



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN  
BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA ED AMBIENTALE

CICLO XXVI

COORDINATORE Prof. GUIDO BARBUJANI

**Basi biochimico-molecolari  
della tolleranza a condizioni di stress  
osmo-salino in varietà italiane di riso**

Settore Scientifico Disciplinare BIO/04

**Dottorando**

Dott. Bertazzini Michele

---

*(firma)*

**Tutore**

Prof. Forlani Giuseppe

---

*(firma)*

Anni 2011/2014

*A Marta, che mi ha donato Mattia.  
E a Mattia, che ogni giorno mi regala scoperte.*

## INDICE

|                                                                                           | pagina |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>1. INTRODUZIONE</b>                                                                    |        |
| 1.1. Aspetti generali                                                                     | 1      |
| 1.1.1. Il riso: botanica e genetica del genere <i>Oryza</i>                               | 1      |
| 1.1.2. Uomo e riso: una storia lunga millenni                                             | 1      |
| 1.1.2.1. Perdita del carattere della dispersione dei semi                                 | 2      |
| 1.1.2.2. Introduzione del carattere del nanismo                                           | 3      |
| 1.1.2.3. Riso geneticamente modificato: il <i>Golden Rice</i>                             | 4      |
| 1.1.3. L'importanza economica del riso: produzione e mercato globale                      | 5      |
| 1.1.4. Il riso in Italia, una storia moderna                                              | 6      |
| 1.1.5. Statistiche del riso italiano                                                      | 8      |
| 1.1.6. Nuove sfide per il futuro                                                          | 10     |
| 1.2. Il suolo e il potenziale idrico                                                      | 12     |
| 1.2.1. Metodi di misurazione della salinità e tipologie di terreni                        | 12     |
| 1.2.2. Cause e distribuzione della salinità                                               | 13     |
| 1.2.3. Adattamento delle piante allo stress salino                                        | 14     |
| 1.2.4. Effetti della salinità del suolo sulla produttività agricola                       | 15     |
| 1.2.5. La sensibilità del riso all'eccesso dei sali                                       | 16     |
| 1.3. Lo stress osmotico e i suoi effetti                                                  | 17     |
| 1.3.1. Potenziale idrico di suolo e pianta in relazione allo stress osmo-salino           | 19     |
| 1.3.2. Il ruolo delle acquaporine nella risposta allo stress osmotico                     | 20     |
| 1.3.3. Il sensing dello stress osmotico                                                   | 22     |
| 1.3.4. La trasduzione del segnale calcio-indipendente                                     | 22     |
| 1.3.4.1. Il ruolo delle <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> (MAPK)                    | 23     |
| 1.3.4.2. Le <i>Sucrose-nonfermenting Related Kinase</i> (SnRK)                            | 24     |
| 1.3.5. I secondi messaggeri nella trasduzione del segnale                                 | 25     |
| 1.3.6. Il ruolo del calcio: sensing e signalling                                          | 26     |
| 1.3.6.1. Le <i>Calmodulin-like Domain Protein Kinases</i> (CDPKs)                         | 26     |
| 1.3.6.2. Le calmoduline (CaM)                                                             | 27     |
| 1.3.6.3. Le proteine <i>Calcineurin B-like</i> (CBL)                                      | 28     |
| 1.3.7. Effetti dello stress osmotico sulla crescita della pianta                          | 29     |
| 1.4. Lo stress ionico                                                                     | 31     |
| 1.4.1. Tossicità del cloruro di sodio                                                     | 31     |
| 1.4.2. Percezione dello stress ionico                                                     | 33     |
| 1.4.3. Meccanismo di assorbimento e trasporto del sodio                                   | 33     |
| 1.4.3.1. Trasportatori coinvolti nell'omeostasi del sodio                                 | 34     |
| 1.4.4. Stress ionico e meccanismi di tolleranza in riso                                   | 40     |
| 1.5. Gli osmoliti compatibili                                                             | 40     |
| 1.5.1. Sistemi osmo-protettivi in riso                                                    | 42     |
| 1.5.2. Biosintesi della prolina                                                           | 42     |
| 1.5.3. Funzioni della prolina                                                             | 43     |
| 1.5.4. Ruolo della prolina nella risposta allo stress salino in riso                      | 45     |
| 1.5.5. Ingegnerizzazione del metabolismo della prolina in riso                            | 49     |
| 1.6. Ruolo dei fattori di trascrizione e dei miRNA nella risposta allo stress osmo-salino | 49     |
| 1.6.1. Classi dei fattori di trascrizione                                                 | 51     |
| 1.6.2. Ruolo dei fattori di trascrizione nella risposta allo stress abiotico              | 52     |
| 1.6.3. Fattori di trascrizione attivati in condizioni di stress osmo-salino in riso       | 53     |
| 1.6.3.1. I TF della famiglia NAC di riso e lo stress salino                               | 54     |
| 1.6.4. Meccanismo d'azione dei miRNA                                                      | 54     |

|          |                                                                                                         |           |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.6.5.   | Il ruolo dei miRNA in risposta allo stress                                                              | 55        |
| 1.6.6.   | Altre classi di piccoli RNA (sRNA) coinvolti nella risposta allo stress salino                          | 56        |
| 1.7.     | I sistemi antiossidanti                                                                                 | 58        |
| 1.7.1.   | Meccanismo di formazione dei ROS durante lo stress salino e loro tossicità                              | 59        |
| 1.7.2.   | Le difese delle piante contro i ROS                                                                     | 59        |
| 1.7.2.1. | Le superossido dismutasi                                                                                | 59        |
| 1.7.2.2. | Catalasi                                                                                                | 63        |
| 1.7.2.3. | Enzimi coinvolti nel ciclo glutatione-ascorbato                                                         | 64        |
| 1.7.2.4. | Le molecole attive nel ciclo glutatione-ascorbato                                                       | 67        |
| 1.7.2.5. | Altre molecole attive nella detossificazione dei ROS                                                    | 68        |
| 1.8.     | Metodi di valutazione della tolleranza del riso allo stress salino                                      | 71        |
| 1.8.1.   | Esclusione selettiva degli ioni tossici                                                                 | 71        |
| 1.8.2.   | Accumulo di prolina                                                                                     | 72        |
| 1.8.3.   | Considerazioni sulla coltivazione del riso in terreni salini                                            | 73        |
| 1.9.     | SCOPO DEL LAVORO                                                                                        | 74        |
|          | <b>2. MATERIALI E METODI</b>                                                                            | <b>76</b> |
| 2.1.     | Materiale vegetale e condizioni di crescita                                                             | 76        |
| 2.2.     | T Trattamenti salini e determinazione della percentuale di germinazione e della crescita delle plantule | 77        |
| 2.3.     | Crescita delle colture cellulari in sospensione liquida                                                 | 79        |
| 2.4.     | Misurazione del contenuto di cationi in radici e parte aerea di plantule di riso                        | 79        |
| 2.5.     | Analisi mediante Western blot dei livelli di alcuni enzimi antiossidanti                                | 80        |
| 2.5.1.   | Estrazione dei tessuti vegetali e preparazione dei campioni per l'elettroforesi                         | 80        |
| 2.5.2.   | Elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)                            | 82        |
| 2.5.3.   | Western blotting                                                                                        | 82        |
| 2.5.4.   | Immunostaining con fosfatasi alcalina                                                                   | 82        |
| 2.6.     | Misurazione delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARs)                                    | 84        |
| 2.7.     | Determinazione dell'attività della superossido dismutasi                                                | 85        |
| 2.7.1.   | Preparazione degli estratti                                                                             | 85        |
| 2.7.2.   | Saggio di attività in vitro della superossido dismutasi                                                 | 86        |
| 2.8.     | Determinazione del contenuto cellulare di prolina e degli amminoacidi liberi                            | 87        |
| 2.8.1.   | Metodo della ninidrina acida                                                                            | 88        |
| 2.9.     | Determinazione dei livelli di glutatione ridotto e ossidato                                             | 89        |
| 2.10.    | Determinazione dei livelli di acido ascorbico e deidroascorbico                                         | 89        |
| 2.11.    | Analisi dell'espressione genica tramite End Point/SQ-PCR                                                | 90        |
| 2.11.1.  | Estrazione dell'RNA totale                                                                              | 90        |
| 2.11.2.  | Trattamento con DNasi                                                                                   | 91        |
| 2.11.3.  | Sintesi di cDNA                                                                                         | 91        |
| 2.11.4.  | Analisi mediante end-point PCR                                                                          | 92        |
| 2.12.    | Clonaggio ed espressione ectopica degli enzimi coinvolti nel metabolismo della prolina in riso          | 92        |
| 2.12.1.  | Amplificazione dei plasmidi nel ceppo DH5 $\alpha$ di <i>E. coli</i>                                    | 93        |
| 2.12.2.  | Subclonaggio nel vettore pET151/D-TOPO                                                                  | 96        |

|                                      |                                                                                                                                 |     |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.12.3.                              | Trasformazione del ceppo BL21(DE3) pLysS di <i>E. coli</i>                                                                      | 98  |
| 2.12.4.                              | Espressione eterologa nel ceppo BL21(DE3) pLysS di <i>E. coli</i>                                                               | 98  |
| 2.12.5.                              | Purificazione delle proteine espresse in <i>E. coli</i> mediante cromatografia per affinità su colonna HIS-Select®              | 99  |
| 2.13.                                | Determinazione del punto isoelettrico di una proteina mediante isoelectrofocusing                                               | 99  |
| 2.14.                                | Saggi dell'attività in vitro della P5C reduttasi e della P5C deidrogenasi                                                       | 100 |
| 2.15.                                | Sintesi chimica e purificazione dell'acido $\delta$ 1-pirrolin-5-carbossilico                                                   | 101 |
| 2.16.                                | Determinazione della massa molecolare nativa di una proteina                                                                    | 102 |
| 2.17.                                | Analisi statistica                                                                                                              | 102 |
| <b>3. RISULTATI e DISCUSSIONE</b>    |                                                                                                                                 | 103 |
| 3.1.                                 | Suscettibilità differenziale di un gruppo di varietà italiane di riso a condizioni di stress salino                             | 103 |
| 3.1.1.                               | Effetto dei sali a livello di tessuto indifferenziato                                                                           | 108 |
| 3.1.2.                               | Valutazione dell'effetto di condizioni di stress osmo-salino allo stadio di terza foglia                                        | 109 |
| 3.2.                                 | Contenuto di cationi nei tessuti di piante di riso esposte a concentrazioni saline crescenti                                    | 110 |
| 3.3.                                 | Livelli di perossidazione lipidica nelle foglie di piante di riso all'aumentare dei valori di conducibilità elettrica del mezzo | 114 |
| 3.4.                                 | Espressione degli enzimi antiossidanti in condizioni di stress osmo-salino                                                      | 116 |
| 3.5.                                 | Livelli di attività delle SOD in condizioni di stress salino                                                                    | 119 |
| 3.6.                                 | Contenuti di ascorbato e glutatione in risposta allo stress salino                                                              | 120 |
| 3.7.                                 | Accumulo di prolina in risposta allo stress salino                                                                              | 122 |
| 3.8.                                 | Livelli di espressione dei geni coinvolti nel metabolismo della prolina in risposta a condizioni di stress salino               | 127 |
| 3.9.                                 | Clonaggio ed espressione eterologa dei geni coinvolti nel metabolismo della prolina                                             | 129 |
| 3.10.                                | Purificazione preparativa della P5C reduttasi e della P5C deidrogenasi di riso                                                  | 132 |
| 3.11.                                | Proprietà funzionali della P5C reduttasi                                                                                        | 138 |
| 3.12.                                | Caratterizzazione funzionale della P5C deidrogenasi di riso                                                                     | 140 |
| <b>4. CONCLUSIONI e PROSPETTIVE</b>  |                                                                                                                                 | 143 |
| <b>5. BIBLIOGRAFIA</b>               |                                                                                                                                 | 146 |
| <b>6. ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI</b> |                                                                                                                                 | 158 |

## ABBREVIAZIONI

|                |                                                      |
|----------------|------------------------------------------------------|
| ABRE           | Abcisic acid responsive elements                     |
| AI             | Inducibile dall'arabinosio                           |
| AP2/EREBP      | APETALA2/ethylene responsive element binding protein |
| APX            | Ascorbato perossidasi                                |
| ASA            | Ascorbato                                            |
| BCIP           | Bromo-cloro-indol fosfato                            |
| bHLH           | Basic helix-loophelix                                |
| BSA            | Albumina da siero bovino                             |
| CaM            | Calmoduline                                          |
| CAMBP          | CaM binding protein                                  |
| CAT            | Catalasi                                             |
| CBL            | Calcineurin b-like proteine                          |
| CCaMKs         | Calcio e calmodulina dipendente protein chinasi      |
| CDPKs          | Calmodulin-like domain protein kinase                |
| cGMP           | Guanosina monofosfato ciclica                        |
| CHX            | Cation:H <sup>+</sup> exchanger, proteina antiporto  |
| CIPK           | CBL-interacting protein kinase                       |
| CML            | CaM-like                                             |
| CMO            | Colina monoossigenasi                                |
| CNGCs          | Cyclic nucleotide gated channels                     |
| D.O.P.         | Denominazione di Origine Protetta                    |
| DCL1           | DICER-LIKE1                                          |
| DHA            | Deidroascorbato                                      |
| DHAR           | Deidroascorbato riduttasi                            |
| DREB           | Dehydration responsive element binding               |
| DTT            | Ditiotreitolo                                        |
| EC             | Conduttività elettrica                               |
| EPF            | EPIDERMAL PATTERNING FACTOR                          |
| Fwd            | Primer forward                                       |
| GC             | Cellule di guardia                                   |
| GLR            | Glutamate like receptors                             |
| GR             | Glutazione riduttasi                                 |
| GSA            | Glutammato semi-aldeide                              |
| GSH            | Glutazione                                           |
| GSH1           | γ- glutamylcysteine sintetasi                        |
| GSH2           | Glutazione sintetasi                                 |
| h              | Ore                                                  |
| HKT            | Trasportatori con alta affinità per il potassio      |
| HR             | Risposta ipersensibile                               |
| HYV            | Varietà ad alta resa                                 |
| I.G.P.         | Identificazione Geografica Protetta                  |
| IP3            | Inositolo trifosfato                                 |
| IRRI           | Istituto Internazionale di Ricerca sul Riso          |
| L <sub>p</sub> | Permeabilità idraulica                               |
| MAPK           | Mitogen Activated Protein Kinase                     |
| MDHA           | Monodeidroascorbato                                  |
| MDHAR          | Monodeidroascorbato riduttasi                        |
| miRNA          | Micro RNA                                            |
| MMC            | Cellule madri, meristemoidi                          |
| MS             | Murashige e Skoog                                    |
| Mtonn          | Milioni di tonnellate                                |
| NBT            | Nitroblu di tetrazolio                               |

|                |                                                                    |
|----------------|--------------------------------------------------------------------|
| NHA            | Na <sup>+</sup> :H <sup>+</sup> antiporto                          |
| NHX            | Antiporti intracellulari Na <sup>+</sup> :H <sup>+</sup> exchanger |
| NSCCs          | Non selective cation channels                                      |
| OAT            | Ornitina-delta-aminotranferasi                                     |
| P5C            | Pirollina-5-carbossilato                                           |
| P5CDH          | P5C deidrogenasi                                                   |
| P5CR           | Pirollina-5-carbossilato reducttasi                                |
| P5CS           | Pirollina-5-carbossilato sintetasi                                 |
| PA             | Acido fosfatidico                                                  |
| PCR            | Reazione a catena della polimerasi                                 |
| pDNA           | DNA plasmidico                                                     |
| PEG            | Polietilenglicole                                                  |
| PI             | Punto isoelettrico                                                 |
| PIP            | Plasma Membrane Intrinsec Proteins                                 |
| PL             | Piridossal chinasi                                                 |
| PLP            | Piridossal fosfato                                                 |
| POX            | Perossidasi                                                        |
| PRODH          | Prolina deidrogenasi                                               |
| PSI            | Fotosistema I                                                      |
| PSII           | Fotosistema II                                                     |
| QTL            | Quantitative trait locus                                           |
| Rev            | Primer reverse                                                     |
| RISC           | RNA-induced silencing complex                                      |
| RLK            | Receptor-like kinases                                              |
| ROS            | Specie radicaliche dell'ossigeno                                   |
| SA             | Acido salicilico                                                   |
| SDS-PAGE       | Sodio dodicil-solfato elettroforesi su gel di poliacrilammide      |
| SE             | Errore standard                                                    |
| SERF1          | SALT-RESPONSIVE ERF1                                               |
| SES            | Standard evaluating score                                          |
| SH, Shat       | Shattering                                                         |
| SIPK           | Salicylic acid-inducible protein kinase                            |
| siRNA          | RNA interferente di piccole dimensioni                             |
| SNAC           | NAC indotti da stress                                              |
| SnRK           | Sucrose-nonfermenting related kinase                               |
| SOD            | Superossido dismutasi                                              |
| SOS            | Salt-overly sensitive                                              |
| SPCH           | SPEECHLESS                                                         |
| SRO5           | Similar to RCD One                                                 |
| TBARs          | Sostanze reattive all'acido tiobarbiturico                         |
| TBS            | Tris Buffered Saline                                               |
| TCA            | Acido tricloroacetico                                              |
| TF             | Fattore di trascrizione                                            |
| VTE1           | Tocoferolo ciclasi                                                 |
| WIPK           | Wound-inducible protein kinase                                     |
| ψ              | Potenziale idrico                                                  |
| Ψ <sub>g</sub> | Potenziale gravitazionale                                          |
| ψ <sub>n</sub> | Potenziale pneumatico                                              |
| ψ <sub>o</sub> | Potenziale osmotico                                                |
| ψ <sub>p</sub> | Potenziale di pressione                                            |
| ZF-HD          | Zinc finger homo domain                                            |

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1. Aspetti generali

Il riso è il secondo cereale più coltivato al mondo e costituisce la maggiore fonte di sostentamento per più della metà della popolazione mondiale: in paesi come Bangladesh, Cambogia, Indonesia, Laos, Myanmar, Thailandia e Vietnam si verifica un consumo pro-capite annuo che varia dai 130 ai 180 chili. Il riso ha un contenuto proteico più basso del grano, ma le sue proteine sono più ricche in lisina e più digeribili. Risulta invece particolarmente deficitario in tiamina e riboflavina. Considerando la produttività media per ettaro, la quantità di energia ricavabile dal riso è più alta di quella del mais e del grano: ciò significa che possono essere sfamate più persone per unità di terreno. Anche le applicazioni industriali del riso sono innumerevoli e comprendono i tradizionali usi alimentari: dal cereale, infatti, si ricavano direttamente cibi, snack, prodotti per la colazione e bevande fermentate (come birra e vino), mentre gli scarti di lavorazione sono impiegati come mangimi per il bestiame. Inoltre, avendo l'esocarpo molto ricco in silicio, il riso è impiegato come materiale da costruzione, mentre dalla sua farina, che è praticamente solo amido e priva di allergeni, vengono formulate ciprie e alimenti per lattanti.

### 1.1.1. Il riso: botanica e genetica del genere *Oryza*

Il riso (*Oryza sativa* L.) è una pianta monocotiledone appartenente alla famiglia delle graminacee e viene distinta dagli altri cereali come costituente della sottofamiglia delle *Ehrhartoideae* (Kellogg, 2001). Il genere *Oryza*, che include 21 specie selvatiche e 2 varietà coltivate (Vaughan *et al.*, 2003; Tabella 1), venne caratterizzato da Linneo nel 1753 e il numero aploide dei suoi cromosomi determinato da Kuwada nel 1910, ben 46 anni prima che la stessa misura fosse effettuata sull'uomo. Le specie selvatiche occupano un vasto habitat, distribuendosi fra tropici e zone subtropicali di Asia, America centrale e meridionale, Africa e Australia; delle due coltivate, *O. glaberrima* o riso africano è circoscritta all'Africa occidentale, mentre *O. sativa* è coltivata in 112 paesi, distribuendosi in tutti i continenti fatta eccezione dell'Antartide. In generale queste due specie di interesse agronomico hanno un ciclo vitale che può variare da 3 a 6 mesi e sono considerate piante semi-acquatiche, anche se alcuni genotipi crescono in suoli non irrigati. Lo sviluppo della pianta viene suddiviso in due fasi: quella vegetativa, dalla germinazione allo sviluppo della pianta, e quella riproduttiva, responsabile della formazione e maturazione dei semi (Maclean *et al.*, 2002).

Il riso è una specie modello, possiede 12 paia di cromosomi e un genoma molto compatto (500 milioni di basi) se confrontato con altri cereali. *O. sativa* conta due sottospecie, *indica* e *japonica*, caratterizzate da un genoma AA ( $2n=2x=24$ ). Le specie selvatiche possono essere diploidi ( $2n=2x=24$ ) o tetraploidi ( $2n=4x=48$ ) e hanno dieci tipologie di genomi: AA, BB, CC, BBCC, CCDD, EE, FF, GG, HHJJ and HHKK (Tabella 1) (Vaughan *et al.*, 2003). Queste possono costituire un'importante fonte di nuovi geni per programmi di miglioramento genetico del riso: ben sette specie, infatti, condividono il genoma AA. Sembra invece impossibile incrociare fra di loro generi geneticamente non omologhi. Infine il riso è autoimpollinante, aspetto questo che può favorire programmi di breeding (Blair *et al.*, 2002).

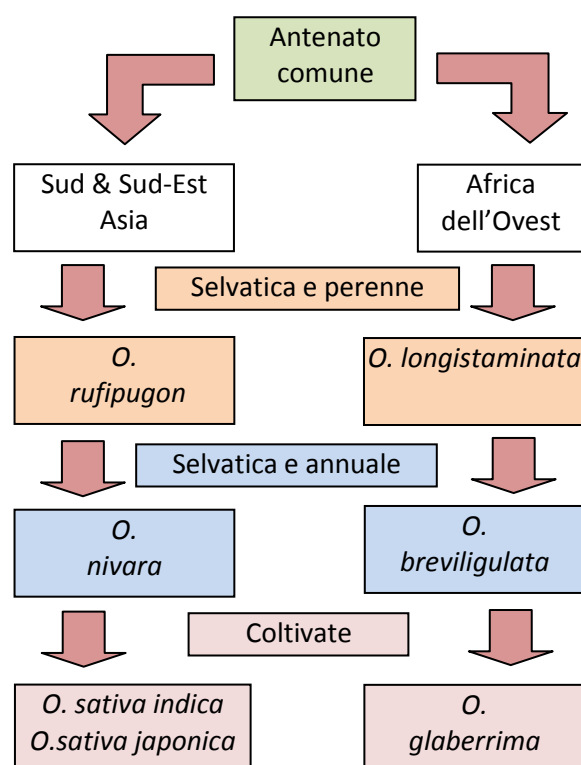
### 1.1.2. Uomo e riso: una storia lunga millenni

Il genere *Oryza* ebbe origine 14 milioni di anni fa in Malesia. *O. sativa* deriva dalla specie spontanea e annuale *O. nivaria*, che a sua volta deriva dalla specie perenne e spontanea *O. rufipogon*, mentre *O. glaberrima* ebbe origine dalla specie *O. barthii* che discende da *O. longistaminata* (Tabella 1) (Chang, 1976). Successivamente *O. sativa* diede luogo a due sottospecie: una adattata ai climi tropicali (*indica*) e una (*japonica*) adattata ai climi temperati e agli altopiani. Non è chiaro se queste sub-specie siano frutto di due singoli eventi di domesticazione, come sembrerebbero suggerire le diversità morfologiche e fisiologiche (Gao *et al.*, 2008), anche se un lavoro recente avanza l'ipotesi di un singolo



evento di domesticazione (Molina *et al.*, 2011). Comunque molto probabilmente l'uomo cominciò a coltivare il riso intorno al 6000 AC nella regione cinese della valle del fiume Azzurro (Yangtze). Dal 10000 AC, infatti, questa zona si riscaldò a causa di modifiche climatiche, diventando l'habitat ideale per diverse specie del genere *Oryza* che crescevano spontanee e costituivano una fonte cibo per le comunità umane di cacciatori perlopiù nomadi. Ma dal 6000 AC diminuirono le precipitazioni monsoniche e con esse le temperature; questi stravolgimenti portarono prima a un declino, poi a una scomparsa delle varie specie di riso. L'inaspettata mancanza del cereale potrebbe aver forzato il processo di domesticazione del riso e, infatti, prove archeo-botaniche sembrano validare questa teoria (Vaughan *et al.*, 2008). Da questo momento l'uomo cambiò le proprie abitudini trasformandosi da nomade cacciatore a coltivatore stanziale, e iniziò a modificare le piante coltivate selezionando le caratteristiche che più gli interessavano.

| Specie ( <i>Oryza</i> )              | Chromosome n° | Genome group |
|--------------------------------------|---------------|--------------|
| <b><i>Oryza sativa</i> complex</b>   |               |              |
| <i>Oryza sativa</i> L.               | 24            | AA           |
| <i>O. rufipogon</i> *                | 24            | AA           |
| <i>O. glaberrima</i>                 | 24            | AA           |
| <i>O. barthii</i> .                  | 24            | AA           |
| <i>O. longistaminata</i> *           | 24            | AA           |
| <i>O. meridionalis</i>               | 24            | AA           |
| <i>O. glumaepatula</i>               | 24            | AA           |
| <b><i>O. officinalis</i> complex</b> |               |              |
| <i>O. officinalis</i>                | 24            | CC           |
| <i>O. minuta</i> J                   | 48            | BBCC         |
| <i>O. rhizomatis</i>                 | 24            | CC           |
| <i>O. eichingeri</i>                 | 24            | CC           |
| <i>O. malapuzhaensis</i>             | 48            | BBCC         |
| <i>O. punctata</i>                   | 24            | BB,          |
| <i>O. latifolia</i>                  | 48            | CCDD         |
| <i>O. alta</i>                       | 48            | CCDD         |
| <i>O. grandiglumis</i>               | 48            | CCDD         |
| <i>O. australiensis</i>              | 24            | EE           |
| <b>Ridleyanae Tateoka</b>            |               |              |
| <i>O. schlechteri</i>                | 48            | Sconosciuto  |
| <b><i>O. ridleyi</i> complex</b>     |               |              |
| <i>O. ridleyi</i>                    | 48            | HHJJ         |
| <i>O. longiglumis</i>                | 48            | HHJJ         |
| <b>Granulata Roschev.</b>            |               |              |
| <b><i>O. granulata</i> complex</b>   |               |              |
| <i>O. granulata</i>                  | 24            | GG           |
| <i>O. meyeriana</i>                  | 24            | GG           |
| <b><i>Brachyantha</i> B.R. Lu</b>    |               |              |
| <i>O. brachyantha</i>                | 24            | FF           |

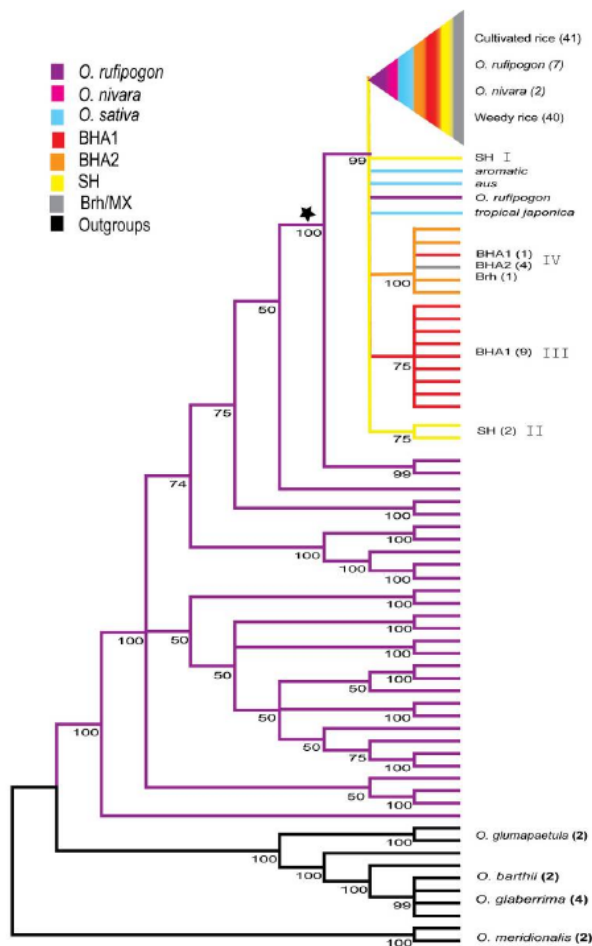


**Tabella 1. Specie appartenenti al genere *Oryza*.** Viene indicato il corrispondente numero di cromosomi e il tipo di genoma presente; l'asterisco indica che per la specie considerata esiste sia una variante annuale che una perenne (da Vaughan *et al.*, 2003). A destra è schematizzata l'evoluzione delle due varietà coltivate, *O. sativa* e *O. glaberrima*, con le principali caratteristiche (Chang, 1976).

### 1.1.2.1. Perdita del carattere della dispersione dei semi

Le specie selvatiche di riso disperdono i semi maturi liberandoli nell'ambiente per avere maggiori possibilità di propagazione. Visto che la maturazione di tutti i chicchi contenuti in una cariosside non avviene nello stesso momento, si è cercato di eliminare il carattere della

dispersione dei semi per evitare inutili perdite e per facilitare le procedure di raccolta. Sono stati eseguiti studi comparativi su risi selvatici appartenenti alle sottospecie *indica* e *japonica* che hanno dimostrato la presenza in tutti i genotipi coltivati di una modifica puntiforme del gene dominante *Shattering1* (SH; Shat; Figura 1) codificante per uno specifico fattore di trascrizione, che non veniva osservata nei genotipi selvatici. In particolare viene cambiato un amino acido (in posizione 79 una lisina viene sostituita con un'asparagina) in seguito a una sostituzione di un singolo nucleotide nel genoma (g237t) (Lin *et al.*, 2007). Questo carattere è stato selezionato molto precocemente nel processo di domesticazione, poiché è presente in tutte le specie coltivate. La sua totale conservazione è un ulteriore elemento a favore del singolo evento di domesticazione.



**Figura 1. A sinistra: albero filogenetico-neighbor joining degli aplotipi per il gene sh4.** I numeri rappresentano la percentuale dei bootstraps; nell'albero vengono riportate solo percentuali maggiori del 50%; la stella nera rappresenta la perdita del carattere della dispersione del seme (Thruher, 2012).

**Sotto: fenotipo di mutanti shat.**



Nell'immagine sono riportati, partendo da sinistra, i pannicoli del *wild-type* (WT; SH4) e dei mutanti shat1, shat2, e doppio mutante shat1 shat2. La mutazione di SH4 corrisponde una maggiore ritenzione dei chicchi (Zhou *et al.*, 2012).

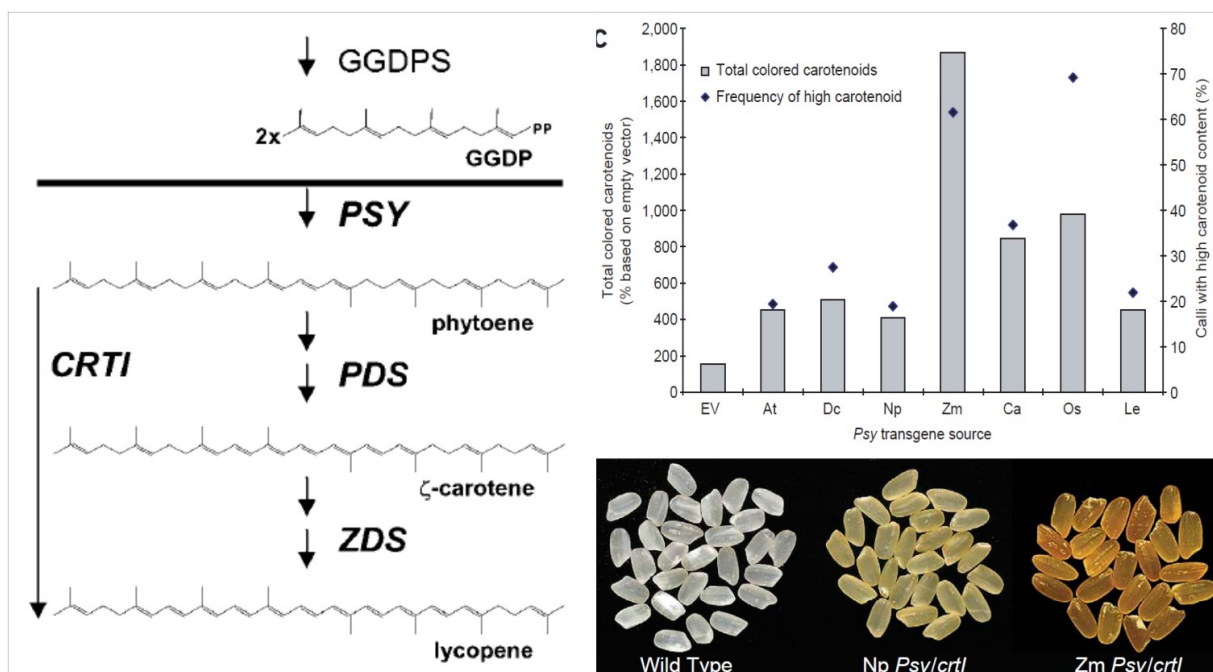
**1.1.2.2. Introduzione del carattere del nanismo**

Nella prima metà del Novecento la popolazione mondiale crebbe in maniera lenta ma costante da quasi 2 miliardi a 3 miliardi; nel 1950 iniziò un vero e proprio boom di nascite che portò gli abitanti della terra a più di 6 miliardi in mezzo secolo. Questo ha provocato una maggiore domanda di cibo che spinse la ricerca scientifica a intraprendere sforzi per aumentare le rese dei cereali. I primi risultati vennero ottenuti da un ricercatore americano, Norman Borlaugh, che sviluppò in Messico una nuova varietà di grano incrociando una varietà giapponese semi-nana (Norin) con una cultivar americana capace di alte rese (Brevor 14) e con varietà messicane che avevano la caratteristica di essere ben adattate a un habitat tropicale. Le cultivar ottenute (Pitic 62 e Penjamo 62) potevano essere concimate in maniera massiccia senza che i fusti crescessero troppo con il rischio di spezzarsi e, considerata la loro alta produttività, resero il Messico autosufficiente per la produzione di grano nel giro di brevissimo tempo: era iniziata la cosiddetta rivoluzione verde (*green revolution*).

Un approccio del tutto simile venne applicato sul riso in Asia, dove era presente la maggior variabilità genetica. Nel 1960 nelle Filippine grazie alle fondazioni Ford e Rockefeller nacque l'IRRI (Istituto Internazionale di Ricerca sul Riso), con l'obiettivo di creare un nuovo riso più resistente alle malattie, con un ciclo di vita corto in modo da permettere anche più di un raccolto all'anno, nano, non sensibile al fotoperiodo e dotato di alte rese. Nel 1966 da un incrocio eseguito tra la linea seminana proveniente da Taiwan (Dee-gee-won) con una indonesiana adattata alle Filippine (Peta), venne sviluppata la varietà IR8, la prima delle moderne cultivar con alta resa (*High Yielding Varieties*, HYV). La produttività media, che nel 1960 era nell'ordine di 2-2,5 tonnellate per ettaro, passò a 10 tonnellate per ettaro nella stagione secca e a 6 in quella delle piogge. Vi erano però dei lati negativi associati a IR8, come l'eccessivo contenuto di amilosio che dava problemi quando i chicchi venivano cotti e raffreddati. Vennero nel tempo prodotti nuovi HYV in cui questi aspetti negativi erano assenti. Molti anni dopo si capì che il meccanismo fisiologico alla base delle varietà seminane di grano e di riso era costituito da un'alterazione del normale metabolismo delle gibberelline (Ashikari *et al.*, 2002).

### 1.1.2.3. Riso geneticamente modificato: il *Golden Rice*

Una dieta basata solo su questo cereale può però portare a una carenza di vitamina A che, nei casi più gravi, comporta cecità e un abbassamento delle difese immunitarie, soprattutto nei soggetti più fragili come i bambini (West *et al.*, 2001). Nell'uomo la vitamina A si ottiene in seguito a una reazione enzimatica che taglia il  $\beta$ -carotene, di cui la dose giornaliera consigliata (RDA) per bambini da 1 a 3 anni è di 300  $\mu\text{g}$  (Paine *et al.*, 2005). La parte edibile del riso, l'endosperma, è particolarmente povera di carotenoidi a causa dell'assenza di alcuni enzimi chiave della via biosintetica. Con il concorso di diversi laboratori questi geni sono stati inseriti per mezzo delle tecnologie del DNA ricombinante, utilizzando come materiale di partenza geni provenienti da altri organismi, dando origine al cosiddetto "*Golden Rice*" (Figura 2).

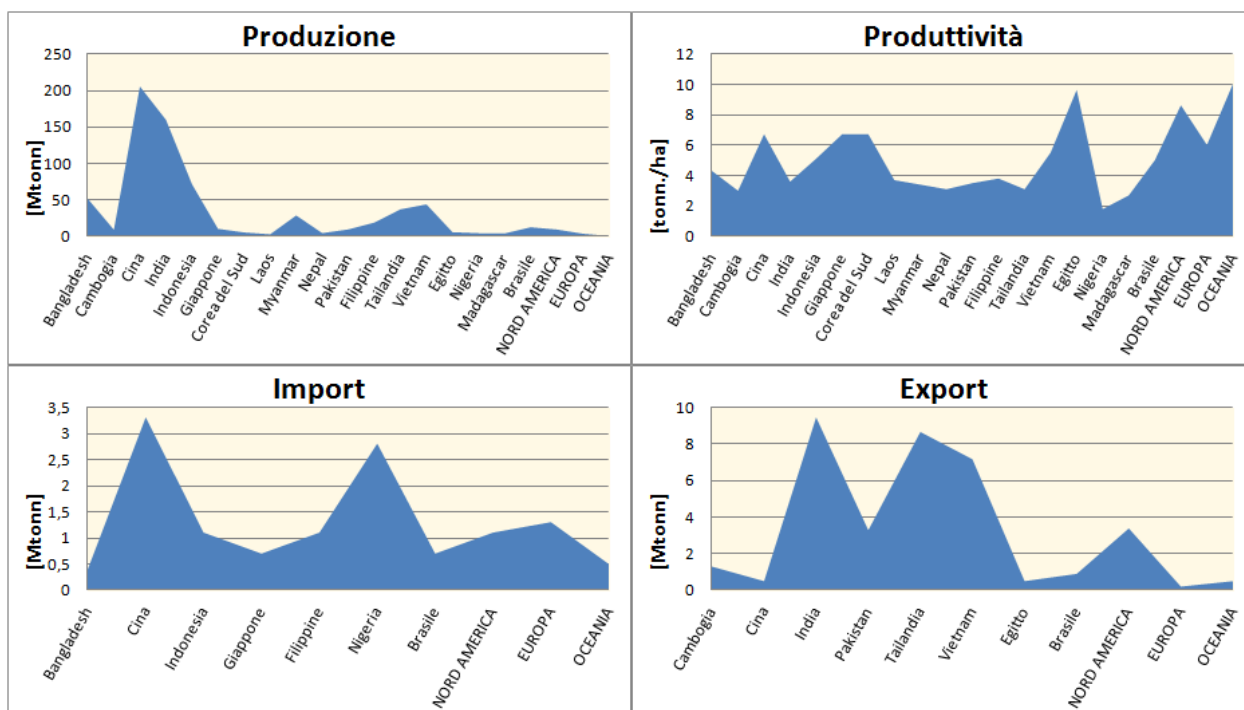


**Figura 2. Il *Golden Rice*.** A sinistra la via biosintetica dei carotenoidi nelle piante, che partendo dal geranyl-geranyl difosfato (GGDP) arriva fino al licopene. Nell'endosperma di riso il GGDP era presente, ma mancavano gli enzimi responsabili dei passaggi successivi. Così, vennero inserite delle fitoene sintasi (PSY) provenienti da diversi organismi che avevano efficienze catalitiche molto diverse (in alto a destra). La più promettente è risultata quella di mais (*Zea mais*, Zm). Per il *Golden Rice* di prima generazione era stata utilizzata la fitoene sintasi di narciso, mentre quello più promettente e di seconda generazione è stato ottenuto con l'enzima di mais (in basso a destra; Paine *et al.*, 2005).

Il primo gene utilizzato a questo fine codifica per l'enzima fitoene sintasi (PSY) che trasforma il geranil-geranil difosfato in fitoene (Burkhardt *et al.*, 1997); tra i geni utilizzati, provenienti da diverse piante, quello di colza ha consentito il maggiore accumulo di carotenoidi. In un secondo momento si è fatto invece ricorso a un gene di origine batterica (CRT1) che codifica per una carotene desaturasi che aggiunge quattro doppi legami al fitoene, producendo licopene (Paine *et al.*, 2005). Si è calcolato che con il *Golden Rice* di ultima generazione basti consumarne 72 g di riso al giorno per introdurre nell'organismo la dose giornaliera consigliata di carotenoidi. Al momento sono in corso ulteriori sperimentazioni per cercare di abbassare ulteriormente la quantità di riso richiesta, ma in alcuni paesi l'opinione pubblica rimane l'ostacolo maggiore per la distribuzione di questa varietà.

### 1.1.3. L'importanza economica del riso: produzione e mercato globale

La produzione di riso nel mondo nel 2013 è stata pari a 744,9 milioni di tonnellate di prodotto grezzo, che corrispondono a circa 496,6 milioni di tonnellate di prodotto lavorato, con un incremento dell'1,1% rispetto all'anno precedente. La stragrande maggioranza viene prodotta nelle zone in via di sviluppo di Sud-Est asiatico, India e Cina, dove l'agricoltura fa ancora poco uso di attrezzi meccanizzati e dove le opere ingegneristiche per consentire una più razionale gestione delle risorse idriche non sono presenti. Questo si traduce spesso in una produttività facilmente influenzabile da condizioni climatiche avverse, che possono compromettere una buona parte del raccolto. I paesi industrializzati invece sono caratterizzati da un'agricoltura che fa vasto uso di carburanti fossili, di concimi e fitofarmaci per limitare la diffusione delle malattie delle piante e spesso applicano conoscenze ingegneristiche per una migliore gestione delle risorse. Questo si traduce in genere in una produttività maggiore, a fronte però di maggiori costi (Figura 3).



**Figura 3. Statistiche FAO relative alla produzione del riso nel 2013-2014.** Da notare come i minori paesi produttori abbiano le rese più alte. Per comodità non si sono riportati i paesi che producevano meno di 3 Mtonn. Inoltre le statistiche dell'Oceania sono state associate a quelle dell'Australia (FAO-Rice Market Monitor, 2014).

Le stime sulla produzione di riso per il 2014 parlano di 751 milioni di tonnellate di prodotto grezzo e ben 500,7 milioni di tonnellate di prodotto lavorato, corrispondenti a un

incremento dello 0,8% rispetto al 2013. Il maggiore produttore di riso del mondo è e rimane la Cina, con più di 200 milioni di tonnellate (Mtonn), seguita dall'India (160 Mtonn), e Indonesia (72 Mtonn). Il primo paese produttore non asiatico è il Brasile, che nel 2014 ha prodotto "solo" poco più di 12 Mtonn.

Per quanto riguarda le importazioni di prodotto lavorato, le stime della FAO indicano ancora una volta la Cina (3,3 Mtonn) come maggiore paese importatore, sorprendentemente seguita dalla Nigeria, che ha importato nel 2014 un volume pari a 2,5 Mtonn di riso lavorato. Considerando i paesi esportatori ancora una volta il record è detenuto da paesi asiatici come l'India, la Thailandia e il Vietnam, i quali esportano circa 10 Mtonn all'anno.

#### **1.1.4. Il riso in Italia, una storia moderna**

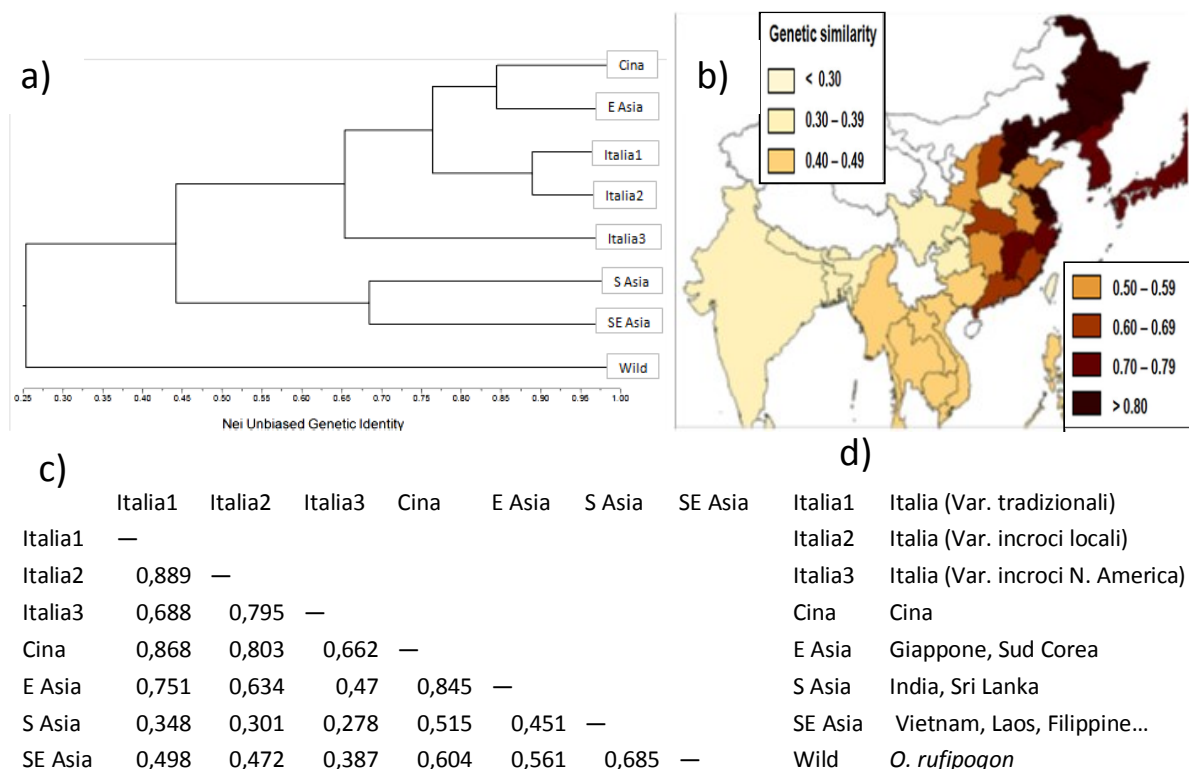
L'Italia è uno dei maggiori produttori di riso europei, ma non è chiaro come il cereale sia stato introdotto, e neppure quando. Di sicuro la coltivazione del riso era presente fra gli anni 1450-1500, come è testimoniato da una lettera del 1475 del duca di Milano Galeazzo Maria Sforza che accompagnava 12 sacchi di "pannocchie gravide di chicchi" di una particolare semente "dalle grandi virtù" destinata all'ambasciatore di Ercole I d'Este, Nicolò de Roberti. L'introduzione del riso in Italia rimase inizialmente limitata ai territori delle famiglie Sforza (Milano), Gonzaga (Mantova) ed Este (Ferrara) (Motta, 1913). Una volta compreso che poteva essere coltivato nei terreni paludosi che poco si prestavano alle altre culture, il riso cominciò a espandersi in tutto il Nord Italia, soprattutto nelle zone di Pisa, Bologna, Venezia e Verona. Sono invece ben documentate le origini del riso nel Novarese, da attribuire agli spagnoli che di qui passarono nel 1521 al seguito di Carlo V per conquistare Milano (De Gregory, 1818), e nel Vercellese, dove fra i secoli XIII e XIV sorse un monastero di monaci cistercensi provenienti da La Fertè, in Francia, che furono i primi a compiere la bonifica e a disboscare una vasta zona attorno a Lucedio (l'attuale Vercelli) in cui introdussero la risicoltura, visto che la regola imponeva loro di coltivare la terra.

Nessuno sa neppure da dove sia venuto il sistema di gestione delle acque che ancora oggi viene attuato nelle risaie. Alcuni sostengono che sia di origine siciliana, allora occupata dai mori, altri ipotizzano un'origine veneziana derivante dai legami della città lagunare con l'oriente, altri ancora l'attribuiscono agli aragonesi che a loro volta l'avrebbero imparata dai mori ai tempi dell'occupazione spagnola. Quest'ultima ipotesi sembra la più realistica. Quello che è chiaro è che la risicoltura impiega una notevole quantità di acqua: partendo dalla germinazione che avviene sommergendo il campo per fare in modo di isolare termicamente le plantule proteggendole dai tardivi freddi invernali, arrivando fino alla fioritura quando la richiesta di acqua è di minor entità, ma pur sempre importante. Per questo da subito la risicoltura si diffuse nelle zone paludose del Nord Italia e vi fiorì a tal punto che il riso venne chiamato il "tesoro delle paludi" (Nunch, 1910).

Scarse e frammentarie notizie sono disponibili sulle varietà coltivate. Bisogna attendere il 1700 quando alcuni autori italiani cominciano a scrivere di un riso detto "Nostrale". Più che una varietà a sé, il Nostrale è da considerarsi come un miscuglio di risi mutati spontaneamente; i suoi tratti caratteristici erano un'altezza pari a 1,20 m, una tendenza all'allettamento, un chicco grande, bianco e perfetto per gli usi del tempo, ma anche una elevata sensibilità al fungo *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia oryzae*) (Piacco, 1954). Questo patogeno fu una delle maggiori cause di selezione delle varietà di riso italiane: fra gli anni 1823 e 1827 si verificò infatti un'epidemia fungina che attaccò ovunque le piante di Nostrale, comportando una diminuzione delle rese. I coltivatori cominciarono quindi a cambiare varietà, introducendo risi provenienti da oriente, in particolare da Cina e Giappone, che fossero resistenti al patogeno. Selezionarono quindi quelli che meglio si adattarono alle nuove condizioni, fino ad arrivare a un completo abbandono della varietà Nostrale intorno al 1870 (Malinverni, 1872; Bordiga *et al.*, 1880).

Fino alla fine del 1800 in Italia le principali varietà di riso coltivato furono due: il Chinese, sviluppato nella tenuta del conte Leonardi da semi provenienti dalla Cina (Re, 1826) e il Bertone. Non si è mai capito se esse fossero o meno la stessa varietà, ma

entrambe possedevano una certa resistenza a *M. grisea* (Malberti, 1829). Durante quegli anni venne inaugurato il canale artificiale Cavour (1863), che permise di coltivare riso in un'areale più vasto. Nel 1842 nacque l'Associazione Agraria, promossa dal re Carlo Alberto, con il compito di favorire l'innovazione varietale. Le rese di riso crebbero anche grazie all'impiego di concimi e agrofarmaci, ma negli anni compresi fra 1875 e 1895 *M. grisea* manifestò una forte virulenza, causando il fallimento di molti coltivatori ed evidenziando la necessità di nuove varietà più resistenti. Per questo motivo l'Associazione Agraria importò nuovi semi dall'Est, in particolare dall'India e Giappone (Boll. Comm. Agr., 1877). Recenti dati molecolari confermano l'origine asiatica dei risi italiani (Figura 4).



**Figura 4. Origine del riso italiano.** Test statistici di similarità del riso italiano con cultivar coltivate in altre parti del mondo. In alto a sinistra (a) è riportato un dendrogramma indicante le relazioni genetiche che intercorrono fra gruppi di risi coltivati con diversa origine. In (b) viene riportata una mappa (sistema di informazione geografica) che illustra la similarità genetica fra il riso tradizionale italiano (Italia1) a quello asiatico coltivato in un particolare areale. L'intensità di colore è direttamente proporzionale al grado di parentela. In (c) sono elencate le similarità genetiche ricavate dalle coppie di genotipi di riso. In (d) sono riportate le corrispondenze delle varietà esaminate. Le immagini sono state tratte e talvolta riadattate da Cai e collaboratori (2013).

Nel 1905 viene redatta una delle prime e più complete liste delle varietà coltivate in Italia in cui compaiono 44 varietà, fra cui il "Chinese Originario" avrà il futuro più florido. Tale cultivar raggiungeva un'altezza fra i 90 e i 100 cm, era molto resistente a *M. grisea* e la sua resa era incredibilmente alta: nel 1905 era pari a 2,4 tonnellate per ettaro, che diventarono 4 nel 1915 fino a 4,9 nel 1929; alcuni riportano che in particolari condizioni si potesse arrivare a 5,5-6 tonnellate per ettaro (Gobetti, 1908). Partendo dal Chinese Originario si ottennero molte varietà come il Balilla, l'Allorio, il Pierrot e il Maratelli, che fu coltivato su più di 10.000 ettari fra il 1960 e il 1970 (Maratelli, 2003). Presso la stazione sperimentale di Riscicoltura di Vercelli dalla varietà americana Lady Wright, considerata il capostipite delle varietà a chicco cristallino e lungo, si ottennero nuove linee come Roma, Sesia e Senator Novelli (Chiappelli, 1929). Nel 1961 l'Ente Nazionale Risi sviluppò una nuova cultivar, Sant'Andrea, che è coltivata ancora oggi e ha intrapreso l'iter per il riconoscimento della Denominazione di Origine Protetta (D.O.P.).

Per tutta la durata del XX secolo vennero sviluppate in Italia nuove cultivar di riso, utilizzando in maniera indipendente due approcci: il primo vedeva impegnati direttamente i coltivatori, alla perenne ricerca di un riso più produttivo; il secondo coinvolgeva la stazione sperimentale di Riscoltura di Vercelli, da sempre molto attiva nel valutare diverse sementi provenienti da tutto il mondo e la loro capacità di adattamento alle condizioni locali. In questo modo il centro di ricerca ottenne nel 1937 il primo ibrido risultante da un incrocio fra le varietà Vialone e Nano: il Vialone Nano, a cui è oggi riconosciuta l'Identificazione Geografica Protetta (I.G.P.). Qualche anno più tardi (1945) da un coltivatore privato (Ettore De Vecchi, di Paullo) venne sviluppata la cultivar Carnaroli (Vialone x Lencino). Il nome Carnaroli è da sempre legato al piatto tipico della cucina italiana, il risotto, per via del suo contenuto in amiloso e amilopectina capace di conferire resistenza alla cottura. Nel 1946 un altro coltivatore privato (Domenico Marchetti, di Arborio) sviluppò una cultivar destinata a diventare famosa: l'Arborio (Vialone x Lady Wright).

Ben presto si ebbe la necessità di un criterio di qualificazione che considerasse le più immediate caratteristiche organolettiche, piuttosto che quelle botaniche. Venne quindi introdotta una suddivisione in gruppi commerciali ancora oggi valida in Italia: superfino, fino, semifino e comune. La medesima scala venne introdotta e adottata successivamente anche dalla legislazione europea, variando i termini: tondo, medio, lungo A e lungo B (Figura 5).

#### Figura 5. Gruppi commerciali del riso italiano.

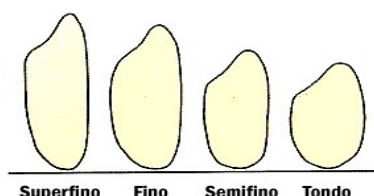
Sono riportate le classi definite dalla normativa europea:

“Tondo”, o riso comune, con grani di lunghezza inferiore a 5,2 mm (come le varietà Balilla, Elio e Selenio).

“Medio” o semifino con chicchi di lunghezza compresa fra i 5,2 e i 6,2 e rapporto tra lunghezza e larghezza inferiore a 3. (Vialone Nano).

“Lungo di tipo A” con lunghezza dei chicchi superiore ai 6 mm ed un rapporto con la larghezza compreso fra 2 e 3 (Arborio, Baldo, Carnaroli, Sant'Andrea, Volano).

Lungo di tipo B il cui rapporto tra lunghezza e larghezza è superiore a 3 (Thaibonnet).



#### 1.1.5. Statistiche del riso italiano

La risicoltura in Italia è fortemente legata alla disponibilità idrica. Per questo motivo si è diffusa lungo il corso del fiume Po, in territori un tempo paludosi delle regioni Emilia Romagna, Veneto, Lombardia e Piemonte. Più di 500 anni di risaia hanno modificato questi ambienti, creando un complesso ecosistema artificiale caratterizzato da una notevole biodiversità. In parallelo una filiera produttiva ben organizzata ha permesso all'Italia di conquistare il primato europeo, con investimenti mirati per valorizzare un patrimonio varietale unico al mondo, irripetibile in altri ambienti e dotato di caratteristiche di salubrità e sicurezza alimentare che vengono garantite ad ogni livello della filiera. Le statistiche dell'Ente Nazionale Risi del 2013 vedono l'estensione della risicoltura italiana (216.019 ettari) come la più vasta d'Europa, corrispondente al 51% delle risaie continentali (Tabella 2).

| Gruppo    | Varietà                     | ha totali | %     | Gruppo    | Varietà                      | ha tot | %    |
|-----------|-----------------------------|-----------|-------|-----------|------------------------------|--------|------|
| 1.TONDO   | CENTAURO                    | 23283,62  | 10,82 | 1.TONDO   | YUME                         | 545,89 | 0,25 |
| 4.LUNGO-B | CL 26                       | 22315,6   | 10,37 | 1.TONDO   | VIRGO                        | 538,6  | 0,25 |
| 4.LUNGO-B | SIRIO CL                    | 13661,32  | 6,35  | 4.LUNGO-B | THAIBONNET                   | 530,03 | 0,25 |
| 1.TONDO   | SELENIO                     | 12850,94  | 5,97  | 4.LUNGO-B | CRLB1                        | 520,56 | 0,24 |
| 3.LUNGO-A | VOLANO                      | 12551,93  | 5,83  | 3.LUNGO-A | MECO                         | 442,28 | 0,21 |
| 4.LUNGO-B | GLADIO                      | 12167,01  | 5,65  | 2.MEDIO   | VENERE                       | 418,57 | 0,19 |
| 4.LUNGO-B | CL 71                       | 10177,79  | 4,73  | 3.LUNGO-A | CARNISE                      | 413,75 | 0,19 |
| 3.LUNGO-A | DARDO                       | 9413,85   | 4,37  | 3.LUNGO-A | ARBORIO                      | 410,94 | 0,19 |
| 3.LUNGO-A | LUNA CL                     | 8084,4    | 3,76  | 3.LUNGO-A | AIACE                        | 389,49 | 0,18 |
| 3.LUNGO-A | BALDO                       | 7780,74   | 3,61  | 3.LUNGO-A | GLORIA                       | 367,38 | 0,17 |
| 1.TONDO   | SOLE CL                     | 6791,7    | 3,16  | 3.LUNGO-A | ONICE                        | 361,97 | 0,17 |
| 3.LUNGO-A | CARNAROLI                   | 5885,35   | 2,73  | 3.LUNGO-A | CAMMEO                       | 334,64 | 0,16 |
| 3.LUNGO-A | S.ANDREA                    | 5276,38   | 2,45  | 4.LUNGO-B | URANO                        | 328,65 | 0,15 |
| 3.LUNGO-A | RONALDO                     | 5258,55   | 2,44  | 2.MEDIO   | CRONO                        | 316,57 | 0,15 |
| 3.LUNGO-A | AUGUSTO                     | 4349,19   | 2,02  | 4.LUNGO-B | SPRINT                       | 309,38 | 0,14 |
| 4.LUNGO-B | MARE CL                     | 4282,51   | 1,99  | 1.TONDO   | DUCATO                       | 308,96 | 0,14 |
| 3.LUNGO-A | LOTO                        | 4209,51   | 1,96  | 1.TONDO   | CLEOPATRA                    | 303,55 | 0,14 |
| 1.TONDO   | CL12                        | 3449,1    | 1,60  | 4.LUNGO-B | TIGRE                        | 275,34 | 0,13 |
| 2.MEDIO   | VIALONE NANO                | 3266,26   | 1,52  | 4.LUNGO-B | OCEANO                       | 268,98 | 0,12 |
| 3.LUNGO-A | GALILEO                     | 3193,83   | 1,48  | 4.LUNGO-B | GANGE                        | 259,14 | 0,12 |
| 3.LUNGO-A | KARNAK                      | 3012,8    | 1,40  | 3.LUNGO-A | CARNAROLI IGP<br>DELTA DELPO | 254,14 | 0,12 |
| 1.TONDO   | BRIO                        | 2938,02   | 1,36  | 4.LUNGO-B | APOLLO                       | 252,18 | 0,12 |
| 1.TONDO   | BALILLA                     | 2887,64   | 1,34  | 1.TONDO   | GAGERON                      | 246,14 | 0,11 |
| 3.LUNGO-A | ROMA                        | 2053,15   | 0,95  | 2.MEDIO   | ROSA MARCHETTI               | 227,35 | 0,11 |
| 4.LUNGO-B | CLXL745                     | 1805,88   | 0,84  | 2.MEDIO   | ARGO                         | 225,91 | 0,10 |
| 3.LUNGO-A | PUMA                        | 1305,07   | 0,61  | 3.LUNGO-A | ARBORIO IGP<br>DELTA DELPO   | 210,1  | 0,10 |
| 4.LUNGO-B | CL46                        | 1276,36   | 0,59  | 3.LUNGO-A | CARNAROLI DOP<br>BARAGGIA    | 198,14 | 0,09 |
| 3.LUNGO-A | NEMBO                       | 1226,73   | 0,57  | 1.TONDO   | ERIDANO                      | 170,99 | 0,08 |
| 3.LUNGO-A | OPALE                       | 1215,87   | 0,56  | 3.LUNGO-A | BACCO                        | 169,12 | 0,08 |
| 3.LUNGO-A | ULISSE                      | 1065,42   | 0,49  | 4.LUNGO-B | GIGLIO                       | 139,24 | 0,06 |
| 3.LUNGO-A | CRESO                       | 870,05    | 0,40  | 4.LUNGO-B | CENTRO                       | 135,32 | 0,06 |
| 4.LUNGO-B | ELLEBI                      | 794,82    | 0,37  | 3.LUNGO-A | CARNISE PRECOCE              | 131,53 | 0,06 |
| 1.TONDO   | CERERE                      | 793,46    | 0,37  | 3.LUNGO-A | EUROSIS                      | 130,35 | 0,06 |
| 4.LUNGO-B | ARSENAL                     | 757,61    | 0,35  | 3.LUNGO-A | ARCHIMEDE                    | 124,07 | 0,06 |
| 4.LUNGO-B | CL80                        | 709,59    | 0,33  | 3.LUNGO-A | LINCE                        | 119,69 | 0,06 |
| 3.LUNGO-A | S.ANDREA DOP<br>BARAGGIA    | 591,72    | 0,27  | 3.LUNGO-A | FEDRA                        | 119,01 | 0,06 |
| 2.MEDIO   | VIALONE NANO IGP<br>VR      | 551,89    | 0,26  | 1.TONDO   | ELIO                         | 117,53 | 0,05 |
| 1.TONDO   | VARIE TONDO<br>Sperimentali | 548,77    | 0,25  | 3.LUNGO-A | ARIETE                       | 112,9  | 0,05 |

**Tabella 2. Elenco delle varietà di riso coltivate in Italia nel 2013.** Sono riportati i rispettivi gruppi varietali, superfici e percentuali sull'area totale coltivata. Cultivar impiegate in un'areale totale inferiore ai 100 ettari non sono state riportate. Dati ottenuti da Ente Nazionale Risi ([www.enterisi.it](http://www.enterisi.it)).



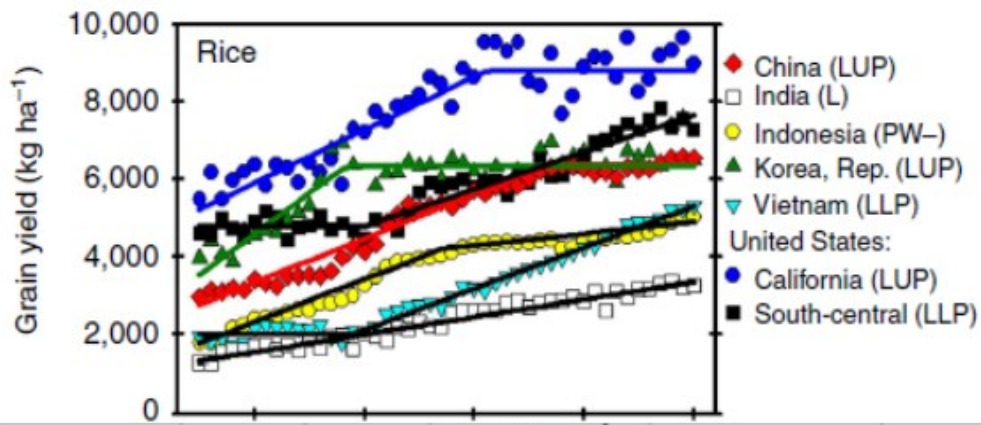
Gli altri paesi produttori sono Spagna, Francia, Grecia, Portogallo, Romania, Bulgaria e Ungheria. L'Italia copre il 49% dell'intera produzione europea, è l'unico paese dell'Unione che utilizza varietà sia del sottogruppo *japonica* che *indica*, ed è l'unica produttrice al mondo di alcune cultivar come Arborio, Carnaroli e Vialone nano. Se si guarda più nello specifico, circa il 90% del riso italiano viene prodotto nelle regioni della Lombardia e del Piemonte, che diventa 98% se si comprende anche Emilia Romagna e Veneto. Relativamente al prodotto, una percentuale del 35% viene impiegato per il mercato interno e il rimanente viene esportato. In totale oggi si coltivano in Italia approssimativamente 70 varietà di riso (Tabella 2), fra cui due I.G.P. ("Riso Vialone Nano veronese" e "Riso del Delta del Po") e una D.O.P. "Riso di Baraggia biellese e vercellese".

### 1.1.6. Nuove sfide per il futuro

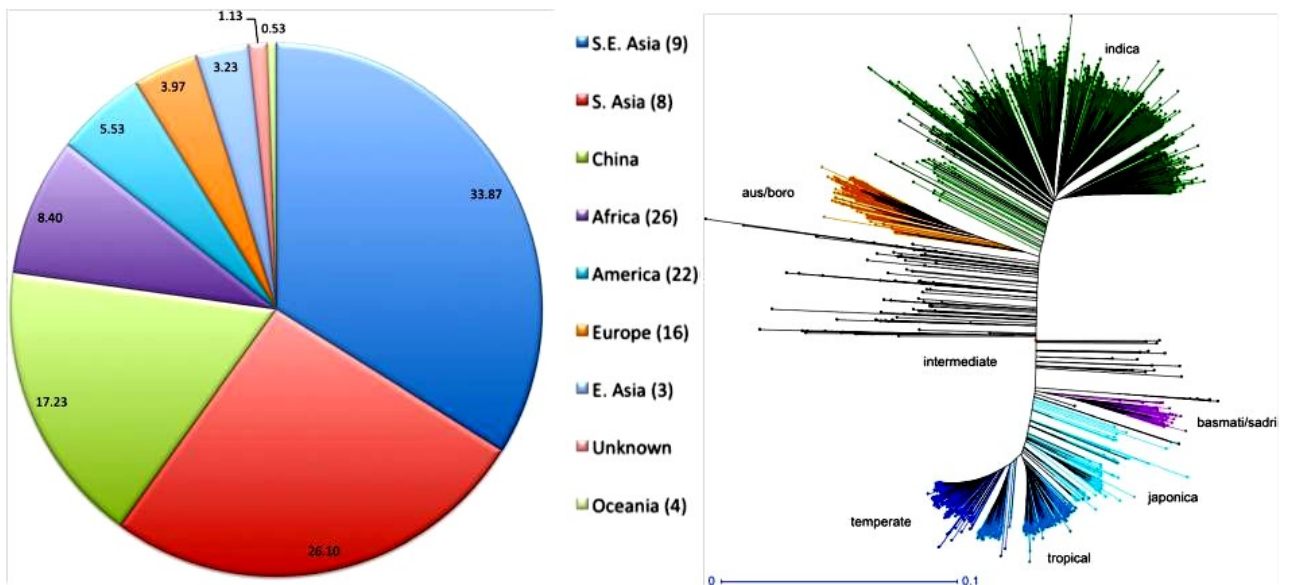
Attualmente la popolazione globale si attesta intorno ai 7 miliardi di persone ed è in continua crescita. Le stime delle Nazioni Unite per il 2050 prevedono il raggiungimento di 8-10 miliardi di abitanti. È stato calcolato che per sfamare nel 2050 9 miliardi di persone la resa delle colture più importanti deve crescere del 2,4% all'anno, ma negli ultimi anni l'incremento è stato ben al di sotto della metà di questo valore. Si potrebbe pensare di destinare più terreno per la produzione di cereali, ma l'agricoltura impiega il 70% delle risorse idriche del pianeta e ne occupa il 40% della superficie, di cui il 30% è destinata a colture alimentari e il 70% è impiegata a pascolo. Sottrarre terreni al pascolo si tradurrebbe in una pericolosa perdita di biodiversità e si potrebbe rivelare inutile, poiché i paesi in via di sviluppo cominciano a richiedere sempre più carni. Inoltre negli USA e in Brasile si sta verificando l'esatto opposto: crescono le aree destinate alla coltura di varietà da cui si produce il bioetanolo, riducendo quelle per scopi alimentari. D'altra parte il cambiamento climatico potrebbe avere effetti deleteri sulle rese delle colture alimentari. Viene infatti ipotizzato un aumento delle temperature da 2 a 6°C entro il 2100, e secondo alcuni studi si determinerebbero perdite iniziali dell'ordine del 10% per grano e riso e del 17% per soia e mais aumentando di un grado la temperatura media (Taiz, 2013).

Per molte specie di interesse agro-alimentare hanno cominciato a essere disponibili le sequenze genomiche, permettendo di conoscere gli alleli presenti per un determinato gene e avvantaggiando il processo di *breeding*, rendendolo più mirato. Fino a questo momento, infatti, l'aumento delle rese è stato ottenuto dai *breeders* mediante incroci assistiti in cui venivano inserite nuove caratteristiche in varietà già molto produttive. Tale processo richiede l'utilizzo di specie capaci di incrociarsi fra loro e di caratteristiche associate a pochi geni o a geni fra loro poco distanti. Questi approcci hanno dato il via alla "*Green Revolution*", ma oggi il loro potenziale si sta esaurendo: è stato calcolato che la resa cerealicola cresce seguendo un modello esponenziale solo in pochissimi paesi, mentre in molti sembra che si sia già raggiunto il limite massimo (Figura 6; Grassini *et al.*, 2013).

Ci sarebbe quindi bisogno di una "*Gene Revolution*", capace di sfruttare le conoscenze che vengono prodotte con una velocità sempre più elevata, con lo scopo di incrementare l'efficienza fotosintetica e, magari, ottenere cereali perenni capaci di fissare azoto. Senza ipotizzare risultati tanto strabilianti, da quando nel 2004 è stato completato il sequenziamento del genoma di riso (International Rice Genome Sequencing Project, 2005) si è cominciato ad avere a disposizione uno strumento molto potente per identificare la funzione dei singoli geni e il loro effetto additivo sui parametri colturali. Ma poiché questo ancora non dava un'idea della variabilità dei singoli loci, nel 2014 sono state sequenziate 3000 varietà di *O. sativa* originarie di tutto il mondo ("The 3,000 rice genomes project", CAAS *et al.*, 2014). I dati sono oggi disponibili in rete (<http://gigadb.org/dataset/200001>) (Figura 6).



| Country/region | Statistical model <sup>†</sup> |            |                      |                             |            |
|----------------|--------------------------------|------------|----------------------|-----------------------------|------------|
|                | L                              | QP         | PW <sup>†</sup>      | LP <sup>†</sup>             | EXP        |
| <i>Rice</i>    |                                |            |                      |                             |            |
| Bangladesh     | 0.92 (234)                     |            | 0.98 (120) [+; 1988] |                             | 0.97 (141) |
| China          | 0.93 (337)                     | 0.96 (256) |                      | 0.97 (216) [U; 1997]        | 0.88 (431) |
| India          | <b>0.95 (142)</b>              |            |                      |                             | 0.93 (163) |
| Indonesia      | 0.91 (297)                     | 0.97 (172) | 0.98 (130) [-; 1987] |                             | 0.85 (380) |
| Japan          | <b>0.61 (294)</b>              |            |                      | 0.63 (290) [U; 1997]        | 0.60 (297) |
| Korea, Rep. of | 0.62 (566)                     | 0.79 (434) |                      | <b>0.81 (412) [U; 1978]</b> | 0.60 (588) |
| Philippines    | <b>0.95 (166)</b>              |            |                      |                             | 0.93 (205) |
| Thailand       | 0.86 (151)                     |            | 0.95 (89) [+; 1988]  |                             | 0.90 (129) |
| United States: |                                |            |                      |                             |            |
| California     | 0.77 (640)                     | 0.84 (550) |                      | <b>0.87 (490) [U; 1992]</b> | 0.74 (683) |
| southern       | 0.87 (371)                     |            |                      | <b>0.93 (269) [L; 1980]</b> | 0.90 (331) |
| Vietnam        | 0.94 (292)                     |            |                      | <b>0.99 (134) [L; 1979]</b> | 0.98 (177) |



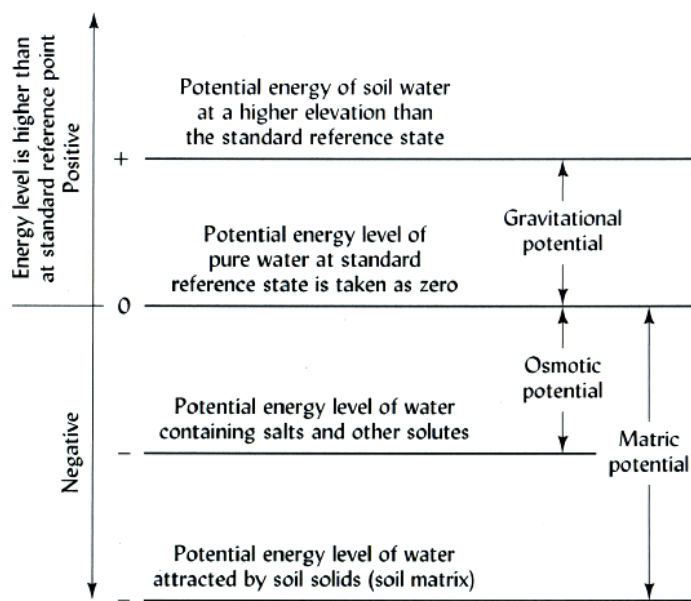
**Figura 6. Proiezioni dell'andamento della produttività delle colture di riso e variabilità presente nel germoplasma a livello mondiale.** Nel grafico in alto sono riportati vari modelli di crescita della resa del riso (L, lineare senza plateau; QP, plateau quadratico; PW, andamento lineare crescente [+] o decrescente [-] dopo l'anno specificato; LUP or LLP, lineare con plateau alto o basso rispettivamente; EXP, andamento esponenziale) (Grassini *et al.*, 2013) e la corrispondente probabilità è elencata nella tabella con evidenziato il modello più probabile. In basso a sinistra è mostrato un grafico a torta esprime le percentuali, rispetto al totale delle varietà selezionate nell'area specificata, delle 3000 varietà che sono state coinvolte nel progetto "3,000 rice genomes project"; nella legenda a fianco fra le parentesi tonde è indicato il numero di paesi da cui si sono selezionate le cultivar studiate, mentre a destra è riportato un albero filogenetico che suddivide i maggiori cinque gruppi varietali sulla base di 200.000 SNP selezionati a caso dalle 18,9 milioni di varianti conosciute (CAAS *et al.*, 2014).

## 1.2. Il suolo e il suo potenziale idrico

Il suolo viene definito come lo strato superficiale che ricopre la crosta terrestre. Il suo spessore può variare da pochi centimetri ad alcuni metri. Il terreno viene originato dalla lenta degradazione della roccia madre a opera di processi di tipo meccanico (azione dell'acqua e di altri agenti atmosferici), fisico (irraggiamento solare e variazioni di temperatura) e chimico (azione diretta dell'acqua come solvente e idrolizzante e delle sostanze disciolte). A questi si aggiungono processi di tipo biologico e organico, che rendono il suolo fertile. Come terreno agrario viene inteso il suolo su cui interviene l'uomo esercitando azioni volte a facilitare la crescita di una determinata coltura. La sua funzione è quella di sostenere la pianta e di fornirle tutte le sostanze utili per il suo ciclo vitale.

Tra i parametri più utili per determinare la qualità di un suolo vi sono la capacità di trattenere l'acqua (capacità di campo) e il potenziale idrico. Quest'ultimo è un indice della tendenza del suolo a trattenere l'acqua, che si muove da zone con potenziale maggiore (o terreno più umido) a zone con potenziale minore, in cui il terreno è più secco. Il potenziale  $\psi$  è la somma di quattro termini:  $\psi = \psi_o + \psi_p + \psi_g + \psi_n$  (Figura 7), dove

- il potenziale gravitazionale ( $\psi_g$ ) è proporzionale all'altezza rispetto al sistema di riferimento e alla accelerazione di gravità ( $g$ )
- il potenziale di pressione ( $\psi_p$ ) è causato dalle forze di attrazione fra le particelle di terreno e di acqua, è positivo in suolo saturo e negativo in suolo insaturo
- il potenziale osmotico ( $\psi_o$ ) è dovuto alle sostanze disciolte nell'acqua, causa una diminuzione di potenziale rispetto all'acqua pura
- il potenziale osmotico pneumatico ( $\psi_n$ ) è dato dalla presenza di aria nel suolo.



**$\psi_p$**  **Figura 7. I componenti del potenziale idrico del suolo.** Elenco dei vari componenti del potenziale idrico del suolo e come ognuno di essi modifica il totale. Ad esempio aumentando il potenziale gravitazionale l'acqua tenderà a muoversi verso un  $\psi_g$  minore. Mentre se partiamo dal potenziale idrico pari a 0 (acqua distillata) e consideriamo una soluzione contenente dei soluti (maggiore  $\psi_o$ ) osserveremo il movimento dell'acqua distillata verso la soluzione più concentrata.

Le statistiche della FAO riportano che una delle maggiori minacce per la produttività agricola risulta essere la salinità, che modifica il potenziale idrico di un suolo, abbassandolo, e rendendo difficile per le piante estrarre da esso l'acqua di cui hanno bisogno. Attualmente un'area pari a 800 milioni di ettari, circa il 6% della superficie arabile, ha un contenuto eccessivo di sali, e la situazione peggiora di anno in anno.

### 1.2.1. Metodi di misurazione della salinità e tipologie di terreni

Per molto tempo si è misurata la salinità come percentuale di ioni presenti rispetto al peso totale, ma questo metodo non consentiva il riconoscimento dei singoli sali e con esso non permetteva il calcolo della pressione osmotica esercitata dagli ioni disciolti in soluzione.

Per questi motivi si è introdotta la misura della conducibilità elettrica (EC) dell'estratto saturo del terreno, un indice strettamente collegato con la pressione osmotica. Più un suolo contiene sali e più questi passeranno nel volume di acqua utilizzato per saturarlo, alzando il valore di conducibilità elettrica. Il metodo fa parte della serie ISO (ISO 7888:1985, ultima revisione 2012). Nello specifico, un suolo è definito salino quando la sua conducibilità elettrica è maggiore di 4 dS/m, il che corrisponde approssimativamente a una soluzione contenente 40 mM NaCl, capace di generare una pressione osmotica di 0,2 MPa.

Il sale che maggiormente determina la salinità del terreno è senza dubbio il cloruro di sodio, perché è il più solubile e il maggiormente diffuso. Nelle zone in cui è molto concentrato e combinato coi carbonati, è capace di innalzare il pH in maniera considerevole, anche a valori maggiori di 8,5 determinando il problema dell'alcalinizzazione. In base alla tipologia del terreno può provocare deflocculazione dell'argilla, deteriorandone la struttura. L'alto contenuto di sodio inoltre si abbina a una scarsa biodisponibilità di cationi come  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  (Tabella 3). Per questi motivi sono stati sviluppati dei parametri *ad hoc* per il sodio, come la Percentuale di Sodio Scambiabile (PSS, ovvero "Exchangeable Sodium Percentage", ESP) data dal rapporto percentuale fra  $Na^+$  e la Capacità di Scambio Cationico (CSC). Quest'ultimo parametro è però molto lungo e dispendioso da calcolare, per cui la PSS viene ricavata empiricamente dal rapporto di assorbimento del sodio ("Sodium Adsorption Ratio") con calcio e magnesio mediante le seguenti formule:

$$ESP = 100(-0.0126+0.01475 * SAR) / (1-(-0.0126+0.01475 * SAR))$$

$$\text{dove } SAR = Na^+ / \sqrt{[(Ca^{2+}+Mg^{2+})/2]} \quad Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} \text{ in meq/l}$$

Tali equazioni, definite e sviluppate dal Dipartimento per l'Agricoltura degli Stati Uniti, permettono di determinare *a priori* se un terreno è indicato o meno agli scopi agricoli e come intervenire, dove possibile, effettuando delle azioni correttive (Tabella 3).

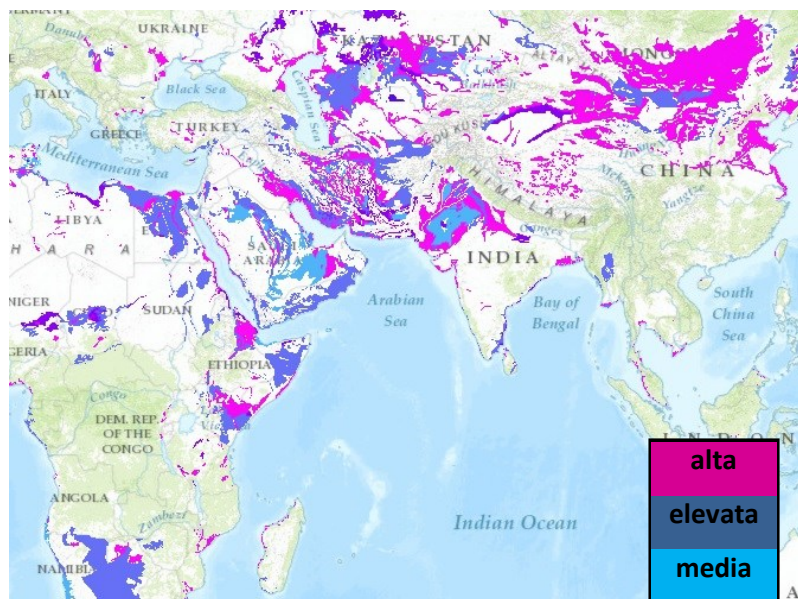
| Terreni       | EC<br>(dS/m <sup>-1</sup> ) | PSS<br>(%) | pH        | <b>Tabella 3. Classificazione dei suoli in base alla salinità.</b> Questa viene determinata mediante la conducibilità elettrica (a 25°C), la percentuale di sodio e il pH risultante dalle due variabili precedenti (misurato con 1 parte di suolo e 2 di acqua distillata). Le classi sono state sviluppate dal Laboratorio sulla Salinità del Dip. per l'Agricoltura degli Stati Uniti. |
|---------------|-----------------------------|------------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Salini        | > 4                         | < 15       | < 8,8     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Salini-sodici | > 4                         | > 15       | variabile |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Sodici        | < 4                         | > 15       | 8,5-10,7  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

### 1.2.2. Cause e distribuzione della salinità

Le cause della salinità nel suolo dipendono da vari fattori, e si distingue una salinità primaria dovuta a elementi naturali e una salinità secondaria determinata dall'uomo.

La fonte della salinità primaria è l'acqua di mare, che contiene una concentrazione di NaCl approssimativamente pari a 500 mM (Taiz & Zeiger, 2002). Le aree più esposte a questo rischio sono quelle costiere, poiché possono venire più facilmente a contatto con essa. Il danno avviene quando il sole fa evaporare l'acqua salata, asciugando il suolo in cui viene così concentrato il sale. Può anche accadere che un terreno venga a contatto con l'acqua marina attraverso canali o fiumi, come avviene periodicamente in Italia nei mesi di luglio e agosto nella zona deltizia del Po, quando la diffusa siccità abbassa il livello idrico del fiume, permettendo l'ingresso al mare per alcuni chilometri. Tale evento, definito come "cuneo salino", viene monitorato poiché negli ultimi anni ha assunto dimensioni sempre più preoccupanti (Figura 8). Altre cause della salinità primaria possono essere eventi eccezionali come cicloni (Bangladesh, 1991) oppure il recente tsunami che ha colpito il Sud Est asiatico

nel 2004 provocando una indifferenziata salinizzazione delle acque di falda e dell'entroterra. Infine, in misura minore, la salinità primaria può scaturire anche in seguito al lento degradarsi delle rocce presenti nel terreno.



**Figura 8. Salinità del suolo.** A sinistra è riportata la distribuzione dei suoli salini fra Asia, Europa e Africa, con quattro livelli arbitrari che ne definiscono la gravità. Sotto sono mostrati immagini dal satellite del delta del fiume Po con la risalita estiva del cuneo salino, evidenziata in rosso, negli anni 1950-1960, 1970-1980 e 2000 (da sinistra a destra). È evidente come il fenomeno si sia aggravato negli ultimi cinquanta anni, evidenziando la necessità di una più attenta gestione delle risorse idriche in Italia e un possibile coinvolgimento del cambiamento climatico.



L'irrigazione è una delle più diffuse cause antropiche di salinità, soprattutto in zone caratterizzate da un alto tasso di evaporazione. Alla fine del secolo scorso la diffusione di tale pratica ha consentito di aumentare le rese delle colture, soprattutto nei paesi subtropicali in via di sviluppo. Spesso però la qualità dell'acqua che veniva impiegata era pessima e ciò ha causato un deterioramento del suolo. Altre fonti secondarie di salinità possono essere rappresentate da residui di fertilizzanti, reflui animali, acque di scolo e acqua salata inserita nel suolo in corrispondenza di pozzi petroliferi.

Le statistiche riportano che dei 1500 milioni di ettari coltivati senza irrigazione il 2% sono affetti da salinità di tipo secondario, mentre dei 230 milioni di ettari irrigati uno su cinque ha un alto contenuto di sale (FAO, 2008). I suoli irrigati, pur costituendo una superficie molto inferiore, sono i più produttivi ed è in essi che viene coltivato un terzo del prodotto mondiale.

### 1.2.3. Adattamento delle piante allo stress salino

Le piante, essendo organismi sessili, non possono sfuggire ai fattori ambientali di stress. La salinità del suolo causa in un primo tempo una condizione di stress osmotico dovuto all'abbassamento del potenziale idrico del suolo. Se le condizioni avverse si

protraggono a lungo, la pianta può accumulare elevate concentrazioni intracellulari di ioni, che possono risultare tossiche (stress ionico). Le due tipologie di stress si accompagnano a numerosi effetti secondari, come l'accumulo di specie radicaliche dell'ossigeno (ROS), potenzialmente molto dannosi per la vitalità delle cellule e quindi per la pianta. Lo stress salino affligge in maniera indifferenziata le monocotiledoni e le dicotiledoni, ma alcune di esse hanno evoluto strategie per difendersi.

Da questo punto di vista vengono distinte due tipologie di specie: le glicofite, ovvero le piante incapaci di tollerare concentrazioni anche relativamente basse di sale, e le alofite, capaci di compiere il loro ciclo vitale in presenza di sale. Nel corso degli anni è stato più volte rivisitato il valore soglia che fa di una pianta una glicofita o un'aloftita: i 300 mM NaCl iniziali (Flowers *et al.*, 1977) sono stati poi abbassati a 200 mM NaCl (Flowers *et al.*, 2008), e altri hanno proposto addirittura soli 85 mM NaCl (Glenn *et al.*, 1999). Questa non uniformità nella definizione si traduce in un non definito numero di specie appartenenti alle alofite, che comunque si aggira intorno a 1500. Queste piante sono molto interessanti poiché conservano adattamenti fisiologici al sale che sono stati persi durante il processo di domesticazione delle specie vegetali. L'evoluzione delle alofite costituisce un evento molto raro, tanto che esse rappresentano solo lo 0,5% delle angiosperme, ma interessa ben 37 dei 65 ordini di piante (Flowers *et al.*, 2010) e studi filogenetici hanno dimostrato non meno di 59 eventi indipendenti di evoluzione (Saslis-Lagoudakis *et al.*, 2014).

