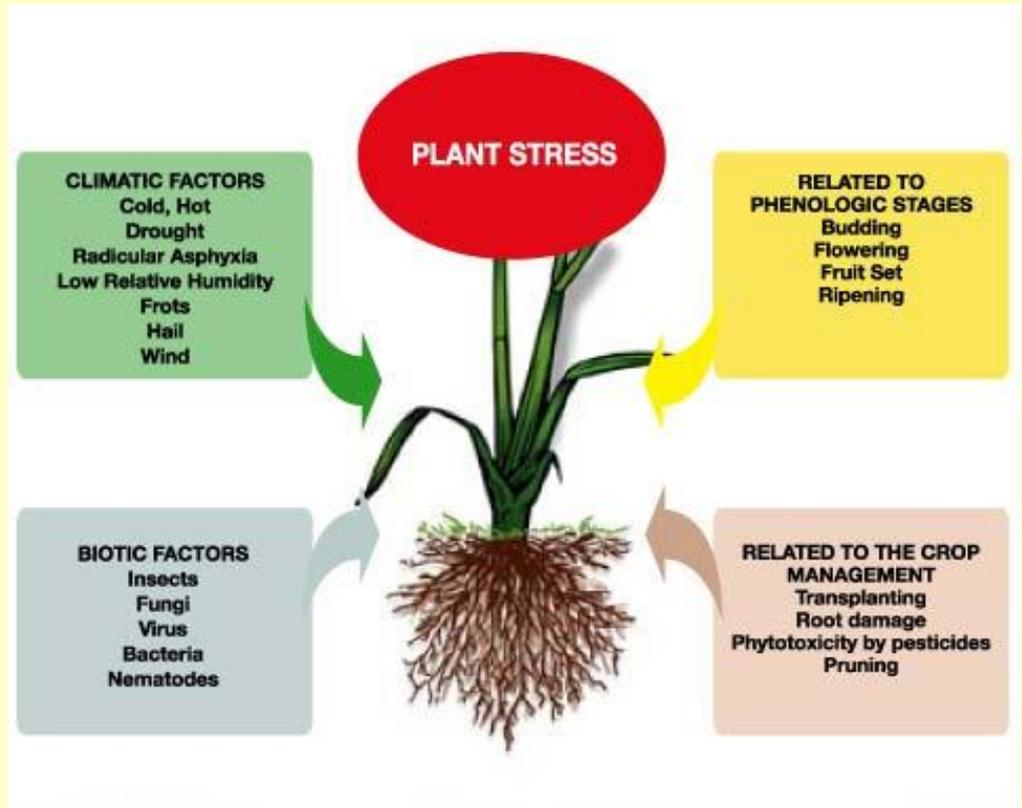
Proteine stress-related

Filtri solari

Osmoliti

Molecole detossificanti

Ecc...



Vi sono due tipi diversi di difese:

1) Difese costitutive:

sempre presenti

2) Difese inducibili:

sintetizzate **solo in caso di stress** (e specifiche per il tipo di stress): strategia per diminuire il costo della produzione delle difese.

In caso di mancato attacco o mancato stress, la pianta investe in crescita e competizione con i vicini.

Se la probabilità di stress è alta, le difese costitutive sono le più efficienti.

Se l'ambiente è molto fluttuante le inducibili sono preferite.

Alcuni esempi:

Constitutive Defenses

- Bark
 - Keeps pathogens and insects from going to the living cells underneath the bark
- Thorns
 - Reduce feeding by large herbivores by limiting the feeding rate.



Inducible Defenses

- Toxic chemicals
- Pathogen degrading enzymes
- Deliberate cell suicide



Vi sono anche due diversi tipi di reazione allo stress:

Resistenza o tolleranza?



**Prevenire (evitare) o
minimizzare lo stress**

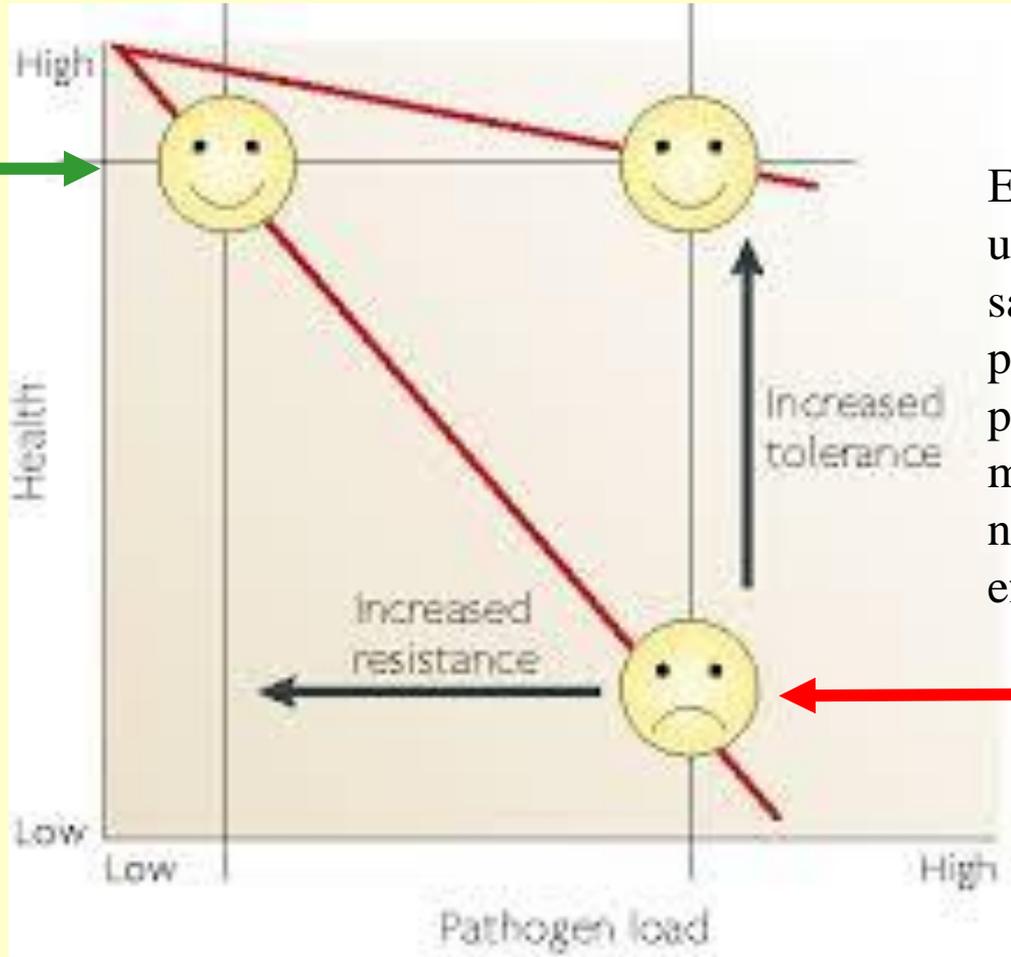


**Abilità di ricrescere e di
riprodursi usando le
risorse stoccate, riparare
lo stress**

La tolleranza è più vantaggiosa della resistenza solo quando non c'è scarsità di risorse

Esempio di resistenza e tolleranza per un attacco da patogeni

Condizione di salute



È possibile tornare ad una condizione di salute sconfiggendo il patogeno (es. produzione di molecole che ne neutralizzino gli effetti)

Condizione di malattia

È possibile tornare ad una condizione di salute scappando dal patogeno (es. formazione precoce dei semi, abscissione degli organi attaccati)

... fra tutti gli stress possibili, quale è il più temuto??
Le piante devono soprattutto costantemente difendersi dai **nemici naturali!**

Quindi i metaboliti secondari sono primariamente deputati a tale funzione, oltre che allo stress abiotico

Gli **erbivori**, soprattutto quelli delle radici, possono essere molto importanti nel determinare:

Abbondanza

Diversità

Successione

delle piante



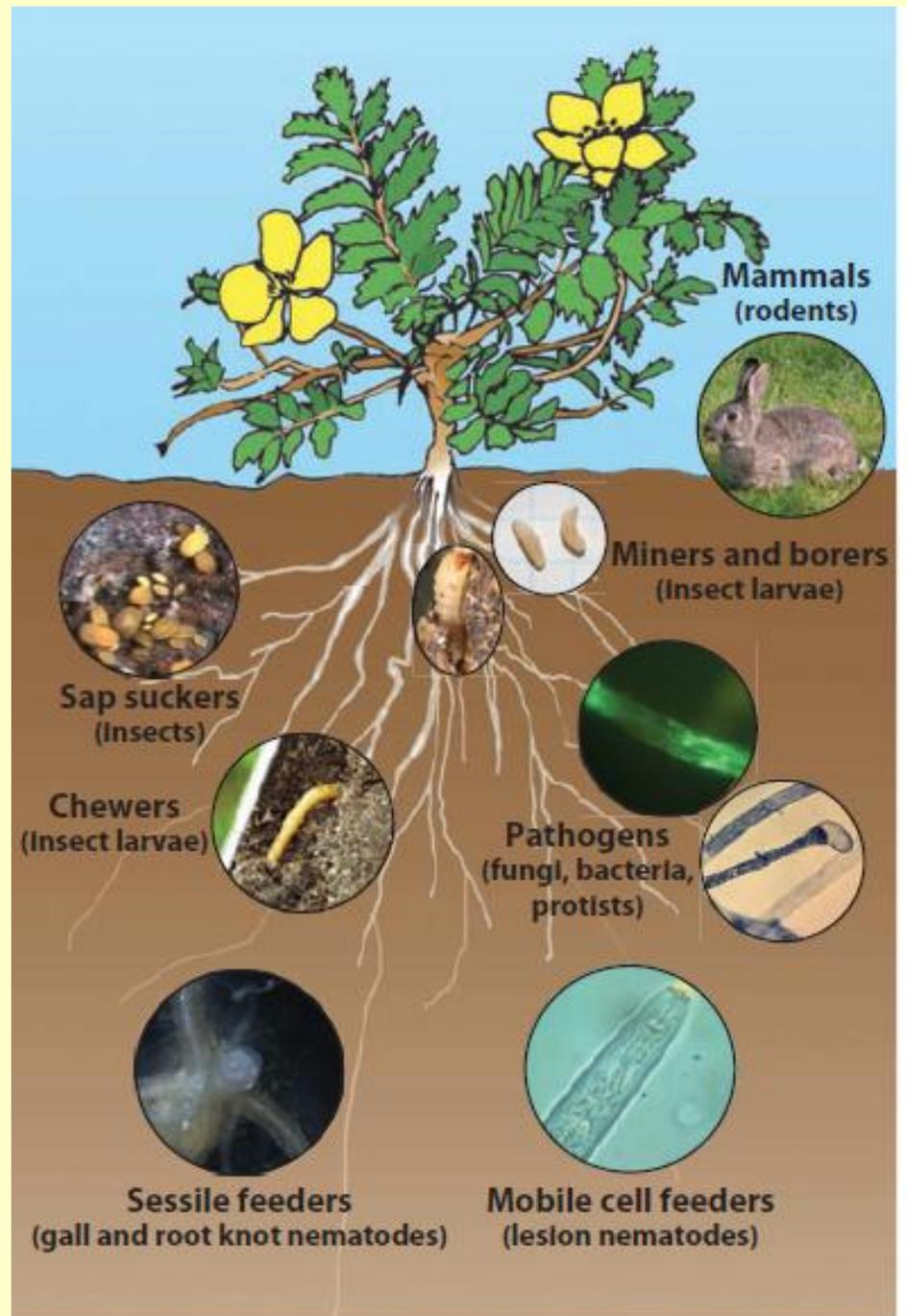
Infatti sono loro quelli ad essere utilizzati nelle lotte biologiche!

Comunque, le radici sono considerate nutrimento “inferiore” per gli organismi eterotrofici perchè contengono meno N rispetto alle parti aeree.

(Infatti non si difendono con gli alcaloidi!)

Tuttavia **vi è una grande diversità di organismi che si nutre parzialmente o totalmente delle radici**

Evoluzione di difese diverse a seconda del diverso stress biotico!



Sebbene radici e parti aeree abbiano un interesse comune (la sopravvivenza dell'individuo), le loro funzioni e l'ambiente in cui vivono sono assai diversi....

Diversa pressione ambientale, evoluzione diversa e diverse difese...

Table 1 Comparison of the primary roles of roots and shoots

Function	Roots	Shoots
Resource acquisition	Water Nutrients: macro and micro elements	Carbon: CO ₂ Light
Structural functions	Anchoring in the soil Storage: tap root, root tubers	Provide photosynthetic surface area: leaves, pericarp Support flowers, fruits and leaves: stems, petioles Storage: succulent leaves
Reproductive functions	Asexual: root tubers, root fragments	Sexual: seeds, spores Asexual: adventitious buds, stolons/ rhizomes and their tubers, bulbs, corms

Riguardo agli ambienti dove radici e parti aeree si trovano, **il suolo è molto più eterogeneo (e quindi più stressante) dell'atmosfera** in termini di:

Nutrienti

acqua

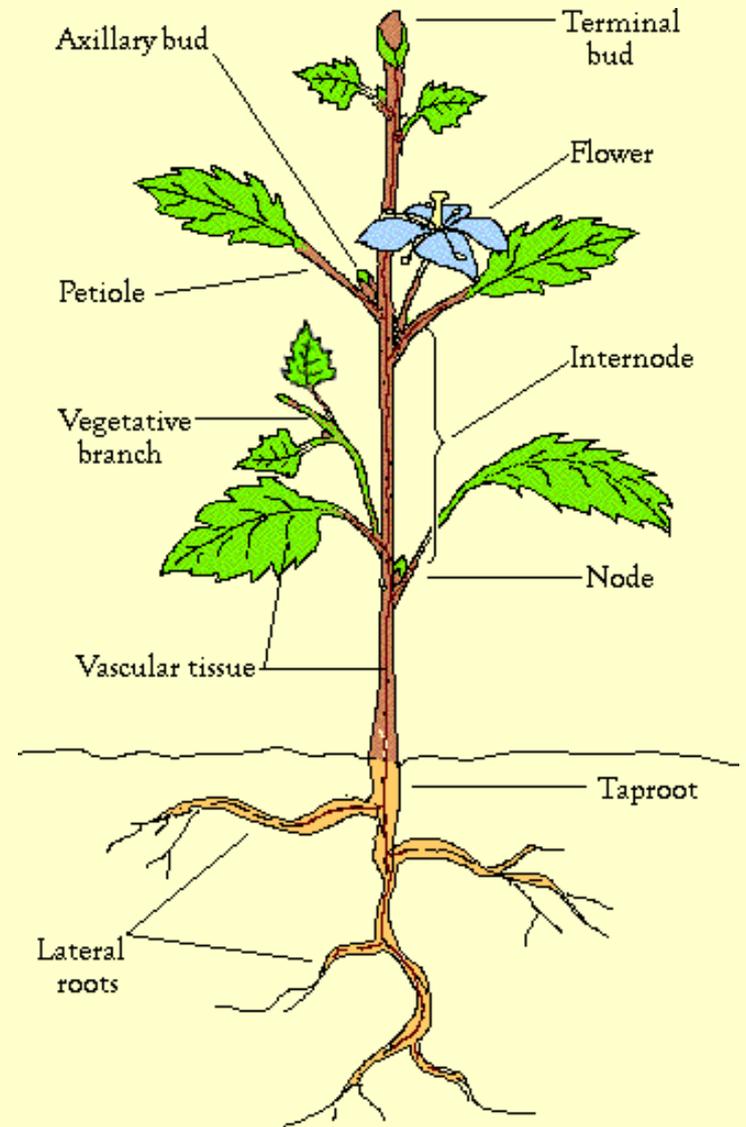
Ossigeno

distribuzione degli erbivori, dei patogeni e delle specie competitive.

Inoltre **il suolo è denso**:

Differente evoluzione del tipo di difese e quindi di metaboliti secondari!

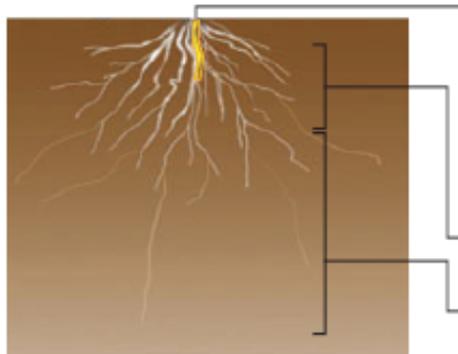
es. Volatili e fototossine per la parte aerea, difese ben diverse dalla radice, per lo più molecole solubili....



Concetto di difesa ottimale

Seguendo il concetto della **difesa ottimale**, la parte di **radice** più preziosa è anche quella più protetta e contiene i livelli più alti di difese.

Spese per la costruzione e
spese per la difesa!



Typical root system

Root class	Vulnerability	Value per unit/individual	Construction costs	Expected defense
Main root	Medium	High	High (structural strength)	High (chemical and structural)
Lateral roots	Medium	Medium	Medium	Variable (chemical)
Fine roots	High	Low (high turnover)	Low	Low (chemical)

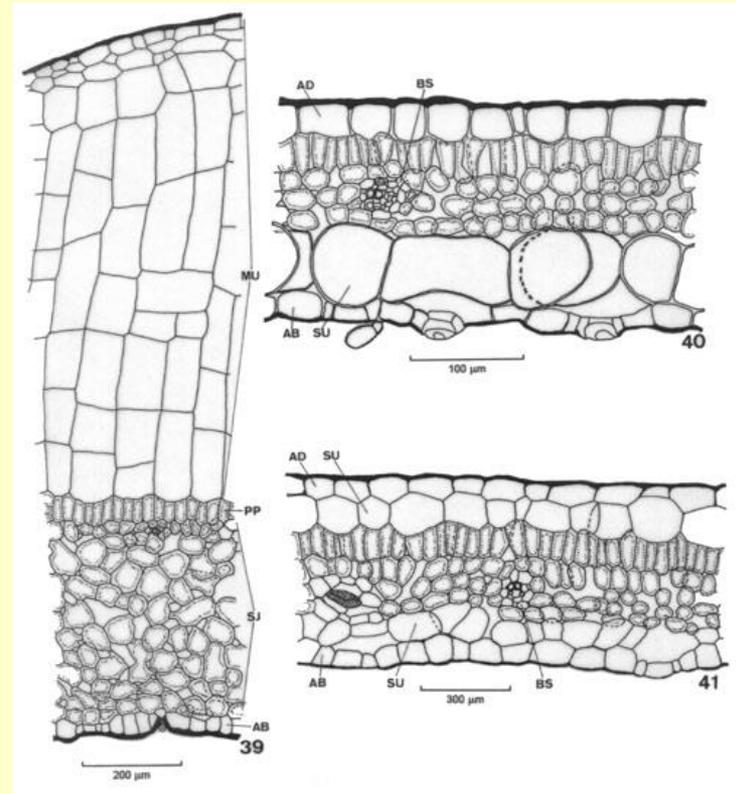
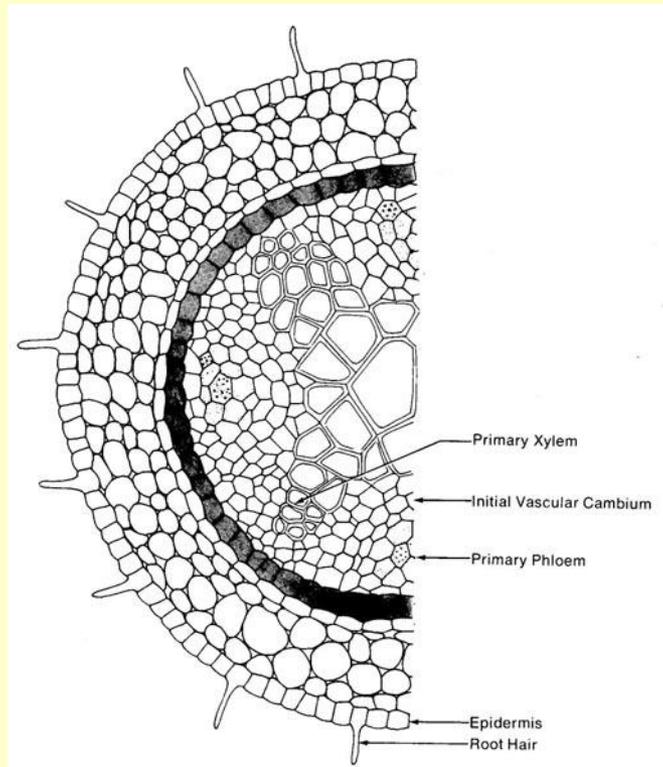
Figure 2

Le radici principali sono quelle più difese perché essenziali per il trasporto a lunga distanza dell'acqua e dei nutrienti.

Nella **parte aerea** la parte più vulnerabile e più difesa è rappresentata dalle **gemme** (e dai **semi!**)

Distribuzione delle difese:

Sotto lo strato più esterno della radice e della parte aerea!!!



Nelle radici, alcune volte difese troppo efficienti possono addirittura inibire la simbiosi con le micorrize!