Fra le strategie che permettono la crescita delle alofite in ambienti ostili si può ricordare:

- 1) la compartimentalizzazione degli ioni in determinate strutture cellulari, come i vacuoli, o nelle foglie vecchie
- 2) la secrezione del sale da particolari ghiandole, come nel caso delle mangrovie
- 3) l'accumulo nel citoplasma di metaboliti compatibili, come la prolina o glicinbetaina, oppure di cationi innocui come il potassio.

Gli adattamenti messi in atto dalle alofite sono molto dispendiosi da un punto di vista energetico, quindi hanno dirette ripercussioni sulla loro produttività che spiegano il motivo per cui queste specie non vengono impiegate in campo agronomico. Vi sono però alcune eccezioni, come la *Salicornia bigelovii* capace di produrre 2 t ha<sup>-1</sup> di semi che contengono olio (28%) e un alto contenuto in proteine (31%). Si è però osservato che in condizioni convenzionali la resa e l'utilizzo idrico delle glicofite sono migliori. Inoltre alcune specie di alofite producono dei composti antinutrizionali che ne limitano l'utilizzo come mangimi per gli animali (Glenn *et al.*, 1999).

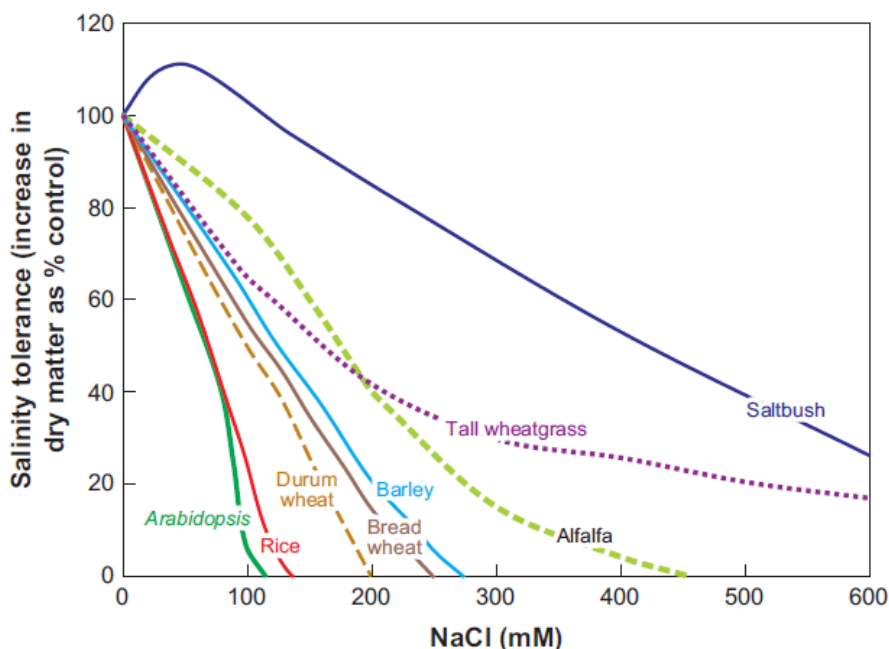
#### **1.2.4. Effetti della salinità del suolo sulla produttività agricola**

Le specie coltivate hanno subito un lungo processo di selezione assistita che ne ha aumentato la produttività; per contro, sono andate perse alcune caratteristiche oggi desiderabili, come le strategie di adattamento delle alofite. Fra i cereali il riso è quello più sensibile al sale (Figura 9) con effetti paragonabili a quella della specie modello *Arabidopsis thaliana*. L'orzo rimane il cereale più tollerante, mentre il grano ha una sensibilità intermedia.

Il maggiore effetto fenotipico della salinità sulle piante è la diminuzione della crescita: nei cereali è stata osservata una riduzione del numero di internodi, mentre in altre specie viene riportata una diminuzione dell'area foliare. Il meccanismo alla base di tale processo non è del tutto chiaro, ma sembra che siano coinvolte vie metaboliche dipendenti e indipendenti da ormoni. Lo stress osmotico richiama acqua dall'esterno, per cui la pianta limita il più possibile i processi che la consumano come la traspirazione foliare. È stato dimostrato che un aumento della tolleranza allo stress osmotico riduce gli effetti negativi come la diminuzione dell'espansione foliare e radicale, la chiusura degli stomi.

Lo stress ionico diventa significativo solo a elevate concentrazioni saline o in specie con qualche difetto nel trasporto del sodio. Generalmente è infatti il sodio ad avere effetti tossici, e per questo molti studi si sono focalizzati sui meccanismi di trasporto e di esclusione di tale catione. Esistono comunque alcune specie, come il cetriolo, la soia e la vite, in cui l'effetto tossico è determinato invece dallo ione cloro, che diffonde liberamente nella pianta,

mentre il sodio viene selettivamente intercettato e concentrato nelle radici (Läuchli, 1984; Storey *et al.*, 1999). Un possibile meccanismo di tolleranza allo stress salino prevede l'esclusione del sodio da parte dell'apparato radicale, evitando il trasporto alla parte aerea della pianta. I vegetali incapaci di attuare tale strategia concentrano il catione preferenzialmente nei tessuti più vecchi. Se le condizioni di stress permangono le foglie vecchie muoiono e la pianta, non essendo più in grado di produrre una quantità sufficiente di fotosintati, ridurrà ulteriormente il suo tasso di crescita.



**Figura 9. Sensibilità allo stress salino di diverse specie vegetali.** L'effetto della presenza del sale viene espresso come percentuale di peso secco dopo tre settimane di crescita. Le specie valutate sono riso (*Oryza sativa*), grano duro (*Triticum turgidum* ssp *durum*), grano tenero (*Triticum aestivum*), orzo (*Hordeum vulgare*), gramigna (*Thinopyrum ponticum*), arabetta comune (*Arabidopsis thaliana*), erba medica (*Medicago sativa*), e un'alofita appartenente al genere *Atriplex* (*Atriplex amnicola*) (Munns *et al.*, 2008).

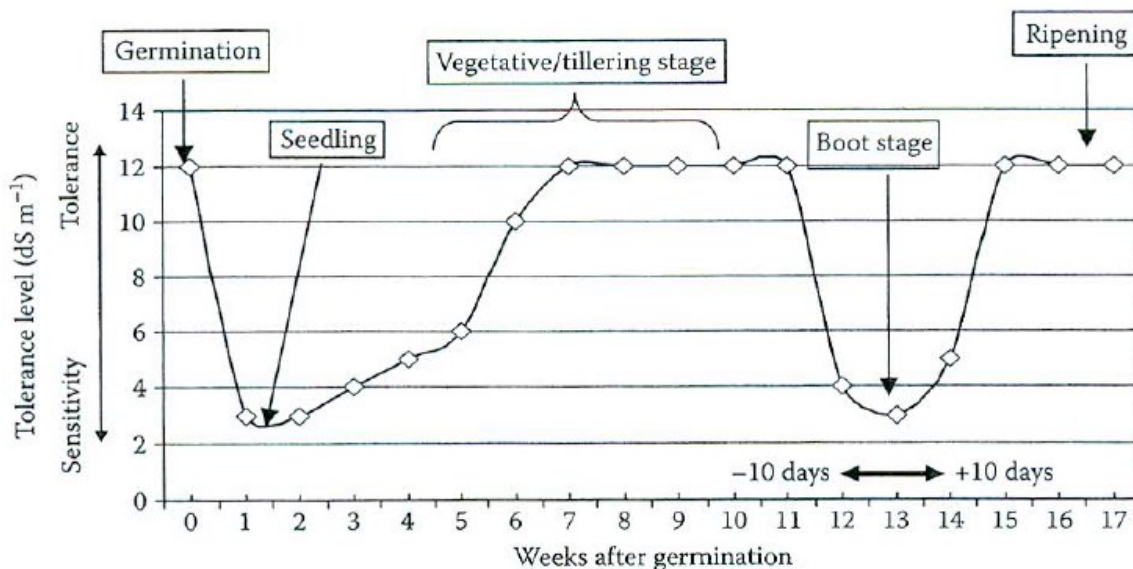
Alcune specie di interesse agronomico hanno dei progenitori resistenti al sale, come il grano (imparentato con *Aegilops* e *Thinopyrum*), l'orzo (*Hordeum maritimum*), il pomodoro (*Lycopersicon cheesmanii*) e altre ancora (Glenn *et al.*, 1999). Quindi non è corretto parlare delle specie di interesse alimentare come glicofite assolute. Il carattere della tolleranza allo stress osmo-salino è multigenico e trasferire un singolo gene da una specie all'altra può non rappresentare una soluzione definitiva e avere delle ripercussioni su altri processi fisiologici. Munns e collaboratori introdussero ad esempio nel grano duro il gene *Kna1* di grano tenero, incrementandone la resistenza al sale, ma abbassandone la resa (Munns *et al.*, 2003).

### 1.2.5. La sensibilità del riso all'eccesso di sali

Definire il riso come una specie sensibile allo stress salino è limitativo, poiché fra le più di 100.000 varietà esistenti esiste una grande variabilità di risposta. Per esempio la cultivar Pokkali mostra spiccate capacità di adattamento, mentre la IR29 risulta estremamente suscettibile. Complessivamente circa il 20% delle varietà è da considerarsi tollerante. Inoltre nel riso la sensibilità al sale è dipendente dalla fase di crescita, dove lo sviluppo della plantula e la fioritura risultano i momenti in cui la pianta è maggiormente suscettibile (Figura 10). Anche a basse concentrazioni la salinità del suolo comporta una riduzione delle rese: esperimenti condotti in laboratorio hanno evidenziato un valore pari a 3 dS/m, oltre al quale la produttività diminuiva del 12% per ogni unità di conducibilità (Maas and Grattan 1999; Hanson *et al.*, 1999). Tale soglia è stata in seguito abbassata a 1,9 dS/m sulla base di sperimentazioni condotte in campo (Grattan *et al.*, 2002).

A ogni specifica varietà è stato associato un valore di sensibilità allo stress salino: vengono considerate resistenti le varietà che hanno un valore compreso fra 1 e 3. Ad oggi non sono stati eseguiti studi che comparassero le variabilità fenotipiche presenti tra le sottospecie *indica* e *japonica*, ma solo sperimentazioni su un numero limitato di varietà

tolleranti o sensibili. Di solito il carattere di resistenza al sale viene associato preferibilmente al gruppo *indica*, in cui si contano numerose cultivar tolleranti che crescono nelle zone costiere: Nona Bokra (India), Pokkali (Sri Lanka), Getu (India), Cheriviruppu (India), SR26B (India), Damodar (India), Pat (India), Solla (India), Ketumbar (Indonesia), Khao Seetha (Thailandia) e Soc Nau (Vietnam). Di recente un'altra varietà di tipo *indica* originaria dell'Arabia Saudita, Hawasi, si è aggiunta a questa lista. Fra le varietà *japonica* si trovano meno cultivar resistenti, fra cui vale la pena di ricordare Harra (Spagna), Agami (Egitto), Daeyabyeo (Corea) e Moroberekan (Guinea). All'altro estremo si trovano varietà molto suscettibili, come IR28, IR29 e M1-48, tutti genotipi *indica*.



**Figura 10. Sensibilità al sale nelle diverse fasi del ciclo vitale del riso.** Gli stadi in cui il cereale è più suscettibile sono la crescita iniziale della plantula e la fase di fioritura (Singh *et al.*, 2010).

Gli studi effettuati per identificare i meccanismi fisiologici alla base della tolleranza al sale hanno evidenziato la presenza in varietà differenti di adattamenti diversi, che non venivano mai riscontrati simultaneamente nella medesima pianta; la distribuzione di tali meccanismi risulta indipendente dal differenziamento dei gruppi *indica* e *japonica* e mostra una origine poligenica (Negrão *et al.*, 2011). Relativamente all'origine geografica, si è osservata una forte localizzazione delle varietà resistenti di tipo *indica* nell'area costiera dell'India, mentre si ha una completa dispersione nei vari continenti per il gruppo *japonica*.

I cambiamenti morfologici dipendenti dallo stress salino in riso sono molteplici: si nota inizialmente la bruciatura dell'estremità foliare, per poi arrivare progressivamente a una diminuzione della crescita del fusto, una riduzione dell'inflorescenza e della sua durata, sterilità, crollo del peso medio dei chicchi, ripiegamento foliare e insorgenza di necrosi.

I meccanismi biochimici e fisiologici che consentono al riso un normale tasso di crescita in presenza di alte concentrazioni di sale sono:

- una bassa traslocazione foliare del sodio
- la capacità di assorbire limitate quantità di cloro
- il mantenimento del normale tasso di assorbimento di potassio, fosforo e zinco
- l'accumulo preferenziale del sodio e del cloro nel fusto e nelle foglie vecchie
- la capacità di sintetizzare osmoliti compatibili.

### 1.3. Lo stress osmotico e i suoi effetti

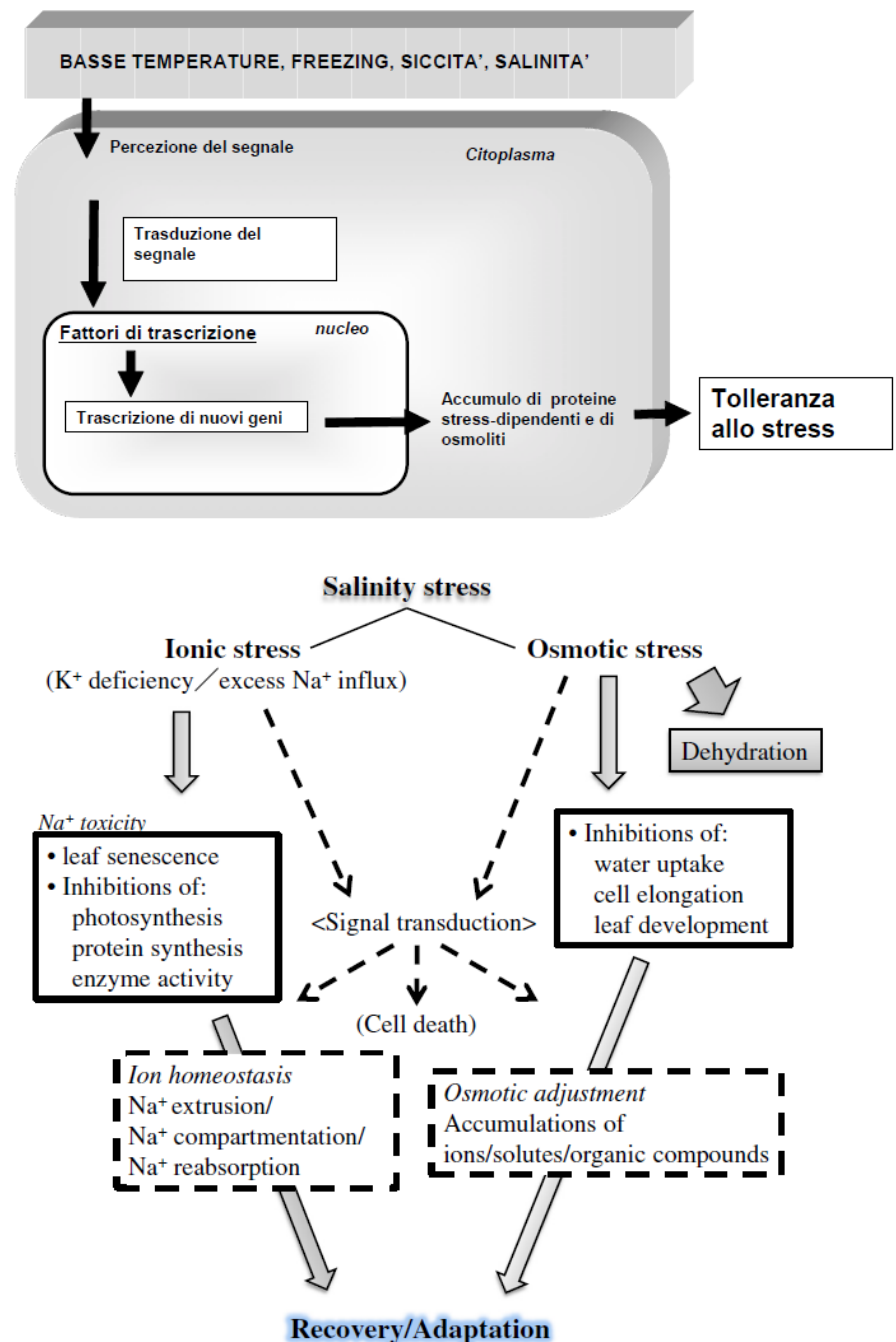
La sopravvivenza delle piante a fattori di stress presenti nell'ambiente dipende dalla capacità di percepire di tali minacce (*sensing*). Una volta avvertito il cambiamento, deve



essere prodotto un segnale che attivi specifiche risposte e meccanismi fisiologici che consentano alla pianta di crescere in presenza dello stress (Figura 11).

**Figura 11. Schema della risposta allo stress nella pianta.** Nel processo sono coinvolti dei sensori a livello di membrana o della parete, dei trasduttori che elaborano il segnale nel citosol e attivano dei fattori di trascrizione che hanno i loro bersagli nel nucleo, dove vengono trascritti specifici geni che alleviano le conseguenze dello stress permettendo alla pianta di continuare a crescere (Bagnaresi *et al.*, 2004).

Nella parte inferiore vengono riassunti gli effetti causati da un alto tasso di salinità nel suolo a cui viene sottoposta una pianta. Nelle caselle tratteggiate sono riportate le difese attivate per sopravvivere in tali condizioni (Horie *et al.*, 2012).



Uno stress salino improvviso mediante la sua componente osmotica può limitare l'assorbimento dell'acqua e dei sali in essa contenuti o, se è molto severo, generare un richiamo d'acqua dalla pianta. Le radici sono l'unico organo a diretto contatto con il terreno, e durante la loro storia evolutiva le piante hanno sviluppato dei sistemi di controllo atti a evitare un eccessivo ingresso di sali: l'acqua e i soluti in essa contenuti possono venire trasportati per via simplastica (entrando nel citosol) o per via apoplastica, non passando cioè attraverso le cellule radicali e mantenendo così la medesima composizione del terreno. È stato dimostrato che in riso più della metà del sodio che raggiunge la parte aerea ha viaggiato attraverso la via apoplastica, a causa di probabili discontinuità nella banda del Caspary in corrispondenza della radici laterali (Horie *et al.*, 2012). Le conoscenze dei meccanismi che modulano le preferenze di una via rispetto a un'altra non sono ancora del tutto chiare, anche

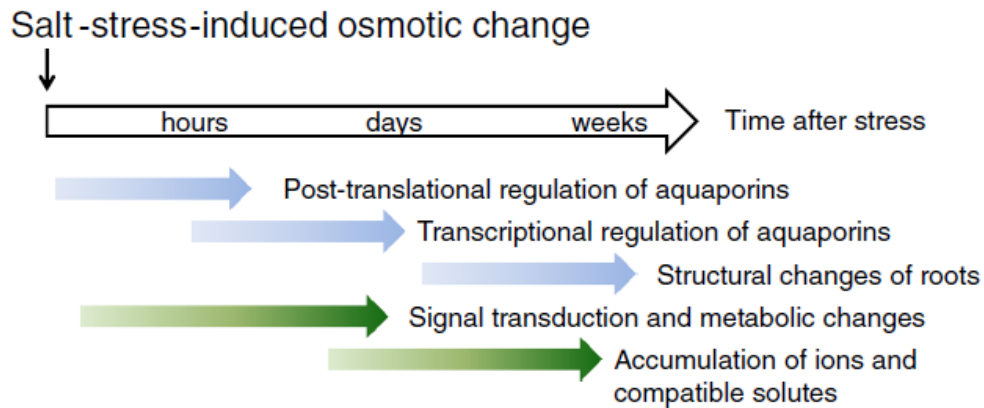
se l'anatomia delle radici sembra giocare un ruolo chiave. Mutanti di riso senza radici laterali o con solo radici laterali sembrano dimostrare che in questa tipologia radicale venga esclusa la via apoplastica. Inoltre utilizzando come osmolita il polietilenglicole (PEG) viene inibita la via apoplastica, perché vengono bloccati i pori della parete oppure perché viene modificata l'architettura radicale (Singh *et al.*, 2010). L'acqua è fondamentale anche perché consente il trasporto a lunga distanza fra le radici e la parte aerea. La foglia della pianta traspira 50 volte l'acqua trattenuta dalle cellule e così facendo concentra enormemente i sali nell'apoplasto. Questa situazione determina un richiamo idrico dalle cellule vicine, che possono morire, sviluppando il fenotipo della punta foliare bruciata. Lo stress osmotico quindi non colpisce solo il tessuto radicale, ma coinvolge anche la parte aerea inibendo processi fra loro molto diversi, come la fotosintesi, il metabolismo energetico e la crescita cellulare.

Data la natura sistemica dei danni provocati dallo stress osmotico, le risposte attuate dalle piante sono sia ormone-dipendenti che indipendenti, sia a lungo che a breve termine. Fra le risposte a breve termine ormone-dipendenti la più precoce è rappresentata dalla chiusura degli stomi. Tale processo è determinato dall'acido abscissico (ABA) ed è volto a limitare la perdita di acqua per traspirazione, ma per contro inibisce la fotosintesi perché limita l'ingresso di anidride carbonica. Se le condizioni di stress permangono, vengono messe in essere da parte della cellula quelle risposte protettive che necessitano di tempo per essere attivate, come l'accumulo di osmoliti compatibili. Anche la diminuzione della crescita della parte aerea sembra essere un processo attivato dalla pianta. Infatti un abbassamento del rapporto fra gli apici vegetativi e le radici sembra possa avere effetti positivi in condizioni di stress osmotico, e per questo in *Arabidopsis* vengono prodotte proteine inibitrici della crescita (Achard *et al.*, 2006). Dopo alcune ore dall'imposizione delle condizioni di stress vengono attuati aggiustamenti osmotici che permettono alle cellule di recuperare il volume originale, ma permane l'inibizione della crescita (Fricke *et al.*, 2002). Nei cereali, e in particolare in riso, col trascorrere dei giorni le foglie stressate appaiono più corte, ma anche più grosse, perché lo spessore non viene influenzato. Se le condizioni di salinità sono moderate ma di lunga durata, capita di osservare una diminuzione della crescita dei germogli laterali e alcuni effetti sullo sviluppo floreale, come fioritura anticipata e diminuzione del numero dei fiori. Queste conseguenze sono univocamente attribuibili allo stress osmotico, poiché si osservano utilizzando sia soluti ionici, come NaCl e KCl (Yeo *et al.*, 1991), che non ionici, come il PEG e mannitolo (Sümer *et al.*, 2004).

### **1.3.1. Potenziale idrico di suolo e pianta in relazione allo stress osmo-salino**

Per comprendere meglio lo stress osmotico causato dall'eccesso di sale nel suolo bisogna considerare la termodinamica che vi sta alla base. In riso la maggior parte dell'acqua viene assorbita dalle radici per via apoplastica e in questo processo il motore è costituito dal potenziale idrico ( $\Psi$ ). Nelle radici il potenziale idrico è dato dalla somma di quello pressorio ( $\Psi_p$ ) e di quello osmotico ( $\Psi_o$ ), mentre quello relativo alla gravità ( $\Psi_g$ ) può venir trascurato, essendo nulla la differenza di altezza fra suolo e radici. In condizioni normali  $\Psi$  intracellulare è minore di quello del suolo, e questo permette l'ingresso dell'acqua nelle radici. Quando aumenta la concentrazione dei sali disciolti nel suolo, diminuisce anche il  $\Psi_o$  extracellulare, che abbassa la differenza di potenziale ( $\Delta\Psi$ ) e con essa l'ingresso di acqua nella pianta. Se la concentrazione di soluti è talmente alta da invertire il  $\Delta\Psi$ , l'acqua esce dalle cellule che a lungo andare vanno incontro a disidratazione. Per minimizzare l'effetto dell'inversione di potenziale causato dallo stress osmotico le radici modulano la permeabilità idraulica ( $L_p$ ), oppure possono compiere degli aggiustamenti osmotici aumentando a loro volta la concentrazione citoplasmatica di soluti, i cosiddetti "osmoliti compatibili". Questa seconda strategia diminuisce direttamente il  $\Psi_o$  ma richiede tempo (da alcune ore ad alcuni giorni) poiché il segnale di stress deve venire trasdotto e attivare la trascrizione dei geni bersaglio (Figura 12). La modulazione della permeabilità idraulica ( $L_p$ ), può essere invece attuata in poche ore e costituisce un adattamento immediato allo stress. Se le condizioni avverse si protraggono per giorni la pianta mette in atto altre difese, come il cambiamento dell'anatomia delle radici, in modo da diminuire sempre più la via apoplastica e avere un controllo totale dei soluti in entrata.

È stato calcolato che il  $\Psi$  intracellulare di una cellula in pieno turgore di riso è di -0,5 MPa, che equivale a una soluzione a 220 mOsm o a una soluzione 124 mM di NaCl. Questo significa che una soluzione 100 mM di NaCl riduce, ma non azzerava o inverte il  $\Delta\Psi$ . In tali condizioni si è osservato un cambiamento della permeabilità idraulica di ripristino ( $L_{pr}$ ) che compensa la diminuzione di acqua in ingresso (Horie *et al.*, 2012). Il trasporto dell'acqua attraverso le membrane è reso possibile da proteine-canale dette acquaporine.



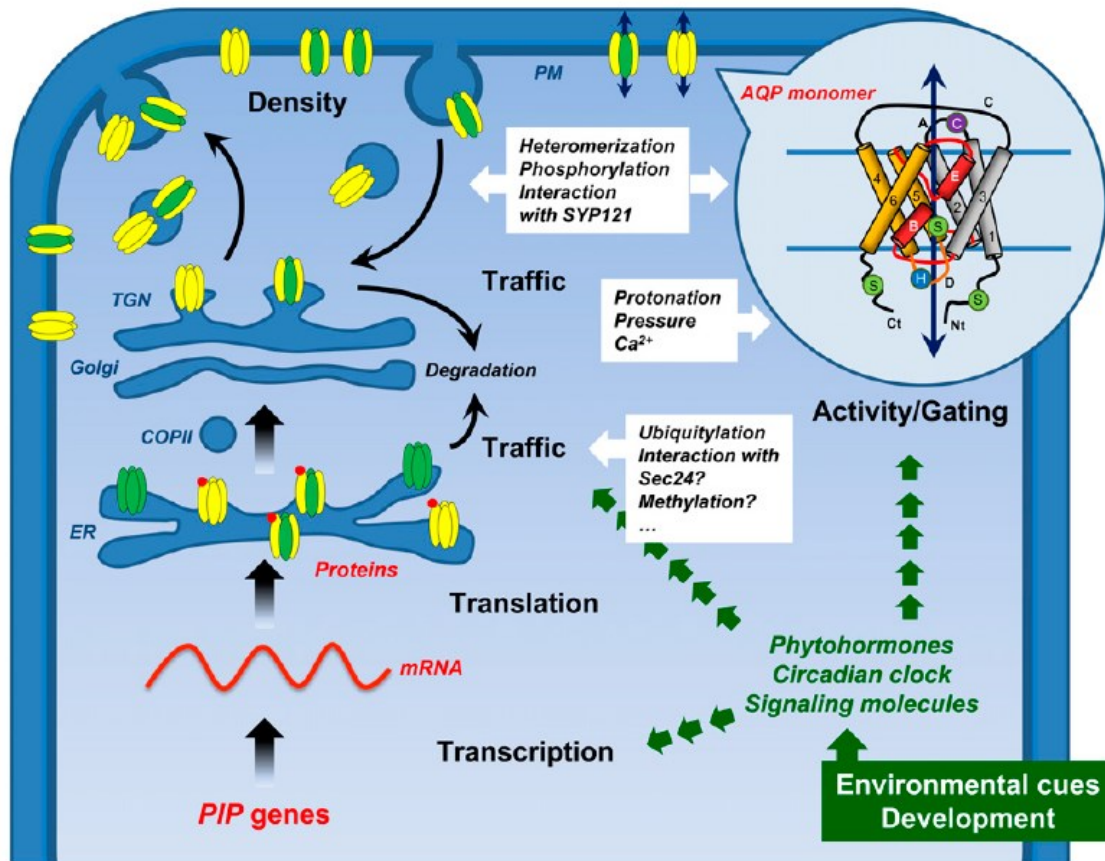
**Figura 12. Ordine temporale dei principali meccanismi di risposta allo stress osmotico in riso.** Le frecce blu indicano funzioni che modificano la permeabilità idrica delle radici, mentre quelle verdi includono le risposte di aggiustamento osmotico che abbassano il potenziale idrico cellulare (Horie *et al.*, 2012).

### 1.3.2. Il ruolo delle acquaporine nella risposta allo stress osmotico

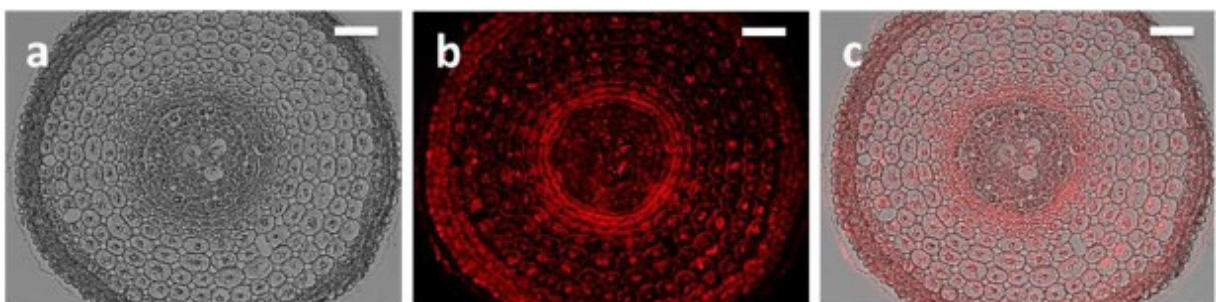
Le acquaporine sono proteine intrinseche di membrana capaci di trasportare acqua e composti neutri a basso peso molecolare. Quelle collocate nella membrana citoplasmatica contano quattro sottofamiglie, una delle quali, le *Plasma Membrane intrinsic Proteins* (PIP), viene divisa in due sottogruppi PIP1 e PIP2. Studi condotti su *Arabidopsis* hanno evidenziato il coinvolgimento delle PIP nel controllo dell'ingresso/fuoriuscita di acqua dalla cellula che modula la permeabilità cellulare ( $L_{pr}$ ): in condizioni di grave stress osmotico il processo di disidratazione può venire arrestato abbassando la  $L_{pr}$ . È interessante notare che sia in *Arabidopsis* che in mais in presenza di una concentrazione esterna di sale minore di 100 mM NaCl la permeabilità diminuisce, invece di aumentare per favorire l'ingresso di acqua. Questo adattamento potrebbe essere spiegato come una preparazione della pianta in vista di condizioni di stress più severe, o come un segnale rivolto all'intero organismo per modulare il metabolismo passando da una crescita veloce in condizioni normo-osmotiche a una più lenta in condizioni avverse. Nella varietà di riso *japonica* Nipponbare non si è osservata alcuna diminuzione della permeabilità idraulica nelle prime 24 ore di esposizione allo stress osmotico, anche estremo. È stato ipotizzato che la mancanza di regolazione della permeabilità in riso potesse essere alla base della sua marcata suscettibilità, anche se risultati analoghi sono stati ottenuti utilizzando come modello il più resistente orzo.

L'attività di canale viene delle acquaporine viene regolata da diversi meccanismi, come la fosforilazione, l'interazione con altre acquaporine, la protonazione, un gradiente di pressione e la concentrazione di  $Ca^{2+}$ . La struttura monomerica di un'acquaporina (Murata *et al.*, 2000) consiste in sei domini giro- $\alpha$ -elica (1-6) connessi alla membrana, collegati da cinque loop (A-E) e con le due estremità (sia N che C-terminali) rivolte verso il citosol. I loop B ed E stabilizzano una struttura idrofobica che percorre la membrana da parte a parte, creando un poro con un'alta specificità. Nel modello di Figura 13 sono riportati anche i residui che possono essere regolati, come le serine fosforilabili (in verde), l'istidina protonabile (blu) e la cisteina responsabile dei legami disolfuro fra i monomeri (in viola). L'espressione, l'attività di canale e lo spostamento delle acquaporine vengono regolati da

stimoli ambientali, fattori interni (come gli ormoni vegetali) o dall'orologio circadiano (Chaumont *et al.*, 2014). In orzo uno stress osmotico causato da una soluzione contenente 200 mM NaCl abbassa l'espressione di 6 acquaporine, che invece si osservano in condizioni di controllo (Horie, 2011b). Fra i meccanismi post-trascrizionali vi sono la già accennata fosforilazione reversibile e lo spostamento dinamico a livello di localizzazione subcellulare in seguito a endocitosi mediata dall'acido salicilico prodotto in risposta ai ROS (Figura 13) (Boursiac, 2008).



**Figura 13. Regolazione delle proteine PIP.** L'mRNA viene tradotto a livello del reticolo endoplasmico rugoso, entra nel Golgi in cui si formano omo-eteroligomeri [tra PIP2 (in giallo) e PIP1 (in verde)] che vengono posti in vescicole secretorie e convogliati alla membrana citoplasmatica. Le PIP possono essere processate nuovamente dal Golgi, a questo punto o vengono degradate o poste nuovamente nella membrana. Lo stress salino causa defosforilazione e internalizzazione delle PIP, quello idrico ne provoca ubiquitinazione e conseguente degradazione nel proteasoma (Chaumont *et al.*, 2014). In basso viene mostrata la localizzazione di OsPIP2;1 nelle radici di riso. Le immagini sono state ottenute mediante immunocitochimica utilizzando un anticorpo specifico. (a) immagine a campo luminoso, (b) immagine della fluorescenza (c) immagine di (b) sovraesposta. La linea corrisponde a 50  $\mu$ m (Horie *et al.*, 2012).



In riso vi sono 33 acquaporine, fra cui distinguiamo quelle espresse sia nelle radici che nelle foglie (OsPIP2;1 e le due localizzate nel tonoplasto, OsTIP1;1 OsTIP2;2) e quelle espresse solo nelle radici (OsPIP2;3 OsPIP2;5 OsTIP2;1). Gli studi sono ancora agli inizi e non si hanno evidenze di modifiche postraduzionali, ma si è osservata una diminuzione del messaggero di alcune PIP e TIP in condizioni di stress osmotico. Sembra plausibile però che uno dei primi meccanismi di risposta sia una loro tempestiva modulazione in grado di limitare i danni fintanto che non vengano posti in essere adattamenti che richiedono tempi più lunghi (Horie *et al.*, 2012).

### 1.3.3. Il sensing dello stress osmotico

Lo stress osmotico sembra essere percepito da una serie di sensori, quali canali (soprattutto per il calcio) attivati dalle modifiche a livello della membrana cellulare causate dall'abbassamento del turgore, elementi legati al citoscheletro e sensibili al cambiamento di volume cellulare, sistemi mediati dal cambiamento dello stato REDOX e proteine chinasi e fosforilasi. In *Arabidopsis* un candidato al ruolo di osmosensore era AtHK1, una proteina con attività di istidin-chinasi localizzata sulla membrana citoplasmatica (Figura 14). L'inserimento di tale proteina in lievito era capace di sopprimere il fenotipo insensibile allo stress osmotico per mutazione del gene *SLN1* (osmosensore di lievito) (Urao *et al.*, 2009). Mutanti AtHK1<sup>-</sup> di *Arabidopsis* in condizioni di stress osmotico si sono però rivelati sensibili, probabilmente perché AtHK1 è solo uno dei tanti sensori presenti (Nagaraj Kumar *et al.*, 2013).

Altre proteine di membrana che possono essere coinvolte nel *sensing* osmotico fanno parte della classe delle *receptor-like kinases* (RLK). In tabacco (*Nicotiana tabacum*) la fosforilazione di NtC7, una proteina simile a un recettore transmembrana, aumenta la tolleranza allo stress osmotico (Tamura *et al.*, 2003). Il meccanismo proposto prevede la formazione di un dimero, la cui conformazione è sensibile al cambiamento dell'architettura della membrana in risposta allo stress. Inoltre NtC7 ha una struttura particolare, priva dello specifico dominio con funzione chinasi, un elemento che suggerisce una possibile interazione con specifici componenti posti nel lato citoplasmatico mediata dalla porzione C-terminale.

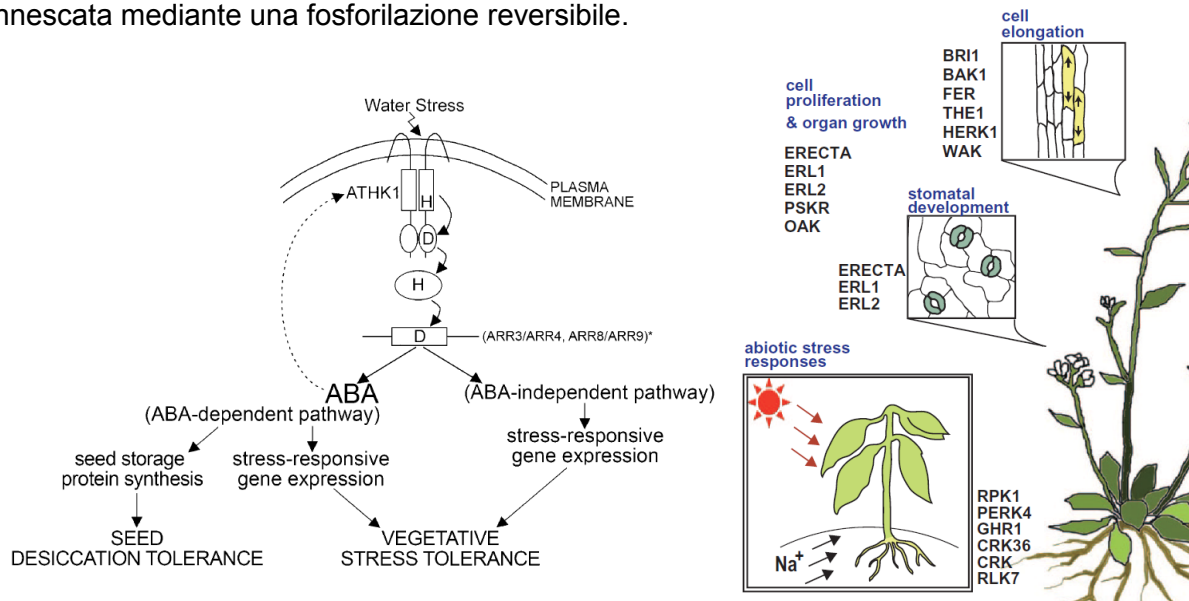
Alcuni ricercatori hanno ipotizzato che i sensori specifici per lo stress osmotico possano essere accoppiati con i canali per il calcio. Infatti è stato osservato un quasi immediato aumento del calcio intracellulare in cellule radicali e un ispessimento nella cuticola esterna in seguito a trattamenti con sale o con mannitolo, tanto da fare ipotizzare una modalità meccanico-osmotica di percezione dello stress. A sostegno di questa teoria si è notato come piante di *Arabidopsis* con un alterato metabolismo della cuticola non erano in grado di attuare le risposte indotte dallo stress osmotico, fra cui la produzione di ABA (Wang *et al.*, 2011). La cuticola infatti provvede sia a fornire un supporto strutturale alle pareti e alla membrane citoplasmatiche che a modulare la permeabilità idraulica della pianta, consentendole una gestione attiva delle riserve idriche. Più di recente Yuan e collaboratori (2014) hanno identificato in *Arabidopsis* un canale per il calcio attivato dallo stress osmotico, denominato OSCA1. Piante con una mutazione responsabile della perdita di funzionalità di OSCA1 non riescono ad attivare la risposta allo stress osmotico, e questo fatto rende il canale un buon candidato come osmosensore.

Molto probabilmente nelle piante la percezione dello stress osmotico coinvolge più sensori, che attivano diverse cascate di trasduzione del segnale in risposta a specifiche condizioni di stress con effetti simili, come possono essere la siccità e la salinità. In tutti i casi esaminati i recettori di stress osmotico sono associati alle membrane.

### 1.3.4. La trasduzione del segnale calcio-indipendente

L'attivazione delle proteine-sensore durante la percezione di stimoli ambientali innesca una serie di reazioni in grado di stimolare l'azione di messaggeri secondari che possono raggiungere il nucleo, attivando la trascrizione di geni specifici. Un gran numero di

componenti di tale catena di trasduzione del segnale sono stati identificati, fra cui molecole semplici come il  $\text{Ca}^{2+}$  e i ROS, e un numeroso gruppo di proteine, la cui attività viene innescata mediante una fosforilazione reversibile.



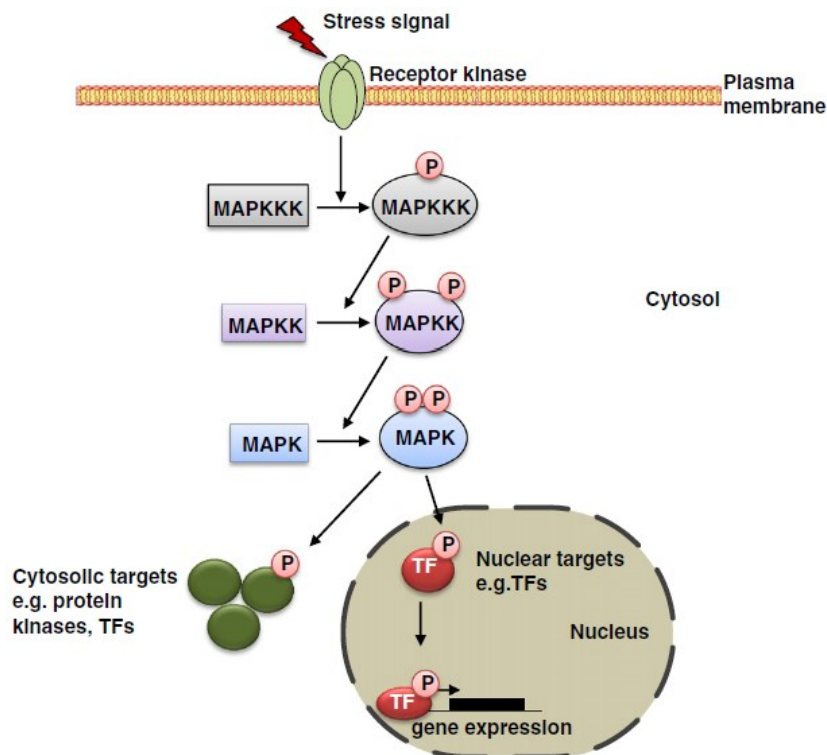
**Figura 14. Meccanismo d'azione di ATHK1.** A seguito della percezione dello stress idrico viene indotta la produzione di ABA, che comporta un aumento della trascrizione dei geni in risposta allo stress (fra cui ATHK1). Nei semi esiste anche una via ABA-indipendente, in cui ATHK1 permette la sintesi di proteine con funzione di riserva e partecipa al processo di acquisizione della tolleranza all'essiccazione (Wohlbaehet *et al.*, 2008). A destra vengono riportate alcune delle *receptor-like kinases* note in Arabidopsis, con qualche esempio di funzione regolata, tra cui aspetti del metabolismo primario, ma soprattutto risposte a condizioni di stress abiotico (Osakabe *et al.*, 2013).

#### 1.3.4.1. Il ruolo delle *Mitogen Activated Protein Kinases* (MAPK)

Numerosi stress abiotici coinvolgono le Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK), che sono proteine attivate da una doppia fosforilazione a livello di residui di tirosina e treonina posti in una specifica sequenza amino acidica (dominio TEY: Thr, Glu, Tyr). Mediante defosforilazione a opera di fosfatasi le MAPK possono tornare a uno stato basale inattivo. Il fatto che vi siano due siti di de/fosforilazione permette una modulazione della catalisi enzimatica. Il sistema è costituito da tre componenti: una MAP chinasi chinasi chinasi (MAPKKK) in grado di fosforilare una MAP chinasi chinasi (MAPKK), che a sua volta fosforila una MAP chinasi. Le MAPKKK si suddividono in due famiglie: le Raf, con dominio chinasi associato alla parte C-terminale e un dominio regolatore all'estremità N-terminale, e le MEKK, con una struttura proteica meno conservata. Il fatto che vi siano tre distinti enzimi permette una cascata di reazione capace di coinvolgere diversi compartimenti cellulari: non è raro che un componente posto nel citosol, una volta attivato, entri nel nucleo dove fosforila specifici fattori di trascrizione; in altri casi è stata dimostrata un'interazione con elementi del citoscheletro (Figura 15).

In Arabidopsis sono stati identificati 20 geni per le MAPK, 10 per le MAPKK e 60 per le MAPKKK (Ichimura *et al.*, 2002). In riso a oggi si conoscono 9 geni MAPK, di cui *OsMSRMK2* viene trascritto appena 15 minuti dopo l'imposizione di condizioni di stress idrico (Agrawal *et al.*, 2002). Vista la grande differenza di numero di geni fra le varie classi di MAPK è possibile che alcuni di esse vengano espresse in seguito a diversi stimoli. Infatti in Arabidopsis *AtMPK6* e *AtMPK3* sono attivati in seguito a stress osmotico, mentre i loro ortologhi di tabacco SIPK (proteina chinasi inducibile dall'acido salicilico) e WIPK (proteina chinasi inducibile da ferita) vengono accumulati in seguito a stress biotico (Singh *et al.*, 2002). Studi recenti di mappatura genetica hanno permesso di individuare le proteine collegate in riso alla resistenza a diversi stress, fra cui la siccità e la salinità. Infatti vi sono almeno due esempi in cui la sovraespressione di un gene appartenente alle MAPK

(*OsMAPK5a*; *OsMAPK44*) permette una maggior tolleranza a freddo, sale e siccità (Xiong *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2006). Inoltre di recente è stata scoperta una proteina MAPKKK che è in grado di regolare in maniera positiva e negativa alcuni geni collegati allo stress ossidativo, conferendo alle piante di riso maggiore resistenza alla siccità e allo stress ossidativo (Ning *et al.*, 2010). La specificità della cascata di reazione MAPK nei confronti dei vari stressori è data dalla differenza nei livelli e nella cinetica con cui la cascata risponde. Considerata la stretta relazione fra le MAPK e gli stress ambientali, capirne il meccanismo nei dettagli potrebbe contribuire all'ottenimento di varietà di specie di interesse agronomico tolleranti a condizioni non permissive.



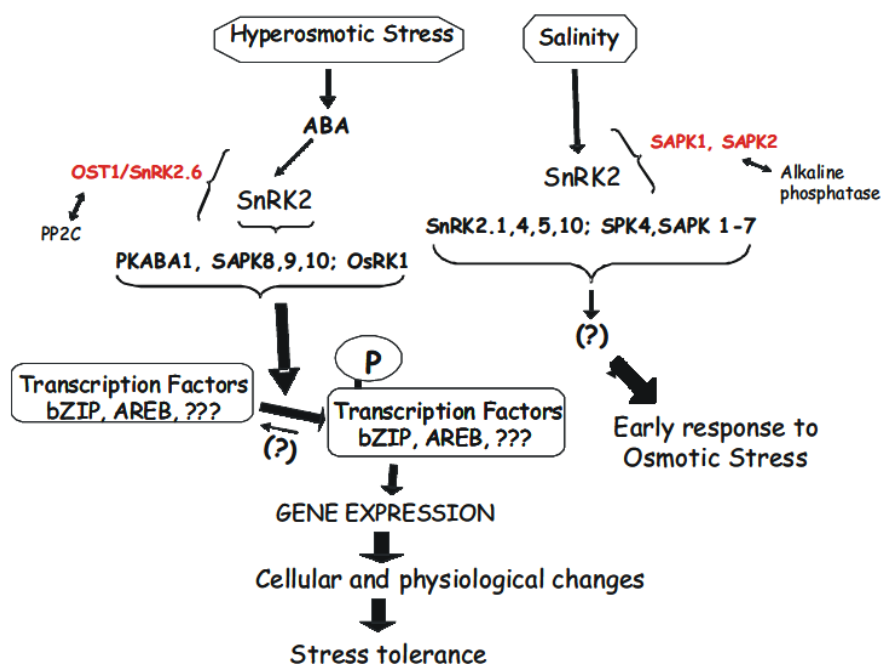
**Figura 15. Esempio di cascata MAPK.**

L'organizzazione della cascata MAPK è a moduli interconnessi: ciascun enzima fosforilato attiva a sua volta quello a valle fosforilandolo. Mediante la loro attività chinasi le MAPK convertono lo stimolo ambientale in modifiche post traduzionali di specifiche proteine, ad esempio i fattori di trascrizione. Questi a loro volta riorganizzeranno l'espressione genica permettendo l'adattamento della pianta alle condizioni di stress (Danquah *et al.*, 2014).

#### 1.3.4.2. Le *Sucrose-nonfermenting Related Kinases* (SnRK)

Questa famiglia di protein chinasi è stata analizzata per la prima volta in lievito ed è capace di regolare il metabolismo cellulare spostando l'equilibrio fra anabolismo e catabolismo in base al rapporto ATP/AMP. Di dimensioni comprese fra i 40 e 50 kDa, vengono attivate dalla fosforilazione di residui di serina e di treonina. Si distinguono tre famiglie di SnRK: le SnRK1 regolano il metabolismo energetico, le SnRK2 sono attivate in risposta ad ABA, disidratazione e stress osmotico, e le SnRK3 con funzione ignota (Bartels *et al.*, 2005). Il riso sembra avere dieci geni per SnRK2, tutti attivati dallo stress osmotico e tre dei quali anche ABA inducibili (Kobayashi *et al.*, 2004). Sono stati proposti diversi modelli di *signalling* dello stress osmotico e salino mediato da SnRK2. In uno di essi l'ABA prodotto in condizioni iperosmotiche attiva alcune SnRK2 (*SnRK2.6/OST1/SRK2E*, *PKABA1*, *SAPK8-10*, *OsRK1*), che a sua volta fosforila specifici fattori di trascrizione attivando la trascrizione genica. Un altro gruppo di SnRK2 ABA-indipendenti (*SnRK2.1*, *SnRK4,5,10*, *SPK4*, *SAPK1-7*, *SAPK1,2*) viene attivato da vari osmoliti come NaCl, mannitolo e saccarosio in maniera molto veloce, suggerendo un loro ruolo importante nel *signalling* osmotico. Il quadro è reso più complesso dall'interazione delle chinasi attivate da SnRK2 con proteine ad attività fosfatase, che potrebbe permettere l'inattivazione preferenziale di alcune specifiche chinasi in modo da non creare interferenze con la trasduzione del segnale di stress osmo-salino (Figura 16) (Shukla *et al.*, 2008). Studi condotti in *Vicia faba* hanno suggerito anche un ruolo

regolativo di SnRK2 nella traduzione proteica: essa infatti attiva una chinasi che interagisce con una proteina in grado di legare l'mRNA che codifica per una proteina coinvolta nella protezione cellulare in condizioni di stress. Questo suggerisce che le SnRK potrebbero contribuire a una rapida riorganizzazione subnucleare in risposta a stimoli ambientali (Li *et al.*, 2002).



**Figura 16. Regolazione di SnRK2 in condizioni di stress osmo-salino.** In condizioni iperosmotiche SnRK2 è attivato dall'ABA e a sua volta attiva fattori di trascrizione bZIP avviando la trascrizione dei geni bersaglio. La salinità induce un veloce adattamento ABA-indipendente per preparare la cellula a una nuova omeostasi. L'ABA, in maniera dipendente dal sale, attiva altre proteine che interagiscono con delle fosfatasi, suggerendo che la fosforilazione delle chinasi ricopra un ruolo importante in risposta allo stress osmotico (Shukla *et al.*, 2008).

### 1.3.5. I secondi messaggeri nella trasduzione del segnale

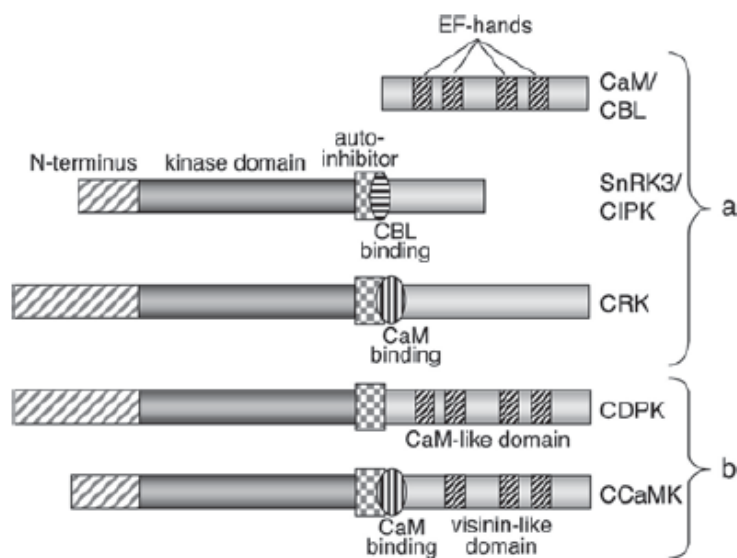
Una volta percepito lo stress osmotico a livello della membrana citoplasmatica, la cellula deve amplificare tale segnale in modo da attivare i meccanismi di risposta che le consentiranno di crescere al meglio nell'ambiente modificato. Nello stesso tempo il segnale deve essere trasmesso anche ai tessuti non ancora coinvolti. Questo ruolo viene ricoperto dai secondi messaggeri, che danno inizio alla cascata di trasduzione. Uno dei più studiati è senza dubbio il calcio. Il flusso di calcio può essere generato dall'ingresso di calcio extracellulare e/o dal rilascio da parte di depositi intracellulari. In condizioni di stress osmotico la seconda modalità sembra prevalente, in quanto la cellula accumula inositolo trifosfato (IP3) per mezzo dell'azione idrolitica della fosfolipasi C su un fosfolipide di membrana. L'IP3 è in grado di muoversi nel citosol e di attivare direttamente i canali per il calcio posti nel tonoplasto. Altri fosfolipidi che ricoprono un ruolo nella risposta allo stress osmotico sono l'acido fosfatidico (PA), che può essere formato direttamente dalla fosfolipasi D o indirettamente dalla fosfolipasi C mediante fosforilazione del diacilglicerolo. In soia il PA attiva delle proteine chinasi attivate da mitogeno (MAPK) in maniera dose-dipendente (Lee *et al.*, 2001). Studi più recenti hanno identificato nuovi bersagli del PA, fra cui proteine con azione di chinasi e fosfatasi.

Lo stress osmotico provoca un accumulo di ROS, che a loro volta attivano la sintesi di enzimi antiossidanti. Sempre più lavori sembrano suggerire un ruolo attivo dei ROS come secondi messaggeri, peraltro già dimostrato in risposta all'attacco patogeno. La loro formazione in condizioni iperosmotiche avviene sia all'interno della cellula che a livello della parete cellulare grazie all'azione di una diammina ossidasi (Lin *et al.*, 2002), ma anche sulla membrana citoplasmatica in condizioni di siccità per mezzo della NADPH ossidasi (Jiang *et al.*, 2002).



### 1.3.6. Il ruolo del calcio: sensing e signalling

Il calcio è uno dei più diffusi secondi messaggeri, il suo accumulo intracellulare avviene in seguito al sensing di diversi stress abiotici e a seconda dei casi tale incremento può avere durata, localizzazione sub-cellulare, ampiezza e frequenza diverse. Un'ulteriore specificità è data dalle proteine che possono transcodificare tale messaggio. Le piante posseggono tre maggiori famiglie di sensori per il calcio: le calmoduline (CaM), le proteine *calcineurin b-like* (CBL) e le *calmodulin-like domain protein kinases* (CDPKs). Le prime due tipologie non hanno una vera e propria attività enzimatica, ma sono in grado di legare il calcio inducendo cambiamenti conformazionali in proteine bersaglio. Le CDPKs hanno attività chinasi e spesso ad esse vengono associate le protein chinasi calcio- e calmodulina-dipendenti (CCaMKs). Tutte le tre categorie hanno un dominio molto conservato che interagisce con il calcio, chiamato EF-hand e costituito da una caratteristica struttura secondaria a elica-giro-elica (Figura 17).



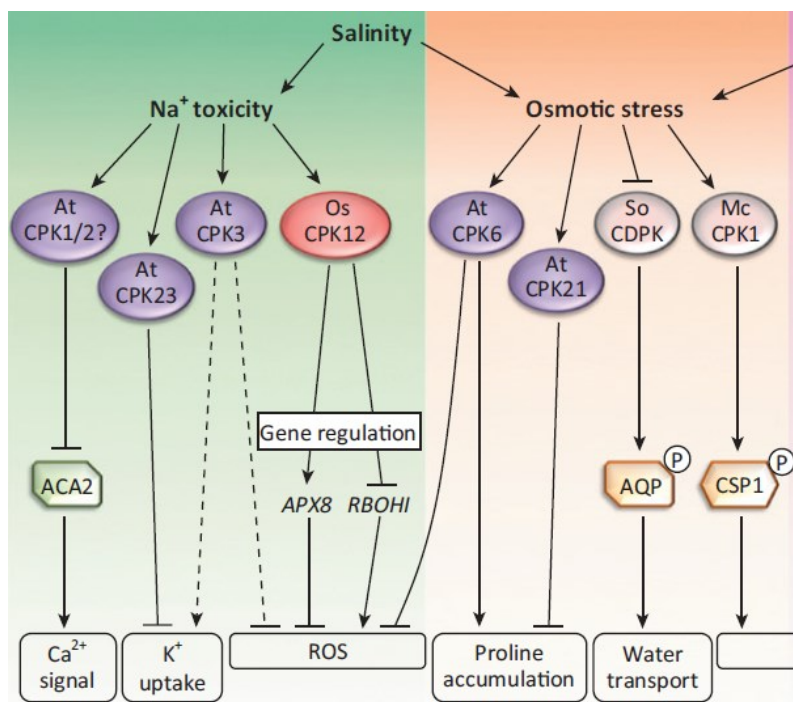
**Figura 17. Struttura delle proteine che interagiscono con il  $\text{Ca}^{2+}$ .** (a) Proteine senza attività enzimatica e proteine partner con dominio chinasi. CaM e CBL legano il  $\text{Ca}^{2+}$  mediante la EF-hand. CaM regola in seguito proteine come le protein chinasi (CRKs), mentre le CBL attivano CIPKs in cui vi è uno specifico sito di binding. (b) Sensori per il calcio con attività chinasi: entrambi hanno domini EF-hand, ma solo le CDPKs funzionano in maniera indipendente, mentre l'attività delle CCaMK può essere regolata dalle CaM (Boudsocq *et al.*, 2010).

#### 1.3.6.1. Le *Calmodulin-like Domain Protein Kinases* (CDPKs)

In soia si è osservato che GmCDPKa e GmCDPKg fosforilano *in vitro* un enzima coinvolto nella sintesi di cisteina (serina acetiltransferasi). Tale reazione rilascia cisteina che può essere utilizzata per produrre glutatione. In questo modo sembra che le CDPKs possano partecipare attivamente nella risposta antiossidante. Si pensa che queste proteine siano inattive in condizioni normali, grazie all'interazione del sito attivo con una porzione regolatrice della proteina stessa; in presenza di calcio l'enzima subisce dei cambiamenti conformazionali che ristabiliscono l'attività catalitica. In riso e in *Arabidopsis* le CDPKs costituiscono una famiglia multigenica che conta rispettivamente 29 e 34 membri. Un così vasto numero di proteine può implicare diversa localizzazione intracellulare, diversità di substrato e differenze nella concentrazione-soglia del  $\text{Ca}^{2+}$  capace di attivarle.

In riso OsCPK12 regola l'omeostasi dei ROS inducendo l'espressione dei geni per l'ascorbato perossidasi (OsAPX2/ OsAPX8) e reprimendo il gene per la NADPH ossidasi, accrescendo in tal modo la tolleranza allo stress salino (Figura 18). La sovraespressione di AtCPK6 è associata a tolleranza alla siccità determinata dall'accumulo di prolina e a ridotta perossidazione lipidica, probabilmente per l'abbassamento del tasso di produzione dei ROS. Stranamente il mutante AtCPK6<sup>-</sup> non presenta fenotipi associabili allo stress, forse per un meccanismo di ridondanza fra le varie AtCPK6 di *Arabidopsis* (Boudsocq *et al.*, 2010). In contrasto, AtCPK21 è negativamente collegato allo stress osmotico, e inibisce la sintesi di prolina (Franz *et al.*, 2011).

Durante lo stress osmotico è vitale per la pianta limitare al minimo le perdite di acqua mediante la regolazione negativa delle acquaporine. In spinacio (*Spinacea oleracea*) l'acquaporina PM28A viene regolata per fosforilazione a opera di una CDPK (Johansson *et al.*, 1998). La regolazione mediata dal  $Ca^{2+}$  è alla base del riconoscimento dello specifico tipo di stress: la  $Ca^{2+}$ -ATPasi autoinibente ACA2 di Arabidopsis gioca un ruolo cruciale in lievito sottoposto a stress salino nel generare un giusto segnale di rilascio di  $Ca^{2+}$ . La forma attiva di AtCPK1 inibisce in lievito l'attività basale di ACA2 e blocca la stimolazione CaM-dipendente. ACA2 e AtCPK1 non sono localizzati nello stesso compartimento cellulare: ACA2 è infatti collocato nel reticolo endoplasmatico, e questo suggerisce che AtCPK2, l'omologo di AtCPK1 presente nel reticolo, possa regolare ACA2.



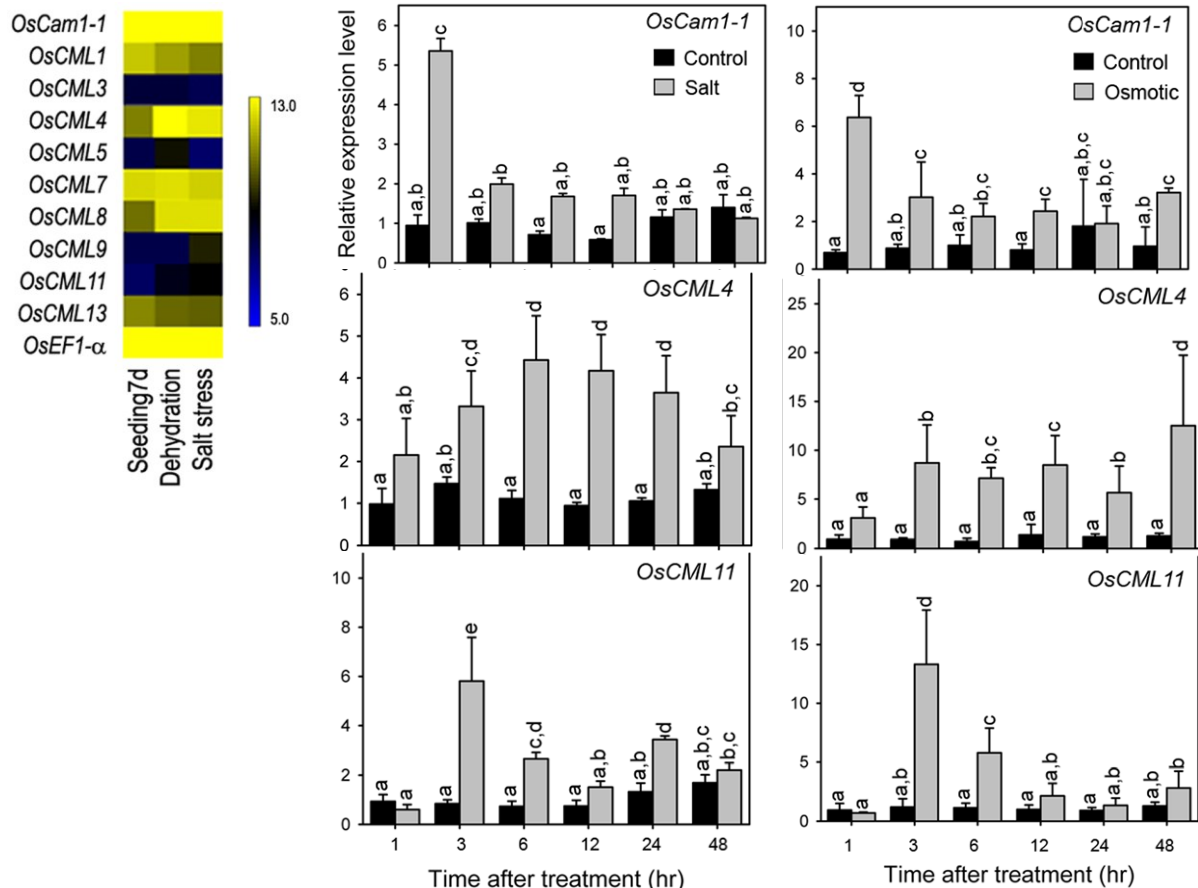
**Figura 18.**  
**Rappresentazione del network delle CDPKs nella risposta allo stress osmo-salino.** Lo stress salino viene percepito mediante la tossicità dello ione sodio, mentre quello osmotico è capace di attivare direttamente specifiche CDPK che hanno come effetto un aumento della concentrazione di prolina e del trasporto d'acqua. Molto spesso queste due azioni si susseguono l'una dopo l'altra, poiché lo stress osmotico in genere precede quello ionico (Boudsocq *et al.*, 2013).

### 1.3.6.2. Le calmoduline (CaM)

Le calmoduline presentano quale unico dominio funzionale l'EF-hand e sono localizzate nell'apoplasto, nel citosol, nel nucleo e nel reticolo endoplasmatico. È stata identificata una vasta famiglia di CaM e simil-CaM (CML) sia in Arabidopsis che in riso, ma per molte di esse i meccanismi molecolari e il ruolo fisiologico rimangono oscuri. Nel genoma di riso vi sono 5 geni per le CaM e 32 per CML, suddivise in altri sei sottogruppi; le CaM sono espresse ad alti livelli in tutta la pianta, mentre le CML mostrano un pattern tessuto-specifico. In condizioni di stress osmotico o osmo-salino viene indotta l'espressione delle OsCam1-1, OsCML4, 5, 8, e 11, con cinetiche e valori assoluti diversi (Figura 19). Tale espressione è proporzionale all'entità dello stress applicato e avviene grazie a elementi posti in cis come i "Drought Responsive Elements" (DRE), mentre sembra che gli ABA-Responsive Elements (ABRE) e i Low Temperature Responsive Elements inducano altri geni per CaM e CML (Chinpongpanich *et al.*, 2012).

Studi sulle calmoduline di Arabidopsis mostrano una stimolazione diretta dell'attività dell'enzima NAD chinasi (AtCaM2). L'analisi aminoacidica evidenzia una forte somiglianza fra AtCaM2 e OsCam1, e sembra che la sintesi di tali proteine sia regolata dalla presenza intracellulare di calcio: bloccando i canali del calcio con un inibitore specifico non viene infatti indotta la sintesi di OsCam1 in condizioni di stress salino e osmotico (Phean-o-Pas *et al.*, 2005). Questa prova fornisce sufficienti elementi per affermare l'importanza sia del calcio come secondo messaggero, che delle calmoduline come trasduttori dello stress osmo-salino.

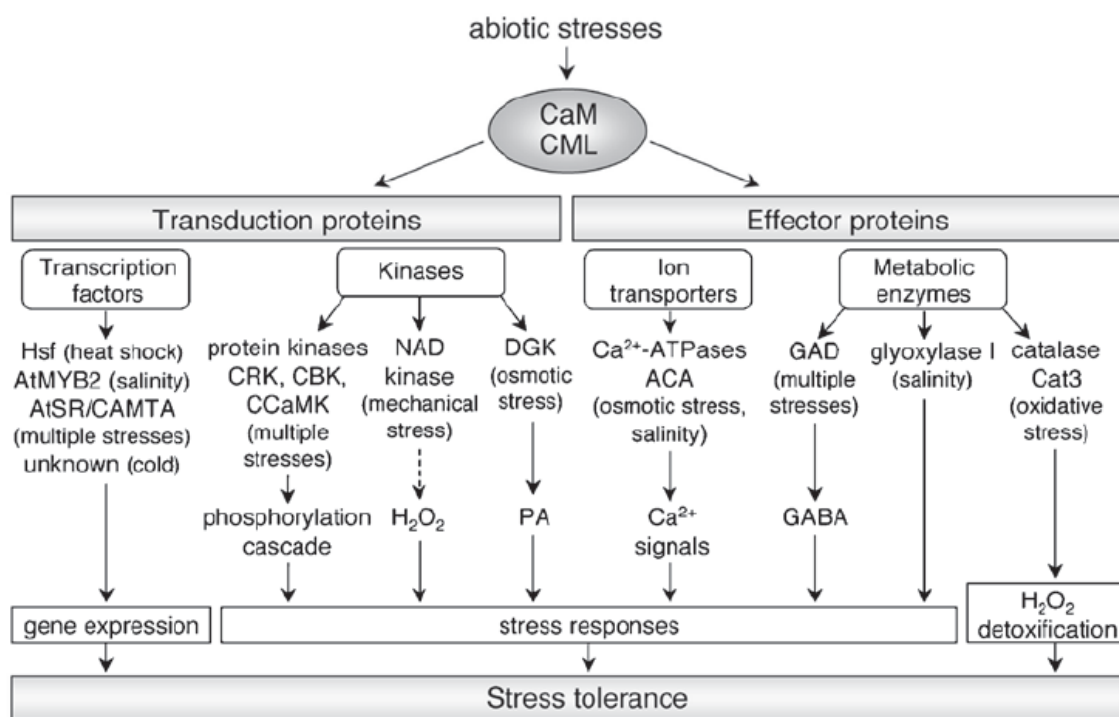
Le CaM e CML interagiscono con le proteine bersaglio, chiamate genericamente CAMBP: in *Arabidopsis* un'analisi computazionale ne ha identificate più di 100. Le CAMBP vengono suddivise in due gruppi: il primo è costituito da proteine capaci di trasdurre il segnale (protein chinasi o fattori di trascrizione), l'altro da proteine con il ruolo attivo di effettori, come enzimi o trasportatori. La complessità di tale quadro è riportata in Figura 20, ma molti dettagli della catena di trasduzione del segnale mediata dalle calmoduline sono ancora da chiarire.



**Figura 19. Misura dell'espressione dei trascritti di *OsCam* e *OsCML* in risposta allo stress.** A sinistra sono riportati i dati di microarray ottenuti a 7 giorni dalla germinazioni in condizioni di stress salino o osmotico. Al centro e a destra sono riportati i livelli di espressione dei geni più indotti. Lettere minuscole differenti indicano medie significativamente diverse (Chinpongpanich *et al.*, 2012).

### 1.3.6.3. Le proteine *Calcineurin B-like* (CBL)

Le CBL sono piccole proteine contenenti due domini globulari fra loro collegati. Ogni dominio contiene 2 EF-hand capaci di legare il  $\text{Ca}^{2+}$ . Per alcune di esse è stata risolta la struttura cristallografica grazie alla quale si è potuto notare che CBL2 lega due ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , mentre CBL4/SOS3 (salt-overly sensitive 3) ne lega quattro (Nagae *et al.*, 2003; Sanchez-Barrena *et al.*, 2005). Alcune di esse hanno un sito di miristilazione che ne facilita l'associazione con le membrane. Sia in riso che in *Arabidopsis* sono presenti dieci CBL (Kolukisaoglu *et al.*, 2004) che ricoprono il ruolo di sensori del  $\text{Ca}^{2+}$  e trasducono il segnale mediante l'interazione con altre proteine, regolando la localizzazione cellulare dei loro bersagli. L'espressione dei geni che codificano per tali proteine viene modulata in maniera differenziale da vari stimoli come freddo, ABA, salinità e siccità, suggerendo un ruolo attivo delle CBL nella risposta a condizioni di stress abiotico. Studi compiuti su *Arabidopsis* alterando l'espressione genica di CBL1, silenziandolo o sovraesprimendolo, hanno dimostrato il suo ruolo attivo in risposta allo stress osmo-salino, mentre quello da freddo era negativamente correlato (Cheong *et al.*, 2003).



**Figura 20. Ruoli di CaM e CML in risposta a condizioni di stress abiotico.** Fra parentesi sono riportati gli stimoli ambientali che attivano la specifica risposta (Boudsocq *et al.*, 2010).

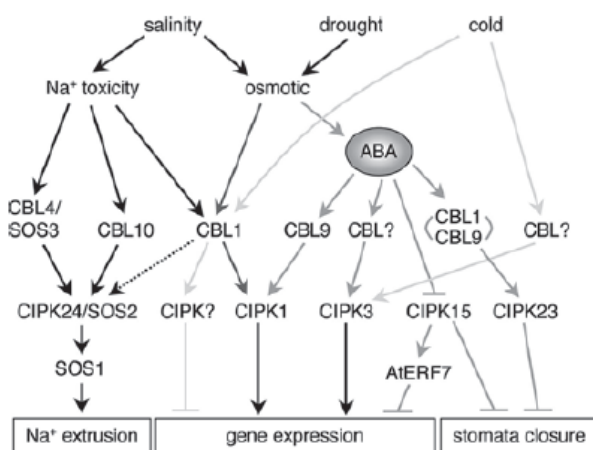
Le CBL svolgono solo metà del ruolo di trasduzione del segnale; la parte restante può essere svolta da altre proteine con attività chinasi che hanno la capacità di interagire con le CBL, le *CBL-interacting protein kinases* (CIPK). In riso e *Arabidopsis* ad oggi sono state scoperte rispettivamente 30 e 25 CIPK. L'interazione fra CBL-CIPK stimola l'attività chinasi e dirige il complesso nella membrana citoplasmatica, dove le CIPK possono fosforilare specifici substrati. La proteina CIPK più studiata è senza dubbio SOS2/CIPK24 che, insieme all'antiporto  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  SOS1 e a SOS3/CBL4 è coinvolta nella via metabolica definita SOS (*salt overlay sensitive*). L'aumento del livello di calcio intracellulare viene percepito da SOS3/CBL4 che in seguito al legame con lo ione subisce modifiche conformazionali e interagisce con una serina/treonina protein chinasi, SOS2. In *Arabidopsis* esistono proteine SOS3-like/CBL, capaci di regolare l'attività di SOS2; la loro espressione è tessuto specifica e interessa la parte aerea della pianta, mentre nelle radici viene espressa preferenzialmente SOS3. Una volta formato e attivato, il complesso SOS3-SOS2 porta all'attivazione dell'antiporto SOS1, con la conseguente estrusione dello ione  $\text{Na}^+$  in eccesso (Figura 21) (Ji *et al.*, 2013).

### 1.3.7. Effetti dello stress osmotico sulla crescita della pianta

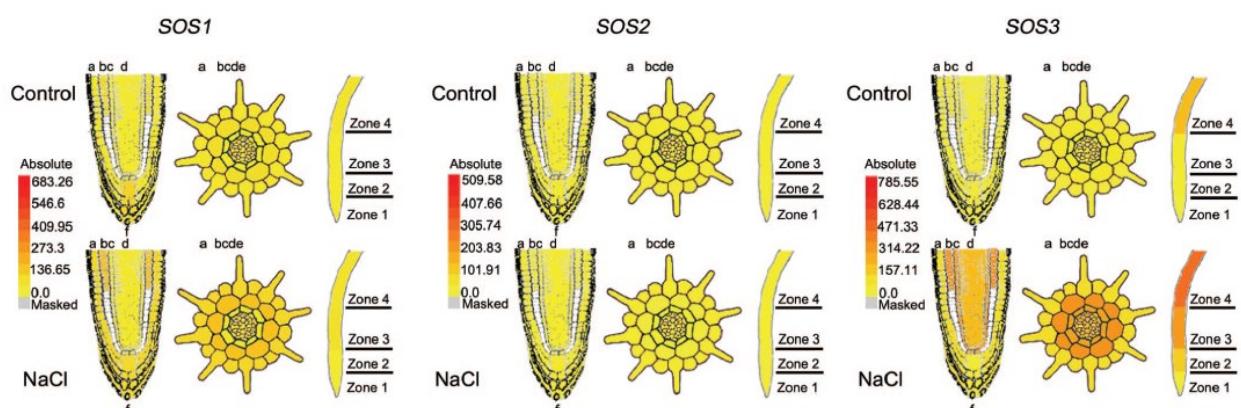
Lo stress osmotico, limitando la disponibilità di acqua, ha effetti negativi sia sulla crescita della singola cellula che su quella della pianta *in toto*. Gli effetti sistemici comprendono un arresto della crescita proporzionale alla durata e all'entità della perturbazione ambientale. In condizioni di medio stress risultano inibite le foglie e il fusto, mentre le radici sono ancora in grado di crescere. L'arresto della crescita potrebbe essere una strategia per preservare i carboidrati per il metabolismo energetico, in modo da avere più energia pronta da investire terminato lo stress. Alcuni interpretano l'inibizione della crescita della parte aerea come un processo di aggiustamento osmotico: infatti mantenendo limitato il volume cellulare si dovranno produrre meno osmoliti compatibili per diminuire il potenziale idrico (Osorio *et al.*, 1998). Al contrario la crescita radicale è un adattamento allo stress osmotico in quanto permette alla pianta di assorbire liquidi in profondità nel suolo e in più fornisce una maggiore superficie in cui sequestrare gli ioni tossici. In orzo, infatti, lo sviluppo radicale in

condizioni di stress è correlato con una minore inibizione della crescita (Munns *et al.*, 2000).

Per comprendere i meccanismi di inibizione della crescita della parte aerea bisogna considerare nel dettaglio le modalità di sviluppo foliare (Figura 22). Questo è un processo continuo che coinvolge le cellule protodermiche che sono capaci di differenziarsi in cellule epidermiche o cellule madri meristemoidi (MMC). Le MMC possono andare incontro a successive divisioni cellulari asimmetriche dando origine ad altre cellule epidermiche e a cellule di guardia (GC) capaci di regolare l'apertura o chiusura degli stomi. Dal numero e dall'attività delle cellule protodermiche viene determinato il numero di cellule dell'epidermide foliare e di cellule di guardia. In *Arabidopsis* il più importante regolatore trascrizionale di questo processo è *SPEECHLESS* (*SPCH*) che favorisce la differenziazione delle cellule totipotenti in cellule madri. La sua regolazione è a carico dei peptidi *EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2* (*EPF2*) che, prodotto e secreto dalle MMC, ha un effetto regolatore negativo sul numero di cellule totipotenti, *EPF1* che viene prodotto sia dai meristemoidi che dalle cellule figlie, inibisce lo sviluppo di due aperture stomatiche vicine e permette lo sviluppo di solo uno stoma, e *EPF9* o *Stomagen*, prodotto da giovani cellule del mesofillo, che regola il numero di stomi. Essi interagendo con dei recettori (*TOO MANY MOUTH*, *TMM*; *ERECTA*, *ER*; *ERECTA LIKE 1* e *2*) avviano una cascata del segnale *MAPK* dipendente che destabilizza *SPCH* fosforilandolo. In questo modo viene favorita la differenziazione delle cellule protodermiche in cellule epidermiche (Figura 22).

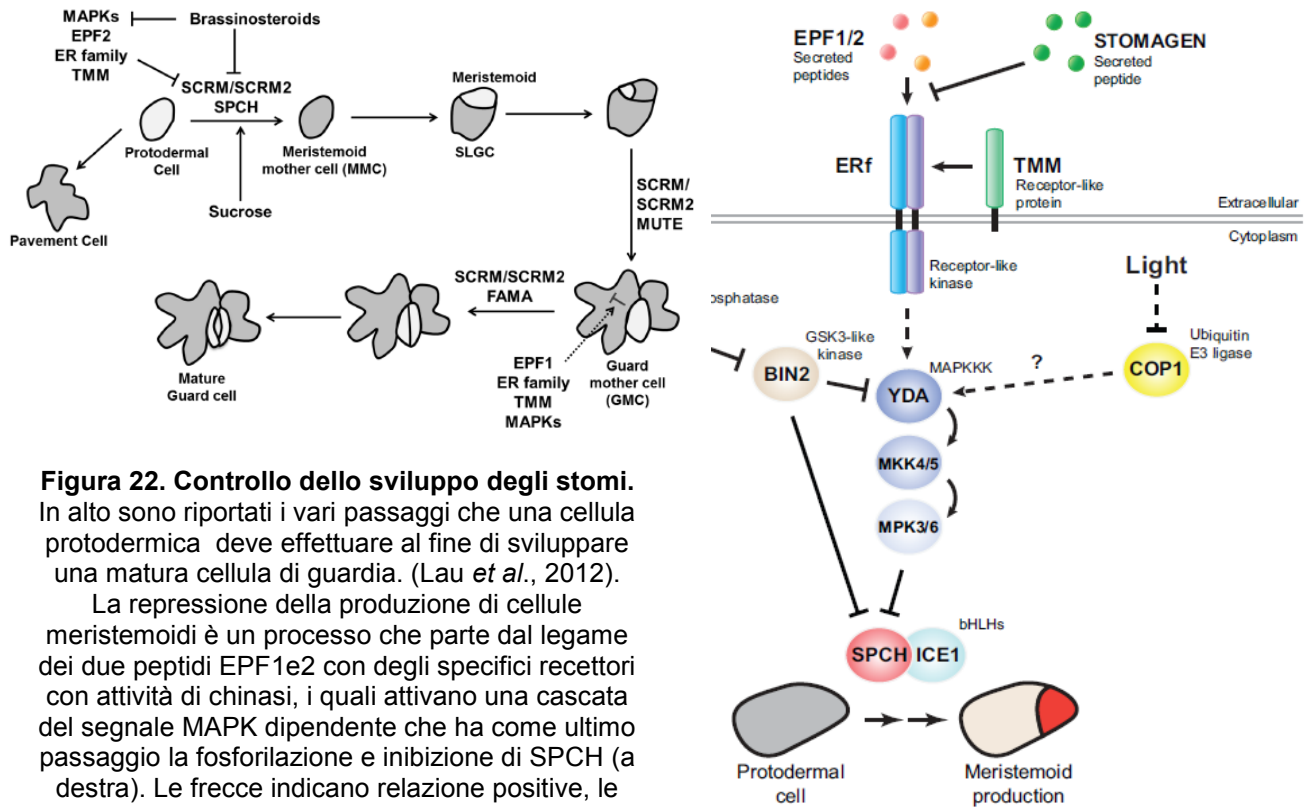


**Figura 21. Schema del network che coinvolge CBL-CIPK nella risposta a condizioni di stress abiotico.** Il sistema SOS viene raggruppato fra le risposte allo stress ionico, ma è stata dimostrata la sua attivazione a tempi molto brevi in seguito al trattamento, quando plausibilmente la pianta è ancora in stress osmotico (Boudsocq *et al.*, 2010). Nella parte sottostante sono rappresentati i cambiamenti nella trascrizione dei geni *SOS1*, *SOS2*, e *SOS3* in radici di cinque giorni di *Arabidopsis* trattate con 140 NaCl per un'ora. I risultati sono stati ottenuti mediante la tecnologia dei microarray applicata a tipi cellulare specifici (Ji *et al.*, 2013).



Controllando l'espressione di questi peptidi la pianta può adattarsi all'ambiente, stimolando o inibendo la crescita foliare e il numero di stomi a seconda delle necessità. Recenti studi hanno osservato una diminuzione nel numero di MMC, nella crescita foliare e nel numero di stomi in risposta a elevati valori di osmolarità, mentre nel mutante privo di MMC la crescita non era inibita. Inoltre se nelle piante *wild-type* veniva inserito un inibitore

della cascata del segnale MAPK, responsabile dell'abbassamento dei livelli di SPCH, gli effetti dello stress osmotico venivano attenuati. Questi dati sembrano confermare un coinvolgimento diretto dell'attività chinasi MAPK-dipendente nell'abbassamento del livello totale di proteina SPCH in risposta alla salinità. La diminuzione di SPEECHLESS determina l'inibizione della crescita dell'epidermide foliare, ma ancora non è chiaro il meccanismo con cui anche il tessuto del mesofillo smette di crescere. Forse vi è un *cross-talk* fra i due tessuti e l'inibizione della crescita dell'uno determina quella dell'altro; in alternativa, il mesofillo potrebbe avere meccanismi regolatori propri (Kumari *et al.*, 2014).



**Figura 22. Controllo dello sviluppo degli stomi.**

In alto sono riportati i vari passaggi che una cellula protodermica deve effettuare al fine di sviluppare una matura cellula di guardia. (Lau *et al.*, 2012).

La repressione della produzione di cellule meristemoidi è un processo che parte dal legame dei due peptidi EPF1e2 con degli specifici recettori con attività di chinasi, i quali attivano una cascata del segnale MAPK dipendente che ha come ultimo passaggio la fosforilazione e inibizione di SPCH (a destra). Le frecce indicano relazione positive, le barre a T relazioni negative (Kalve *et al.*, 2014).

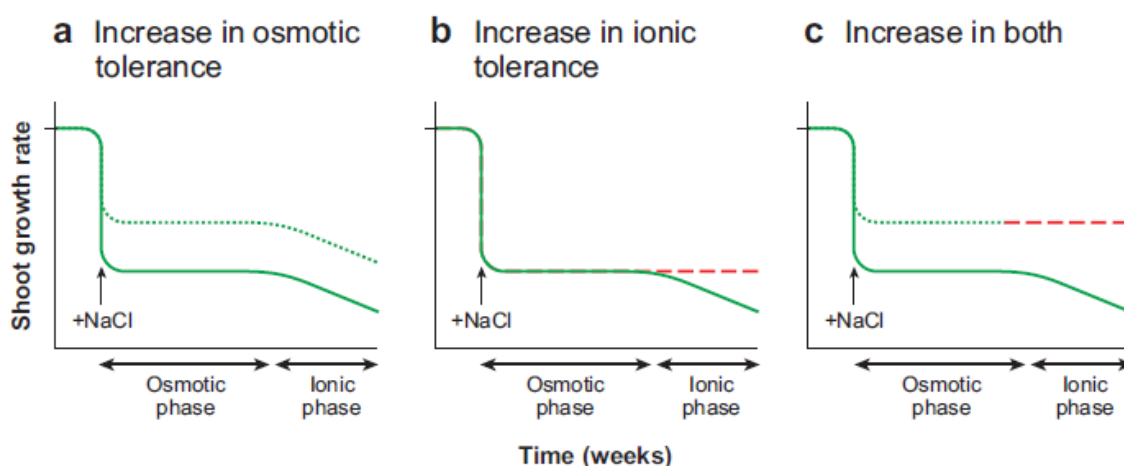
#### 1.4. Lo stress ionico

Se l'alta concentrazione di sale contenuta nel terreno persiste nel tempo, le piante vanno incontro anche a una condizione di stress ionico. Questo si aggiunge a quello osmotico e ne aggrava gli effetti su crescita e produttività (Figura 23). Gli alti livelli di sali accumulati risultano tossici perché interferiscono direttamente con alcuni passaggi-chiave del metabolismo cellulare. Vista la consequenzialità, non sempre si riesce a distinguere se un meccanismo di difesa venga attuato contro un tipo di stress piuttosto che contro l'altro. Ovviamente un ruolo attivo nella risposta allo stress ionico è svolto da trasportatori in grado di accumulare selettivamente gli ioni pericolosi in quei tessuti o compartimenti cellulari dove gli effetti sono limitati, permettendo così alla pianta di riprendere una crescita normale. Un'altra strategia è quella di limitare l'assorbimento di quelle specie ioniche che hanno un effetto negativo sul metabolismo.