Comunque, che lo stress e le interazioni varie siano biotiche o abiotiche, l'adattamento e le difese sono sempre a carico del:

METABOLISMO SECONDARIO DELLE PIANTE

Isoprenoidi e Terpeni

Composti fenolici

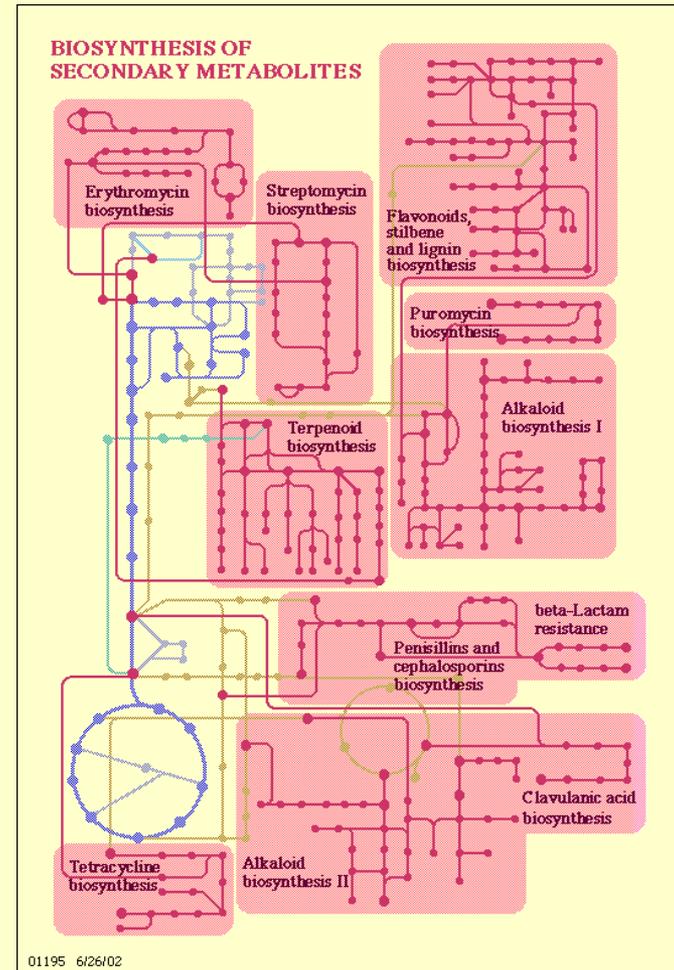
Alcaloidi

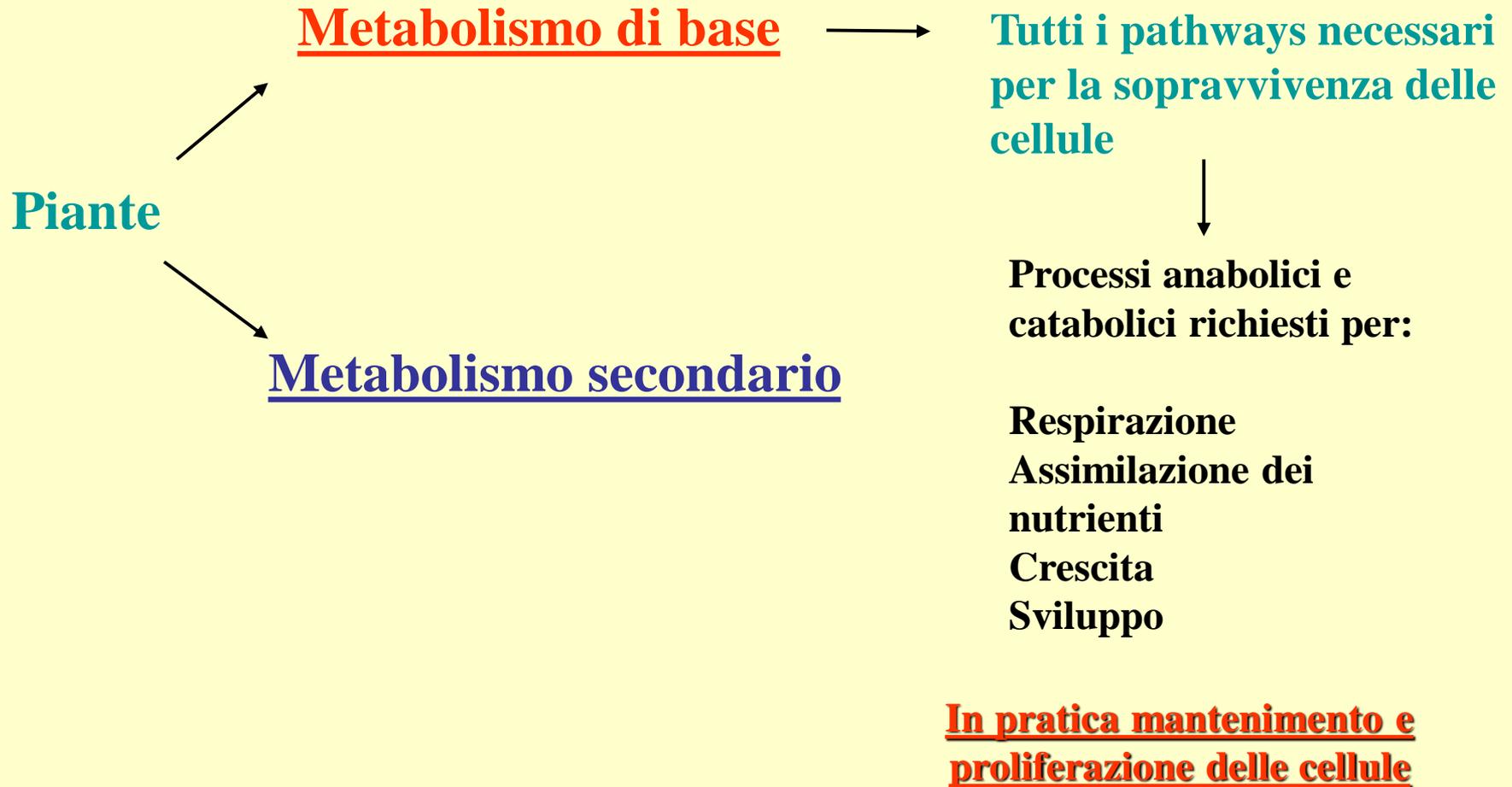
Polisopreni

Polimeri della gomma

Glicosidi

Aminoacidi rari





Metabolismo di base

Piante

Sovrapposizione,

a volte non è chiaro come un prodotto venga sintetizzato, altre un prodotto secondario può essere riconvertito in primario

Metabolismo secondario

Un'infinità di prodotti....
ma una certa specificità di
produzione sia in termini
“sistematici” che di
“localizzazione” e di sviluppo

I prodotti del metabolismo secondario sono presenti solo in cellule speciali differenziate e non sono necessari per la sopravvivenza della cellula stessa ma lo possono essere per quella dell'intera pianta.

Esempi: pigmenti floreali, profumi, ecc...

Molti sono tossici (quelli contro lo stress biotico spesso fanno male anche alla pianta stessa)

Stessa localizzazione e stessi metodi di auto-protezione:

Vescicole o vacuoli per detossificazione (es. epidermide e tricomi)

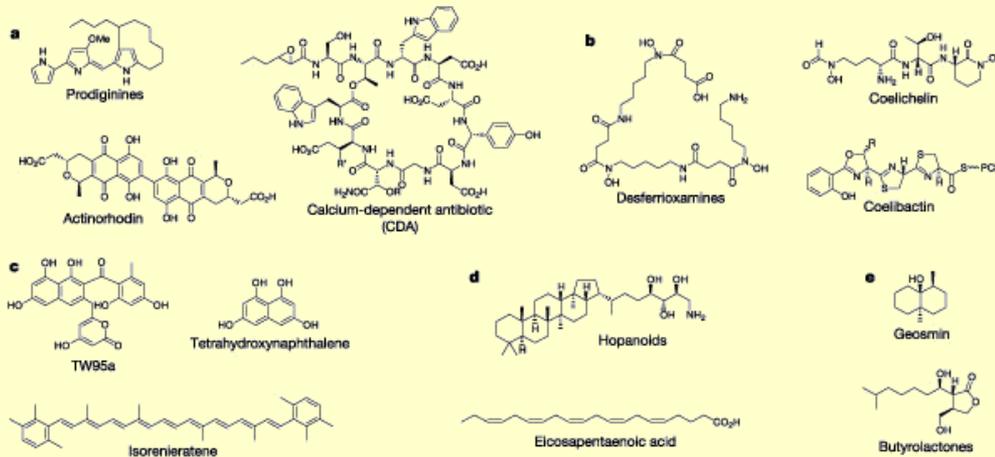
Dal «punto di vista umano», i **metaboliti secondari** (o prodotti naturali delle piante) determinano il **colore, l'odore ed il sapore dei vegetali**, possono avere **effetti benefici o dannosi sulla salute** dell'uomo e degli animali e sono la base per la **ricerca farmacologica**.

Nel contesto dell'adattamento delle piante all'ambiente svolgono numerose funzioni....



Alcuni esempi di metaboliti secondari e loro funzioni

Sono tantissimi perché tantissime sono le loro funzioni!!!!



Ormoni

Comunicazione
fra cellule

Crescita e sviluppo
della pianta

Pigmenti non fotosintetici

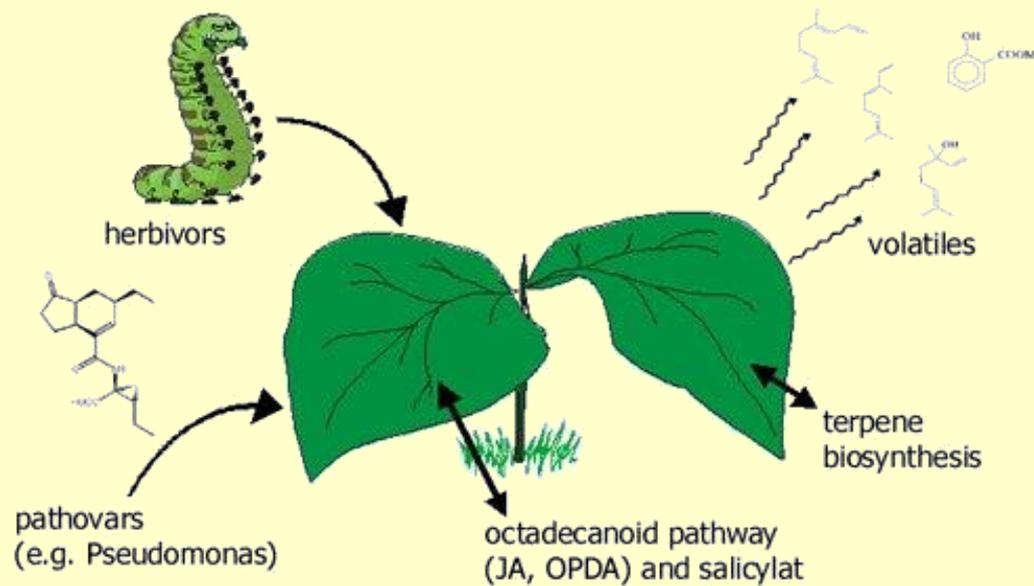
Comunicazione con
gli impollinatori

Comunicazione con
batteri azoto-fissatori

Metaboliti vari per risposta allo stress e adattamento

Es: stress da freddo, da alte temperature, stress salino, stress da UV.....

Alcuni esempi di metaboliti secondari e loro funzioni



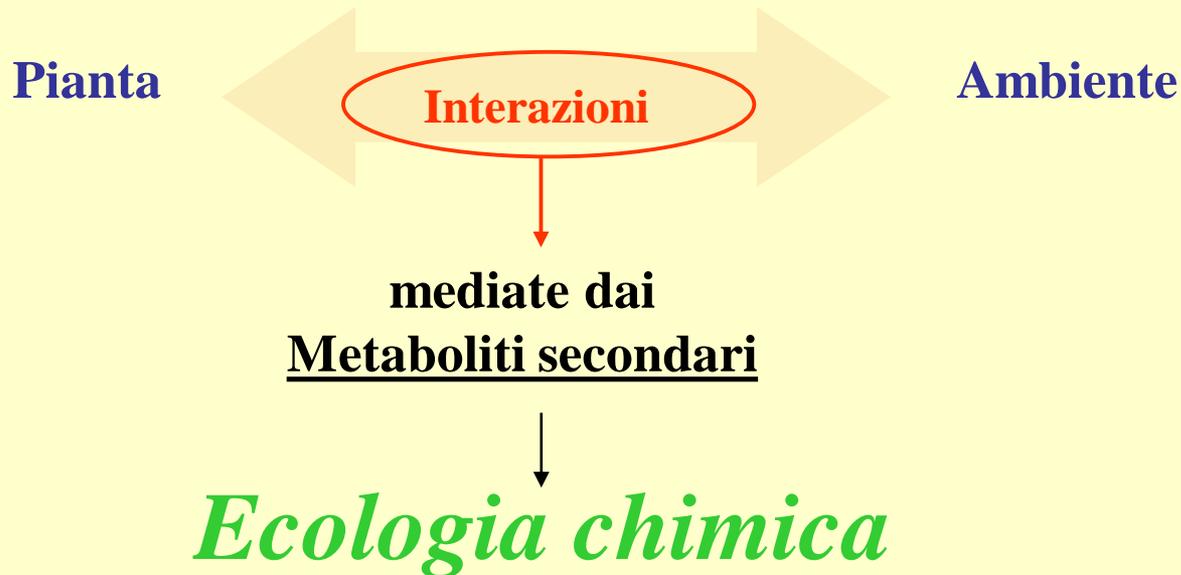
Sostanze deterrenti

Deterrenza da erbivori e patogeni
(anticoagulanti, antibiotici)

Prodotti farmaceutici e droghe varie
(pozioni e veleni!)

Sostanze allelopatiche

(contro germinazione, crescita
e sviluppo di altre piante)



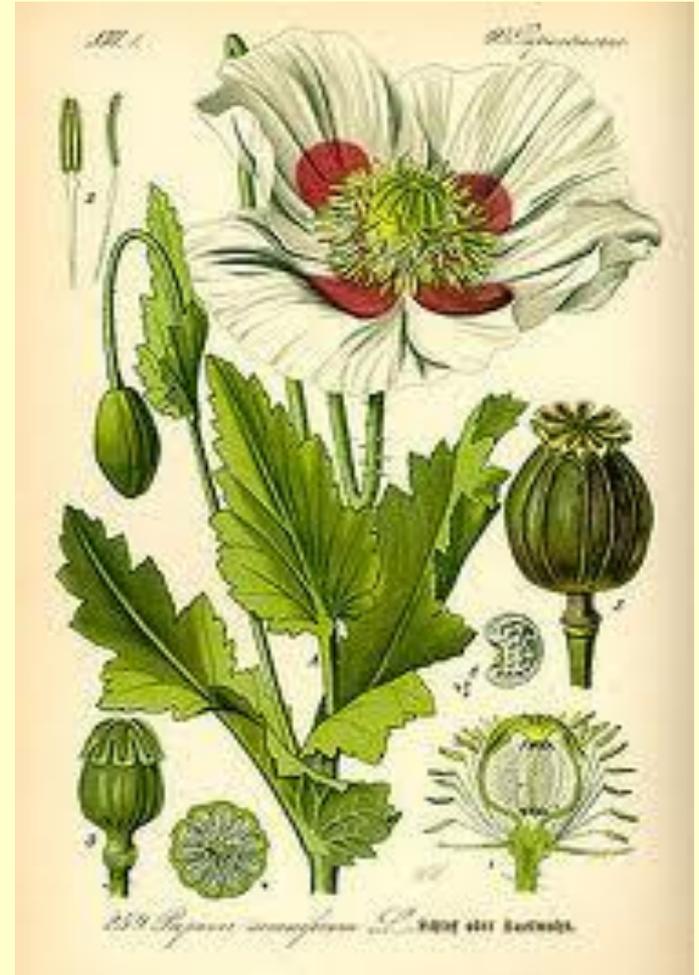
(Oltre al ruolo fisiologico che tali sostanze hanno per regolare crescita e sviluppo della pianta stessa.)

Comunque, non solo biochimica e scienza delle piante ma molte altre discipline come ad esempio **medicina** ed **ingegneria dei materiali**.

Infatti, l'importanza dei metaboliti secondari è da molto tempo nota alla storia del genere umano...

Ad esempio, il *Papaver somniferum*, la fonte originale di morfina e codeina, era già noto (e coltivato) ai Sumeri nel **4000 BC** come “pianta della gioia”.

Questi due alcaloidi probabilmente furono evoluti dal genere *Papaver* originariamente come composti difensivi contro gli erbivori (adesso li produce per farsi coltivare!!!!).



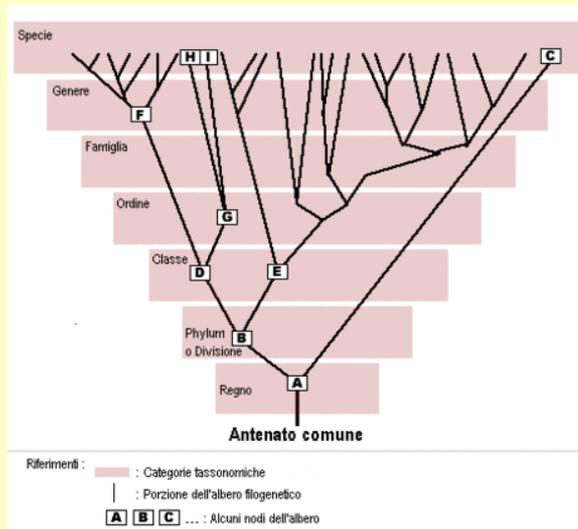
La struttura chimica dei composti secondari è complessissima.



Alta eterogeneità



Chemotassonomia



Comunque, la maggior parte di questi sono **derivati di aminoacidi** o **nucleotidi** (stesso scheletro carbonioso opportunamente modificato).

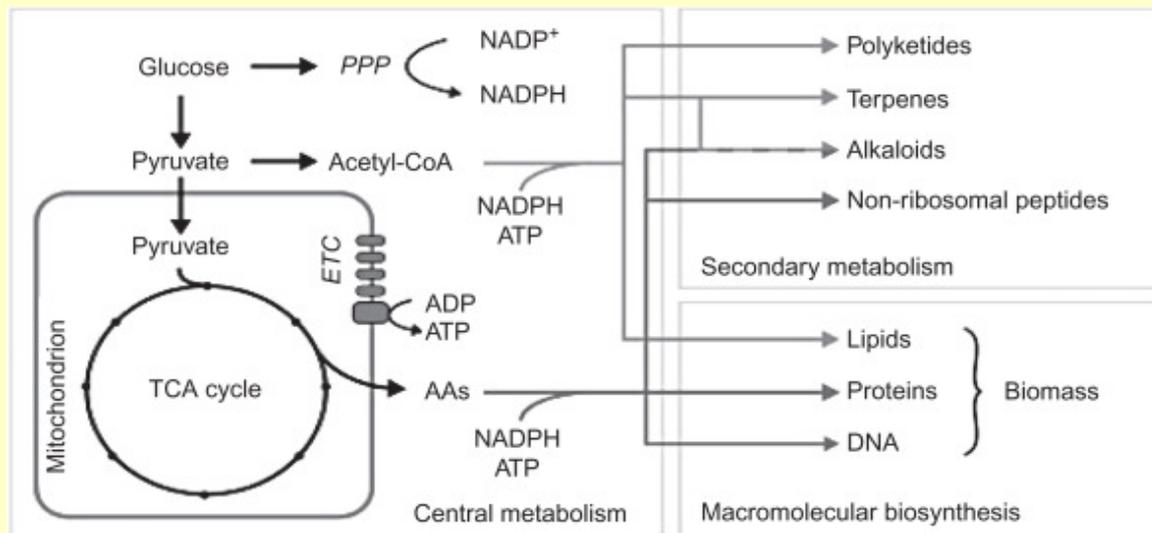
Piccole modificazioni chimiche come metilazioni, idrossilazioni o inserzione di uno ione metallico ecc.. possono portare ad un ampio spettro di sostanze funzionalmente differenti



Sintesi in pochi semplici passi da metaboliti primari.



Funzione!!!



...caratteristiche
chimiche
specifiche e
specifica
funzione!

Chemical characteristics	Interactions	Functions
Availability of electrical charge	Electrostatic	Structure-stabilizing
Presence of – COOH, –OH, –NH ₂ , 	Covalent bonding: polymerisation, condensation, complexation	Structure-stabilizing (cell wall-strengthening) Antimicrobial (blocking of active sites) Hypersensitive response (HR)
Availability of conjugated double bonds (delocalized π-electrons) in: 	Light and UV- absorbance Energy dissipation	Photoprotective
Availability of – NH ₂ , – SH, – OH, – CH – CH = CH – CH = (unsaturated carbon chains)	H and electron transfers	Antioxidant Antiradical

Sebbene i metaboliti secondari siano molto comuni...

...non significa che ogni pianta possa sintetizzare ogni prodotto

Alcuni prodotti sono caratteristici di singole specie o generi,
ma anche il contrario (convergenza evolutiva)

Sono quasi sempre **specifici di determinati organi**

Spesso in uno **specifico tipo di cellule**

E solo in un **determinato compartimento cellulare**

Sono spesso generati solo durante **uno specifico stadio di sviluppo**
della pianta

Le famiglie più importanti che compongono l'arsenale di metaboliti secondari sono:

Alcaloidi
Isoprenoidi (terpeni)
Polimeri della gomma
Fenoli
Tannini
Glucosidi
Ammine

Massima
diversità
strutturale:
ben **30000**
molecole
diverse
conosciute!

Queste sostanze sono spesso glicosilate (aggiunta di un residuo glucidico ad un aglicone).

Aumento della solubilità per detossificazione e storage

L'elevata eterogeneità dei metaboliti secondari presuppone un'altrettanto alta **eterogeneità di grandi famiglie geniche per gli enzimi delle loro biosintesi**

Come è sorta tale diversità?

E' adattativa? Cioè si è evoluta come risultato della pressione ambientale?

Perchè questa diversità viene mantenuta?

La *variabilità genetica naturale* può causare variazioni
quantitative

(quanto di un determinato metabolita?)

e **qualitative**

(con quale struttura chimica?)

nel metabolismo secondario delle piante.

Variazioni quantitative  Abbondanza di trascritto

Variazioni qualitative  Evoluzione di pathways divergenti

Evoluzione dei pathways del metabolismo secondario

I° ipotesi: enzimi tipici del metabolismo primario “per caso” sono stati capaci di catalizzare la formazione anche di metaboliti secondari.

II° ipotesi: enzimi specifici per le biosintesi del metabolismo secondario sono apparsi durante il corso dell'evoluzione.



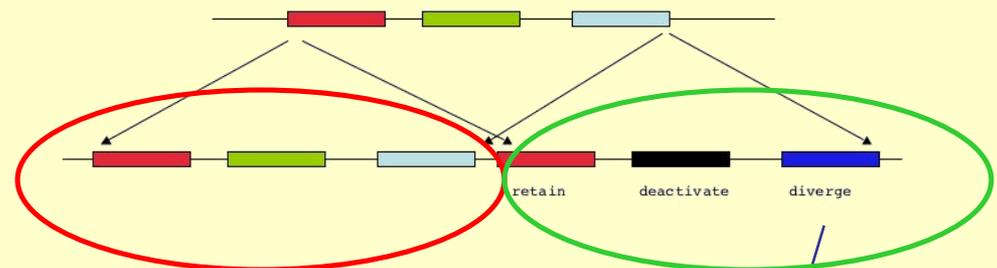
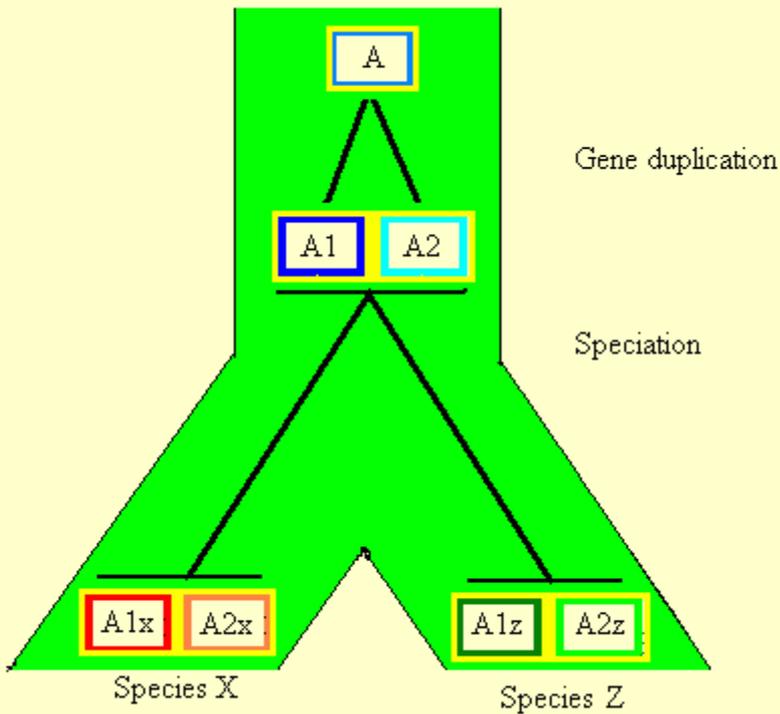
Molto probabilmente la più corretta:

il metabolismo secondario non deriva per sbaglio dal primario!