##### 1.4.1. Tossicità del cloruro di sodio

La salinità del suolo è molto spesso correlata a un alta concentrazione di NaCl, che in soluzione si dissocia. L'azione tossica sembra avvenire maggiormente a danno della parte

aerea, per cui sono stati condotti numerosi studi al fine di comprendere i meccanismi di trasporto alla base della traslocazione del sodio. Anche utilizzando il più semplice dei modelli per il trasporto radicale, per avere un quadro esaustivo devono essere prese in considerazione numerose tipologie cellulari, con gli annessi compartimenti. L'inibizione della crescita dovuta all'accumulo di sodio è uno degli effetti più dannosi dello stress salino nei vegetali. In condizioni normali le concentrazioni di  $\text{Na}^+$  nel citoplasma sono nell'ordine di 1-10 mM, mentre quelle dello ione potassio ( $\text{K}^+$ ), essenziale per alcuni processi metabolici, vengono mantenute tra 100 e 200 mM. Il fatto che abbiano caratteristiche chimico-fisico simili spesso causa l'incapacità dei trasportatori di discriminare una specie dall'altra. Questo può portare a un veloce aumento intracellulare di sodio. Il potassio ricopre il ruolo di cofattore per numerosi enzimi, che sono molto suscettibili o all'alta concentrazione di  $\text{Na}^+$  o all'alto rapporto  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Per esempio l'enzima piruvato chinasi ha una  $K_m$  di 5 mM se interagisce con il potassio, mentre la sua attività si abbassa del 90-95% se viene legato il sodio (Maathuis *et al.*, 2014). Lo stress salino dipende molto dalla concentrazione raggiunta dal sodio nel citosol ( $[\text{Na}^+]_{\text{cyt}}$ ), ma su questo si sa ancora poco. Alcuni studi, utilizzando l'analisi di flusso, hanno misurato concentrazioni maggiori di 300 mM, mentre altri lavori, condotti con sonde fluorescenti, hanno stimato concentrazioni nell'ordine di 20-60 mM (Anil *et al.*, 2007). Il valore limite di  $[\text{Na}^+]_{\text{cyt}}$  in cui cominciano ad avvertirsi gli effetti negativi sul metabolismo si stima essere 10 mM. L'inibizione della crescita della pianta viene aggravata dall'insorgenza di stress secondari, come quello ossidativo, che sono una conseguenza diretta dello stress ionico.



**Figura 23. Stress osmotico e stress ionico.** La salinità colpisce la pianta in due fasi distinte e successive: la prima coinvolge una risposta rapida all'aumento della pressione osmotica esterna (fase osmotica), mentre la seconda è più lenta ed è determinata dall'accumulo di ioni  $\text{Na}^+$  nelle foglie. La linea verde continua rappresenta la crescita della pianta. (a) la linea tratteggiata è l'andamento ipotetico di una pianta tollerante allo stress osmotico. (b) la linea rossa tratteggiata rappresenta il tasso di crescita di una pianta con spiccata resistenza alla componente ionica dello stress salino. (c) la linea tratteggiata indica la crescita di una pianta con caratteristiche di resistenza sia alla componente osmotica che ionica (Munns *et al.*, 2008).

In alcune specie, come il limone, l'effetto tossico è dato invece dal cloro, che viene accumulato più in fretta del sodio; in altre come il mais non vi è differenza tra i due ioni. Per quanto riguarda il riso, studi condotti negli anni Ottanta del secolo scorso hanno verificato un accumulo lineare dei due ioni, anche se alcuni affermano che genotipi di riso più resistenti al sale accumulano meno cloro nelle foglie (Lewitt *et al.*, 1980). Il meccanismo di tossicità dello ione cloro non è ancora stato ben chiarito, ma si è osservato un suo ruolo attivo nel determinare il volume e il pH cellulare. Si ritiene comunque in genere che nelle piante l'effetto tossico degli ioni sodio sia prevalente, mentre il ruolo ricoperto dal cloro sarebbe marginale.

#### 1.4.2. Percezione dello stress ionico

Poco si sa su come le cellule vegetali avvertano la presenza di sodio. Si crede che un sensore del sodio possa essere rappresentato dalla proteina antiporto SOS1 (Zhu, 2003). In effetti molti trasportatori si sono rivelati essere dei sensori, come BgIF (una permeasi specifica per i  $\beta$ -glucosidi) in *E. coli* (Chen *et al.*, 1997) e Mep2p che permette l'ingresso dell'ammonio in lievito inducendone una crescita filamentosa (Lorenz *et al.*, 1998). SOS1, è fondamentale per l'esclusione del sodio dalle cellule di *Arabidopsis*, ma la sua espressione è limitata al parenchima xilematico e alle cellule associate ai peli radicali. Ha una struttura costituita da 10-12 domini transmembrana e una sequenza C-terminale citosolica di 700 aminoacidi. Proprio questa lunga e insolita coda potrebbe avere un ruolo nel *signalling* del sodio. Un altro potenziale candidato come sensore potrebbe essere la proteina SOS5, ma ancora poco si sa sulle sue funzioni. Di recente è stato proposto un modello di percezione dello stress ionico a livello del citosol. Infatti bloccando il trasferimento di sodio nel citoplasma delle cellule del mesofillo di riso o aggiungendo sorbitolo l'accumulo di calcio intracellulare non si verificava (Kader *et al.*, 2007), anche se sembra che nel sistema pianta lo stress osmotico sia indissolubilmente legato all'aumento del  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  (Türkan *et al.*, 2009).

Anche se, come per lo stress osmotico, non è chiaro a livello molecolare chi sia il sensore, fondamentali risultano i secondi messaggeri capaci di dare origine alla cascata di trasduzione del segnale che porterà ai necessari adattamenti metabolici.

#### 1.4.3. Meccanismo di assorbimento e trasporto del sodio

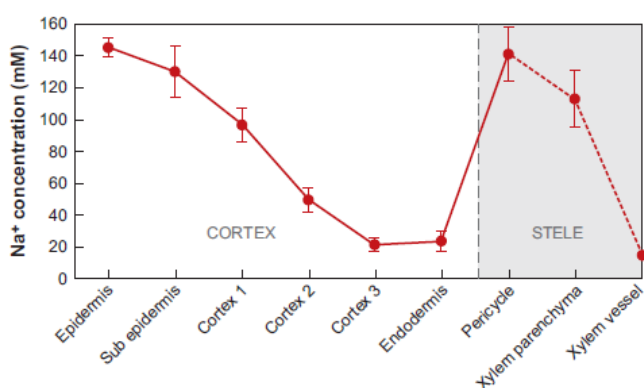
L'ingresso del sodio a livello cellulare è favorito dal potenziale di membrana, che è molto negativo. Per fare in modo che non raggiunga concentrazioni tossiche nell'apparato foliare, la concentrazione di sodio all'interno della pianta può essere controllata a vari livelli.

Un primo meccanismo ha luogo nelle radici, ma limitare l'uptake del sodio è reso difficile per le caratteristiche fisico-chimiche condivise con il potassio. Il sodio entra nel tessuto radicale in maniera passiva utilizzando dei canali voltaggio indipendenti o non selettivi per cationi. Presumibilmente sono coinvolti anche altri trasportatori, come i membri della famiglia dei trasportatori con alta affinità per il potassio (HKT), la cui espressione in condizioni di alta salinità risulta però essere inibita. Appena entrata, la maggior parte del sodio nelle radici viene pompata all'esterno grazie ad antiporti di membrana  $Na^+ : H^+$ , che dissipano considerevolmente il potenziale elettrochimico di membrana, ma impediscono il raggiungimento della parti radicali più interne e più prossime allo xilema. Questa azione di riestensione ionica viene osservata in grano, nelle cui radici più esterne è stata osservata una maggiore concentrazione vacuolare di sodio rispetto ai tessuti più interni (Figura 24).

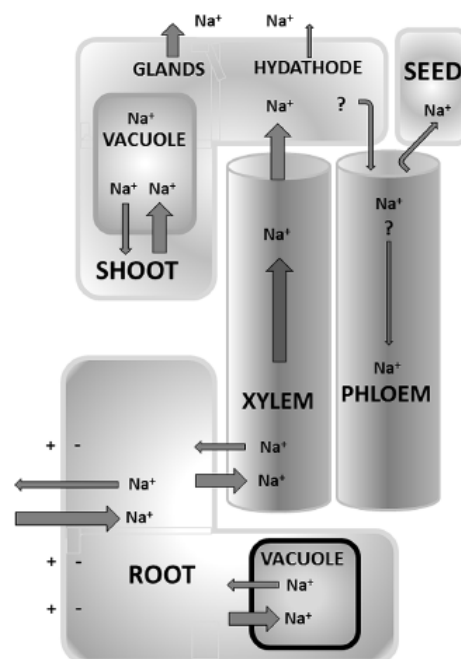
Un secondo meccanismo prevede la ritenzione del sodio nelle radici, sequestrato nei vacuoli. Tale processo è favorito da antiporti  $Na^+ : H^+$  posti sul tonoplasto, come quelli appartenenti alla famiglia NHX in *Arabidopsis*. Nell'interfaccia cellula-vacuolo vi sono dei canali non selettivi per i cationi che permettono il ritorno di sodio nel citosol; per questa ragione l'attività degli antiporti deve essere costante, come quella delle pompe protoniche che ristabiliscono la differenza di potenziale elettrochimico. Un terzo livello di controllo avviene durante il trasporto xilematico: il sodio infatti può essere estratto dallo xilema impedendo che raggiunga la parte aerea della pianta. Il meccanismo con cui il sodio entra nello xilema non è chiaro. Si pensa che SOS1 ne permetta l'ingresso, ma il mutante SOS1<sup>-</sup> accumula più sodio nelle foglie rispetto al *wild-type*. È stata quindi avanzata l'ipotesi che SOS1 pompi il sodio in uscita dallo xilema verso il tessuto radicale, ipotesi che sembra però improbabile viste le differenze di pH e di concentrazione di  $Na^+$  fra xilema e tessuti adiacenti. Le piante, a differenza delle cellule animali, non posseggono  $Na^+$ -ATPasi e  $Na^+ / K^+$ -ATPasi che, data la loro alta specificità, faciliterebbero l'esclusione del sodio. Per questo è fondamentale che la concentrazione di protoni venga mantenuta sotto controllo nei vari compartimenti cellulari, grazie all'azione di enzimi come le  $H^+$ -ATPasi e le  $H^+$ -pirofosfatasi.



Considerando una concentrazione intracellulare di sodio in condizioni di stress pari a 30 mM e un potenziale di membrana di -120 mV (Figura 25), il flusso di  $\text{Na}^+$  dal citosol allo xilema deve coinvolgere trasportatori attivi, anche se la concentrazione nella cellula è 10 volte superiore, poiché il potenziale di membrana delle cellule della radice è più negativo di quelle dello xilema (Munns *et al.*, 2008). Considerando invece gli antiporti  $\text{Na}^+:\text{H}^+$ , che per le piante abbiamo visto essere fondamentali, le assunzioni da fare sono più semplici, poiché vengono scambiate due cariche positive senza modificare il potenziale di membrana. Nel caso rappresentato nella Figura 25 il sodio entra nelle radici per diffusione, data la sua alta concentrazione nel suolo; in seguito verrà trasferito nello xilema grazie allo scambio con un protone, reso possibile dal pH del tessuto xilematico, più basso di quello radicale.



**Figura 24.** Sopra: concentrazione vacuolare di sodio in cellule radicali di grano cresciute in presenza di 150 mM NaCl (Munns *et al.*, 2008). A lato: immagine d'insieme del trasporto di sodio. Alcuni meccanismi non sono stati del tutto chiariti, come il ricircolo del sodio per mezzo del floema. Altri sono messi in atto solo da alcune specie di alofite, come è il caso degli idatodi e delle ghiandole capaci di secernere il sodio. La grandezza delle frecce è proporzionale all'entità del flusso (Maathius *et al.*, 2014).

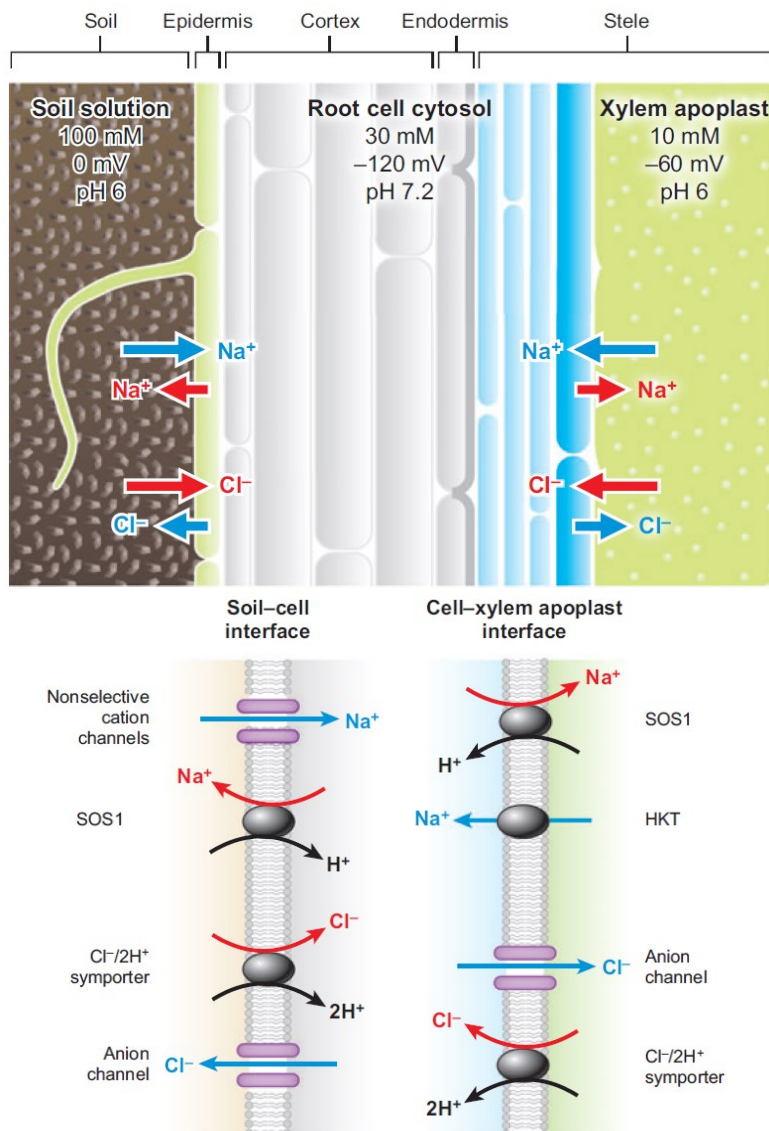


#### 1.4.3.1. Trasportatori coinvolti nell'omeostasi del sodio

L'omeostasi cellulare del sodio coinvolge un elevatissimo numero di trasportatori, alcuni dei quali sono specifici per il sodio, mentre altri trasportano i cationi in genere (Figura 26). Il flusso netto di sodio all'interno di una pianta, determinato dal catione in entrata meno quello che viene riestruso, non rappresenta qualcosa di statico, bensì è un equilibrio in costante evoluzione in risposta a stimoli ambientali, alla ricerca del miglior adattamento per la pianta. L'ingresso del sodio nelle radici avviene mediante canali per il trasporto di ioni e trasportatori. Fra i canali si trovano i GLR (*glutamate like receptors*) e i CNGCs (*cyclic nucleotide-gated channels*) e probabilmente altri come NSCCs (*non selective cation channels*). Utilizzando una sonda fluorescente sensibile al sodio si riuscì a dimostrare il coinvolgimento dei NSCC nell'influsso di  $\text{Na}^+$  durante lo stress salino in riso (Kader *et al.*, 2005), anche se l'identità molecolare della proteina rimane non chiarita.

Altre vie d'ingresso per il  $\text{Na}^+$  durante lo stress possono essere i trasportatori per il potassio, appartenenti alla famiglia delle proteine HKT. Nella varietà di riso *japonica* Nipponbare sono state scoperte sette OsHKT, di cui due sono state caratterizzate. OsHKT2;1 sembra mediare il trasporto del sodio a basse concentrazioni di potassio, ma la sua espressione viene rapidamente abbassata dopo qualche minuto dall'inizio dello stress salino, portando a escluderne il coinvolgimento nell'ingresso del sodio in tali condizioni (Horie *et al.*, 2007). OsHKT2;4 è invece capace di legare un vasto numero di cationi, fra cui il calcio, per cui era stato proposto un suo coinvolgimento nella cascata del segnale  $\text{Ca}^{2+}$  dipendente; lavori recenti hanno però portato a rifiutare questa ipotesi, poiché ne è stata

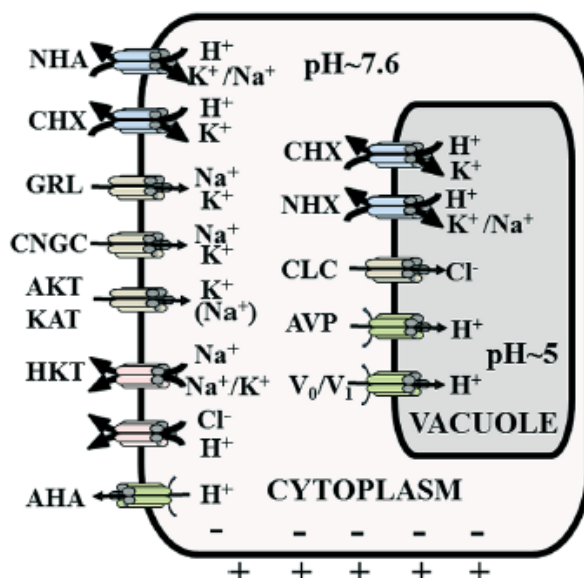
dimostrata una spiccata e atipica selettività per il potassio rispetto ai cationi bivalenti e al sodio (Horie *et al.*, 2011).



**Figura 25. La termodinamica e i meccanismi alla base del trasporto radicale di sodio e cloro.** Le variabili che sono state considerate in relazione allo stress salino sono le seguenti: pH citosolico, concentrazione ionica e voltaggio.

La termodinamica del movimento degli ioni è indicata dai colori delle frecce, dove il trasporto attivo è raffigurato in rosso, mentre quello passivo è in blu.

SOS, salt overly sensitive; HKT, high-affinity  $K^+$  transporter (riadattato da Munns *et al.*, 2008).

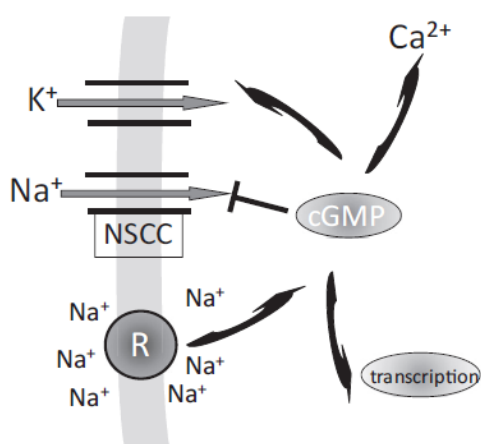


**Figura 26. I trasportatori di membrana che contribuiscono all'ingresso e alla distribuzione del sodio.** Le pompe ricoprono un ruolo fondamentale, ristabilendo il gradiente protonico; fra di esse troviamo AHA che pompa protoni nell'apoplasto e due pompe protoniche poste sul tonoplasto che pompano  $H^+$  nel vacuolo. Non tutti i trasportatori sono presenti in un'unica cellula.

AKT/KAT, trasportatore per lo ione  $K^+$ ; CHX, antiporto catione protone; CLC, canale per il cloro; CNGC, canale dipendente da nucleotide ciclico; GRL o GLR, canale simile al recettore per il glutammato; HKT, simporti  $K^+ : Na^+$  e  $Na^+ : Na^+$ ; NHA, antiporto  $Na^+ : H^+$  sulla membrana citoplasmatica; NHX, antiporto  $Na^+ : H^+$  del tonoplasto (Maathius *et al.*, 2014).

Se una pianta non precedentemente esposta al sale viene sottoposta a stress salino, l'ingresso passivo di  $\text{Na}^+$  è molto marcato, soprattutto durante i primi 10-20 minuti. Trascorso questo lasso di tempo l'influsso di sodio diminuisce, non è chiaro se per effetto di un aumento del suo efflusso o di una diminuzione del suo ingresso. Una spiegazione può essere fornita dalla modifica del potenziale elettrochimico di membrana, che diventa meno negativo (Mian *et al.*, 2011). Si è pensato che la decrescita del potenziale di membrana potesse essere uno dei segnali specifici determinati dall'aumento del sodio intracellulare. Infatti in condizioni di stress osmotico si verifica un'iperpolarizzazione della membrana, mentre lo stress ionico la depolarizza. Studi più approfonditi hanno però evidenziato una risposta aspecifica: qualsiasi ione con cui si alzava la concentrazione del mezzo di coltura era capace di indurre depolarizzazione.

Come lo stress osmotico, anche quello salino coinvolge numerosi secondi messaggeri, tra cui il  $\text{Ca}^{2+}$ , la guanosina monofosfato ciclica (cGMP) e i ROS (Maathuis, 2013). Studi condotti su piante di Arabidopsis e di peperone hanno dimostrato che l'ingresso del sodio è da collegarsi ai nucleotidi ciclici, in particolare al cGMP (Maathuis *et al.*, 2001; Essah *et al.*, 2003) (Figura 27). Si crede che il cGMP abbia un effetto inibitorio diretto sui canali ionici non selettivi (NSGCs), poiché applicandolo esternamente alle radici l'uptake di sodio viene abbassato. Durante lo stress salino il cGMP promuove, mediante un segnale calcio-dipendente, l'ingresso di ioni potassio e la trascrizione di geni codificanti per trasportatori di membrana. Ma i diretti bersagli del cGMP rimangono ignoti: non è ancora stata scoperta infatti una chinasi cGMP-dipendente.

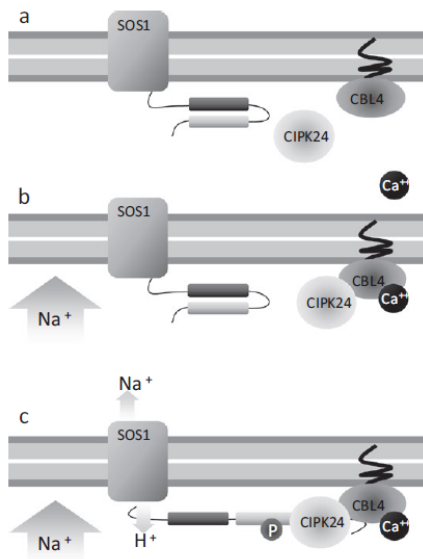


**Figura 27. Regolazione del flusso di cationi a opera del cGMP.** Un aumento di sodio citosolico viene avvertito dal cGMP, che blocca il flusso dei canali non selettivi per i cationi (NSCC), attiva la trascrizione di specifici geni, stimola l'ingresso di potassio e favorisce un accumulo citosolico di calcio per dare inizio alla cascata di trasduzione del segnale. (Maathuis, 2013).

Lo stress salino attiva la produzione di ROS (in prevalenza perossido di idrogeno e anione superossido), molecole potenzialmente tossiche il cui accumulo induce la trascrizione dei geni codificanti per gli enzimi antiossidanti. I ROS ricoprono anche il ruolo di molecole segnale. Infatti l'accumulo che si verifica dopo qualche minuto dall'imposizione dello stress salino (Hong *et al.*, 2009) determina l'attivazione della cascata del segnale MAPK-dipendente. Studi recenti in riso hanno dimostrato l'attivazione di fattori di trascrizione ROS-sensibili, ad esempio ERF1 (*Ethylene Response Factor*) che si lega a una serie di promotori fra i quali sono inclusi quelli delle MAPK (Schmidt *et al.*, 2013). Aumentando l'espressione di ERF1 si accresce la tolleranza del riso al sale. Non ancora chiarito cosa generi il segnale dei ROS, ma un'ipotesi recente vede la proteina SOS2, che ha attività chinasi, interagire con un'altra chinasi nucleoside trifosfato (NDPK2), che risulta fondamentale per l'attivazione della chinasi indotta da perossido di idrogeno (Verslues *et al.*, 2007). Il ruolo ricoperto dal calcio in risposta allo stress ionico rimane invece difficile da determinare, poiché vi è sovrapposizione con la risposta adottata dalla pianta in condizioni iperosmotiche.

### L'efflusso del sodio nell'apoplasto e sua regolazione

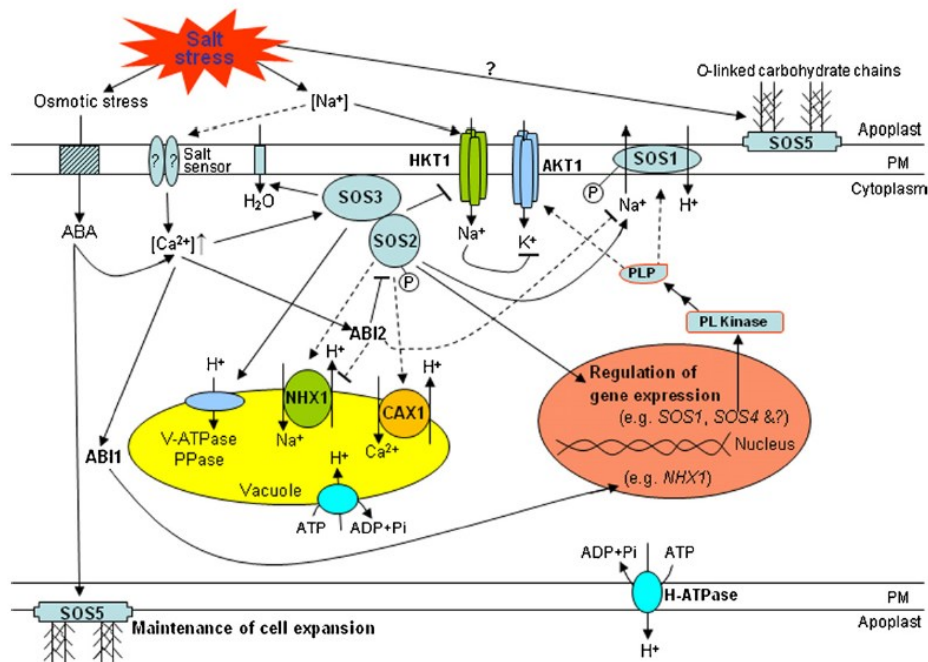
Il sodio passa dal citoplasma all'apoplasto mediante trasportatori appartenenti alla famiglia NHA ( $Na^+ : H^+$  antiporter) (Figura 28). Tra essi solo uno è stato descritto e studiato in dettaglio: SOS1, la cui espressione è stata riscontrata nel parenchima dello xilema e a livello dei peli radicali. Questi ultimi sono incaricati dell'assorbimento di sali minerali dal suolo e hanno la caratteristica di non avere il vacuolo: l'unica possibilità di abbassare la concentrazione di sodio è quindi quella di riestruderlo nell'apoplasto mediante SOS1. La sua espressione è molto elevata dopo ore e giorni di stress salino. Tale meccanismo non è presente in tutti i tessuti, dato che SOS1 non ha un'espressione sistemica, e suoi analoghi ad oggi non sono ancora noti. Una valida alternativa può essere costituita dalla famiglia di antiporti CHX (*cation:H<sup>+</sup> Exchange*), che permette l'ingresso di potassio.



**Figura 28. Il sistema SOS.** A fianco è illustrato come viene regolato il pathway SOS.

- (a) In assenza dello stimolo derivante dall'alta concentrazione di sodio SOS1 è inattiva, mediante un meccanismo di auto-inibizione
- (b) In presenza di sodio CBL4 (SOS3) lega il calcio, che stimola l'interazione con una chinasi specifica CIPK24 (SOS2).
- (c) Il complesso CBL-CIPK fosforila la coda C-terminale di SOS1, questo porta a una modifica conformazionale che rimuove l'auto-inibizione da SOS1 e ne stimola l'attività (Maathuis, 2013).

In basso è mostrato il sistema SOS nelle piante in risposta allo stress sia osmotico che salino con gli adattamenti molecolari risultanti (Türkan *et al.*, 2009).



L'attività dell'antiporto SOS1 dipende dalla fosforilazione di SOS2 (la chinasi CIPK24), una chinasi indotta dal calcio e attivata dall'associazione con SOS3 (CBL4), una calcineurin-

B like. CBL4, che per azione del  $\text{Ca}^{2+}$  dimerizza e interagisce con un dominio NAF di SOS2, rimuovendo l'inattivazione e permettendo la fosforilazione di SOS1 (Quintero *et al.*, 2011). CIPK24 (SOS2) può avere effetto anche su altri trasportatori come HKT1, coinvolto nel trasporto del sodio, e NHX1 responsabile per l'estrusione di sodio nel vacuolo. Lo studio di mutanti *knockout* per CBL4 (SOS3) e CIPK24 (SOS2) risulta molto complicato, per via delle interazioni con altre proteine con attività di trasportatori. Inoltre il ruolo fisiologico dell'antiporto SOS1 e l'importanza della cascata di reazione che lo attiva lascia aperte numerose domande. Infatti il segnale dell'incremento del calcio intracellulare che attiva SOS3 è un sinonimo di stress osmotico e non ionico. Inoltre il livello di  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  rimane considerevole per 1-2 minuti, non di più, e questo determina un'attivazione dell'antiporto SOS1 quando i livelli di sodio nel citosol non sono ancora dannosi (Maathius, 2013).

Per completare il quadro del sistema SOS devono essere considerate anche SOS4 e SOS5. SOS4 codifica per una piridossal chinasi (PL) coinvolta nella sintesi di piridossal fosfato (PLP, una forma attiva della vitamina B), cofattore essenziale per un elevato numero di enzimi che in cellule animali è capace di regolare l'attività di alcuni trasportatori. Per questo motivo è stata avanzata l'ipotesi che SOS4 sia uno dei determinanti dell'omeostasi del sodio e del potassio. In effetti mutanti *sos4* di *Arabidopsis* in condizioni di stress salino accumulavano più sodio e meno potassio rispetto *al wild-type* (Shi *et al.*, 2002). SOS5 è una proteina posta all'esterno del plasmalemma, e si suppone che possa avere un ruolo nel processo di adesione cellula-cellula e nel mantenimento dell'integrità della membrana, sostenendo l'espansione cellulare anche in condizioni di stress salino. È stato formulato un modello in cui i ROS modulano il sistema SOS: lo stress salino induce l'accumulo di calcio attivando SOS1, il quale provoca un'alcalinizzazione dell'apoplasto che attiva la NADPH ossidasi transmembrana che produce ROS. Si pensa che questi ROS, in qualche maniera, stabilizzino l'mRNA di SOS1 incentivandone la sintesi e l'attività, che a sua volta provoca un incremento di ROS NADPH ossidasi-dipendente. Il modello sottolinea l'importanza del trasportatore SOS1 nel *signalling* precoce del sodio e nell'attivazione della cascata del segnale, ma deve essere ancora determinato quali siano i componenti che modificano la stabilità dell'mRNA (Türkan *et al.*, 2009).

### *Il sequestro vacuolare del sodio e la sua regolazione*

Il controllo dei livelli di sodio nel citosol può avvenire mediante l'estrusione apoplastica, ma anche pompando il catione nel vacuolo, che in condizioni normali occupa circa il 90% del volume cellulare e non possiede al suo interno enzimi sensibili. Qui possono essere raggiunte senza effetti negativi concentrazioni di sodio nell'ordine di 100 mM.

Studi condotti su molte specie vegetali, fra cui il riso, hanno evidenziato che la maggior parte del trasporto di sodio nel vacuolo in condizioni di stress salino è a carico di NHX1 ( $\text{Na}^+:\text{H}^+$  exchanger1) (Fukuda *et al.*, 2004). In *Arabidopsis* sono stati identificati sei geni NHX, suddivisi in due classi: quelli di classe I (AtNHX1-4) e quelli di classe II (AtNHX5-6). I primi sono trasportatori che si trovano sul tonoplasto e sono attivati da una fosforilazione ad opera di SOS2 (CIPK24) (Maathius, 2013) e inibiti da una proteina calmodulin-like (CaM15) (Yamaguchi *et al.*, 2005). Di recente sono emersi dubbi sui dettagli molecolari e fisiologici del funzionamento delle NHX di classe I: la maggior parte di queste isoforme, infatti, è in grado di trasportare dentro al vacuolo sia il sodio che il potassio, ma i valori di Km hanno dimostrato una inaspettata preferenza per il potassio (Jiang *et al.*, 2010), suggerendo un ruolo attivo di questi trasportatori nel modulare il rapporto citosolico  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , piuttosto che nel compartimentare il solo sodio nel vacuolo. I trasportatori di classe II, invece, sono associati al complesso sistema di membrane del Golgi e i mutanti *knockout* per entrambe le proteine (AtNHX5-6) mostrano un fenotipo più sensibile al sale. Bassil e collaboratori hanno dimostrato che l'omeostasi degli ioni all'interno dei compartimenti cellulari, come il Golgi, è capace di attivare la sintesi e il successivo spostamento di proteine (NHX di classe I) verso il vacuolo (Bassil *et al.*, 2011).

In condizioni di stress salino deve essere limitata il più possibile la fuoriuscita di sodio

dal vacuolo. In queste condizioni, infatti, viene modificata la permeabilità del tonoplasto, inibendo il flusso dei canali (SV, slow vacuolar, e FV, fast vacuolar) permeabili al sodio (Bonales Alatorre *et al.*, 2013).

### *Il trasporto del sodio a lunga distanza*

Nelle piante il trasporto di acqua e sali minerali dalle radici alle foglie è a carico dello xilema. Il sodio deve attraversare tutta la radice prima di essere caricato in questo tessuto di trasporto, e può farlo mediante la via simplastica o apoplastica; in riso quest'ultima sembra prevalente. La via apoplastica è bloccata dalla banda del Caspary, costituita da un tessuto suberificato impermeabile, oltre la quale sembra invece predominante la via simplastica. È stato però osservato che nelle giovani piante spesso tale tessuto non risulta ancora ben sviluppato e ciò può comportare un ingresso incontrollato di sodio nelle radici che, se non espulso o sequestrato nel vacuolo, verrà caricato nello xilema.

Prima di essere caricati nello xilema i soluti devono passare la membrana citoplasmatica del parenchima a contatto diretto con i tubi xilematici. Siccome questo passaggio rappresenta l'ultimo punto di controllo dei soluti da traslocare nella parte aerea, risulta regolato molto finemente. All'interfaccia con lo xilema si trovano infatti sia canali di membrana permeabili al sodio capaci di trasporto passivo, che antiporti  $\text{Na}^+:\text{H}^+$  (come le proteine SOS1). Anche trasportatori della famiglia CHX sono responsabili del passaggio di sodio nello xilema. Mutanti *knock-out* di Arabidopsis per il gene CHX21 in condizioni di stress salino avevano un succo xilematico più povero di sodio rispetto al *wild-type* (Hall *et al.*, 2006). Una volta caricato nello xilema, il sodio può essere riassorbito, specie a opera dei trasportatori della famiglia HKT che si trovano nelle radici.

In Arabidopsis il silenziamento di HKT1;1 porta all'ipersensibilità in condizioni di stress salino, con sviluppo di clorosi foliare dovuto all'alto tasso di accumulo di sodio rispetto al *wild-type* (Mäser *et al.*, 2002). Sembra quindi che HKT1;1 sia associato a un limitato accumulo di sodio nella parte aerea. Sunarpi e collaboratori mediante l'uso di un anticorpo specifico riuscirono a localizzare il trasportatore sulla membrana delle cellule parenchimatice dello xilema, dimostrandone anche l'attività di riassorbimento del sodio. Esperimenti di sovraespressione di HKT1;1 nella stele di Arabidopsis hanno confermato un limitato accumulo di sodio nelle foglie. In più si è osservato che a una limitata traslocazione di sodio si accompagnava una elevata mobilitazione di potassio, portando a ipotizzare che HKT1;1 assorba il sodio dai vasi xilematici stimolando in maniera indiretta l'accumulo di potassio nel tessuto di trasporto (Sunarpi *et al.*, 2005; Horie *et al.*, 2009). In riso è stato scoperto un analogo di questo trasportatore (OsHKT1;5), espresso nel parenchima dello xilema, capace di riassorbire ioni sodio contenuti nello xilema (Ren *et al.*, 2005), la cui attività risulta proporzionale alla capacità di tollerare condizioni di stress salino. L'ipotesi di un ruolo nel riassorbimento del sodio dallo xilema anche per l'antiporto SOS1 sembra invece irrealistica, considerando la termodinamica del trasporto del sodio.

Visto che una parte importante della tolleranza allo stress salino si gioca nei tessuti foliari e nella loro capacità di mantenere un alto rapporto  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , anche i trasportatori specifici per il potassio presenti nel parenchima xilematico potrebbero avere un ruolo al riguardo. Si pensa che i  $\text{K}^+$  *outward-rectifying channels* (KORC) e i *nonselective outward-rectifying channels* (NORC) siano i maggiori responsabili del caricamento xilematico, ma potrebbero essere coinvolti altri trasportatori. Rimane inoltre da stabilire come la loro attività sia modificata dall'estruzione di sodio HKT- dipendente (Hauser *et al.*, 2010).

Una volta raggiunta la parte aerea il sodio, se non compartimentalizzato nel vacuolo, può subire due destini: può essere utilizzato come osmolita per abbassare il potenziale idrico della foglia, ma questa strategia è rischiosa per via dell'effetto tossico dello ione sugli enzimi citosolici; in alternativa, può essere caricato nei vasi floematici ed essere reindirizzato alle radici. Ad oggi non è ancora chiaro quali trasportatori siano coinvolti nella ri-mobilitazione floematica del sodio, ma è stato determinato che dal 5 al 7% del catione che raggiunge la parte aerea segue questo destino. Il floema, a differenza dello xilema che può raggiungere

concentrazioni di sodio fino a 100 mM, non è in grado di trasportare quantità importanti di questo ione. Per questa ragione i tessuti che sono a diretto contatto con il floema, come i frutti o i tuberi, non ne accumulano grandi quantità anche in condizioni di stress salino. Al momento non è chiara l'importanza di questo meccanismo nella resistenza allo stress, anche perché il trasporto floematico muove volumi limitati (20%) rispetto a quello xilematico. Per dimostrarne un possibile ruolo dovranno essere condotte misurazioni precise della composizione del succo floematico in piante soggette a stress salino.

#### 1.4.4. Stress ionico e meccanismi di tolleranza in riso

Numerosi studi sono stati condotti in riso per comprendere i meccanismi di tolleranza verso la componente ionica dello stress salino. In varietà di tipo *indica* si è dimostrato che l'accumulo di sodio nella parte aerea è inversamente proporzionale al tasso di suberina contenuta nelle radici. Inoltre il processo di produzione di tale barriera è indotto dallo stress salino, determinando un aumento degli mRNA responsabili della produzione di suberina già dopo 30 minuti dall'inizio dello stress (Figura 29). L'ispessimento della banda del Caspary permette un maggiore controllo dei soluti trasportati, soprattutto in riso dove l'assorbimento aspecifico mediato dalla via apoplastica è notevole.

In varietà di riso con una diversa sensibilità al sale sono stati misurati alcuni parametri dopo 10 giorni di esposizione a diverse concentrazioni saline (Tabella 4; Lutts *et al.*, 1999). La cultivar più resistente risulta capace di mantenere un contenuto idrico maggiore e un più negativo potenziale osmotico, anche mediante una più marcata sintesi di osmoliti compatibili. Il genotipo resistente inoltre ha un contenuto di sali nelle foglie molto diverso dal sensibile, riuscendo a mantenere un alto rapporto  $K^+/Na^+$ , e a limitare maggiormente il trasferimento di sodio.

| NaCl dose<br>(mM) | RWC<br>(%) |             | $\Psi_s$<br>(MPa) |              | Na<br>(mmol g <sup>-1</sup> DM) |             | K<br>(mmol g <sup>-1</sup> DM) |             |
|-------------------|------------|-------------|-------------------|--------------|---------------------------------|-------------|--------------------------------|-------------|
|                   | IKP        | NB          | IKP               | NB           | IKP                             | NB          | IKP                            | NB          |
| 0                 | 93.7 ± 0.8 | 92.8 ± 0.3  | -0.75 ± 0.04      | -0.63 ± 0.11 | 0.08 ± 0.01                     | 0.06 ± 0.01 | 1.31 ± 0.11                    | 1.17 ± 0.04 |
| 50                | 65.6 ± 0.2 | 79.7 ± 0.09 | -1.67 ± 0.10      | -2.14 ± 0.08 | 0.84 ± 0.07                     | 0.62 ± 0.05 | 0.51 ± 0.12                    | 0.93 ± 0.08 |
| 100               | 51.4 ± 0.4 | 72.8 ± 0.1  | -2.17 ± 0.21      | -3.01 ± 0.17 | 1.23 ± 0.17                     | 0.80 ± 0.03 | 0.39 ± 0.05                    | 0.62 ± 0.08 |

**Tabella 4. Effetti differenziali della salinità su due genotipi di riso.** I potenziali ( $\Psi$ ) e le concentrazioni di sodio e potassio sono state misurate in piante di riso cresciute per 10 giorni in presenza o meno di sale (0, 50, and 100 mM NaCl). I genotipi corrispondenti sono: Nona Bokra NB, tollerante; I Kong Pao IKB, sensibile. Le corrispondenze delle sigle: contenuto idrico relativo (RWC); potenziale osmotico medio ( $\Psi_s$ ) (Lutts *et al.*, 1999).

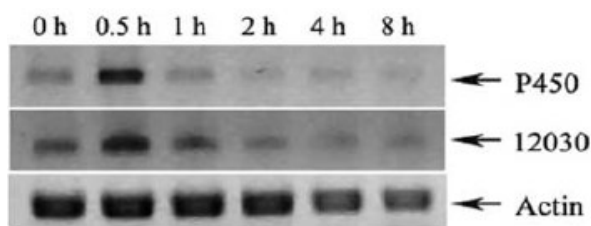
Inoltre studi condotti su cellule singole hanno indicato la presenza di diversi meccanismi innescati dall'ingresso di sodio, permettendo lo sviluppo di modelli *ad hoc* (Figura 29). In particolare è stato osservato che varietà sensibili acidificavano il citoplasma, mentre in genotipi tolleranti il pH cresceva. Questo può essere spiegato mediante l'attivazione di trasportatori diversi: le cellule sensibili, infatti, trasferiscono il sodio nell'apoplasto attivando l'antiporto di membrana  $Na^+:H^+$  (SOS1) e favorendo l'ingresso di protoni. Quelle tolleranti, invece, utilizzano preferenzialmente l'antiporto vacuolare  $Na^+:H^+$ . Tale forma di trasferimento richiede una costante attivazione delle pompe protoniche poste sul tonoplasto per ristabilire il gradiente elettrochimico, e per questo il pH citosolico non viene abbassato. Un'ulteriore conferma di questo modello è data dall'abbassamento del pH vacuolare.

#### 1.5. Gli osmoliti compatibili

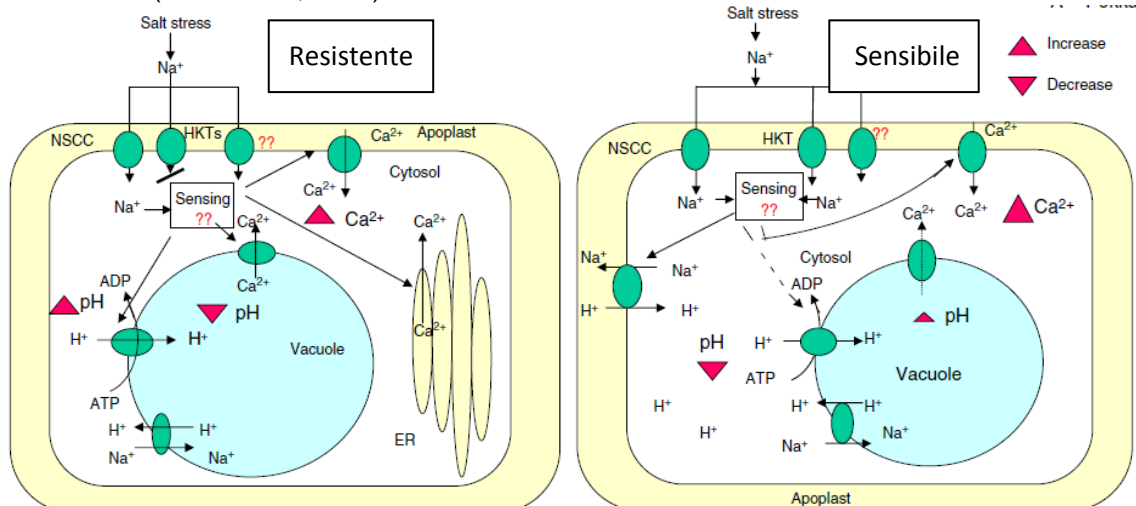
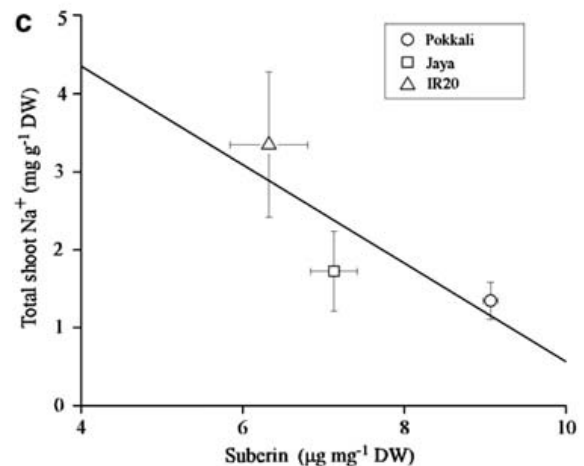
Lo stress osmotico determina uno squilibrio idrico nella pianta, la quale è spinta ad abbassare il suo potenziale idrico per cercare di limitare la disidratazione. Inoltre se gli

antiporti responsabili del sequestro di sodio nel vacuolo funzionano a dovere, la cellula è costretta ad attivare la sintesi dei cosiddetti osmoliti compatibili per non sbilanciare il potenziale osmotico del citoplasma. Sarebbe un enorme vantaggio per la pianta se la sintesi di tali composti fosse promossa dall'attività degli antiporti vacuolari  $\text{Na}^+:\text{H}^+$  o dalle pompe protoniche, ma ad oggi non vi sono evidenze in questa direzione. Si definisce osmoprotettore una molecola solubile, metabolicamente inattiva, che possa essere accumulata in grandi quantità. Fra di essi possiamo trovare aminoacidi, come la prolina, composti quaternari dell'ammonio (glicina betaina), zuccheri (saccarosio) o alcoli (mannitolo).

Nelle alofite la concentrazione foliare di prolina o glicina betaina può arrivare a  $40 \mu\text{mol g}^{-1}$ , esercitando una pressione osmolare nell'ordine di  $0,1 \text{ MPa}$  (Flowers *et al.*, 1977). Nelle glicofite, invece, tali molecole raggiungono concentrazioni notevolmente più basse (nell'ordine di  $10 \mu\text{mol g}^{-1}$ ), ma considerando che vengono accumulate nel citosol, corrispondente a una porzione molto limitata del volume cellulare, possono contribuire ugualmente al raggiungimento di notevoli pressioni osmotiche e svolgere il ruolo di osmoliti compatibili. Probabilmente il ruolo degli osmoprotettori a basse concentrazioni non è quello di abbassare il potenziale idrico: alcuni studi suggeriscono un loro ruolo attivo nella stabilizzazione della struttura terziaria delle proteine. In *Arabidopsis* infatti la sovra-espressione della mannosio-6-fosfato reduttasi in condizioni di stress salino stimola sia la crescita che la fotosintesi, plausibilmente grazie a un meccanismo mannitolo-dipendente di protezione delle proteine fotosintetiche e quindi dei cloroplasti (Sickler *et al.*, 2007). In condizioni di controllo la crescita di tali piante è paragonabile a quella del *wild-type*, fatto da non trascurare perché ci sono molti esempi in cui il transgene interferisce con passaggi chiave del metabolismo e quindi con la crescita o la resa finale.



**Figura 29. Livelli degli mRNA coinvolti nella sintesi di suberina in risposta al trattamento con 200 mM NaCl.** P450: acido grasso  $\omega$ -hydroxylase; 12030: elongasi. A fianco viene riportata la correlazione fra il contenuto di sodio nelle foglie e la quantità di suberina (Krishnamurthy *et al.*, 2009). Sotto sono rappresentati i due modelli di risposta allo stress ionico in riso (Kader *et al.*, 2007).





La sintesi degli osmoliti compatibili è un processo che richiede energia e non viene effettuata se non in condizioni di estrema necessità. È stato calcolato che la spesa energetica per la pianta per la sintesi o l'accumulo dei soluti coinvolti è di 3,5 ATP per il sodio, di 34 ATP per il mannitolo, 41 ATP per la prolina, 50 per la glicina betaina e 52 per il saccarosio (Raven, 1985). Gli osmoliti compatibili sono dunque molecole "costose", ma possono permettere alla pianta di sopravvivere in presenza di elevate concentrazioni saline.

### 1.5.1. Sistemi osmo-protettivi in riso

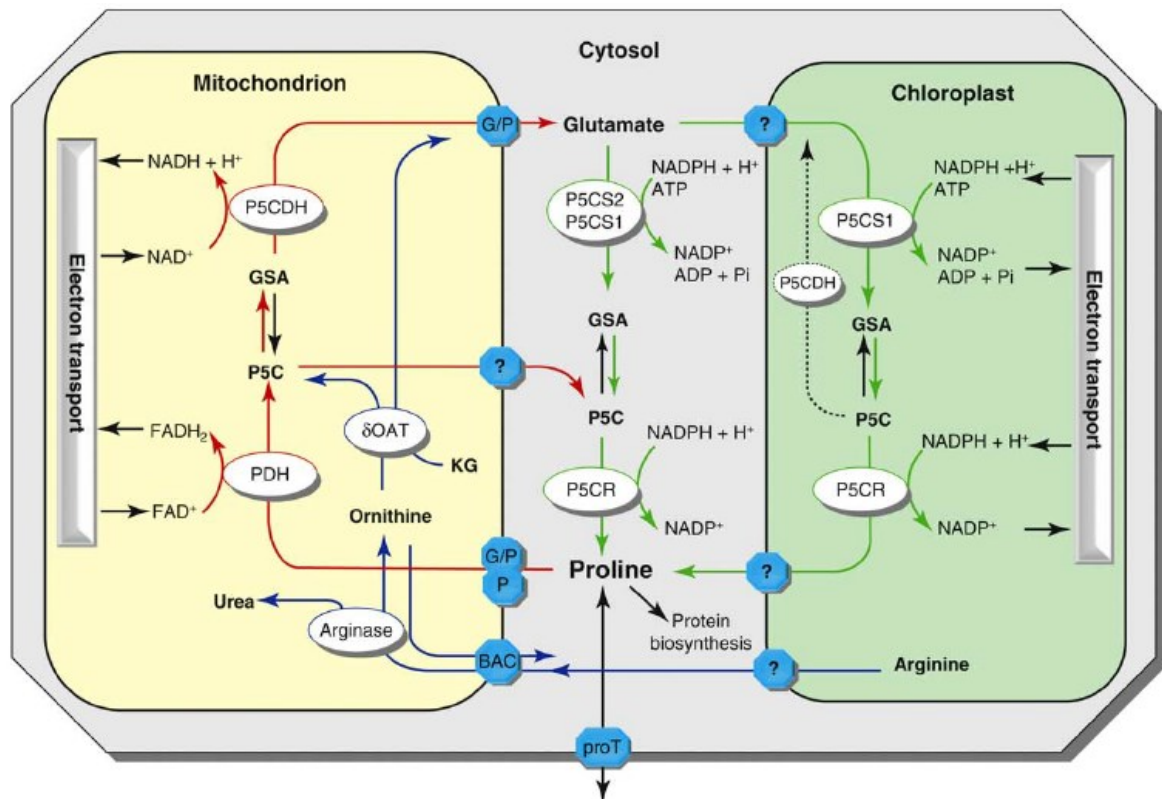
Il riso non produce la glicina betaina poiché non possiede un enzima necessario per la sua sintesi, la colina monoossigenasi (CMO). Genotipi trasformati con la betaina aldeide deidrogenasi (BADH) di orzo e cresciuti in presenza di betaina aldeide hanno dimostrato capacità di trasformare tale substrato in glicina betaina con un'efficienza maggiore rispetto ai controlli e questo si traduceva in maggiore tolleranza allo stress salino delle piante ingegnerizzate (Kishitani *et al.*, 2000). Sempre mediante la transgenesi si è prodotto un riso capace di sintetizzare la glicina betaina, inserendo il gene della CMO di spinacio e di batterio (*codA*); anche in questo caso le piante transgeniche mostravano una ridotta sensibilità al sale (Shirasawa *et al.*, 2006; Mohanty *et al.*, 2002). In modo simile, la produzione di mannitolo è stata ottenuta introducendo una mannitolo deidrogenasi batterica (Pujni *et al.*, 2007).

Di recente l'attenzione è stata focalizzata sullo zucchero non riducente trealosio, capace di proteggere le molecole biologiche dalla disidratazione. Un genotipo di riso (Pusa Basmati 1) è stato trasformato con gli enzimi necessari per la sua produzione sotto il controllo di promotori sia tessuto-specifici che stress-inducibili: in entrambi i casi i danni derivanti dallo stress salino venivano ridotti. Le piante così ottenute mantenevano infatti un alto tasso fotosintetico e avevano una bassa percentuale di fotodanno, ma una volta quantificato il trealosio ci si è accorti con sorpresa che la sua concentrazione nei tessuti era troppo bassa per poter agire come osmoprotettore. È stata quindi avanzata l'ipotesi che tale zucchero riesca ad attivare una cascata del segnale responsabile di tali adattamenti (Flowers, 2004). Ma l'osmolita compatibile per eccellenza è sicuramente la prolina. È stata dimostrata infatti la capacità di piante di riso di accumulare prolina in condizioni di stress salino, ma non è chiaro se tale aumento di sia un'attiva risposta della pianta oppure un sintomo di stress. Alcuni lavori associano infatti un alto tasso di sintesi dell'imminoacido con un'elevata suscettibilità al sale, altri l'esatto contrario.

### 1.5.2. Biosintesi della prolina

La biosintesi della prolina nelle piante è stata ben caratterizzata, e può avvenire attraverso due vie metaboliche, dall'ornitina o dal glutammato; quest'ultima sembra quella stimolata dallo stress osmotico. L'enzima pirrolin-5-carbossilato sintetasi (P5CS) fosforila e riduce il glutammato a glutammato semi-aldeide (GSA), che spontaneamente ciclizza convertendosi in pirrolin-5-carbossilato (P5C). La pirrolin-5-carbossilato reductasi (P5CR) riduce quindi il P5C in prolina. Nella maggior parte delle piante sono state identificate due isoforme della P5CS, una espressa costitutivamente e l'altra indotta da condizioni di stress, mentre generalmente la P5CR è codificata da un solo gene. Il passaggio limitante dell'anabolismo della prolina sembra a carico della P5CS, anche se ultimamente è stato dimostrato che la P5CR è capace di modulare la propria attività in funzione degli equivalenti riducenti disponibili (Giberti *et al.*, 2014). Il catabolismo della prolina avviene nel mitocondrio mediante l'azione sequenziale di una prolina deidrogenasi (PRODH), che produce P5C da prolina, e della P5C deidrogenasi (P5CDH), che ossida il P5C per formare glutammato (Figura 30). In *Arabidopsis* e in tabacco sono stati identificati due geni per la PRODH e uno per la P5CDH. Nella via biosintetica alternativa l'enzima ornitina- $\delta$ -amino transferasi (OAT) reagisce con l'ornitina per dare GSA, il quale può condurre alla sintesi di prolina mediante le reazioni precedentemente descritte.

Mentre per il catabolismo sembra chiara una localizzazione mitocondriale, lo stesso non può dirsi per le reazioni che portano alla produzione di prolina. In cellule meristematiche ed embrionali di *Arabidopsis* l'anabolismo avviene normalmente nel citosol, ma in condizioni di stress si è osservato un accumulo della P5CS1 nel cloroplasto, determinando un aumento della concentrazione plastidiale di prolina. Il coinvolgimento di diversi compartimenti cellulari per i vari passaggi del metabolismo necessita di una fitta rete di trasportatori. Si pensa che uno trasportatore specifico per la prolina ne medi l'ingresso nel mitocondrio. Recentemente in grano è stato scoperto un antiporto mitocondriale Pro:Glu, che sembra modulare la quantità di questi due amino acidi sia nel citosol che nel mitocondrio (Di Martino *et al.*, 2006). In molte alofite è stato riscontrato che elevate quantità di prolina sono mantenute all'interno del vacuolo in condizioni di bassa salinità, in modo da non sovraccaricare il processo della sintesi *de novo* al verificarsi delle condizioni avverse (Szabados *et al.*, 2009).



**Figura 30. Metabolismo della prolina nelle piante superiori.** La via anabolica è indicata con linee verdi, mentre quella catabolica con linee di colore rosso, il *pathway* dell'ornitina ha linee blu. BAC, basic amino acid transporter coinvolto nello scambio di arginina e ornitina; Glu, glutammato; G/P, antiporto mitocondriale glutammato/prolina; KG, alfa-chetoglutarato; P, trasportatore mitocondriale per la prolina; Pi, fosfato inorganico; ProT, trasportatore posto sulla membrana citoplasmatica per la prolina; ?, trasportatore ipotizzato (Szabados *et al.*, 2009).

### 1.5.3. Funzioni della prolina

La prolina viene spesso definita come un "amino acido multifunzionale"; in effetti solo il ruolo di osmoprotettore sembra un po' riduttivo. La sua produzione viene stimolata da un numero considerevole di condizioni di stress abiotico e biotico (Figura 31), dato che è in grado di proteggere l'integrità delle proteine, di preservare l'attività di numerosi enzimi, e di esercitare il ruolo di chaperone molecolare sia in caso di temperature estreme che in condizioni di stress osmotico o di stress ossidativo indotto da metalli pesanti.

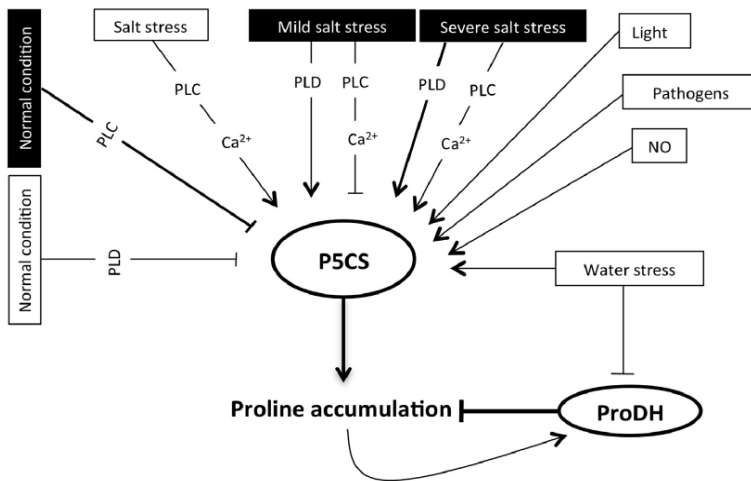
Numerosi studi attribuiscono infatti proprietà antiossidanti alla prolina, che si concretizzano nel "silenzamento" del singoletto dell'ossigeno. Il trattamento con prolina diminuisce lo sviluppo dei ROS in funghi e lieviti (Chen *et al.*, 2005), riduce la perossidazione lipidica in

alghe in seguito esposizione a metalli pesanti (Mehta *et al.*, 1999) e limita l'effetto dannoso dei ROS sulle membrane del fotosistema II (PSII) (Alia *et al.*, 1997). Silenziando geni per il metabolismo della prolina si osserva una maggiore tendenza all'accumulo di radicali dell'ossigeno. È stato osservato anche un ruolo "indiretto" nella protezione dai ROS: quando subentrano condizioni di stress, la prolina stabilizza infatti in maniera specifica alcuni degli enzimi coinvolti nella detossificazione delle forme radicaliche, come perossidasi, glutatione transferasi e superossido dismutasi.

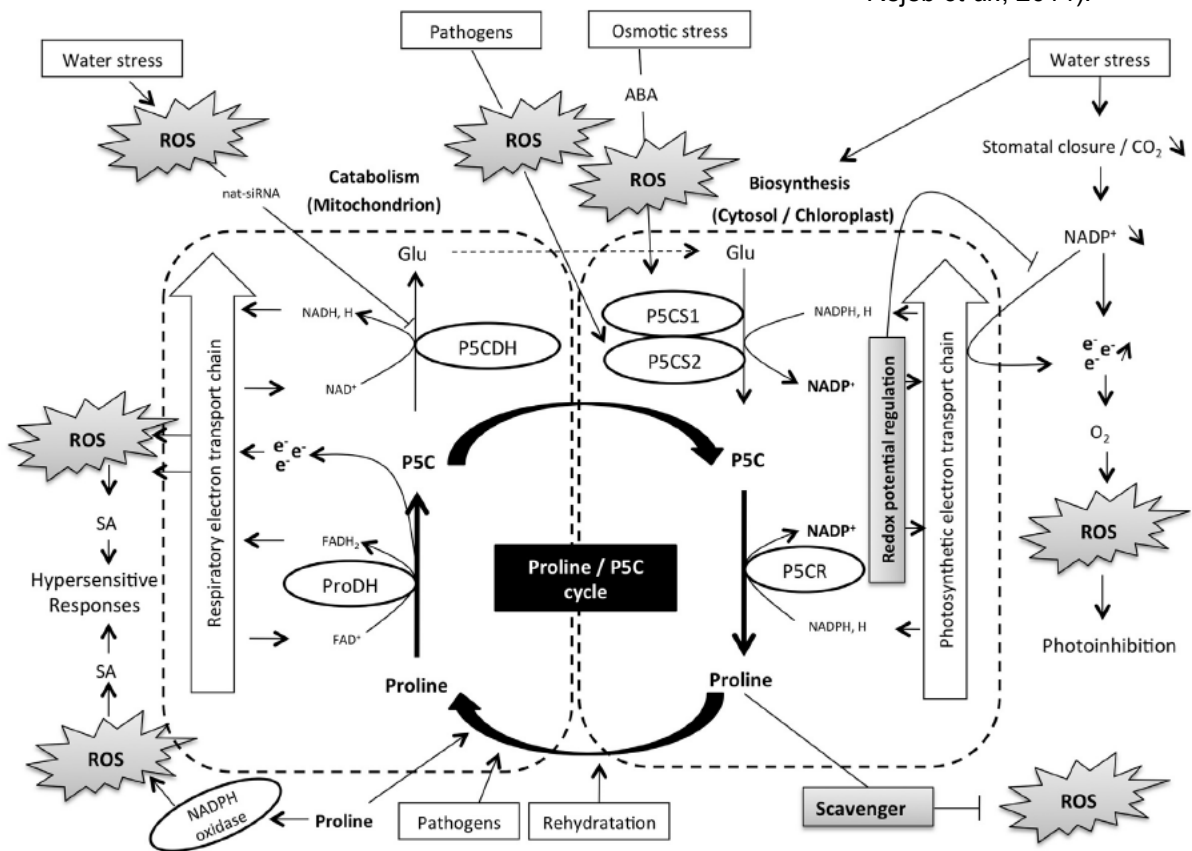
Un altro ruolo svolto dalla prolina è quello di regolare l'equilibrio *redox* della cellula. In condizioni di alta irradianza è stato osservato un aumento di sintesi glutammato-dipendente dell'amino acido nei plastidi. Tale processo assicura un alto quantitativo di prolina capace di stabilizzare le proteine del cloroplasto, e soprattutto riossida il NADPH in NADP<sup>+</sup>, che viene utilizzato come accettore finale degli elettroni dal fotosistema I (PSI), evitando così la formazione di ROS (Chaves *et al.*, 2009). Inoltre la fosforilazione del glutammato consuma ATP, producendo nuovo substrato per la sintesi di ATP durante la fotosintesi. In questo modo la sintesi di prolina nel cloroplasto assicura un basso rapporto NADPH/ NADP<sup>+</sup>, limita il fenomeno della fotoinibizione e consente il fondamentale mantenimento dell'integrità delle membrane anche in condizioni di stress. Un ulteriore elemento a favore di questa ipotesi è la dimostrazione dell'andamento circadiano luce-dipendente dell'accumulo di prolina, ottenuto mediante regolazione sia della sintesi (P5CS) che del catabolismo (PRODH) (Hayashi *et al.*, 2000). Il metabolismo della prolina influenza inoltre la via metabolica dei pentosi fosfati, in cui le prime due reazioni irreversibili, partendo dal glucosio-6-fosfato, portano alla formazione di due molecole di NADPH e liberando anidride carbonica. In condizioni di stress (stomi chiusi, bassa concentrazione di anidride carbonica) la CO<sub>2</sub> può venire utilizzata nel ciclo di Calvin mentre il NADPH, come visto in precedenza, può essere usato per la sintesi di prolina riottenendo NADP<sup>+</sup> e prevenendo la formazione dei ROS (Ben Rejeb *et al.*, 2014).

Nei mitocondri la prolina può fornire direttamente potenziale riducente tramite la sua ossidazione a opera della PRODH e della P5CDH; la prima fornisce elettroni alla catena respiratoria che verranno convertiti in energia utile per riprendere la crescita una volta terminate le condizioni di stress, la seconda produce NADH (Hare *et al.*, 1997). Di recente è stato ipotizzato un *ciclo prolina/P5C*, in cui la prolina viene ossidata a P5C, che passa nel citosol per venire riconvertito in prolina, la quale può rientrare nei mitocondri e venire ossidata nuovamente (Figura 31). Questo ciclo, all'apparenza futile, fornisce elettroni alla catena di trasporto mitocondriale, che se sovraccaricata può cederli all'ossigeno generando ROS. Si è infatti osservato che nel mutante *p5cdh* di *Arabidopsis* l'induzione della PRODH disaccoppiata da quella della P5CDH porta all'accumulo di P5C e di ROS, i quali possono agire come stressori e provocare la morte cellulare programmata (PCD) (Miller *et al.*, 2009). Ormai è accettato il ruolo ricoperto dai ROS come secondi messaggeri e vi sono sempre più evidenze che vedono coinvolto il catabolismo della prolina nella modulazione di queste molecole. Infatti si è osservato che trattando piante con prolina esogena, queste morivano in seguito a un accumulo di ROS e frammentazione del DNA (Deuschle *et al.*, 2004). Di recente è stato proposto che la prolina esogena induca la sintesi di ROS mediante un segnale calcio-dipendente che stimola la NADPH ossidasi. Successivamente si ha la produzione di acido salicilico (SA), che attiva la HR (Chen *et al.*, 2011).

Va infine ricordato che il metabolismo della prolina è fondamentale anche nei risi "aromatici", che ultimamente hanno una porzione di mercato globale sempre maggiore a causa delle caratteristiche organolettiche, che conferiscono un valore aggiunto rispetto alle varietà non aromatiche. Il composto volatile maggiormente responsabile di queste proprietà è la 2-acetil-1-pirrolina, un prodotto derivante dalla prolina e capace di conferire al riso un'aroma simile a quello del pop corn. In seguito alla osservazione che nelle varietà aromatiche era presente un quantitativo maggiore di P5C, è stato proposto per la sintesi di 2-acetil-1-pirrolina un modello basato su una maggiore attività della P5CS (Figura 32) (Huang *et al.*, 2008). Appare però strano che un composto potenzialmente tossico venga accumulato all'interno dei tessuti di riserva del riso. Non sono d'altra parte stati sinora condotti studi per verificare se alla "aromaticità" sia associata anche una maggiore tolleranza allo stress osmosalino in funzione e alla maggiore attività catalitica della P5CS.



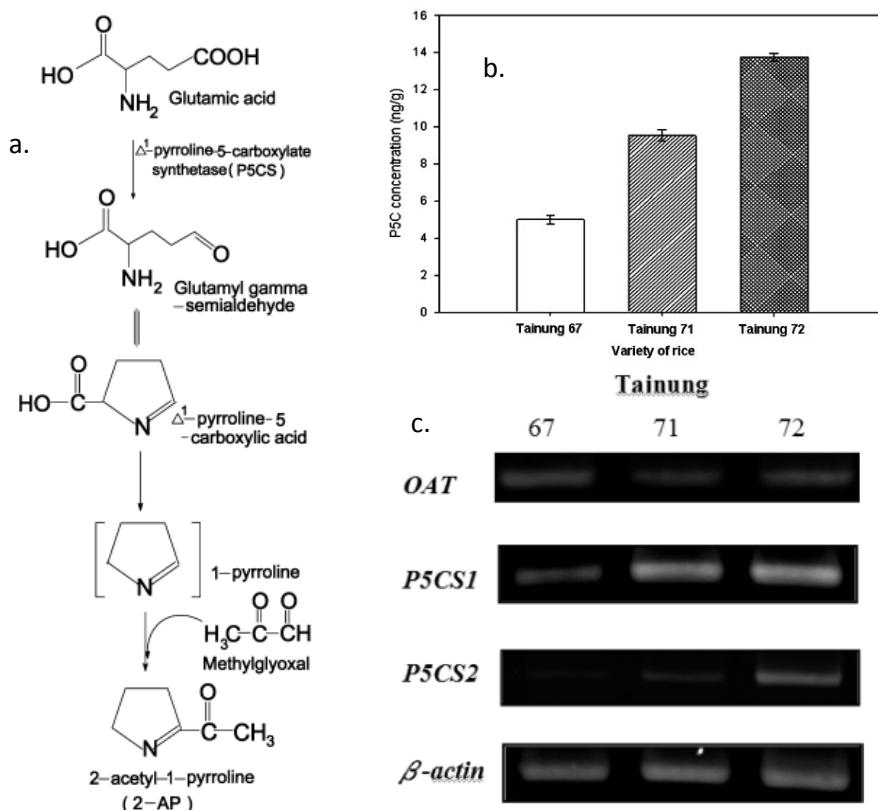
**Figura 31. Ruolo della prolina nella risposta allo stress.** A sinistra con i cerchi vengono rappresentati gli enzimi, con i rettangoli i fattori di stress verificati su *A. thaliana* (bianchi) e *T. salsuginea* (neri); PL, fosfolipasi. Sotto sono riportate le relazioni fra ROS e prolina, che si accumula in risposta all'induzione ROS dipendente dalla P5CS1 (stress osmotico) o P5CS2 (biotico). In presenza di un eccesso di prolina il ciclo prolina/ P5C è più attivo, provocando la formazione di ROS e attivando la risposta ipersensibile (HR; Ben Rejeb *et al.*, 2014).



#### 1.5.4. Ruolo della prolina nella risposta allo stress salino in riso

Visti i ruoli positivi esercitati dalla prolina, stupisce come in alcuni lavori eseguiti sul riso il suo accumulo sia più marcato nelle varietà sensibili allo stress salino piuttosto che in quelle tolleranti (Lutts *et al.*, 1999; Vaidyanathan *et al.*, 2003). Sono state proposte due spiegazioni: nella prima si suggerisce che le diverse varietà di riso siano in grado di accumulare quantità differenti di prolina in condizioni di stress salino indipendentemente dalla loro resistenza al sale, mentre nella seconda si avanza l'ipotesi che le basi metaboliche della resistenza alla salinità nella pianta possano cambiare in base allo stadio di sviluppo e con esse anche la capacità di accumulare la prolina. In genere l'aumento di prolina è interpretato come un regolatore positivo della tolleranza allo stress salino. Non è chiaro però se tale accumulo in riso avvenga inibendo il catabolismo dell'amino acido o stimolandone la biosintesi, oppure attraverso entrambi i meccanismi.

Lavori eseguiti su foglie di riso staccate e trattate con diversi sali di rame o con sodio cloruro hanno dimostrato un accumulo di prolina trattamento-dipendente già dopo 8 ore dall'imposizione dello stress. Tale accumulo è stato però associato all'aumento dell'attività della OAT, anche se non è stata verificata quella della P5CS (Chen *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2002). Come un possibile marcatore di tolleranza allo stress salino, oltre all'accumulo di prolina, è stato proposto anche l'aumento dell'attività della P5CR. In condizioni di stress salino è stato infatti osservato quasi un raddoppio della quantità di prolina dovuto a un abbassamento dell'attività della PRODH (in genotipi sia sensibili che tolleranti) e all'aumento dell'attività della P5CR. Nella varietà più resistente questo aumento era nell'ordine del 50% (Roy *et al.*, 1992), ma senza che anche in questo caso venissero eseguite misure dell'attività della P5CS.



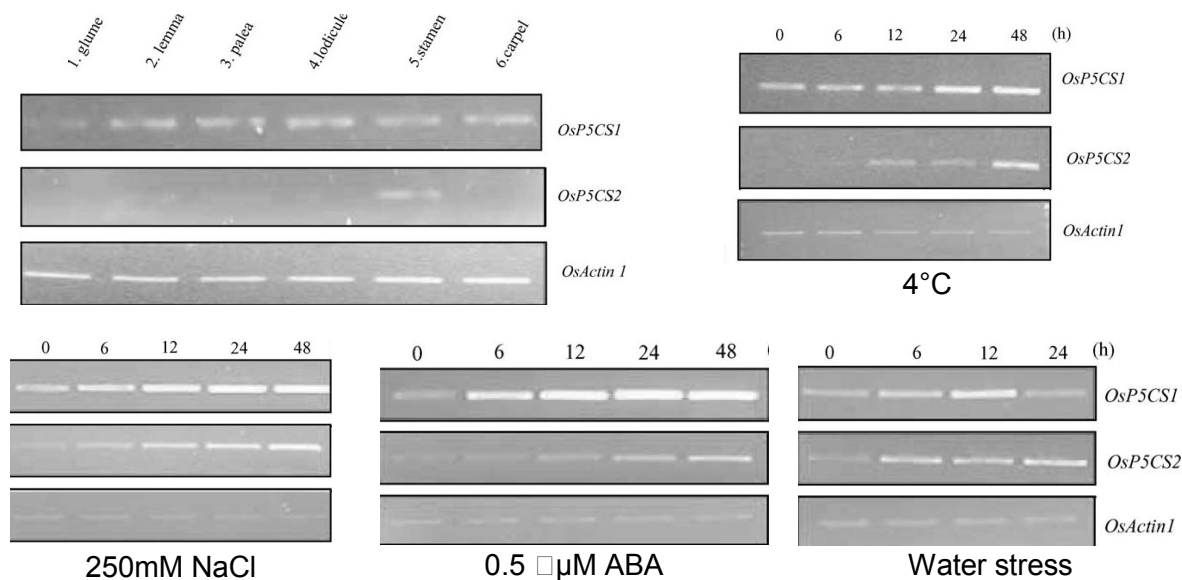
**Figura 32. Metabolismo della 2-acetil-1-pirrolina.** A: meccanismo proposto per la produzione di 2-acetil-1-pirrolina. B: livelli endogeni di P5C in tre varietà di Tainung (67 =non aromatica; 71 e 72 =aromatiche). C: livelli di espressione dei geni del metabolismo della prolina in relazione al P5C prodotto. (Huang *et al.*, 2008).

Come in *Arabidopsis*, anche in riso sono state identificate due isoforme della P5CS: OsP5CS1, con espressione ubiquitaria sia negli organi vegetativi che riproduttivi, e OsP5CS2, preferenzialmente espressa nelle piante mature, soprattutto negli stami (Figura 33).

I *patterns* di espressione indicano che la prima isoforma sintetizza prolina in maniera costitutiva, mentre OsP5CS2 è implicata nella risposta allo stress. Entrambi i geni sono indotti da sale, freddo e trattamento esogeno con ABA già a 48 ore dall'inizio del trattamento. Lo stress idrico causa un'induzione della OsP5CS1 a 12 ore, che poi ritorna ai livelli iniziali dopo 24 ore, mentre il trascritto della OsP5CS2 aumenta nelle 24 ore di trattamento. Analizzando mutanti *knock-out* per le due isoforme, si è visto che il genotipo *Osp5cs1* è letale, mentre *Osp5cs2* in condizioni normali cresce in maniera simile al *wild-type*, indicando chiaramente un ruolo di OsP5CS2 nella risposta allo stress e non nel metabolismo basale o costitutivo (Hur *et al.*, 2004).

In tessuti indifferenziati, come calli ottenuti dai cotiledoni cresciuti sia su terreno solido che in liquido, il trattamento con 250 mM NaCl determina una forte induzione della P5CS2 e una meno marcata, ma pur sempre rilevante espressione di P5CS1 e P5CR, confermando quanto osservato da Hur e collaboratori (2004). Le stesse determinazioni su cellule in coltura non hanno evidenziato cambiamenti degni di nota nei livelli di espressione

di P5CS1 e P5CR, mentre una leggera induzione è visibile per la P5CS2 (ma meno della metà rispetto al sistema callo). I risultati evidenziano i rischi dell'utilizzo di sistemi semplificati come quello delle colture cellulari. Infatti le caratteristiche di resistenza osservate in piante vengono in genere mantenute nelle cellule indifferenziate sviluppate dalle medesime, ma con le dovute eccezioni (Somboonwatthanaku *et al.*, 2010).

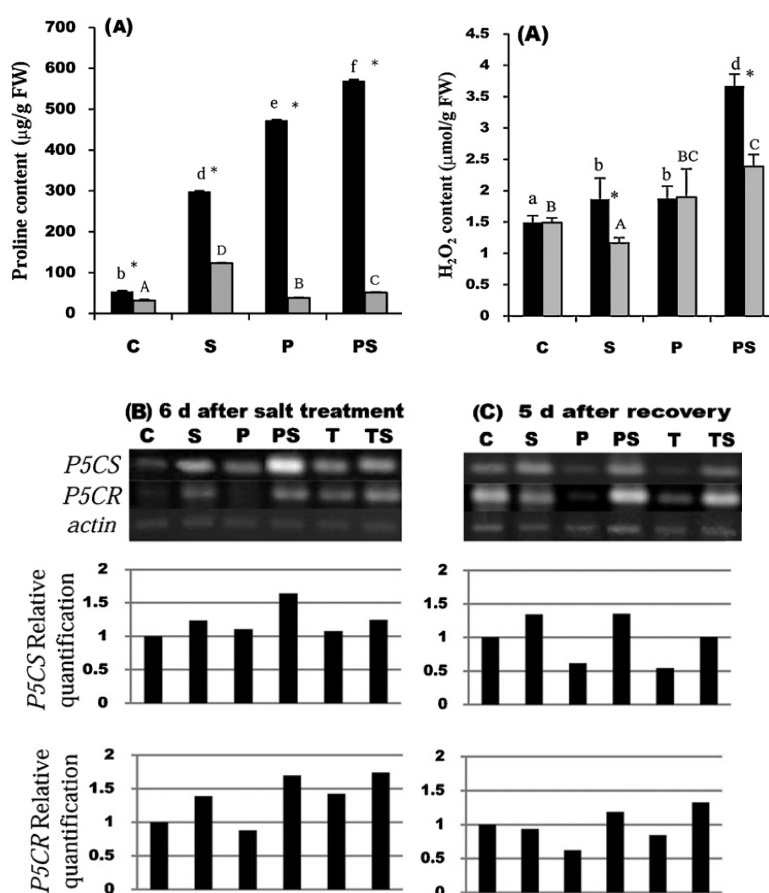


**Figura 33. Espressione delle due forme di P5CS in riso.** I livelli di messaggero sono stati quantificati in diversi tessuti della pianta e in molteplici condizioni di stress (Hur *et al.*, 2004).

Recentemente è stato dimostrato che in due varietà di riso di tipo *indica* (molto simili geneticamente, ma una resistente, LPT123-TC171 e l'altra suscettibile allo stress salino, LPT123) l'accumulo di prolina in condizioni di alta salinità è da attribuirsi, almeno in parte, all'attivazione ABA-dipendente della P5CS1, anche se non è stata determinata quella della P5CS2. L'entità di tale accumulo e la velocità con cui esso si manifesta sono molto più elevati nel genotipo resistente che in quello suscettibile. La somministrazione esogena di ABA è in grado di conferire tolleranza allo stress salino in entrambe le cultivar, aumentandone il tasso di sopravvivenza del 20% mediante un'induzione dell'accumulo di prolina (da poco meno di 2 mg g<sup>-1</sup> di peso secco a quasi 10 mg g<sup>-1</sup> dopo 9 giorni di trattamento). In condizioni di controllo, invece, l'ABA induce la trascrizione della P5CS1 solo nei genotipi tolleranti. Studi eseguiti sulla sequenza promotrice della P5CS1 del genotipo resistente hanno evidenziato in effetti la presenza di elementi ABRE (*abscisic acid responsive elements*). Inoltre l'ABA è capace di regolare in maniera positiva un gene responsabile della sintesi di calmodulina (OsCam1-1), il quale ricopre un ruolo attivo nella cascata di trasduzione del segnale in risposta allo stress salino, attivando la sintesi di prolina. Infatti l'espressione della P5CR è indotta in entrambi i genotipi a opera del segnale calmodulina-dipendente, mentre la trascrizione della P5CS1 è attivata solo nel genotipo tollerante (Sripinyowanich *et al.*, 2013).

Come dimostrato in *Arabidopsis*, la somministrazione esogena di prolina ha un effetto negativo sulla crescita vegetale (Deuschle *et al.*, 2004). Questo sembra provocato da un aumento del catabolismo della prolina che, a sua volta, provoca un accumulo di P5C, tossico per la cellula, e una iperproduzione di ROS derivante dall'attivazione del ciclo *prolina/P5C*. Tale effetto di inibizione della crescita però non si verifica trattando piante di riso con la sola prolina, mentre risulta evidente quando l'amino acido e lo stress salino sono compresenti, provocando una senescenza precoce dei tessuti. In effetti la quantità di prolina libera aumenta nelle piante trattate col sale rispetto al controllo, ma un aumento maggiore viene osservato nel trattamento con prolina esogena senza e con il sale. Quantificando il perossido

di idrogeno, si osserva un innalzamento del suo contenuto paragonabile nei trattamenti con prolina o con il solo sale, statisticamente significativo rispetto al controllo. In piante trattate con entrambi, l'aumento di  $H_2O_2$  è molto più marcato, come se vi fosse un effetto cumulativo del sale e della prolina sulla produzione di ROS (Figura 34). Il livello di trascrizione dei geni responsabili della sintesi di prolina (P5CS e P5CR) viene fortemente indotto dallo stress salino. Anche la P5CR, che non rappresenta un passaggio limitante nella sintesi dell'osmolita, viene indotta come in *Arabidopsis* (Verbruggen *et al.*, 1993). La somministrazione esogena della sola prolina ha un effetto negativo sull'espressione dei due enzimi, ma nel trattamento con entrambi viene osservata una induzione, confermando un ruolo primario ricoperto dalla prolina nello stress salino non solo come osmolita compatibile, ma anche nell'accumulo di ROS derivante dall'eccessivo catabolismo dell'iminoacido, testimoniato dagli alti livelli di perossido di idrogeno. Una volta riportate le piante in condizioni norm-osmotiche (fase di recupero), si è verificato come atteso un marcato abbassamento nei livelli di prolina. All'origine di tale diminuzione vi è una soppressione della trascrizione della P5CS, mentre in quasi tutti i trattamenti non viene inibita l'espressione della P5CR, i cui livelli di mRNA non sembrano correlati all'accumulo di prolina (Figura 34; Nounjan *et al.*, 2012).



**Figura 34. Effetto di diversi trattamenti sul contenuto di prolina e di perossido di idrogeno in plantule di riso.** I trattamenti, durati 6 giorni [NaCl 100 mM (s), prolina 10 mM (p), trealosio 10 mM (t), NaCl e prolina (ps) e NaCl e trealosio (ts)], sono rappresentati da barre scure, mentre quelle chiare indicano i valori dopo 5 giorni di recovery. In basso è visualizzato l'effetto di questi trattamenti sull'espressione degli enzimi biosintetici della prolina (P5CS e P5CR) nelle foglie di riso, ottenuta mediante sqRT-PCR. Gli istogrammi riportano la quantità relativa di cDNA rispetto al controllo, dopo normalizzazione con il segnale ottenuto dall'actina (Nounjan *et al.*, 2012).

Altri lavori hanno sostenuto che il calo nella concentrazione dell'osmolita compatibile sia da attribuire a un'induzione della PROD $H$  piuttosto che a una diminuzione dell'attività della P5CR, anche perché nella fase di recupero la pianta ha un bisogno impellente di energia, visto che durante lo stress il tasso fotosintetico viene ridotto, ed è stato calcolato che l'ossidazione di una molecola di prolina possa fornire 30 equivalenti di ATP (Trovato *et al.*, 2008). Una conferma in questa direzione è data dall'alta concentrazione di  $H_2O_2$  che viene osservata durante la fase di recupero nei trattamenti con sale e prolina+sale (Nounjan *et al.*, 2012). Una diminuzione dell'attività della P5CR potrebbe comunque non richiedere una variazione del suo livello di trascrizione. Studi condotti in *Arabidopsis* hanno evidenziato

infatti che la sua attività è stimolata direttamente dal sale, e inibita dal NADP<sup>+</sup> (Giberti *et al.*, 2014), abbondanti nel citosol proprio durante lo stress e durante il successivo *recovery*.

### 1.5.5. Ingegnerizzazione del metabolismo della prolina in riso

La complessità delle vie coinvolte nel metabolismo della prolina e le differenze tra una specie e l'altra rendono il quadro d'insieme ancora non del tutto chiaro. Elementi che possono aiutare la sua comprensione sono stati ottenuti dalla caratterizzazione di piante transgeniche in cui uno dei geni coinvolti è stato sovraespresso o silenziato. Vista l'incidenza dello stress salino sulla produttività delle colture e il positivo effetto che su questa può svolgere l'accumulo di prolina, molti tentativi sono stati eseguiti al fine di migliorarne il metabolismo. Alla fine del secolo scorso è stata tentata l'inserzione in riso di una P5CS di *Vigna aconitifolia* L. sotto il controllo di un promotore ABA-dipendente inducibile da stress salino. In condizioni di stress le piante così ottenute mostravano un aumento nella biomassa rispetto a quelle non trasformate (Zhu *et al.*, 1998). Questi risultati promettenti hanno stimolato studi biochimici e molecolari più approfonditi, in cui è stato chiarito che la reazione della P5CS rappresenta il passaggio limitante della via metabolica. L'enzima infatti è soggetto a regolazione da feedback da prodotto, e quello di riso non fa eccezione. Nel 2000 Hong e collaboratori riuscirono a capire quali residui aminoacidici fossero coinvolti in tale regolazione, rimuovendo l'inibizione da prodotto mediante la sostituzione della fenilalanina in posizione 129 con un'alanina nell'enzima di *Vigna aconitifolia*.

In presenza di una P5CS così modificata veniva prodotto il doppio della prolina presente nel *wild-type* e in condizioni di stress salino (200 mM NaCl) tale differenza veniva amplificata, permettendo una migliore crescita della pianta transgenica (Hong *et al.*, 2000). In riso è stato eseguito il medesimo approccio, ottenendo una serie di varietà di tipo *indica* che producevano da 4 a 5 volte il quantitativo di prolina del controllo non trasformato. Questo accumulo permetteva alle cultivar una crescita migliore in condizioni di stress salino, anche perché venivano sviluppati meno ROS e quindi vi era meno perossidazione lipidica (Figura 35) (Kumar *et al.*, 2010).

In questi lavori l'accumulo di prolina nei genotipi ingegnerizzati viene maggiormente indotto in condizioni di stress rispetto ai controlli, esercitando un ruolo di scavenger nei confronti dei ROS generati in risposta al sale e proteggendo i lipidi di membrana, come evidenziato dall'abbassamento del contenuto di malondialdeide. Il fatto che non venga attivato il *ciclo prolina/P5C* (che genera radicali dell'ossigeno) potrebbe indicare la presenza di un meccanismo non ancora identificato alla base della sua regolazione. Nei genotipi transgenici, non essendoci più il meccanismo di inibizione da substrato della P5CS il contenuto di prolina viene mantenuto alto anche in situazioni di controllo. Quando subentra lo stress osmo-salino la pianta lo fronteggia meglio visto il minore potenziale idrico cellulare. Nel *wild-type* i ROS innescano la trascrizione della P5CS e inducono il *ciclo prolina/P5C*. Rimane però da verificare se nelle linee transgeniche l'efficienza fotosintetica venga mantenuta alta anche in presenza di stress salino.