Ed in effetti ha una sua specifica funzione!

Evoluzione dei pathways del metabolismo secondario

Duplicazioni di clusters di geni per uno stesso metabolismo e poi **divergenza**



Vecchia funzione

Nuova funzione

Basta una mutazione minima nella sequenza aminoacidica dell'enzima per cambiare funzione!

Evoluzione dei pathways del metabolismo secondario

Duplicazione genica seguita da neofunzionalizzazione o conflitto adattativo risolto dalla duplicazione genica?



In ogni modo, sicuramente i “geni vecchi” vengono sempre mantenuti per garantire una adeguata diversità genica: l’ambiente non è statico!
Chi è troppo specializzato ha poca riserva genica e soccombe...

Evoluzione dei pathways del metabolismo secondario

Esempio di “quando” è cominciata l’ “esplosione” evolutiva dei geni del metabolismo secondario.

Molte delle vie del metabolismo secondario prevedono **reazioni di ossidazione**.

Molte di queste sono catalizzate dalle **Monossigenasi Citocromo P450 dipendenti**.



Monoossigenasi:



Citocromo P450



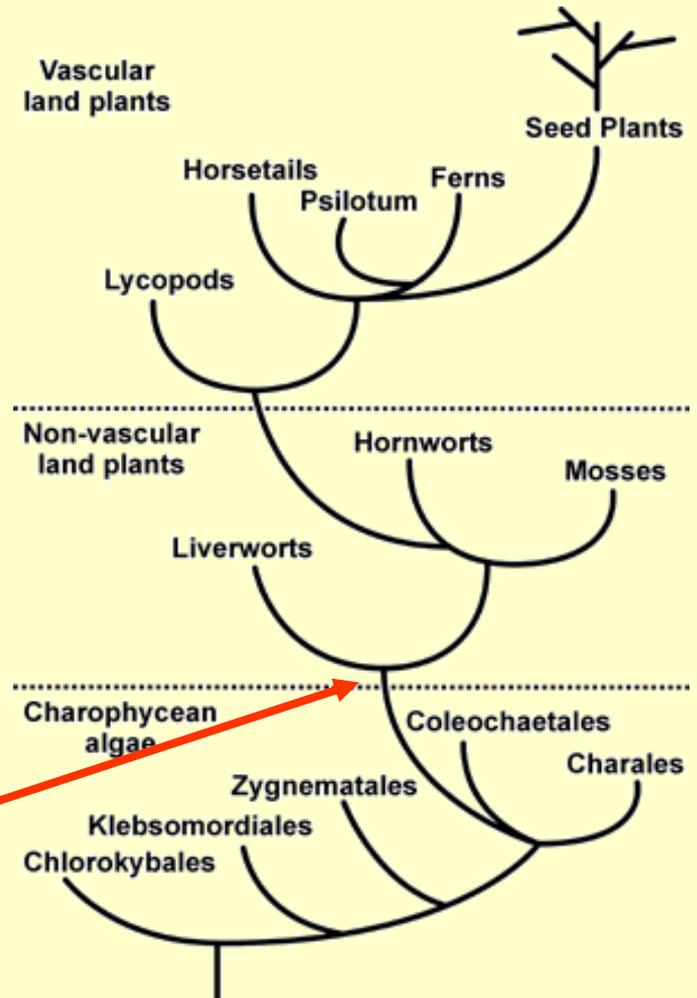
In una pianta sono stimate esservi più di **300 isoforme di Cyt P450!**

che catalizzano altrettante reazioni di ossidazione!

Un **Cyt P450 ancestrale** è stato predetto esistere **prima** della presenza di **O₂** nell'atmosfera.

L'inizio dell'**esplosione evolutiva** di questo citocromo, come anche degli altri enzimi del metabolismo secondario, è databile al momento in cui aumentarono le **interazioni ecofisiologiche** e quindi...

.....la diversificazione dei metaboliti secondari avvenne quando le piante colonizzarono le terre emerse, circa 400 milioni di anni fa!



Al momento della colonizzazione delle terre emerse, si è evoluta prima la radice o la parte aerea?

460 milioni di anni fa:

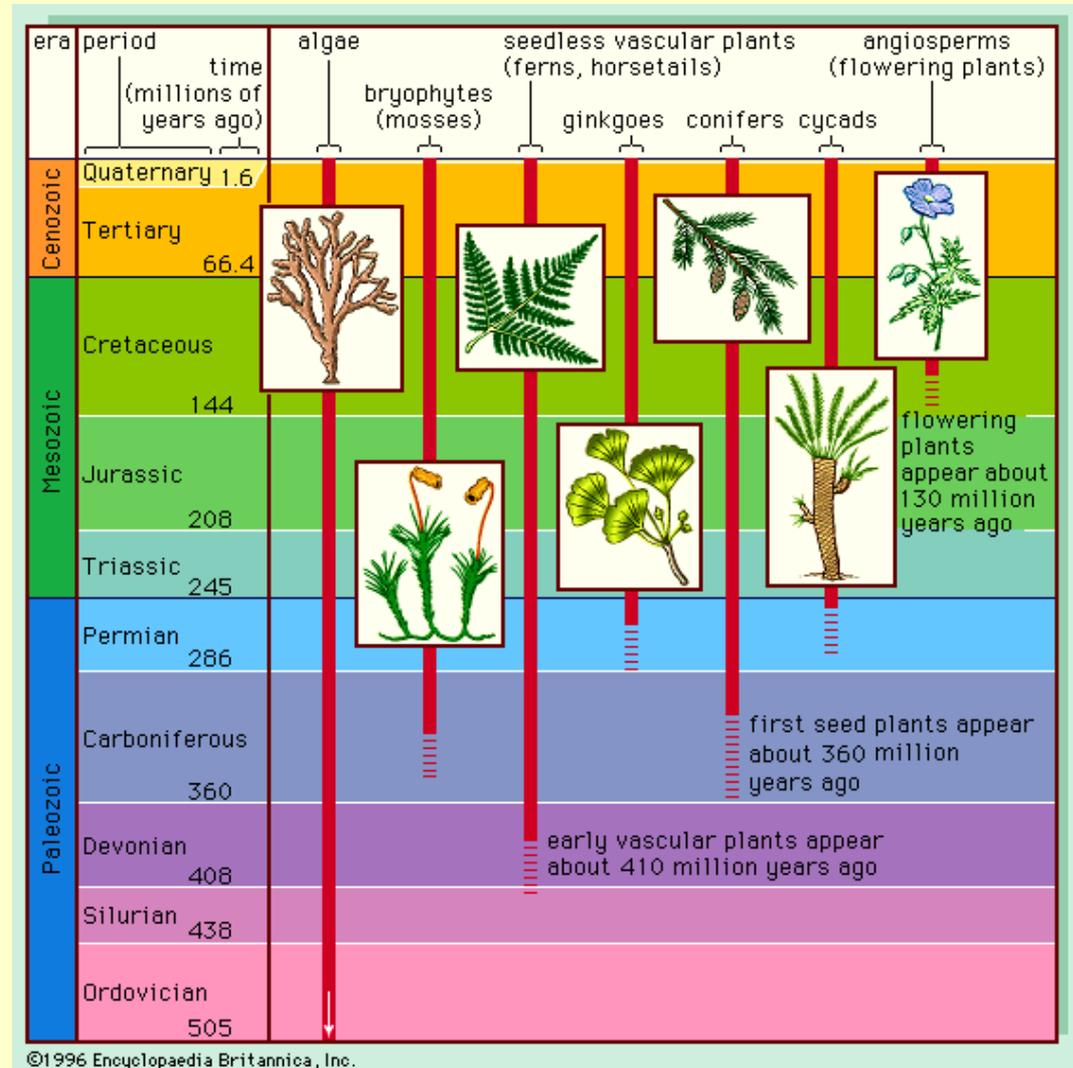
La prima specie vegetale emerse dall'acqua per colonizzare la terra, non aveva né radici né foglie vascolarizzate

420 milioni di anni fa:

Primo fossile di pianta con parte aerea

390 milioni di anni fa:

Primo fossile con anche la radice, evolutasi da strutture della parte aerea simili alle radici, come ad esempio i rizomi.



**La diversificazione delle piante in composti secondari
è tuttora in corso e non si arresterà mai!**

**L'evoluzione non si arresterà mai... e la co-
evoluzione la farà andare ancora più veloce!!!!**

Solo un esempio:

Coevoluzione piante insetti.

La **co-evoluzione è una interazione
evolutiva reciproca tra una pianta ed
uno o più dei suoi nemici naturali ed
avviene in modo ciclico.**



**Ogni qualvolta un insetto acquista la capacità di tollerare
un composto tossico contenuto in una pianta, questa lo
modifica ulteriormente per fargli riacquistare la sua
valenza ecologica.**

La **reiterazione di questo processo nei millenni spiega la
vastità di strutture chimiche dei metaboliti secondari.**

Esempi di co-evoluzione in sistemi pianta-nemici naturali

Plant defence	Plant taxon	Natural enemy	Counter-resistance
Toxic furanocoumarins	Umbelliferae	Black swallowtail butterfly	Cytochrome P450 detoxifying enzymes
Toxic amino acids	Various Leguminosae	Bruchid weevil	Modified tRNA synthetase
Trichomes	<i>Solanum</i>	Ithomiid butterfly	Silk scaffolding
Latex	<i>Asclepias</i> (milkweeds)	Monarch butterfly	Leaf-vein-cutting and others behaviour
Enlarged fruits	Sapindales	<i>Jadera</i> bugs	Elongated mouthparts
Chitinase	<i>Arabis</i> (Cruciferae)	Fungal pathogens	Chitinase inhibitors
Hypersensitive response	Several taxa	Fungal and bacterial pathogens	Modification of elicitor proteins
R genes			
Mutualism with predacious ants	<i>Acacia</i>	<i>Polyhymno</i> (Gelechiid lepidopteran)	Shelter construction

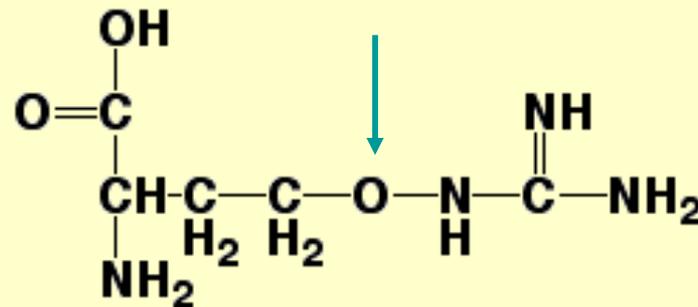


Un esempio:

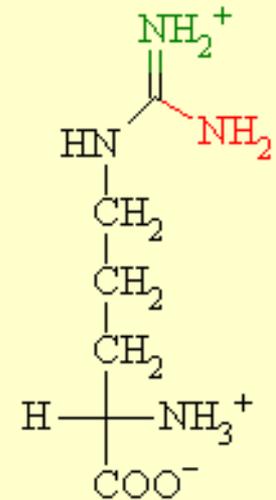
Semi di *Dioclea megacarpa* contengono l'AA non proteico L-canavanina

Sono tossici per la maggior parte degli insetti.