La possibilità di mutagenizzare enzimi in maniera mirata e di esprimere ectopicamente tali proteine nella pianta può dunque permettere di ottenere varietà più capaci di adattamento a situazioni di stress ambientali, con ripercussioni positive sulla resa finale. Questo approccio viene impiegato da quasi vent'anni e sono stati compiuti molti progressi, ma si è ancora ben lontani dal traguardo. La trasformazione con il gene della P5CS ha d'altra parte dimostrato come non si possa prescindere dal lavoro di caratterizzazione biochimico-molecolare degli enzimi, in modo da inserire nelle piante geni che codifichino per delle proteine il più rispondenti possibile agli effetti che si vuole indurre.

### 1.6. Ruolo dei fattori di trascrizione e dei miRNA nella risposta allo stress osmo-salino

In condizioni di stress idrico (indotto sia da siccità che da salinità) la pianta accumula ABA, il quale attiva una serie di geni che costituiscono una prima linea di difesa contro i



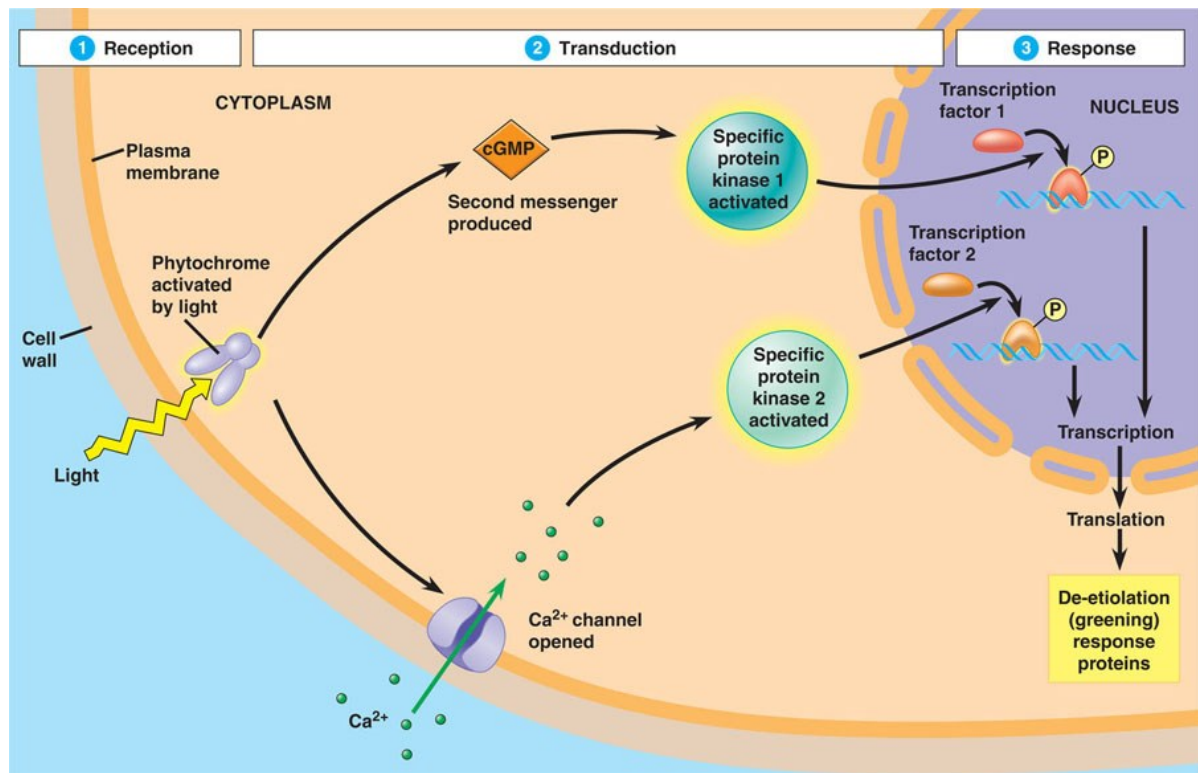
potenziali effetti deleteri. Le medesime condizioni provocano sia a livello cellulare che extra-cellulare anche un aumento della quantità di ROS, soprattutto perossido di idrogeno, ma anche di secondi messaggeri come il calcio (Figura 36). In riso si è osservato un aumento di perossido di idrogeno NADPH ossidasi-dipendente dopo appena qualche minuto dall'inizio dello stress salino (Hong *et al.*, 2009) e spesso la risposta allo stress ossidativo viene attivata prima di quella indotta dall'ABA.

| T <sub>1</sub> lines | Proline content (µg g <sup>-1</sup> dry weight) | Lipid peroxidation (MDA content) (nmol g <sup>-1</sup> fresh weight) |
|----------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| NT                   | 1055 ± 8.9 <sup>a</sup> (100)                   | 32.9 ± 1.2 <sup>f</sup> (100)                                        |
| T <sub>1-1</sub>     | 5075 ± 18.7 <sup>cd</sup> (481)                 | 19.4 ± 1.4 <sup>d</sup> (59)                                         |
| T <sub>1-2</sub>     | 4615 ± 15.6 <sup>c</sup> (437)                  | 20.5 ± 1.1 <sup>e</sup> (62)                                         |
| T <sub>1-3</sub>     | 5205 ± 19.9 <sup>de</sup> (493)                 | 16.4 ± 0.9 <sup>c</sup> (50)                                         |
| T <sub>1-4</sub>     | 5725 ± 21.4 <sup>g</sup> (543)                  | 15.7 ± 1.3 <sup>b</sup> (48)                                         |
| T <sub>1-5</sub>     | 5430 ± 23.7 <sup>f</sup> (515)                  | 16.8 ± 0.8 <sup>c</sup> (50)                                         |



**Figura 35. Piante transgeniche di riso sovra-esprimenti la P5CS.** In alto, contenuto di prolina e di malondialdeide (MDA) in piante transgeniche e non (NT) in condizioni di stress salino (150 mM NaCl per 7 giorni). I valori fra parentesi riportano la percentuale di prolina libera e di MDA rispetto al controllo (100%). In basso, l'effetto fenotipico dello stress salino sui genotipi trasformati e sul controllo (Kumar *et al.*, 2010).

I secondi messaggeri possono attivare proteine da cui ha inizio una cascata di reazioni, fino a indurre specifici fattori di trascrizione (TF) capaci di promuovere la sintesi di enzimi antiossidanti. I TF sono definiti come proteine contenenti sequenze specifiche in grado di legare il DNA, determinando l'attivazione/repressione dell'espressione genica. La regolazione dell'espressione genica controlla molti processi, tra cui il ciclo cellulare, regola il metabolismo e le risposte della pianta all'ambiente esterno. Quindi i TF sono molecole attivabili da stimoli esterni, capaci di interagire con elementi contenuti nel nucleo e di indurre la trascrizione di specifici geni. Essi uniscono il passaggio della cascata del segnale derivante dalla percezione dello stress con la risposta vera e propria che viene attuata dalla pianta. Un altro meccanismo attuato dalle piante in risposta a condizioni ambientali avverse è la regolazione di specifici messaggeri a opera di piccole molecole di RNA (piccolo RNA interferente, siRNA; micro RNA, miRNA), molecole in grado di degradare velocemente e selettivamente alcuni trascritti.



**Figura 36. Visione di insieme della risposta della pianta a stimoli esterni.** Il segnale deve essere percepito (1. fase di ricezione dello stimolo) mediante apposite strutture che lo convertono in segnale chimico. Questo può venire amplificato o può dare origine alla cosiddetta cascata di trasduzione del segnale (2. fase di trasduzione del segnale). Di solito l'ultimo passaggio della trasduzione attiva un fattore di trascrizione (TF), che avvia la sintesi di specifici messaggeri in risposta allo stimolo (3. risposta).

### 1.6.1. Classi dei fattori di trascrizione

Le proteine capaci di regolare l'espressione di specifici geni hanno un ruolo fondamentale nella risposta a condizioni ambientali in evoluzione. Si è calcolato che le piante in media investano il 7% del loro genoma totale in TF (Udvardi *et al.*, 2007). Uno dei *databases* più aggiornati è il Plant Transcription Factor DataBase (PlnTFDB), che include numerose specie vegetali. Esso contiene 28193 proteine con attività di TF, suddivise in 84 famiglie geniche in base ai domini che esse contengono. A queste vanno aggiunte però 1280 ulteriori proteine, definite "orfane" poiché contengono uno o più domini diversi la cui presenza non può essere categorizzata dalle famiglie già definite. Il loro ruolo nella regolazione trascrizionale al momento non è chiaro. Quando nel 2000 è stata resa disponibile l'intera sequenza genomica di *Arabidopsis*, si è potuto attuare un'analisi comparativa dei TF, da cui è emerso che in questa specie circa il 22% dei fattori di trascrizione aveva un dominio coordinato da un atomo di zinco, mentre negli altri organismi tali proteine ricoprivano più della metà del totale dei TF. Le tre famiglie di fattori di trascrizione più numerose in *Arabidopsis* (AP2/EREBP o APETALA2/ethylene responsive element binding protein; MYB-(R1)R2R3; bHLH o basic helix-loop-helix) rappresentano ciascuna il 9% del totale e molte altre famiglie contano un numero di geni paragonabile.

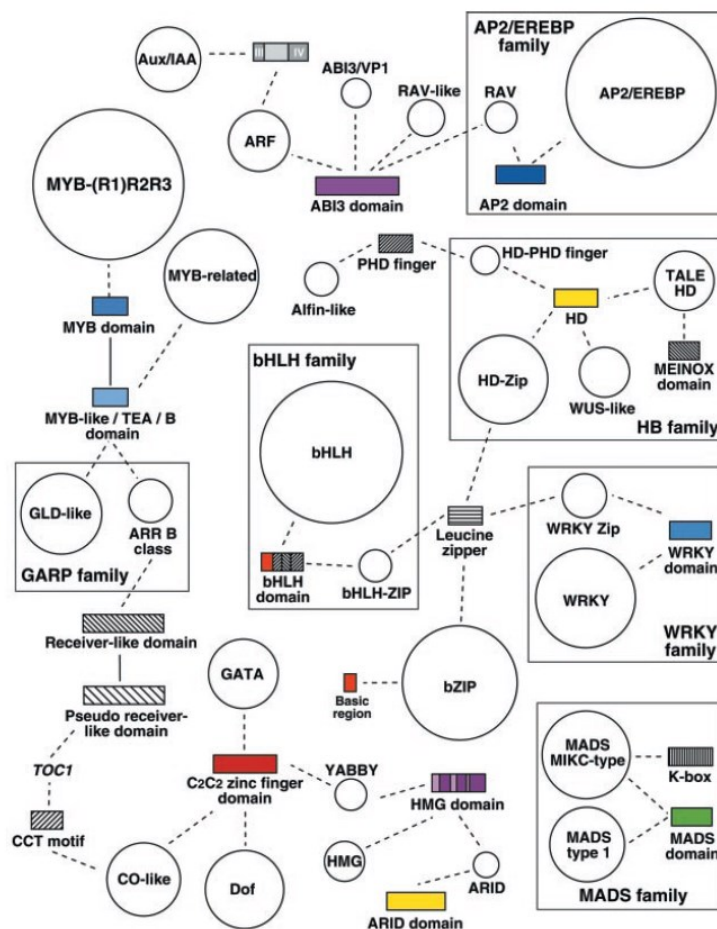
Vi sono inoltre famiglie di fattori di trascrizione che si trovano solo in piante, come AP2/EREBP, NAC, WRKY, trihelix DNA, i fattori di risposta per le auxine (ARFs) e le proteine Aux/IAA. In maniera analoga gli altri eucarioti contengono gruppi di TF che non sono presenti nelle piante (Figura 37) (Riechmann *et al.*, 2000). Quello che permette al TF di esplicare la propria azione è la presenza di un dominio funzionale capace di interagire col DNA o con altre proteine presenti nel nucleo. Durante l'evoluzione sembra che questi domini si siano combinati fra loro, tanto che in organismi più evoluti sono presenti TF più

“complessi”, formati dalla combinazione di domini già esistenti. Questo fenomeno di riarrangiamento sembra aver permesso una maggiore e più efficiente regolazione dei geni coinvolti.

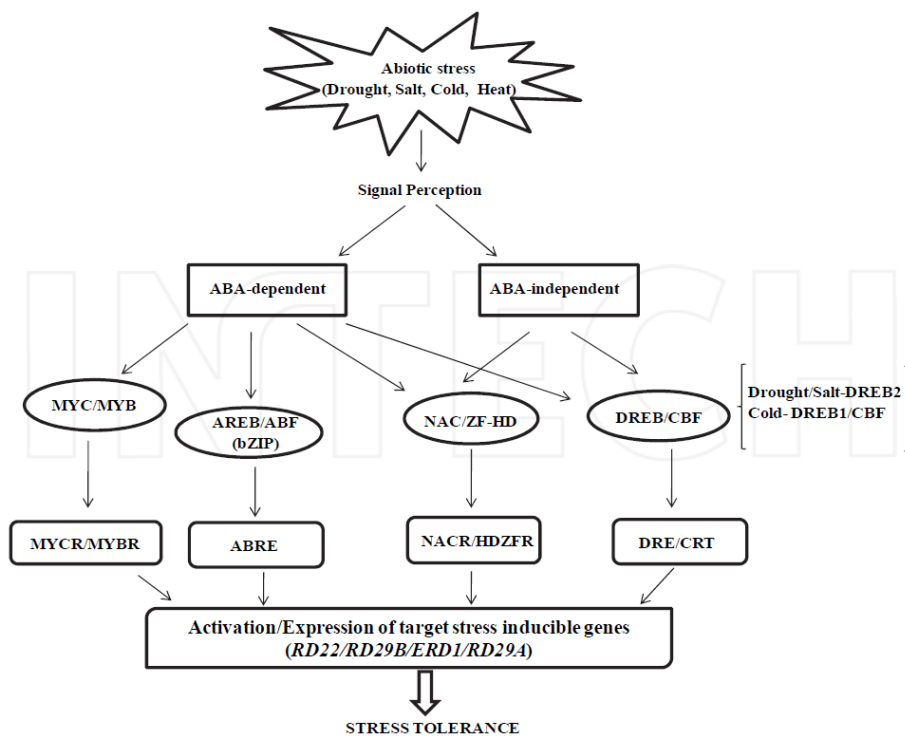
### 1.6.2. Ruolo dei fattori di trascrizione nella risposta allo stress abiotico

Nelle piante sono attivate in risposta allo stress due tipologie di *pathways*, una ABA-dipendente e l'altra ABA-indipendente (Figura 38). I geni indotti dall'ABA vengono attivati da fattori di trascrizione ABRE, la cui importanza è evidente nei genotipi in cui la sintesi dell'ormone viene soppressa. I geni codificanti per i TF MYB e MYC sono diffusi in tutti gli eucarioti e costituiscono la famiglia più numerosa di proteine attivabili dall'ABA. In *Arabidopsis* e in riso ne sono stati trovati rispettivamente 198 e 183 (Yanhui *et al.*, 2006).

Le proteine DREB (*dehydration responsive element binding*) sono invece TF ABA-indipendenti appartenenti alla famiglia AP2/ERF coinvolti nella risposta allo stress abiotico. Essi sono in grado di attivare i geni regolati dalla sequenza DRE (5'-TACCGACAT-3'), posta nel promotore e si suddividono in due categorie: TF che inducono i geni in risposta alla disidratazione o al freddo (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1993). La famiglia NAC e ZF-HD (*zinc finger homo domain*) include infine TF specifici di piante, ed è una delle più numerose: in *Arabidopsis* sono presenti 106 membri e in riso ben 149 (Xiong *et al.*, 2005). La loro azione regola lo sviluppo della pianta, la senescenza, la risposta a stress abiotici e la morte cellulare programmata.



**Figura 37.**  
**Rappresentazione delle diverse famiglie di TF in *Arabidopsis*.** Le famiglie sono rappresentate da cerchi, la cui dimensione è proporzionale al numero dei componenti. I domini caratteristici delle famiglie sono rappresentati con dei rettangoli, la cui grandezza è proporzionale alla lunghezza del dominio, quelli colorati sono capaci di legare direttamente il DNA. Gli altri domini sono generalmente responsabili di interazioni fra proteine. Le linee tratteggiate indicano che il dominio in questione è caratteristico della famiglia (Riechmann *et al.*, 2000).



**Figura 38.**  
**Rappresentazione**  
**dei maggiori TF**  
**coinvolti nello**  
**stress abiotico. I**

TF sono rappresentati dentro le ellissi, mentre gli elementi cis su cui i TF effettuano la loro azione vengono rappresentati da rettangoli. Nel lungo rettangolo in basso sono rappresentati alcuni geni la cui trascrizione è indotta a seguito del processo descritto (Lata *et al.*, 2011).

### 1.6.3. Fattori di trascrizione attivati in condizioni di stress osmo-salino in riso

In riso è stato dimostrato che la risposta allo stress salino coinvolge più di 40 TF, ma si pensa ve ne siano altri ancora da scoprire e caratterizzare. Le famiglie dei fattori di trascrizione interessati sono AP2/EREBP, bZIP, HD, HSF, Zinc Finger, Trihelix, MYB, CCAAT-HAP2 e NAC. Questi ultimi si sono rivelati i più rispondenti allo stress salino. La risposta spesso non è univoca, visto che molti di essi vengono indotti da condizioni ambientali anche molto diverse fra loro: solitamente è il grado di espressione che ne modula l'attività. Infatti alcune proteine DREB ABA-indipendenti (OsDREB1A e OsDREB1F, Liu *et al.*, 2007) appartenenti alla famiglia AP2/EREBP sono indotte sia in condizioni di freddo che di salinità, mentre OsDREB2A, appartenente alla sottofamiglia DREB2 dei TF ABA-dipendenti, è coinvolto nella risposta a siccità e salinità, ma non alle basse temperature (Matsukura *et al.*, 2010). I geni *OsBIERF2* (AP37), *OsBIERF3* (AP59) e *Os-BHD1* sono generalmente indotti da stress biotico, ma *OsBIERF2*(AP37) e *OsBIERF3* (AP59) vengono indotti in bassa misura anche dallo stress salino, e la loro sovra-espressione aumenta la tolleranza a questa tipologia di stress (Negrão *et al.*, 2011).

Tre geni codificanti proteine contenenti un dominio a *zinc finger* sono coinvolti nella risposta all'alta salinità: *ZFP179* e *ZFP182* vengono sovra-espressi, mentre *SRZ1* viene represso. Tali meccanismi sono ABA-dipendenti e suggeriscono una loro probabile funzione come regolatori positivi/negativi nella risposta al trattamento salino. Piante di tabacco in cui l'espressione di *SRZ1* veniva indotta erano maggiormente sensibili allo stress salino, poiché non venivano trascritti geni coinvolti nella risposta al sale (Sun *et al.*, 2010).

Fra gli elementi bZIPs vi sono quattro geni associabili allo stress salino, tutti attivabili dall'ABA: *OsABF1*, *OsABI5*, *OsbZIP23* e *OSBZ8*. In particolare *OsABI5* e *OsbZIP23* sono indotti dall'alta salinità, ma solo la sovra-espressione dell'ultimo porta a tolleranza, mentre alti livelli di *OsABI5* determinano una maggiore suscettibilità della pianta. Per contro la repressione di *OsABI5* aumenta la resistenza delle piante al sale, ma ne riduce la fertilità, (Zou *et al.*, 2008).

Di recente si è osservato che l'attivazione di alcuni TF avveniva mediante un meccanismo MAPK-dipendente, in cui le proteine con attività chinasi venivano attivate da alti livelli di perossido di idrogeno. Per questo sono stati condotti numerosi studi sulle MAPK

e la regolazione a monte dei TF. In *Arabidopsis*, ad esempio, vi sono varie MAPK coinvolte nella tolleranza allo stress salino: MEKK1-MKK2-MPK4/MPK6. Infatti il mutante *mkk2* è risultato molto sensibile al sale (Teige *et al.*, 2004). Il bersaglio della MPK6 è un fattore di trascrizione che stimola la sintesi dell'antiporto SOS1 (Yu *et al.*, 2010). In riso è stato poi caratterizzato un fattore di trascrizione denominato SALT-RESPONSIVE ERF1 (SERF1), attivato da una MAPK5 e sensibile al perossido di idrogeno. Mediante approcci di silenziamento e sovra-espressione genica ne è stato dimostrato il ruolo di regolatore positivo della risposta allo stress salino (Schmidt *et al.*, 2013).

#### **1.6.3.1. I TF della famiglia NAC di riso e lo stress salino**

La famiglia NAC di TF è una delle più numerose in riso, contando circa 150 proteine ed essendo coinvolta nei processi di sviluppo e di risposta allo stress. Questa famiglia viene suddivisa filogenicamente in cinque gruppi (I-V), di cui i TF inseriti nel terzo gruppo (geni NAC indotti da stress, SNAC) svolgono un ruolo fondamentale durante lo stress salino. Infatti in un lavoro recente è stato osservato il coinvolgimento di 40 geni OsNAC in seguito all'esposizione al sale (Fang *et al.*, 2008).

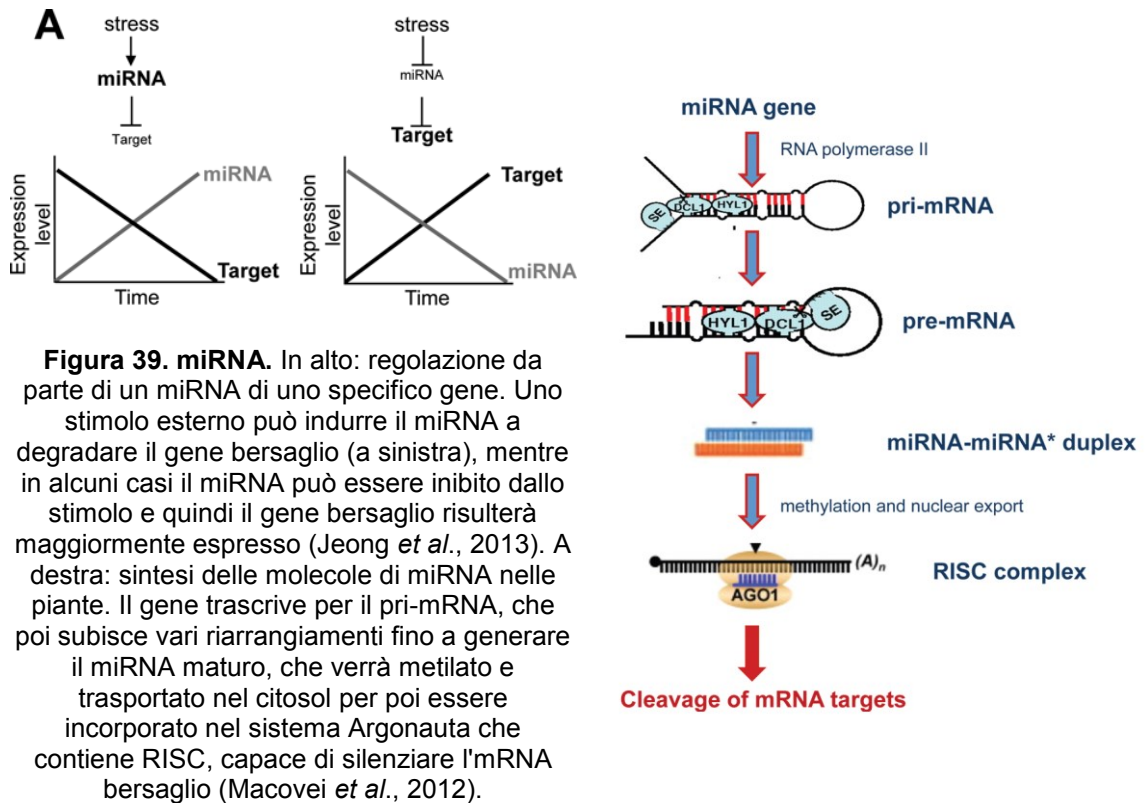
Di norma tali geni vengono indotti non solo dalla salinità, ma anche dall'ABA e da altri tipi di stress come freddo, siccità e calore. Osservazioni condotte in pianta dimostrano che la loro espressione avviene a bassi livelli in condizioni di controllo, ed è fortemente indotta durante lo stress. Sono stati condotti numerosi studi in cui un gene NAC di riso veniva sovra-espresso, e in tutti i casi ciò correlava con un'aumentata tolleranza alla salinità e alla siccità (Nakashima *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2010). Tali evidenze portano a pensare che questi geni siano dei regolatori positivi nella risposta allo stress iperosmotico. Piante sovra-esprimenti *SNAC1* attuano una risposta all'ABA più veloce, chiudendo un maggior numero di stomi e limitando nel tempo la perdita d'acqua (Hu *et al.*, 2006). Al contrario il gene *SNAC2* (*NAC6* o *NAC48*) viene indotto in seguito a stress biotici e correla con fenotipi tolleranti agli attacchi patogeni (Nakashima *et al.*, 2007).

Fra i TF NAC vi è infine un sottoinsieme, detto NTL, di TF associati alla membrana. Il loro meccanismo di azione prevede che il fattore di trascrizione inattivo sia ancorato alla membrana. In seguito a stimolazione, che avviene mediante un taglio proteolitico, il TF viene attivato ed entra nel nucleo, dove svolge il suo ruolo di regolatore. Questo meccanismo conferisce una maggiore velocità di risposta agli stimoli esterni, poiché il TF non necessita di essere trascritto, ma solo attivato. La salinità e il mannitolo attivano la trascrizione di numerosi NTL, come OsNTL2, OsNTL3, OsNTL4, OsNTL5, e OsNTL6. Anche se altri stress come il freddo e il caldo sono capaci di stimolare l'attività dei NTL, sembra che questa tipologia di TF sia particolarmente utilizzata nelle piante in risposta al sale e alla siccità (Kim *et al.*, 2010).

Nonostante i numerosi lavori e gli sforzi finora compiuti, le conoscenze riguardo alla regolazione dei TF a livello trascrizionale, post-trascrizionale ed epigenetico sono comunque ancora frammentarie, così come l'identificazione dei geni bersaglio.

#### **1.6.4. Meccanismo d'azione dei miRNA**

I miRNA sono piccoli RNA non codificanti che si trovano sia negli animali che nelle piante. Sono stati scoperti nel 1993 in *C. elegans* e giocano un ruolo fondamentale nella regolazione post-trascrizionale dei messaggeri. Vengono trascritti dalla RNA polimerasi II; l'RNA così ottenuto si ripiega su sé stesso dando luogo al pre-miRNA, con una caratteristica struttura a forcina. Successivamente vengono eseguiti due tagli sequenziali a opera di RNasi per ottenere il miRNA maturo. Nelle piante entrambi i tagli sono a carico dell'enzima DICER-LIKE1 (DCL1), mentre negli animali il primo avviene grazie a Drosha e il secondo è mediato da Dicer; in entrambi i casi si genera il duplex miRNA/miRNA (antisense).

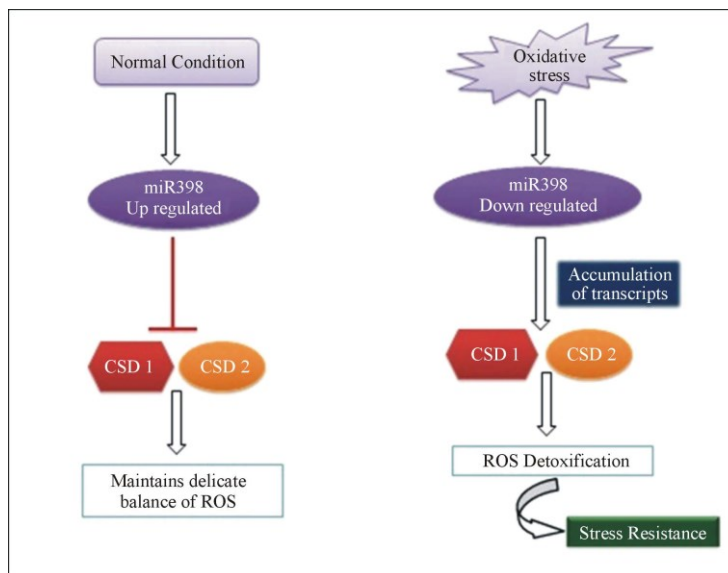


Nelle piante, a differenza degli animali, entrambi i tagli avvengono nel nucleo. Una volta maturo il miRNA viene trasportato nel citosol da HASTY e incorporato nel complesso RISC (*RNA-induced silencing complex*). Quando un mRNA con alta omologia viene riconosciuto dal miRNA, dopo l'appaiamento RISC effettuerà il taglio del messaggero bersaglio, non permettendo la sintesi della corrispondente proteina (Figura 39). Tra monocotiledoni e dicotiledoni i miRNA sono molto conservati, elemento che suggerisce che l'evoluzione di queste molecole sia un evento molto precoce dell'evoluzione degli eucarioti (Macovei *et al.*, 2012).

### 1.6.5. Il ruolo dei miRNA in risposta allo stress

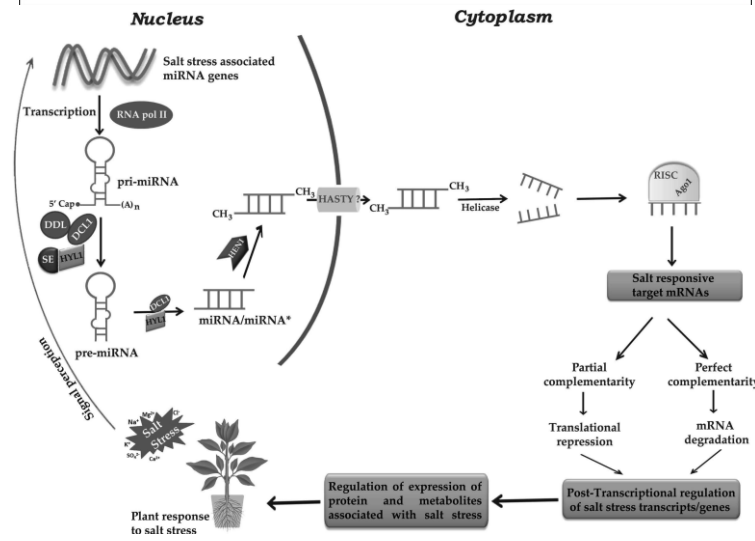
I miRNA sono dotati di funzioni molto versatili e la possibilità di poterli esprimere ectopicamente o silenziarli completamente ha avvantaggiato il lavoro di identificazione della loro azione. Tali molecole sono coinvolte nello sviluppo, mentre ancora poco si sa sul loro ruolo durante lo stress. Uno studio condotto in *Arabidopsis* ha evidenziato che un quarto delle EST contenenti miRNA vengono indotte da condizioni di stress, suggerendone un ruolo importante in risposta a fattori ambientali (Zhang *et al.*, 2005). La modulazione della espressione genica che risulta dall'azione dei miRNA è molto efficiente. Per contro l'impiego dei miRNA per reprimere gli mRNA sintetizzati in risposta allo stress, una volta terminata la minaccia, conferisce notevoli vantaggi rispetto a una regolazione eseguita con i soli fattori di trascrizione (Figura 40). Gli esperimenti condotti sui mutanti di alcune famiglie di miRNA hanno dimostrato un'ipersensibilità allo stress osmotico e all'ABA (Jeong *et al.*, 2013).

Anche la modifica dei bersagli dei miRNA e la verifica dei cambiamenti indotti nel genotipo mutato rispetto al *wild-type* hanno evidenziato un ruolo di prim'ordine dei miRNA in risposta agli stress abiotici (Tabella 4; Bej *et al.*, 2014).



**Figura 40. Ruolo dei miRNA in risposta allo stress.** In alto, esempio di un particolare miRNA (miR398) che in condizioni di controllo è up-regolato e non influisce sul metabolismo dei ROS, mentre quando la pianta entra in stress ossidativo viene inibito: si accumulano i trascritti che normalmente verrebbero degradati (soprattutto SOD) e i ROS vengono detossificati (Bej *et al.*, 2014).

In basso invece viene riportato un modello di regolazione post trascrizionale regolata da miRNA in risposta allo stress salino. In questo caso il ruolo del miRNA può essere quello di silenziare totalmente (in caso di perfetta complementarità miRNA-mRNA) o parzialmente (mediante una non perfetta complementarità) il trascritto (Mangrauthia *et al.*, 2013).



|                 |                                                                                                        |   |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
|                 | miR169g, miR169n, miR169o, miR393                                                                      | ↑ |
| Salinity stress | miR156, miR158, miR159, miR165, miR167, miR168, miR169, miR171, miR319, miR393, miR394, miR396, miR397 | ↑ |
|                 | miR398                                                                                                 | ↓ |

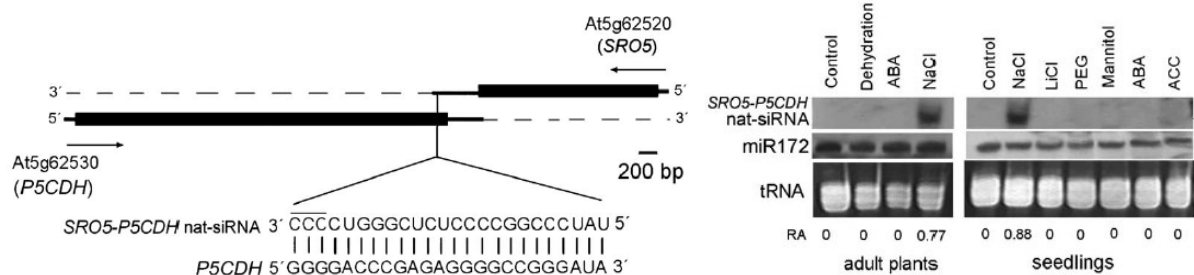
**Tabella 4. Elenco dei miRNA coinvolti nella risposta allo stress salino in Arabidopsis.** Non sempre lo stimolo ambientale determina una sovraespressione del miRNA, a volte anzi ne abbassa l'espressione (freccia in giù) (Bej *et al.*, 2014).

### 1.6.6. Altre classi di piccoli RNA (sRNA) coinvolti nella risposta allo stress salino

Nelle piante, oltre ai miRNA, vi sono altre tipologie di RNA che regolano l'espressione di geni bersaglio, come gli siRNA. Essi derivano da regioni del DNA ricche in eterocromatina o direttamente dai messaggeri, e il loro ruolo è quello di silenziare determinati trascritti a loro complementari. Il precursore dei siRNA è a doppio filamento e può essere generato da diversi tipi di RNA polimerasi: una volta trascritto, lo siRNA viene processato da enzimi

DICER-LIKE per ottenere uno siRNA maturo (Kruszka *et al.*, 2012).

In *Arabidopsis* è stato caratterizzato uno siRNA capace di influenzare direttamente il metabolismo della prolina, denominato SRO5-P5CDH nat-siRNA. Tale siRNA contiene 24 nucleotidi e viene originato dall'appaiamento di due trascritti complementari: quello della P5CDH e quello della SRO5 (*Similar to RCD One*), che nel genoma di *Arabidopsis* hanno una porzione sovrapposta (Figura 41). Quando la pianta cresce in presenza di un'alta concentrazione di sale, il gene *SRO5* viene indotto, mentre quello della *P5CDH* viene espresso costitutivamente. L'appaiamento della zona complementare dei due trascritti genera il doppio filamento di siRNA. L'inizio della degradazione del trascritto della *P5CDH* attiva l'enzima DICER-LIKE1 che produce un più specifico siRNA (*P5CDH nat-siRNAs*), lungo 21 nucleotidi, capace di eliminare tutti i messaggeri per la *P5CDH*, silenziandone l'espressione. Questa regolazione di un enzima responsabile del catabolismo della prolina potrebbe avere come effetto diretto un accumulo dell'imminoacido. Fra gli effetti indiretti vi è invece l'accumulo di ROS, dovuti all'attivazione del *ciclo prolina/P5C*, che a sua volta induce l'espressione della proteina SRO5, la cui funzione putativa è quella di detossificazione dei ROS (Borsani *et al.*, 2005).

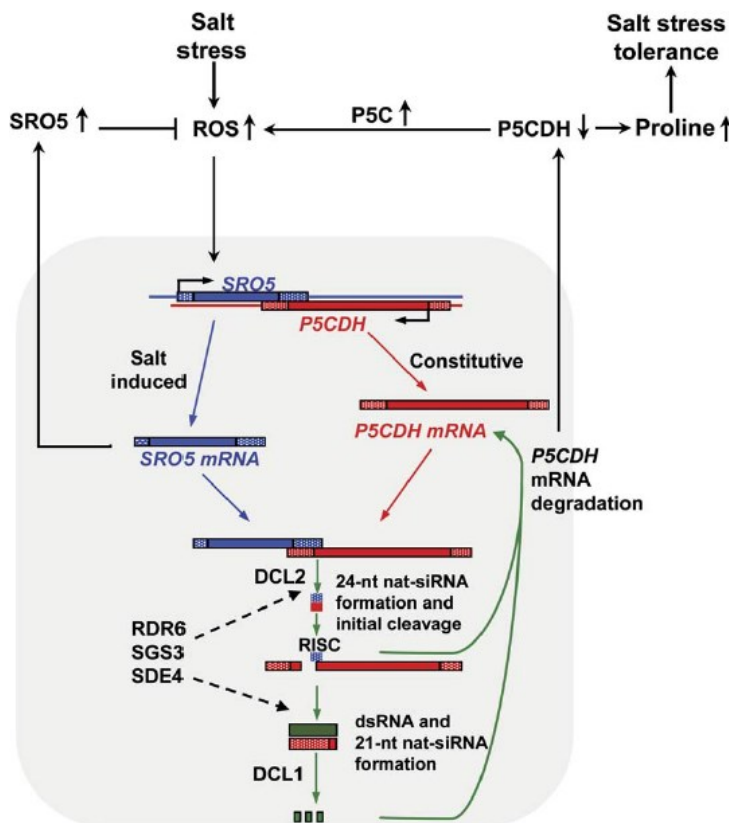


**Figura 41. Controllo della espressione della P5CDH da parte di siRNA in *Arabidopsis*.**

In alto a sinistra, struttura genomica di *SRO5* e *P5CDH*: le frecce indicano la direzione della trascrizione. La sequenza di *SRO5-P5CDH nat-siRNA* è allineata con l'mRNA della *P5CDH*.

A destra: l'accumulo di *SRO5-P5CDH nat-siRNA* indotto in maniera specifica dallo stress salino.

Di fianco viene proposto un modello d'azione in cui i ROS indotti dal sale aumentano la trascrizione di *SRO5*. Questo porta a una degradazione dei trascritti della *P5CDH* mediata da diversi siRNA prodotti da varie tipologie di enzimi DICER-LIKE. L'aumento di prolina conferisce alla pianta tolleranza al sale, ma allo stesso tempo attiva la produzione di ROS (*ciclo prolina/P5C*), che a loro volta inducono l'espressione di *SRO5*, che detossifica tali molecole (Borsani *et al.*, 2005).





Questo sistema viene contestualmente regolato dallo stress salino e ossidativo e permette alla pianta una rapida risposta: da un lato consente una diminuzione del potenziale idrico citosolico mediante l'accumulo di prolina, dall'altro continua a produrre i ROS che a loro volta continuano a fornire il segnale di attivazione al gene SRO5. Il tutto viene mediato da siRNA, senza alcun bisogno di fattori di trascrizione o trasduzione del segnale. Tale risposta in Arabidopsis non viene attivata nè dalla siccità nè dal PEG.

### 1.7. I sistemi antiossidanti

Lo stress osmo-salino ha vari effetti secondari sulla pianta che possono essere anche più gravi di quelli derivanti della somma delle sue componenti osmotica e ionica. Il più diffuso è senza dubbio lo stress ossidativo derivante dalla formazione dei ROS, risultante da anomalie nel processo di trasporto degli elettroni nei cloroplasti e nei mitocondri e dalla fotorespirazione. È stato infatti dimostrato come la reazione ossigenasica della Rubisco venga stimolata in condizioni di stress salino. Per prevenire i danni causati dai ROS, le piante hanno evoluto una serie di meccanismi sia enzimatici che non enzimatici. Fra gli enzimi coinvolti troviamo superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT), perossidasi (POX), monodeidroascorbato reductasi (MDHAR), deidro-ascorbato reductasi (DHAR) e glutatione reductasi (GR), mentre fra le molecole ad attività antiossidante vanno ricordate le forme idrosolubili e ridotte dell'ascorbato (ASA) e del glutatione (GSH), i carotenoidi e i tocoferoli (Tabella 5).

| Meccanismo                               | Localizzazione               | ROS                                                                                       | Tabella 5.<br>Sistemi antiossidanti nelle piante.                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Produzione</b>                        |                              |                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Fotosintesi (e <sup>-</sup> + Psi oPSII) | Chl                          | O <sub>2</sub> <sup>-</sup>                                                               | Apo, apoplasto; Chl, cloroplasto; CW, parete cellulare; Cyt, citosol; ET, trasporto di elettroni; Mit, mitocondri; O <sub>2</sub> <sup>1</sup> , singoletto dell'ossigeno; Per, perossisomi; PM, membrana citoplasmatica; PS, er ossidasi; ROS, specie er ossidasi dell'ossigeno; Vac, vacuolo. (riadattata da Mittler, 2002). |
| Respirazione                             | ET Mit                       | O <sub>2</sub> <sup>-</sup>                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Glicolato ossidasi                       | Per                          | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Clorofille eccitate                      | Chl                          | O <sub>2</sub> <sup>1</sup>                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| NADPH ossidasi                           | PM                           | O <sub>2</sub> <sup>-</sup>                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| β-ossidazione acidi grassi               | Per                          | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Ossalato ossidasi                        | Apo                          | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Xantina ossidasi                         | Per                          | O <sub>2</sub> <sup>-</sup>                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Perossidasi                              | CW                           | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> <sup>-</sup>                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Ammina ossidasi                          | Apo                          | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Scavenging</b>                        |                              |                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Superossido dismutasi                    | Chl, Cyt, Mit, Per, Apo      | O <sub>2</sub> <sup>-</sup>                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Ascorbato perossidasi                    | Chl, Cyt, Mit, Per, Apo      | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Catalasi                                 | Per                          | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Glutatione perossidasi                   | Cyt,                         | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , ROOH                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Perossidasi                              | CW, Cyt, Vac                 | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Tioredoxina perossidasi                  | Chl, Cyt, Mit                | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Acido ascorbico                          | Chl, Cyt, Mit, Per, Apo      | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> <sup>-</sup>                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Glutatione                               | Chl, Cyt, Mit, Per, Apo      | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| α-tocoferolo                             | ROOH,                        | O <sub>2</sub> <sup>1</sup>                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Carotenoidi                              | Chl                          | O <sub>2</sub> <sup>1</sup>                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Annullamento degli effetti</b>        |                              |                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Adattamenti anatomici                    | Struttura foglia, epidermide | O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> <sup>1</sup> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| metabolismo C4 o CAM                     | Chl, Cyt, Vac                | O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| movimento Chl                            | Cyt                          | O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> <sup>1</sup> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Soppressione fotosintesi                 | Chl                          | O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Modulazione PS e antenne                 | Chl                          | O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , O <sub>2</sub> <sup>1</sup>                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Ossidasi alternative                     | Chl, Mit                     | O <sub>2</sub> <sup>-</sup>                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

### 1.7.1. Meccanismo di formazione dei ROS durante lo stress salino e loro tossicità

La formazione di basse concentrazioni dei ROS è un processo che avviene normalmente durante la crescita della pianta. In precedenza è stato ricordato il loro coinvolgimento come secondo messaggero in condizioni di stress, capace di attivare risposte specifiche. Un loro alto livello può però essere responsabile di danni cellulari, o indurre il meccanismo della morte cellulare programmata (PCD).

I ROS sono radicali liberi costituiti da uno o un gruppo di atomi che hanno almeno un elettrone disaccoppiato. Tale conformazione è molto instabile, l'orbitale contenente un solo elettrone infatti tende ad attrarne un altro, spingendo il radicale a reagire con altre molecole formando altri radicali. I ROS vengono prodotti in seguito a vari meccanismi: nella respirazione cellulare alcuni elettroni possono deviare dal principale sistema di trasporto e interagire direttamente con l'ossigeno molecolare ( $O_2$ ) per dare anione superossido ( $O_2^{\cdot-}$ ). La dismutazione di due anioni superossido, sia per via enzimatica che non enzimatica, produce perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ). L'acqua ossigenata è prodotta anche da altre reazioni come la  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi nel gliossisoma e la ossidazione del gliossilato nei perossisomi. Il perossido di idrogeno è molto dannoso per le piante poiché è un forte inibitore del ciclo di Calvin: in condizioni di stress la sua concentrazione plastidiale arriva a 15  $\mu M$ , mentre in condizioni normali è di 0,5  $\mu M$ . È stato dimostrato che una concentrazione di 10  $\mu M$  nel cloroplasto inibisce del 50% il processo fotosintetico. Un discorso analogo può essere fatto per l'anione superossido: in condizioni normali il suo livello si attesta a 240  $\mu M$ , mentre in condizioni avverse arriva a concentrazioni pari a 720  $\mu M$  (Vaidyanathan, 2003).

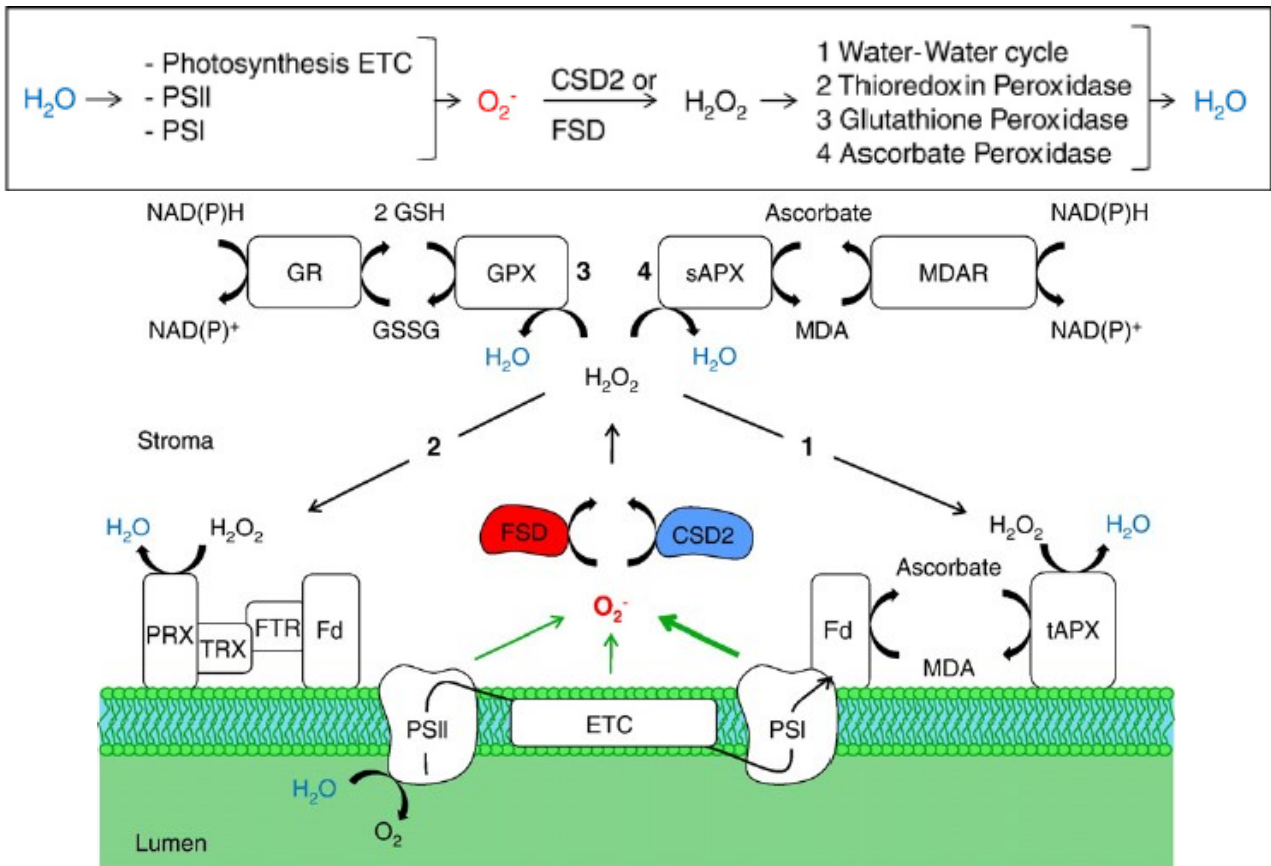
Lo stress idrico determina stress ossidativo in conseguenza della chiusura degli stomi: questa provoca infatti un abbassamento del livello di  $CO_2$  nella foglia, che a sua volta determina un sovraccarico della catena del trasporto di elettroni, che reagendo con l'ossigeno provoca la formazione di ROS (Figura 42). L'effetto tossico dei ROS è causato dalla loro spiccata reattività, che conduce a reazioni di perossidazione di proteine, lipidi e acidi nucleici, danneggiandoli irreparabilmente. L'anione superossido non è in grado di reagire direttamente con le macromolecole cellulari, ma la sua forma protonata (il radicale ossidrilico  $HO^{\cdot}$ ) può provocare perossidazione lipidica; inoltre è in grado di accelerare la produzione del perossido di idrogeno e del radicale idrossile. Il perossido di idrogeno esercita la sua azione negativa sul ciclo di Calvin: enzimi chiave come la fruttosio-1,6-difosfato fosfatasi vengono inattivati mediante la modifica dello stato di ossidazione degli atomi di zolfo. L'acqua ossigenata in presenza di enzimi dotati di atomi di Fe con attività catalitica ( $Fe^{3+}$  o  $Fe^{2+}$ ), può formare il radicale idrossile, ed è anche in grado di inattivare l'enzima detossificante Cu/Zn SOD, modificando il sito del rame. Il radicale idrossile può venire prodotto dalle reazioni che coinvolgono l'anione superossido e il perossido di idrogeno. Perché nelle piante non vi sono degli enzimi detossificanti specifici, esso può danneggiare le macromolecole cellulari.

### 1.7.2. Le difese delle piante contro i ROS

Considerata la loro natura di sostanze altamente reattive e capaci di inattivare la funzionalità di importanti macromolecole, le cellule vegetali hanno evoluto una serie di strategie atte alla detossificazione dei ROS.

#### 1.7.2.1. Le superossido dismutasi

Le superossido dismutasi (SOD, EC 1.15.1.1) sono enzimi che si trovano in tutte le cellule vegetali, con una localizzazione subcellulare che coinvolge il cloroplasto, il mitocondrio, il perossisoma e il citosol (Figura 43). La reazione catalizzata da questi enzimi è la dismutazione di due anioni superossido ( $O_2^{\cdot-}$ ) in ossigeno molecolare e perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ).

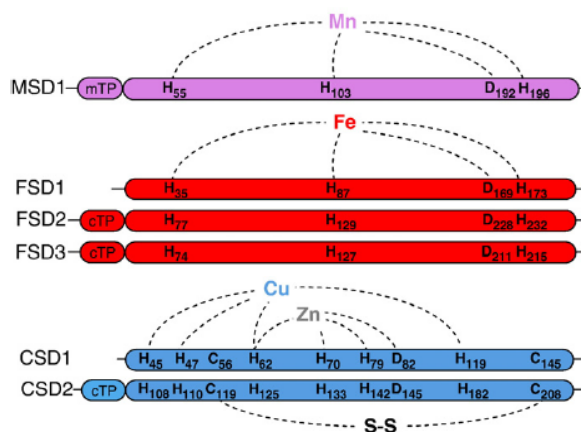
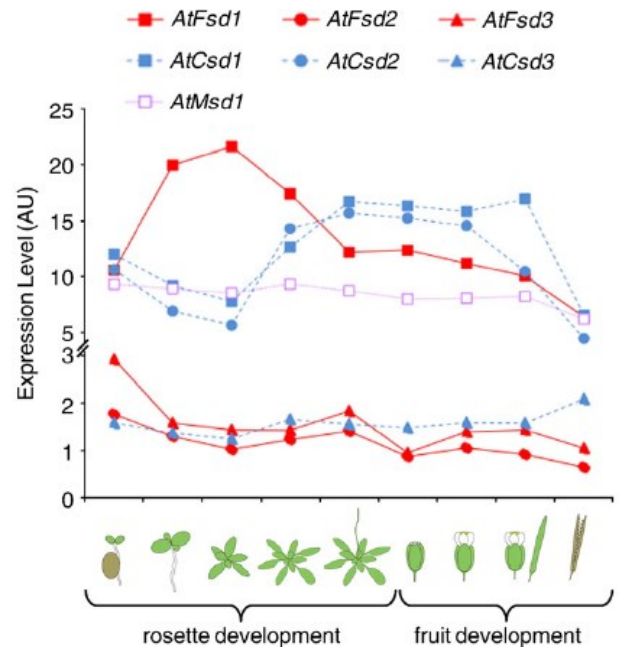
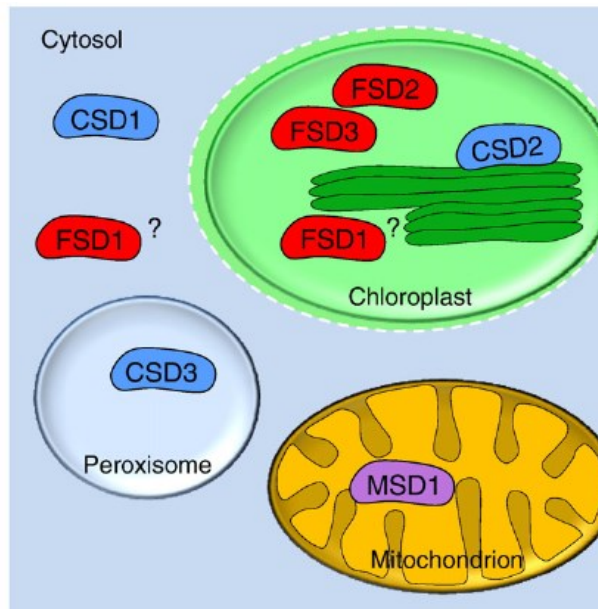


**Figura 42. Detossificazione dell'anione superossido nello stroma del cloroplasto (ciclo dell'acqua-acqua).** Le SOD producono perossido di idrogeno che può venire neutralizzato mediante quattro possibili reazioni enzimatiche. Nel cloroplasto è invece assente la CAT. sAPX, ascorbato perossidasi dello stroma; tAPX, ascorbato perossidasi associata ai tilacoidi; ETC, catena di trasporto degli elettroni; Fd, ferredossina; FTR, Fd-Trx-reduttasi; GPX, glutazione perossidasi; GR, glutazione reduttasi; GSH, glutazione ridotto; GSSG, glutazione ossidato; MDA, monodeidroascorbato; MDAR, MDA reduttasi; PRX, perossiredossina; PSI, fotosistema I; PSII, fotosistema II; TRX, tioredossina (Pilon *et al.*, 2011).

Le SOD sono metallo-proteine mimeriche e in base al metallo contenuto nel loro sito attivo possono essere suddivise in contenenti rame e zinco (Cu/ZnSOD), manganese (MnSOD), ferro (FeSOD) e nichel (NiSOD). Queste ultime sono state osservate solo in specie del genere *Streptomyces* (Feng *et al.*, 2006).

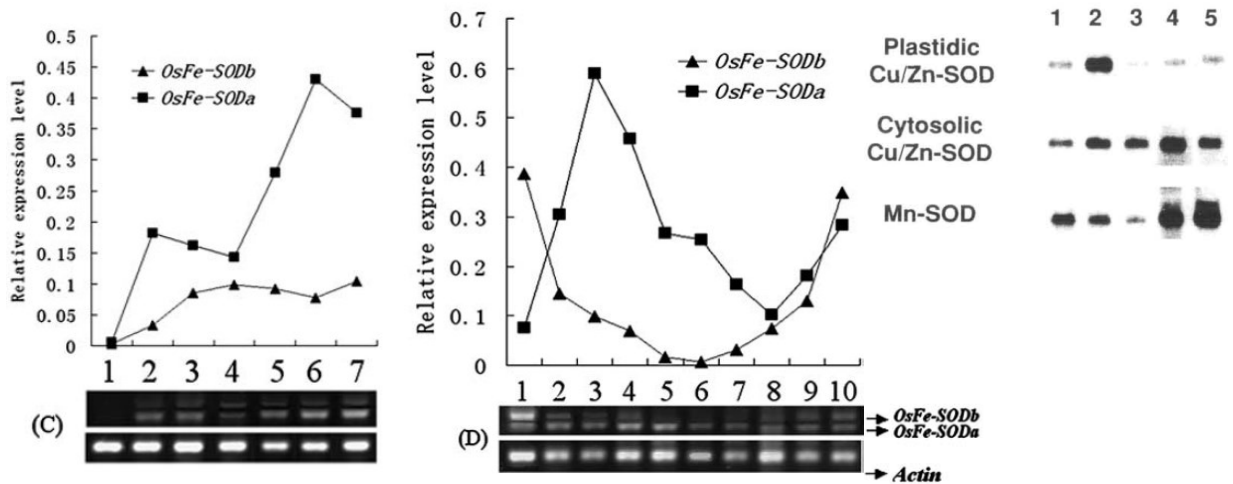
In riso sono state identificate diverse OsCu/ZnSOD: un'isoforma plastidiale (OsCu/ZnSODI) espressa in foglie fotosinteticamente attive (Kaminaka *et al.*, 1997) e tre citosoliche (OsCu/ZnSOD II, III, IV), espresse nei tessuti eziolati e capaci di rispondere in maniera differenziale alla somministrazione esogena di ABA e ditiotreitolo (DTT) (Sakamoto *et al.*, 1995). Inoltre il riso ha due isoforme della MnSOD (I, II) espresse nei mitocondri (Sakamoto *et al.*, 1993), e una OsFeSOD (Kaminaka *et al.*, 1999), caratterizzata da una bassissima attività. Lavori eseguiti con lo scopo di determinare gli induttori dell'espressione genica hanno però evidenziato la presenza di due isoforme tessuto e cultivar aspecifiche, denominate OsFeSODa e OsFeSODb. Sia OsFeSODa che OsFeSODb vengono espresse nelle foglie, nei tessuti riproduttivi e nei semi, con un picco nei tessuti meristemati. La quantità di trascritto dell'OsFeSODa è particolarmente elevata nei pannicoli durante la fioritura, mentre OsFeSODb viene espressa preferenzialmente nelle giovani foglie. Piante eziolate di riso non producono OsFeSOD, ma quando vengono esposte alla luce si attiva l'espressione di entrambe le isoforme, con un picco a 36 h dall'inizio del trattamento e una quantità di trascritto di OsFeSODa maggiore di tre volte rispetto a quello di OsFeSODb. Un trattamento a 4°C induce l'espressione di OsFeSODa già dopo un'ora, con picco a 2 h di

esposizione, ma nel giro di 24 h ritorna a livelli basali; il medesimo trattamento comporta una drastica diminuzione nella quantità di trascritto dell'isoforma OsFeSODb, la cui espressione è quasi azzerata a 12 h dall'inizio del trattamento. Se la temperatura viene riportata ai livelli iniziali, la quantità di messaggero corrispondente a OsFeSODb aumenta, per poi tornare ai livelli di controllo in 12 h, mentre quella di OsFeSODa rimane più alta rispetto all'inizio del trattamento (Figura 44) (Feng *et al.*, 2006).

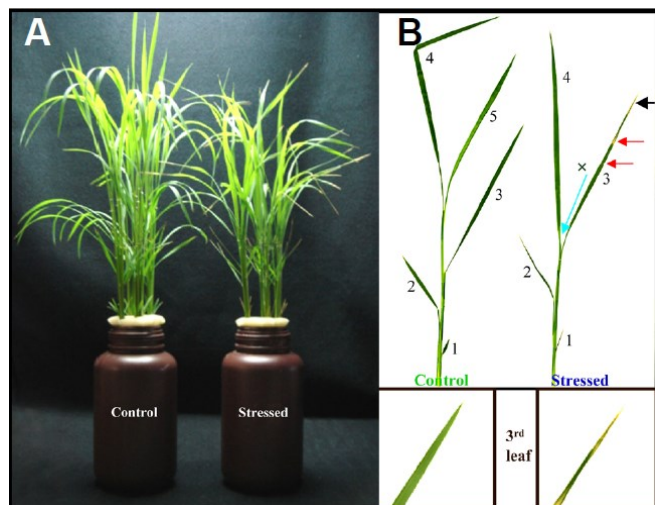
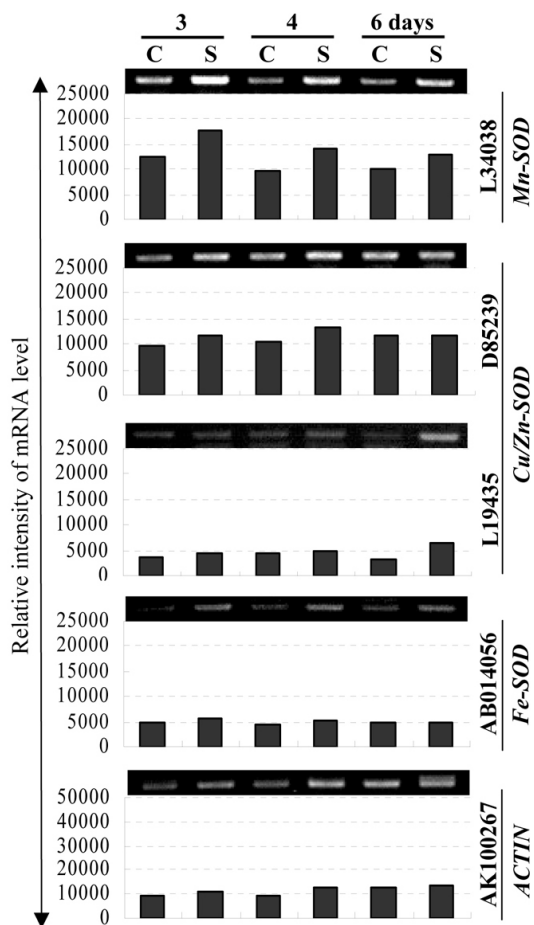


**Figura 43. Le diverse forme di SOD in Arabidopsis.** In alto a sinistra: localizzazione subcellulare delle diverse SOD. In alto a destra: espressione dei diversi geni in relazione allo sviluppo. A fianco una schematizzazione della struttura primaria delle SOD con evidenziati i peptidi di transito (cloroplastico cTP; mitocondriale mTP), i residui di istidina (H) e di acido aspartico (D) coinvolti nel legame con il metallo, le cisteine specifiche per il ponte disolfuro all'interno della Cu/ZnSOD (Pilon *et al.*, 2011).

Come riportato in Figura 42, le SOD sono i primi enzimi coinvolti nella risposta antiossidante, detossificando il singolo dell'ossigeno. Vi sono numerosi lavori in cui è stata misurata l'attività delle SOD in piante di riso sottoposte a stress salino. Quello che si osserva è in genere un aumento dell'attività totale delle diverse isoforme. Questa informazione fornisce solo un'indicazione generale, perché non permette di identificare quali dei numerosi isoenzimi venga maggiormente coinvolto. Sono infatti pochissimi i lavori che discriminano il contributo delle varie forme di SOD nel detossificare i ROS. Un esempio recente è uno studio che analizza l'espressione dei diversi isoenzimi in relazione allo stress salino nella varietà *japonica* di riso Nipponbare, la stessa che è stata utilizzata per il sequenziamento del genoma. Quello che emerge è che la SOD maggiormente espressa a tempi sia brevi che lunghi durante lo stress salino è quella manganese-dipendente, seguita dalle due isoforme rame-zinco (D85239, plastidiale, e L19435, citosolica) la cui espressione non è così pronunciata soprattutto a breve termine, mentre la FeSOD non viene praticamente indotta (Figura 45). Nello stesso lavoro sono stati misurati i livelli di attività anche per enzimi come la APX, la GR e la CAT, confermando l'attivazione dei sistemi antiossidanti di riso in risposta allo stress salino (Kim *et al.*, 2007).



**Figura 44. Livello di espressione dei messaggeri corrispondenti alle due isoforme di OsFeSOD in piante di riso.** Piante eziolate poi esposte alla luce (C: 1= pianta eziolata; 2= 1h di luce; 3= 3 h; 4= 9 h; 5= 24 h; 6= 36 h; 7= 72 h) e in seguito a esposizione a 4°C per poi tornare a temperature di controllo (D: 1= 28°C; 2= 4°C\*1 h; 3= 4°C\*2 h; 4= 4°C\*3h; 5= 4°C\*6 h; 6= 4°C\*12 h; 7= 4°C\*24 h; 8= 28°C\*6 h; 9= 28°C\*9h; 10= 28°C\*12 h) (Feng *et al.*, 2006). A sinistra: concentrazione dei trascritti delle diverse forme di SOD (Cu/Zn plastidiale e citosolica e Mn) nei tessuti di riso. 1. Foglie eziolate di plantule; 2. Foglie verdi; 3. Gambo; 4. Radici; 5. Calli (Kaminaka *et al.*, 1997).



**Figura 45. Espressione delle isoforme SOD in plantule di riso cresciute in condizioni di stress salino.** Nel pannello a destra (B) sono schematizzati i danni morfologici causati dallo stress salino (130 mM NaCl per 6 giorni). Sulla terza foglia sono state condotte le analisi per valutare l'espressione delle diverse isoforme delle SOD (di fianco a sinistra) mediante l'impiego di RT-PCR. I vari isoenzimi sono messi in ordine dal più indotto (in alto) a quello meno stimolato (Kim *et al.*, 2007).

Il fatto che vengano indotte le SOD sia a manganese che a rame-zinco, citosoliche e plastidiali, indica che a tempi brevi lo stress ossidativo è diffuso in tutti i compartimenti

cellulari e non limitato al solo cloroplasto. Anche in altre specie si assiste a un aumento specifico dell'attività delle SOD in risposta allo stress salino. In alcuni casi l'entità di tale stimolazione arriva a essere più del doppio rispetto alle condizioni di controllo (Chang-Quan *et al.*, 2008).

### 1.7.2.2. Catalasi

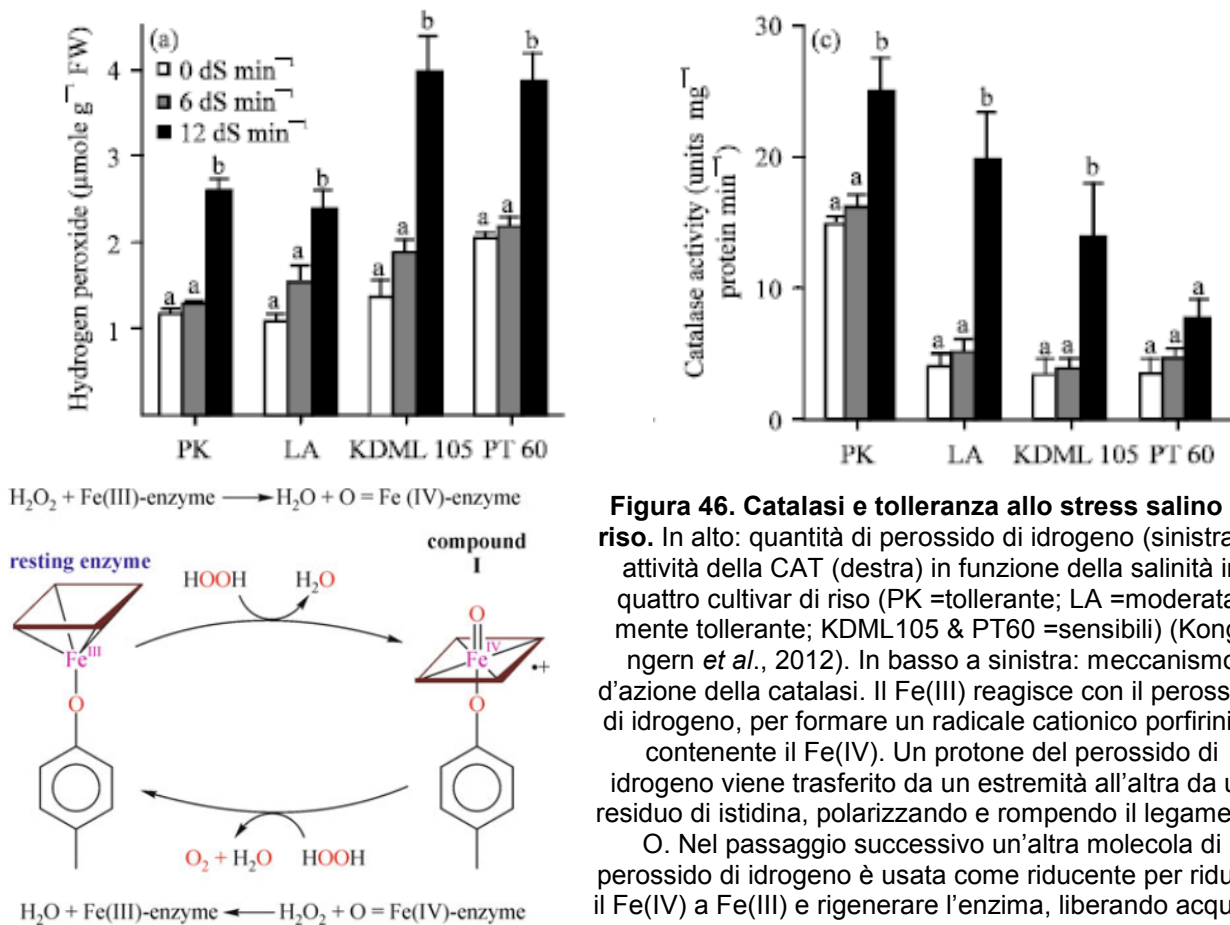
Le catalasi (CAT, EC 1.11.1.6) sono enzimi localizzati nel perossisoma e nel gliossisoma delle piante, responsabili della dismutazione del perossido di idrogeno in acqua e ossigeno. Esse sono costituite da dei tetrameri, e si pensa che questa struttura sia essenziale per l'attività catalitica poiché inibisce il rilascio dei reagenti prima che la reazione sia completa, evitando la liberazione del radicale idrossile dal gruppo prostetico eme esposto. Ogni catalasi contiene quattro gruppi eme che costituiscono il sito attivo, dove è posizionato un atomo di ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) coordinato a quattro atomi di azoto di diversi anelli porfirinici; la quinta valenza del ferro è coniugata a una tirosina, mentre la sesta è libera di legare l'ossigeno dell'acqua ossigenata. Gli enzimi meglio caratterizzati sono quello umano degli eritrociti e quello di fegato bovino. Da studi condotti sull'enzima umano emerge che ogni subunità è in grado di legare una molecola di NADPH e altri dinucleotidi in base alla seguente affinità:  $\text{NADPH} > \text{NADH} > \text{NADP}^+ > \text{NAD}^+$ ; dal momento che tali molecole non sono necessarie per la catalisi enzimatica, il loro ruolo non è chiaro. Sono state avanzate varie ipotesi per giustificare la presenza di NADPH all'interno della catalasi, la prima delle quali vede il cofattore capace di mantenere attivo l'enzima anche a basse concentrazioni di perossido di idrogeno. In queste condizioni il ferro che è stato ridotto da una prima molecola di  $\text{H}_2\text{O}_2$ , entrando in un pericoloso stato eccitato, ossiderebbe preferenzialmente il NADPH. La completa reazione di dismutazione infatti richiede due molecole di perossido per rilasciare il prodotto e riportare allo stato basale il sito attivo; quando vi è scarsa disponibilità di perossido di idrogeno l'atomo di ferro potrebbe dunque andare incontro a una pericolosa parziale riduzione, che verrebbe risolta dal NADPH. La seconda ipotesi vede il NADPH come una fonte di potere riducente per l'enzima che durante l'evoluzione è stata sostituita da altre molecole più adatte allo scopo. Quest'ultima spiegazione vede la CAT come una proteina capace di regolare lo stato redox della cellula mediante il rilascio di  $\text{NADP}^+$  in condizioni di stress perossidativo, stimolando l'attività di altri enzimi come la glutatione reduttasi e perossidasi, per catalizzare maggiormente la rimozione di  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Goyal *et al.*, 2010).

Le CAT sono gli unici enzimi in grado di reagire con l'acqua ossigenata in assenza di agenti riducenti e sono indispensabili nel ciclo fotorespiratorio in cui si produce  $\text{H}_2\text{O}_2$  nei perossisomi. In foglie di *Nicotiana plumbaginifolia* la riduzione dell'attività della catalasi perossisomale (CAT1) mediante un costrutto antisense determina un fenotipo normale in condizioni di bassa luce, che se esposto a luce intensa sviluppa lesioni necrotiche (Willekens *et al.*, 1997). Le diverse isoforme di CAT presenti nelle piante evidenziano un'attivazione/inattivazione circadiana (Feierabend, 2005). In plantule di mais l'esposizione all'ozono induce l'espressione di CAT1 e CAT3, mentre inibisce CAT2. Inoltre è stato proposto un modello per l'attivazione stress-dipendente delle CAT: in condizioni normali la loro espressione viene inibita dall'acido salicilico, mentre quando subentra lo stress la concentrazione di perossido di idrogeno aumenta attivando la trascrizione dei geni delle CAT. Nonostante siano in tessuti diversi, si pensa che le CAT preservino l'attività delle SOD dall'inibizione mediata dal perossido di idrogeno, e le SOD quella delle CAT dall'anione superossido (Bartosz, 2005).

In riso alcuni autori hanno osservato che le varietà di tipo *indica* più sensibili allo stress salino hanno una maggiore attività degli enzimi detossificanti (ascorbato perossidasi, perossidasi) fra cui la CAT. Tale osservazione viene giustificata suggerendo che la maggior resistenza al sale di una varietà rispetto a un'altra sia data dall'attività basale di enzimi con attività *scavenger* dei ROS; il loro aumento in genotipi suscettibili avverrebbe in risposta a un danno ossidativo già avviato, causato dal danneggiamento dei sistemi antiossidanti (Lee *et al.*, 2013). Studi precedenti su piante di riso esposte col sale non hanno osservato un incremento dell'attività della CAT, che anzi a volte mostravano una decrescita (Fadzilla *et al.*,

1997; Dionisio-Sese *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 2004).

Utilizzando trattamenti più spinti (200 mM NaCl), si osserva un aumento dell'attività enzimatica detossificante i ROS nelle radici di varietà di riso resistenti alla siccità. In queste condizioni nelle varietà tolleranti si riscontra infatti un minore accumulo di perossido di idrogeno e un incremento dell'attività della CAT maggiore rispetto a quello che avviene nella cultivar sensibile. Questo sembrerebbe confermare l'importanza dei sistemi antiossidanti nel meccanismo di adattamento della pianta allo stress salino. Inoltre l'attività della CAT viene influenzata dai livelli di perossido di idrogeno presenti: basse e più realistiche concentrazioni (1 mM) ne stimolano l'attività, mentre a concentrazioni più elevate (5-10 mM) gli enzimi di entrambe le varietà vengono inibiti in maniera paragonabile (Wang *et al.*, 2013). Un altro lavoro prende in esame quattro varietà di riso con differenti capacità di tollerare lo stress salino. L'aumento della concentrazione di sale nel mezzo di coltura porta a un aumento della concentrazione di perossido di idrogeno, che causa un incremento dell'attività della CAT in maniera proporzionale alla resistenza (Figura 46) (Kong-ngern *et al.*, 2012).



**Figura 46. Catalasi e tolleranza allo stress salino in riso.** In alto: quantità di perossido di idrogeno (sinistra) e attività della CAT (destra) in funzione della salinità in quattro cultivar di riso (PK =tollerante; LA =moderatamente tollerante; KDML105 & PT60 =sensibili) (Kong-ngern *et al.*, 2012). In basso a sinistra: meccanismo d'azione della catalasi. Il Fe(III) reagisce con il perossido di idrogeno, per formare un radicale cationico porfirinico contenente il Fe(IV). Un protone del perossido di idrogeno viene trasferito da un'estremità all'altra da un residuo di istidina, polarizzando e rompendo il legame O-O. Nel passaggio successivo un'altra molecola di perossido di idrogeno è usata come riducente per ridurre il Fe(IV) a Fe(III) e rigenerare l'enzima, liberando acqua e idrogeno (Goyal *et al.*, 2010).

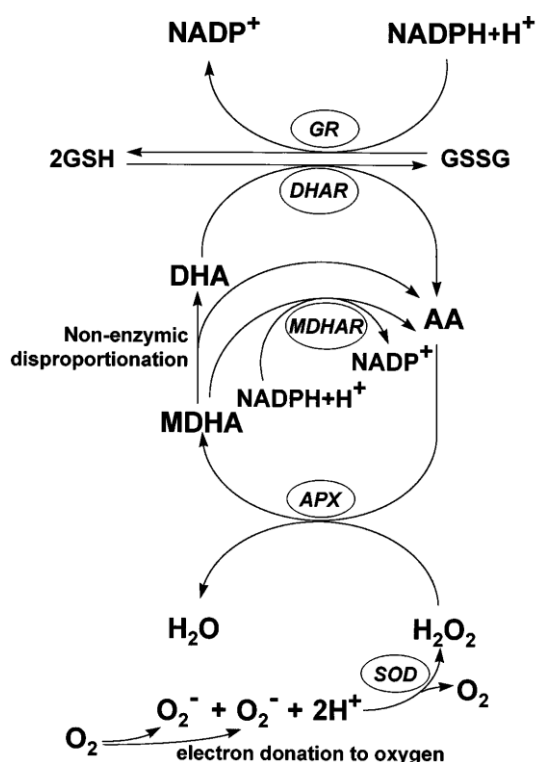
### 1.7.2.3. Enzimi coinvolti nel ciclo glutazione-ascorbato

Numerosi enzimi modulano la perossidazione e la rigenerazione del glutatione e dell'ascorbato, poiché tale ciclo è una delle difese antiossidanti più efficaci presenti nelle piante (Figura 47). Le ascorbato perossidasi (APX; EC 1.11.1.11) sono capaci di ridurre il perossido di idrogeno producendo monodeidroascorbato (MDHA). Tali enzimi sono i candidati migliori per regolare i livelli di acqua ossigenata cellulare; infatti, al contrario delle catalasi, essi hanno un'elevata affinità per tale substrato, e una localizzazione cellulare diffusa. In base alla loro disposizione cellulare, vengono divise in quattro diverse tipologie: una forma cloroplastica solubile nello stroma (sAPX), una legata alle membrane tilacoidali (tAPX), una citosolica (cAPX) e una presente nella membrana dei gliossisomi (gmAPX). In

piante di tabacco APX-antisense è stata evidenziata una maggiore sensibilità allo stress ossidativo (Örvar *et al.*, 1997). Una vasta gamma di stress, come la siccità, la salinità, l'ozono e l'alta irradianza, ne induce l'espressione; in tabacco la cAPX svolge un importante ruolo nel contrastare gli effetti della salinità (Faize *et al.*, 2011).

Per mantenere attive le difese è necessario poi rigenerare il MDHA prodotto. Nello stroma del cloroplasto la riduzione dell'MDHA avviene grazie alla MDHA reduttasi (MDHAR; EC 1.6.5.4); nel caso in cui questo non dovesse avvenire l'MDHA può diventare deidroascorbato (DHA), che a sua volta verrà rigenerato dalla DHA reduttasi (DHAR; EC 1.8.5.1). Si è osservato che la reduttasi più attiva nelle piante è la MDHAR che si trova in cloroplasti, mitocondri, perossisoma e citosol; la DHAR è stata localizzata negli stessi organuli, ma non nel citosol.

La DHAR usa il glutatione (GSH) come donatore di potere riducente. Questo viene rigenerato dalla glutatione reduttasi (GR; EC 1.6.4.2) che si trova in prevalenza nel cloroplasto, anche se piccole quantità sono state rinvenute nei mitocondri e nel citosol. Il GSH è coinvolto sia in processi di regolazione del metabolismo che nelle difese antiossidanti (Asharaf, 2009).

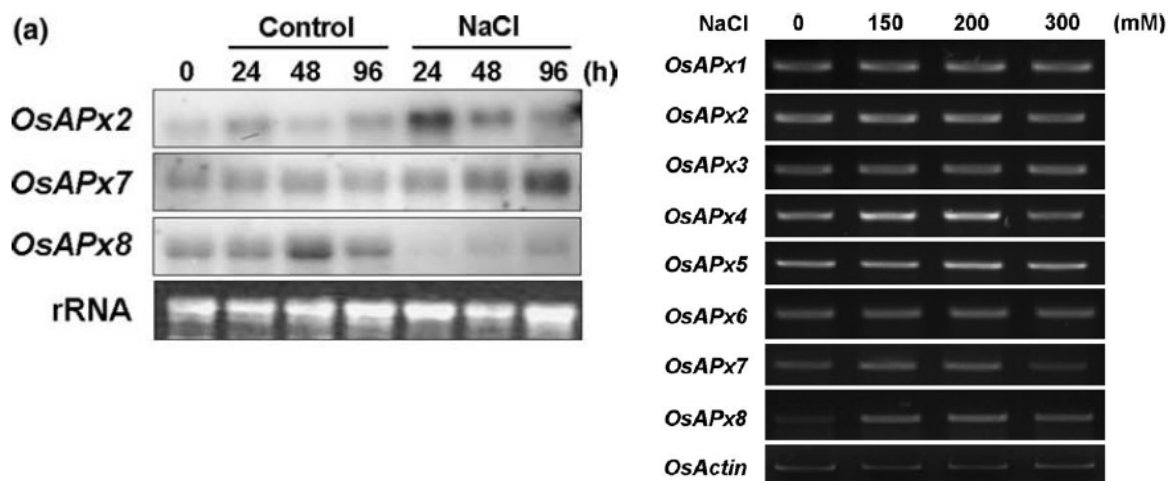


**Figura 47. Il ciclo glutatione-ascorbato.** Le reazioni riportate non sono in equilibrio stechiometrico. Le SOD forniscono il perossido di idrogeno che viene convertito dalle APX in acqua; l'attività della MDHAR ripristina l'acido ascorbico, altrimenti l'MDHA diventa DHA, che viene rigenerato dal glutatione. Quest'ultimo, oltre ad essere un antiossidante, ultimamente si è dimostrato un regolatore di alcuni aspetti del metabolismo cellulare (Noctor *et al.*, 1998).

In riso vi sono otto forme isoenzimatiche di APX: due citosoliche (OsAPx1 e OsAPx2), due putative perossisomiali (OsAPx3 e OsAPx4) e quattro cloroplastiche (OsAPx5, OsAPx6, OsAPx7, e OsAPx8) (Teixeira *et al.*, 2004). OsAPx6 è stata in seguito localizzata nel mitocondrio. Studi di espressione in risposta allo stress salino (250 mM NaCl per 24–96 h), nella cultivar Taim7 hanno evidenziato un'induzione delle isoforme OsAPx2 e OsAPx7 e una inibizione della OsAPx8 (Teixeira *et al.*, 2006). Determinazioni analoghe in radici di riso cv. Taichung Native hanno invece mostrato un incremento dell'espressione di OsAPx8 e un'inibizione di OsAPx7 (Hong *et al.*, 2007) (Figura 48).

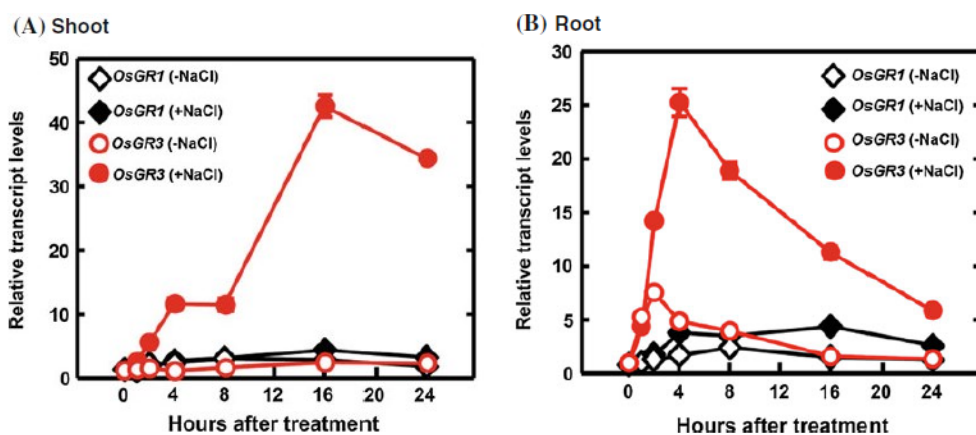
I risultati in parte contrastanti dei due lavori sono stati spiegati avanzando l'ipotesi che ciascuna varietà possa esprimere in maniera differenziale le diverse isoforme di APX, tanto più se hanno la stessa localizzazione cellulare. Sia OsAPx7 che OsAPx8 svolgono infatti la loro funzione nel cloroplasto. L'attivazione di questi sistemi antiossidanti consente alla pianta di continuare a crescere normalmente.





**Figura 48. Induzione delle forme di APx in piante di riso sottoposte a stress osmo-salino.** A sinistra: livelli dei trascritti in risposta a 250 mM NaCl ottenuti mediante Northern blot (Teixera *et al.*, 2006). A destra: RT-PCR semiquantitativa in piante sottoposte a diversi trattamenti salini (Hong *et al.*, 2007).

Per quanto riguarda la glutatione reduttasi (GR), in molte specie sono stati identificati due geni: è il caso di *A. thaliana*, *Pisum sativum*, *V. unguiculata* e *N. tabacum*, mentre in riso e *Populus trichocarpa* ne sono stati trovati tre. È stato dimostrato che un aumento dell'attività enzimatica è associato positivamente con la tolleranza allo stress salino in pisello, soia, cotone, riso e *Arabidopsis*. In riso sono state evidenziate due forme contenute sia nei cloroplasti che nei mitocondri (OsGR1 e OsGR3), più una citoplasmatica (OsGR2). Lavori recenti indicano che lo stress ionico e non l'osmotico è capace di stimolare l'espressione di OsGR2 e OsGR3 in radici di plantule e che questa induzione è mediata dal perossido di idrogeno e non dall'ABA (Hong *et al.*, 2009b). L'isoforma OsGR3 era considerata non funzionale poiché priva di un dominio funzionale all'N terminale, ma recentemente è stato dimostrato che l'enzima è attivo e coinvolto nella risposta allo stress salino (Figura 49) (Wu *et al.*, 2013).



**Figura 49. Profilo temporale dell'espressione di OsGR1 e OsGR3 in piante sottoposte o meno a stress salino.** I dati, ottenuti mediante RT-PCR, si riferiscono all'RNA isolato da radici o parti aeree di plantule di riso di due settimane esposte o no a 200 mM NaCl a tempi crescenti dopo il trattamento, e sono stati normalizzati sulla base dell'espressione costitutiva di OsActin 1 (Wu *et al.*, 2013).

Il fatto che OsGR1 non segua il pattern di espressione di OsGR3 può indicare che quest'ultima ha un ruolo attivo in riso in risposta alle condizioni di stress, mentre la prima potrebbe essere responsabile del mantenimento del pool di glutazione in condizioni normali di crescita. L'analisi della sequenza promotrice del gene ha infatti confermato la presenza in OsGR3 di sequenze bersaglio specifiche per TF attivati in condizioni di stress (Wu *et al.*, 2013).