L'**arginil-tRNA sintasi** non discrimina l'**argina** dalla **canavanina** e l'incorpora quindi nelle proteine che in tal modo non funzionano!



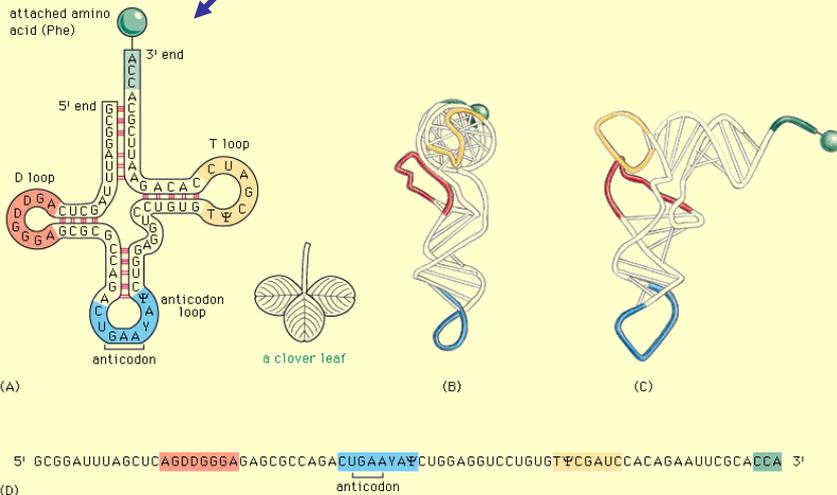
Canavanina



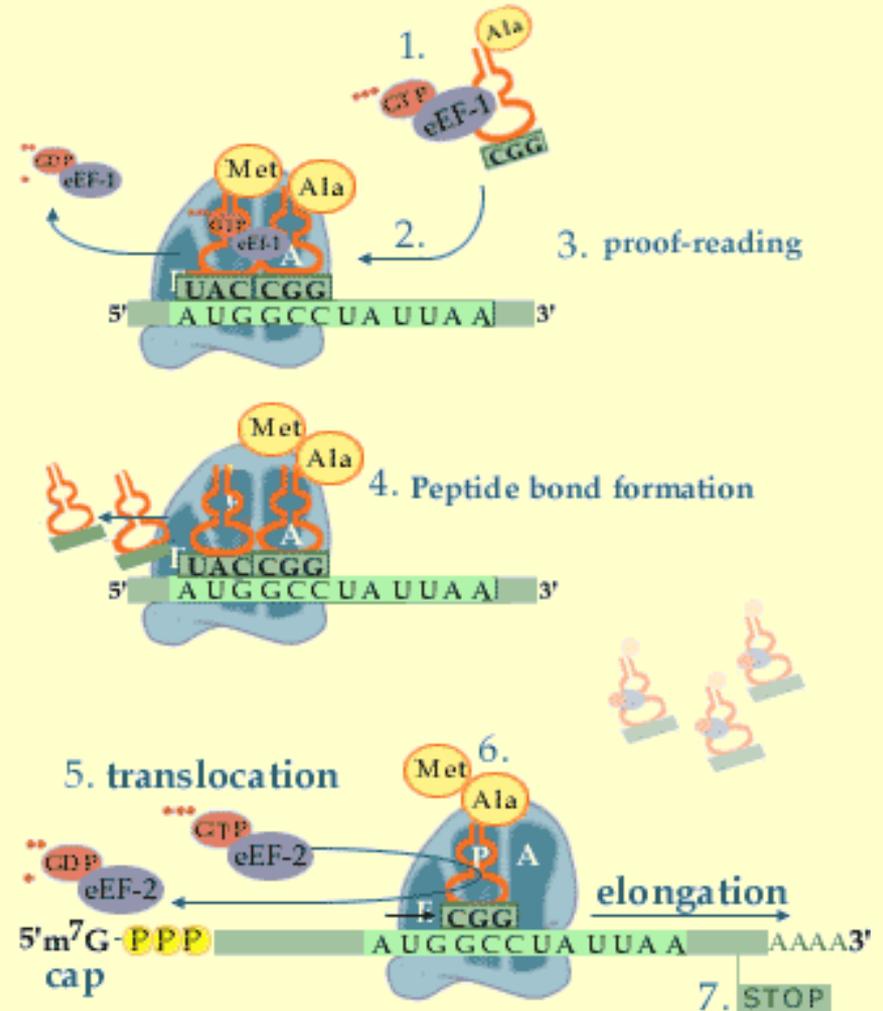
Arginina

Tuttavia, il bruco di scarafaggio *Caryedes brasiliensis* si nutre esclusivamente di tali semi e non muore!

Ha evoluto una **tRNA sintasi modificata** che riesce a distinguere fra l'arginina e la canavanina e sintetizza il **giusto tRNA** che permette una funzionale sintesi proteica.



©1998 GARLAND PUBLISHING

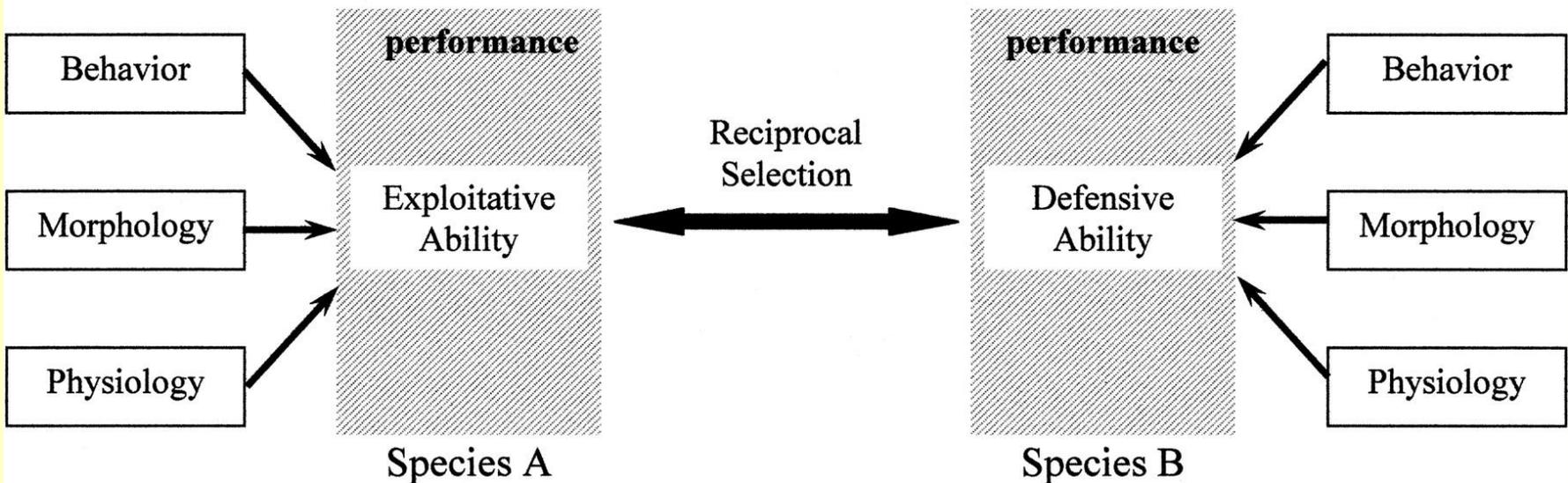


CO-EVOLUZIONE =

...la guerra

...dei geni!

The Phenotypic Interface of Coevolution

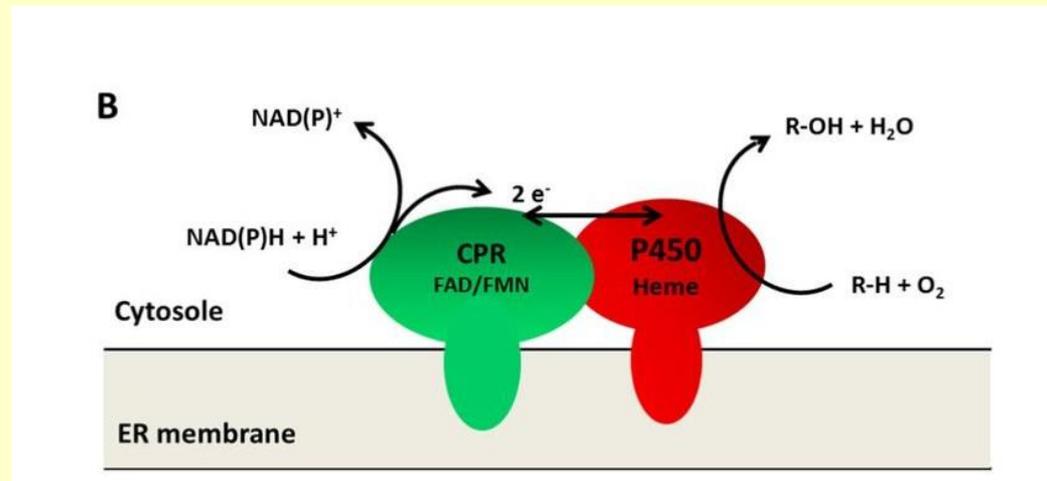


The phenotypic interface of coevolution. Fitness of each individual involved in interspecific interactions is determined through reciprocal selection both caused and experienced by the phenotypes that mediate the interaction. This phenotypic interface typically involves performance traits that comprise a variety of behavioral, morphological, and physiological components determined by the continuous evolution of new genes....

Diversità e regolazione delle vie del metabolismo secondario

Molto spesso, gli enzimi delle vie del metabolismo secondario si trovano compartimentalizzati in vario modo all'interno della cellula.

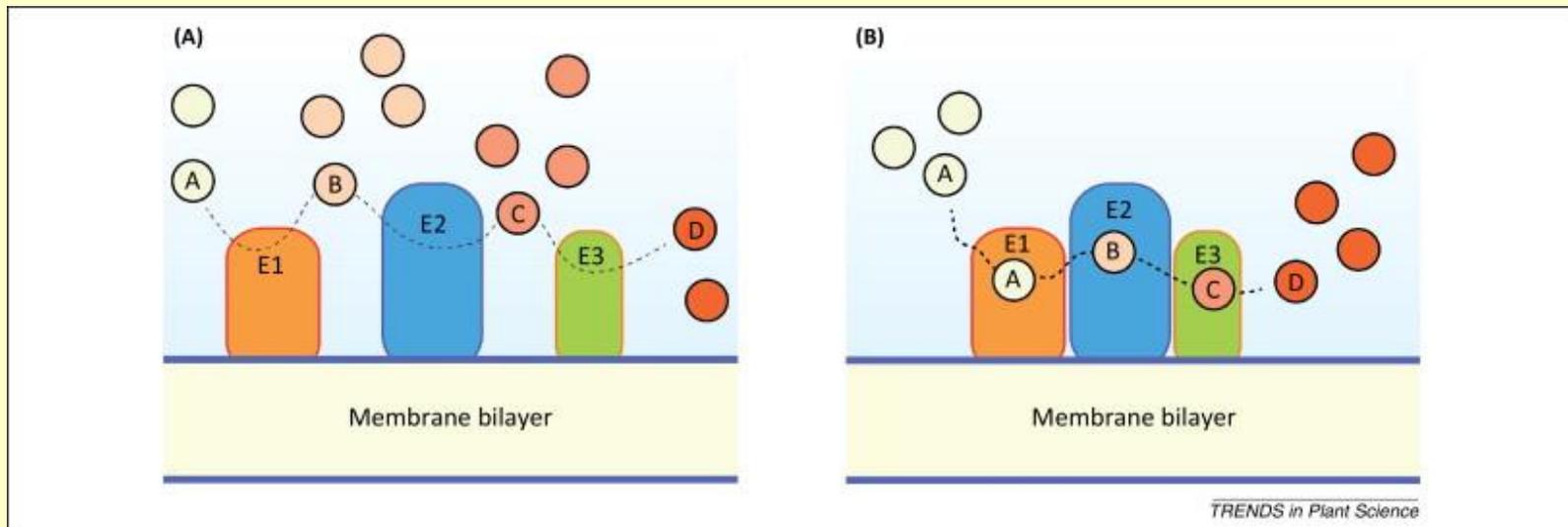
Ad esempio, stanno adesi sulla superficie delle membrane cellulari, come quella del reticolo endoplasmatico



Distanza fra gli enzimi: 0.1-1 nm

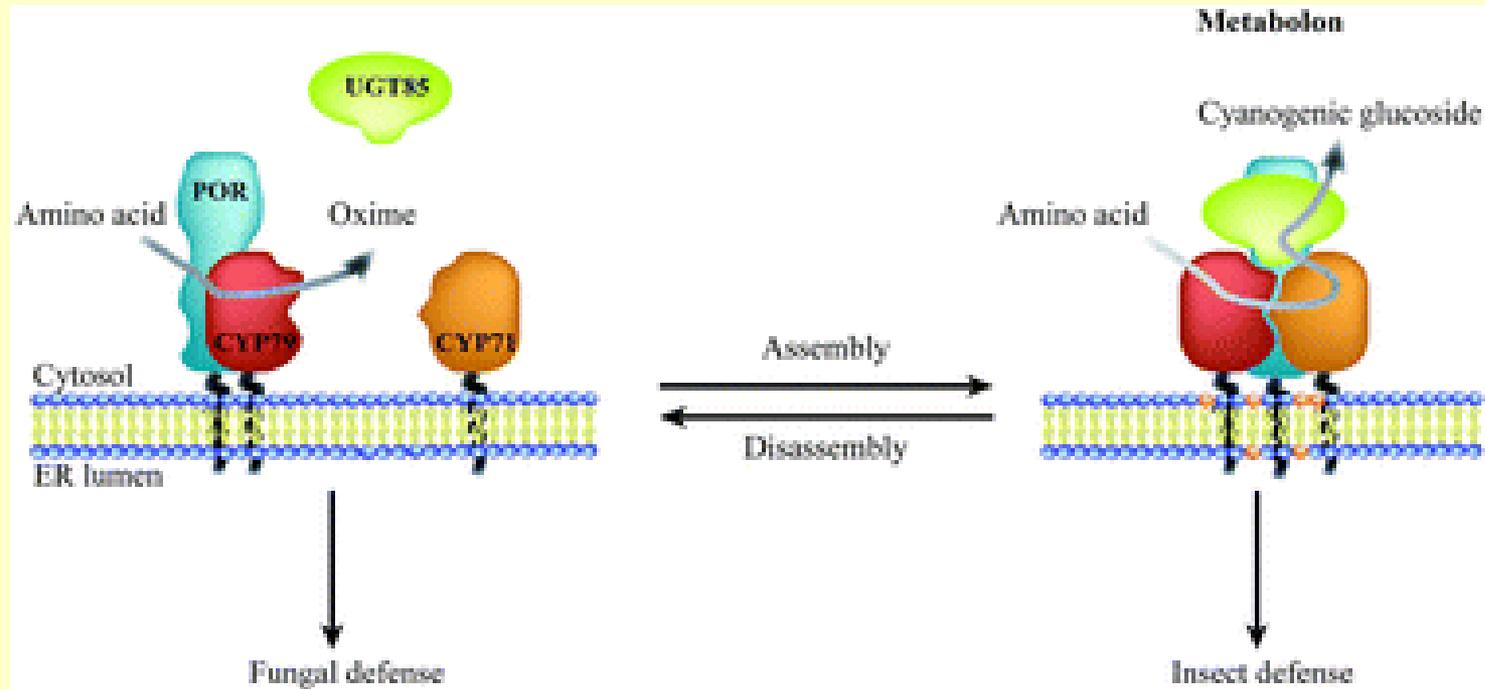
Non solo viene facilitato lo scambi di metaboliti fra un enzima e l'altro, ma viene anche prevenuto il leakage di intermedi potenzialmente tossici

In tal modo, diventa «facile» attivarli quando necessario....



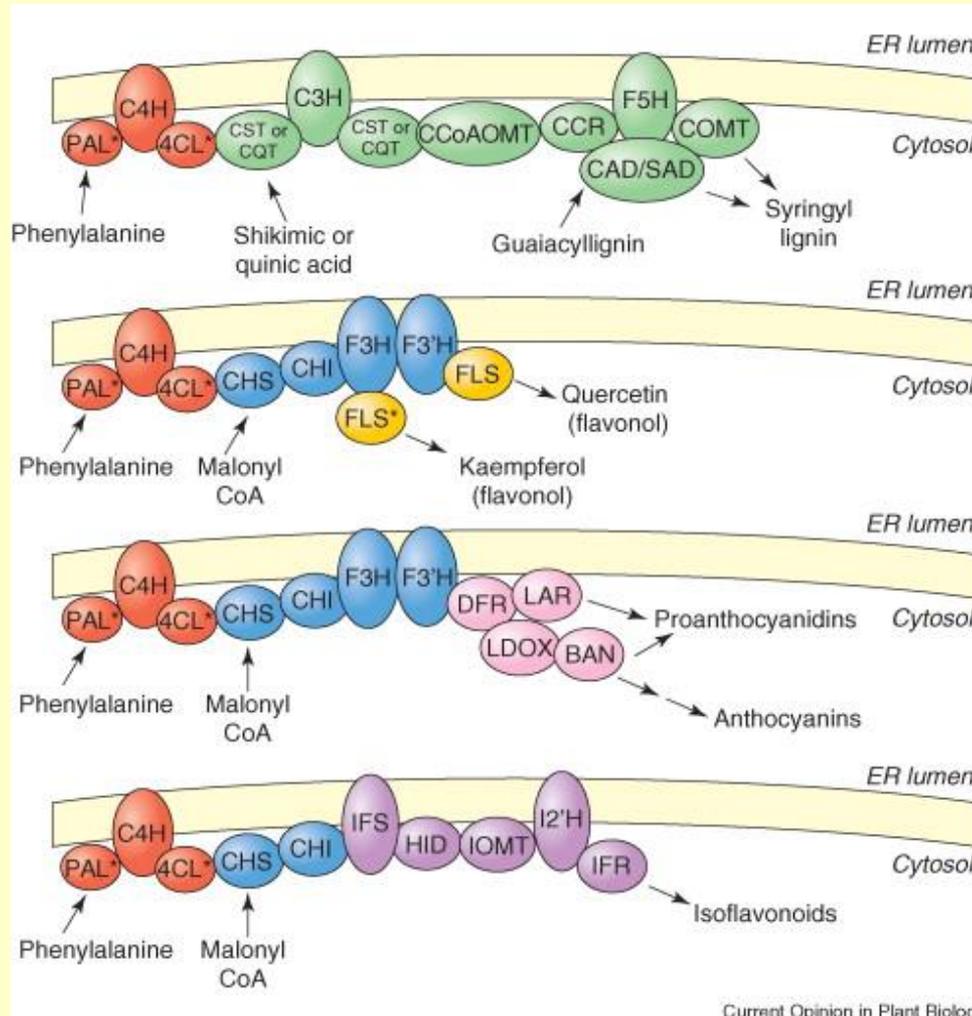
.. Basta che sia attivata la proteina giusta che li assembla!!!!!!

On-demand organization



Il metabolone!!!!!!

Inoltre, a seconda di chi è messo vicino a chi, può essere diversificato l'end-point!
Vengono formati metaboliti diversi assemblando metaboloni diversi con parti a comune



Se le sostanze sintetizzate sono
 idrofile: vacuolo e parete
 idrofobiche: vescicole con emi-membrane e cisterne di ER!