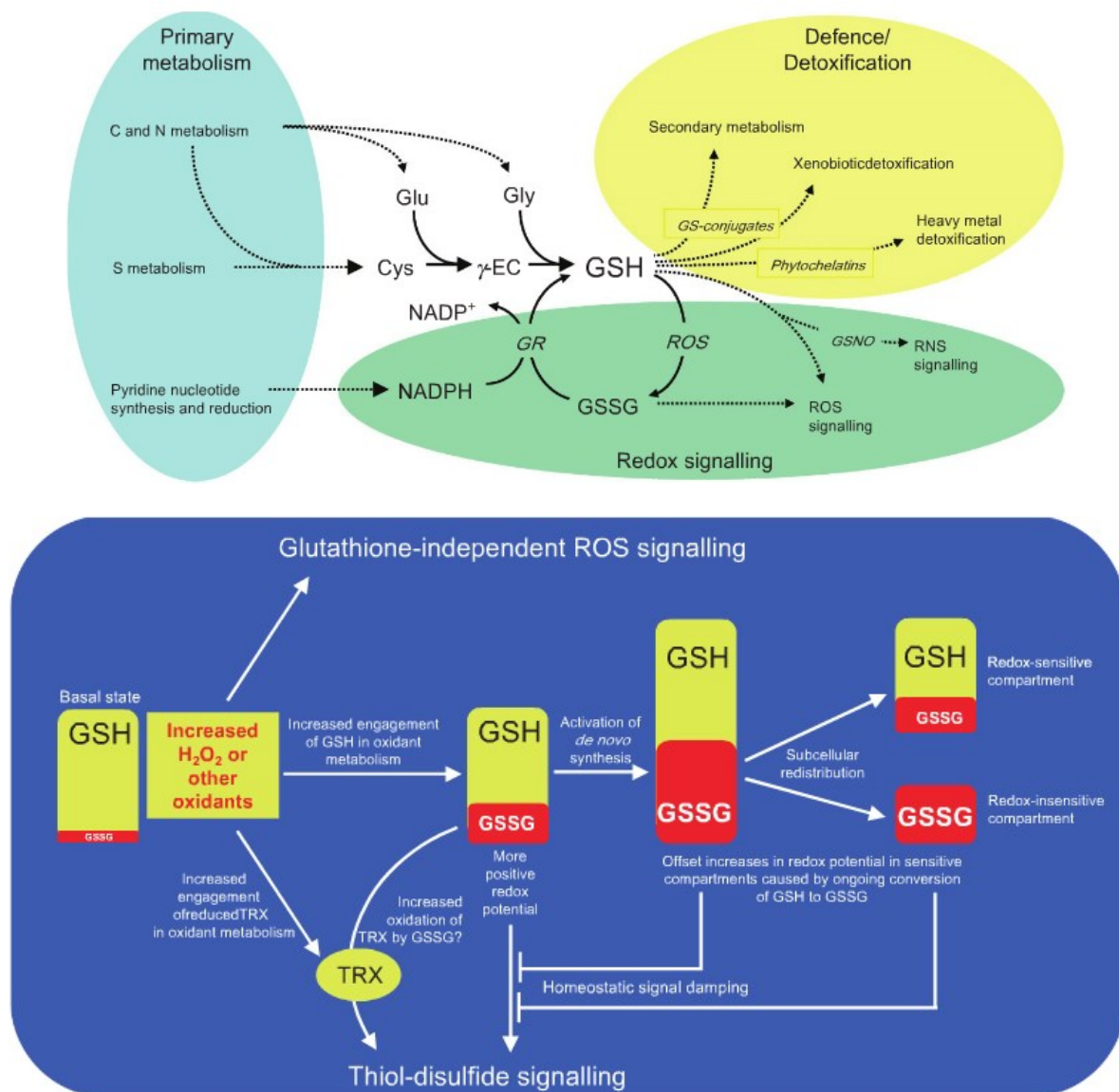
#### 1.7.2.4. Le molecole attive nel ciclo glutazione-ascorbato

Il glutatione (GSH) è un tripeptide idrosolubile formato da glutammato, cisteina e glicina localizzato in tutti i compartimenti cellulari. La sintesi di GSH avviene partendo dai tre aminoacidi che lo costituiscono mediante due reazioni che richiedono ATP. Il primo passaggio avviene nei plastidi dove l'enzima  $\gamma$ -glutamylcisteina sintetasi (GSH1) unisce la cisteina al glutammato, mentre il secondo step è catalizzato dalla glutatione sintetasi (GSH2) che unisce alla glutamylcisteina una glicina, probabilmente nel citosol. Ogni enzima viene sintetizzato da un singolo gene e genotipi *knock-out* di Arabidopsis si sono rivelati letali allo stadio embrionale (GSH1) o di plantula (GSH2) (Figura 50). La sintesi di GSH in Arabidopsis è regolata dalla disponibilità di cisteina, ATP e, in misura minore, di glicina; la prima reazione a opera della GSH1 è considerata il passaggio limitante della via biosintetica. La GSH1 viene attivata dai metalli pesanti, dall'ormone vegetale acido jasmonico, mentre curiosamente è insensibile ai livelli di perossido di idrogeno presenti nella cellula. Sull'enzima parzialmente purificato di tabacco si è osservata un'inibizione dell'attività esercitata dai tioli; inoltre è stata dimostrata la formazione di omodimeri di GSH1 mediante due legami disolfuro, uno dei quali è impiegato nella regolazione *redox* e costituisce un fattore importante nella stimolazione della sintesi di glutatione durante lo stress ossidativo. Infine è stata dimostrata l'inibizione a feedback della GSH1 a opera del glutatione.

La forma ridotta del glutatione è necessaria alla cellula per mantenere il potere riducente da investire prontamente in caso di stress ossidativo. Il GSH è in grado di neutralizzare il perossido di idrogeno, l'anione superossido e altri ROS come i radicali idrossilici. Inoltre è fondamentale per la rigenerazione dell'ascorbato. L'equilibrio fra il GSH e la sua forma ossidata GSSG è indice dello stato di salute della cellula: più questo si sposta verso la forma ossidata e più lo stress ossidativo si aggrava (Figura 50). Più di recente è stato riconosciuto al GSH anche un ruolo di *signalling*, vista la sua pronta conversione nello stato ossidato in risposta a stress ambientali e la sua capacità di interagire con una vasta gamma di molecole. Lo spostamento del rapporto verso il GSSG può infatti indurre la sintesi *de novo* di GSH, ma anche attivare le glutaredossine o favorire la glutationilazione di specifiche proteine, oppure ossidare a sua volta le tioredossine (Noctor *et al.*, 2012).

L'acido ascorbico (ASA) è il più abbondante e potente antiossidante presente in natura, ed è capace di donare elettroni a un gran numero di molecole, sia mediante attività enzimatica che non. Come il GSH è pressochè ubiquitario nelle cellule vegetali. In condizioni normali la maggior parte del pool di ASA è nella forma ridotta ed è contenuta nei cloroplasti delle foglie; la sua concentrazione può arrivare nell'ordine del millimolare e solitamente supera quella del GSH. L'ascorbato può reagire direttamente con il perossido di idrogeno, i radicali ossidrilici e il singoletto dell'ossigeno. Inoltre può rigenerare il tocoferolo partendo dal radicale tocoferile, contribuendo alla protezione delle membrane cellulari (Ashraf, 2009).

La biosintesi dell'ascorbato dal glucosio prevede 10 reazioni enzimatiche, di cui le prime sei sono comuni alla biosintesi di glicoproteine associate alla parete cellulare. Vista l'importanza del glutatione e dell'ascorbato nel mantenere un ottimale stato *redox* cellulare non stupisce che il loro accumulo sia legato alla resistenza allo stress osmo-salino. In particolare si è osservato che lo stato di ossidazione del glutatione interferisce con l'apertura degli stomi: più ASA è presente e più lo scambio gassoso della pianta non viene inibito in condizioni di stress iperosmotico (Chen & Gallie, 2004).

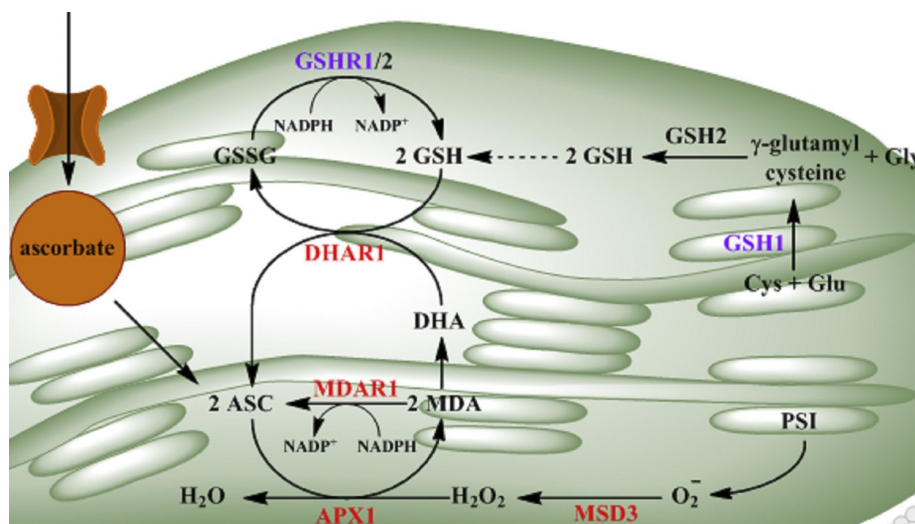


**Figura 50. Metabolismo del glutatione nella pianta.** In alto, vista d'insieme di alcune delle funzioni del GSH, dalla sintesi, al turnover *redox* passando per il metabolismo e il *signalling*. Cys, cisteina;  $\gamma$ -EC,  $\gamma$ -glutamilsteina; Glu, glutammato; Gly, glicina; RNS, specie radicali che dell'azoto; ROS, specie radicaliche dell'ossigeno; GS-conjugates, glutatione S-coniugati; GSNO, S-nitroso-glutatione. In basso, modello delle risposte glutatione-dipendenti durante diversi livelli di stress ossidativo. L'ossidazione del glutatione provoca un accumulo di GSSG e una modifica nel potenziale *redox* cellulare. Questo segnale induce la sintesi di nuovo glutatione o il trasporto di quello già contenuto nella cellula in modo da ristabilire la situazione iniziale. La modifica del potenziale *redox* del glutatione agisce da *signalling* attraverso le glutaredossine o proteine che vengono glutationilate consentendo alla cellula di mettere in atto le risposte contro lo stress ossidativo (Noctor *et al.*, 2012).

### 1.7.2.5. Altre molecole attive nella detossificazione dei ROS

Oltre ai sistemi ricordati, le piante hanno altri meccanismi per proteggersi dal danno ossidativo derivante dai ROS. Uno di questi è rappresentato dai carotenoidi, che nelle piante ricoprono numerose funzioni. Nella cellula vegetale essi si trovano nel cloroplasto, dove fanno parte del sistema antenna; la natura lipofila permette loro il posizionamento sulle membrane, mentre la struttura chimica fa in modo che possano assorbire la luce a una lunghezza d'onda compresa fra 450 e 570 nm, e trasferire l'energia accumulata alle clorofille. Un ruolo ulteriore ricoperto da queste molecole è di proteggere i sistemi fotosintetici: di solito

l'energia viaggia in maniera unidirezionale dai pigmenti antenna al centro di reazione, ma quando la quantità di luce è troppo elevata il sistema non fa in tempo a rigenerarsi, e il tripletto della clorofilla può reagire con l'ossigeno, formando il singoletto dell'ossigeno. In queste condizioni viene promosso il ciclo delle xantofille, in cui la quantità di energia che rischierebbe di sovraccaricare il sistema e di generare ROS viene dissipata sotto forma di calore. Il ciclo è reso possibile grazie alla conversione reversibile mediata dall'ascorbato della violaxantina a zeaxantina, la quale produce dei cambiamenti nell'architettura del PSII che avvantaggiano la dissipazione dell'energia in eccesso.

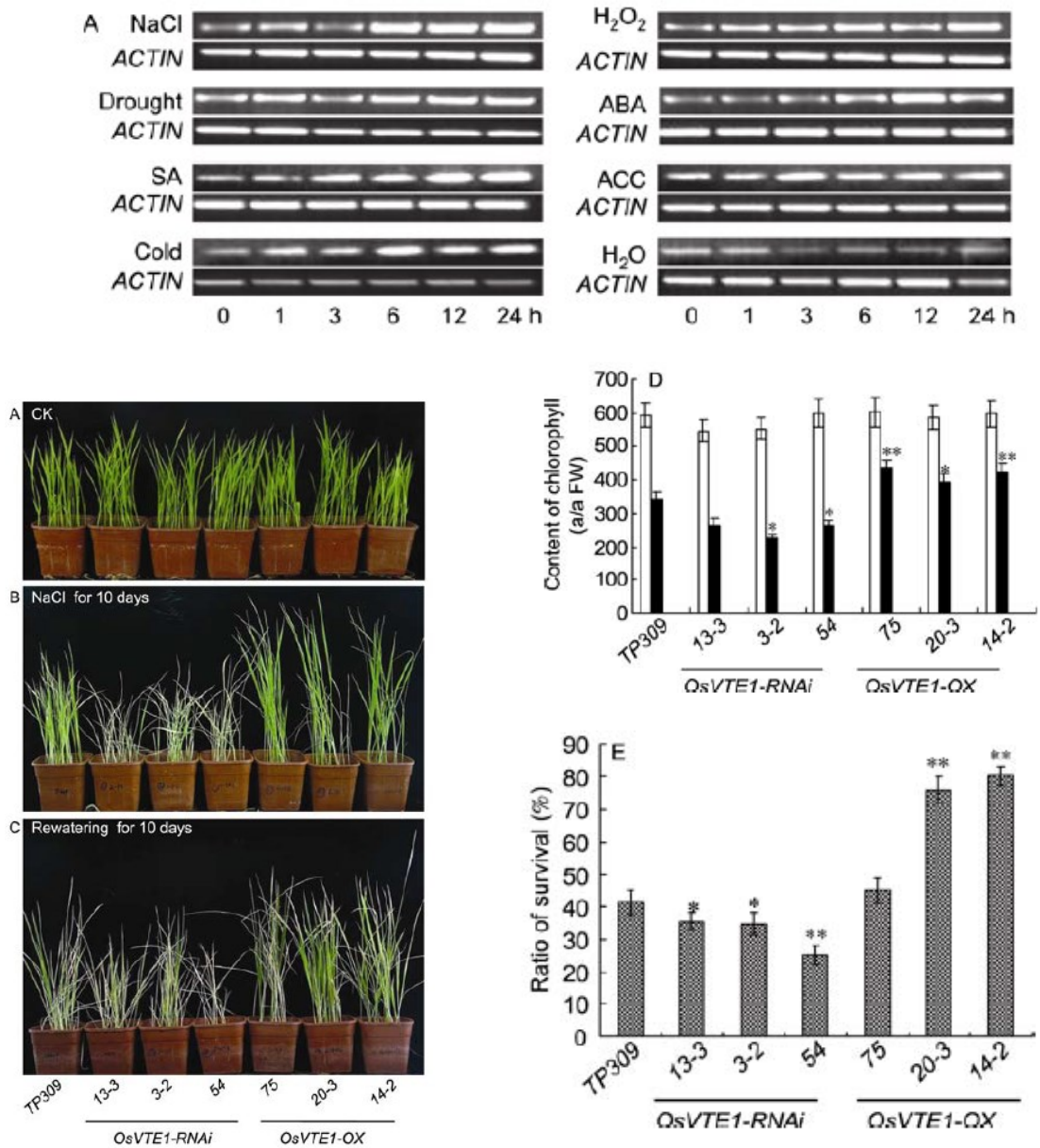
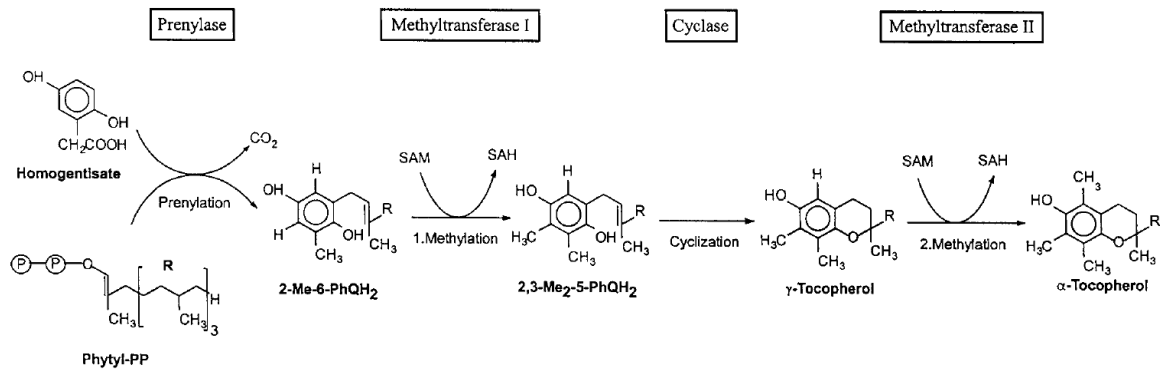


**Figura 51.** Metabolismo dell'ascorbato nei cloroplasti. Gli enzimi evidenziati in rosso sono quelli indotti durante lo stress ossidativo e di perossidazione lipidica in *C. reinhardtii*, mentre quelli in viola vengono indotti solo dallo stress ossidativo (Urzica *et al.*, 2012).

Un'altra molecola con attività antiossidante presente solo nei vegetali, ma indispensabile anche per gli animali, è il tocoferolo, conosciuto anche come vitamina D. Lipofilo, si trova nelle membrane in cui protegge gli acidi grassi insaturi. In natura ne sono stati scoperti quattro isomeri ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -, e  $\gamma$ -), di cui l' $\alpha$ -tocoferolo ha la maggiore attività antiossidante e costituisce la forma predominante nelle foglie, mentre il  $\gamma$ -tocoferolo è contenuto nei semi di numerose specie. Il tocoferolo, come i carotenoidi, protegge dalla perossidazione lipidica i componenti della membrana tilacoidale mediante diretta interazione con i radicali, impedendo il propagarsi della reazione a catena. È stato calcolato mediante la tecnologia del trasferimento di energia per risonanza che una molecola di tocoferolo inattiva 120 molecole di  $O_2^{\cdot-}$ . In *Arabidopsis* è stato verificato che il passaggio limitante della sintesi di tocoferolo è a carico dell'enzima con attività ciclasica (*VTE1*) (Figura 52), molto conservato sia nelle piante che nei cianobatteri. Esperimenti di sovra-espressione di *VTE1* in *Arabidopsis* e tabacco hanno determinato un genotipo più resistente allo stress salino. Nel 2011 Ouyang osservò l'effettiva induzione in riso dell'enzima *VTE1* in varie condizioni di stress (alta salinità, perossido di idrogeno, siccità, freddo) e in risposta a ormoni come ABA e acido salicilico, con una marcata localizzazione nelle foglie. Applicando uno stress salino alle piante che sovraesprimevano *VTE1* si osservò una maggiore resistenza rispetto ai controlli e a piante in cui il gene veniva silenziato mediante RNAi (Figura 52); è probabile che tale effetto sia correlato a un minor accumulo tocoferolo-dipendente di perossido di idrogeno.

Un altro sistema antiossidante è costituito dai flavonoidi, la cui diffusione è molto ampia nel regno vegetale. Di solito queste molecole vengono accumulate nel vacuolo in foglie, pollini e fiori dopo coniugazione a uno zucchero; la loro concentrazione può arrivare a 1 mM. Un gran numero di flavonoidi agisce contrastando le lipoossigenasi, enzimi che utilizzano come substrato gli acidi grassi poliinsaturi liberando idroperossidi coniugati (Ashraf, 2009).

Molte altre molecole hanno mostrato attività antiossidante, tra cui alcaloidi, acidi fenolici, poliammide, diterpeni. Poco però si sa sul loro meccanismo di azione in condizioni di stress.



**Figura 52. Biosintesi di  $\alpha$ -tocoferolo in riso.** Il penultimo passaggio è una ciclizzazione catalizzata dalla tocoferolo ciclasi (VTE1) (Arango *et al.*, 1998). In riso VTE1 è indotto in seguito a numerosi stress, soprattutto dopo il trattamento con il sale. Piante transgeniche con il gene per la ciclasi sovraespresso (*OsVTE1-OX*) in condizioni di stress (NaCl per 10 giorni) le piante *OsVTE1-OX* avevano un contenuto di clorofilla maggiore sia delle piante RNAi (*OsVTE1-RNAi*) che del controllo. Quando poi lo stress veniva revertito (H<sub>2</sub>O per 10 giorni) le piante *OsVTE1-OX* avevano maggiore capacità di recupero (Ouyang *et al.*, 2011).

Il quadro generale è ancora più complesso poiché la sensibilità allo stress ossidativo dipende anche dallo stadio di sviluppo in cui la pianta si trova. Una migliore conoscenza dei meccanismi di attivazione delle risposte antiossidanti potrebbe permettere di capire meglio i costituenti che giocano un ruolo fondamentale nella risposta allo stress. Capire ad esempio quale delle numerose isoforme enzimatiche sia coinvolta nella fase di adattamento della pianta alla salinità potrebbe fornire ai *breeders* nuovo materiale genetico utile per lo sviluppo di varietà di riso più tolleranti.

### 1.8. Metodi di valutazione della tolleranza del riso allo stress salino

Visti i numerosi parametri coinvolti, non stupisce che siano stati sviluppati numerosi metodi per determinare il livello di tolleranza a questa tipologia di stress. Le classificazioni utilizzate dipendono fortemente dallo stadio di sviluppo della pianta in cui sono state effettuate le determinazioni. Le più utilizzate si riferiscono alle fasi di maggiore sensibilità al sale: durante lo sviluppo della plantula (10 giorni dopo la germinazione) e durante la fioritura. L'IRRI ha sviluppato una scala (*standard evaluating score*, SES) da 1 a 10, dove i valori più bassi sono da attribuire ai genotipi più resistenti. La SES si basa su osservazioni condotte sulle piante dopo 10 giorni dall'inizio del trattamento salino; un'ulteriore valutazione viene condotta al sedicesimo giorno. Vengono così identificate cinque classi, dalla più tollerante all'altamente suscettibile (Tabella 6).

Questa classificazione viene adottata ancora oggi dall'IRRI. Ad esempio Pokkali ha uno score di 1, la IR74 di 5 e la IR29 di 7. Ma distinguere le tolleranti da quelle moderatamente tolleranti è possibile solo dopo 16 giorni, quando Pokkali ha uno score di 3, IR74 di 7 e IR29 di 9. Sebbene rappresenti un veloce e comodo metodo di *screening*, questo approccio non aiuta a capire quali determinanti biochimico-molecolari siano alla base del meccanismo di resistenza.

| Score | Observation                                                             | Tolerance           |
|-------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 1     | Normal growth, no leaf symptoms                                         | Highly tolerant     |
| 3     | Nearly normal growth, but leaf tips or few leaves whitish and rolled    | Tolerant            |
| 5     | Growth severely retarded; most leaves rolled; only a few are elongating | Moderately tolerant |
| 7     | Complete cessation of growth; most leaves dry; some plants dying        | Susceptible         |
| 9     | Almost all plants dead or dying.                                        | Highly susceptible  |

**Tabella 6. Rappresentazione delle classi sulla scala "standard evaluating score".** Sviluppata all'IRRI, viene utilizzata per valutare la sensibilità allo stress salino delle diverse cultivar di riso (Gregorio *et al.*, 1997).

#### 1.8.1. Esclusione selettiva degli ioni tossici

Uno dei meccanismi più diffusi nelle varietà di riso tolleranti allo stress salino è quello di limitare l'assorbimento di ioni sodio e aumentare quello del potassio, mantenendo un rapporto ottimale  $Na^+/K^+$  nella parte aerea. Questo permette una crescita normale poiché le reazioni più importanti del metabolismo vengono inibite solo in parte. Dati ottenuti su un gruppo di genotipi *indica* mostrano una buona correlazione ( $r= 0,93$ ) fra il rapporto  $Na^+/K^+$  e lo SES (Tabella 7), mentre sia il contenuto di potassio che quello di sodio non sono sufficienti per descrivere il grado di tolleranza. Il medesimo *trend* è stato osservato anche in genotipi *japonica* (Lee *et al.*, 1995).

| Entries           | Salinity score | Na    | K     | Na-K ratio | Reaction to salinity |
|-------------------|----------------|-------|-------|------------|----------------------|
| IR28              | 7.0            | 0.652 | 1.935 | 0.359      | Susceptible          |
| IR29              | 7.0            | 0.835 | 2.410 | 0.350      | Susceptible          |
| M1-48             | 6.0            | 0.582 | 2.080 | 0.284      | Susceptible          |
| IR4595-4-1-13     | 4.5            | 0.510 | 2.435 | 0.209      | Moderate             |
| IR9884-54-3-1E-P1 | 4.5            | 0.526 | 2.630 | 0.200      | Moderate             |
| IR10206-29-2-1    | 4.8            | 0.599 | 2.295 | 0.261      | Moderate             |
| Nona Bokra        | 3.0            | 0.456 | 2.540 | 0.180      | Tolerant             |
| Pokkali           | 3.0            | 0.397 | 2.480 | 0.159      | Tolerant             |
| SR26B             | 3.5            | 0.452 | 2.850 | 0.159      | Tolerant             |

**Tabella 7.** Rapporto  $Na^+/K^+$  e SES in diverse varietà di riso appartenenti al gruppo *indica*, cresciute in condizioni di stress salino (Gregorio *et al.*, 1997).

Se negli anni Ottanta del secolo scorso si riteneva che le varietà tolleranti fossero in grado di non trasferire il sodio nelle foglie, sulla base di questi studi prevale oggi l'ipotesi che il mantenimento di un basso rapporto  $Na^+/K^+$ , indipendentemente dalla concentrazione delle due specie, possa costituire la base di un più efficace adattamento allo stress salino.

### 1.8.2. Accumulo di prolina

Il riso manca di alcuni enzimi responsabili del metabolismo della glicina betaina, per cui il principale osmoliti compatibile in questa specie è la prolina. Quindi ci si aspetterebbe che la quantità dell'amino acido libero aumenti in condizioni di stress salino ma, come già ricordato, spesso questo non si osserva (Tabella 8).

| EC<br>dS/m | Giorni | -          | ++    | --   | +      | +++     |
|------------|--------|------------|-------|------|--------|---------|
|            |        | Annapoorna | Hrswa | IR20 | Jyothi | Pokkali |
| 0,73       | 0      | 0,52       | 0,66  | 0,82 | 0,83   | 0,62    |
| 0,73       | 4      | 0,87       | 0,66  | 0,71 | 0,68   | 0,71    |
| 0,73       | 8      | 0,34       | 0,45  | 0,45 | 0,51   | 0,75    |
| 8,6        | 4      | 3,08       | 4,14  | 6,90 | 3,21   | 0,75    |
| 8,6        | 8      | 6,11       | 3,98  | 3,52 | 3,73   | 2,07    |
| 15,6       | 4      | 8,30       | 5,85  | 8,09 | 7,54   | 3,36    |
| 15,6       | 8      | 10,80      | 3,21  | 7,94 | 7,63   | 5,84    |
| 28         | 4      | 8,79       | 9,13  | 9,00 | 7,49   | 3,08    |
| 28         | 8      | 6,09       | 10,20 | 8,52 | 7,33   | 3,10    |

**Tabella 8.** Concentrazioni di prolina in genotipi di riso *indica* sottoposti a stress salino. Il quantitativo medio di prolina è espresso in  $\mu\text{mol/g}$  di peso fresco. Il trattamento è stato effettuato facendo crescere le plantule in un sistema idroponico in cui vi erano soluzioni saline con valori crescenti di conducibilità (EC). I genotipi hanno un diverso grado di tolleranza allo stress salino (+++ il più resistente, -- il più suscettibile) (Renuka Devi *et al.*, 1997).

Molto probabilmente la variabilità genetica all'interno del genere *Oryza* per la risposta allo stress salino è così ampia che non è possibile affermare con certezza che se un genotipo è tollerante al sale allora accumula anche più prolina. Nello studio riportato la varietà più tollerante, Pokkali, è capace di mantenere un basso rapporto fra sodio e potassio, e quindi plausibilmente non avrà un così marcato bisogno di accumulare osmoliti compatibili rispetto a varietà con un alto rapporto  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .

### 1.8.3. Considerazioni sulla coltivazione del riso in terreni salini

Malgrado la sua estrema sensibilità al sale, il riso è considerato una coltura desalinizzante per via della sua capacità di crescere in condizioni di sommersione, permettendo così all'acqua di dilavare gli ioni contenuti nel terreno, in cui risulta poi possibile seminare altre colture. Studi scientifici hanno evidenziato che le famiglie delle proteine coinvolte nell'osmoregolazione, nel trasporto degli ioni e nella detossificazione dei ROS sono cruciali nel determinare la tolleranza allo stress salino. Molto spesso queste misurazioni vengono eseguite su un numero limitato di varietà e i risultati non sono del tutto univoci. Lo stress osmo-salino, infatti, riprogramma il metabolismo della pianta per permetterle di crescere anche in condizioni proibitive. Il fatto che il riso cresca in ecosistemi molto eterogenei fra loro può aver determinato l'insorgenza di adattamenti diversi allo stesso tipo di stress. In altri casi sono state osservate differenze importanti nella tempistica con cui la pianta risponde al sale. È il caso dell'accumulo di prolina, che se avviene in tempi ragionevolmente brevi assicura adattamenti efficaci, mentre se avviene in tempi più dilatati non riesce a sortire gli effetti benefici, in quanto il danno ossidativo è già stato avviato.

Di recente sono state sviluppate nuove tecnologie che hanno permesso la creazione di librerie di geni, mRNA, proteine e fattori di trascrizione associati allo stress salino. Lo studio comparato di questi parametri in varietà di riso con diversa suscettibilità allo stress ha permesso l'identificazione dei determinanti coinvolti, confermando la presenza di vari meccanismi di adattamento al sale. La mole di dati prodotti, però, è molto ampia e il fattore limitante è costituito dall'interpretazione dei risultati. Negli ultimi anni i medesimi studi sono stati condotti anche su altre piante di interesse agronomico, come tabacco, pomodoro e grano, oltre all'organismo modello *Arabidopsis thaliana*. Questo ha permesso l'applicazione di approcci di genomica comparativa, capaci di fornire una chiave di lettura più ampia e attendibile dei geni coinvolti nella risposta allo stress salino, ma per contro ha aumentato ancora di più la mole di dati da analizzare.

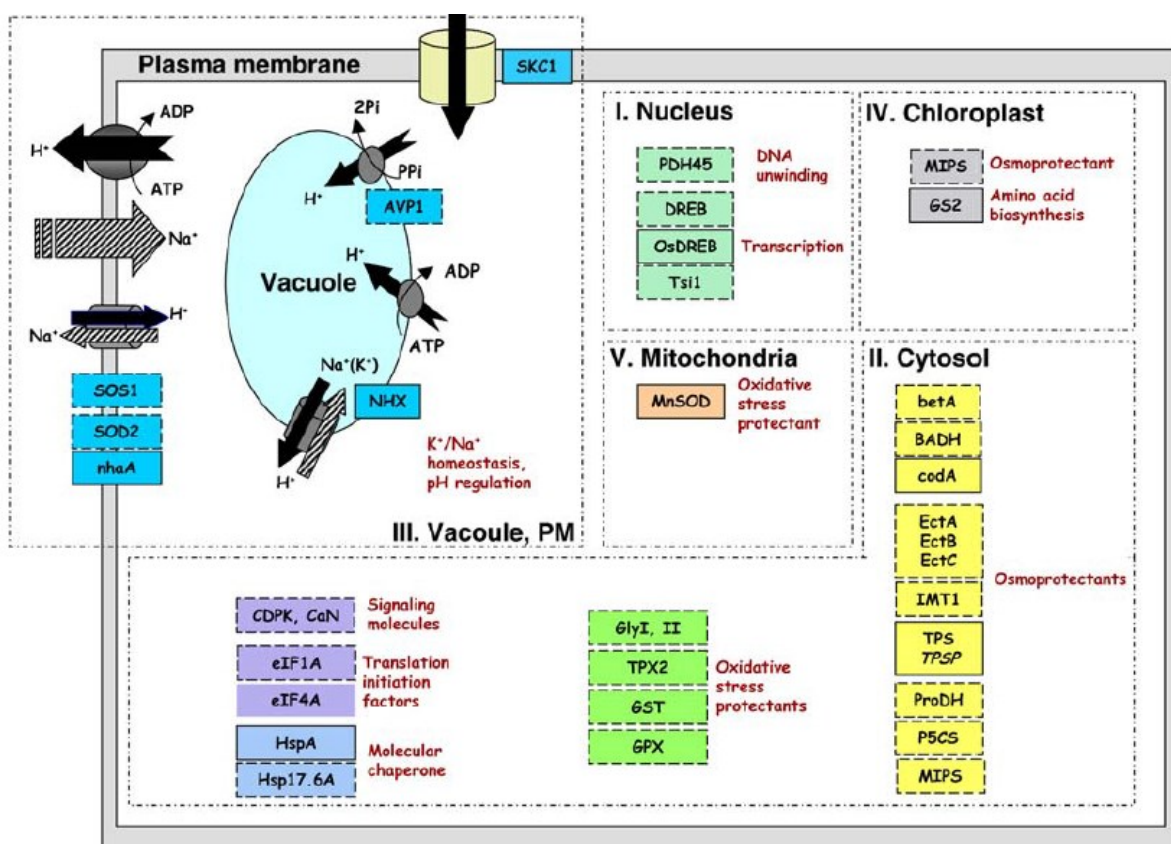
Una volta eseguito un primo *screening* sul genoma e selezionati i maggiori marcatori indotti dal sale, il passaggio successivo prevede lo studio delle loro funzioni nel sistema pianta. Questo processo di validazione si avvale sia di mutanti *knock-out* che di piante geneticamente modificate che sovra-esprimano il carattere di interesse (Figura 53).

Entrambi gli approcci permettono di confermare o meno il coinvolgimento dello specifico determinante nella risposta al sale, e possono fornire importanti elementi per capirne la funzione nella riprogrammazione del metabolismo stress-dipendente. Il più delle volte, però, la risposta allo stress coinvolge diversi *pathways* correlati fra loro; lo squilibrio dato dal silenziamento di un gene o dalla sua sovra-espressione provoca delle modificazioni che si manifestano anche in condizioni normo-osmotiche, e questo rende l'analisi ancora più difficile (Sahi *et al.*, 2006).

Le analisi genomiche hanno permesso l'individuazione di diversi *quantitative trait loci* (QTL) associati alla resistenza al sale in riso. Il QTL è un carattere che viene espresso in maniera variabile all'interno della popolazione, la cui presenza è associata al grado di resistenza alla salinità mediante l'assegnazione di specifici *scores*. Nel riso le mappe cromosomiche riportanti i QTL vengono periodicamente aggiornate e sono uno strumento molto potente per lo sviluppo di nuove varietà con migliori caratteristiche di resistenza. I dati ottenuti con tecniche di biologia molecolare risultano importanti per la selezione di marcatori associati allo stress, ma parallelamente devono essere attuati studi biochimici di caratterizzazione delle proteine coinvolte. Durante lo stress salino si verificano infatti delle perturbazioni



nel contenuto di ioni, nel volume cellulare, nel potenziale *redox* e nel potenziale idrico, ciascuna delle quali può avere un ruolo attivo nella modulazione dell'attività enzimatica. Tale modulazione potrebbe avere in alcuni casi un ruolo anche superiore a quello della regolazione a livello trascrizionale (Giberti *et al.*, 2014).



**Figura 53. Analisi dei regolatori positivi nella risposta allo stress osmo-salino.** I riquadri con la linea continua sono l'esito di determinazioni eseguite in riso applicando protocolli di transgenesi, mentre quelli con la linea tratteggiata rappresentano i risultati di analisi attuate su specie diverse. I vari determinanti sono divisi in base alla localizzazione subcellulare e includono proteine coinvolte nella protezione dallo stress ossidativo o dallo stress osmotico, nel trasporto di ioni o fattori di trascrizione (Sahi *et al.*, 2006).

### 1.9. Scopo del lavoro

Nel 2012 grazie all'appoggio economico di "Ager-Fondazioni in rete per la ricerca agroalimentare", un network di fondazioni bancarie finalizzato a supportare l'eccellenza nella ricerca applicata all'agricoltura, è stato avviato un progetto di ricerca denominato "RISINNOVA" con lo scopo di applicare in maniera integrata approcci di genetica e genomica a nuove strategie di *breeding* del riso italiano. Il progetto prevedeva il coinvolgimento di dodici gruppi di diverse università e centri di ricerca, ripartiti in funzione di cinque obiettivi:

- approcci genetici e genomici per aumentare la resistenza alle principali malattie del riso
- approcci genetici e genomici con lo scopo di difendere il riso italiano dai maggiori stress abiotici (scarsa disponibilità di acqua, stress salino e stress termico)
- diversità genetica e funzionale delle comunità microbiche associate al riso
- sistemi di analisi genomica applicati alla biodiversità
- diffusione dei risultati, formazione e trasferimento tecnologico

Uno dei gruppi partecipanti era quello del laboratorio di Fisiologia e Biochimica Vegetale dell'Università di Ferrara, coinvolto in particolare nella seconda tematica di indagine, con l'obiettivo di caratterizzare i meccanismi biochimici alla base della tolleranza al sale nel riso italiano. Per ottenere tale fine si sarebbero dovuti identificare un numero limitato di cultivar con sensibilità differenziale allo stress salino (1-2 molto sensibili, 2-3 molto tolleranti), su cui valutare l'attivazione dei sistemi antiossidanti e l'accumulo di metaboliti compatibili in seguito a stress osmo-salino. Avrebbero dovuto essere condotte quindi determinazioni dei livelli di espressione e delle proprietà biochimiche degli enzimi che hanno un ruolo importante nella detossificazione dei ROS [SOD, EC 1.15.1.1; CAT, EC 1.11.1.6; APX, EC 1.11.1.11 e glutatione reduttasi (GR, EC 1.6.4.2)] e nel metabolismo della prolina (P5CS, EC undefined; P5CR, EC 1.5.1.2; PRODH, EC 1.4.3 e P5CDH, EC 1.5.1.12). Contestualmente si sarebbero quantificati i corrispondenti livelli di ROS, e la concentrazione di prolina libera, glutatione e ascorbato nei tessuti di piante sottoposte a stress.

Tali risultati avrebbero dovuto contribuire a incrementare le conoscenze dei meccanismi di risposta allo stress salino nel germoplasma di riso italiano, sin qui oggetto di scarsa attenzione, dal momento che la quasi totalità dei lavori disponibili in letteratura si riferisce a varietà asiatiche. L'obiettivo ultimo era quello di individuare nuovi marcatori da utilizzare in progetti di selezione varietale assistita per lo sviluppo di nuove cultivar di riso da destinare alla coltivazione in aree con suoli salini, come il delta del Po.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1. Materiale vegetale e condizioni di crescita

I semi di 17 varietà italiane di riso sono stati cortesemente forniti dall'Unità di ricerca per la risicoltura CRA-RIS di Vercelli, una delle dodici unità operative che hanno preso parte al progetto RISINNOVA. Essi derivano dai raccolti degli anni 2010-2013, e sono stati conservati a 4-7°C in camera fredda al buio. Tali cultivar sono elencate in Tabella 9 insieme alle principali caratteristiche che le contraddistinguono.

| Varietà             | Classificazione | Ciclo di crescita | Gruppo   | Sensibilità a <i>Mo</i> <sup>a</sup> |
|---------------------|-----------------|-------------------|----------|--------------------------------------|
| Asia                | lungo tipo B    | tardivo           | japonica | molto resistente                     |
| Augusto             | lungo tipo A    | medio             | japonica | resistente                           |
| Baldo               | lungo tipo A    | precoce           | japonica | sensibile                            |
| Carnaroli           | lungo tipo A    | medio             | japonica | sensibile                            |
| Centauro            | tondo           | precoce           | japonica | medio sensibile                      |
| Eurosis             | lungo tipo A    | medio             | japonica | sensibile                            |
| Gange               | lungo tipo B    | molto tardivo     | japonica | resistente                           |
| Gigante VC          | lungo tipo A    | medio             | japonica | molto resistente                     |
| Loto                | lungo tipo A    | precoce           | japonica | molto sensibile                      |
| Maratelli           | medio           | precoce           | japonica | molto sensibile                      |
| S. Andrea           | lungo tipo A    | medio             | japonica | sensibile                            |
| Salvo               | lungo tipo B    | medio             | japonica | non valutato                         |
| Selenio             | tondo           | medio             | japonica | sensibile                            |
| Thaibonnet          | lungo tipo B    | medio             | japonica | medio resistente                     |
| Venere <sup>b</sup> | medio           | medio             | japonica | molto resistente                     |
| Vialone nano        | medio           | medio             | japonica | molto sensibile                      |
| Volano              | lungo tipo A    | tardivo           | japonica | sensibile                            |

**Tabella 9. Genotipi di riso analizzati nel corso del presente lavoro.** I 17 genotipi su cui sono state condotte le determinazioni sono stati scelti nell'ambito del progetto RISINNOVA sulla base delle loro caratteristiche di produttività, diffusione, adattabilità ai sistemi pedoclimatici italiani e resistenza al brusone. *Mo*: *Magnaporthe oryzae*. <sup>a</sup> dati tratti da Faivre-Rampant *et al.*, 2011; <sup>b</sup> varietà con chicco nero, contenente antociani nel pericarpo.

I semi sono stati sterilizzati superficialmente mediante trattamento sequenziale in etanolo assoluto per 5 minuti e in una miscela sterilizzante contenente il 3% di NaClO e lo 0,04% di Triton X-100 (v/v) sottovuoto per 5 min. Successivamente il materiale è stato abbondantemente lavato con acqua distillata sterile, lasciato imbibire per almeno 5 h e infine seminato con due modalità alternative:

- in piastre Petri (9 cm Ø) dove era presente uno strato di 15 mL di acqua agarizzata (6‰), 20 semi per piastra
- in capsule Magenta (6 ⇨ x 6 ⇨ x 20 ⇨ cm) precedentemente riempite con 75 mL di acqua agarizzata (6‰), 16 semi per contenitore (Figura 54).

Una volta messi a dimora i semi sono stati immediatamente ricoperti con lo stesso volume di sali Murashige e Skoog (MS) 0,25X, portati a pH 5,8 con KOH (Tabella 10), contenenti 2 mg mL<sup>-1</sup> di Plant Preservative Mixture (Plant Cell Technology).

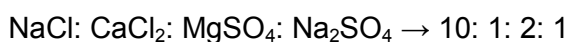
| Composto                                            | mg L <sup>-1</sup> | Elemento | mmol L <sup>-1</sup> |
|-----------------------------------------------------|--------------------|----------|----------------------|
| <u>Murashige &amp; Skoog</u>                        |                    |          |                      |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                     | 206                | N        | 7,50                 |
| KNO <sub>3</sub>                                    | 238                | P        | 0,16                 |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 21                 | K        | 2,51                 |
| CaCl <sub>2</sub>                                   | 42                 | Ca       | 0,37                 |
| MgSO <sub>4</sub>                                   | 83                 | Mg       | 0,69                 |
| Fe-NaEDTA                                           | 4,6                | Mn       | 0,013                |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 0,78               | Mo       | 0,00013              |
| MnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O                 | 2,1                | B        | 0,013                |
| ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O                | 1,1                | Zn       | 0,0038               |
| KI                                                  | 0,1                | Cu       | 0,000013             |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O | 0,03               | Co       | 0,000014             |
| CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O                | 0,003              | Fe       | 0,013                |
| CoSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O                | 0,004              | I        | 0,00063              |

**Tabella 10. Composizione del terreno di coltura MS.** Il riso è stato fatto germinare e crescere nel terreno di coltura di Murashige e Skoog (Murashige *et al.*, 1962). Dato che tale mezzo è stato formulato per la crescita di cellule vegetali in coltura ed è dunque molto ricco di sali in modo da garantire una crescita ottimale, per ottenere condizioni che meglio simulassero quelle di campo esso è stato diluito 4 volte. Considerato che esso viene stratificato sopra uno strato di acqua agarizzata dello stesso volume, la concentrazione finale dei componenti risulta pari a un ottavo di quello indicato in tabella.

Le piastre sono state incubate a 24°C ± 0,5°C in condizioni di penombra (circa 50 µmol m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>) con un fotoperiodo di 16:8 h (luce:ombra). Le capsule Magenta, invece, sono state incubate con un fotoperiodo di 14:10 h (luce:buio) a 26 ± 1°C di giorno sotto alta irradianza (300 µmol m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>) e a 22 ± 1°C di notte, in un incubatore con lampade a luce fredda con emissione luminosa pari a 1700 lumen (GE Lighting). La crescita è stata in genere lasciata procedere per 7 giorni in piastra, e per 14 giorni nelle capsule Magenta, fino a quando i controlli non raggiungevano lo stadio di terza foglia.

## 2.2. Trattamenti salini e determinazione della percentuale di germinazione e della crescita delle plantule

Per valutare l'effetto dell'aumento di conduttività elettrica sulla germinazione dei semi e sulla crescita delle plantule, alla soluzione di crescita sono state aggiunte concentrazioni crescenti di sodio cloruro o di una miscela di sali nel seguente rapporto molare:



Tale miscela rispetto all'impiego del solo sodio cloruro consente di ottenere condizioni più simili a quelle dovute alla composizione ionica del terreno (Grattan *et al.*, 2002).

Il valore di conducibilità elettrica risultante è stato misurato a 24 h dalla semina e al termine del periodo di incubazione mediante un conduttimetro (Hanna HI 8733). I valori trovati (Tabella 11) erano in perfetto accordo con quelli attesi sulla base della composizione, indicando che i sali si distribuiscono in modo uniforme anche nello strato di acqua e agar.

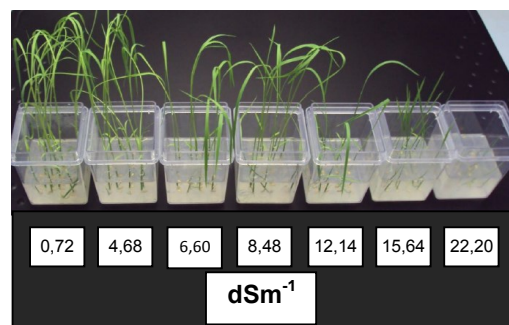
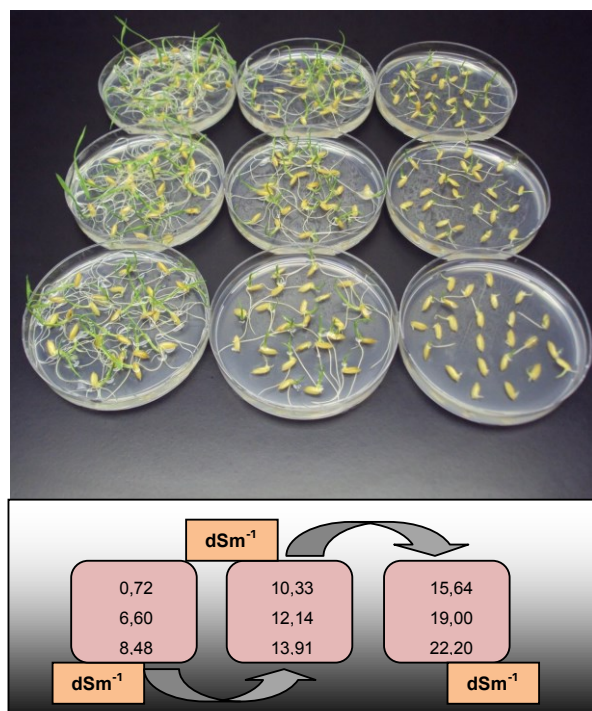
|                                        |             |             |             |             |              |              |              |              |              |              |
|----------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Miscela salina (mmol L <sup>-1</sup> ) |             |             |             |             |              |              |              |              |              |              |
| NaCl                                   | 0           | 25          | 37,5        | 50          | 62,5         | 75           | 87,5         | 100          | 125          | 150          |
| CaCl <sub>2</sub>                      | 0           | 2,5         | 3,75        | 5           | 6,25         | 7,5          | 8,75         | 10           | 12,5         | 15           |
| MgSO <sub>4</sub>                      | 0           | 5           | 7,5         | 10          | 12,5         | 15           | 17,5         | 20           | 25           | 30           |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>        | 0           | 2,5         | 3,75        | 5           | 6,25         | 7,5          | 8,75         | 10           | 12,5         | 15           |
| <b>dS m<sup>-1</sup></b>               | <b>0,72</b> | <b>4,68</b> | <b>6,60</b> | <b>8,48</b> | <b>10,33</b> | <b>12,14</b> | <b>13,91</b> | <b>15,64</b> | <b>19,00</b> | <b>22,20</b> |
| NaCl (mmol L <sup>-1</sup> )           |             |             |             |             |              |              |              |              |              |              |
| NaCl                                   | 0           | 50          | 62,5        | 75          | 87,5         | 100          | 125          | 150          | 250          |              |
| <b>dS m<sup>-1</sup></b>               | <b>0,72</b> | <b>5,67</b> | <b>6,85</b> | <b>8,00</b> | <b>9,12</b>  | <b>10,22</b> | <b>12,47</b> | <b>14,67</b> | <b>23,73</b> |              |
| NaCl (mmol L <sup>-1</sup> )           |             |             |             |             |              |              |              |              |              |              |
| NaCl                                   | 0           | 50          | 62,5        | 75          | 87,5         | 100          | 125          | 150          | 250          |              |
| <b>dS m<sup>-1</sup></b>               | <b>0,72</b> | <b>5,67</b> | <b>6,85</b> | <b>8,00</b> | <b>9,12</b>  | <b>10,22</b> | <b>12,47</b> | <b>14,67</b> | <b>23,73</b> |              |

**Tabella 11. Valori di conduttanza ottenuti mediante l'aggiunta di sali al terreno MS.** Dopo aver aggiunto a piastre e capsule già contenenti un opportuno volume di acqua agarizzata lo stesso volume di terreno contenente concentrazioni doppie di sali rispetto a quelle volute (in modo che si ottenesse una diluizione 1:1) e aver lasciato per 24 h che i sali si distribuissero uniformemente, la conduttanza nella fase liquida è stata misurata con un conduttimetro, ottenendo i valori riportati.

Nelle determinazioni condotte in piastra, il piano sperimentale consisteva in uno schema randomizzato a blocchi con tre repliche per ogni trattamento. Per ogni genotipo ogni blocco comprendeva 9 piastre con 8 trattamenti salini (da 6,60 a 22,20 dS m<sup>-1</sup> e da 5,67 a 23,73 dS m<sup>-1</sup> rispettivamente per la miscela salina e il trattamento con solo sodio cloruro) e un controllo con solo il terreno MS 0,125X, la cui conduttività era pari a 0,72 dS m<sup>-1</sup> (Figura 54). Esattamente una settimana dopo la semina, è stata effettuata una raccolta distruttiva per determinare la biomassa sviluppatasi, valutando in parallelo per ogni piastra la percentuale di germinazione corrispondente (n = 3).

Dopo aver scartato i residui del seme, le radici e le parti aeree di ogni plantula venivano pesate separatamente (il numero delle plantule dipendeva nei diversi casi dal tasso di germinazione, con 10 ≤ n ≤ 60). Successivamente il materiale è stato trasferito su cartine pre-pesate di alluminio e trattato in una stufa a 90°C per 48 h per la determinazione del peso secco.

Lo stesso protocollo è stato impiegato per le plantule cresciute nei contenitori Magenta. Anche in questo caso si è utilizzato un disegno a blocchi randomizzati comprendente quattro repliche per trattamento, dove ogni blocco consisteva di un controllo e 6 trattamenti salini (da 4,7 a 22,2 dS m<sup>-1</sup>). La raccolta distruttiva è avvenuta in questo caso quando i controlli non trattati sono giunti allo stadio di terza foglia (20 ≤ n ≤ 60 in base al tasso di germinazione), circa due settimane dopo la semina.



**Figura 54. Modalità di crescita delle piantine di riso.** La germinazione è stata fatta avvenire sia in capsule Petri (a sinistra) che in capsule Magenta (sopra) in presenza di concentrazioni saline crescenti, che hanno determinato i valori di conduttività specificati.

### 2.3. Crescita delle colture cellulari in sospensione liquida

Alcuni esperimenti sono stati condotti su colture cellulari in sospensione di tre delle varietà oggetto di studio (Vialone nano, Gigante Vercelli e Carnaroli). Tali colture, già disponibili nel laboratorio, erano state ottenute da callo indotto da cotiledone (Rożkowicz *et al.*, 2003). La crescita è stata fatta avvenire al buio in un incubatore termostato a 24°C in beute Erlenmeyer da 100 mL contenenti 25 mL di terreno MS (1X) addizionato con 30 g L<sup>-1</sup> di saccarosio e 2 mg L<sup>-1</sup> di acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D), poste su un agitatore (100 rpm). Le colture sono state mantenute trasferendo ogni 7 giorni una aliquota da 5 mL della sospensione cellulare in 20 mL di terreno fresco.

Condizioni di stress salino sono state anche in questo caso imposte aggiungendo al mezzo di coltura concentrazioni crescenti di NaCl/miscela salina, come indicato in Tabella 11. Ogni trattamento è stato effettuato in quintuplicato. Dopo 10 giorni di crescita le cellule sono state raccolte mediante un apparato per filtrazione sotto vuoto, lavate abbondantemente con acqua distillata, pesate, trasferite su cartine di alluminio e trattate in stufa a 90°C per 48 h per la determinazione della biomassa secca. L'inibizione della crescita risultante dai trattamenti salini è stata espressa come percentuale dell'incremento del peso secco (tolto quindi il valore corrispondente all'inoculo) rispetto al controllo non trattato.

### 2.4. Misurazione del contenuto di cationi in radici e parte aerea di plantule di riso

La valutazione della concentrazione dei cationi nei tessuti di riso è avvenuta applicando un disegno sperimentale a blocchi randomizzati che comprendeva quattro repliche per ogni trattamento. Ogni blocco includeva 24 Magenta, in cui erano stati seminati 6 genotipi diversi, ognuno dei quali veniva trattato con tre livelli salini (4,68 - 8,48 e 15,64 dS m<sup>-1</sup>).

In un primo esperimento i semi sono stati fatti germinare e crescere per 13 giorni presenza di 25 mL del solo terreno MS 0,125X. Quindi sono stati aggiunti 50 mL di terreno MS contenente (o meno) i sali, in modo da ottenere le concentrazioni finali volute. Il materiale vegetale è stato raccolto a 24 e 48 h dall'aggiunta. In un secondo esperimento i semi sono invece stati fatti germinare direttamente in presenza di concentrazioni crescenti di sali e fatti crescere per 14 giorni fino alla raccolta distruttiva.

Al momento della raccolta sono state selezionate per ogni trattamento 10 plantule cresciute uniformemente il cui apparato radicale, una volta estratto delicatamente dall'agar, è stato lavato abbondantemente per più volte con acqua deionizzata, cercando di far sì che il contenuto ionico dell'apoplasto fosse allontanato il più possibile. Il residuo del seme è stato scartato, e della plantula sono stati separati i tessuti radicali e foliari, che sono stati poi trattati separatamente. Dopo aver preso nota del peso fresco, ogni campione è stato trattato in stufa come descritto per ottenere il corrispondente peso secco.

Il materiale così ottenuto è stato quindi sottoposto ad analisi ionomica. I processi di mineralizzazione e di determinazione del contenuto dei cationi mediante spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) sono stati condotti presso il laboratorio del Prof. G.A. Sacchi dell'Università di Milano (Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali - Produzione, Territorio e Agroenergia).

A questo fine il materiale vegetale essiccato è stato posto in tubi di Teflon contenenti 10 mL di HNO<sub>3</sub> 65% e trasferito in stufa per fare avvenire il processo di mineralizzazione grazie alla potenza sviluppata da un digestore a microonde (Anton Paar Multiwave 3000) applicando il seguente trattamento:

- da 0 a 500 W in 10 min
- 500 W mantenuti per 5 min
- Da 500 W a 1200 W in 10 min
- 1200 W mantenuti per 15 min

Dopo 20 min di raffreddamento, i campioni mineralizzati sono stati trasferiti in tubi di polipropilene, diluendo 1:20 con acqua Milli-Q; la concentrazione dei diversi cationi è stata misurata per mezzo di un apparato ICP-MS (Varian 820 ICP-MS). Ogni 15 corse la macchina veniva ricalibrata grazie a una soluzione standard che conteneva 2 mg L<sup>-1</sup> di <sup>45</sup>Sc, <sup>89</sup>Y e <sup>159</sup>Tb. Le condizioni di analisi sono riportate in Tabella 12.

## **2.5. Analisi mediante *Western blot* dei livelli di alcuni enzimi antiossidanti**

Per verificare l'eventuale incremento dei livelli di espressione di alcuni enzimi antiossidanti in risposta allo stress salino, i corrispondenti livelli di proteina sono stati determinati mediante immunoanalisi. Ciò è stato reso possibile dalla disponibilità di anticorpi policlonali commerciali (Tabella 13) indotti contro proteine di vegetali superiori o di alghe unicellulari, che secondo le informazioni fornite dalla casa produttrice (Agrisera, Vännas, Sweden) avrebbero dovuto cross-reagire anche con gli enzimi di riso.

### **2.5.1. Estrazione dei tessuti vegetali e preparazione dei campioni per l'elettroforesi**

Plantule cresciute in capsule Magenta e sottoposte o meno a stress osmo-salino sono state raccolte e si è diviso l'apparato radicale dalla parte aerea. Dopo aver pesato il materiale, questo è stato omogenato per 2 min in un mortaio di porcellana precedentemente equilibrato in ghiaccio insieme a 2 g g<sup>-1</sup> di sabbia di quarzo e 6 mL g<sup>-1</sup> di tampone Tris HCl 50 mM, pH 7,8 (tampone di estrazione). Dopo aver aggiunto altri 6 volumi di tampone di estrazione, i campioni sono stati trasferiti in provette tipo Eppendorf da 1,5 mL e centrifugati a 16000 g per 3 min con una centrifuga da banco a temperatura ambiente. Il supernatante è stato raccolto, misurato, trasferito in altre provette e equilibrato in ghiaccio. Le proteine in esso contenute sono state precipitate per mezzo della tecnica del *salting out* con ammonio solfato. A questo fine agli estratti è stata aggiunta una quantità di sale (436 mg mL<sup>-1</sup>) pari al 70% della soluzione satura. Il materiale uscito di soluzione è stato sedimentato per centrifugazione con le stesse modalità descritte in precedenza. Il supernatante è stato accuratamente eliminato, e il sedimento è stato risospeso in un piccolo volume (da metà a un decimo di quello originale) di tampone di estrazione.

---

**Parametri**

|                                  |                                |                                                     |
|----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------------|
| <u>Strumento:</u>                | ICP-QMS instrument             | Varian 820-MS                                       |
| <u>Analisi Quantitativa:</u>     | Punti per picco                | 1                                                   |
|                                  | Repliche                       | 10                                                  |
|                                  | Campioni                       | 5                                                   |
| <u>Plasma:</u>                   | Flusso del plasma              | 18 L min <sup>-1</sup>                              |
|                                  | Flusso ausiliario              | 1,8 L min <sup>-1</sup>                             |
|                                  | Flusso nebulizzatore           | 0,9 L min <sup>-1</sup>                             |
|                                  | Flusso nella guaina            | 0,25 L min <sup>-1</sup>                            |
|                                  | Potenza                        | 1,4 kW                                              |
| <u>Profondità campionamento:</u> | 7 mm                           |                                                     |
| <u>CRI*:</u>                     | Gas collisionale (He)          | 25 mL min <sup>-1</sup>                             |
|                                  | Gas reattivo (H <sub>2</sub> ) | 60 mL min <sup>-1</sup>                             |
| <u>Prelievo :</u>                | Generazione aerosol            | Nebulizzatore                                       |
|                                  | Fonte                          | Autocampionatore                                    |
|                                  | Spray chamber (T°)             | 3°C                                                 |
|                                  | Periodo prelievo               | 45 secondi                                          |
|                                  | Tempo di scansione             | 1043 ms                                             |
|                                  | Ripetizione                    | 11 secondi                                          |
|                                  | <u>Isotopi monitorati:</u>     | <sup>23</sup> Na, <sup>24</sup> Mg, <sup>39</sup> K |

---

**Tabella 12. Condizioni operative della ICP-MS.** Per l'analisi quantitativa del contenuto cationico nelle radici e nella parte aerea delle plantule di riso cresciute in presenza di concentrazioni saline crescenti sono state impiegate le condizioni indicate. CRI\* viene definito come interfaccia di reazione collisionale ed è un approccio utilizzato in spettrometria di massa per abbassare le interferenze degli ioni poliatomici.

Una volta determinato il contenuto proteico dei campioni in tal modo ottenuti, essi sono stati diluiti con altro tampone in modo da normalizzare la concentrazione di proteine a 20 mg mL<sup>-1</sup> per gli estratti da foglia e a 10 mg mL<sup>-1</sup> per quelli da radice. Questi preparati sono stati uniti a un uguale volume di *SDS-loading buffer* (125 mM Tris-HCl pH 6,8 contenente 4% SDS, 20% glicerolo, 10% β-mercaptoetanolo e 2 mg mL<sup>-1</sup> blu di bromofenolo) e trattati a 95°C per 5 min. In questo modo le proteine sono denaturate termicamente e ricoperte in modo uniforme dal detergente, che conferisce loro una carica negativa proporzionale alla loro massa; l'inclusione dell'agente riducente consente poi la riduzione di eventuali ponti disolfuro intra o intermolecolari, disaggregando le proteine oligomeriche e impedendo che rimangano parziali strutture terziarie. Una volta riportati a temperatura ambiente, i preparati sono stabili e possono essere conservati senza particolari accorgimenti fino all'analisi.



### 2.5.2. Elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)

Prima dell'immunostaining le proteine sono state frazionate mediante elettroforesi in condizioni denaturanti, utilizzando un sistema discontinuo in un apparato per gel 20 x 20 cm, usando spaziatori da 1 mm. In base alla massa della proteina da quantificare, è stato allestito un *separating gel* al 12% (se < 50 kDa) o al 10% (se > 50 kDa, come per GR e CAT) di poliacrilammide, con le modalità indicate nella Tabella 14. Dopo aver fatto polimerizzare sopra questo uno strato di *stacking gel* idoneo alla formazione di pozzetti da 50 µL e aver completato il montaggio dell'apparato grazie all'aggiunta di 100 mL nel comparto superiore e 150 mL in quello inferiore di *SDS tank buffer* (25 mM Tris-192 mM glicina, pH 8,3 contenente lo 0,1% SDS), 40 µL dei diversi campioni sono stati caricati nei pozzetti per mezzo di una siringa Hamilton. La corsa elettroforetica è stata fatta avvenire a temperatura ambiente a 8 mA costanti fino a quando il *tracking dye* non segnala l'ingresso dei campioni nel *separating gel*, momento in cui l'amperaggio è stato aumentato a 12 mA. La corsa è stata considerata finita quando il fronte del colorante era a 1 cm dalla base del gel. Durante la corsa elettroforetica il voltaggio aumentava progressivamente fino a raggiungere circa 160 V.

Per aver un confronto il più attendibile possibile tra i diversi trattamenti, i campioni da paragonare sono stati sempre analizzati in un'unica corsa elettroforetica.

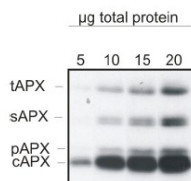
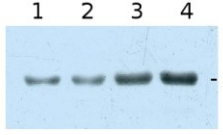
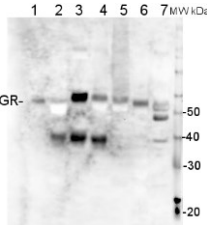
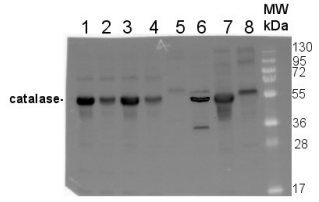
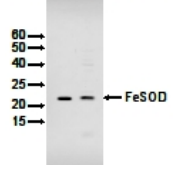
### 2.5.3. Western blotting

Circa 20 min prima del termine della corsa si pone con pinze e guanti un foglietto di nitrocellulosa in tampone di trasferimento (25 mM Tris-192 mM glicina, pH 8,3, contenente metanolo 10%) lasciando in agitazione per 15 minuti e quindi sotto vuoto per 5 minuti. Anche il gel, una volta tolto dall'apparato, è riequilibrato per 5 min nello stesso tampone allo scopo di lavare via l'SDS. Quindi viene allestito il "sandwich" sovrapponendo nell'ordine: una spugnetta imbibita di tampone di trasferimento, un foglio di carta 3MM, il gel, la nitrocellulosa, un secondo foglio di carta 3MM e la seconda spugna. All'aggiunta di ogni elemento viene fatta scorrere su di esso una bacchetta di vetro, eliminando così le bolle di aria che si potrebbero formare e che interferirebbero con il trasferimento delle proteine. Quindi il sandwich viene inserito nell'apposito apparato e l'elettrotrasferimento è lasciato procedere a temperatura ambiente *overnight* a 10 mV costanti.

### 2.5.4. Immunostaining con fosfatasi alcalina

Il giorno seguente si smonta il sandwich dall'apparato; il foglietto di nitrocellulosa viene trasferito in un contenitore delle stesse dimensioni e saturato per 60 min in 10 mL di TBS (*Tris Buffered Saline*, 10 mM Tris-HCl pH 7,5 contenente 150 mM NaCl) a cui è stato aggiunto il 3% (p/v) di albumina di siero bovina (BSA). Al resto del TBS viene nel frattempo aggiunto lo 0,2% di Tween 20, e si preparano due aliquote da 9 mL del tampone ottenuto contenenti lo 0,5% di BSA. Al termine della saturazione la nitrocellulosa viene sciacquata velocemente tre volte con TBS, e incubata per 120 min nei primi 9 mL di TBS-0,5% BSA con 4 µL di anticorpo primario. Si effettuano quindi tre lavaggi da 10 minuti in 20 mL di TBS, e si incuba altri 120 min con gli altri 9 mL di TBS-0,5% BSA a cui sono stati aggiunti 2 µL di anticorpo secondario (rabbit anti-mouse IgG coniugato con fosfatasi alcalina, Sigma A4312). Si effettuano infine 3 lavaggi da 10 min in TBS.

Durante l'ultimo lavaggio si prepara la soluzione di sviluppo: a 19 mL di tampone per fosfatasi alcalina (0,1 M Tris-HCl, pH 9,5, contenente 0,1 M NaCl e 5 mM MgCl<sub>2</sub>) si uniscono 600 µL di una soluzione 33 mg mL<sup>-1</sup> di nitroblu di tetrazolio (NBT) in 50% dimetilformammide e 400 µL di una soluzione 41 mg mL<sup>-1</sup> di bromo-cloro-indol fosfato (BCIP) in dimetilformammide, equilibrando a 37°C. Il foglietto di nitrocellulosa viene quindi posto per 5 min in 20 mL di tampone per fosfatasi alcalina. La soluzione di sviluppo viene versata nella vaschetta, agitando fino alla comparsa delle bande.

| Enzima                                    | Abbr. (kDa)    | Codice   | Reattività confermata                                                                                                                                               | Reattività prevista                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------------------------|----------------|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| L-ascorbato perossidasi                   | APX (25 kDa)   | AS08 368 | <i>A. thaliana</i> , <i>N. tabacum</i> , <i>S. vulgaris</i>                                                                                                         | <i>O. sativa</i> , <i>S. lycopersicum</i>                                                                                 |  <p>Da 5 a 20 µg di proteine totali da estratto foliare di <i>A. thaliana</i></p>                                                                                                                        |
| Mn superossido dismutasi                  | MnSOD (25 kDa) | AS09 524 | <i>A. thaliana</i> , <i>A. maritima</i> , <i>P. sativum</i>                                                                                                         | <i>H. vulgare</i> , <i>O. sativa</i> , <i>T. aestivum</i> , <i>Z. mays</i> , <i>P. sitchensis</i> , <i>P. balsamifera</i> |  <p>5 µg (1,2), 10 µg (3, 4) of total protein from <i>Pisum sativum</i></p>                                                                                                                              |
| Cu/Zn superossido dismutasi cloroplastica | CSD2 (20 kDa)  | AS06 170 | <i>A. thaliana</i> , <i>O. sativa</i> , <i>Populus</i> sp.                                                                                                          | <i>Z. mays</i> , <i>P. pinaster</i>                                                                                       | Non Disponibile                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Glutazione reductasi                      | GR (54 kDa)    | AS06 181 | <i>N. tabacum</i> , <i>S. vulgaris</i> , <i>S. tuberosum</i> , <i>Z. mays</i>                                                                                       | <i>H. vulgare</i> , <i>O. sativa</i> , <i>P. balsamifera</i>                                                              |  <p>10 µg di proteine totali da (1) <i>A. thaliana</i>; (2) <i>N. tabacum</i>; (3) <i>Z. mays</i>; (4) <i>H. vulgare</i>; (5) <i>P. patens</i>; (6) <i>C. reinhardtii</i>; (7) <i>S. elongatus</i></p>  |
| Catalasi                                  | CAT (57 kDa)   | AS09 501 | <i>A. thaliana</i> , <i>B. oleracea</i> , <i>H. vulgare</i> , <i>N. bentamina</i> , <i>O. sativa</i> , <i>S. lycopersicum</i> , <i>S. oleracea</i> , <i>Z. mays</i> | <i>G. mexicanum</i> , <i>V. vinifera</i>                                                                                  |  <p>10 µg di proteine totali da <i>A. thaliana</i> Col0 (1), Cat2-(Col0) (2), Ler0 (3), Cat2-(Ler0) (4), <i>Z. mays</i> (5), <i>O. sativa</i> (6), <i>B. oleracea</i> (7), <i>N. bentamina</i> (8)</p> |
| Fe superossido dismutasi cloroplastica    | FeSOD (23 kDa) | AS06 125 | <i>A. maritima</i> , <i>A. thaliana</i> , <i>C. reinhardtii</i> , <i>Z. mays</i>                                                                                    | <i>G. max</i> , <i>S. lycopersicum</i>                                                                                    |  <p>5 µg di proteine stromali da <i>C. reinhardtii</i> (sinistra) e <i>A. thaliana</i></p>                                                                                                             |

**Tabella 13. Anticorpi utilizzati per la determinazione dei livelli degli enzimi antiossidanti potenzialmente coinvolti nella risposta allo stress salino in riso.** Sono specificate la massa molecolare relativa degli enzimi il cui riconoscimento è atteso in *Arabidopsis*, e le reattività confermate o attese nei confronti di quelli di altre specie vegetali. Dove disponibili, vengono riportate le immagini dei *Western Blots* fornite dalla ditta che li commercializza (Agrisera, Vännas, Sweden).

| Composto                                         | Separating gel    |                   | Stacking gel     |
|--------------------------------------------------|-------------------|-------------------|------------------|
|                                                  | Gel 10% Acril-Bis | Gel 12% Acril-Bis | Gel 5% Acril-Bis |
| Acqua distillata                                 | 15,6 mL           | 14 mL             | 3,66 mL          |
| Separating gel buffer 4x (1,5 M Tris-HCl pH 8,8) | 8 mL              | 8 mL              | 1,5 mL*          |
| SDS 10%                                          | 320 µL            | 320 µL            | 60 µL            |
| Acrilamide-bis Sigma al 40%                      | 8 mL              | 9,6 mL            | 750 µL           |
| Degasare per 5 minuti                            |                   |                   |                  |
| Ammonio persolfato 10%                           | 250 µL            | 250 µL            | 60 µL            |
| TEMED                                            | 36 µL             | 36 µL             | 15 µL            |

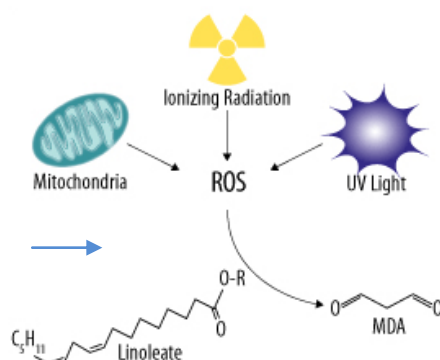
**Tabella 14. Composizione di *separating* e *stacking* gel.** Sono riportati, nell'ordine di aggiunta, le varie soluzioni usate per preparare il *separating* e lo *stacking gel* alle concentrazioni indicate di acrilammide. La soluzione di ammonio persolfato deve essere preparata fresca ogni volta. Il volume finale del gel era di circa 34 mL (30 mL di *separating* + 4 mL di *stacking*). \*Il tampone per lo *stacking gel* (0,5 M Tris-HCl pH 6,8) è diverso da quello utilizzato per il *separating gel*.

Al termine, si elimina la mix e la reazione viene bloccata con 20 mL di soluzione bloccante (20 mL di TBS contenente 20 mM EDTA) per almeno 1 min. Dopo 3-4 lavaggi in acqua distillata il blot viene infine fatto asciugare su carta da filtro, e conservato a temperatura ambiente al buio.

Sui blots così ottenuti è stata condotta un'analisi densitometrica utilizzando il software *imageJ* (National Institutes of Health), che fornisce i valori di intensità per ogni banda analizzata e quindi una stima semi-quantitativa della proteina presente nell'estratto.

## 2.6. Misurazione delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARs)

La quantificazione delle sostanze derivanti dalla perossidazione delle membrane lipidiche, come la malondialdeide (MDA) (Figura 55), può essere realizzata con numerosi metodi descritti in letteratura; quello adottato nel presente lavoro si basa sulla misurazione delle sostanze capaci di reagire con l'acido tiobarbiturico, i cosiddetti TBARs.



**Figura 55. Meccanismo semplificato di formazione della malondialdeide.** Tale composto deriva dal catabolismo ossidativo dei lipidi di membrana che può essere causato da diverse tipologie di stress (Immagine da R&D systems- TOCRIS).

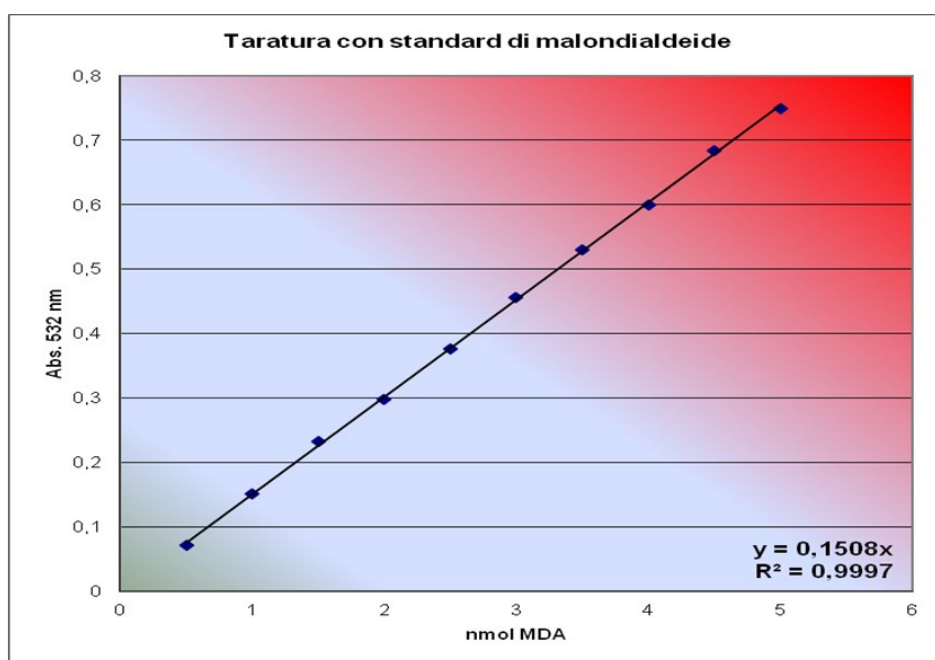
A questo fine il materiale vegetale è stato pesato, posto in un mortaio precedentemente equilibrato in ghiaccio insieme a 2 mL g<sup>-1</sup> di acido tricloroacetico (TCA) allo 0,1% (p/v) e 2 g g<sup>-1</sup> di sabbia di quarzo. Il tutto viene omogenato con un pestello per almeno 1 min, trascorso il quale si recupera l'omogenato e lo si trasferisce in provette tipo Eppendorf da 1,5

mL. Il campione viene centrifugato per 3 min a 14000 g in una centrifuga da banco, e il supernatante così ottenuto è trasferito in una nuova provetta e mantenuto in ghiaccio fino all'analisi, che è stata comunque effettuata entro poche ore dall'estrazione. Il piano sperimentale prevedeva per ogni trattamento l'analisi indipendente di 10 plantule, di cui è stato analizzato separatamente il tessuto radicale da quello foliare.

Per l'analisi dei TBARs si allestivano quindi delle miscele di reazione in provette tipo Eppendorfs da 200  $\mu$ L costituite da:

- 40  $\mu$ L di campione, opportunamente diluito con TCA 0,1%
- 80  $\mu$ L di TCA 20%
- 80  $\mu$ L di una soluzione fresca di acido tiobarbiturico allo 0,67% (p/v)

L'ordine dell'aggiunta dei componenti alla miscela influisce sul risultato. I campioni così preparati sono stati immediatamente letti allo spettrofotometro in cuvette in grado di leggere campioni da 50 a 200  $\mu$ L (*UVette*, Eppendorf) a 532 nm contro un bianco costituito da TCA 0,1%, in modo da poter sottrarre l'assorbanza non dovuta alla reazione specifica. Questa è stata quindi fatta avvenire a 70°C per 30 min in un termoblocco (PTC-100 MJ Research), trascorsi i quali i campioni sono centrifugati per 1 min a 14000 g e nuovamente letti. I valori ottenuti per differenza con il tempo 0 sono stati poi interpolati con una retta di taratura ottenuta facendo reagire concentrazioni note di uno standard puro di MDA (Sigma-Aldrich 63287) (Figura 56).



**Figura 56. Curva di taratura del saggio TBARs.** L'analisi di volumi crescenti di uno standard a titolo noto di malondialdeide consente di identificare la relazione tra assorbanza e concentrazione.

## 2.7. Determinazione dell'attività della superossido dismutasi

Per discriminare l'apporto delle diverse forme isoenzimatiche delle SOD all'attività complessiva presente negli estratti grezzi si è seguito un protocollo in cui lo stesso estratto viene saggiato in parallelo in presenza di inibitori specifici per le diverse isoforme, secondo il quadro riportato in Tabella 15.

### 2.7.1. Preparazione degli estratti

Le plantule vengono raccolte, pesate e poste in mortaio precedentemente equilibrato in ghiaccio insieme a 6 mL  $g^{-1}$  di tampone di estrazione (50 mM Tris-HCl, pH 7,8) e 2 g  $g^{-1}$  di

sabbia di quarzo. Dopo aver omogenato con il pestello per 1 min vengono aggiunti ulteriori 6 volumi di tampone di estrazione e si continua a omogenare per almeno altri 30 sec. Quindi l'estratto è trasferito in provette tipo Eppendorf da 1,5 mL e centrifugato per 3 min a 14000 g. Il supernatante viene recuperato, misurato e addizionato con 436 mg mL<sup>-1</sup> di ammonio solfato. Una volta sciolto il sale, le proteine precipitate per l'effetto di *salting out* sono state sedimentate per centrifugazione 3 min a 14000 g, e il supernatante è stato scartato. Il sedimento è stato risospeso in 0,4 mL di tampone di estrazione. Un'aliquota da 10 µL dell'estratto così ottenuto è stata ulteriormente diluita 1:10 con tampone di estrazione e impiegata per la quantificazione delle proteine. Il resto è stato usato per il saggio di attività. Per ogni trattamento sono state eseguite 6 repliche indipendenti.

| Inibitore                                   | SOD inibita | SOD attiva      |
|---------------------------------------------|-------------|-----------------|
| controllo                                   | -           | Cu/Zn + Fe + Mn |
| 3mM KCN                                     | Cu/Zn       | Fe + Mn         |
| 5mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>           | Fe          | Cu/Zn + Mn      |
| 5mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 3mM KCN | Cu/Zn + Fe  | Mn              |

**Tabella 15. Inibitori specifici delle superossido dismutasi vegetali.** Aggiungendo alla miscela di saggio diverse combinazioni di tali molecole è possibile discriminare l'attività delle diverse isoforme (Chang-Quan *et al.*, 2008).

### 2.7.2. Saggio di attività *in vitro* della superossido dismutasi

Il saggio è stato standardizzato mediante l'uso di piastre a 96 pozzetti, consentendo di eseguire in un tempo ragionevole l'elevato numero di saggi richiesti per la determinazione delle singole isoforme. Dati preliminari hanno evidenziato un livello trascurabile di Fe-SOD, dal momento che i valori ottenuti in presenza di 5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> non si discostavano significativamente da quelli in sua assenza. Nel protocollo standard, quindi, si è deciso di non quantificare questa forma di SOD.

Negli 8 pozzetti di una colonna di una piastra sono stati posti volumi crescenti di uno stesso estratto; nella colonna adiacente è stato fatto lo stesso, ma aggiungendo KCN 3 mM (20 µL di una soluzione 30 mM). Lo schema veniva ripetuto nelle colonne adiacenti, permettendo di analizzare sei estratti contemporaneamente (Figura 57).

|   | 1             | 2             | 3              | 4              | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---------------|---------------|----------------|----------------|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | 0/60;20/0;40  | 0/60;0/20;40  | 0/60;20/0;40   | 0/60;0/20;40   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| B | 2/58;20/0;40  | 2/58;0/20;40  | 2*/58;20/0;40  | 2*/58;0/20;40  |   |   |   |   |   |    |    |    |
| C | 4/56;20/0;40  | 4/56;0/20;40  | 4*/56;20/0;40  | 4*/56;0/20;40  |   |   |   |   |   |    |    |    |
| D | 8/52;20/0;40  | 8/52;0/20;40  | 8*/52;20/0;40  | 8*/52;0/20;40  |   |   |   |   |   |    |    |    |
| E | 16/44;20/0;40 | 16/44;0/20;40 | 16*/44;20/0;40 | 16*/44;0/20;40 |   |   |   |   |   |    |    |    |
| F | 32/28;20/0;40 | 32/28;0/20;40 | 32*/28;20/0;40 | 32*/28;0/20;40 |   |   |   |   |   |    |    |    |
| G | 60/0;20/0;40  | 60/0;0/20;40  | 60*/0;20/0;40  | 60*/0;0/20;40  |   |   |   |   |   |    |    |    |
| H | 0/60;20/0;40  | 0/60;0/20;40  | 0/60;20/0;40   | 0/60;0/20;40   |   |   |   |   |   |    |    |    |

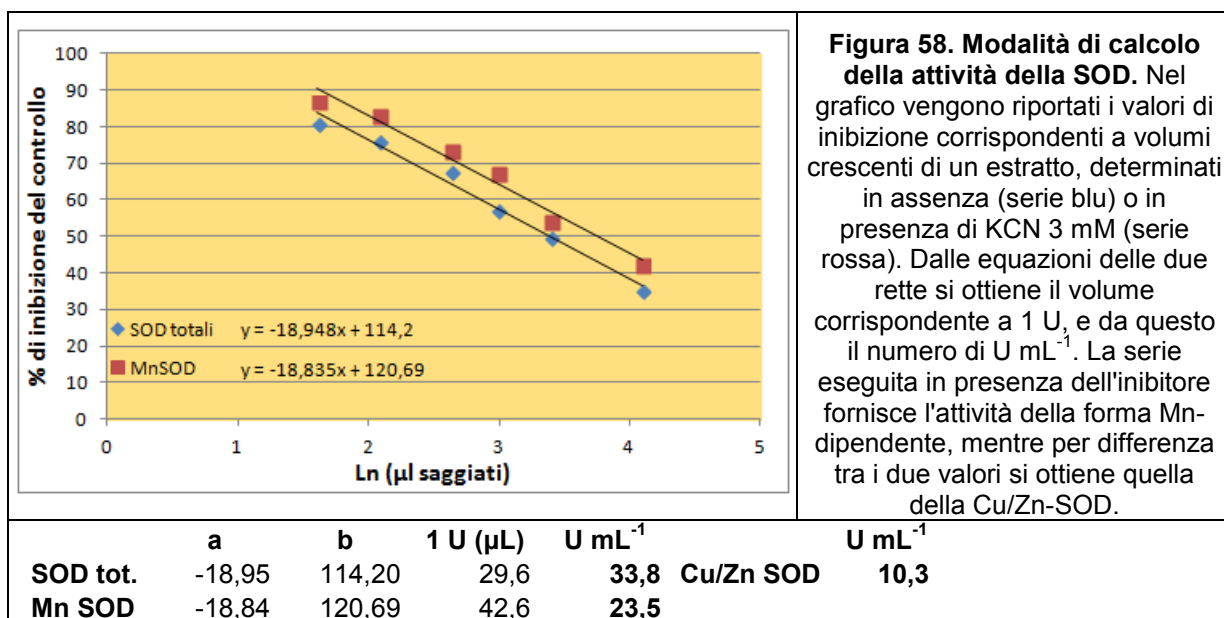
**Figura 57. Schema dell'analisi dell'attività SOD in una micropiastra a 96 pozzetti.** I volumi di estratto sono indicati in colore verde, quelli di tampone di estrazione in nero, l'acqua in blu e l'inibitore in rosso. Ai 120 µL di questa parte variabile sono stati poi aggiunti 80 µL di miscela, dando il via alla reazione. Le righe A e H rappresentano i bianchi in assenza di estratto. Due colonne adiacenti, evidenziate con la stessa tonalità di giallo, contengono il medesimo estratto.

A parte è stata allestita una miscela di reazione aggiungendo nell'ordine (volumi necessari per una singola piastra da 96 pozzetti):

- 1 mL tampone 1 M Tris-HCl, pH 7,8 (10  $\mu$ L x pozzetto)
- 2 mL acqua distillata (20  $\mu$ L)
- 1 mL EDTA 2 mM, pH 8.0 (10  $\mu$ L)
- 2 mL metionina 150 mM (20  $\mu$ L)
- 2 mL riboflavina 0,6 mM (20  $\mu$ L)

Dopo aver scaldato la miscela a 37°C per 5 min, schermandola dalla luce per mezzo di un foglio di stagnola, si aggiunge 1 mL di nitroblu di tetrazolio (NBT) 2,25 mM; aliquote da 80  $\mu$ L della miscela completa vengono rapidamente aggiunte in ogni pozzetto per mezzo di una pipetta a 8 canali. La piastra è stata quindi illuminata con luce a elevata fluena, ponendo due lampade alogene posizionate perpendicolarmente a una distanza di circa 10 cm. La luce innesca la formazione di radicali sviluppati dalla riboflavina che reagiscono con l'NBT, provocando la formazione di NBT-diformazano, un composto di colore marrone con un picco di assorbimento a 560 nm. Dopo 1 min esatto, la reazione viene bloccata spegnendo la luce e l'assorbanza di ogni pozzetto viene determinata mediante un lettore di micropiastre LEDETECT 96 (Labexim, Vienna) equipaggiato con un filtro da 560 nm. La procedura viene iterata per 8 volte, sempre illuminando per 1 min tra una lettura e l'altra.

In presenza di livelli crescenti di SOD si ha una progressiva dismutazione dei radicali prodotti, e quindi una proporzionale diminuzione della formazione di NBT-diformazano. Un'unità enzimatica è stata pertanto definita come la quantità di enzima necessaria per causare il 50% di inibizione della velocità di comparsa del prodotto colorato. Per calcolarla, i valori di inibizione percentuale della formazione di NBT-diformazano vengono posti in relazione al logaritmo naturale del volume di estratto saggiato. Dall'equazione della retta interpolante i punti sperimentali si ricava la quantità di estratto che inibisce al 50% la comparsa del prodotto, corrispondente a 1 U di attività SOD (Figura 58).