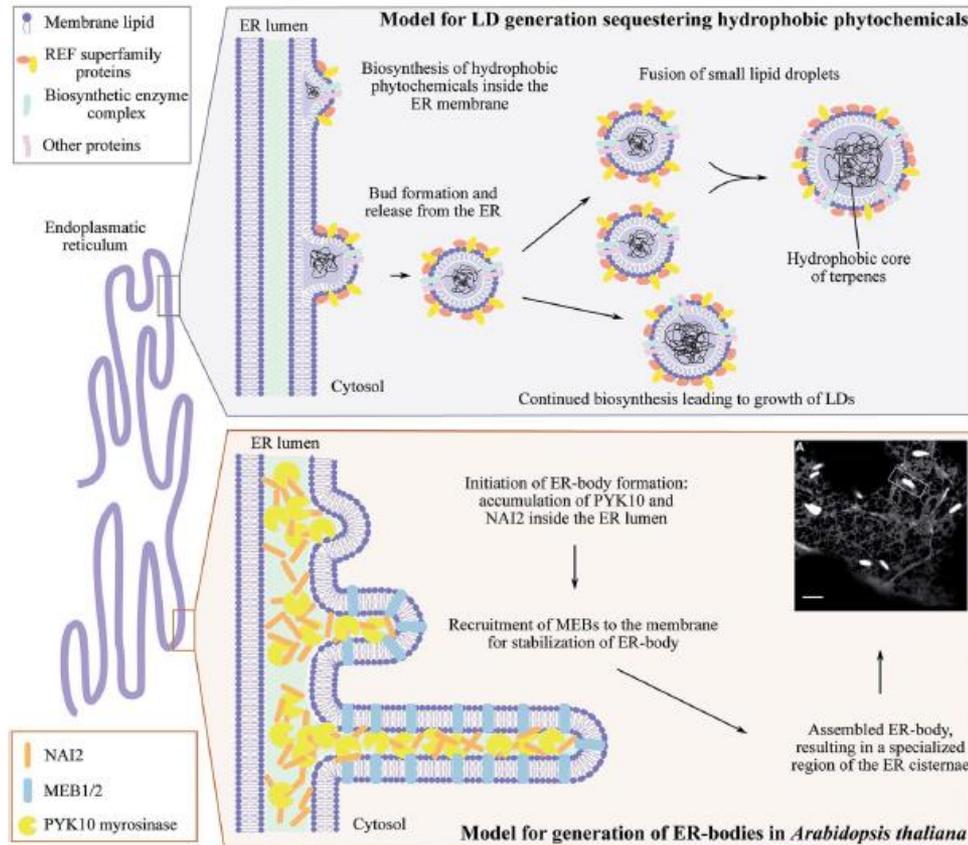
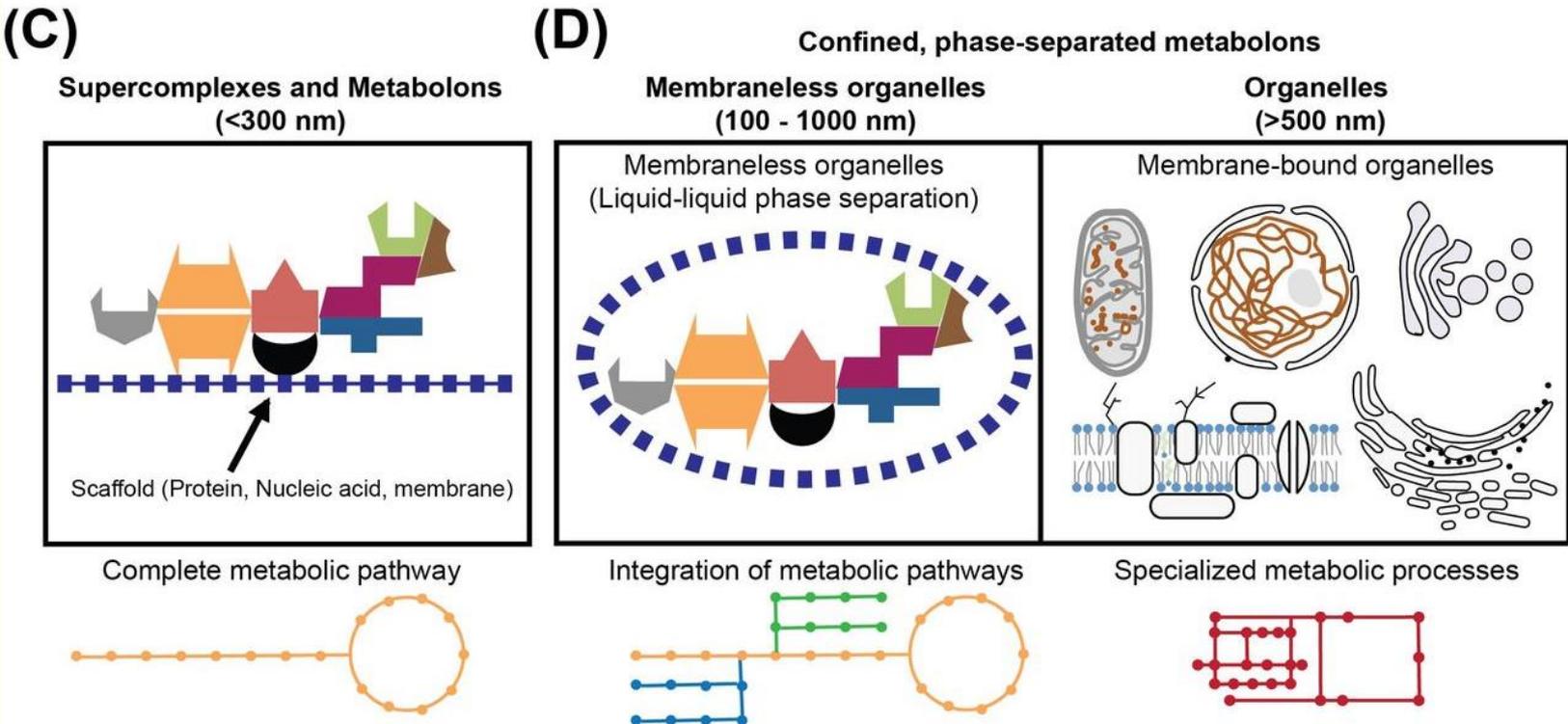


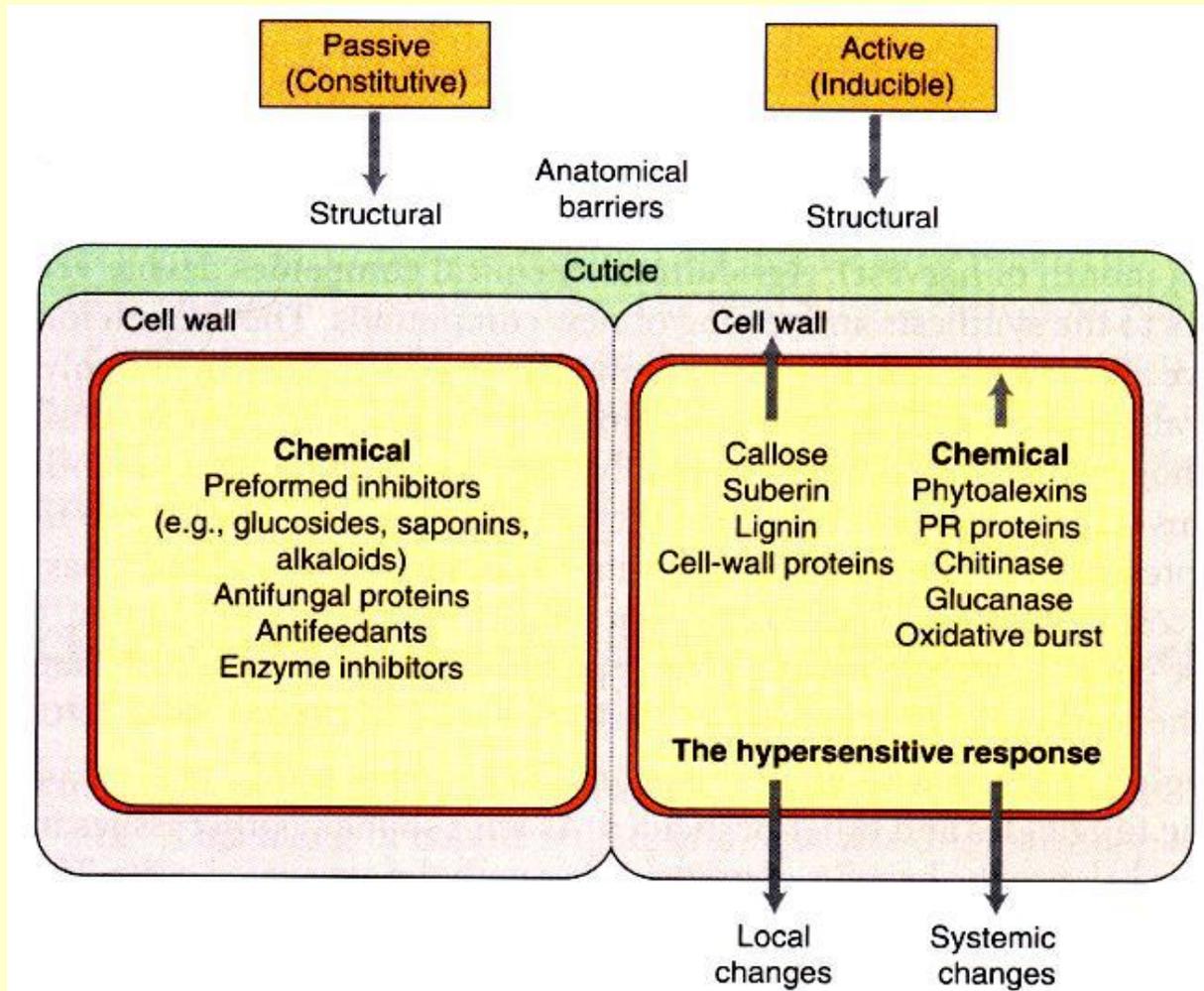
Fig. 5 ER-derived microcompartments, lipid droplets (LDs) and ER-bodies. Top panel: shows the model for lipid droplets sequestering hydrophobic phytochemicals inspired by Laibach *et al.* 2015, *Journal of Biotechnology*.¹⁶⁰ During biosynthesis, the hydrophobic phytochemical such as natural rubber accumulate inside the ER membrane leaflet causing bud formation and release of LD confined by an ER membrane monolayer. Small LDs may fuse to larger LDs at the same time as continued biosynthesis may occur resulting in growth of LDs. Lower panel: illustrates the development of ER-bodies in *Arabidopsis thaliana* in which the myrosinase PYK10 accumulates inside the ER lumen together with the soluble protein NAI2. This results in bud formation and triggers the recruitment of the membrane proteins MEB1 and MEB2 that interacts with NAI2, elongating the bud into the rod-shaped ER-body (1 $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$) highly enriched with PYK10 and other β -glucosidases. Confocal image of ER-localized GFP (grey ER-network) in ER-bodies (white dilated ER cisternae) in *Arabidopsis thaliana* is adapted from Nakano *et al.* 2014, *Frontiers in Plant Science*.¹⁵⁰

Comunque i sistemi di compartimentalizzazione possono essere di vario tipo....

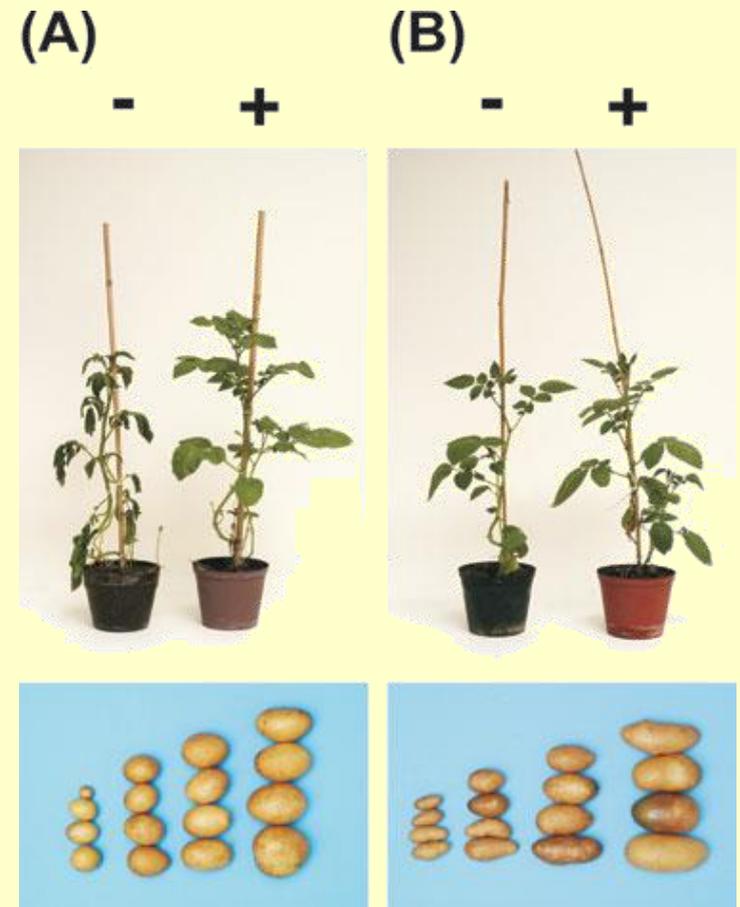


Ma difendersi è costoso?

Sì, sia per le difese costitutive (passive) che per quelle inducibile (attive)



Costo delle strategie di difesa



Le spese vengono recuperate solamente in presenza di stress!!!

I benefici dell'acquisizione di una difesa possono essere anche temporanei.

In assenza di stress sono le piante meno competitive ad avere più fitness!!!!

Competitività delle piante in situazioni “naturali”



Piante coltivate..... Riallocazione delle risorse!