**Figura 58. Modalità di calcolo della attività della SOD.** Nel grafico vengono riportati i valori di inibizione corrispondenti a volumi crescenti di un estratto, determinati in assenza (serie blu) o in presenza di KCN 3 mM (serie rossa). Dalle equazioni delle due rette si ottiene il volume corrispondente a 1 U, e da questo il numero di U mL<sup>-1</sup>. La serie eseguita in presenza dell'inibitore fornisce l'attività della forma Mn-dipendente, mentre per differenza tra i due valori si ottiene quella della Cu/Zn-SOD.

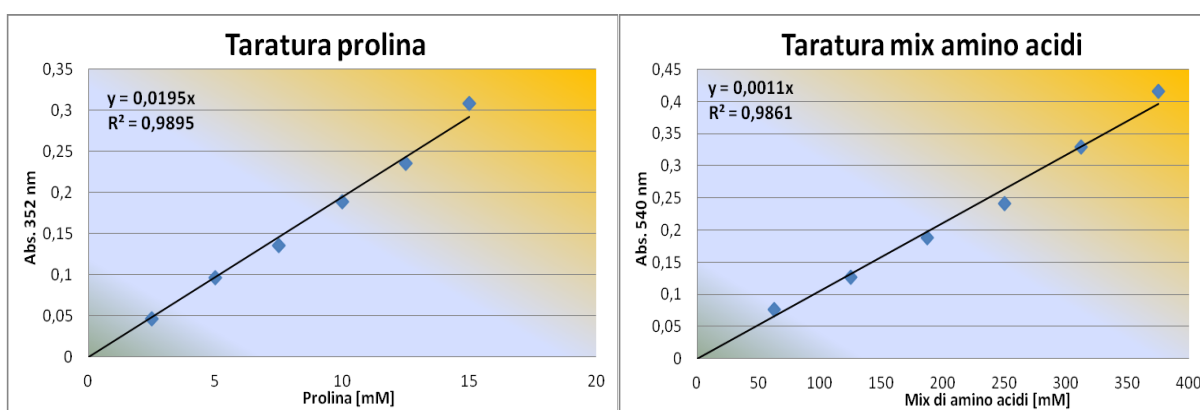
## 2.8. Determinazione del contenuto cellulare di prolina e degli amminoacidi liberi

Ai fini della valutazione del contenuto amminoacidico, il materiale vegetale è stato pesato ed estratto in mortaio in 2 mL g<sup>-1</sup> di una soluzione al 3% (p/v) di acido sulfosalicilico e

2 g g<sup>-1</sup> di sabbia di quarzo. Prove preliminari, non riportate, hanno evidenziato una migliore efficienza di questo metodo rispetto ad altri (ad esempio l'estrazione con un omogenizzatore Potter) per l'estrazione dei tessuti foliari e radicali con un basso rapporto tra volume di estrazione e biomassa. Una volta preparato, l'estratto viene centrifugato in una centrifuga da tavolo a 14000 g per tre min, consentendo la sedimentazione della maggior parte delle proteine (che precipitano in ambiente acido) e del materiale insolubile, mentre gli aminoacidi liberi rimangono nella fase liquida. Il supernatante viene quindi analizzato o conservato a -20°C fino all'utilizzo. Per ogni trattamento sono state eseguite 10 repliche indipendenti.

### 2.8.1. Metodo della ninidrina acida

La determinazione della prolina libera e degli aminoacidi totali è avvenuta modificando il metodo descritto da Bates (Bates *et al.*, 1973) in accordo con Williams e Frank (1975). Il saggio è di tipo spettrofotometrico e segue la comparsa di un addotto di colore giallo proporzionale al contenuto di prolina, con un massimo di assorbimento a 352 nm. La stessa procedura, con minore efficienza, determina la formazione di un addotto di colore viola con tutti gli altri aminoacidi, con un massimo di assorbimento a 540 nm. Visto l'elevato numero di campioni, si è messo a punto un metodo che prevede l'impiego di piastre a 96 pozzetti. Diluizioni opportune di ogni campione in un volume finale di 15 µL sono poste in ogni pozzetto, e vengono aggiunti in sequenza un pari volume di una soluzione di sodio acetato 3 M e 0,2 mL di reattivo formato da 0,15% ninidrina (p/v) in acido acetico glaciale. Quindi si fa procedere la reazione a 50°C per 15 min. Una volta portati a temperatura ambiente i campioni vengono letti mediante un lettore di micropiastre LEDETECT 96 (Labexim) dotato di filtri a una lunghezza d'onda di 352 nm per la quantificazione della prolina e a 540 nm per la quantificazione degli aminoacidi totali. Ai valori ottenuti sono sottratti quelli determinati al T0, prima di far avvenire la reazione a 50°C, così da eliminare l'interferenza dovuta alla presenza negli estratti di sostanze capaci di assorbire la luce alle stesse lunghezze d'onda. Per ogni campione sono state analizzate da 4 a 8 diverse diluizioni. In alcuni casi, la reazione è stata fatta avvenire in provette tipo Eppendorf da 1,5 mL su aliquote da 75 µL, ma mantenendo invariato il rapporto volumetrico con le altre soluzioni (75 µL di Na acetato e 1 mL di ninidrina). Dai valori di assorbanza ottenuti è stato possibile risalire alla concentrazione aminoacidica grazie a un'interpolazione con una retta di taratura ottenuta aggiungendo quantità note di prolina (da 2,5 a 15 mM) e di una miscela di aminoacidi (da 62,5 a 375 mM) (Figura 59).



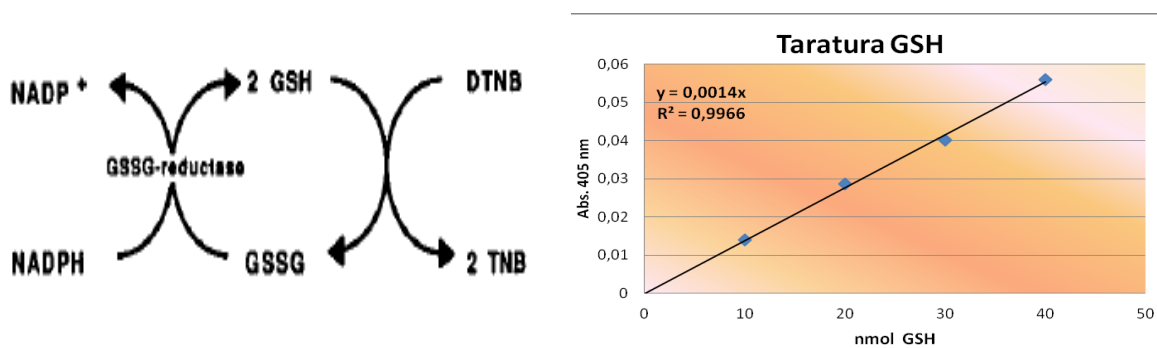
**Figura 59. Rette di taratura del metodo della ninidrina acida usato per la quantificazione della prolina e degli aminoacidi totali.** Entrambe le calibrazioni sono state eseguite in micropiastra. La taratura viene eseguita su ogni *batch* di ninidrina, dal momento che la sua scarsa solubilità fa sì che la risposta quantitativa del metodo possa variare leggermente tra le diverse preparazioni.

## 2.9. Determinazione dei livelli di glutazione ridotto e ossidato

Ai fini della determinazione contestuale di GSH e GSSG nei tessuti delle plantule di riso, il materiale vegetale è stato estratto in mortaio con 2 mL g<sup>-1</sup> di una soluzione al 5% (w/v) di acido sulfosalicilico. L'omogenato è stato trasferito in provette tipo Eppendorf da 1,5 mL e centrifugato in una centrifuga da banco per 3 min a 14000 g; il supernatante è stato quindi diviso in due aliquote: nella prima a 12,5 µL di campione è stato aggiunto uno stesso volume di una soluzione 6 mM di 1-metil-2-vinilpiridina (2VP) in 0,1 M HCl, immediatamente tamponata con l'aggiunta di 25 µL di sodio carbonato 160 mM a pH 10. Il 2VP si lega col gruppo tiolico del glutatione, bloccandone la reattività. Quindi il glutatione totale è stato quantificato in entrambe le aliquote mediante il metodo descritto da Queval e collaboratori (2007) che segue la comparsa dell'acido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) a opera della glutatione reduttasi, con una velocità proporzionale alla quantità di glutatione presente (Figura 60).

A questo fine sono state utilizzate micropiastre a 96 pozzetti, in cui vengono poste opportune diluizioni dei campioni (2,5 – 5 – 10 µL in un volume finale di 10 µL), a cui sono aggiunti 150 µL di acido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico (DTNB) 0,04 mg mL<sup>-1</sup> disciolto in tampone potassio fosfato 100 mM, pH 7,0, contenente 1 mM EDTA e 0,16 unità di glutatione reduttasi di lievito. Dopo 5 minuti la reazione è stata avviata aggiungendo 50 µL di NADPH 0,16 mg mL<sup>-1</sup> e l'aumento dell'assorbanza a 405 nm è stato monitorato per 5 minuti, eseguendo una lettura ogni minuto.

La concentrazione di glutatione totale è stata determinata interpolando la pendenza ottenuta graficando la velocità di aumento dell'assorbanza a 405 nm contro la quantità di estratto incubato con quella ottenuta analizzando allo stesso modo quantitativi noti di GSH (da 10 a 40 µM) (Figura 60). Il contenuto in GSSG è stato calcolato direttamente dall' aliquota trattata con la 2VP, mentre il GSH è ricavato per differenza fra il glutatione totale e il GSSG. Per ogni trattamento sono state eseguite 10 repliche indipendenti, ognuna rappresentata da una singola pianta.



**Figura 60. Schema della reazione utilizzata per quantificare il glutatione e curva di calibrazione ottenuta su soluzioni a titolo noto.** A sinistra viene riportata la serie di reazioni accoppiate per la quantificazione del glutatione presente nel campione, DTNB- e NADPH-dipendente, a opera della glutatione reduttasi. La reazione ricicla il glutatione con il DTNB, accumulando l'anione TNB, che ha un picco di assorbimento a 412 nm ( $\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Redegeld *et al.*, 1988). A destra è mostrata una retta di taratura ottenuta con quantità note di GSH. Per ogni piastra sono state allestite ogni volta due curve di calibrazione.

## 2.10. Determinazione dei livelli di acido ascorbico e deidroascorbico

La quantificazione dei livelli di ASA e di DHA è stata condotta modificando il metodo descritto da Gillespie e collaboratori (2007). Le singole piante sono state prelevate, pesate ed estratte per 1,5 min in mortaio equilibrato in ghiaccio con 2 mL g<sup>-1</sup> di TCA 6% (p/v) e 1 g



g<sup>-1</sup> di sabbia di quarzo. L'omogenato è quindi trasferito in provette tipo Eppendorf e centrifugato per 3 min a 14000 g in una centrifuga da banco. Questo passaggio permette la sedimentazione delle proteine, mentre gli acidi come l'ASA e il DHA rimangono in soluzione. Siccome l'ascorbato è un composto facilmente ossidabile e si voleva determinare il contenuto sia della forma ossidata che di quella ridotta, per non dare luogo ad artefatti l'analisi è stata condotta immediatamente dopo l'estrazione.

A questo fine due serie di aliquote da 5 – 7,5 – 10 µL di ogni campione sono state poste nei pozzetti di una micropiastra e portate a un volume totale di 20 µL con TCA 6%. A una serie sono stati addizionati 20 µL di tampone fosfato contenente 1 mM ditioneotritolo (DTT). Il DTT riduce tutto il DHA presente nel campione in ASA. Quindi si aggiungono 10 µL di N-etilmaleimide (NEM) 0,5% (p/v), allo scopo di rimuovere l'eccesso di DTT. Alla seconda serie sono invece stati aggiunti 20 µL di tampone fosfato e 10 µL di acqua.

A tutti i campioni sono infine aggiunti 150 µL di una miscela di reazione ottenuta mescolando (volumi necessari per l'esecuzione di una singola piastra):

- 6 mL di TCA 10%
- 4,8 mL di acido fosforico al 21% (p/v)
- 4,8 mL di 2% biperidina in acido fosforico 21% (p/v)
- 2,4 mL di FeCl<sub>3</sub> 1,5% (p/v).

La riduzione ad opera dell'ASA dello ione ferrico produce lo ione ferroso che, complessandosi con la biperidina, forma un composto con un picco di assorbimento a 525 nm.

La piastra così allestita è stata incubata per 1 h a 37°C e quindi letta a 540 nm a intervalli di 1 minuto per 5 min, in modo da verificare che il complesso si fosse completamente formato. Una retta di taratura è stata ricavata ogni volta con concentrazioni note di ascorbato (da 1 a 3 mM), e per interpolazione dei valori ottenuti analizzando gli estratti si è determinata la quantità di ascorbato totale (campioni trattati con DTT) e di ascorbato ridotto (campioni non trattati). Il deidroascorbato è stato poi calcolato per differenza.

## 2.11. Analisi dell'espressione genica tramite End Point/SQ-PCR

Per avere un'indicazione dei livelli di espressione degli enzimi coinvolti nel metabolismo della prolina in risposta a diversi valori di conducibilità del substrato si è utilizzato un protocollo di PCR semi-quantitativa dopo retrotrascrizione degli mRNA.

### 2.11.1. Estrazione dell'RNA totale

Per l'estrazione dell'RNA è stato utilizzato il "*Plant RNA Isolation Mini Kit*" (Agilent) seguendo il protocollo indicato (Figura 61). Particolare cura è stata prestata a preservare materiali e ambienti di lavoro esenti da contaminazione da parte di RNasi, maneggiando sempre tutti i materiali con i guanti, sterilizzando più volte tutto ciò che non è compreso nel kit e trattando l'acqua distillata con dietilpirocarbonato. Quantità comprese tra 50 e 60 mg di tessuto foliare sono state trasferite in un Potter da 15 mL (*Teflon-in-glass Potter homogenizer*), costituito da un pestello in Teflon mantenuto in rotazione da un motore a velocità variabile, che viene fatto scorrere su e giù nella provetta, di diametro leggermente superiore a quello del pestello. Il materiale è stato risospeso in 700 µL di *extraction solution* addizionati con 7 µL di β-mercaptoetanol, e si è proceduto a estrarre con 20 trattamenti al massimo della potenza. L'omogenato è stato trasferito nella *prefiltration column*, che è stata centrifugata per 3 min a 14000 g. Al filtrato sono stati aggiunti 600 µL di isopropanolo, e dopo aver ben mescolato il preparato è stato caricato sulla *isolation column*, facendo adsorbire mediante centrifugazione 30 sec a 14000 g. La colonnina è stata quindi lavata due volte con 500 µL di wash solution. Quindi l'RNA è stato eluito ponendo 50 µL di H<sub>2</sub>O RNase-free nella colonnina e, dopo 60 s di riequilibrio, centrifugando 1 min a 14000 g. Il preparato è stato conservato in ghiaccio e utilizzato lo stesso giorno per la retro-trascrizione. Per verificare la purezza e la concentrazione dell'RNA, una aliquota da 10 µL è stata diluita in acqua a un

volume finale di 100  $\mu\text{L}$  e letta in uno spettrofotometro UV-visibile (Ultraspec 1100 pro) a 260 e 280 nm, usando una *UVette*. I campioni sono stati considerati puri se  $A_{260}/A_{280} > 1.9$ , e la quantità è stata desunta dalla relazione  $1 A_{260} = 40 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 2.11.2. Trattamento con DNasi

Il protocollo di estrazione permette l'eliminazione quasi totale del DNA. Per evitare comunque la comparsa di prodotti di amplificazione da imputare a una contaminazione residua di pur bassi livelli di DNA, invece che all'RNA, ogni preparato è stato trattato con DNasi. Viene utilizzato a questo fine il kit *DNase I Amplification Grade* (Sigma AMPD1). In provette tipo Eppendorfs da 0,2 mL sono trasferiti nell'ordine:

- 13-N  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  *RNase-free*
- N  $\mu\text{L}$  del preparato di RNA totale corrispondente a 1  $\mu\text{g}$
- 2  $\mu\text{L}$  di 10X Reaction Buffer
- 5  $\mu\text{L}$  di DNase I.

Si mescola delicatamente e si incuba 60 minuti a 30°C. La reazione viene terminata aggiungendo 2  $\mu\text{L}$  di *Stop Solution* e trattando a 70°C in termoblocco per 10 min per inattivare l'enzima e denaturare l'RNA. I campioni sono quindi riequilibrati in ghiaccio.

#### Homogenize tissue or cells

- 1 Prepare tissue or seed homogenate in appropriate volume of Extraction Solution/ $\beta$ -ME mixture.



#### Spin through prefiltration column

- 2 Centrifuge up to 600  $\mu\text{L}$  of homogenate through the mini prefiltration column (natural) for 3 minutes at  $16,000 \times g$ .



#### Capture RNA on mini isolation column

- 3 Add an equal volume of isopropanol to the filtrate and mix until homogeneous. Incubate 5 minutes.
- 4 Apply to mini isolation column (blue) and centrifuge 30 seconds at  $16,000 \times g$ . Discard flow-through and replace RNA-loaded column in same collection tube.



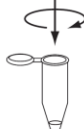
#### Wash two times and spin dry

- 5 Add 500  $\mu\text{L}$  of prepared Wash Solution to the mini isolation column and centrifuge 30 seconds at  $16,000 \times g$ . Discard flow-through and replace isolation column in the same collection tube.
- 6 Add 500  $\mu\text{L}$  wash solution and centrifuge 2 minutes at  $16,000 \times g$ .



#### Elute pure intact RNA

- 7 Elute the purified RNA by adding 10–50  $\mu\text{L}$  of nuclease-free water, waiting 1 minute, and centrifuging 1 minute at  $16,000 \times g$ .



| Leaf tissues                    | $A_{260}/A_{280}$ | $A_{260}/A_{230}$ | Yield* (ng/mg tissue) | gDNA† (pg/ $\mu\text{g}$ NA) |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|------------------------------|
| Arabidopsis                     | 2.11              | 2.29              | 512                   | 0.21                         |
| Corn                            | 2.13              | 2.31              | 346                   | 1.92                         |
| Rice                            | 2.11              | 2.35              | 1104                  | 6.26                         |
| Wheat                           | 2.14              | 2.35              | 437                   | 0.75                         |
| Cotton                          | 2.10              | 1.99              | 217                   | 11.51                        |
| Tobacco                         | 1.88              | 1.84              | 280                   | 0.77                         |
| Cucumber                        | 2.10              | 2.39              | 959                   | 2.56                         |
| Tomato                          | 2.12              | 2.30              | 613                   | 0.13                         |
| White pine (needles)            | 2.11              | 2.20              | 214                   | 3.25                         |
| <b>Nonphotosynthetic tissue</b> |                   |                   |                       |                              |
| Corn root                       | 2.12              | 2.14              | 92                    | 5.35                         |
| Arabidopsis root                | 2.12              | 2.24              | 330                   | ND                           |

**Figura 61. Protocollo del *Plant RNA Isolation Mini Kit*.** I passaggi indicati nel testo sono riportati a sinistra.

Nella tabella in alto vengono indicate le rese tipiche ottenute da diverse specie vegetali, utilizzando tessuti sia fotosintetici che non (immagine tratta dal protocollo fornito dal produttore).

### 2.11.3. Sintesi di cDNA

Per la retrotrascrizione è stato utilizzato *iScript cDNA Synthesis Kit* (BioRad 170-8890). A ogni campione si aggiungono 5,5  $\mu\text{L}$  di 5x *iScript reaction mix* e 1  $\mu\text{L}$  di trascrittasi

inversa. Dopo aver incubato per 5 min a 26°C, la reazione viene lasciata procedere a 42°C per 60 min. La sintesi di cDNA è infine terminata ponendo per 5 min a 85°C in termoblocco. Al termine il preparato viene conservato a 4°C fino all'utilizzo.

#### 2.11.4. Analisi mediante end-point PCR

Una volta ottenuto il cDNA, la sua amplificazione è stata ottenuta utilizzando le coppie di primers riportate nella Tabella 16, fatti sintetizzare da un *service* esterno (Invitrogen) e risospesi in TE a 100 µM. Per ogni coppia di primers si prepara una *working solution* 10X diluendo 10 µL di ognuna in 180 µL di acqua sterile.

Le miscele di amplificazione sono state allestite unendo 3 µL di acqua a 1 µL di *working solution* 10X contenente i primers, 1 µL di cDNA, e 5 µL di REDExtract-N-Amp™ PCR ReadyMix (Sigma R4775). La reazione è stata fatta procedere con il seguente programma: attivazione della polimerasi per 5 min a 95°C, denaturazione 1 min a 94°C, *annealing* 30 sec a 61°C e *elongation* 1 min a 72°C, ciclo ripetuto un numero variabile di volte (da 28 a 36), e *final extension* per 5 min a 72°C.

I prodotti di amplificazione sono analizzati su gel di agarosio all'1,5% (70 mL) in TAE buffer con 0,002 µg mL<sup>-1</sup> di etidio bromuro. La corsa elettroforetica è stata fatta procedere per 45 min a 40 V. Le immagini dei gel sono state ottenute sotto luce UV per mezzo di un apparato GelDoc (Bio-Rad). Sulle immagini è stata eseguita un'analisi densitometrica utilizzando il software *ImageJ*.

| Gene             | Primers             | Sequenza                  | Frammento atteso |          |
|------------------|---------------------|---------------------------|------------------|----------|
|                  |                     |                           | cDNA             | Genomico |
| <b>P5Csynth1</b> | riceP5CsynBfwd      | CGCAGGATCAATTCGTGAAATCGCA | 162              | 291      |
|                  | riceP5CsynBrev      | GCAATCTGTACCAAGGCATCAGGA  |                  |          |
| <b>P5Csynth2</b> | riceP5CsynAfwd      | GATTGGGTGCTGAGGTTGGCATAA  | 132              | ---      |
|                  | riceP5CsynArev      | CGACATCCTTGTCACCATTACCA   |                  |          |
| <b>P5Cred</b>    | riceP5Credfwd       | ATCGTAAGGCAGGTAAGTGGTTGAG | 150              | 377      |
|                  | riceP5Credrev       | AGCTGAACGGGTGTTTGGCATT    |                  |          |
| <b>OAT</b>       | riceOATfwdREAL      | GAGGGGTTTGTCTTAATGCAGTGGA | 142              | 142      |
|                  | riceOATrevREAL      | CAGCGGAGGCGCTAATCTGATTAT  |                  |          |
| <b>ProDH</b>     | riceProdhfwd        | ACGGTCCAGTGGAGCAGATCAT    | 133              | 261      |
|                  | riceProdhrevII      | AGCATTGCAGCCTTGAACCT      |                  |          |
| <b>P5CDH</b>     | riceP5Cdhfwd        | ATGCTTGCAGTGGTCAGAAGTG    | 134              | 487      |
|                  | riceP5Cdhrev        | TGGGCCAATGGTCAAGTCTTCA    |                  |          |
| <b>actin</b>     | actinriceforward    | CTGCGGGTATCCATGAGACT      | 118              | 118      |
|                  | actinricereverse    | GCAATGCCAGGGAACATAGT      |                  |          |
| <b>EF1</b>       | riceelongFactorlfwd | TCTCTGGGTTTGGAGGGTGACAACA | 94               | 94       |
|                  | riceelongFactorlrev | TTGATCTGGTCAAGAGCCTCAAGC  |                  |          |

**Tabella 16. Primers utilizzati per l'amplificazione del cDNA dei geni coinvolti nel metabolismo della prolina.** Viene indicata anche la lunghezza attesa degli amplificati, sia genomici che specifici dal cDNA. Nell'analisi sono stati inseriti anche due geni *housekeeping* (actina ed *Elongation Factor 1*). I primers sono stati disegnati avvalendosi del software AmplifX (© Nicolas Jullien 2004-2008).

#### 2.12. Clonaggio ed espressione ectopica degli enzimi coinvolti nel metabolismo della prolina in riso

Nella prospettiva di condurre un'approfondita analisi delle proprietà degli enzimi

coinvolti nel metabolismo della prolina, cloni di cDNA codificanti per i corrispondenti geni di riso di varietà *japonica* (Tabella 17) sono stati acquistati dal Rice Genome Resource Center (RGRG), appartenente all'Istituto Nazionale giapponese di Scienze Agrobiologiche (NIAS).

| Enzima                  | Classe (EC) | Massa (MW) | Prot. ID. | cDNA clone               |
|-------------------------|-------------|------------|-----------|--------------------------|
| <b>P5CS1</b>            | EC 2.7.2.11 | 79.52 kDa  | Q941T1    | J033031H21<br>J023019K03 |
| <b>P5CS2</b>            | EC 1.2.1.41 | 77.75 kDa  | O04226    | J033099M14               |
| <b>P5CR<sup>‡</sup></b> | EC 1.5.1.2  | 29.67 kDa  | Q8GT01    | J013104L18<br>J023044E03 |
| <b>P5CDH</b>            | EC 1.5.1.12 | 60,53 kDa  | B9FLB9    | J033091O16               |
| <b>PRODH</b>            | EC 1.4.3    | 51,63 kDa  | Q336U3    | J023047B13               |

**Tabella 17. Cloni di cDNA degli enzimi coinvolti nel metabolismo della prolina in riso.** Le ID sono quelle del database Uniprot (<http://www.uniprot.org>). Per le P5CS erano disponibili tre cloni, di cui il J033099M14 corrisponde alla P5CS2. ‡: 2 varianti di splicing.

Poichè tali cloni (Tabella 17) erano inseriti in un vettore (pFLC1, Tabella 18) non adatto all'espressione in un sistema eterologo, si è proceduto al loro subclonaggio in un adeguato vettore di espressione (pET151/D-TOPO, Tabella 18).

### 2.12.1. Amplificazione dei plasmidi nel ceppo DH5 $\alpha$ di *E. coli*

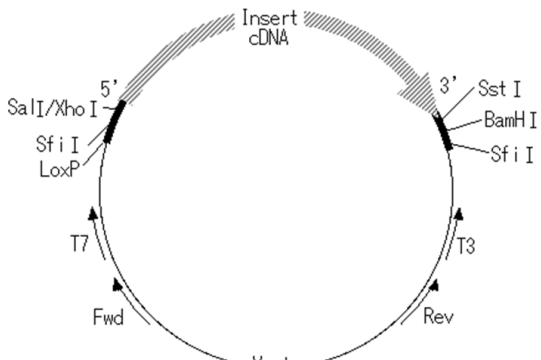
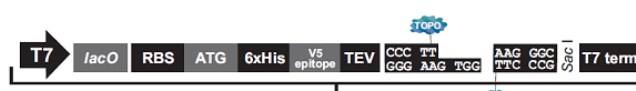
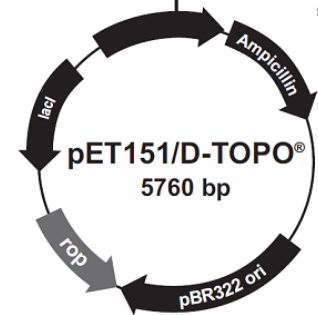
#### *Preparazione delle cellule competenti*

Da una piastra di terreno agarizzato contenente il ceppo DH5 $\alpha$  di *E. coli* si preleva una colonia che viene usata per inoculare da 10 mL di terreno LB (Tabella 19) lasciando crescere *overnight* a 37°C. Il mattino seguente si prepara una nuova beuta contenente 25 mL di LB e si effettua una diluizione tale da ottenere una densità ottica (OD) a 600 nm compresa fra 0,05 e 0,1. Quando la crescita batterica raggiunge un'OD<sub>600</sub> pari a circa 0,2 viene aggiunto l'1% (v/v) di MgCl<sub>2</sub> 2 M e si lascia ulteriormente crescere fino a un valore di OD<sub>600</sub> compreso fra 0,45 e 0,55. Le cellule sono quindi poste in ghiaccio per 90 min, trascorsi i quali vengono fatte sedimentare per centrifugazione in un tubo Nalgene per 5 min a 4000 g in una centrifuga refrigerata Sorvall RC5B a 4°C. Il supernatante viene scartato, e il pellet risospeso delicatamente in 12,5 mL (metà del volume iniziale) di soluzione Ca<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup> (Tabella 19), pre-equilibrata a 0°C. Le cellule sono quindi recuperate mediante una seconda centrifugazione per 5 min a 4000 g a 4°C, e il pellet è risospeso in 1,25 mL (5% del volume iniziale) di soluzione Ca<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>. Dopo ulteriori 60 min in ghiaccio, le cellule sono usate per la trasformazione.

#### *Trasformazione delle cellule competenti*

Il terreno SOC (Tabella 19) e le piastre di terreno LB contenente gli opportuni antibiotici (ampicillina 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) sono equilibrati a temperatura ambiente. Quindi un'aliquota da 50  $\mu\text{L}$  delle cellule divenute competenti viene posta in una provetta sterile da 15 mL, in ghiaccio, a cui viene aggiunto un appropriato quantitativo di plasmide (da 10 pg a 10 ng). Dopo aver lasciato in ghiaccio per 30 min, le cellule sono sottoposte a *heat shock* per 45 sec a 42°C, senza agitare; si aggiungono quindi immediatamente 450  $\mu\text{L}$  di SOC, e si pone per 1 h a 37°C in forte agitazione.

Aliquote da 100, 30 e 10  $\mu\text{L}$  della sospensione sono quindi piastrate su piastre selettive contenenti 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  di ampicillina, incubando *overnight* a 37°C.

| Mappa del vettore                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Caratteristiche                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>FLC1 After Excision (1st-BS, 2nd-NK/X)</p>  <p>TAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTGTGTA<sup>Fwd Primer</sup>AAACGACGGCCAGTGAATT<br/> GTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGGTGGCCGGCCGC<br/> T7 Promoter<br/> ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGGATCAGCCAAATCGGC<br/> LoxP SfiI<br/> CGAGCTCGAATTCGTCGAGTTAATTAATTAATCCCCCCCCCCC==cDNA<br/> SalI/XhoI<br/> =&gt;AAAAAAAAAAAAAAAAAGAGCTCTTGGATCCGGCCATAAGGGCGTATCCT<br/> SstI BamHI SfiI<br/> TCGAGGGGGGGCCCGGTACCAGCTTTTGTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTTC<br/> T3 Promoter<br/> GAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCG<br/> Rev Primer(1233)<br/> CTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAG</p> | <p>Nome vettore: pFLC1<br/> Vettore originale: pBluescript KS(+)<br/> 1° Primer per la costruzione di libreria a cDNA: 1°-BG primer (short poly-A)<br/> 2° Primer per la costruzione di libreria a cDNA: 2°-bird_linker primer (g-tail less)<br/> Cloning site (5' &gt; 3'): M13-21<br/> Sequenza primer (Fwd 5'): M13-21<br/> Sequenza primer (Rev 3'): 1233<br/> Scopo: creazione di librerie di cDNA</p> |
|   <p>pET151/D-TOPO®<br/>5760 bp</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <p>Nome vettore: pET151/D-TOPO<br/> Sequenza primer (Fwd 5'): T7<br/> Sequenza primer (Rev 3'): T7 Reverse<br/> Posizione peptide: N-terminale<br/> Tag di fusione: V5, 6xHis<br/> Aumento massa atteso: 4 kDa<br/> Sito di taglio: TEV proteasi<br/> Marcatore di selezione: Ampicillina<br/> Scopo: Espressione in E. coli</p>                                                                            |

**Tabella 18. Mappe e caratteristiche dei vettori utilizzati.** Il vettore pFLC1 non è adatto all'espressione delle proteina di interesse in *E. coli* poiché è privo di promotore inducibile.

#### Purificazione del DNA plasmidico

Il giorno seguente una colonia viene selezionata e fatta crescere *overnight* in 5 mL di LB contenente ampicillina 100 µg mL<sup>-1</sup>. La mattina successiva il DNA plasmidico (pDNA) viene estratto utilizzando il kit *innuPREP plasmid mini kit* (Analytik, Jena) con la seguente procedura:

- 2 mL di coltura sono centrifugate in provette tipo Eppendorf per 5 min a 12000 g, scartando il supernatante
- le cellule sedimentate sono risospese in 500 µL di *Re-suspension Buffer*, vortexando. Si aggiungono 500 µL di *Lysis Buffer* agitando dolcemente il tubo 6-8 volte, e si lascia agire al massimo per 5 min a temperatura ambiente, aggiungendo quindi 600 µL di *Neutralization Buffer*, invertendo delicatamente il tubo 6-8 volte

- dopo aver centrifugato a 12000 g per 10 min, 700 µL di supernatante limpido sono caricati sullo *Spin Filter* posto in una provetta tipo Eppendorf da 1,5 mL; dopo centrifugazione a 12000 g per 1 min, si scarta il filtrato e si ripete l'operazione col residuo del supernatante
- lo *Spin Filter* viene lavato prima con 500 µL di *Washing Solution A*, poi con 700 µL di *Washing Solution B*, centrifugando ogni volta a 12000 g per 1 min e scartando il filtrato
- lo *Spin Filter* viene infine inserito nel *Receiver Tube*, si aggiungono 50 µL di *Elution Buffer P* e, dopo 3 min, si centrifuga a 12000 g per 1 min, eluendo così il pDNA.

Per confermare la correttezza del plasmide purificato, tramite un'analisi *in silico* con il software SeqBuilder (Lasergene) si seleziona uno specifico enzima di restrizione che dia origine a un caratteristico *pattern* di bande dal pDNA. Si incuba quindi a 37°C per 2 h 1 µl di pDNA con 1 U dell'enzima selezionato e il tampone specifico da esso richiesto. Una volta terminata la reazione, il preparato viene analizzato su un gel di agarosio all'1% facendo correre a 80 mV per 40 min; dopo riequilibrio con etidio bromuro (0,002 µg mL<sup>-1</sup>) il gel è stato visualizzato al transilluminatore, verificando la comparsa delle bande attese, stimate per confronto con marcatori di peso molecolare noto (GeneRuler™ DNA ladder mix, 100-10000 bp; Fisher Scientific).

| Terreno LB                                                                                                  |                       | Soluzione Ca <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup>   |                        |            |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|------------------------------------------------|------------------------|------------|-----------|
| Componente                                                                                                  | g L <sup>-1</sup>     | Componente                                     | Concentrazione         |            |           |
| Triptone                                                                                                    | 10                    | Na-Acetato                                     | 40 mM                  |            |           |
| Estratto di lievito                                                                                         | 5                     | MnCl <sub>2</sub>                              | 70 mM                  |            |           |
| NaCl                                                                                                        | 10                    | CaCl <sub>2</sub>                              | 100 mM                 |            |           |
| pH a 7,5 con NaOH<br>Agar (dove richiesto) 12 g L <sup>-1</sup><br>Sterilizzare in autoclave 20 min a 118°C |                       | pH 5,5 con HCl<br>Sterilizzare per filtrazione |                        |            |           |
| Terreno SOC                                                                                                 |                       | Antibiotico                                    | Concentrazione         |            |           |
| Componente                                                                                                  | Quantità              | Ampicillina - amp                              | 100 mg L <sup>-1</sup> |            |           |
| Triptone                                                                                                    | 20 g L <sup>-1</sup>  | Cloramfenicolo - chl (L)                       | 25 mg L <sup>-1</sup>  |            |           |
| Estratto di lievito                                                                                         | 5 g L <sup>-1</sup>   | Cloramfenicolo - chl (S)                       | 50 mg L <sup>-1</sup>  |            |           |
| NaCl                                                                                                        | 0,5 g L <sup>-1</sup> | In terreno:                                    |                        |            |           |
| MgCl <sub>2</sub>                                                                                           | 10 mM                 | (S) = agarizzato                               |                        |            |           |
| MgSO <sub>4</sub>                                                                                           | 10 mM                 | (L) = liquido                                  |                        |            |           |
| Glucosio                                                                                                    | 20 mM                 |                                                |                        |            |           |
| Sterilizzare per filtrazione                                                                                |                       |                                                |                        |            |           |
| Ceppo <i>E. coli</i> / vettore                                                                              | DH5α                  | BL21AI                                         | BL21(DE3)<br>pLysS     | pET151 (V) | pFLC1 (V) |
| Marcatore selettivo                                                                                         | -                     | -                                              | chl                    | amp        | amp       |

**Tabella 19. Elenco dei terreni di coltura utilizzati per la crescita e la trasformazione dei ceppi batterici utilizzati.** Nella parte inferiore della tabella sono indicati gli antibiotici utilizzati per la selezione dei trasformati con i rispettivi vettori.

### 2.12.2. Subclonaggio nel vettore pET151/D-TOPO

Una volta ottenute le quantità necessarie di plasmide, le sequenze codificanti i vari cDNA sono state amplificate mediante PCR con primers disegnati utilizzando il programma AmplifX; all'inizio dei *forward primers* è stata aggiunta la sequenza "CACC" (Tabella 20).

Le amplificazioni sono state condotte utilizzando il termociclatore Eppendorf Mastercycler Gradient 5331 in provette tipo Eppendorf da 0,2 mL contenenti 50 µL di una miscela di reazione così composta:

- 5\*Phusion buffer, 10 µL
- 2 mM della mix di deossiribonucleotidi, 5 µL
- Fwd primer e Rev primer 10 µM, corrispondenti a 2,5 µL di ciascun primer
- DNA plasmidico, 2 µL
- 1 U (0,5 µL) di Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Thermo scientific)
- acqua (fino a 50 µL)

La miscela è stata modificata nel caso dell'amplificazione della P5C reductasi, aggiungendo una concentrazione finale pari a 2 M di betaina (Zhang *et al.*, 2009). Nel caso dell'amplificazione della ProDH, con un contenuto in GC, alla miscela è stata aggiunta una concentrazione finale di dimetilsolfossido pari al 3% (v/v) e l'enzima Phusion High Fidelity DNA Polymerase è stato sostituito con la polimerasi KAPA HiFi (Peqlab VWR), più adatta a questa tipologia di sequenze. Le modalità di amplificazione sequenza-dipendenti sono riportate nella Tabella 21.

| Enzima         | Primers                    | Sequenza                                                  |
|----------------|----------------------------|-----------------------------------------------------------|
| <b>P5CS1</b>   | P5CS1-fwd<br>P5CS1-rev     | <u>cacc</u> ATGGGGAGAGGGATCG<br>gccactcaccTCACTGCAAAG     |
| <b>P5CS2</b>   | P5CS2-fwd<br>P5CS2-rev     | <u>cacc</u> ATGGCGAGCGTACCCGT<br>agcatttgaccTCATTGCAAAG   |
| <b>P5Cred</b>  | P5CR-fwd<br>P5CR-rev       | <u>cacc</u> ATGGCGGCGCCGCCTCA<br>gaggaTTAACTCTGAGAAAG     |
| <b>ProDH</b>   | ProDH-fwd<br>ProDH-rev     | <u>cacc</u> cttccATGGCCATCGCCT<br>cttctgccacctcactTCACT   |
| <b>ProDHtr</b> | ProDHtr-fwd<br>ProDHtr-rev | <u>cacc</u> GCAGCCAAGCTtCCaGAGG<br>cttctgccacctcactTCACT  |
| <b>P5CDH</b>   | P5CDH-fwd<br>P5CDH-rev     | <u>cacc</u> ATGAGCCTCATCCTTTCCCG<br>GACATAGTATTTATGTAGCGG |
| <b>P5CDHtr</b> | P5CDHtr-fwd<br>P5CDHtr-rev | <u>cacc</u> TCAGGtCCaGCCGCaCTC<br>GACATAGTATTTATGTAGCGG   |

**Tabella 20. Primers utilizzati per amplificare ciascun cDNA.** Il disegno di queste sequenze è stato realizzato avvalendosi dei *software* AmplifX; gli oligonucleotidi sono stati sintetizzati dalla Sigma-Aldrich.

Una volta avvenuta la reazione di PCR e verificato che la banda ottenuta sia delle dimensioni attese, essa viene excisa dal gel al transilluminatore con bisturi e pinzette. Il frammento viene isolato e purificato mediante l'utilizzo dell'*innuPREP Gel extraction Kit* con le seguenti modalità:

- per ogni 300 mg di gel vengono aggiunti 650 µL di *Gel Solubilizer* incubando per 10 min a 50°C; successivamente si aggiungono 50 µL di *Binding Optimizer* e si vortexa

- si unisce lo *Spin Filter* al tubo ricevente e vi si applica il campione 750  $\mu$ L alla volta, centrifugando per 1 min a 10000 g e scartando il filtrato
- lo *Spin Filter* viene lavato due volte con 700  $\mu$ L di *LS Solution*, centrifugando per 1 min a 10000 g e scartando il filtrato
- si cambia il tubo ricevente, ponendo il filtro in una provetta tipo Eppendorf da 1,5 mL DNAsi-free, e si aggiungono 50  $\mu$ L di *Elution Buffer*, lasciando agire per 1 min a temperatura ambiente, e si eluisce centrifugando a 4000 g per 1 min.

| Enzima                       | Denaturazione iniziale | Denaturazione | Annealing | Estensione | Estensione finale |
|------------------------------|------------------------|---------------|-----------|------------|-------------------|
| <b>P5CS1</b>                 | 95°C 2 min             | 95°C 15 s     | 58°C 15 s | 72°C 50 s  | 72°C 2 min        |
| <b>P5CS2</b>                 | 95°C 2 min             | 95°C 15 s     | 56°C 15 s | 72°C 45 s  | 72°C 2 min        |
| <b>P5Cred</b>                | 94°C 2 min             | 95°C 15 s     | 59°C 20 s | 72°C 45 s  | 72°C 7 min        |
| <b>ProDHtr</b>               | 95°C 2 min             | 95°C 15 s     | 58°C 15 s | 72°C 50 s  | 72°C 2 min        |
| <b>ProDHtr</b>               | 95°C 2 min             | 95°C 15 s     | 58°C 15 s | 72°C 50 s  | 72°C 2 min        |
| <b>P5CDH</b>                 | 95°C 2 min             | 95°C 15 s     | 58°C 15 s | 72°C 50 s  | 72°C 2 min        |
| <b>P5CDHtr</b>               | 95°C 2 min             | 95°C 15 s     | 58°C 15 s | 72°C 50 s  | 72°C 2 min        |
| <b>Ripetere per 30 cicli</b> |                        |               |           |            |                   |

**Tabella 21. Condizioni per l'amplificazione dei cDNA di interesse dal vettore pFLC1 mediante l'utilizzo dell'enzima Phusion High Fidelity DNA Polymerase.** Le differenze sono dovute da un diverso contenuto di GC nel template, ma anche dalla lunghezza della sequenza, maggiore.

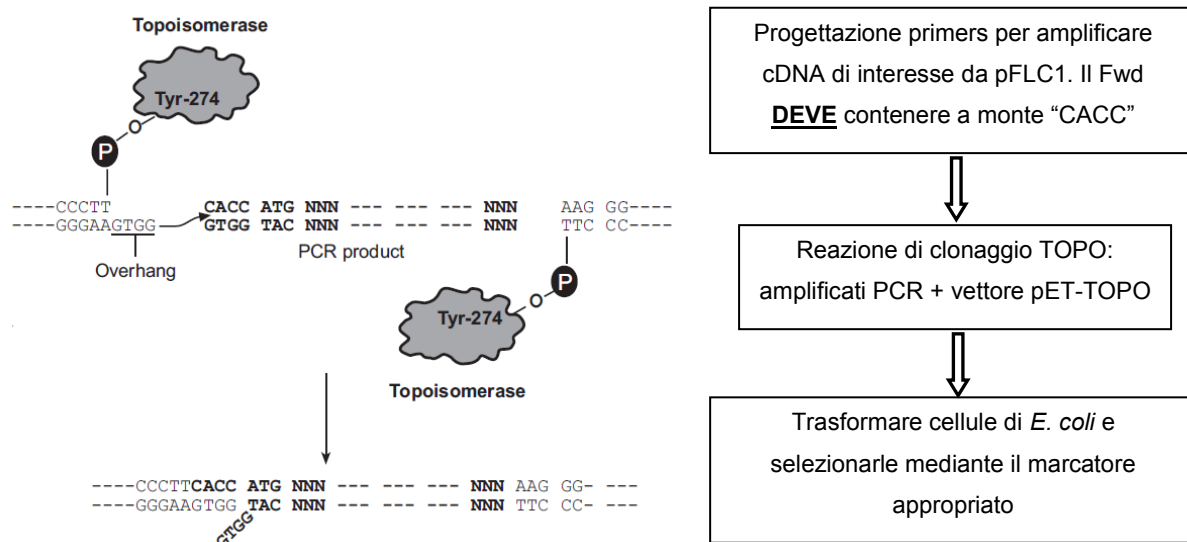
Un'aliquota del campione ottenuto viene analizzata e quantificata su gel per confronto con 1 e 2  $\mu$ L dei marcatori (GeneRuler™ DNA ladder mix, 100-10000 bp; Fisher Scientific).

L'amplificato così ottenuto, conservato sino all'utilizzo a 4°C, viene inserito nel vettore di espressione pET151/D-TOPO per mezzo della tecnologia sviluppata dall'azienda che lo commercializza, che prevede l'utilizzo dell'enzima topoisomerasi: questo esegue un taglio che lascia delle estremità coesive libere (GTGG), a cui sono capaci di appaiarsi le sequenze CACC inserite *ad hoc* nei *forward primers* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Questo permette il clonaggio direzionale della proteina di interesse (Figura 62). A questo fine si procede allestendo una miscela in provette tipo Eppendorf da 0,2 mL DNAsi-free con le seguenti modalità:

- pDNA exciso da PCR e purificato da gel (0,5 - 4  $\mu$ L, corrispondenti a 5 - 10 ng)
- soluzione salina (1  $\mu$ L)
- vettore pET151/D-TOPO (0,5  $\mu$ L)
- acqua fino a 6  $\mu$ L finali

La miscela così preparata viene lasciata 5 min a RT. Il metodo prevede tempi di incubazione dipendenti dalla lunghezza del cDNA che si vuole inserire, ma fino a 2 kb questo tempo è sufficiente. Un'aliquota fino a 3  $\mu$ L della miscela può essere utilizzata per trasformare le cellule competenti di *E. coli*.





**Figura 62. Sistema di clonaggio direzionale pET-TOPO.** A sinistra è riportata la rappresentazione del principio alla base del clonaggio nel vettore TOPO, con le estremità coesive liberate dall'enzima topoisomerasi a cui si appaieranno gli amplificati dalla reazione di PCR. A destra viene riportato un diagramma che schematizza i passaggi seguiti per il subclonaggio.

### 2.12.3. Trasformazione del ceppo BL21(DE3) pLysS di *E. coli*

Il ceppo di *E. coli* BL21(DE3)pLysS è stato trasformato con i vettori pET151/D-TOPO ricombinanti utilizzando cellule rese competenti con il metodo del  $\text{CaCl}_2$  come precedentemente descritto (2.12.1), con la differenza che in piastre e colture liquide era presente anche lo specifico antibiotico (cloramfenicolo, rispettivamente alla concentrazione di 50 e 25  $\text{mg L}^{-1}$ ) richiesto per il mantenimento del plasmide pLysS. I trasformanti sono stati verificati mediante *colony PCR*.

A questo fine alla miscela di reazione descritta nel punto 2.12.2, invece del pDNA, sono aggiunte direttamente delle cellule batteriche. Con un puntale sterile si tocca la colonia da analizzare, lo si striscia su una piastra fresca di terreno LB con l'1,2% di agar, ampicillina (100  $\text{mg mL}^{-1}$ ) e cloramfenicolo (50  $\text{mg mL}^{-1}$ ), e lo si usa infine per pipettare su e giù la miscela di reazione, in modo che alcune cellule batteriche finiscano in essa. Se la PCR fornisce i risultati attesi, evidenziando l'inserimento del cDNA nel plasmide pET151, il plasmide viene nuovamente reisolato -con la procedura già descritta- direttamente dalle colonie cresciute sulla piastra, inoculate in 5 mL di LB liquido contenente ampicillina 100  $\text{mg mL}^{-1}$  e cloramfenicolo 25  $\text{mg mL}^{-1}$ . Il pDNA così purificato viene sottoposto a sequenziamento nella zona compresa fra i primers per verificare la correttezza della sequenza dell'inserito. Il sequenziamento è stato eseguito dall'azienda GATC Biotech (Germania).

### 2.12.4. Espressione eterologa nel ceppo BL21(DE3) pLysS di *E. coli*

Una volta verificata l'assenza di errori nelle sequenze, l'espressione eterologa delle proteine clonate è stata ottenuta con le seguenti modalità. Una colonia cresciuta il giorno precedente su terreno selettivo agarizzato viene stemperata in 40 mL di LB contenente ampicillina 100  $\text{mg mL}^{-1}$  e cloramfenicolo 25  $\text{mg mL}^{-1}$ , lasciando crescere a 37°C in forte agitazione *overnight*.

La mattina successiva con aliquote opportune del preinoculo vengono avviate colture parallele in 200 mL di LB contenente i due antibiotici, in modo da ottenere un valore iniziale di  $\text{OD}_{600}$  pari a 0,2, e ponendo a crescere a 24°C in agitazione. Quando l' $\text{OD}_{600}$  raggiunge un valore compreso fra 0,6 e 0,8, viene aggiunto l'induttore, l'isopropiltiogalattopiranoside

(IPTG), come soluzione 50 mM sterilizzata per filtrazione, così da ottenere una concentrazione di 1 mM. Lasciato crescere *E. coli* in presenza dell'induttore per almeno 4 h, le cellule sono raccolte mediante centrifugazione a 2500 g per 10 min in una centrifuga Eppendorf 5702 in tubi Falcon a fondo conico prepesati. Una volta scartato il supernatante e asciugati i bordi, i tubi sono pesati nuovamente in modo da determinare per differenza il peso netto. Le cellule sono conservate a -20°C fino al momento dell'estrazione.

### 2.12.5. Purificazione delle proteine espresse in *E. coli* mediante cromatografia per affinità su colonna His-Select®

Grazie ai 6 residui di istidina aggiunti alle proteine di interesse, è possibile purificarle in un singolo passaggio mediante cromatografia di affinità su una colonna contenente una resina di nichel agarosio (His-Select® High Flow Cartridge, Sigma Aldrich). Il materiale congelato viene recuperato, posto in un mortaio equilibrato in ghiaccio con 2 g allumina (g peso fresco)<sup>-1</sup>, e omogenato per 5 min con un pestello. L'omogenato è risospeso in 25 mL g<sup>-1</sup> di tampone di estrazione (sodio fosfato 50 mM, pH 7,5, contenente 200 mM NaCl, 0,5 mM DTT e 20 mM imidazolo) e centrifugato 10 min a 10000 g in una centrifuga refrigerata Sorvall RC5B a 4°C. Il supernatante è stato caricato su una colonna His-Select con un *bed volume* di 1,25 mL a un flusso costante di 10 mL h<sup>-1</sup> mantenuto mediante una pompa peristaltica in uscita. Dopo lavaggio con 3 mL di tampone di estrazione, la colonna è stata eluita *stepwise* mediante il passaggio di aliquote da 3 mL contenenti concentrazioni crescenti di imidazolo, raccogliendo nel contempo frazioni da 1 mL. Tutta la procedura è stata eseguita in camera fredda a 7°C. La colonna è stata poi rigenerata per passaggio delle seguenti soluzioni:

- 1) 5 mL di acqua deionizzata a un flusso di 10 mL h<sup>-1</sup>
- 2) 5 mL di guanidina HCl 6 M (G3272, Sigma Aldrich) a un flusso di 5 mL h<sup>-1</sup>, per rimuovere le proteine ancora adese alla resina
- 3) 5 mL di acqua deionizzata a un flusso di 10 mL h<sup>-1</sup>

La resina viene infine riequilibrata e conservata in etanolo 30%. Al momento del successivo utilizzo, essa viene lavata con 5 mL di acqua e riequilibrata con almeno 5 mL di tampone di estrazione.

### 2.13. Determinazione del punto isoelettrico di una proteina mediante isoelectrofocusing

Per determinare il valore di pH in cui la carica elettrica netta di una proteina è pari a 0 (punto isoelettrico, pI) è stato applicato il protocollo di Robertson e collaboratori (1987) per isoelettrofocusing in minigel verticali continui di poli(acrilamide) al 5%. La preparazione del gel avviene mescolando fra loro le seguenti soluzioni:

|                        |        |
|------------------------|--------|
| acrilamide stock (40%) | 1,5 mL |
| glicerolo 50%          | 2,4 mL |
| anfoline (sol. 40%)    | 0,6 mL |
| acqua                  | 7,5 mL |

Il tutto viene degasato sotto vuoto per 5 min, quindi vengono aggiunti 100 µL di una soluzione al 10% di ammonio persolfato e 20 µL di TEMED. Subito si versa il tutto nell'intercapedine dell'apparato per elettroforesi, posizionando il pettine. La polimerizzazione viene lasciata procedere a temperatura ambiente per 60 min, quindi il pettine viene tolto e i pozzetti sono lavati con acqua distillata. I campioni da caricare vengono trattati prima dell'impiego con un uguale volume di soluzione ottenuta mescolando:

|                                           |       |
|-------------------------------------------|-------|
| glicerolo 99%                             | 60 µL |
| anfoline dello stesso range di pH del gel | 8 µL  |
| acqua sterile                             | 32 µL |

Sono state utilizzate anfoline per un gradiente di pH compreso tra 3,5 e 10 e per uno più

stretto tra 5 e 7 (Pharmacia). Una volta polimerizzato il gel, si inseriscono nel serbatoio superiore 100 mL di una soluzione 25 mM di NaOH e in quello inferiore 100 mL di acido acetico 20 mM. La corsa elettroforetica viene fatta procedere a 50 V costanti per circa 5 h; l'ampereaggio nel corso della migrazione decresce velocemente fino ad arrivare a 1-2 mA.

Una volta ultimata la corsa, il gel viene tolto dall'apparato e le corsie più esterne sono tagliate e suddivise in numerose fettine di spessore il più uniforme possibile, che sono poste in 1 mL di acqua sterile. Dopo circa un'ora di incubazione a temperatura ambiente viene determinato il pH, utilizzando un pHmetro (HANNA HI9321), valutando così il gradiente formato all'interno del gel (Figura 63).

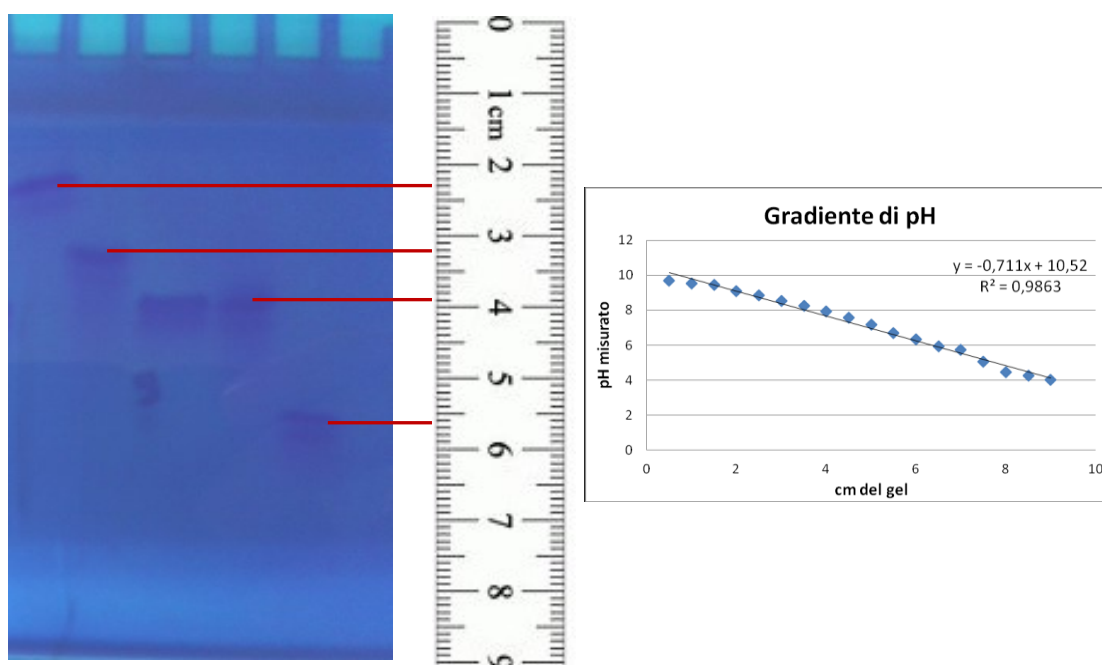
Il resto del gel viene immediatamente fissato mediante 3 passaggi da 30 min in TCA 20% e quindi colorato per 20 min in 50 mL di Coomassie Brilliant Blue R250 0,25% (p/v) in 40% (v/v) metanolo e 7% (v/v) acido acetico. Dopo decolorazione per più passaggi in 40% (v/v) metanolo e 7% (v/v) acido acetico, viene misurata la migrazione di ciascuna banda. I valori di Rf (coefficiente di ritardo, pari al rapporto tra la corsa di una singola proteina e la corsa totale del gel) sono posti in grafico insieme ai valori di pH ottenuti in precedenza. Il pI della proteina di interesse viene interpolato graficamente da tali dati.

#### 2.14. Saggi dell'attività *in vitro* della P5C reduttasi e della P5C deidrogenasi

La P5CR è stata saggiata a 35°C seguendo l'ossidazione P5C-dipendente del NAD(P)H. La miscela di reazione comprendeva in un volume finale di 200 µL:

tampone Tris-HCl 25 mM, pH 7,5  
0,4 mM NADH o 0,2 mM NADPH  
2 mM DL-P5C.

Il decremento dell'assorbanza a 340 nm è stato misurato per 5 min a intervalli di 30 sec contro un bianco in assenza di P5C. L'attività è stata calcolata sulla fase iniziale di reazione, lineare, assumendo un coefficiente di estinzione molare ( $\epsilon$ ) per il NAD(P)H di  $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 63. Schema per il calcolo del punto isoelettrico di una proteina.** Nel gel sono fatte correre quattro proteine di cui è noto il punto isoelettrico (5,1  $\beta$ -lattoglobulina di latte bovino – 5,4 e 5,9 anidrasi carbonica II di eritrociti bovini – 6,6 anidrasi carbonica I di eritrociti bovini). I valori di pH nei diversi punti della corsa elettroforetica sono stati determinati con un pHmetro. Graficando l'Rf dei marcatori con il loro pI, si ottiene una retta su cui può venire interpolato il pI della proteina di interesse. Lo stesso può essere fatto con il profilo di pH (a destra).

L'attività della P5CDH è stata misurata a 35°C seguendo la riduzione P5C-dipendente del NAD(P)<sup>+</sup>. La miscela di reazione comprendeva in un volume finale di 200 µL:

tampone Hepes-KOH 25 mM, pH 7,5  
10 mM NAD<sup>+</sup> o 20 mM NADP<sup>+</sup>  
2 mM DL-P5C.

L'aumento di assorbanza a 340 nm è stato determinato per 20 min a intervalli di 1 min contro un bianco in cui il P5C non era stato incluso.

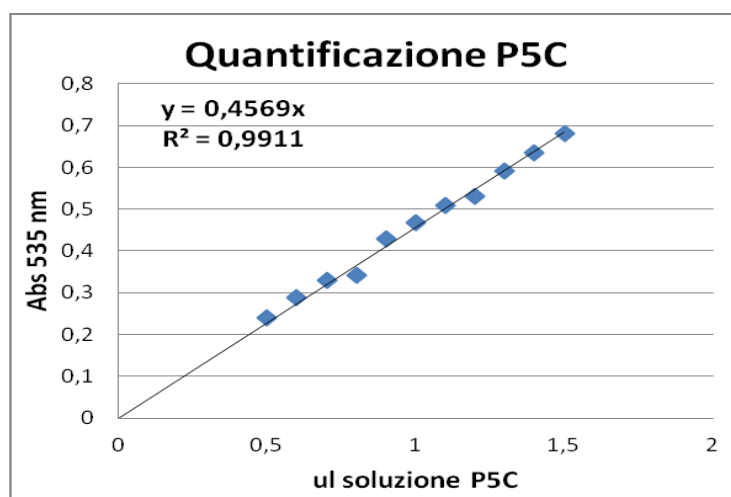
Per il calcolo delle concentrazioni di cationi/anioni in grado di determinare l'inibizione del 50% dell'attività (IC<sub>50</sub>) e dei loro intervalli di confidenza, i risultati sono stati espressi come percentuale dei controlli non trattati in funzione del logaritmo della concentrazione; la curva risultante è stata analizzata per mezzo di regressione non lineare utilizzando il software PRISM 6 (versione 6.03; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## 2.15. Sintesi chimica e purificazione dell'acido δ<sup>1</sup>-pirrolin-5-carbossilico

Dal momento che il P5C non è più disponibile commercialmente, ne è stata effettuata la sintesi chimica dall'idrossilisina (Williams & Frank, 1975). Una quantità pari a 600 mg di idrossilisina monoclorigrato (circa 3 mmol) sono sciolti in 35 mL di acqua in una bottiglia scura e posta in ghiaccio. In luce fioca vengono pesati anche 644 mg (3 mmol) di sodio metaperiodato che vengono disciolti in 50 mL di acqua, correggendo il pH a 7 con NaOH 2N. Anche questo preparato è conservato al riparo dalla luce e in ghiaccio. Le due soluzioni sono quindi mescolate velocemente fra loro, mantenendo il tubo di reazione a 0°C. L'ossidazione dell'idrossilisina viene lasciata procedere per 8 minuti esatti, al termine dei quali il periodato in eccesso viene distrutto aggiungendo 950 µL di glicerolo 1 M. Dopo ulteriori 2 minuti il tutto viene bloccato tramite l'aggiunta di 2,46 mL di HCl 2 N e il volume complessivo della soluzione viene portato a 100 mL con acqua.

La miscela di reazione viene immediatamente caricata a un flusso di 90 mL h<sup>-1</sup> su una colonna di resina a scambio cationico Dowex AG50 (WX8, 200-400 mesh) di 46 mL di *bed volume*. Dopo aver lavato con 50 mL di HCl 0,05 N, raccogliendo un'unica frazione, l'eluizione procede in isocratica con HCl 1N, raccogliendo 50 frazioni da 6 mL mediante un collettore di frazioni (HeliFrac, Pharmacia LKB).

La concentrazione di P5C nelle frazioni eluite dalla colonna è stata determinata mediante il saggio con la ninidrina acida descritto al paragrafo 2.8.1, ma leggendo a 535 nm il complesso P5C-ninidrina. Le frazioni con contenuto maggiore di 10 mM vengono unite fra loro in un unico *pool* che viene sterilizzato per filtrazione. Una piccola aliquota viene invece utilizzata per determinare l'esatta concentrazione del composto (Figura 64).



**Figura 64. Quantificazione del P5C.** Diluizioni della soluzione di P5C sono state analizzate

mediante il saggio della ninidrina acida. Dalla pendenza della retta interpolante i valori di assorbanza in funzione del volume analizzato si ricava la concentrazione del substrato sulla base di un coefficiente di estinzione molare ( $\epsilon$ ) a 535 nm di  $4600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Williams & Frank, 1975).

## 2.16. Determinazione della massa molecolare nativa di una proteina

Per determinare la massa molecolare di un enzima si è ricorsi alla cromatografia ad alta prestazione (FPLC) per gel filtrazione. Aliquote da 100  $\mu\text{L}$  della proteina di interesse o di opportuni marcatori di massa molecolare sono stati iniettati su una colonna Superose 12 HR 10/30 (Pharmacia), equilibrata con il tampone Tris HCl 50 mM a pH 7,75 contenente 250 mM NaCl a un flusso costante di 0,5  $\text{mL min}^{-1}$ . La ritenzione delle diverse molecole è stata determinata misurando l'assorbanza dell'eluato a 280 nm tramite uno spettrofotometro equipaggiato con una cella a flusso di 10  $\mu\text{L}$  (HPLC Detector 432, Kontron).

Per la costruzione della retta di calibrazione sono stati impiegati i seguenti marcatori: tireoglobulina di tiroide bovina (669 kDa), ferritina di milza equina (440 e 960 kDa), catalasi di fegato bovino (232 kDa), aldolasi di muscolo di coniglio (158 kDa) e albumina di siero bovino (67 e 268 kDa). Per ogni marcatore sono state eseguite tre corse, sei per le proteine di interesse.

## 2.17. Analisi statistica

I valori di conducibilità in grado di determinare l'inibizione della crescita e della germinazione del 50% ( $IC_{50}$ ) e le soglie di danno (definite come il valore di conducibilità che determina il 10% di inibizione) con i relativi intervalli di confidenza sono stati stimati attraverso un'analisi di regressione non lineare utilizzando il *software* Prism 6 (versione 6.03, GraphPad Software, Inc., USA) o il programma Excel (Microsoft). Gli stessi *softwares* sono stati utilizzati per l'analisi della varianza a due vie. Quando un numero consistente di medie sono state confrontate fra loro è stata utilizzata la correzione di Bonferroni, per evitare errori del primo tipo e quindi falsi positivi. Per verificare se fra due variabili intercorresse una relazione sistematica, se ne è verificata la correlazione mediante il calcolo del coefficiente  $r$  di Pearson o tau di Kendall, assumendo che i dati si riferissero a una distribuzione normale o gaussiana. Come descritto caso per caso, i disegni sperimentali per le diverse determinazioni condotte prevedevano da un minimo di 3 a un massimo di 10 repliche. Dove non specificato diversamente, le differenze sono da intendersi al livello di significatività del 5% ( $P < 0,05$ ).

### 3. RISULTATI e DISCUSSIONE

#### 3.1. Suscettibilità differenziale di un gruppo di varietà italiane di riso a condizioni di stress salino

Per ottenere informazioni relative alla possibile presenza di una diversa sensibilità nei confronti di condizioni di stress osmo-salino tra le cultivar italiane di riso e poter in tal modo scegliere varietà con fenotipo contrastante su cui condurre le successive determinazioni, è stato messo a punto un protocollo che permettesse di valutare l'abilità di germinare e crescere in presenza di concentrazioni saline crescenti. I 17 genotipi forniti dall'Unità di Ricerca per la Riscoltura (CRA-RIS) di Vercelli sono stati seminati in piastre Petri a cui sono state aggiunte quantità crescenti di una miscela di sali che simulasse la composizione ionica della soluzione-suolo (Grattan *et al.*, 2002). La determinazione della percentuale di germinazione rispetto al controllo è stata eseguita una settimana dopo la semina, e i risultati sono stati normalizzati sulla base dei valori ottenuti per i controlli non trattati (Tabella 22).

| Germinazione<br>Cultivar | Conducibilità elettrica (EC, dS m <sup>-1</sup> ) |             |             |             |             |            |             |            |
|--------------------------|---------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|
|                          | 6,60                                              | 8,48        | 10,33       | 12,14       | 13,91       | 15,64      | 19,00       | 22,20      |
| Asia                     | 94,3 ± 3,0                                        | 98,9 ± 4,1  | 85,1 ± 9,8  | 87,4 ± 7,0  | 75,9 ± 0,0  | 55,2 ± 4,0 | 17,2 ± 7,2  | 1,4 ± 1,4  |
| Augusto                  | 101,8 ± 0,9                                       | 86,5 ± 4,7  | 96,4 ± 3,9  | 83,8 ± 1,6  | 95,5 ± 1,8  | 80,2 ± 9,0 | 55,0 ± 7,9  | 56,8 ± 5,6 |
| Baldo                    | 109,7 ± 3,5                                       | 99,0 ± 5,8  | 99,0 ± 4,4  | 102,9 ± 3,9 | 98,1 ± 11,9 | 94,2 ± 7,9 | 83,5 ± 12,7 | 51,5 ± 7,0 |
| Carnaroli                | 87,9 ± 1,5                                        | 89,7 ± 2,3  | 76,7 ± 7,1  | 87,1 ± 5,2  | 81,9 ± 5,2  | 72,4 ± 7,8 | 52,6 ± 7,1  | 37,9 ± 4,6 |
| Centauro                 | 94,2 ± 9,6                                        | 90,4 ± 3,8  | 85,6 ± 3,5  | 89,4 ± 8,7  | 77,9 ± 6,0  | 81,7 ± 3,8 | 55,8 ± 11,1 | 44,2 ± 3,5 |
| Eurosis                  | 93,6 ± 5,5                                        | 80,0 ± 0,8  | 84,8 ± 2,1  | 88,0 ± 9,7  | 70,4 ± 8,1  | 63,2 ± 0,8 | 29,6 ± 2,9  | 15,2 ± 5,8 |
| Gange                    | 89,3 ± 4,8                                        | 62,7 ± 5,8  | 76,0 ± 6,1  | 66,7 ± 2,7  | 72,0 ± 16,0 | 58,7 ± 8,1 | 46,7 ± 10,4 | 0,0 ± 0,0  |
| Gigante VC               | 85,8 ± 7,0                                        | 73,2 ± 3,6  | 86,6 ± 1,6  | 70,1 ± 8,3  | 81,1 ± 8,7  | 57,5 ± 4,4 | 51,2 ± 10,1 | 1,2 ± 1,2  |
| Loto                     | 97,8 ± 2,9                                        | 99,3 ± 5,0  | 95,7 ± 1,9  | 100,0 ± 1,9 | 84,9 ± 5,8  | 86,3 ± 6,5 | 67,6 ± 10,1 | 30,9 ± 5,6 |
| Maratelli                | 89,6 ± 3,8                                        | 87,7 ± 4,3  | 91,5 ± 3,4  | 87,7 ± 4,3  | 79,2 ± 5,7  | 35,8 ± 6,2 | 27,4 ± 6,6  | 1,1 ± 1,1  |
| S, Andrea                | 86,3 ± 11,2                                       | 76,1 ± 3,1  | 65,0 ± 10,7 | 75,2 ± 10,7 | 66,7 ± 16,8 | 53,8 ± 7,8 | 29,1 ± 3,1  | 13,7 ± 4,5 |
| Salvo                    | 89,7 ± 3,1                                        | 76,7 ± 11,0 | 77,6 ± 4,0  | 78,4 ± 4,6  | 69,8 ± 9,3  | 44,8 ± 8,2 | 7,8 ± 4,0   | 1,0 ± 1,0  |
| Selenio                  | 94,5 ± 6,6                                        | 97,3 ± 2,4  | 100,0 ± 1,8 | 96,4 ± 2,4  | 96,4 ± 6,0  | 83,6 ± 4,8 | 86,4 ± 10,1 | 71,8 ± 6,4 |
| Thaibonnet               | 74,6 ± 4,5                                        | 74,6 ± 3,4  | 72,9 ± 3,7  | 65,3 ± 14,8 | 51,7 ± 9,0  | 51,7 ± 7,4 | 11,0 ± 0,8  | 7,6 ± 4,4  |
| Venere                   | 75,6 ± 9,5                                        | 62,2 ± 3,7  | 62,2 ± 2,1  | 67,1 ± 7,4  | 34,1 ± 3,2  | 22,0 ± 9,7 | 4,9 ± 2,4   | 1,5 ± 1,5  |
| Vialone nano             | 89,1 ± 0,9                                        | 93,6 ± 12,0 | 93,6 ± 4,0  | 99,9 ± 13,4 | 86,4 ± 8,7  | 87,3 ± 4,2 | 49,1 ± 7,2  | 36,4 ± 3,6 |
| Volano                   | 94,8 ± 3,4                                        | 92,2 ± 4,8  | 96,6 ± 4,6  | 93,1 ± 0,0  | 94,8 ± 3,4  | 91,4 ± 3,8 | 94,8 ± 6,0  | 75,0 ± 7,5 |

**Tabella 22. Percentuali di germinazione di 17 diversi genotipi di riso in presenza di valori crescenti di conducibilità elettrica.** I semi sono stati imbibiti in acqua e quindi seminati in presenza di una miscela di sali (NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in rapporto molare 10:1:2:1) che simula la concentrazione ionica della soluzione-suolo. Il tasso di germinazione 7 giorni dopo la semina è stato espresso come percentuale del valore ottenuto con controlli paralleli incubati in assenza di sali (EC = 0,72 dS m<sup>-1</sup>). I valori evidenziati in grigio corrispondono a una riduzione della germinazione superiore al 50%. Gigante VC = Gigante Vercelli.

I risultati mostrano che la germinazione dei semi comincia a essere inibita sensibilmente solo a valori di conducibilità elettrica molto elevati, pari a circa 8,5 dS m<sup>-1</sup>. Per trovare un'inibizione maggiore del 50% bisogna salire oltre i 10 dS m<sup>-1</sup>. Alcuni genotipi, come Augusto, Baldo, Selenio e Volano, sono in grado di mantenere una germinabilità discreta anche a valori di conducibilità pari a 22,2 dS m<sup>-1</sup>, che per la maggior parte delle altre cultivar

risultano letali. Si tratta comunque di concentrazioni sostanzialmente irrealistiche, molto superiori a quelle che si possono in genere trovare nei terreni coltivati, anche se affetti da un eccesso di salinità. Il dato indica dunque che, in condizioni di campo, la germinazione non viene sostanzialmente compromessa dalla presenza di fluttuazioni naturali dei livelli salini.

Con lo stesso approccio è stato d'altra parte valutato l'effetto dell'iperosmoticità sulla velocità di sviluppo delle plantule. Ogni piantina è stata prelevata, i tessuti fogliari sono stati separati da quelli radicali, pesati separatamente ed essiccati in stufa in modo da determinare anche peso secco e percentuale di idratazione. I dati relativi alla biomassa secca delle piantine intere sono riportati in Tabella 23.

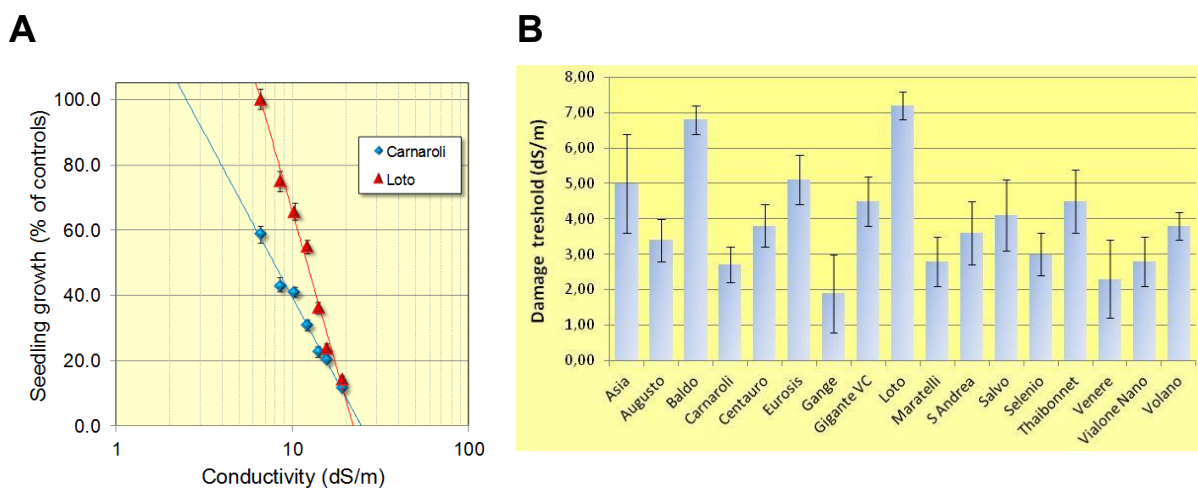
| Crescita<br>Cultivar | Conducibilità elettrica EC |            |            |            |            |            |            |            |
|----------------------|----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|                      | 6,60                       | 8,48       | 10,33      | 12,14      | 13,91      | 15,64      | 19,00      | 22,20      |
| Asia                 | 75,8 ± 6,7                 | 73,0 ± 6,3 | 62,4 ± 5,5 | 47,8 ± 4,9 | 53,6 ± 9,8 | 28,7 ± 3,4 | 18,2 ± 3,0 | NR         |
| Augusto              | 68,2 ± 3,0                 | 55,3 ± 3,3 | 51,7 ± 3,2 | 36,6 ± 2,7 | 31,3 ± 2,6 | 26,3 ± 2,3 | 13,7 ± 1,9 | 9,9 ± 1,3  |
| Baldo                | 88,8 ± 3,1                 | 78,7 ± 2,7 | 64,5 ± 2,7 | 55,6 ± 2,4 | 33,0 ± 2,0 | 27,5 ± 1,7 | 14,2 ± 1,3 | 8,9 ± 1,1  |
| Carnaroli            | 58,9 ± 3,5                 | 43,0 ± 2,5 | 41,0 ± 2,7 | 31,0 ± 1,7 | 22,7 ± 1,5 | 20,4 ± 1,7 | 11,7 ± 1,6 | 6,2 ± 1,0  |
| Centauro             | 68,7 ± 3,4                 | 64,7 ± 3,4 | 48,9 ± 2,6 | 38,8 ± 2,1 | 34,6 ± 2,6 | 31,0 ± 2,4 | 14,7 ± 1,8 | 12,6 ± 1,4 |
| Eurosis              | 76,6 ± 4,5                 | 58,7 ± 4,8 | 64,1 ± 4,0 | 42,2 ± 2,9 | 23,7 ± 1,8 | 18,5 ± 1,6 | 8,8 ± 1,2  | NR         |
| Gange                | 57,1 ± 5,8                 | 40,0 ± 4,8 | 48,1 ± 5,4 | 36,3 ± 4,3 | 31,9 ± 3,1 | 29,4 ± 3,7 | 14,2 ± 2,1 | NR         |
| Gigante Vercelli     | 85,6 ± 4,7                 | 62,0 ± 3,2 | 54,4 ± 3,3 | 46,7 ± 2,6 | 39,7 ± 2,4 | 34,2 ± 1,7 | 24,8 ± 1,9 | NR         |
| Loto                 | 100,2 ± 3,2                | 75,1 ± 3,1 | 65,8 ± 2,6 | 55,0 ± 2,0 | 36,3 ± 1,8 | 23,8 ± 1,4 | 14,4 ± 1,2 | 8,5 ± 1,2  |
| Maratelli            | 62,9 ± 4,5                 | 54,1 ± 3,0 | 47,7 ± 3,1 | 43,3 ± 2,8 | 34,2 ± 2,8 | 26,8 ± 1,8 | 12,8 ± 1,4 | NR         |
| S. Andrea            | 64,8 ± 4,8                 | 59,4 ± 4,6 | 42,2 ± 3,8 | 36,5 ± 3,4 | 25,4 ± 2,7 | 20,7 ± 2,6 | 8,1 ± 1,0  | NR         |
| Salvo                | 60,8 ± 4,9                 | 59,0 ± 3,3 | 52,6 ± 3,6 | 46,3 ± 4,0 | 36,6 ± 2,8 | 30,8 ± 2,9 | NR         | NR         |
| Selenio              | 68,5 ± 2,7                 | 55,9 ± 2,7 | 52,1 ± 2,6 | 43,3 ± 2,5 | 35,0 ± 1,9 | 33,8 ± 2,3 | 23,4 ± 1,6 | 10,5 ± 1,2 |
| Thaibonnet           | 74,6 ± 6,0                 | 63,1 ± 4,7 | 50,7 ± 4,2 | 47,2 ± 2,9 | 31,6 ± 3,2 | 22,5 ± 2,7 | NR         | NR         |
| Venere               | 61,9 ± 5,0                 | 42,0 ± 3,4 | 51,4 ± 4,3 | 40,2 ± 4,0 | 27,9 ± 2,7 | 21,0 ± 4,4 | NR         | NR         |
| Vialone nano         | 61,9 ± 4,4                 | 48,2 ± 2,7 | 46,5 ± 3,2 | 40,3 ± 2,9 | 28,1 ± 2,4 | 21,9 ± 2,3 | 14,8 ± 1,6 | 12,1 ± 2,4 |
| Volano               | 75,2 ± 2,4                 | 62,0 ± 2,3 | 54,7 ± 1,5 | 49,4 ± 1,7 | 44,7 ± 1,5 | 34,9 ± 1,6 | 23,0 ± 1,3 | 16,2 ± 1,6 |

| ANOVA A 2 VIE              | Devianza                | GdL  | Varianza | F calc.              | P-value  |
|----------------------------|-------------------------|------|----------|----------------------|----------|
| <b>Totale</b>              | 2,131 x 10 <sup>5</sup> | 16   | 13317    |                      |          |
| <b>Tra Medie</b>           | 1,127 x 10 <sup>6</sup> | 5    | 225343   |                      |          |
| <b>Tra Trattamenti (A)</b> | 1,362 x 10 <sup>5</sup> | 80   | 1703     | F (5, 5059) = 382,2  | < 0,0001 |
| <b>Tra Blocchi (B)</b>     | 2,983 x 10 <sup>6</sup> | 5059 | 590      | F (16, 5059) = 22,59 | < 0,0001 |
| <b>Interazione (A*B)</b>   | 2,131 x 10 <sup>5</sup> | 16   | 13317    | F (80, 5059) = 2,888 | < 0,0001 |
| <b>Errore</b>              | 1,127 x 10 <sup>6</sup> | 5    | 225343   |                      |          |

**Tabella 23. Effetto della presenza di sali sulla crescita delle plantule di diverse cultivar di riso.** La biomassa secca delle plantule cresciute per 7 giorni a valori crescenti di conducibilità elettrica è stata espressa come percentuale dei valori ottenuti con i rispettivi controlli incubati in assenza di sali. Il numero di piante analizzate variava in funzione della percentuale di germinazione ( $10 < n < 60$ ); dove erano presenti troppo poche piante ( $n < 10$ ) il valore ottenuto non è stato considerato (NR). I dati sono stati analizzati mediante una ANOVA a 2 vie, in cui i risultati relativi ai trattamenti a 19 e 22,20 dS m<sup>-1</sup> non sono stati considerati, poichè non disponibili per tutti i genotipi.

La crescita delle piante ai primi stadi di sviluppo è risultata molto più sensibile al sale: già in conseguenza del trattamento più blando a  $6,60 \text{ dS m}^{-1}$  si nota una significativa riduzione sia della biomassa fresca, che di quella secca. Le differenze tra i genotipi risultano minori ad elevate concentrazioni saline, mentre maggiori diversità sono riscontrabili a bassi valori di EC (Tabella 23). Fra le cultivar meno inibite dalle condizioni di stress si può notare come Loto, Baldo e Gigante Vercelli siano capaci di mantenere un alto tasso di crescita (maggiore dell'85%) a tenori di sale che per altre varietà determinano una riduzione molto più marcata. L'analisi della varianza a due vie ha evidenziato differenze altamente significative, oltre che fra i trattamenti, anche fra i genotipi e relativamente all'interazione tra i due fattori, indicando come le cultivar rispondano in maniera significativamente diversa alle condizioni di stress salino.

Per poter condensare in un unico valore la diversa suscettibilità di un genotipo, i dati ottenuti sono stati rielaborati in modo da calcolare il valore di conducibilità elettrica che determina il 50% di inibizione della crescita ( $IC_{50}$ ). Dal momento che questi valori risultano relativamente elevati (Tabella 24), e si può constatare come all'aumentare della concentrazione salina diminuiscano le differenze tra genotipi (Figura 65A), è stato calcolato allo stesso modo una *soglia di danno*, definita come la conducibilità che determina il 10% di riduzione della crescita rispetto al controllo non trattato (Figura 65B).



**Figura 65. Determinazione delle concentrazioni inibenti al 50% e delle soglie di danno.** I dati ottenuti sono stati linearizzati ponendo i valori di crescita espressi come percentuale del controllo non trattato in funzione del logaritmo della conducibilità del substrato. Nel grafico nel pannello A si vede come i valori di inibizione ad alti valori di EC siano relativamente simili fra le due varietà considerate, mentre differenze più marcate siano evidenti a basse concentrazioni saline. Per questo si è deciso di considerare come parametro indicativo della diversa suscettibilità al sale una “soglia di danno”, pari al valore di EC che determina il 10% di riduzione della crescita. Tale parametro (pannello B), calcolato mediante analisi non lineare dei dati con il programma Prism 6 (GraphPad Software), fornisce indicazioni della tolleranza al sale a concentrazioni più realistiche, vicine a quelle riscontrabili in campo.

I genotipi che sulla base di questo parametro meglio tollerano la presenza della miscela salina sono Baldo e Loto, per i quali è stata calcolata una soglia di danno corrispondente a circa  $7 \text{ dS m}^{-1}$ . Per gran parte delle altre varietà tale valore si attesta tra 3 e  $5 \text{ dS m}^{-1}$ , mentre per il gruppo costituito da Carnaroli, Gange, Maratelli, Venere e Vialone nano esso risulta inferiore a  $3 \text{ dS m}^{-1}$ . È interessante notare come l'effetto sulla crescita non correli con quello evidenziato a livello di germinazione: varietà capaci di germinare bene in presenza di sale, come Selenio, Volano e Vialone nano (Tabella 22), mostrano infatti una sensibilità molto maggiore nella successiva fase di sviluppo della plantula. Un simile comportamento può dipendere dal fatto che per la germinazione l'effetto osmotico costituisce probabilmente il fattore principale di danno, ostacolando l'assorbimento dell'acqua, mentre nella fase di crescita la tossicità ionica diviene prevalente.



| Cultivar     | Mix salina (NaCl, CaCl <sub>2</sub> , MgSO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) |                  |                  |                  | NaCl             |                  |                  |                  |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|              | Germinazione                                                                                |                  | Crescita         |                  | Germinazione     |                  | Crescita         |                  |
|              | IC <sub>10</sub>                                                                            | IC <sub>50</sub> | IC <sub>10</sub> | IC <sub>50</sub> | IC <sub>10</sub> | IC <sub>50</sub> | IC <sub>10</sub> | IC <sub>50</sub> |
| Asia         | 11,9 ± 0,5                                                                                  | 15,9 ± 0,3       | 5,0 ± 1,4        | 12,2 ± 1,1       |                  |                  |                  |                  |
| Augusto      | 12,3 ± 0,9                                                                                  | 22,3 ± 1,0       | 3,4 ± 0,6        | 9,7 ± 0,5        |                  |                  |                  |                  |
| Baldo        | 17,9 ± 1,3                                                                                  | 22,4 ± 0,5       | 6,8 ± 0,4        | 12,1 ± 0,3       | 9,1 ± 1,0        | 18,3 ± 1,2       | 3,8 ± 0,4        | 9,2 ± 0,3        |
| Carnaroli    | 9,6 ± 0,8                                                                                   | 19,8 ± 0,6       | 2,7 ± 0,5        | 7,9 ± 0,4        | 4,8 ± 0,9        | 14,1 ± 1,1       | 1,9 ± 0,5        | 6,0 ± 0,5        |
| Centauro     | 10,9 ± 1,1                                                                                  | 21,3 ± 0,9       | 3,8 ± 0,6        | 10,2 ± 0,4       |                  |                  |                  |                  |
| Eurosis      | 10,4 ± 0,7                                                                                  | 16,6 ± 0,3       | 5,1 ± 0,7        | 10,4 ± 0,5       |                  |                  |                  |                  |
| Gange        | 7,4 ± 1,0                                                                                   | 15,7 ± 0,8       | 1,9 ± 1,1        | 8,0 ± 1,1        |                  |                  |                  |                  |
| Gigante VC   | 8,8 ± 0,8                                                                                   | 17,0 ± 0,6       | 4,5 ± 0,7        | 11,5 ± 0,5       |                  |                  |                  |                  |
| Loto         | 14,9 ± 0,7                                                                                  | 20,4 ± 0,4       | 7,2 ± 0,4        | 12,2 ± 0,3       | 9,3 ± 0,7        | 22,3 ± 1,2       | 4,2 ± 0,8        | 11,4 ± 0,8       |
| Maratelli    | 11,8 ± 0,4                                                                                  | 15,5 ± 0,4       | 2,8 ± 0,7        | 9,4 ± 0,6        |                  |                  |                  |                  |
| S, Andrea    | 7,3 ± 1,3                                                                                   | 15,7 ± 0,4       | 3,6 ± 0,9        | 9,2 ± 0,6        |                  |                  |                  |                  |
| Salvo        | 9,8 ± 0,7                                                                                   | 14,9 ± 0,4       | 4,1 ± 1,0        | 10,6 ± 0,6       |                  |                  |                  |                  |
| Selenio      | 16,0 ± 1,4                                                                                  | 30,6 ± 3,9       | 3,0 ± 0,6        | 10,2 ± 0,5       |                  |                  |                  |                  |
| Thaibonnet   | 5,7 ± 1,1                                                                                   | 13,5 ± 0,6       | 4,5 ± 0,9        | 10,5 ± 0,6       | 7,1 ± 0,9        | 16,8 ± 1,1       | 1,6 ± 1,3        | 12,8 ± 1,8       |
| Venere       | 5,6 ± 0,6                                                                                   | 12,2 ± 0,5       | 2,3 ± 1,1        | 8,4 ± 0,9        |                  |                  |                  |                  |
| Vialone nano | 14,1 ± 1,1                                                                                  | 19,8 ± 0,5       | 2,8 ± 0,7        | 8,8 ± 0,6        | 7,8 ± 1,0        | 21,1 ± 1,8       | 2,4 ± 0,7        | 9,7 ± 0,6        |
| Volano       | 16,7 ± 1,6                                                                                  | 15,8 ± 0,3       | 3,8 ± 0,4        | 11,5 ± 0,3       | 8,8 ± 0,9        | 20,4 ± 1,4       | 4,4 ± 0,6        | 10,5 ± 0,5       |

**Tabella 24. Valori di conducibilità elettrica che inibiscono al 10% e al 50% la germinazione e la crescita della piante di riso.** Accanto ai dati ottenuti con la miscela di NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in rapporto molare 10:1:2:1 (a sinistra), per un sottoinsieme di genotipi sono riportati gli stessi parametri valutati in conseguenza alla semina in presenza del solo sodio cloruro (a destra).

Dal momento che nella maggior parte degli studi riportati in letteratura la suscettibilità di diversi genotipi di specie di interesse agrario viene valutata somministrando dosi crescenti del solo sodio cloruro, per vedere se queste due modalità di analisi possano fornire risultati simili o divergenti le stesse determinazioni sono state ripetute sostituendo alla miscela salina una soluzione contenente solo NaCl a diverse concentrazioni. Tale sperimentazione è stata condotta su un numero più ridotto di varietà, scelte tra quelle che presentavano soglie di danno molto diverse fra loro: Baldo, Carnaroli, Loto, Thaibonnet, Vialone nano e Volano. I risultati ottenuti sono stati sensibilmente diversi rispetto a quelli evidenziati con la miscela salina (Tabella 24). In genere sia la soglia di danno che l'ID<sub>50</sub> hanno mostrato valori notevolmente più bassi rispetto a quelli ottenuti in precedenza. Questo risultato può dipendere dal fatto che lo stress salino si presenta come una sindrome complessa, capace di coinvolgere più aspetti del metabolismo. Molto spesso nelle piante risulta infatti più grave l'effetto dello sbilanciamento del rapporto tra gli ioni che una variazione della concentrazione assoluta di un singolo ione. È stato ad esempio dimostrato che la presenza di ioni Ca<sup>2+</sup> può influire in maniera positiva sul rapporto K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>, mitigando i sintomi dello stress salino (Maathius *et al.*, 1999). Dal momento che -ad eccezione degli ambienti salmastri, che però in genere non sono destinati a uso agricolo- in genere l'ipersalinità del suolo dipende dalla presenza di più sali e non del solo NaCl, i risultati ottenuti con la miscela sembrano meglio in grado di prevedere le *performances* in campo di un dato genotipo.

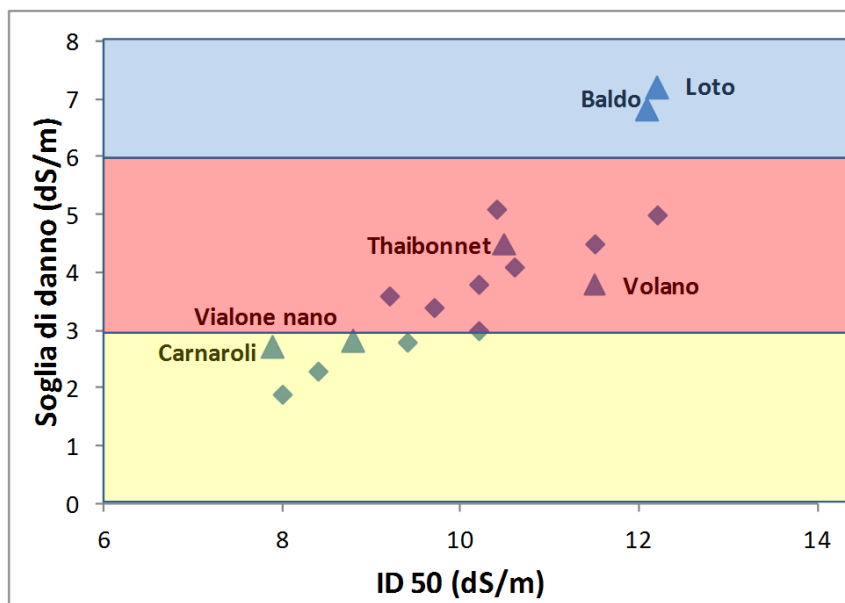
Al di là delle differenze quantitative, comunque, con entrambe le modalità la risposta relativa dei genotipi analizzati è risultata uniforme: Volano, Loto e Baldo presentano infatti in entrambi i casi le soglie di danno più elevate, Vialone nano e Carnaroli quelle più basse.

Per vedere se questo primo insieme di risultati potesse trovare una conferma, sia pure indiretta, nelle statistiche relative alla coltivazione delle varietà in aree soggette a elevati valori di salinità, sono state confrontate le percentuali di superficie a coltura in tutta Italia con quelle relative alle sole province in cui è suddiviso il delta del fiume Po, interessato in questi ultimi anni da fenomeni di risalita del cuneo salino. I risultati ottenuti rielaborando le statistiche dell'Ente Nazionale Risi (Tabella 25) mostrano in effetti che in queste aree affette da elevata salinità quasi la metà della superficie disponibile viene impiegata per la coltivazione delle varietà Baldo e Volano, che su scala nazionale occupano invece meno del 13% dell'area totale. La prima è proprio uno dei due genotipi capaci di crescere meglio in condizioni di stress salino, con uno dei più alti valori di soglia di danno. La cultivar Volano ha evidenziato una suscettibilità intermedia con la miscela salina, ma ha mostrato il più alto valore di soglia di danno con il solo NaCl, e il valore più elevato di IC<sub>50</sub> con la miscela salina subito dopo Loto e Baldo. La superficie coltivata con la cultivar Loto, invece, risulta inferiore nelle aree vulnerabili al sale rispetto all'uso su scala nazionale. Tale apparente contraddizione può però essere facilmente spiegata considerando che tale genotipo risulta estremamente suscettibile all'attacco da parte di *M. oryzae* (Faivre-Rampant *et al.*, 2011), il patogeno fungino che rappresenta oggi la principale causa di riduzione della resa delle colture di riso in Italia.

| Cultivar      | % area coltivata in Italia |             |             | % area coltivata nel delta del Po |              |              |
|---------------|----------------------------|-------------|-------------|-----------------------------------|--------------|--------------|
|               | 2010                       | 2011        | 2012        | 2010                              | 2011         | 2012         |
| Asia          | ≤ 0,05                     | ≤ 0,05      | ≤ 0,05      | ≤ 0,1                             | ≤ 0,1        | ≤ 0,1        |
| Augusto       | 3,64                       | 2,33        | 1,96        | ≤ 0,1                             | ≤ 0,1        | ≤ 0,1        |
| <b>Baldo</b>  | <b>4,33</b>                | <b>4,58</b> | <b>3,28</b> | <b>31,96</b>                      | <b>30,61</b> | <b>28,28</b> |
| Carnaroli     | 2,68                       | 3,03        | 3,83        | 1,05                              | 1,63         | 2,92         |
| Centauro      | 9,84                       | 9,58        | 11,61       | 1,32                              | 1,00         | ≤ 0,1        |
| Eurosis       | 0,40                       | 0,14        | 0,12        | 0,39                              | 0,23         | 0,20         |
| Gange         | ≤ 0,05                     | 0,08        | 0,09        | ≤ 0,1                             | ≤ 0,1        | ≤ 0,1        |
| Gigante VC    | ≤ 0,05                     | ≤ 0,05      | ≤ 0,05      | ≤ 0,1                             | ≤ 0,1        | ≤ 0,1        |
| Loto          | 3,62                       | 2,92        | 2,61        | 0,27                              | ≤ 0,1        | 0,37         |
| Maratelli     | ≤ 0,05                     | 0,09        | 0,05        | ≤ 0,1                             | ≤ 0,1        | ≤ 0,1        |
| S.Andrea      | 4,94                       | 4,64        | 4,59        | ≤ 0,1                             | ≤ 0,1        | ≤ 0,1        |
| Salvo         | ≤ 0,05                     | ≤ 0,05      | ≤ 0,05      | ≤ 0,1                             | ≤ 0,1        | ≤ 0,1        |
| Selenio       | 7,04                       | 7,32        | 5,83        | 0,16                              | 0,13         | 0,14         |
| Thaibonnet    | 0,75                       | 0,34        | 0,23        | ≤ 0,1                             | ≤ 0,1        | ≤ 0,1        |
| Venere        | ≤ 0,05                     | 0,11        | 0,12        | ≤ 0,1                             | ≤ 0,1        | ≤ 0,1        |
| Vialone nano  | 2,06                       | 1,97        | 1,76        | 1,07                              | 0,49         | 0,46         |
| <b>Volano</b> | <b>6,91</b>                | <b>8,21</b> | <b>8,32</b> | <b>14,96</b>                      | <b>17,94</b> | <b>19,99</b> |

**Tabella 25. Confronto fra le varietà di riso coltivate nel delta del Po con le statistiche a livello nazionale.** I dati dell'Ente Nazionale Risi, disponibili al sito [www.enterisi.it](http://www.enterisi.it), mostrano che negli anni considerati la superficie totale coltivata a riso era rispettivamente di 247653 ha, 246541 ha e 235052 ha, mentre nel delta del Po (province di Ferrara e Rovigo) erano impiegati a riso 9521, 11009 e 8888 ha. In quest'ultima zona tra i 17 genotipi analizzati nel presente lavoro due risultano le varietà predominanti, Baldo e Volano.

I risultati ottenuti in questa prima parte del lavoro sono stati riassunti visivamente graficando per ogni genotipo i valori di soglia di danno in funzione di quelli di IC<sub>50</sub> (Figura 66). Tale rappresentazione grafica permette la divisione delle cultivar analizzate in tre classi: mediamente tolleranti, con soglia di danno maggiore di 6 dS m<sup>-1</sup>; sensibili, la cui soglia di danno è compresa fra 6 e 3 dS m<sup>-1</sup>; altamente sensibili, in cui l'inibizione del 10% della crescita avviene a valori di EC minori di 3 dS m<sup>-1</sup>. Si è quindi deciso di selezionare due varietà per ognuna di queste 3 classi su cui cercare di caratterizzare le basi molecolari della diversa suscettibilità a condizioni di stress salino.

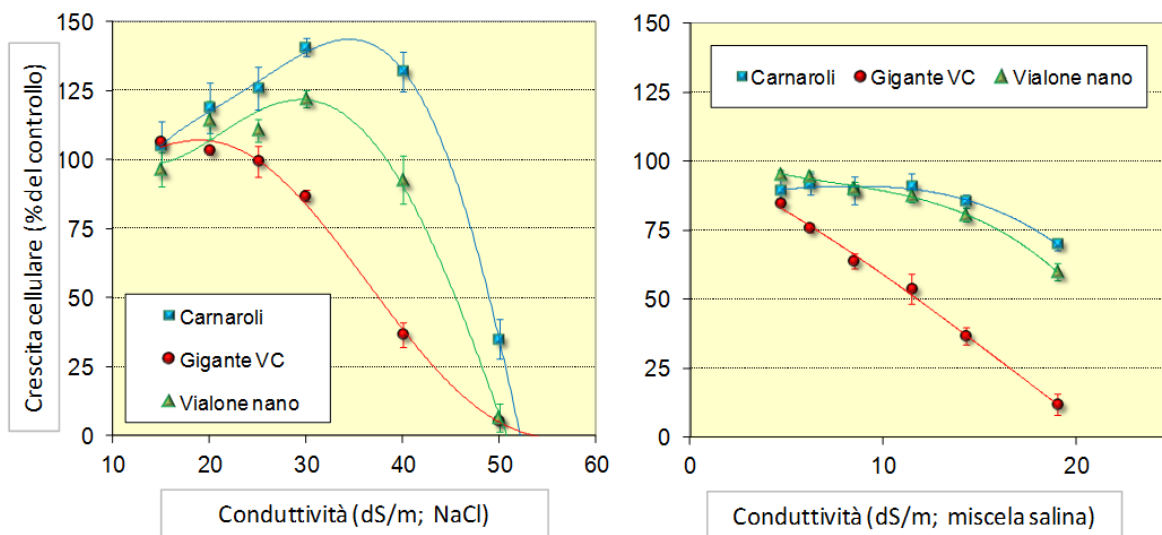


**Figura 66. Soglia di danno e IC<sub>50</sub> delle 17 varietà italiane di riso analizzate.** Graficando in questo modo i dati ottenuti facendo germinare e crescere le piantine in presenza di una miscela di sali simile per composizione alla soluzione-suolo, le varietà vengono suddivise in tre classi in base al loro grado di resistenza allo stress salino. Quelle che sono state scelte come rappresentative per la prosecuzione della ricerca sono evidenziate con un triangolo e indicate per nome.

### 3.1.1. Effetto dei sali a livello di tessuto indifferenziato

Per ottenere maggiori informazioni, l'effetto dello stress osmo-salino è stato indagato anche a livello di tessuti indifferenziati. L'utilizzo di colture cellulari in sospensione rappresenta un modello molto diffuso per studiare le risposte della pianta a condizioni di stress di tipo abiotico. Spesso le caratteristiche di resistenza/tolleranza presenti *in planta* vengono riscontrate anche nei calli e viceversa, per cui l'esposizione delle cellule a condizioni di stress può permettere una rapida selezione di cloni resistenti. Dal momento che erano già a disposizione colture cellulari di 3 tra i 17 genotipi oggetto di indagine, si è scelto di procedere a delle prove preliminari per verificare se la risposta a livello indifferenziato riflettesse o meno i livelli di tolleranza evidenziati *in vivo*. In caso positivo, si sarebbe potuto indurre la crescita di cellule in sospensione di tutte e 6 le cultivar selezionate per la caratterizzazione biochimico-molecolare dei determinanti della tolleranza. Inaspettatamente, si è osservata una inibizione molto blanda della crescita cellulare anche a livelli di conducibilità elettrica in cui la crescita delle piante era stata completamente soppressa (Figura 67).

La minore suscettibilità della crescita cellulare potrebbe dipendere dalla presenza di una non limitante fonte di energia. Il saccarosio contenuto nel terreno MS (30 g l<sup>-1</sup>) potrebbe infatti fornire l'energia sufficiente per estrarre dal citosol gli ioni prima che essi raggiungano livelli tossici. Independentemente dal meccanismo che assicura una così elevata tolleranza, dai risultati emerge una differenza significativa tra i dati *in vivo* e *in vitro* relativamente alla capacità di crescere ad alte concentrazioni di sali. Le varietà Carnaroli e Vialone nano mantengono infatti alti tassi di crescita a valori di EC pari a 40 dS m<sup>-1</sup>, mentre Gigante Vercelli nelle medesime condizioni subisce una forte inibizione, maggiore del 50%. Questo risultato è esattamente l'opposto di quello ottenuto a livello di plantula, dove sia la soglia di danno che l'ID<sub>50</sub> per Gigante Vercelli risultano significativamente maggiori che per gli altri due genotipi (Tabella 24). Sebbene il numero dei genotipi esaminati sia limitato, tali evidenze sembrano dunque suggerire che la risposta a livello indifferenziato non rispecchi esattamente la capacità di fronteggiare lo stress a livello di tessuti differenziati, dove probabilmente un ruolo chiave può essere giocato da fenomeni di trasporto intertissutale. Sulla base di queste risultanze si è pertanto deciso di non effettuare altre determinazioni basate sull'utilizzo di questo sistema *in vitro*.



**Figura 67. Effetto di elevati valori di EC sulla crescita di cellule in coltura di riso.** Colture cellulari in sospensione liquida di tre genotipi sono state trattate con la miscela salina (grafico a destra) o con il solo sodio cloruro (sinistra). L'incremento del peso secco 7 giorni dopo l'inoculo, espresso come percentuale di quello dei controlli non trattati, è stato posto in funzione del conseguente valore di conducibilità elettrica. Il trattamento con NaCl è risultato molto meno inibente di quello con la miscela salina. Ciò nonostante, la sensibilità a livello di cellule indifferenziate appare molto minore di quella evidenziata in precedenza sui tessuti differenziati.

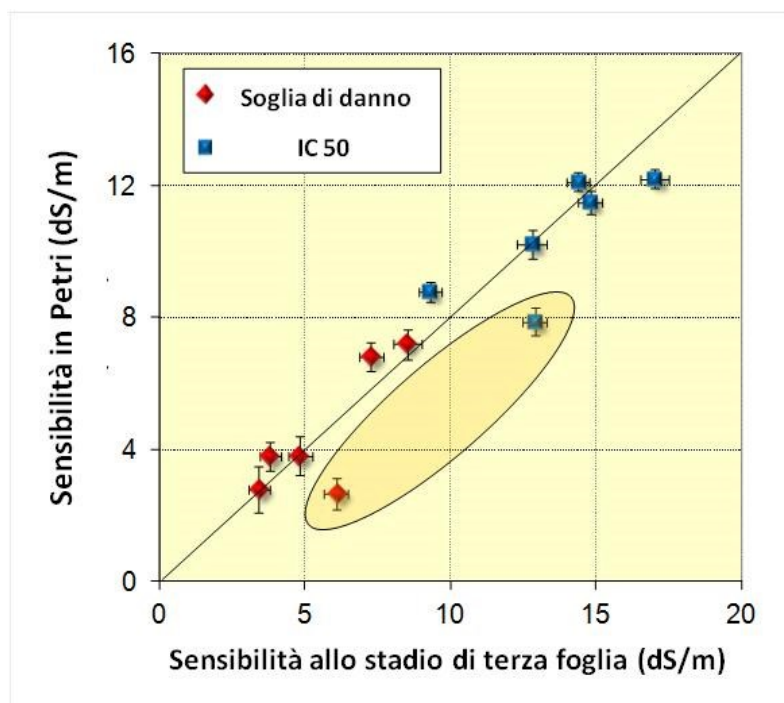
### 3.1.2. Valutazione dell'effetto di condizioni di stress osmo-salino allo stadio di terza foglia

Per l'effettuazione dello *screening* iniziale su 17 genotipi allo scopo di verificare l'esistenza di una variabilità naturale nella tolleranza allo stress osmo-salino tra le cultivar di riso esaminate era stato utilizzato un saggio a tempi brevi in capsule Petri, in modo da rendere fattibile l'esecuzione di un numero molto elevato di analisi. Al fine di verificare se le differenze in tal modo evidenziate tra i diversi genotipi fossero mantenute anche a uno stadio di sviluppo più avanzato, l'effetto di valori crescenti di conducibilità elettrica è stato esaminato sui sei genotipi selezionati come rappresentativi dei diversi gradi di suscettibilità facendo crescere le piante fino allo stadio di terza foglia. La crescita è stata fatta avvenire in capsule Magenta di quasi 20 cm di altezza, che permettono lo sviluppo verticale della pianta e l'applicazione di più lunghi periodi di trattamento. Per questa prova il genotipo Thaibonnet è stato rimpiazzato dalla cultivar Centauro, poiché il primo ad elevate concentrazioni saline mostra una forte riduzione della germinazione (Tabella 23), e ciò avrebbe determinato un numero troppo basso di plantule a elevati valori di EC.

I risultati ottenuti (Tabella 26) hanno confermato le varietà Loto e Baldo come quelle che manifestano la maggiore resistenza, con soglie di danno e  $IC_{50}$  più elevati rispetto agli altri genotipi. Eseguendo un confronto quantitativo tra i valori di soglia di danno e di  $IC_{50}$  ottenuti allo stadio di terza foglia con quelli ricavati dopo 7 giorni di trattamento in piastra Petri (Figura 68) si evidenzia un andamento molto simile. Effettuando un'analisi di correlazione fra i valori ricavati nei due esperimenti, il coefficiente di correlazione  $r$  di Pearson indica una significatività statistica, evidenziata dal fatto che tutti i punti nel grafico giacciono molto vicini alla retta. Fa in parte eccezione la cultivar Carnaroli, per cui è stata riscontrata una sensibilità inferiore nel saggio in Magenta. Tale comportamento suggerisce la possibilità che in questo genotipo qualche meccanismo di adattamento allo stress osmo-salino possa essere attivato durante i primi giorni di crescita, permettendo di recuperare con il tempo un tasso di proliferazione cellulare più simile a quello dei controlli.

| Cultivar   | 4,68        | 6,60       | 8,48       | 11,42      | 15,64      | 22,20      | IC <sub>10</sub> | IC <sub>50</sub> |
|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------------|------------------|
| Baldo      | 103,5 ± 4,7 | 90,0 ± 4,6 | 83,7 ± 3,3 | 68,3 ± 2,8 | 44,0 ± 2,1 | 18,8 ± 1,0 | 7,3 ± 0,4        | 14,4 ± 0,4       |
| Carnaroli  | 97,0 ± 5,3  | 78,0 ± 5,0 | 82,8 ± 4,3 | 59,4 ± 3,3 | 39,0 ± 2,4 | 10,7 ± 0,8 | 6,1 ± 0,4        | 12,9 ± 0,4       |
| Centauro   | 84,4 ± 5,3  | 80,0 ± 5,1 | 76,2 ± 5,7 | 59,9 ± 3,9 | 40,8 ± 2,1 | 15,8 ± 0,8 | 4,8 ± 0,4        | 12,8 ± 0,5       |
| Loto       | 108,2 ± 3,8 | 99,5 ± 4,2 | 87,2 ± 3,4 | 74,7 ± 3,1 | 59,2 ± 2,5 | 29,6 ± 1,5 | 8,5 ± 0,5        | 17,0 ± 0,5       |
| Vialone n. | 81,9 ± 7,1  | 68,8 ± 5,7 | 55,4 ± 4,9 | 42,1 ± 2,8 | 24,6 ± 2,6 | 6,7 ± 0,5  | 3,4 ± 0,4        | 9,3 ± 0,4        |
| Volano     | 95,9 ± 4,6  | 82,9 ± 3,9 | 80,5 ± 2,9 | 69,4 ± 2,6 | 48,3 ± 1,5 | 22,4 ± 1,1 | 3,8 ± 0,4        | 14,8 ± 0,4       |

**Tabella 26. Effetto di concentrazioni saline crescenti sulla crescita di plantule di riso fino allo stadio di terza foglia.** Il peso secco di piante di riso germinate e cresciute in presenza di volumi di miscela salina (NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in rapporto molare 10:1:2:1) in grado di determinare i valori specificati di EC è stato determinato 14 giorni dopo la semina, quando i controlli non trattati avevano raggiunto lo stadio di terza foglia. I dati sono stati espressi come percentuale rispetto ai controlli.



**Figura 68. Confronto fra i parametri di inibizione risultanti dal saggio in piastra Petri e quelli determinati allo stadio di terza foglia.** Nel grafico vengono riportati i valori di soglie di danno e di IC<sub>50</sub> ricavate con le due metodiche. I dati relativi alla varietà Carnaroli sono evidenziati dall'ellisse gialla. Nella tabella sottostante viene riportata l'analisi di correlazione.

#### Analisi di correlazione

|                |          |
|----------------|----------|
| r calc.        | 0,95     |
| r <sup>2</sup> | 0,90     |
| GdL            | 10       |
| t calc.        | 9,25     |
| p-value        | 1,62E-06 |

Dimostrata in tal modo l'esistenza nel germoplasma di riso italiano di diversi gradi di tolleranza a condizioni di stress osmo-salino, sono state condotte analisi più dettagliate su questo gruppo più ristretto di genotipi, cercando di individuare i meccanismi biochimico-molecolari alla base di tali differenze.

### 3.2. Contenuto di cationi nei tessuti di piante di riso esposte a concentrazioni saline crescenti

Come prima cosa si è voluto verificare se fra i genotipi in esame ve ne fosse qualcuno capace di escludere selettivamente gli ioni a livello radicale, impedendone il trasferimento nella parte aerea. A questo fine, presso il laboratorio del Prof. G. A. Sacchi dell'Università di Milano, è stata svolta una analisi ionomica dei tessuti di piante cresciute in terreno contenente livelli crescenti di sali. Le analisi si sono in particolare focalizzate sui cationi K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> e Mg<sup>2+</sup> contenuti nella parte aerea, dal momento che i campioni di tessuto radicale

hanno mostrato una elevatissima variabilità tra repliche, plausibilmente dovuta all'impossibilità di allontanare in modo efficiente gli ioni penetrati attraverso la via apoplastica nonostante i numerosi lavaggi effettuati al momento della raccolta dei campioni.

In un primo esperimento le piante sono state fatte crescere in terreno privo di sali aggiunti, e quindi trattate con diverse concentrazioni della miscela salina. A 24 e 48 h dal trattamento i tessuti sono stati prelevati per l'analisi mediante spettrometria di massa ICP. I risultati sono stati riassunti nella Tabella 27. Per quanto riguarda le concentrazioni di potassio, a 24 h non si osservano differenze sostanziali rispetto al controllo, mentre a 48 h si manifesta un calo dell'ordine del 10% nei due trattamenti a livelli più elevati di EC. Il contenuto di magnesio nella parte aerea delle plantule cresce leggermente, aumentando di circa il 20% rispetto ai controlli. La concentrazione del sodio aumenta in maniera molto netta in maniera proporzionale al trattamento e al tempo di esposizione. I valori in percentuale riportati in tabella evidenziano come il suo contenuto a 15,64 dS m<sup>-1</sup> arrivi in media ad aumentare di 15 volte rispetto al controllo.

#### Conducibilità elettrica (EC)

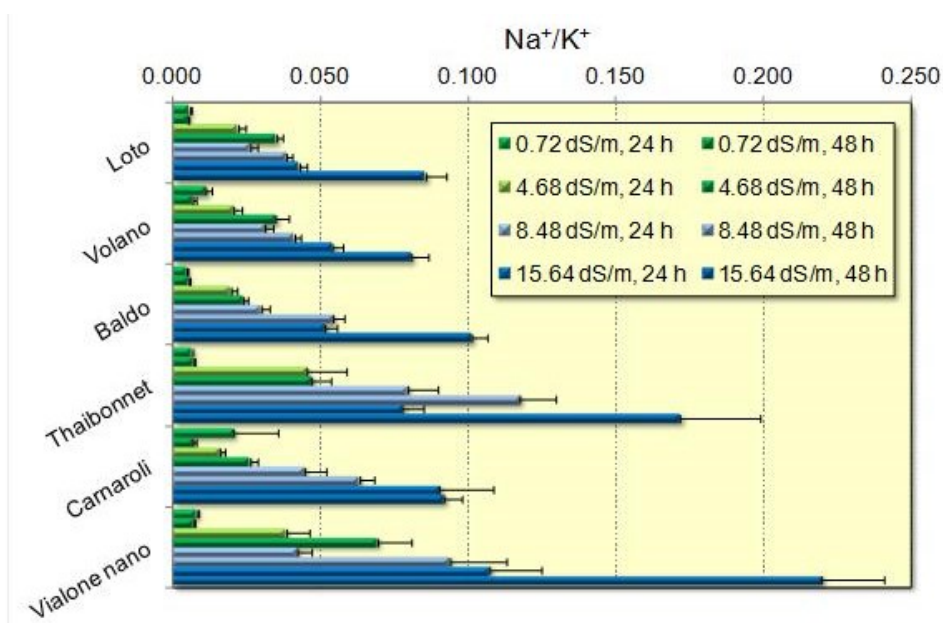
| Varietà                | 0,72                                |                 | 4,68            |                 | 8,48            |                 | 15,64           |                 |
|------------------------|-------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                        | T <sub>24</sub>                     | T <sub>48</sub> | T <sub>24</sub> | T <sub>48</sub> | T <sub>24</sub> | T <sub>48</sub> | T <sub>24</sub> | T <sub>48</sub> |
| <b>K<sup>+</sup></b>   | mg (kg di peso secco) <sup>-1</sup> |                 |                 |                 | %               |                 |                 |                 |
| Baldo                  | 58788 ± 937                         | 60611 ± 1293    | 106,6           | 110,6           | 107,7           | 95,7            | 103,2           | 103,3           |
| Carnaroli              | 61413 ± 819                         | 72546 ± 1777    | 114,9           | 91,5            | 105,8           | 91,1            | 111,4           | 88,2            |
| Loto                   | 64355 ± 1492                        | 60850 ± 2483    | 90,9            | 104,7           | 100,3           | 93,7            | 100,2           | 92,9            |
| Thaibonnet             | 63911 ± 174                         | 68509 ± 2357    | 90,8            | 86,5            | 90,7            | 84,6            | 89,4            | 83,3            |
| Vialone nano           | 64055 ± 6133                        | 64225 ± 1116    | 107,7           | 107,0           | 95,8            | 91,4            | 89,1            | 95,5            |
| Volano                 | 54781 ± 846                         | 64975 ± 1298    | 99,6            | 87,7            | 104,3           | 82,8            | 97,4            | 77,0            |
| <b>Na<sup>+</sup></b>  |                                     |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
| Baldo                  | 335 ± 25                            | 320 ± 15        | 400,3           | 732,8           | 489,9           | 695,9           | 769,9           | 1669,7          |
| Carnaroli              | 695 ± 104                           | 475 ± 72        | 203,7           | 474,7           | 288,5           | 576,8           | 527,6           | 1082,9          |
| Loto                   | 305 ± 14                            | 320 ± 24        | 352,8           | 481,6           | 631,5           | 962,8           | 1075,7          | 1774,4          |
| Thaibonnet             | 428 ± 14                            | 495 ± 49        | 563,1           | 561,0           | 1045,8          | 1281,4          | 991,8           | 1940,6          |
| Vialone nano           | 507 ± 115                           | 442 ± 59        | 219,3           | 410,0           | 528,2           | 835,1           | 919,7           | 1272,9          |
| Volano                 | 450 ± 23                            | 451 ± 36        | 448,9           | 849,2           | 521,6           | 1071,0          | 1236,4          | 1888,5          |
| <b>Mg<sup>2+</sup></b> |                                     |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
| Baldo                  | 1612 ± 44                           | 1620 ± 42       | 102,1           | 129,1           | 106,9           | 123,5           | 108,1           | 124,3           |
| Carnaroli              | 2106 ± 74                           | 1793 ± 89       | 91,4            | 127,0           | 112,0           | 123,2           | 95,4            | 126,8           |
| Loto                   | 1911 ± 54                           | 2358 ± 111      | 108,0           | 96,2            | 131,2           | 100,4           | 114,4           | 90,5            |
| Thaibonnet             | 2934 ± 5                            | 2797 ± 155      | 83,2            | 91,6            | 75,2            | 106,6           | 113,9           | 112,7           |
| Vialone nano           | 1845 ± 160                          | 1984 ± 71       | 115,0           | 118,7           | 132,7           | 127,9           | 120,1           | 124,8           |
| Volano                 | 2416 ± 128                          | 2370 ± 107      | 118,3           | 159,1           | 110,2           | 131,0           | 139,0           | 127,8           |

**Tabella 27. Contenuti di potassio, sodio e magnesio nelle foglie di sei genotipi di riso 24 e 48 h dopo il trattamento con diverse concentrazioni saline.** La quantità di cationi risultante dall'analisi effettuata in ICP-MS è espressa in valore assoluto per i controlli, e come percentuale nei trattati. I dati sono le medie ± errore standard dell'analisi ionomica eseguita su 10 repliche indipendenti per ogni trattamento.

Questi dati dimostrano come il contenuto di sodio nelle foglie cresca rapidamente in tutte le cultivar in seguito alla esposizione a un substrato salino. La rapida e uniforme traslocazione del catione nella parte aerea sembra dunque suggerire l'assenza di meccanismi che fungano da filtro selettivo per il sodio a livello radicale, o che permettano la sua riestrusione prevenendone il trasporto fino alle foglie.

L'approccio sperimentale utilizzato fornisce il contenuto totale dei cationi nei tessuti, ma non è in grado di discriminare le concentrazioni apoplastiche da quelle simplastiche, nè tra quelle presenti nel citosol rispetto al contenuto vacuolare. Non è possibile pertanto escludere che le varietà tolleranti siano maggiormente in grado di compartimentalizzare il sodio, limitandone gli effetti negativi.

Un parametro importante che può fare la differenza tra un genotipo sensibile e uno tollerante è rappresentato dal rapporto fra sodio e potassio. Infatti le piante hanno un assoluto bisogno di potassio ed è stato dimostrato che le varietà di riso capaci di mantenere un'alta concentrazione di potassio rispetto al sodio durante lo stress osmo-salino, sono quelle che meglio si adattano a queste condizioni, limitando la conseguente inibizione della crescita (Kader *et al.*, 2006). Tale rapporto è stato pertanto calcolato sulla base dei dati ottenuti con l'analisi ionomica e i risultati sono riportati nella Figura 69. I dati evidenziano però anche in questo caso una sostanziale omogeneità di risposta dei genotipi esaminati: in tutti i casi, infatti, si osserva un forte aumento del rapporto  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  in risposta alla presenza di elevate concentrazioni saline. Le lievi differenze presenti al riguardo fra i genotipi più tolleranti e quelli più sensibili non sono risultate statisticamente correlabili alla suscettibilità differenziale evidenziata a livello di crescita delle plantule.



**Figura 69.** Rapporto fra il contenuto di sodio e di potassio in sei varietà di riso a 24 e 48 h dal trattamento con concentrazioni crescenti di sali. I genotipi sono elencati dal più tollerante (Loto) al più suscettibile (Vialone nano).

Quest'ultima, però, era stata valutata su piante germinate e cresciute in condizioni di controllo e quindi esposte per brevi periodi a conducibilità crescenti. Non si poteva dunque escludere che differenze in meccanismi di traslocazione/esclusione potessero comparire solo dopo un certo tempo di esposizione alle condizioni di stress, e non risultassero evidenti a tempi brevi dopo la loro imposizione. Per verificare questa ipotesi, lo stesso esperimento è stato ripetuto su plantule fatte germinare e crescere per due settimane in presenza di concentrazioni crescenti di sali. I risultati ottenuti in questo caso dall'analisi ICP-MS sono riportati nella Tabella 28.

Nell'insieme i dati non sembrano discostarsi da quelli ottenuti in precedenza. In tutte le varietà si nota un aumento nel contenuto di sodio proporzionale alla severità del trattamento

applicato. Tra i genotipi sono evidenti delle differenze anche notevoli, che però non vanno nella direzione attesa: ad esempio in tutti i trattamenti il contenuto di sodio in Loto, espresso come percentuale rispetto al controllo, è più alto rispetto alla maggior parte delle altre varietà. Dal punto di vista della quantità assoluta, i valori del sodio sono nettamente superiori rispetto a quanto evidenziato a 24 e 48 h dal precedente trattamento, indicando che il raggiungimento dell'omeostasi a livello foliare richiede alcuni giorni.

Si nota d'altra parte un accumulo più marcato anche di magnesio, che a valori elevati di conducibilità più che raddoppia. Un andamento opposto è invece evidente per il potassio, che decresce con l'aumentare della severità del trattamento, facendo registrare diminuzioni che vanno dal 40% al 70% (Tabella 28).

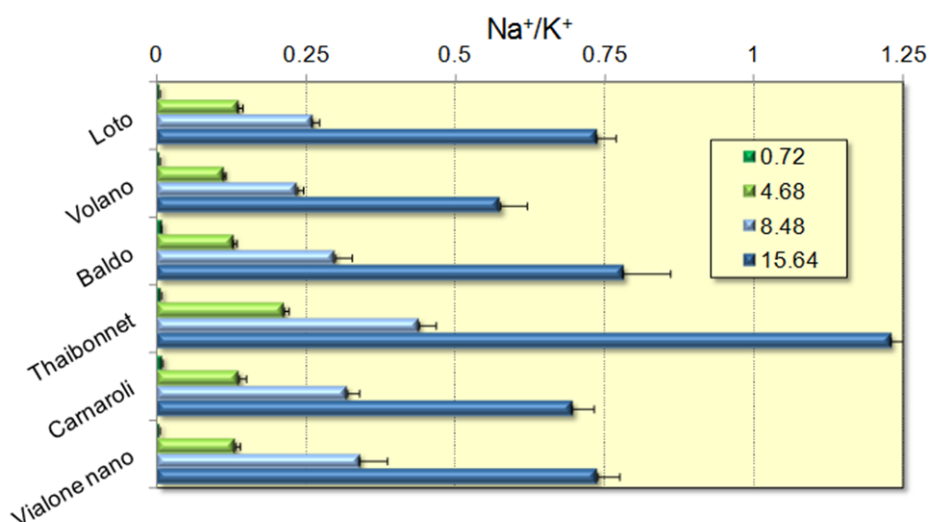
|                        | Conducibilità elettrica (EC)        |              |              |              |         |         |          |
|------------------------|-------------------------------------|--------------|--------------|--------------|---------|---------|----------|
|                        | 0,72                                | 4,68         | 8,48         | 15,64        | 4,68    | 8,48    | 15,64    |
| <b>K<sup>+</sup></b>   | mg (kg di peso secco) <sup>-1</sup> |              |              |              | %       |         |          |
| Baldo                  | 62182 ± 973                         | 50808 ± 1441 | 37817 ± 1806 | 29339 ± 1574 | 81,71   | 60,82   | 47,18    |
| Carnaroli              | 51600 ± 3286                        | 54476 ± 3089 | 40790 ± 1394 | 30309 ± 815  | 105,57  | 79,05   | 58,74    |
| Loto                   | 62648 ± 1319                        | 45058 ± 1098 | 37705 ± 1124 | 25783 ± 738  | 71,92   | 60,19   | 41,16    |
| Thaibonnet             | 59398 ± 1341                        | 39515 ± 1093 | 34020 ± 1036 | 18094 ± 1486 | 66,53   | 57,27   | 30,46    |
| Vialone nano           | 57907 ± 1036                        | 44136 ± 1042 | 31065 ± 1087 | 35893 ± 2354 | 76,22   | 53,65   | 61,98    |
| Volano                 | 59420 ± 1240                        | 50611 ± 909  | 34720 ± 1011 | 26977 ± 961  | 85,18   | 58,43   | 45,40    |
| <b>Na<sup>+</sup></b>  |                                     |              |              |              |         |         |          |
| Baldo                  | 463 ± 24                            | 6423 ± 250   | 10928 ± 692  | 21947 ± 754  | 1387,26 | 2360,26 | 4740,17  |
| Carnaroli              | 424 ± 22                            | 7107 ± 262   | 12784 ± 674  | 20796 ± 979  | 1676,18 | 3015,09 | 4904,72  |
| Loto                   | 256 ± 12                            | 6095 ± 240   | 9739 ± 340   | 18921 ± 812  | 2380,86 | 3804,30 | 7391,02  |
| Thaibonnet             | 393 ± 42                            | 8321 ± 217   | 14699 ± 648  | 20150 ± 941  | 2117,30 | 3740,20 | 5127,23  |
| Vialone nano           | 240 ± 9                             | 5729 ± 327   | 10107 ± 794  | 26266 ± 1933 | 2387,08 | 4211,25 | 10944,17 |
| Volano                 | 279 ± 10                            | 5611 ± 182   | 8087 ± 248   | 15279 ± 970  | 2011,11 | 2898,57 | 5476,34  |
| <b>Mg<sup>2+</sup></b> |                                     |              |              |              |         |         |          |
| Baldo                  | 1671 ± 44                           | 2271 ± 56    | 2422 ± 86    | 1671 ± 44    | 135,91  | 144,94  | 194,67   |
| Carnaroli              | 1783 ± 61                           | 3169 ± 117   | 3356 ± 145   | 1783 ± 61    | 177,73  | 188,22  | 191,25   |
| Loto                   | 1910 ± 56                           | 2460 ± 119   | 2518 ± 91    | 1910 ± 56    | 128,80  | 131,83  | 157,91   |
| Thaibonnet             | 2440 ± 80                           | 3097 ± 50    | 3325 ± 112   | 2440 ± 80    | 126,93  | 136,27  | 107,42   |
| Vialone nano           | 1471 ± 34                           | 2052 ± 58    | 2393 ± 49    | 1471 ± 34    | 139,50  | 162,68  | 277,29   |
| Volano                 | 1532 ± 57                           | 2483 ± 71    | 2424 ± 56    | 1532 ± 57    | 162,08  | 158,22  | 190,99   |

**Tabella 28. Contenuti di potassio, sodio e magnesio nelle foglie di sei genotipi di riso seminati e cresciuti in presenza di diverse concentrazioni saline.** La quantità di cationi risultante dall'analisi effettuata in ICP-MS è espressa sia in valore assoluto che come percentuale dei controlli non trattati. I dati sono le medie ± errore standard dell'analisi ionomica eseguita su 10 repliche indipendenti per ogni trattamento.

Non essendo evidente anche in questo caso alcuna correlazione tra i livelli dei diversi ioni e la suscettibilità differenziale allo stress salino dei genotipi esaminati, è stato calcolato il rapporto fra il sodio e il potassio, in modo da verificare eventuali variazioni rispetto ai *patterns* evidenziati a tempi brevi dopo l'aggiunta della miscela salina. I risultati ottenuti (Figura 70) sono nuovamente molto simili ai precedenti. Infatti il rapporto dei due cationi cresce in maniera stabile con la concentrazione dei sali nel terreno di coltura. In questo esperimento in particolare le grandezze ottenute con la maggiore concentrazione di sali sono il triplo di quelle ottenute a tempi brevi dopo l'esposizione ai sali. Nel caso della cultivar



Thaibonnet il quantitativo di sodio supera quello di potassio, mentre in piante cresciute 14 giorni a un valore di EC pari a  $4,68 \text{ dS m}^{-1}$  si raggiunge un valore di  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  paragonabile a quello che si otteneva dopo 48 ore a  $15,64 \text{ dS m}^{-1}$ . Nell'insieme i risultati sembrano dunque fornire un'ulteriore indicazione dell'assenza di meccanismi di esclusione capaci di impedire l'accumulo del sodio nella parte aerea della pianta.



**Figura 70. Rapporto fra il contenuto di sodio e di potassio in sei varietà di riso direttamente germinate in presenza di diverse concentrazioni di sali.** Le varietà sono elencate dalla più tollerante (Loto) alla più suscettibile (Vialone nano).

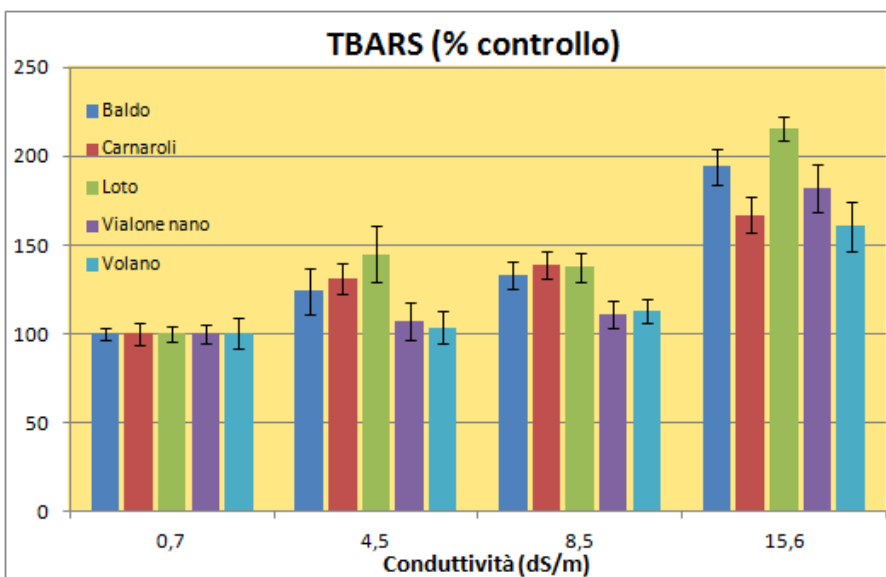
Pur non potendo escludere che parte del sodio traslocato a livello fogliare possa essere compartimentalizzato nei vacuoli, l'assenza di un attivo meccanismo di esclusione a livello radicale, o di riestrusione del sodio dallo xilema, dovrebbe provocare un innalzamento della sua concentrazione citosolica tale da tradursi in condizioni di stress ossidativo. Per prevenire i danni derivanti dai ROS le piante possono attivare la sintesi di enzimi antiossidanti. Il loro ruolo è essenziale poichè possono neutralizzare tali molecole riportandole a concentrazioni tali da fungere da segnale per una corretta modulazione dell'espressione genica, ripristinando così l'omeostasi metabolica (Türkan *et al.*, 2009). Proprio per questo è stato osservato che differenze nei livelli degli enzimi che detossificano i ROS possono conferire una diversa capacità di crescere in presenza di sale (Vaidyanathan *et al.*, 2003). Se questi sistemi non vengono attivati in tempo, si assiste al contrario a una massiccia produzione di ROS.

### 3.3. Livelli di perossidazione lipidica nelle foglie di piante di riso all'aumentare dei valori di conducibilità elettrica del mezzo

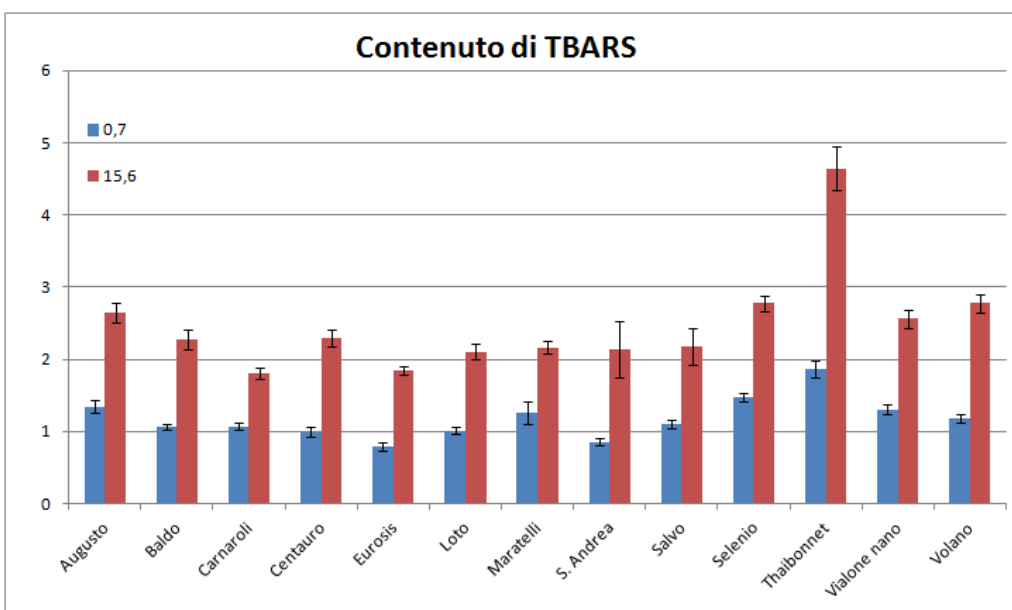
Per verificare questo aspetto, le 5 varietà di riso selezionate in base alla tolleranza differenziale allo stress osmo-salino sono state fatte crescere in presenza di concentrazioni crescenti di sali, e il tasso di perossidazione lipidica è stato calcolato misurando il contenuto delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARs). In questa, come in alcune tra le successive determinazioni, la varietà Thaibonnet è stata esclusa per via della bassa percentuale di germinazione.

I risultati, riportati in Figura 71, confermano che la traslocazione del sodio fino ai tessuti foliari provoca condizioni di stress ossidativo: all'aumentare della EC cresce infatti in maniera proporzionale anche il livello di TBARs. Tale incremento appare però relativamente simile in tutte le varietà esaminate, con un aumento che fino a  $8,5 \text{ dS m}^{-1}$  resta abbastanza contenuto. Solo a seguito del trattamento a  $15,6 \text{ dS m}^{-1}$  si giunge a un raddoppio della concentrazione di TBARs. Tra i genotipi sono evidenti a questo proposito delle differenze, ma senza un andamento correlabile nè in senso positivo nè in senso negativo alla tolleranza differenziale a livello di crescita. Nell'ipotesi che tale mancanza di correlazione potesse dipendere dal basso numero di cultivar esaminate, le medesime determinazioni sono state

eseguite su un numero maggiore di genotipi (n = 13) con l'obiettivo di avere una base statistica più solida. Si è deciso però a questo fine di limitare i trattamenti alla sola dose più alta (corrispondente a 15,6 dS m<sup>-1</sup>), dove si erano manifestate le differenze maggiori. I risultati di queste determinazioni sono riassunti nella Figura 72.



**Figura 71. Accumulo di TBARS in risposta a condizioni di stress salino.** Le piante di riso sono state fatte germinare in presenza di concentrazioni crescenti di sale, e dopo due settimane di crescita il contenuto di TBARS è stato misurato nelle foglie. I risultati sono espressi come percentuale rispetto al controllo e sono la media ± errore standard di 10 repliche indipendenti.



**Figura 72. Accumulo dei TBARS in 13 genotipi di riso sottoposti a stress salino.** Le piante in questo caso sono state sottoposte al solo trattamento a 15,6 dS m<sup>-1</sup>. I risultati sono stati analizzati statisticamente per verificare la presenza di una correlazione con le soglie di danno calcolate in precedenza nelle stesse condizioni di crescita.

#### Analisi di correlazione (r di Pearson)

| x               | y                            | r (calc.) | Gd | t (calc.) | p-value |
|-----------------|------------------------------|-----------|----|-----------|---------|
| Soglia di danno | [TBARS] (trattato-controllo) | 0,087     | 11 | 0,29      | 0,77    |

Nei 13 genotipi analizzati viene confermato l'andamento evidenziato in precedenza, ovvero un generale raddoppio della concentrazione di TBARS in risposta al trattamento salino. In termini assoluti risulta evidente un accumulo maggiore in Thalbonnet, a fronte però di valori elevati già presenti nei controlli non trattati.

Su questo insieme di dati si è provato, mediante il coefficiente di correlazione di Pearson (*r*), a verificare se vi fosse una relazione fra questo indice di stress ossidativo e la

soglia di danno valutata nel saggio in capsule Petri. Da questo punto di vista ci si sarebbe potuti attendere una correlazione negativa, assumendo che le varietà in cui si verifica una minore inibizione della crescita in condizioni di stress sviluppino meno ROS. Non poteva però essere esclusa a priori neppure una correlazione positiva, dal momento che la produzione di livelli moderati di ROS sembra essenziale per indurre le risposte di difesa della pianta (O'Brien *et al.*, 2012). Il valore di  $p$  ottenuto, però, non risulta significativo, con un valore di  $r^2$  addirittura inferiore a 0,01. Questo sembra suggerire che la riduzione della crescita manifestata a livello di plantule trattate con concentrazioni crescenti di sali non dipenda da un conseguente livello di stress ossidativo. Il dato sembrerebbe in contrasto con quanto osservato in alcune varietà di riso resistenti al sale (Pokkali e FL478), dove è risultato evidente un basso contenuto di TBARs in condizioni di stress salino (Senadheera *et al.*, 2012). Non bisogna dimenticare però che tali varietà di riso appartengono al gruppo *indica* e che proprio in Pokkali è stata osservata una notevole capacità di estrusione del sodio che limita la sua traslocazione alla parte aerea, nonché il mantenimento di un'alta concentrazione di potassio. Probabilmente la variabilità genetica all'interno del germoplasma di riso è così elevata che vi sono numerosi meccanismi di resistenza allo stress salino. Se a questo si somma il fatto che le cultivar italiane (tutte *japonica*) sono geneticamente distanti da quelle di tipo *indica*, l'esistenza di differenti strategie di adattamento all'alta salinità sembra più che possibile.

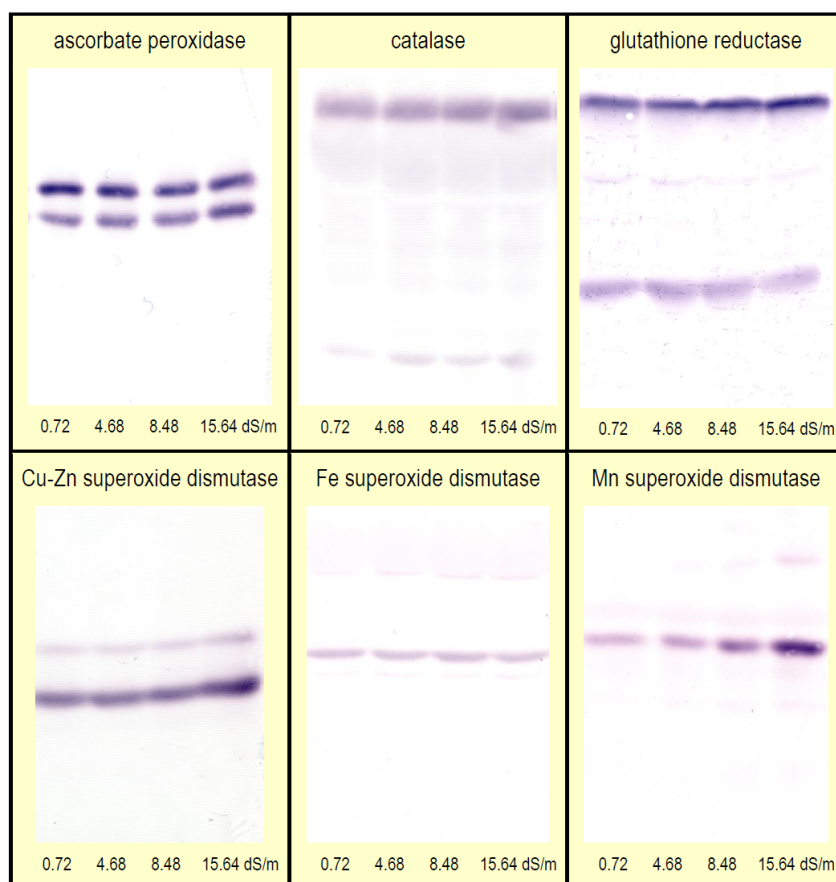
Questi dati consentono d'altra parte di speculare, sia pur indirettamente, sulla possibilità che tra le cultivar italiane vi sia una differente capacità di compartimentalizzazione del sodio a livello cellulare. Se nelle varietà più tolleranti vi fosse un efficiente trasporto del catione nel vacuolo, questo dovrebbe infatti determinare un danno ossidativo minore, e quindi un conseguente minore accumulo di TBARs. Dal momento che così non è, sembra che si possa escludere anche questa evenienza.

### **3.4. Espressione degli enzimi antiossidanti in condizioni di stress osmo-salino**

Per fronteggiare l'accumulo di ROS conseguente allo stress salino, le piante inducono l'espressione degli enzimi antiossidanti. Il ruolo di tali molecole è stato studiato a fondo, ed è quello di modulare l'equilibrio fra l'iper-produzione dei ROS in risposta a stimoli ambientali e la loro neutralizzazione. Questo consente il mantenimento di appropriati livelli dei radicali, utili per il *signalling*, anche in condizioni di stress, permettendo il raggiungimento di un nuovo stato di omeostasi e quindi la continuazione della crescita. Le differenze a livello dell'espressione e della modulazione delle attività degli enzimi antiossidanti possono contribuire in maniera significativa all'adattamento della pianta all'alto contenuto salino presente nel terreno. Anche se le prove condotte avevano fatto escludere una correlazione tra il livello di perossidazione lipidica e la tolleranza relativa delle cultivar di riso allo stress salino, non si poteva escludere che questa dipendesse dalla capacità di evitare uno specifico danno ossidativo a livello cellulare, e che quindi diversi livelli di espressione di un determinato sistema antiossidante potessero differenziare i genotipi sensibili da quelli più tolleranti.

Nelle piante sono presenti numerosi enzimi con un ruolo antiossidante, ognuno dei quali conta diverse isoforme, a volte anche compresenti nello stesso comparto cellulare. Questo aspetto rende molto difficoltosa la determinazione dei loro livelli di attività specifica, dal momento che la quantificazione dell'attività totale potrebbe non essere in grado di evidenziare differenze significative in quella di una singola forma isoenzimatica. D'altra parte la separazione fisica di queste forme risulta spesso difficoltosa e, richiedendo una notevole mole di lavoro, non si presta facilmente all'esecuzione di uno *screening* adeguatamente replicato su un numero significativo di genotipi. Con lo scopo di ottenere una prima serie di dati sugli enzimi maggiormente coinvolti nella risposta allo stress osmo-salino, si è deciso pertanto di utilizzare un approccio di tipo immunologico, grazie alla disponibilità commerciale di anticorpi policlonali specifici per tali proteine. Questa indagine preliminare avrebbe dovuto fornire indicazioni riguardo agli enzimi maggiormente indotti dallo stress salino, su cui poi concentrare l'attenzione e ottenere conferme a livello di attività enzimatica.

Dopo aver ottimizzato le condizioni di *Western blot* per ognuna delle proteine di interesse in modo da ottenere condizioni in cui il segnale non risultasse saturato, è stata condotta un'analisi sui 5 genotipi di riferimento, cresciuti in presenza di concentrazioni crescenti di sali. I tessuti della radice e della parte aerea sono stati analizzati separatamente. Per poter avere un dato statisticamente più valido ma senza moltiplicare eccessivamente il numero di campioni, sono stati preparati per ogni trattamento 6 estratti differenti, ognuno corrispondente a una singola piantina. Dopo normalizzazione per il contenuto di proteine, essi sono stati combinati, ottenendo un preparato che rappresenta dunque una sorta di *valore medio*. Questo estratto è stato sottoposto a separazione elettroforetica e *immunostaining* per il contenuto di ascorbico perossidasi, catalasi, glutatione reduttasi e per le 3 forme di superossido dismutasi. Nella figura 73 sono riportati i risultati ottenuti nel caso della varietà Vialone nano, che mostrano l'andamento dei livelli dei sei enzimi esaminati in risposta alla severità del trattamento salino.

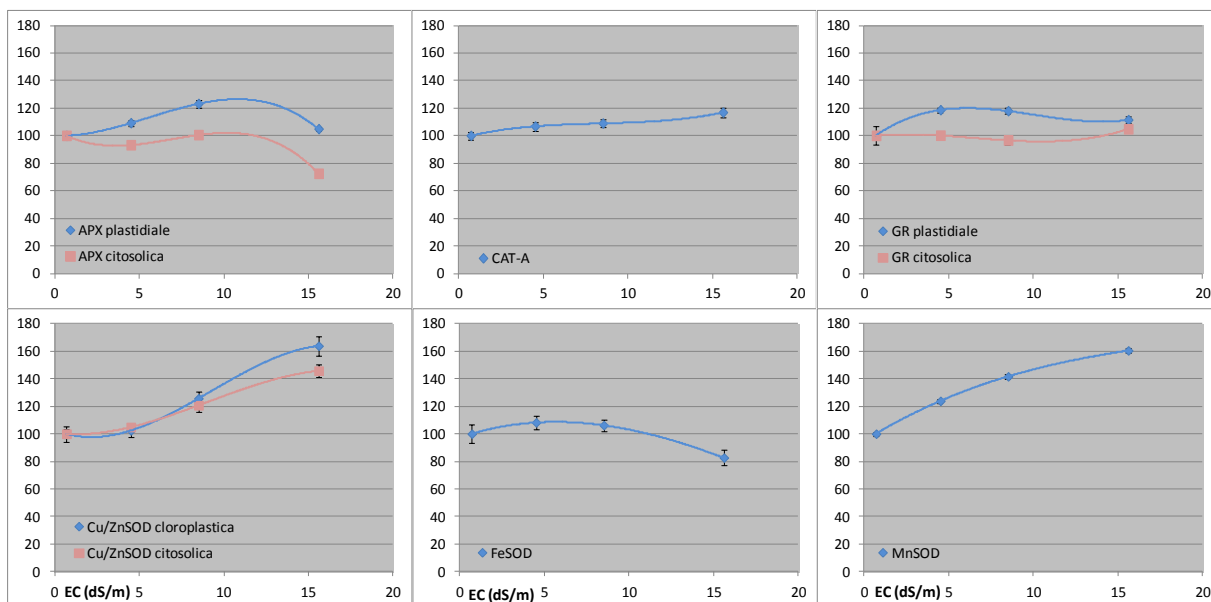


**Figura 73. Analisi immunologica dei livelli proteici di sei enzimi antiossidanti in foglie di plantule di riso esposte a valori crescenti di conducibilità elettrica. I dati si riferiscono alla varietà Vialone nano e sono il risultato della immunorilevazione dopo separazione delle proteine mediante SDS-PAGE. Le medesime determinazioni sono state eseguite anche sugli altri 4 genotipi di riferimento. L'entità delle bande è proporzionale alla quantità di proteina presente nell'estratto.**

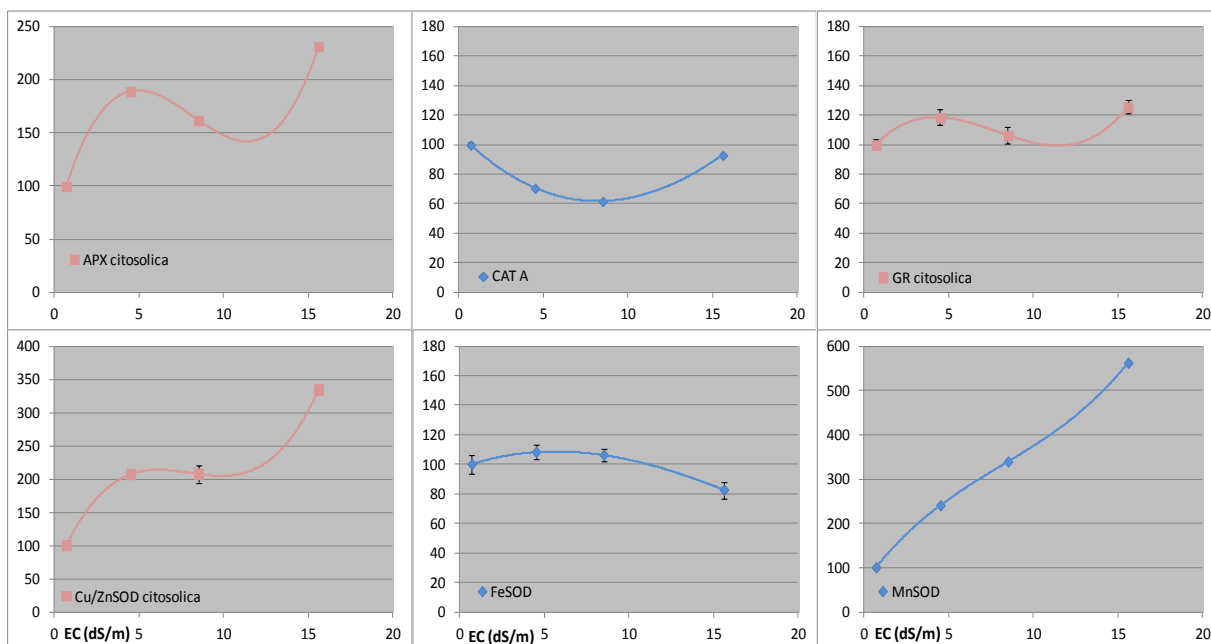
Le bande così ottenute sono state sottoposte ad analisi densitometrica, che ha permesso la conversione del segnale visivo in valori numerici. I dati sono stati quindi espressi come percentuale rispetto ai relativi controlli. Non risultando immediatamente evidenti forti differenze tra genotipi, si è deciso di combinare fra di loro tutte le determinazioni, con lo scopo di ottenere un quadro generale che evidenziasse il possibile incremento dei livelli di proteina in risposta alle condizioni di stress.

Dai risultati (Figura 74) si può vedere come nella parte aerea delle plantule non siano evidenti variazioni significative per quanto riguarda la GSH reduttasi e la Fe-SOD. Si nota poi un andamento contrastante per l'ascorbato perossidasi, la cui forma plastidiale a più alto peso molecolare è risultata indotta dallo stress osmo-salino, mentre quella citosolica (a peso molecolare minore) mostra un andamento opposto: considerando la somma delle due isoforme, il contenuto di questo enzima rimane inalterato. I quantitativi di catalasi mostrano

una leggera induzione in risposta al trattamento, ma gli enzimi maggiormente rispondenti sono risultati essere le due forme di superossido dismutasi dipendenti da rame-zinco e manganese. Per esse si verifica infatti un aumento rispetto ai controlli corrispondente al 160 e 140% per la forma cloroplastica e citosolica di Cu/Zn-SOD, e al 160% per la Mn-SOD.



**Figura 74. Analisi semi-quantitativa dei livelli degli enzimi antiossidanti nelle radici e nella parte aerea di piante sottoposte a stress salino.** I risultati ottenuti mediante analisi densitometrica dei *Western blots* sono stati normalizzati come percentuale rispetto a quelli ottenuti per i corrispondenti controlli non trattati, ed espressi come media  $\pm$  SE dei dati ottenuti nelle 5 varietà di riso analizzate. I valori corrispondenti alla parte aerea sono riportati nel pannello superiore, quelli relativi alle radici vengono presentati nella porzione sottostante.



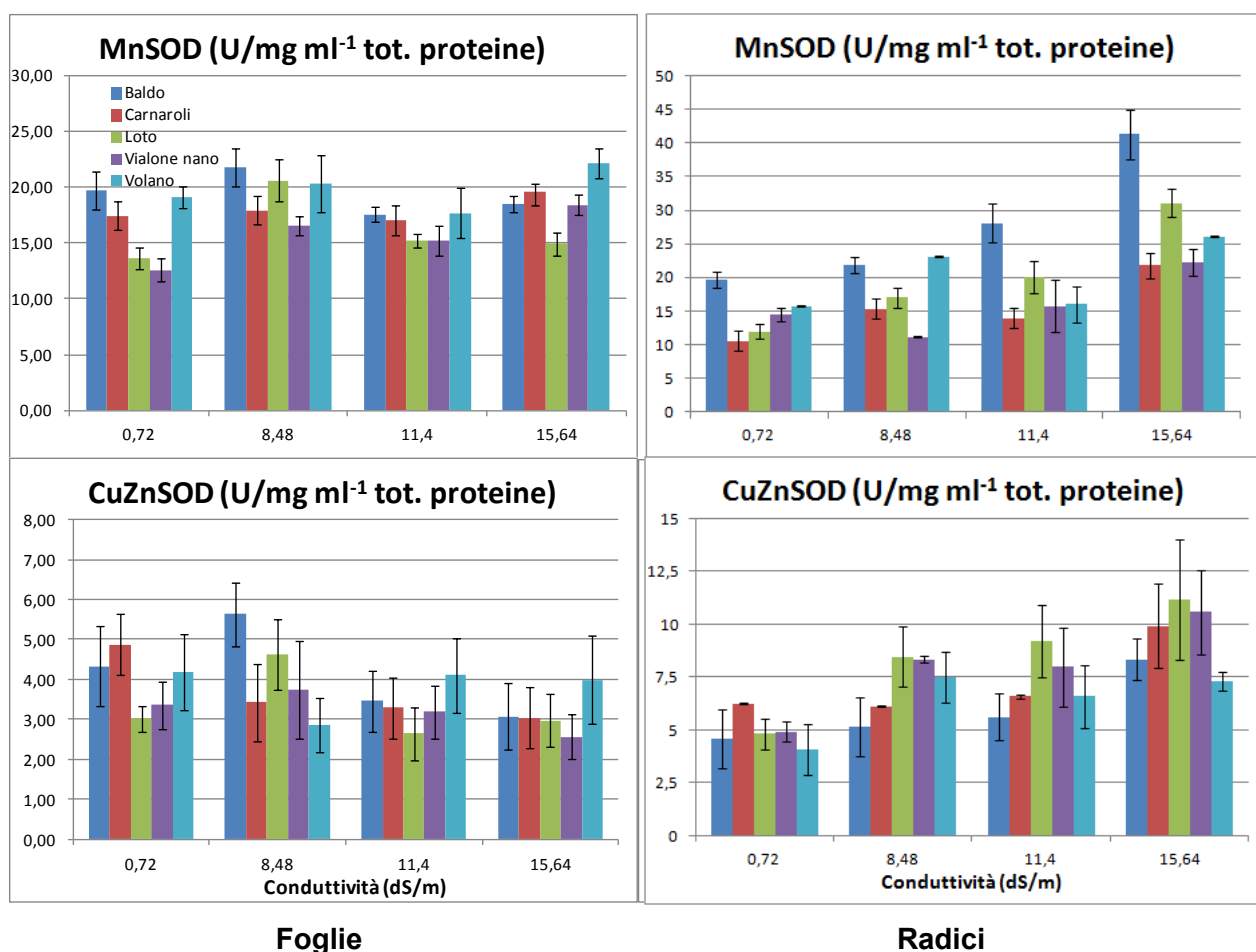
L'analoga analisi condotta sugli estratti preparati dall'apparato radicale ha evidenziato, come poteva essere atteso, una maggiore induzione degli enzimi antiossidanti. Le radici,

infatti, sono la porzione della pianta più esposta al contatto con i sali. La forma citosolica di APX, che nelle foglie era risultata non indotta, mostra un raddoppio dei propri livelli. La Cu/ZnSOD presenta un aumento più che doppio. La MnSOD, in particolare, risulta l'enzima maggiormente rispondente allo stress, con un livello di proteina che cresce in risposta all'aumento della concentrazione salina fino ad arrivare a quasi sei volte quello del controllo non trattato, un valore che supera il triplo di quello osservato nelle foglie.

Le differenze relative ai singoli genotipi non sono state analizzate statisticamente, visto che il dato ottenibile mediante l'approccio sperimentale utilizzato è di tipo semi-quantitativo. Inoltre la presenza di differenti livelli di proteina non implica necessariamente una uguale differenza in termini catalitici, poichè vi potrebbero essere varianti alleliche con diverse proprietà cinetiche. I risultati dell'analisi immunologica sono stati utilizzati solo per orientare la scelta del sistema su cui focalizzare ulteriormente l'attenzione. Sulla base dei dati ottenuti, quindi, si è deciso di misurare i livelli di attività di Mn-SOD e Cu/Zn-SOD, i due enzimi maggiormente indotti in condizioni di stress salino.

### 3.5. Livelli di attività delle SOD in condizioni di stress salino

La determinazione dei livelli di attività della Cu/Zn-SOD e della Mn-SOD in estratti preparati da foglie e da radici di piante riso germinate e cresciute in presenza di valori crescenti di EC hanno permesso di ottenere i risultati riassunti in Figura 75.



**Figura 75. Livelli di attività delle SOD in risposta a concentrazioni saline crescenti.** Le diverse forme dell'enzima sono state misurate per mezzo di condizioni specifiche di saggio in estratti da piante cresciute a diversi valori di EC.

Il metodo impiegato consente la determinazione contestuale di tutte e tre le forme di SOD. Ciò nonostante i livelli di attività della Fe-SOD, come atteso sulla base dei dati di letteratura (Kaminaka *et al.*, 1999), erano al di sotto dei limiti di rilevabilità del metodo, e non sono quindi stati calcolati. Relativamente alle altre due isoforme, inaspettatamente non sono stati rilevati cambiamenti rilevanti nei livelli di attività specifica nella parte aerea in risposta alle condizioni di stress. Solo a bassi valori di EC ( $8,48 \text{ dS m}^{-1}$ ) si verifica un leggero aumento di entrambe, ma che risulta non correlato alla tolleranza differenziale allo stress delle diverse cultivar. L'andamento dei livelli di attività dei medesimi enzimi nelle radici mostra un aumento più marcato in corrispondenza del trattamento più drastico, in cui l'attività specifica delle SOD raddoppia in quasi tutti i genotipi.

Questi risultati, però, appaiono nell'insieme del tutto non coerenti con quelli dell'analisi immunologica (Figura 74), in cui erano state al contrario rilevate variazioni molto significative dei livelli delle corrispondenti proteine. Una simile discrepanza potrebbe essere spiegata da una parziale ma consistente inattivazione di questi enzimi in condizioni di stress. Alcuni lavori, infatti, riportano che la Cu/Zn-SOD in presenza di elevate concentrazioni di  $\text{H}_2\text{O}_2$  può funzionare come perossidasi, causando in tal modo la propria inattivazione (Kim *et al.*, 2000). Questa ipotesi è avvalorata dall'abbassamento dei livelli di attività rispetto al controllo che si osserva in alcuni genotipi (Figura 75) a valori di EC a cui il contenuto di TBARs (Figura 71) denota un'elevata concentrazione di ROS all'interno della cellula. Se questa interpretazione fosse corretta, quello che era stato evidenziato con l'analisi immunologica consisterebbe in un accumulo di proteina inattiva. Si tratta di una osservazione non riportata sinora in letteratura, per confermare la quale in via definitiva bisognerebbe però dimostrare un aumento dell'espressione genica nelle stesse condizioni sperimentali, a fronte di livelli relativamente costanti di attività enzimatica.

Dal momento che i livelli di attività specifica delle SOD rimangono sostanzialmente costanti in risposta ai trattamenti, è plausibile che essi non costituiscano il determinante alla base della sensibilità differenziale all'eccesso di sali evidenziata tra le diverse cultivar. A parità di livelli enzimatici, una differenza potrebbe però essere determinata da una diversa disponibilità dei co-substrati che forniscono loro il potere riducente necessario al *quenching* delle specie radicaliche.

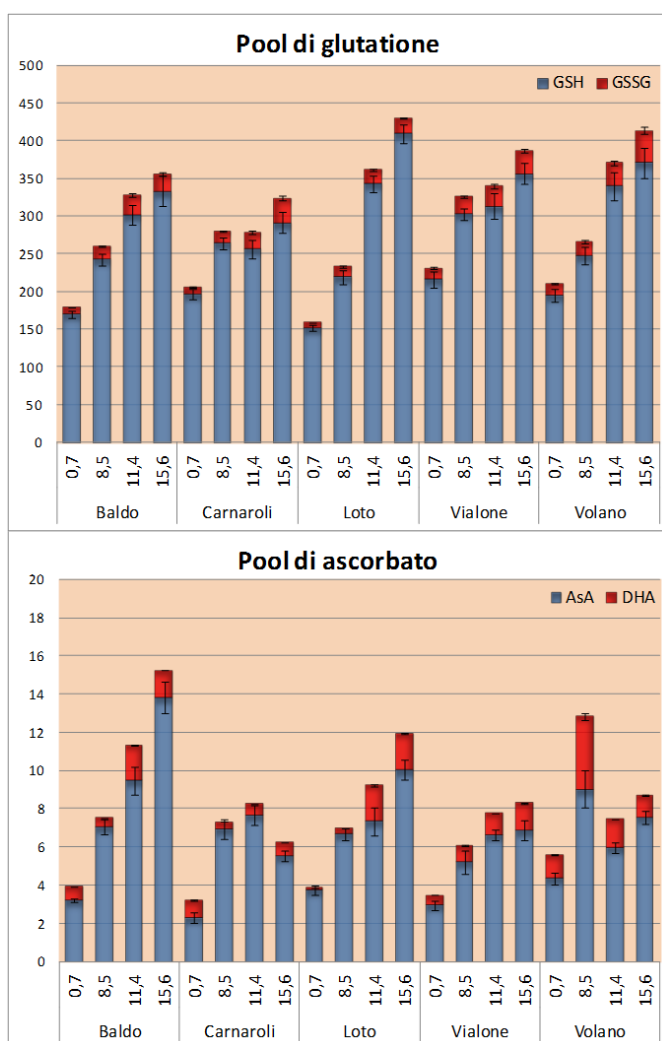
### 3.6. Contenuti di ascorbato e glutazione in risposta allo stress salino

I ROS che si accumulano a livello cellulare in risposta allo stress ossidativo possono infatti venire neutralizzati grazie alla concomitante ossidazione di alcune molecole, che a loro volta debbono essere rigenerate di continuo per impedire che il processo si arresti. Nelle piante questo ruolo è svolto principalmente dal GSH e dall'ASA. Per verificare se le diverse cultivar di riso presentassero una diversa capacità di rigenerazione di queste sostanze di difesa, i livelli delle forme sia ridotte (GSH e ASA) che ossidate (GSSG e DHA) di entrambi i composti sono state misurate in estratti preparati da plantule cresciute in presenza di concentrazioni crescenti di sale.

I risultati (Figura 76) evidenziano che per entrambe le molecole si verifica un aumento di concentrazione proporzionale ai valori di conducibilità elettrica. Per quanto riguarda il glutatione totale, somma di GSH e GSSG, sono evidenziabili differenze statisticamente significative sia tra i trattamenti che tra i genotipi, mentre l'interazione di queste due variabili non è significativa. Questo indica come in riso venga indotta la produzione di GSH in risposta allo stress salino, e come una parte significativa di tale molecola venga ossidata per neutralizzare i ROS, causando la formazione di GSSG. È interessante notare come la varietà più tollerante, Loto, accumuli il maggiore quantitativo di GSH, circa  $400 \text{ nmol (g di peso fresco)}^{-1}$ , valore statisticamente superiore rispetto alle medie di tutti gli altri genotipi.

Pur tenendo presente che il numero dei genotipi ( $n = 5$ ) è estremamente ridotto per poter trarre delle conclusioni valide per l'intero germoplasma di riso italiano, si è provato ad effettuare un'analisi di correlazione fra l'aumento percentuale del pool di GSH e GSSG e la corrispondente soglia di danno *in vivo*. Calcolando il coefficiente  $r$  di Pearson e sottoponendo

il *p-value* trovato alla correzione di Bonferroni, si è osservato che l'aumento di GSH ad alti valori di EC è proporzionale all'indice di danno. Tale dato sembra dunque indicare che ad elevate concentrazioni saline l'aumento di GSH libero contribuisca in maniera significativa alla sensibilità differenziale dei genotipi di riso esaminati. Eseguendo le medesime determinazioni sul GSSG, ci si aspettava di rilevare una correlazione negativa tra l'ossidazione del GSH e la soglia di danno. I dati ottenuti, però, non sono risultati significativi: in tutte le varietà si assiste allo stesso aumento della concentrazione di GSSG, indipendentemente della quantità di GSH disponibile. Sembra dunque che il parametro in grado di spiegare almeno in parte la minore inibizione della crescita sia più legato al mantenimento di un elevato pool di glutatione ridotto, ottenuto attraverso una sintesi *de novo*, che non nella rapidità della sua rigenerazione dal GSSG.



**Figura 76. Livelli di glutatione e ascorbato in piante di riso sottoposte a stress salino.** Le plantule sono state cresciute per due settimane alla EC specificata, quindi sono state determinate la forma ossidata (in rosso) e la forma ridotta (in blu) di glutatione e ascorbato. I dati sono media  $\pm$  SE di 10 repliche indipendenti, espressi in nmol o  $\mu$ mol (g peso fresco)<sup>-1</sup> per GSH e ASA, rispettivamente. Nella parte sottostante sono riportati i coefficienti ricavati dall'analisi di correlazione utilizzando il test di Pearson. I valori evidenziati (\*) sono risultati significativi dopo la correzione di Bonferroni.

|                | EC dS m <sup>-1</sup> |        |        |         |
|----------------|-----------------------|--------|--------|---------|
|                | 8,5                   | 11,4   | 15,6   | GdL     |
| <b>GSH</b>     |                       |        |        |         |
| r              | 0,66                  | 0,88   | 0,85   | 3       |
| t              | 1,96                  | 4,16   | 3,65   |         |
| p-value        | 0,07                  | 0,0008 | 0,0024 |         |
| r <sup>2</sup> | 0,44                  | 0,78   | 0,73   |         |
| <b>GSSG</b>    |                       |        |        |         |
| r              | 0,59                  | 0,78   | -0,39  | 3       |
| t              | 1,64                  | 2,83   | 0,94   |         |
| p-value        | 0,12                  | 0,01   | 0,36   |         |
| r <sup>2</sup> | 0,35                  | 0,62   | 0,15   |         |
| <b>ASA</b>     |                       |        |        |         |
| r              | -0,16                 | 0,24   | 0,81   | 3       |
| t              | 0,38                  | 0,55   | 3,1    |         |
| p-value        | 0,71                  | 0,58   | 0,007  |         |
| r <sup>2</sup> | 0,02                  | 0,06   | 0,66   |         |
| <b>DHA</b>     |                       |        |        |         |
| r              | -0,18                 | 0,88   | 0,68   | 3       |
| t              | 0,42                  | 4,14   | 2,08   |         |
| p-value        | 0,66                  | 0,0008 | 0,055  | P<0,05* |
| r <sup>2</sup> | 0,034                 | 0,77   | 0,46   | P<0,01* |

I dati analoghi relativi all'ascorbato mostrano un *trend* simile. I diversi trattamenti salini determinano un aumento del DHA rispetto al controllo, che spesso non è proporzionale alla severità dello stress. Ad esempio in Baldo e Volano i valori maggiori di DHA si ottengono rispettivamente nei trattamenti a 11,4 e 8,5 dS m<sup>-1</sup>. Il quantitativo di ASA ridotto cresce invece in proporzione ai valori di EC in quasi tutte le varietà considerate. In Baldo il trattamento salino più drastico triplica il quantitativo di ASA rispetto al controllo; un simile aumento, anche se di minore entità, viene osservato in Loto, mentre in Vialone il livello raddoppia. In Volano si registra un picco di ASA a 8,5 dS m<sup>-1</sup>, mentre in Carnaroli il



trattamento a  $15,6 \text{ dS m}^{-1}$  determina una diminuzione della sua concentrazione, forse a causa del complessivo danno a livello cellulare. L'analisi di correlazione fra l'aumento percentuale del quantitativo di ASA e DHA e la soglia di danno non ha però evidenziato nell'insieme relazioni significative, anche se il trattamento a  $11,4 \text{ dS m}^{-1}$  induce una sintesi di DHA statisticamente proporzionale al grado di resistenza alla salinità.

L'incremento di GSH e ASA in risposta a condizioni di stress salino è stato osservato in altre piante e interpretato come un possibile meccanismo di adattamento ad elevate concentrazioni di sali (Ruiz *et al.*, 2002). Nelle piante il maggiore sistema per detossificare l' $\text{H}_2\text{O}_2$  si basa sull'ascorbato come donatore di potere riducente. La sua forma ossidata viene continuamente rigenerata grazie al GSH mediante il ciclo glutatione-ascorbato. Stando così le cose, all'aumento della concentrazione di GSH ci si aspetterebbe una decrescita del livello di DHA, ma i dati ottenuti non vanno in questa direzione. Recentemente è stata avanzata però l'ipotesi che il metabolismo del GSH possa giocare un ruolo importante nel *signalling* legato allo stress, modulando attivamente il livello di espressione di alcuni geni di difesa (Ball *et al.*, 2004). D'altra parte la rigenerazione dell'ASA mediata dalla DHA reduttasi-GSH dipendente è solo una delle possibili strategie disponibili nei vegetali. Infatti le GSH perossidasi di alcune piante usano in maniera più efficace le tioredossine invece del GSH. Inoltre è stato osservato che alcune perossidasi dipendenti dal GSH sono attive contro l' $\text{H}_2\text{O}_2$  e i perossidi organici e che il gene corrispondente viene fortemente indotto dallo stress ossidativo (Foyer *et al.*, 2011). Questi dati di letteratura sembrano dunque rafforzare la possibilità che un accumulo di GSH possa contribuire all'adattamento a condizioni di stress ossidativo, anche a prescindere dal suo coinvolgimento nel ciclo di Halliwell-Asada.

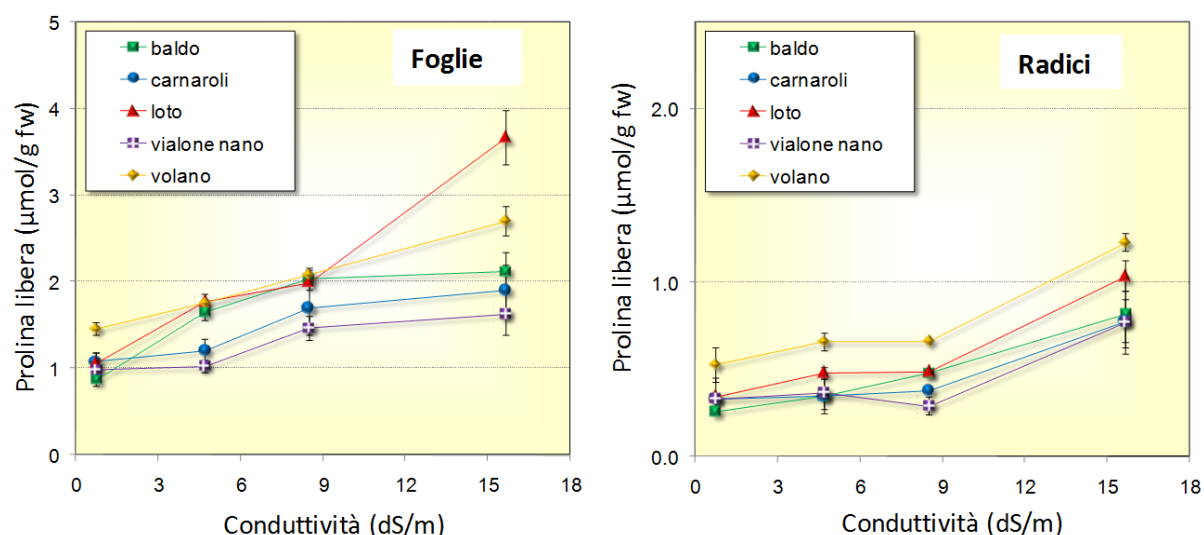
### 3.7. Accumulo di prolina in risposta allo stress salino

Un'ulteriore possibilità per le piante di far fronte ad un incremento del contenuto ionico dell'apoplasto è costituita dall'abbassamento del valore di potenziale idrico del simplasto mediante la sintesi e l'accumulo di osmoliti compatibili, tra cui la prolina è uno dei più comuni. Per le sue proprietà, questo amminoacido può svolgere un ruolo protettivo particolare in condizioni di stress, agendo anche come *scavenger* dei ROS. È stata quindi valutata la possibilità che la tolleranza differenziale allo stress salino potesse dipendere, almeno in parte, da una differente capacità di accumulare elevati livelli intracellulari di prolina.

In alcuni esperimenti preliminari piante dei cinque genotipi di riferimento sono state fatte crescere a diverse concentrazioni saline fino allo stadio di terza foglia, quindi si è determinato il contenuto amminoacidico della parte aerea e delle radici. In entrambi i tessuti si è osservato un aumento della concentrazione dell'imminoacido proporzionale alla severità del trattamento (Figura 77). Nelle radici la quantità assoluta di prolina era molto più bassa se paragonata a quanto osservato nelle foglie, e l'incremento veniva osservato solo a valori di EC maggiori di  $10 \text{ dS m}^{-1}$ . Nelle foglie l'aumento della quantità di prolina rispetto al controllo era invece visibile già con il trattamento più blando, a circa  $5 \text{ dS m}^{-1}$ .

Considerando gli andamenti osservati per le cinque varietà, sono evidenti differenze sia nelle quantità di prolina accumulata, sia relativamente alla severità delle condizioni di stress a cui tale accumulo inizia a manifestarsi. Sebbene i dati siano relativi a un numero limitato di genotipi, è interessante notare come le cultivar caratterizzate da una tolleranza intermedia (Volano) ed elevata (Baldo e Loto) mostrino un più alto tasso di accumulo di prolina già a bassi valori di EC rispetto alle varietà sensibili (Carnaroli e Vialone nano).

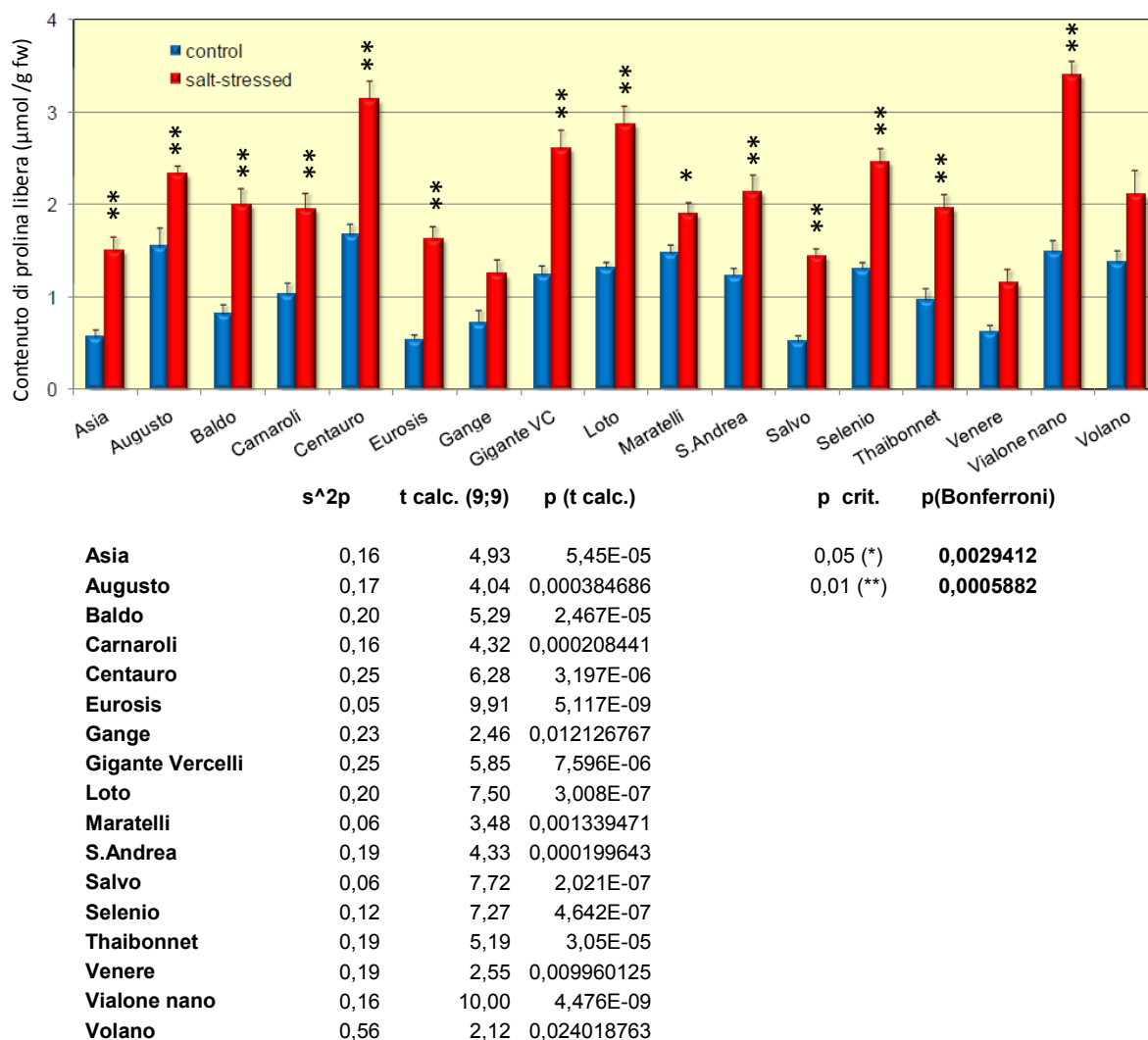
Sulla base di questi risultati si è quindi deciso di condurre una analisi più articolata su tutti i 17 genotipi disponibili. Per semplificare il disegno sperimentale si è limitata l'analisi alla parte aerea, dove vengono accumulati livelli maggiori dell'amminoacido, e si è eseguito un solo trattamento salino, corrispondente a  $15,6 \text{ dS m}^{-1}$ . Tale semplificazione ha permesso di aumentare il numero di repliche, in modo da ottenere poi un'analisi statistica più robusta. I dati ottenuti da 10 plantule dopo due settimane di crescita in condizioni di assenza o presenza della miscela salina sono riassunti nella Figura 78.



**Figura 77. Contenuto di prolina libera nelle foglie e nelle radici di piante di riso sottoposte a stress salino.** Le plantule sono state fatte crescere due settimane ai valori di EC indicati, quindi la concentrazione di prolina è stata misurata ed espressa in relazione al peso fresco. I risultati presentati sono media  $\pm$  SE di almeno tre repliche indipendenti, ognuna rappresentata da una singola piantina.

Differenze statisticamente significative sono state evidenziate in risposta allo stress salino in quasi tutte le varietà esaminate, confermando un accumulo dell'amminoacido a valori di EC elevati. Considerando i valori assoluti di prolina in condizioni di controllo e sotto stress si nota nel complesso una grande variabilità: varietà come Centauro, Vialone nano e Volano in condizioni normo-osmotiche hanno un contenuto dell'imminoacido maggiore di quello riscontrato in Gange, Salvo e Venere cresciuti a  $15,6 \text{ dS m}^{-1}$ . Quindi la concentrazione dell'amminoacido di per sé non sembra poter rappresentare un indice della tolleranza relativa allo stress. Un quadro molto diverso è però quello che è stato ottenuto mettendo in relazione la soglia di danno con l'incremento dei livelli di prolina dipendente dalle condizioni di stress. Dividendo le varietà nelle tre categorie descritte precedentemente e considerando l'aumento medio di prolina rispetto al relativo controllo, si ottengono infatti risultati statisticamente significativi. Se ne può quindi dedurre che le varietà mediamente tolleranti accumulano più prolina in risposta allo stress osmo-salino delle altre due tipologie di cultivar (Tabella 29).

Una volta confermata l'esistenza di differenze significative a questo riguardo tra i gruppi di genotipi, si è provato a verificare se l'aumento di prolina fosse correlabile con i coefficienti di soglia di danno determinati in precedenza. Si è così calcolato il coefficiente  $r$  di correlazione di Pearson tra queste variabili (Figura 79). Il calcolo del coefficiente "t" e del relativo p-value ha evidenziato una relazione significativa fra l'accumulo dell'imminoacido e la capacità di crescere meglio in condizioni di stress salino ( $p = 0,041$ ). Il valore di  $r^2$  ci fornisce un'idea della variabilità che accomuna i due parametri esaminati. Quasi un quinto della variabilità osservata nella tolleranza al sale può essere associata all'accumulo di prolina. In precedenza erano stati ottenuti valori maggiori di  $r^2$  nell'analisi di correlazione fra il contenuto di GSH e la soglia di danno (Figura 76), ma in quel caso le determinazioni erano state eseguite su un numero molto più limitato di genotipi ( $n = 5$ ) e quindi la base statistica che supporta quei risultati deve essere considerata molto più debole.



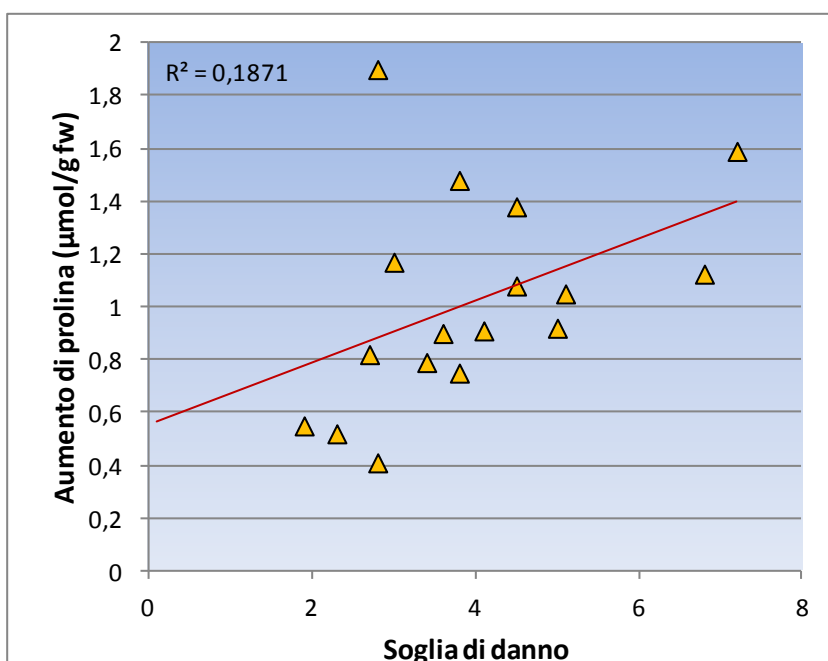
**Figura 78. Contenuto di prolina nelle foglie di 17 varietà italiane di riso in condizioni di controllo e di stress salino.** Le piante sono state fatte crescere per due settimane in assenza o presenza di sali ( $EC\ 16\ dS\ m^{-1}$ ) prima di quantificare i livelli di prolina. I risultati sono media  $\pm$  SE dei dati ottenuti su 10 repliche indipendenti. Vengono riportati anche i coefficienti ottenuti applicando il test T di Student a una coda per due campioni indipendenti.

|                          | n                | media  | Devianza |                 |         |               |
|--------------------------|------------------|--------|----------|-----------------|---------|---------------|
| toll.                    | 20               | 1,36   | 0,1081   |                 |         |               |
| sens.                    | 90               | 1,03   | 0,5073   |                 |         |               |
| alt. sens.               | 60               | 0,90   | 1,5861   |                 |         |               |
|                          | s <sup>2</sup> p | GdL    | t calc   | p (t calc)      | p crit. | P(Bonferroni) |
| Var. toll. VS sens.      | 0,0057           | 20; 90 | 17,60982 | <b>7,98E-34</b> | 0,05    | 0,016667      |
| Var. toll. VS alt. sens. | 0,0217           | 20; 60 | 12,15386 | <b>5,56E-20</b> | 0,01    | 0,003333      |
| Var. sens. VS alt. sens. | 0,0141           | 90; 60 | 6,754551 | <b>1,53E-10</b> |         |               |

**Tabella 29. Confronto fra l'aumento medio di prolina delle tre categorie in cui i genotipi di riso italiano possono essere suddivisi sulla base della loro suscettibilità al sale.** I 17 genotipi analizzati sono stati divisi nelle tre classi precedentemente identificate (varietà mediamente tolleranti, sensibili e altamente sensibili) e su di esse si è verificato se vi fossero differenze statisticamente significative nell'accumulo osmo-indotto di prolina, applicando un test T di Student a una coda. In tutti i casi le differenze sono significative all'1%.

I risultati indicano dunque che maggiore è la capacità di una cultivar di accrescere il contenuto intracellulare di prolina, sintetizzandola *ex novo* o limitandone l'ossidazione, e maggiore è la possibilità che sia in grado di adattarsi alle elevate concentrazioni saline. Non è la prima volta che tale correlazione viene evidenziata, anche se in alcuni casi essa era risultata negativa (Lutts *et al.*, 1999). In tutti gli altri studi condotti sul riso, tali risultati non avevano però permesso di ottenere evidenze conclusive per via del numero limitato di varietà esaminate. I risultati ottenuti nel presente studio hanno come punto di forza il fatto di essere relativi a un numero molto più elevato di genotipi.

Pur essendo questo risultato estremamente interessante, i livelli di prolina libera raggiunti in condizioni di stress sembrano comunque relativamente esigui. Anche considerando che i dati sono espressi in funzione del peso fresco dei tessuti, e che la corrispondente concentrazione assoluta nel citosol potrebbe essere anche di un ordine di grandezza più elevata ( $1 \mu\text{mol g}^{-1} \approx 10 \text{ mM}$ ), il conseguente abbassamento del potenziale idrico della cellula non sembra sufficiente a svolgere un ruolo di compensazione osmotica.



**Figura 79. Relazione fra l'accumulo di prolina e la tolleranza al sale.**

L'aumento dei livelli di prolina libera è stato posto in relazione con i valori di soglia di danno ottenuti in precedenza. La correlazione è stata calcolata utilizzando il test di Pearson a una coda, assumendo che i dati avessero una distribuzione normale.

|                    |        |                |        |
|--------------------|--------|----------------|--------|
| $\Sigma x$         | 67,3   | GdL (n-2)      | 15     |
| $\Sigma y$         | 17,34  | r              | 0,43   |
| $\Sigma x^2$       | 300,67 | t calc.        | 1,86   |
| $\Sigma y^2$       | 20,22  | p (t calc.)    | 0,0414 |
| $\Sigma x \cdot y$ | 72,69  | r <sup>2</sup> | 0,1871 |

Per meglio capire il ruolo funzionale svolto dall'accumulo di prolina, sono stati condotti esperimenti in cui le piante di riso sono state cresciute in condizioni normo-osmotiche e poi trattate con NaCl o con PEG 6000, un osmolita non permeante che induce la sola componente osmotica dello stress, simulando condizioni di siccità. Le stesse determinazioni sono state svolte anche su plantule di tabacco come termine di paragone, dal momento che in questa specie è stato dimostrato che la prolina svolge effettivamente un ruolo di osmolita compatibile (Krasensky *et al.*, 2012).

Il trattamento con NaCl determina un aumento della concentrazione di prolina già dopo 24 h, che continua fino a 72 h (Tabella 30). Tale aumento è però solo apparente, poiché anche il livello degli altri amminoacidi liberi aumenta in maniera paragonabile. Se il contenuto di prolina viene espresso come percentuale rispetto agli amminoacidi totali, le variazioni

successive al trattamento col sale sono quasi trascurabili. Solo a 72 ore l'incremento arriva a valori significativi (+30% in termini assoluti), ma molto al di sotto di quanto osservato in precedenza (Figura 78). Al contrario, gli stessi trattamenti in tabacco determinano un incremento specifico di prolina, con livelli nei trattati oltre dieci volte maggiori rispetto a quelli del controllo e una percentuale rispetto agli amminoacidi totali che passa dal 5 al 32%. Questi esperimenti suggeriscono che, mentre in tabacco l'esposizione a condizioni di stress promuove una specifica sintesi di prolina, in riso il suo accumulo può essere spiegato da fenomeni di proteolisi o di arresto della sintesi proteica che interessano tutti gli amminoacidi in genere. Un andamento analogo è stato osservato trattando le plantule con il PEG (dati non riportati).

Molto differente è invece il quadro che è stato ottenuto esaminando plantule di riso germinate e cresciute direttamente in presenza di concentrazioni crescenti di NaCl. In questo caso si osserva ancora un incremento degli amminoacidi liberi e della prolina, ma quest'ultima cresce in modo decisamente più marcato rispetto ai primi. In tal modo si assiste ad un aumento specifico, analogo a quello che era stato osservato a tempi brevi per il tabacco: la prolina passa dal 7% degli amminoacidi totali in condizioni di controllo al 16% a 20 dS m<sup>-1</sup>. Questi risultati suggeriscono dunque che, al contrario di altre specie vegetali, in riso l'accumulo di prolina non sia un meccanismo rapido per contrastare il richiamo osmotico di acqua dall'apoplasto, ma rappresenti piuttosto un adattamento a lungo termine messo in atto per attenuare gli effetti negativi dell'eccesso di sale. I dati ottenuti facendo crescere le piante di riso in presenza di PEG sembrano avvalorare questa ipotesi: in presenza della sola componente osmotica dello stress, si osserva infatti ancora una volta solo un generale aumento degli amminoacidi liberi, senza che la percentuale di prolina vari in maniera significativa (Tabella 31).

|                                |       | Riso               |          |          |          | Tabacco  |                    |          |          |
|--------------------------------|-------|--------------------|----------|----------|----------|----------|--------------------|----------|----------|
| % Pro rispetto al<br>EC (dS/m) | 10,22 | Ore di trattamento |          |          |          | 0        | Ore di trattamento |          |          |
|                                | 0     | 24                 | 48       | 72       | 24       |          | 48                 | 72       |          |
|                                | 14    | 100±4              | 159±10   | 138±5    | 165±7    | 100±     | 167±11             | 367±11   | 667±14   |
|                                | 20    |                    | 154±9    | 201±14   | 218±9    |          | 283±15             | 800±15   | 1033±25  |
|                                |       |                    | 196±7    | 221±6    | 313±8    |          | 317±10             | 1283±23  | 1533±56  |
| <b>% AA tot.</b>               |       |                    |          |          |          |          |                    |          |          |
| % AA tot.<br>EC (dS/m)         | 10,22 | Ore di trattamento |          |          |          | 0        | Ore di trattamento |          |          |
|                                | 0     | 24                 | 48       | 72       | 24       |          | 48                 | 72       |          |
|                                | 14    | 100±4              | 131±10   | 171±6    | 131±6    | 100±     | 123±9              | 133±5    | 166±6    |
|                                | 20    |                    | 136±6    | 184±13   | 177±8    |          | 121±6              | 149±9    | 157±6    |
|                                |       |                    | 166±6    | 226±9    | 229±12   |          | 129±8              | 215±11   | 182±8    |
| <b>%Pro rispetto</b>           |       |                    |          |          |          |          |                    |          |          |
| %Pro rispetto<br>EC (dS/m)     | 10,22 | Ore di trattamento |          |          |          | 0        | Ore di trattamento |          |          |
|                                | 0     | 24                 | 48       | 72       | 24       |          | 48                 | 72       |          |
|                                | 14    | 6,3±0,24           | 6,8±0,71 | 5,9±0,31 | 8,1±0,57 | 5,0±0,32 | 7,8±0,41           | 15,9±1,1 | 23,1±1,9 |
|                                | 20    |                    | 6,3±0,57 | 7,9±1,09 | 7,9±0,71 |          | 11,2±0,77          | 25,5±1,3 | 31,3±2,1 |
|                                |       |                    | 6,6±0,48 | 7,1±0,21 | 8,8±0,73 |          | 11,3±0,83          | 27,5±1,6 | 39,0±2,4 |

**Tabella 30. Variazioni del contenuto intracellulare dell'amminoacido prolina in piante di riso e tabacco a tempi brevi dopo l'esposizione a condizioni di stress ionico.** La determinazione contestuale degli amminoacidi totali mostra che l'aumento dei livelli di prolina in riso dipende da un generale aumento di questi composti, mentre in tabacco è specifico per l'imminoacido. Per ogni trattamento sono state eseguite 8 repliche indipendenti. I dati in riso sono stati ottenuti sulla cultivar Loto.

Recentemente è stato dimostrato che l'imminoacido può realmente svolgere un ruolo di *scavenger* dei radicali (Signorelli *et al.*, 2014). L'aumento del contenuto di prolina a livelli insufficienti per abbassare significativamente il potenziale idrico della cellula potrebbe dunque rappresentare una difesa diretta contro i radicali dell'ossigeno, sviluppati in

conseguenza delle condizioni di stress osmo-salino, e/o un meccanismo attuato per stabilizzare gli enzimi presenti nella cellula ed evitarne la denaturazione causata dalle alte concentrazioni di sodio e il danneggiamento conseguente all'azione dei ROS. In alternativa, l'accumulo di prolina in condizioni di stress, oltre ad avere effetti benefici, come quelli appena elencati, può anche contribuire in maniera attiva alla formazione di ROS grazie al ciclo P5C-prolina (Miller *et al.*, 2009). Probabilmente, nel riso cresciuto in condizioni normali e quindi shockato con alti tenori salini, si attiva subito una diffusa produzione dei ROS, dovuta alla componente ionica dello stress salino. La pianta, in condizioni di danno ossidativo, non risponde sintetizzando immediatamente prolina, potenzialmente in grado di aggravare la situazione, ma potrebbe fare affidamento sugli enzimi antiossidanti (SOD dipendenti dal Mn e Cu/Zn), come sulle molecole biologicamente attive (GSH e ASA), che stabilizzerebbero nel breve periodo la situazione. Se le condizioni di stress permangono, cominciando a inibire l'attività enzimatica del sistema antiossidante delle SOD, allora la pianta attiva la sintesi di prolina, come osservato nelle 48 ore successive allo shock in riso. Sarebbe interessante verificare, le modalità con cui viene tenuto sotto controllo il ciclo P5C-prolina in riso, ma questo richiede una dettagliata analisi dei trascritti degli enzimi del metabolismo della prolina in risposta allo stress salino, e sarà argomento dell'indagine del paragrafo successivo.

| Riso adattato al sale           |       |       | Riso adattato al PEG 6000       |       |       |
|---------------------------------|-------|-------|---------------------------------|-------|-------|
| % Pro rispetto al controllo     |       |       | % Pro rispetto al controllo     |       |       |
| EC (dS/m)                       | media | E.S.  | EC (dS/m)                       | media | E.S.  |
| 10,22                           | 371   | 35,16 | 10,22                           | 298   | 26,21 |
| 14                              | 599   | 44,75 | 14                              | 343   | 33,39 |
| 20                              | 624   | 38,36 | 20                              | 501   | 80,51 |
| % AA tot. Rispetto al controllo |       |       | % AA tot. Rispetto al controllo |       |       |
| EC (dS/m)                       | media | E.S.  | EC (dS/m)                       | media | E.S.  |
| 10,22                           | 186   | 8,96  | 10,22                           | 448   | 75,49 |
| 14                              | 258   | 14,78 | 14                              | 460   | 4,40  |
| 20                              | 284   | 13,37 | 20                              | 490   | 31,54 |
| %Pro rispetto agli AA tot.      |       |       | %Pro rispetto agli AA tot.      |       |       |
| EC (dS/m)                       | media | E.S.  | EC (dS/m)                       | media | E.S.  |
| 0,72                            | 6,1   | 0,24  | 0,72                            | 5,07  | 0,49  |
| 10,22                           | 15,0  | 0,67  | 10,22                           | 5,2   | 0,46  |
| 14                              | 17,5  | 0,60  | 14                              | 5,9   | 0,57  |
| 20                              | 16,6  | 0,40  | 20                              | 8,1   | 0,83  |

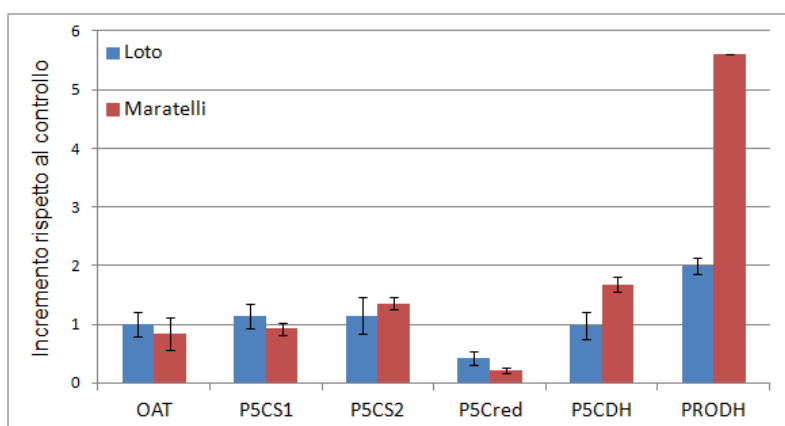
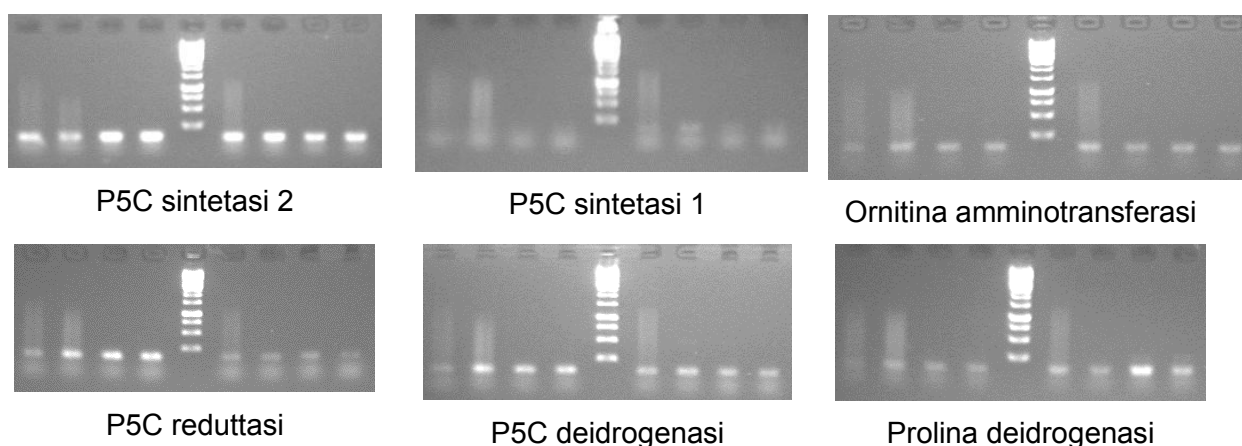
**Tabella 31. Variazioni del contenuto intracellulare dell'amminoacido prolina in piante di riso germinate e cresciute in condizioni di stress ionico.** La determinazione contestuale dei livelli amminoacidici totali mostra in questo caso che l'aumento della prolina non è solo apparente. Valori percentuali riportati sono relativi al controllo non trattato e sono il risultato di determinazioni condotte allo spettrofotometro con opportune diluizioni degli estratti. Per ogni trattamento sono state eseguite 8 repliche indipendenti. I dati sono relativi alla cultivar Loto.

### 3.8. Livelli di espressione dei geni coinvolti nel metabolismo della prolina in risposta a condizioni di stress salino

La via metabolica che porta alla sintesi di prolina nelle piante è resa complessa dal fatto che esistono due reazioni indipendenti che portano alla formazione di P5C, una che utilizza come substrato l'ornitina, l'altra che catalizza la riduzione del glutammato. Quest'ultima in riso è catalizzata da due forme isoenzimatiche della P5CS, differenzialmente indotte da condizioni di stress abiotico. D'altra parte l'incremento della concentrazione di prolina nelle cellule può essere dovuto non solo all'induzione del suo anabolismo, ma anche da una riduzione del suo catabolismo.

Per capire meglio le basi molecolari dell'accumulo di prolina in piante di riso soggette a condizioni di stress iperosmotico si è fatto ricorso a una analisi semi-quantitativa mediante RT-PCR, in modo da individuare i trascritti maggiormente indotti nella risposta allo stress. Da foglie di piante cresciute in presenza di alte concentrazioni saline ( $EC\ 15,6\ dS\ m^{-1}$ ) e da controlli non trattati è stato estratto l'RNA, che è stato poi retrotrascritto. Il cDNA è stato amplificato utilizzando specifiche coppie di primers per ognuno dei geni da analizzare, e usando quelli per due geni *housekeeping* (actina e EF1) per normalizzare i risultati. Per ottenere delle indicazioni preliminari sono stati utilizzati solo due genotipi divergenti riguardo all'entità di accumulo di prolina: Loto, che sotto stress mostra uno degli aumenti maggiori, e Maratelli, in cui la prolina aumenta molto meno marcatamente (Figura 78).

La densità delle bande ottenute mediante PCR è stata analizzata mediante densitometria, portando ai dati quantitativi normalizzati presentati in Figura 80.



**Figura 80. Amplificazione mediante PCR del cDNA dei geni coinvolti nel metabolismo della prolina.** L'analisi è stata condotta su 2 repliche indipendenti per ogni trattamento. I dati densitometrici sono stati normalizzati sulla base dei prodotti di amplificazione di 2 geni *housekeeping*. Nell'istogramma sono riportati i livelli di cDNA nelle piante stressate, espressi come *fold-change* rispetto ai controlli non trattati.

Il metodo utilizzato non risulta capace di determinare variazioni di lieve entità, ma può fornire evidenze utili nel caso in cui un gene sia fortemente indotto. Per quanto riguarda la via anabolica, i livelli di cDNA delle due forme di P5C sintetasi e della ornitina amminotransferasi in entrambi i genotipi risultano simili in piante di controllo e in piante esposte a stress; solo la P5C sintetasi 2 mostra un lieve incremento, ma ai limiti della sensibilità del metodo e in modo non statisticamente significativo. Sorprendentemente è stata osservata invece una sensibile diminuzione per la P5C reduttasi, meno netta in Loto rispetto a Maratelli. È infatti insolito che in condizioni in cui si verifica un accumulo di prolina il gene che codifica l'enzima responsabile dell'ultimo passaggio in entrambe le vie anaboliche possa essere represso. Altrettanto sorprendentemente è stato osservato un aumento della quantità di trascritto dei geni della via catabolica. La P5C deidrogenasi in Loto rimane ai livelli del controllo, mentre in Maratelli aumenta di quasi due volte. Se tale aumento potrebbe

dipendere dal livello di imprecisione del metodo, altrettanto non si può dire per quello della prolina deidrogenasi, il cui incremento arriva a 2 volte il livello dei controlli in Loto e a più di 5 volte in Maratelli. Queste prime indicazioni sembrano dunque suggerire che nella varietà Maratelli il minore accumulo di prolina in condizioni di stress salino dipenda più da una maggiore stimolazione del catabolismo dell'imminoacido che non da una minore induzione della sua sintesi.

Si tratta nell'insieme di indicazioni preliminari, che andrebbero approfondite su un numero maggiore di genotipi e in un ambito più ampio di condizioni di stress. Esperimenti sono attualmente in corso per ottenere le opportune conferme mediante un approccio quantitativo di PCR *Real Time*. I risultati di queste analisi forniranno dati più precisi sull'entità e quindi sul possibile significato fisiologico della repressione e dell'induzione di questi geni a seguito della crescita in presenza di elevate concentrazioni saline.

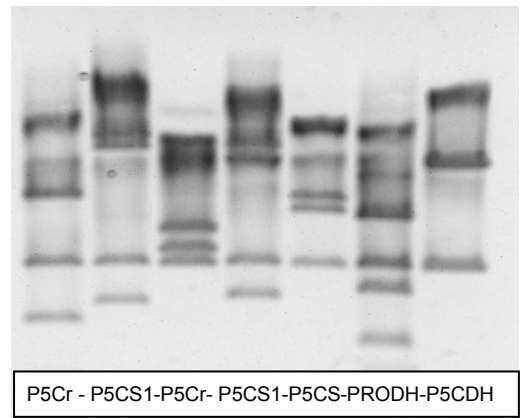
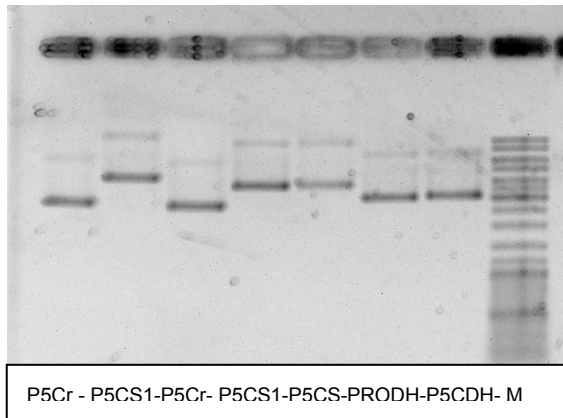
D'altra parte, l'aumento della concentrazione ionica all'interno della cellula a seguito della traslocazione del sodio nella parte aerea potrebbe essere in grado di modulare l'attività di alcuni degli enzimi coinvolti. Dati a questo riguardo sono stati recentemente descritti per la P5C reductasi di *A. thaliana* (Giberti *et al.*, 2014). Se lo stesso fenomeno fosse presente anche in riso, potrebbe spiegare l'apparente contraddizione dei dati ottenuti mediante PCR: anche in presenza di un drastico calo dei livelli di trascrizione in condizioni di stress, la stimolazione allosterica dell'attività dell'enzima garantirebbe comunque un elevato flusso carbonioso nella via biosintetica.

### **3.9. Clonaggio ed espressione eterologa dei geni coinvolti nel metabolismo della prolina**

Sarebbe dunque utile, ai fini di una migliore comprensione delle modalità di attivazione del metabolismo della prolina sotto stress, caratterizzare le proprietà cinetiche degli enzimi coinvolti. A tutt'oggi poco si conosce sull'esistenza di meccanismi di regolazione post-trascrizionale di queste proteine. Purificarle e caratterizzarle direttamente dalle piantule di riso avrebbe presentato non poche difficoltà. Si tratta infatti di enzimi espressi a livelli relativamente bassi, che risultano non saggiabili in estratti grezzi per la presenza di attività in grado di interferire con la loro reazione, e per alcuni di essi (come P5C sintetasi e prolina deidrogenasi) non esistono neppure metodi affidabili e specifici di saggio *in vitro*. Si è scelto quindi un approccio alternativo, basato sul clonaggio dei corrispondenti geni e la loro espressione eterologa in sistemi procariotici. A questo fine sono stati acquistati i cloni di cDNA che erano disponibili presso il Rice Genome Resource Center (RGRC) un ente giapponese che fa parte dell'Istituto Nazionale di Scienze Agro-Biologiche. Tali cDNA sono però stati clonati in vettori non adatti all'espressione in *E. coli*, ed era dunque necessario subclonarli in altri plasmidi di espressione. Per acquisire le conoscenze necessarie a questo fine è stato effettuato uno stage di 3 mesi nel laboratorio di Fisiologia e Biochimica Vegetale dell'Università di Konstanz, presso il gruppo della Prof.ssa Adamska e sotto la supervisione del Dr. Dietmar Funck, dove erano disponibili i materiali e le competenze di biologia molecolare necessari. Tale stage è stato reso reso possibile grazie al supporto economico fornito dal DAAD (German Academic Exchange Service), cui è stato presentato il relativo progetto in risposta ad un bando per il conferimento di borse di studio per soggiorni di breve termine, progetto che è risultato tra i vincitori della selezione.

Inizialmente i plasmidi sono stati amplificati nel ceppo DH5 $\alpha$  di *E. coli*, che ha la caratteristica di accumulare più copie dello stesso plasmide. Il DNA plasmidico (pDNA) così ottenuto è stato verificato mediante analisi di restrizione (Figura 81) pianificata dopo una adeguata analisi *in silico* delle sequenze di ogni plasmide.





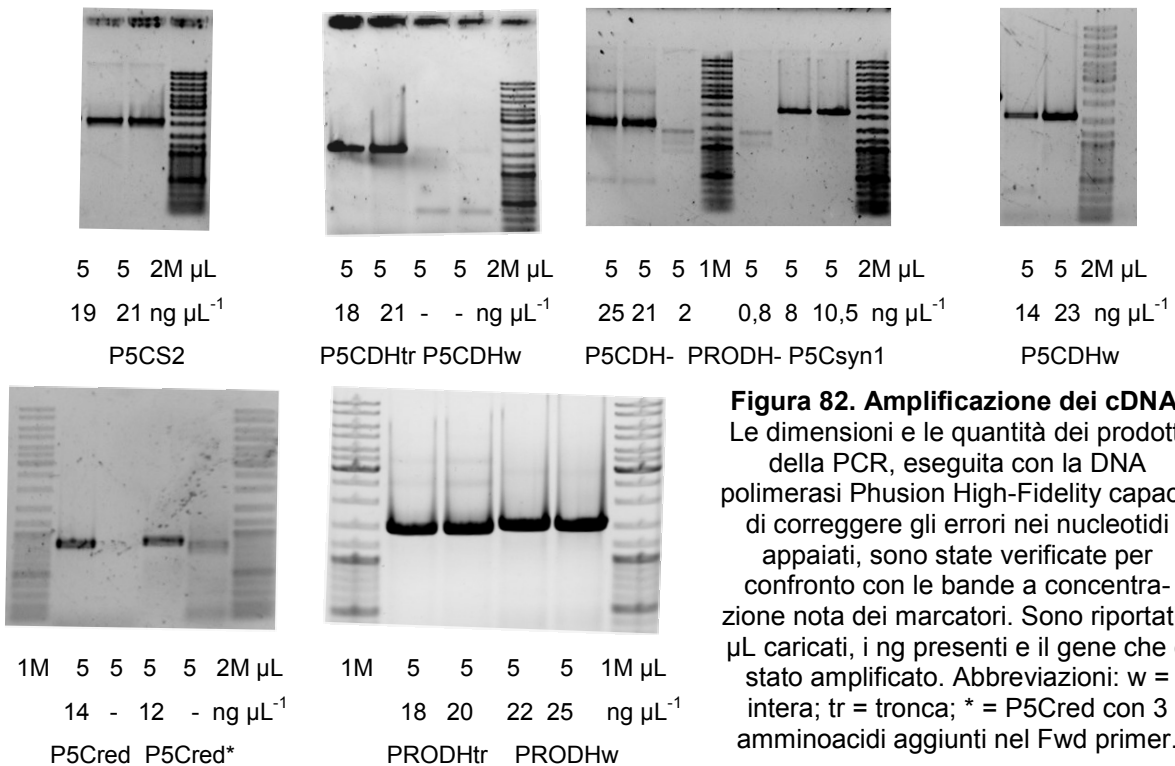
P5Cr - P5CS1-P5Cr- P5CS1-P5CS-PRODH-P5CDH- M

P5Cr - P5CS1-P5Cr- P5CS1-P5CS-PRODH-P5CDH

| Enzima | Clone      | Enzima di r. | Frammenti | Dimensioni                             |
|--------|------------|--------------|-----------|----------------------------------------|
| P5Cred | J013104L18 | BsrFI        | 3         | 2509, 1163, 565                        |
| P5CS1  | J023019K03 | BsrFI        | 3         | 4524, 1163, 726                        |
| P5Cred | J023044E03 | Fspl         | 3         | 1707, 1358, 1171                       |
| P5CS1  | J033031H21 | BsrFI        | 3         | 3821, 1163, 782                        |
| P5CS2  | J033099M14 | Fspl         | 3         | 2470, 2152, 1172                       |
| PRODH  | J023047B13 | BsrFI        | 8         | 2017, 1163, 867, 411, 126, 121, 79, 25 |
| P5CDH  | J033091O16 | Fspl         | 3         | 2992, 1172, 645                        |

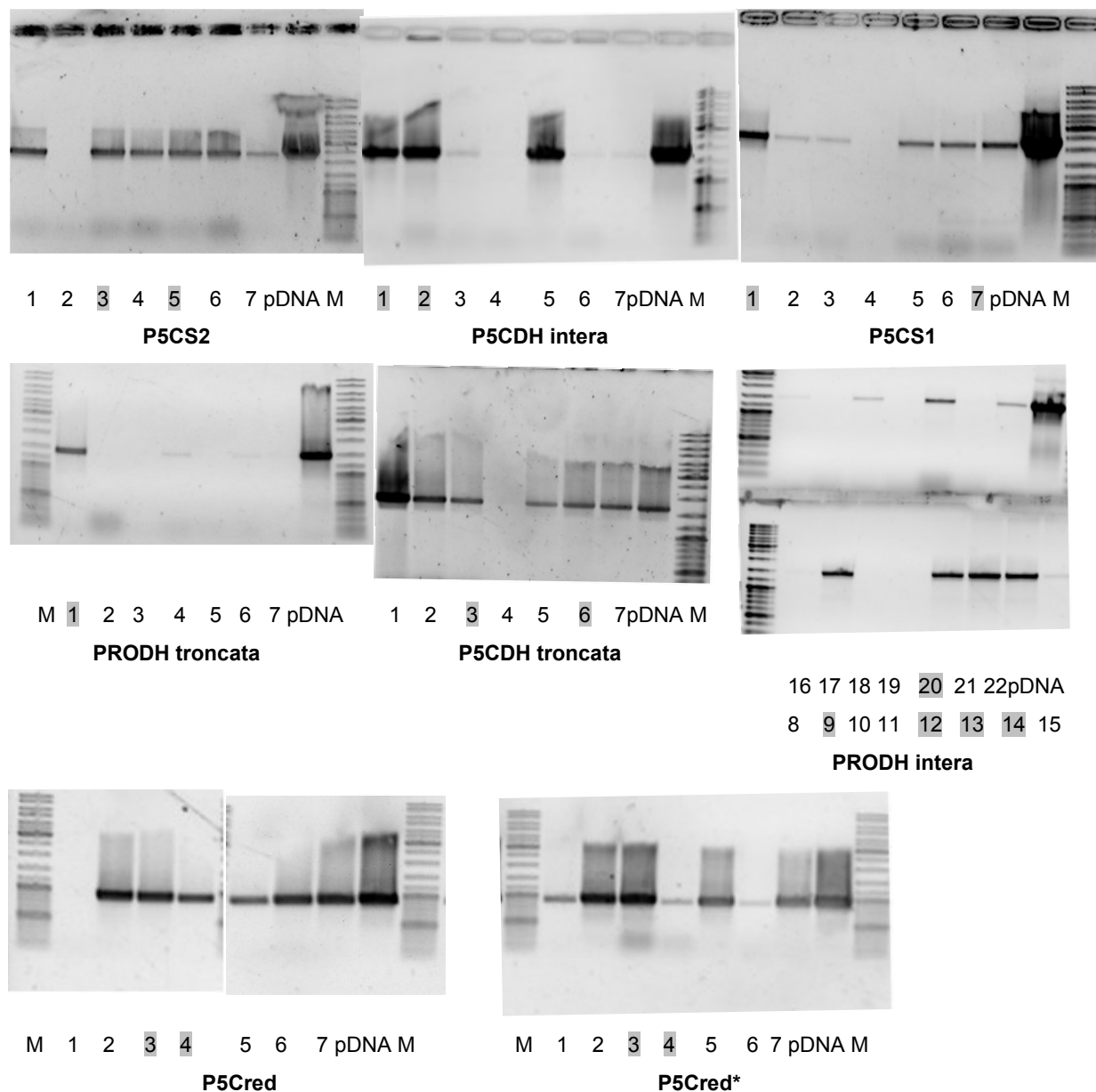
**Figura 81. Analisi di restrizione del pDNA.** Gli enzimi più adatti per ottenere frammenti di specifica lunghezza del plasmide pFLC1 sono stati scelti mediante il software SeqBuilder (Lasergene).

Accertata la correttezza delle dimensioni degli inserti, i cDNA sono stati amplificati mediante PCR (Figura 82), apportando eventuali modifiche *ad hoc* alla sequenza terminale per facilitare il successivo clonaggio monodirezionale nel nuovo plasmide. In particolare, per i due geni della via catabolica, P5CDH e PRODH, si è fatto in modo di ottenere due amplificati, uno contenente il peptide di transito e uno privo della corrispondente sequenza terminale. Questi ultimi vengono definiti nel testo come *troncati*.



**Figura 82. Amplificazione dei cDNA.** Le dimensioni e le quantità dei prodotti della PCR, eseguita con la DNA polimerasi Phusion High-Fidelity capace di correggere gli errori nei nucleotidi appaiati, sono state verificate per confronto con le bande a concentrazione nota dei marcatori. Sono riportati i  $\mu\text{L}$  caricati, i  $\text{ng}$  presenti e il gene che è stato amplificato. Abbreviazioni: w = intera; tr = tronca; \* = P5Cred con 3 amminoacidi aggiunti nel Fwd primer.

Successivamente un'aliquota corrispondente a 10 ng di cDNA è stata unita alla mix di reazione in cui era contenuto anche il vettore vuoto, pET151/D-TOPO. Un appropriato volume della miscela di reazione è stato incubato con cellule calcio-competenti di *E. coli* DH5 $\alpha$ , che sono state poi piastrate su terreno selettivo. La presenza del plasmide in alcune delle colonie cresciute è stata quindi verificata in seguito a colony PCR (Figura 83). Mediante una successiva digestione con specifici enzimi di restrizione si è infine ottenuto conferma che il trascritto amplificato con la colony PCR fosse quello specifico del vettore pET151 e non del plasmide originario (pFLC1).



**Figura 83. Colony PCR dei trasformati con il vettore pET151.** Per ogni costrutto sono state analizzate 7 colonie. Nel caso delle due forme di PRODH, intera e tronca, hanno invece dovuto essere analizzate 22 colonie, poiché le prime 7 non contenevano il cDNA di interesse. Di due pDNA per ogni costrutto (evidenziati in grigio) è stato quindi verificato il *pattern* di digestione; anche in questo caso per la PRODH è stata necessaria l'analisi di un numero maggiore di campioni. Non viene riportato il gel ottenuto nel caso della forma tronca di PRODH.

Ottenute tutte queste conferme, ogni plasmide è stato amplificato nel ceppo di *E. coli* DH5 $\alpha$ , isolato e sottoposto a sequenziamento per verificare che durante i processi di PCR o

nella replicazione in *E. coli* non siano avvenute delle mutazioni. Le sequenze fornite da un service esterno (GATC, <http://www.gatc-biotech.com/de/home.html>) hanno confermato la presenza nel vettore pET151 degli specifici cDNA, in cui non sono state evidenziate mutazioni delle sequenze originali.

Con i plasmidi ottenuti sono stati quindi trasformati due ceppi di *E. coli* adatti per l'espressione ectopica, BL21AI e BL21(DE3) pLysS. Una volta ottenuti i trasformati e verificata la presenza del cDNA di interesse mediante colony PCR, si è proceduto all'induzione di ognuno dei geni di interesse. Dopo almeno 4 ore di crescita in presenza dell'opportuno induttore, le cellule sono state analizzate mediante SDS-PAGE per avere un riscontro visivo della proteina ectopica espressa nel batterio (Figura 84). Su gel sono stati caricati sia campioni costituiti dalle sole proteine solubili che altri contenenti le proteine totali per verificare che quella di interesse non venisse sequestrata nei corpi di inclusione, un'eventualità molto comune in questi sistemi.

Si voleva in tal modo verificare che il costrutto si fosse integrato come pianificato nel nuovo plasmide, e fosse in grado di indurre la sintesi di proteine del peso molecolare atteso. Dai risultati dell'analisi mediante SDS-PAGE si evince come la P5CS1 e la P5CS2 siano espresse in seguito all'induzione e risultino riscontrabili nella frazione corrispondente alle proteine totali; esse non compaiono invece in corrispondenza delle frazioni solubili, suggerendo che la maggior parte di tali enzimi venga confinata all'interno dei corpi di inclusione. Per ovviare a questo inconveniente si potrebbe cambiare vettore di espressione, o cercare di ottimizzare la temperatura a cui l'induzione viene fatta avvenire. Esistono in alternativa protocolli di estrazione delle proteine dai corpi di inclusione, ma molto spesso questo determina la perdita dell'attività enzimatica.

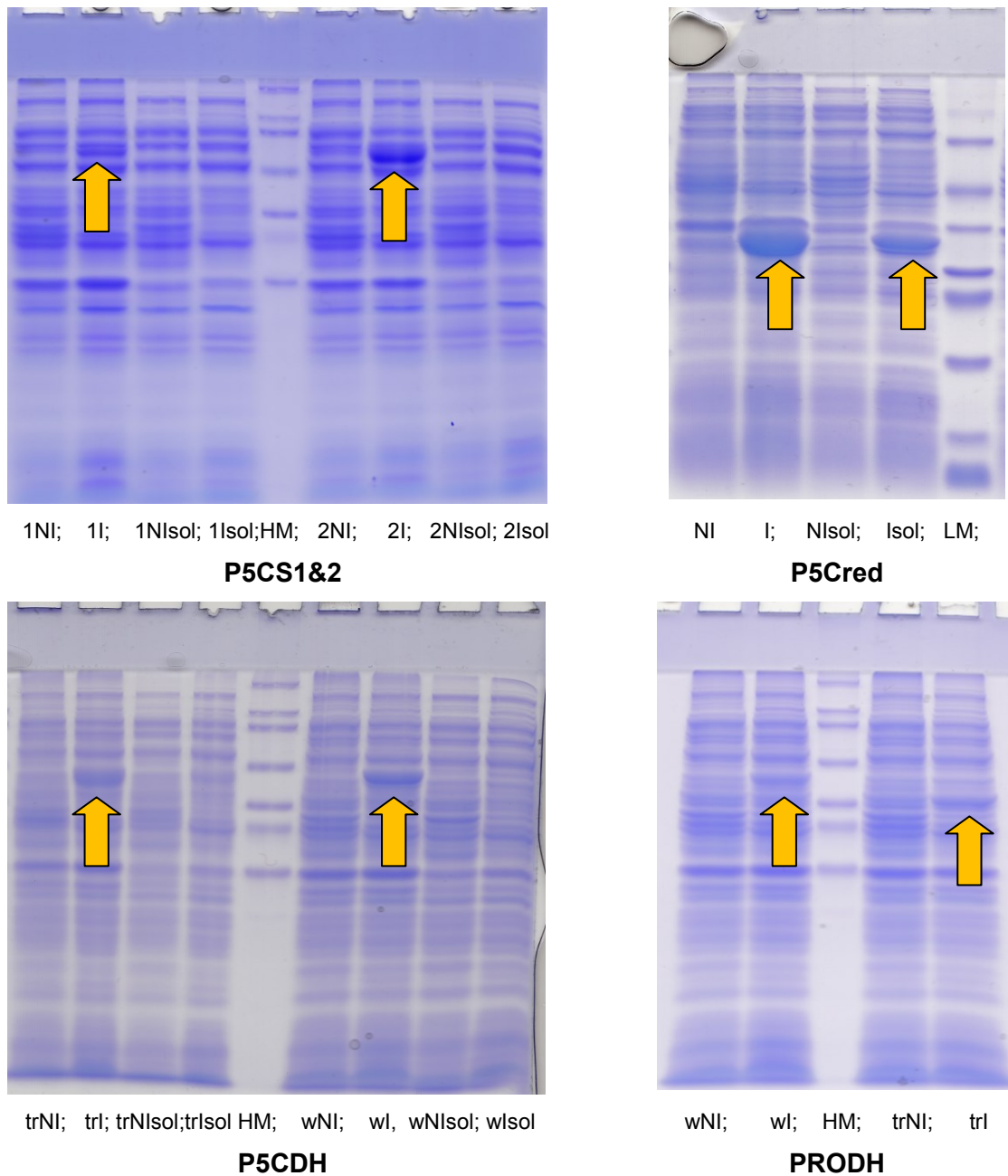
Per quanto riguarda la P5CR, si osserva la comparsa di una banda prominente delle dimensioni attese sia nella frazione insolubile che in quella solubile. Evidentemente il suo accumulo non interferisce con il metabolismo delle cellule batteriche, che lasciano in forma libera quantità molto elevate dell'enzima vegetale. Il particolare successo della sua induzione potrebbe però essere dovuto anche alle sue piccole dimensioni rispetto a P5CS1 e 2.

L'SDS-PAGE eseguito per analizzare l'induzione della P5CDH ha invece evidenziato l'accumulo della proteina nella frazione insolubile, sia per la versione troncata che per quella intera della proteina. In corrispondenza del peso molecolare atteso, l'analisi densitometrica sembra indicare che nella frazione solubile della P5CDH troncata sia presente più proteina rispetto a quello che avviene per la versione intera. L'intensità della banda è però ai limiti della sensibilità del metodo, e la sua presenza dovrebbe essere verificata in modo più certo. Per la PRODH, infine, è stata esaminata solo la componente insolubile, poiché si tratta di un enzima associato alle membrane mitocondriali, e quindi ci si attende che anche in *E. coli* non sia presente in forma solubile. Anche in questo caso, almeno per la forma intera, la banda attribuibile alla proteina vegetale è molto flebile, e la sua effettiva produzione andrebbe verificata attraverso la sua purificazione o mediante un saggio di attività.

### **3.10. Purificazione preparativa della P5C reduttasi e della P5C deidrogenasi di riso**

In prospettiva, i risultati ottenuti dovrebbero permettere una adeguata caratterizzazione delle proprietà funzionali di tutte le proteine coinvolte nella sintesi di prolina dall'acido glutammico e nella sua riossidazione mitocondriale. Si tratta però di un obiettivo ambizioso, che va al di là degli scopi del presente lavoro. Si è comunque voluto procedere con la purificazione e la determinazione preliminare delle proprietà di almeno due delle proteine clonate, la P5C reduttasi e la P5C deidrogenasi. Tale scelta è stata motivata sia dalla disponibilità all'interno del laboratorio dei materiali e delle metodiche richieste (Forlani *et al.*, 1997; Giberti *et al.*, 2014), che dal fatto che l'analisi mediante SDS-PAGE aveva fornito la sicurezza che tali enzimi fossero prodotti nel sistema eterologo, ma anche in considerazione del fatto che i risultati ottenuti mediante PCR semi-quantitativa (Figura 80) avevano mostrato delle possibili variazioni dei livelli di trascrizione che mal si conciliano con un accumulo di prolina in condizioni di stress. Ciò potrebbe dunque indicare l'esistenza a carico di questi due

enzimi di meccanismi di regolazione post-traduzionale attivati dallo stress salino. D'altra parte, invece, l'analisi della PRODH (anch'essa interessante da quest'ultimo punto di vista) è stata rimandata a una fase successiva della ricerca per la mancanza di uno specifico metodo di saggio *in vitro*.



**Figura 84. Analisi mediante SDS PAGE dell'espressione delle proteine di interesse nel sistema eterologo.** I cDNA inseriti all'interno del ceppo BL21AI sono indicati al di sotto di ogni figura. Le frecce evidenziano la banda del peso molecolare atteso corrispondente alla proteina di interesse.

Abbreviazioni: NI = non indotto; NIsol = non indotto frazione solubile; I = indotto; Isol = indotto frazione solubile; HM = marcatori high range S8320; LM = marcatori low range M3913; tr = forma troncata della proteina; w = forma intera della proteina).

Durante il processo di subclonaggio alcune variazioni erano state introdotte nella sequenza di questi due geni. Innanzitutto era stata ottenuta la fusione con un tratto del plasmide di espressione codificante per una successione di 6 residui di istidina, la cui presenza avrebbe dovuto facilitare la purificazione della proteina mediante cromatografia per

affinità. Oltre a questa modifica ve ne erano altre (Figura 85), come la presenza di un sito di taglio specifico per la proteasi TEV, un codone di START della trascrizione, un epitopo V5 e cinque amminoacidi a monte dell'inizio della proteina di interesse introdotti per stabilizzarne la struttura. Relativamente alla conservazione della sequenza amminoacidica del gene di riso, le sequenze dedotte della P5C riduttasi e dalla P5CDH troncata sono identiche a quelle attese, mentre per la P5CDH intera è avvenuta una delezione nella porzione iniziale della proteina (evidenziata in rosso nella Figura 85). Questa parte della sequenza è molto ricca in "CG" e quindi teoricamente auto-complementare. Probabilmente durante la fase di amplificazione si sono formate delle anse di pDNA sullo stesso filamento, che non hanno permesso alla DNA polimerasi di riconoscere tutti i nucleotidi, *bypassando* quelli coinvolti nell'ansa. L'errore così avvenuto tuttavia non inficia l'utilizzo del costrutto per due motivi: i nucleotidi eliminati sono un multiplo di tre ( $n = 27$ ), e corrispondono quindi a 9 amminoacidi, che non sono presenti nella sequenza amminoacidica finale (evidenziati in rosso in Figura 85), ma senza influire sulla correttezza del successivo *open reading frame*; inoltre tale porzione della proteina corrisponde a una parte del peptide di transito, fondamentale *in planta* per la corretta localizzazione funzionale, ma che è irrilevante ai fini dell'attività enzimatica, dal momento che il peptide viene idrolizzato una volta raggiunta la matrice mitocondriale.

Dopo alcuni tentativi, per quanto riguarda la P5CDH si è scelto di utilizzare il ceppo di *E. coli* BL21(DE3) pLysS invece del ceppo BL21 AI, poiché sembrava determinare un minore sequestro della proteina eterologa nei corpi di inclusione. Ciò nonostante, l'analisi mediante SDS-PAGE di estratti da cellule indotte e non indotte ha mostrato in corrispondenza del peso molecolare atteso una banda di grandi dimensioni nella corsia corrispondente alle proteine totali, mentre nella stessa posizione della frazione di proteine solubili il segnale era comunque molto più flebile (Figura 86).

Questo comportamento può essere spiegato anche considerando la natura parzialmente idrofobica dell'enzima, che pur essendo localizzato nella matrice mitocondriale prende contatto funzionale con la membrana mitocondriale interna (Forlani *et al.*, 1997). Nonostante le basse quantità presenti nella frazione solubile, la *coda* di istidina presente all'estremità N-terminale della proteina eterologa ha permesso la purificazione all'omogeneità elettroforetica di una consistente quantità di enzima mediante cromatografia di affinità su una colonna di Ni<sup>2+</sup>-sefariosio. La proteina di interesse è risultata eluire dalla colonna a concentrazioni di imidazolo comprese fra 50 e 100 mM (Figura 86). Si tratta di un risultato inatteso, dal momento che nella maggior parte dei casi l'interazione tra proteina e resina risulta molto più forte, e concentrazioni di imidazolo da 200 a 400 mM sono necessarie per il suo distacco. Il dato potrebbe forse dipendere da un folding che sottrae una parte delle istidine dal contatto con il mezzo esterno. L'analisi in SDS-PAGE non ha comunque evidenziato la presenza di significative contaminazioni da parte di proteine endogene di *E. coli* che vengono comunque trattenute dalla resina e eluite a basse concentrazioni di ligando.

Le frazioni contenenti la proteina di interesse sono state unite fra loro in un unico preparato, che è stato sterilizzato per filtrazione e conservato in ghiaccio sino al successivo utilizzo. Il saggio di attività ha mostrato per una tipica preparazione una quantità di proteina pari a circa 1,3 - 1,5  $\mu\text{kat mL}^{-1}$ , a un'attività specifica di circa 4500 nkat (mg di proteine)<sup>-1</sup>. Nelle condizioni impiegate, l'enzima ha mostrato una buona stabilità: dopo 1 mese di conservazione in ghiaccio l'attività residua è risultata pari a circa il 70% di quella iniziale.

Prove analoghe sono state effettuate anche con la forma intera della P5CDH. In tal caso, però, la proteina di riso è stata quasi completamente sequestrata nei corpi di inclusione, e anche dopo il passaggio per cromatografia per affinità la quantità di enzima presente nel preparato finale è risultata inferiore a un centesimo di quella ottenuta con la forma tronca. Il dato può essere facilmente spiegato considerando che la presenza del peptide di transito può aumentare in modo significativo l'idrofobicità della proteina, e consentire anche un suo legame con le membrane del batterio. Una valutazione approssimativa dell'attività nel preparato ottenuto ha mostrato una attività specifica pari a circa la metà di quella evidenziata sulla forma troncata (dati non mostrati), indicando comunque che la presenza del peptide di transito non blocca l'attività catalitica.

**P5CDH cDNA di riso:**

MetSLILSRRLAAAVRRSGPAAI ASRWMetHTPPFATVSPQEISGSSPAEVQNFVQGSWTTSGNWNWLVDP LNGEKFIKVAEVQEAIEIKPFVESLSNCPKHGLHNPLKAPERLYLMetYGDISAKAANMetLGQPVVSDFFAKLIQRVSPKSYQQALAEVQVSQKFLNFVCGDQVRFLARSAFVPGNHLGQSSNGYRWYPYGPVAIITPFNFPLEIPLLQLMetGALYMetGNKPVLVKVDKSVIVMetDQMetLRLHACGMetPAEDVDFINSDGITMetNKLLEANPKMetTLFTGSSRIAIEKLAADLKGKIKLEDAGFDWKILGPDVQEVVDYIAWVCDQDAYACSGQKCSAQSI LFMetHKNWSSSGLLDKMetKLSERRKLEDLTI GPVLTVTSSMetIEHMetetKNLLKIPGSKVLFVGGPELENHSIPEIYGAFKPTAVFVPLSEILKSGNFELVTREIFGPFQVVTEYSDDLELVLVLEACERMe tNAHLTAAVVSNDPLFLQEV LGRSVNGT TYAGIRARTTGAPQNHWFPGADPRGAGIGTPEAIKLVWSCHREI IYDIGPLPKNRALPSATStop

**P5CDH troncata (pET151):**

MetHHHHHHGKPIPNPLGLDSTENLYFQGI DPFTSGPAAALASRWMetHTPPFATVSPQEISGSSPAEVQNFVQGSWTTSGNWNWLVDP LNGEKFIKVAEVQEAIEIKPFVESLSNCPKHGLHNPLKAPERLYLMetYGDISAKAANMetLGQPVVSDFFAKLIQRVSPKSYQQALAEVQVSQKFLNFVCGDQVRFLARSAFVPGNHLGQSSNGYRWYPYGPVAIITPFNFPLEIPLLQLMetGALYMetGNKPVLVKVDKSVIVMetDQMetLRLHACGMetPAEDVDFINSDGITMetNKLLEANPKMetTLFTGSSRIAIEKLAADLKGKIKLEDAGFDWKILGPDVQEVVDYIAWVCDQDAYACSGQKCSAQSI LFMetHKNWSSSGLLDKMetKLSERRKLEDLTI GPVLTVTSSMetIEHMetetKNLLKIPGSKVLFVGGPELENHSIPEIYGAFKPTAVFVPLSEILKSGNFELVTREIFGPFQVVTEYSDDLELVLVLEACERMe tNAHLTAAVVSNDPLFLQEV LGRSVNGT TYAGIRARTTGAPQNHWFPGADPRGAGIGTPEAIKLVWSCHREI IYDIGPLPKNRALPSATStop

Amminoacidi della sequenza di transito mitocondriale: MetSLILSRRLAAAVRR

**P5CDH intera (pET151):**

MetHHHHHHGKPIPNPLGLDSTENLYFQGI DPFTMetSLILSRRLAAALASRWMetHTPPFATVSPQEISGSSPAEVQNFVQGSWTTSGNWNWLVDP LNGEKFIKVAEVQEAIEIKPFVESLSNCPKHGLHNPLKAPERLYLMetYGDISAKAANMetLGQPVVSDFFAKLIQRVSPKSYQQALAEVQVSQKFLNFVCGDQVRFLARSAFVPGNHLGQSSNGYRWYPYGPVAIITPFNFPLEIPLLQLMetGALYMetGNKPVLVKVDKSVIVMetDQMetLRLHACGMetPAEDVDFINSDGITMetNKLLEANPKMetTLFTGSSRIAIEKLAADLKGKIKLEDAGFDWKILGPDVQEVVDYIAWVCDQDAYACSGQKCSAQSI LFMetHKNWSSSGLLDKMetKLSERRKLEDLTI GPVLTVTSSMetIEHMetetKNLLKIPGSKVLFVGGPELENHSIPEIYGAFKPTAVFVPLSEILKSGNFELVTREIFGPFQVVTEYSDDLELVLVLEACERMe tNAHLTAAVVSNDPLFLQEV LGRSVNGT TYAGIRARTTGAPQNHWFPGADPRGAGIGTPEAIKLVWSCHREI IYDIGPLPKNRALPSATStop

Amminoacidi deleti dal cDNA di riferimento: AVRRSGPAAI

**P5Cred cDNA di riso:**

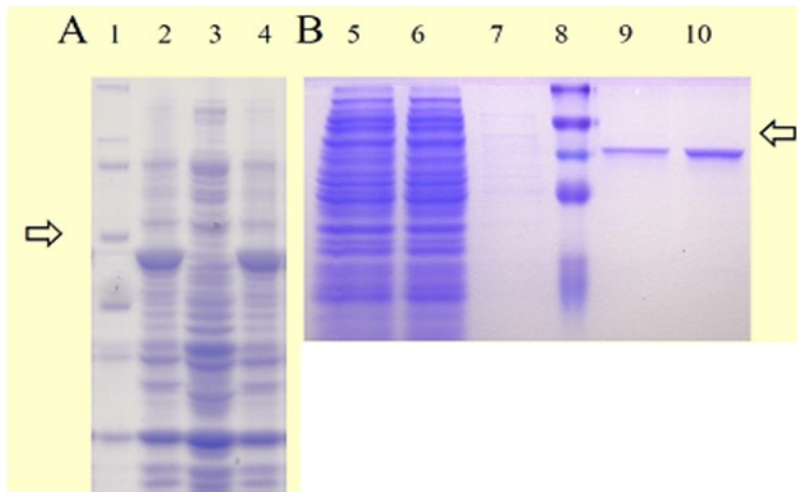
MetAAPPQVPAPAAAASPEVFR LGFIGPGLAESIARGVAASGVLPATAIR TAPHRRPERAEAFSSIGAHILETN AQQVDDSDVIVISVKPQIVRQVLVELKPLLSEKLLVSIAGIKMetEDLQGWSGHRRFIRVMetPNTPSAVGQAASVMetCLGEMetATENDENRVRSLFSAIGKVWTAEEKYFDAV TGLSGSGPAYIFLAIEAMetADGGVAAGLPRDLALGLASQTVLGAATMetVNKTGKHPGQLKDMetVTSPAGTTITGIQELEKGA FRGTLINAVVAATKRCRELSQSStop

**P5Cred (pET151):**

MetHHHHHHGKPIPNPLGLDSTENLYFQGI DPFTMetAAPPQVPAPAAAASPEVFR LGFIGPGLAESIARGVAASGVLPATAIR TAPHRRPERAEAFSSIGAHILETN AQQVDDSDVIVISVKPQIVRQVLVELKPLLSEKLLVSIAGIKMetEDLQGWSGHRRFIRVMetPNTPSAVGQAASVMetCLGEMetATENDENRVRSLFSAIGKVWTAEEKYFDAV TGLSGSGPAYIFLAIEAMetADGGVAAGLPRDLALGLASQTVLGAATMetVNKTGKHPGQLKDMetVTSPAGTTITGIQELEKGA FRGTLINAVVAATKRCRELSQSStop

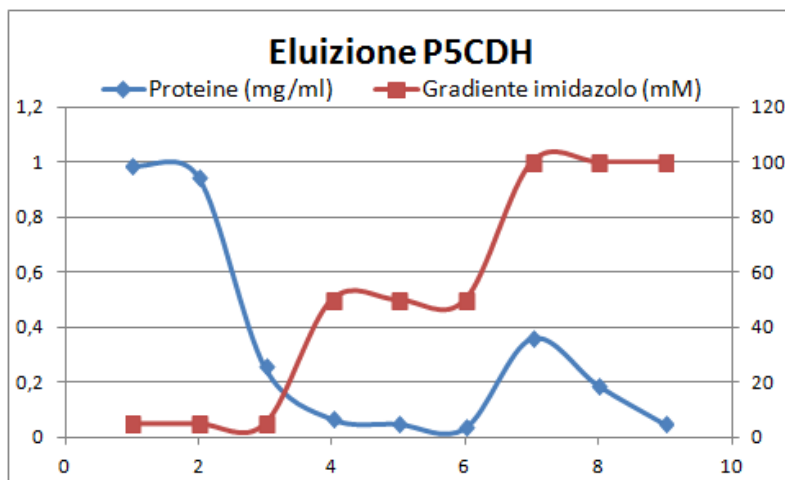
|                         | P.I. teorico | M.W. teorico | LEGENDA                   |
|-------------------------|--------------|--------------|---------------------------|
| <b>P5CDH rif.</b>       | 5,22         | 64724,85     | Start(pET151)             |
| <b>P5CDH tr. pET151</b> | 5,15         | 66656,79     | 6 His(pET151)             |
| <b>P5CDH wh. pET151</b> | 5,24         | 67872,32     | Epitopo V5(pET151)        |
| <b>P5Cred rif.</b>      | 5,20         | 32034,56     | TEV cleavage site(pET151) |
| <b>P5Cred pET151</b>    | 5,42         | 36048,02     | Stabilizzatore(pET151)    |
|                         |              |              | Delezioni                 |

**Figura 85. Sequenze amminoacidiche degli enzimi clonati e delle proteine di riso.** Il vettore pET151 contiene a monte del sito di inizio della traduzione delle particolari inserzioni che facilitano le procedure di purificazione della proteina. Le sequenze sono state dedotte da quelle nucleotidiche, verificate per sequenziamento, utilizzando il software ExPasy (<http://web.expasy.org/translate/>), così come i pesi molecolari e punti isoelettrici ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)). Il peptide di transito della P5CDH di riso è stato dedotto con il software Mitoprot (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>).



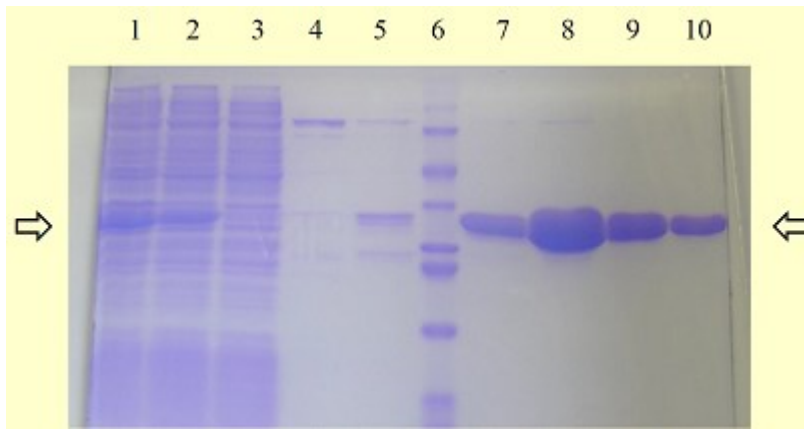
**Figura 86. Espressione eterologa e purificazione per affinità della P5C deidrogenasi di riso.**

Le proteine totali nelle cellule indotte e non indotte di *E. coli* sono state analizzate mediante SDS PAGE (pannello A). Nel pannello B sono invece riportate le frazioni ottenute mediante cromatografia per affinità. Nel grafico sottostante viene riportato il profilo di eluizione delle proteine nelle frazioni raccolte dalla colonna. Corsie 1 e 8 = marcatori a peso molecolare noto. 3 = proteine totali da cellule non indotte. 2 e 4 = proteine totali da cellule indotte. 5 = proteine solubili di cellule indotte. 6 = *flow through* della colonna. 7 = lavaggio della colonna (5 mM imidazolo). 9 e 10 = eluizione della colonna rispettivamente con 50 e 100 mM imidazolo.

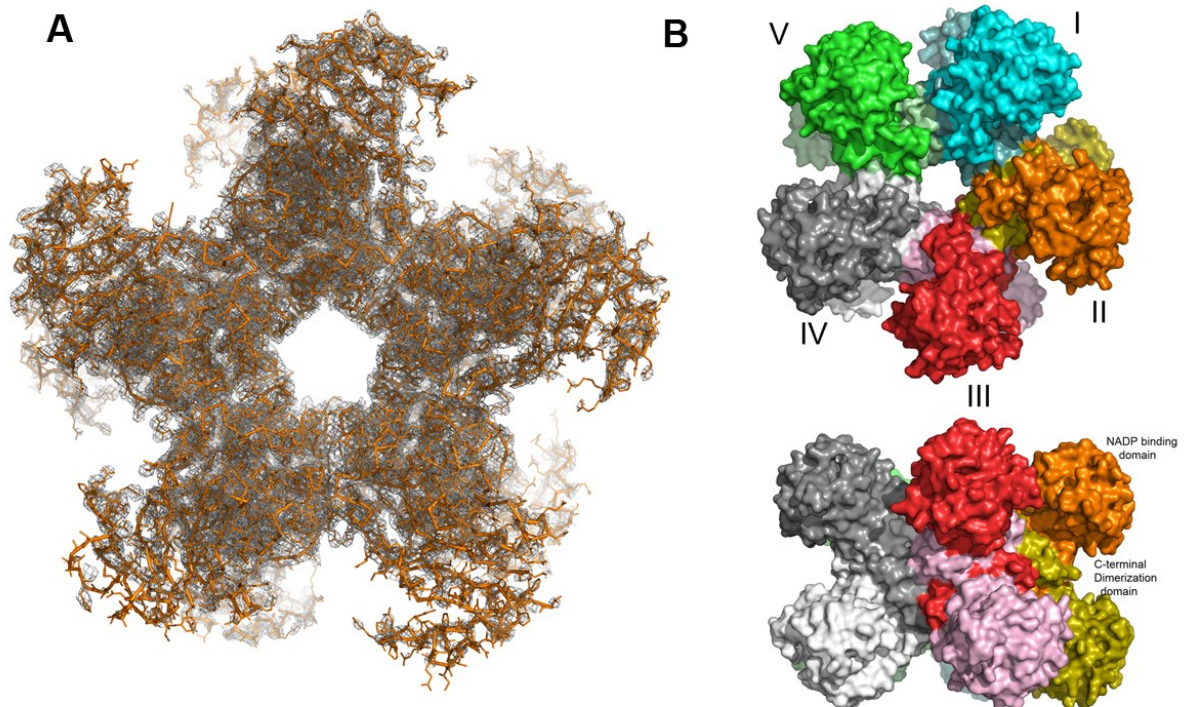
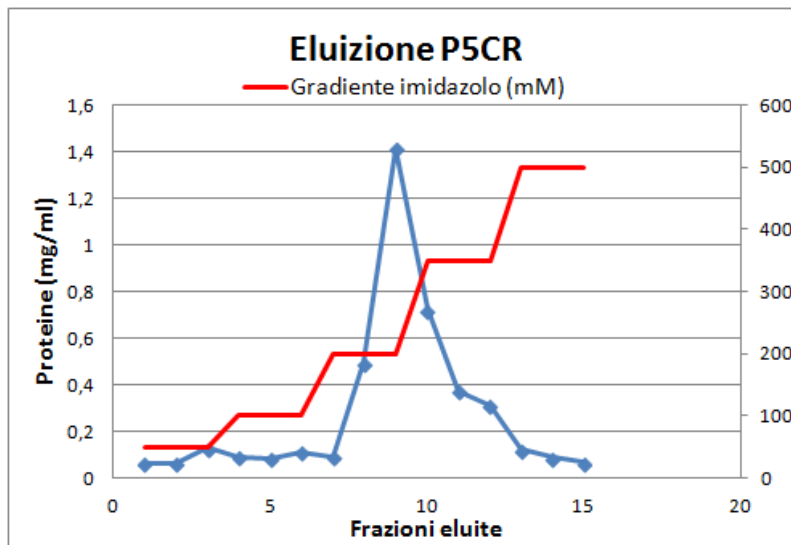


Un approccio analogo è stato utilizzato per purificare la P5C reduttasi, impiegando anche in questo caso il ceppo BL21(DE3) pLysS di *E. coli*. L'analisi delle varie frazioni ha fatto emergere che, pur essendovi una maggior quantità di enzima negli estratti totali rispetto alla frazione solubile, gran parte della proteina di riso passava in soluzione negli estratti preparati dalle cellule indotte (Figura 87).

In questo caso l'interazione della proteina ricombinante con la resina è stata quella attesa, e una concentrazione elevata di imidazolo è risultata necessaria per ottenerne l'eluizione. L'adozione di un gradiente *step-wise* con incrementi lievi dei livelli del ligando è risultata d'altra parte necessaria per ottenere la separazione dell'enzima di interesse da proteine contaminanti di *E. coli* in grado di interagire con la resina di affinità, la cui eluizione è evidente nelle corsie 4 e 5 del gel, corrispondenti al lavaggio con 50 e 100 mM imidazolo. Il preparato ottenuto è sostanzialmente omogeneo all'analisi elettroforetica. Solo nella frazione contenente la quantità più elevata di proteina si nota una debole banda leggermente più alta del marcatore BSA (66 kDa). Anche in relazione a altri dati resi disponibili in letteratura (Giberti *et al.*, 2014), tale banda più che a una contaminazione può essere però attribuita alla residua presenza in condizioni denaturanti di un dimerico della proteina di interesse. In effetti con lo stesso costrutto, in collaborazione con il dott. Boguslaw Nocek dell'Argonne National Laboratory (Illinois, USA), è stato possibile ottenere una grande quantità di proteina che è stata cristallizzata e usata per esperimenti di diffrazione ai raggi X. È stata in questo modo ottenuta la prima struttura tridimensionale di una P5C reduttasi vegetale, anche se ancora a bassa risoluzione (3,4 Å), che ha confermato la formazione di dimeri, a loro volta assemblati in un decamero (Figura 88).



**Figura 87. Espressione eterologa e purificazione per affinità della P5C reduttasi di riso.** Il vettore pET151 contenente il gene vegetale fuso a una coda di istidine è stato usato per trasformare il ceppo BL21 DE3 pLysS di *E. coli*. L'analisi delle cellule indotte con IPTG ha evidenziato la comparsa di una banda prominente con un coefficiente di ritardo corrispondente a quello atteso per la proteina di interesse. Nel grafico sottostante viene riportato il profilo di eluizione delle proteine dalla colonna His- Select™ Nickel Gel, le cui frazioni sono state anch'esse analizzate mediante SDS-PAGE. Corsie: 1 = proteine totali da cellule indotte. 2 = proteine solubili di cellule indotte. 3 = *flow through* della colonna. 4 = lavaggio della colonna (50 mM imidazolo). 5 = 100 mM imidazolo. 6 = marcatori a peso molecolare noto. 7 = 150 mM imidazolo. 8-10 = eluizione della colonna (200 mM imidazolo).



**Figura 88.** Struttura tridimensionale della P5C reduttasi di riso. La proteina è formata dall'unione di 5 omodimeri, ognuno formato dall'interazione di due monomeri in orientamento opposto (G. Forlani, M. Bertazzini, M. Zarattini, D. Funck, M.J. Ruszkowski e B.P. Nocek, dati in corso di pubblicazione).



Il *pool* ottenuto unendo le frazioni più ricche è risultato contenere una attività corrispondente a circa 25000 nkat mL<sup>-1</sup>, e un'attività specifica di circa 40 µkat (mg di proteine)<sup>-1</sup>. Tale preparato, sterilizzato per filtrazione e conservato in ghiaccio, ha mostrato una eccezionale stabilità: dopo 3 mesi in tali condizioni l'attività enzimatica residua è risultata infatti pari a più del 90% del valore iniziale.

### 3.11. Proprietà funzionali della P5C reduttasi

Le due proteine in tal modo purificate sono state oggetto di una caratterizzazione biochimica tesa a determinarne le principali proprietà cinetiche, ma soprattutto a verificare la possibile presenza di meccanismi di regolazione post-traduzionale che possano essere attivati in risposta all'esposizione delle piante di riso a condizioni di stress osmo-salino.

Il calcolo delle costanti cinetiche (Tabella 32) ha evidenziato la capacità della P5C reduttasi di utilizzare sia il NADH che il NADPH come donatore di elettroni per la riduzione del P5C. Utilizzando il NADPH si è calcolata una  $V_{max}$  di circa 12 µmol s<sup>-1</sup> (mg proteine)<sup>-1</sup>, che corrisponde a una costante catalitica di 400 s<sup>-1</sup>. Quando è stato impiegato il NADH, si è ottenuta una  $V_{max}$  elevatissima, che corrisponderebbe a più di 5000 eventi catalitici al secondo. L'affinità per i due substrati mostra però un andamento opposto, con una  $K_M$  pari a 52 µM per il NADPH e a 806 µM per il NADH. Di conseguenza, per quest'ultimo non è stato possibile ottenere condizioni saturanti neppure alle più alte concentrazioni testate. Considerando le concentrazioni fisiologiche dei due cofattori all'interno delle cellule di riso, pari rispettivamente a circa 50 µM NADPH e 30 µM NADH (Hayashi *et al.*, 2005), l'attività dell'enzima dovrebbe dunque procedere a una velocità simile nei due casi, a un valore corrispondente a circa metà della  $V_{max}$  con il NADPH.

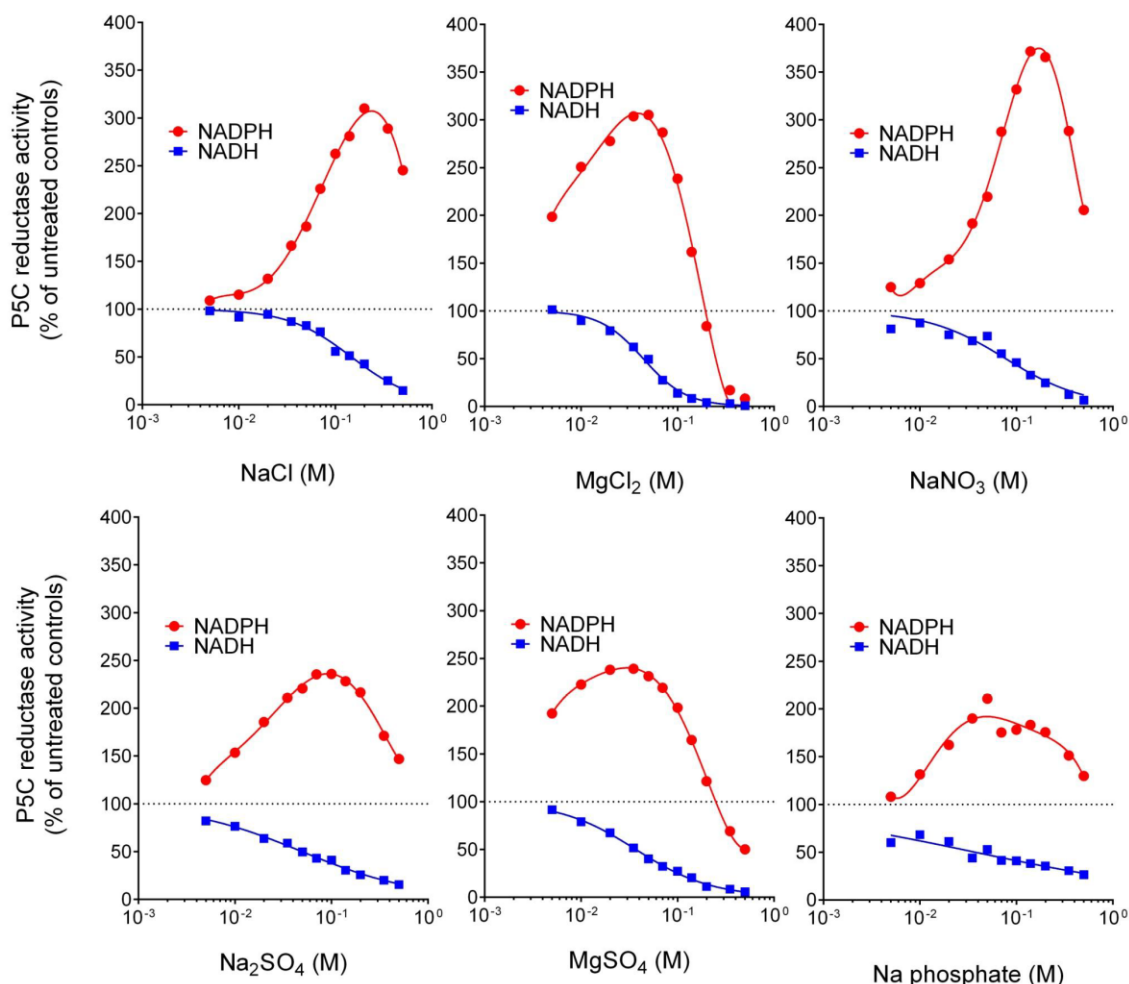
|                                                 |                                              |
|-------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Denatured molecular mass (by SDS-PAGE)          | 30,1 ± 0,4 kDa                               |
| Native molecular mass (by gel permeation)       | 401 ± 19 kDa                                 |
| Isoelectric point                               | 6,58 ± 0,04                                  |
| pH optimum                                      | 8,75 ± 0,21                                  |
| $V_{max}$ (NADH)                                | 158,3 ± 13,2 µkat (mg protein) <sup>-1</sup> |
| $V_{max}$ (P5C, with NADH as the co-substrate)  | 85,95 ± 3,53 µkat (mg protein) <sup>-1</sup> |
| $V_{max}$ (NADPH)                               | 11,93 ± 0,23 µkat (mg protein) <sup>-1</sup> |
| $V_{max}$ (P5C, with NADPH as the co-substrate) | 11,65 ± 0,29 µkat (mg protein) <sup>-1</sup> |
| $K_{cat}$ (NADH)                                | 4697 s <sup>-1</sup>                         |
| $K_{cat}$ (NADPH)                               | 350 s <sup>-1</sup>                          |
| $K_{M(app)}$ for L-P5C (NADH)                   | 283 ± 25 µM                                  |
| $K_{M(app)}$ for L-P5C (NADPH)                  | 23,8 ± 4,2 µM                                |
| $K_{M(app)}$ for NADH                           | 806 ± 89 µM                                  |
| $K_{M(app)}$ for NADPH                          | 52,4 ± 3,4 µM                                |

**Tabella 32. Proprietà della P5C reduttasi.** La proteina di riso è stata analizzata sia relativamente a parametri strutturali, che per quanto riguarda la capacità di utilizzo dei possibili substrati. I dati e i loro limiti fiduciali sono stati calcolati per mezzo del *software* Prism 6 (versione 6.03, GraphPad Software, Inc., USA).

L'analisi dell'effetto di concentrazioni crescenti di sali sull'attività della P5C reduttasi ha evidenziato d'altra parte una marcata diversità in base al donatore di elettroni utilizzato (Figura 89). Quando nella miscela di saggio è presente il NADH, i sali determinano una

progressiva inibizione dell'attività a concentrazioni superiori a 10 mM. Al contrario, se viene utilizzato il NADPH come cofattore, viene riscontrata una forte stimolazione dell'attività, molto maggiore rispetto all'entità dell'inibizione ed evidente a concentrazioni più basse (1 mM  $\text{MgCl}_2$ ). Per esempio, la presenza di 100 mM NaCl o KCl causa un'inibizione del 40% della reazione NADH-dipendente, ma una stimolazione del 150% di quella NADPH-dipendente. Essendo il NADPH il co-substrato nei confronti del quale l'enzima mostra la maggiore affinità (Tabella 32), questo potrebbe rappresentare un semplice meccanismo in grado di incrementare la sintesi di prolina nelle cellule sottoposte a stress salino.

Un attento esame dei dati riportati nella Figura 89 permette anche una ulteriore distinzione. Confrontando dal punto di vista quantitativo le curve di inibizione dell'attività NADH-dipendente, ad esempio quella ottenuta con NaCl con quella ricavata con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , o quelle relative a  $\text{MgCl}_2$  e  $\text{MgSO}_4$ , esse sembrano proporzionali alla concentrazione di anioni. Al contrario, la stimolazione dell'attività dipendente dal NADPH mostra *patterns* quasi sovrapponibili per il  $\text{Na}^+$ , ma diversi per il  $\text{Mg}^{2+}$ . Sembra dunque che i cationi come il  $\text{Na}^+$  esercitino un effetto globalmente stimolatorio sull'attività, che viene invece inibita dagli anioni solo a dosi elevatissime e non fisiologiche (>200 mM). Ciò viene evidenziato dal fatto che l'effetto stimolatorio dei cationi sull'attività NADPH-dipendente a concentrazioni eccedenti tale limite viene gradualmente revertito.



**Figura 89. Effetto di concentrazioni crescenti di alcuni sali sull'attività *in vitro* della P5C reductasi.** Un'uguale quantità di enzima è stata saggiata utilizzando come donatore di elettroni il NADPH (cerchi rossi) o il NADH (quadrati blu) in presenza di concentrazioni via via più elevate di sali. I risultati sono espressi come percentuale del controllo saggiato in assenza di sale, e sono la media  $\pm$  SE di tre repliche.

Anche se ulteriori conferme sono richieste per avvalorare il fatto che questo meccanismo di stimolazione possa effettivamente aver luogo *in vivo*, il dato sembra coerente con quanto visto in precedenza sulle plantule di riso. Le determinazioni eseguite su piante cresciute in condizioni normo-osmotiche e poi sottoposte a condizioni di stress salino avevano evidenziato un incremento nel contenuto di prolina libera solo successivamente a 48-72 h di esposizione allo stress (Tabella 30). Un simile *timing* era stato d'altra parte evidenziato anche dalle analisi ionomiche, che avevano indicato un aumento progressivo del rapporto  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  a seguito all'esposizione al sale, che a 48 h era ancora ben al di sotto dei livelli raggiungibili in plantule direttamente germinate in soluzione salina (Figure 69 e 70). Sembra dunque plausibile che, man mano che il  $\text{Na}^+$  viene traslocato nelle foglie, il suo ingresso nel citosol possa stimolare l'attività della P5C reduttasi, risultando funzionale all'aumento della trascrizione della P5CS2 (Figura 80; Hur *et al.*, 2004) e all'accumulo progressivo dell'imminoacido.

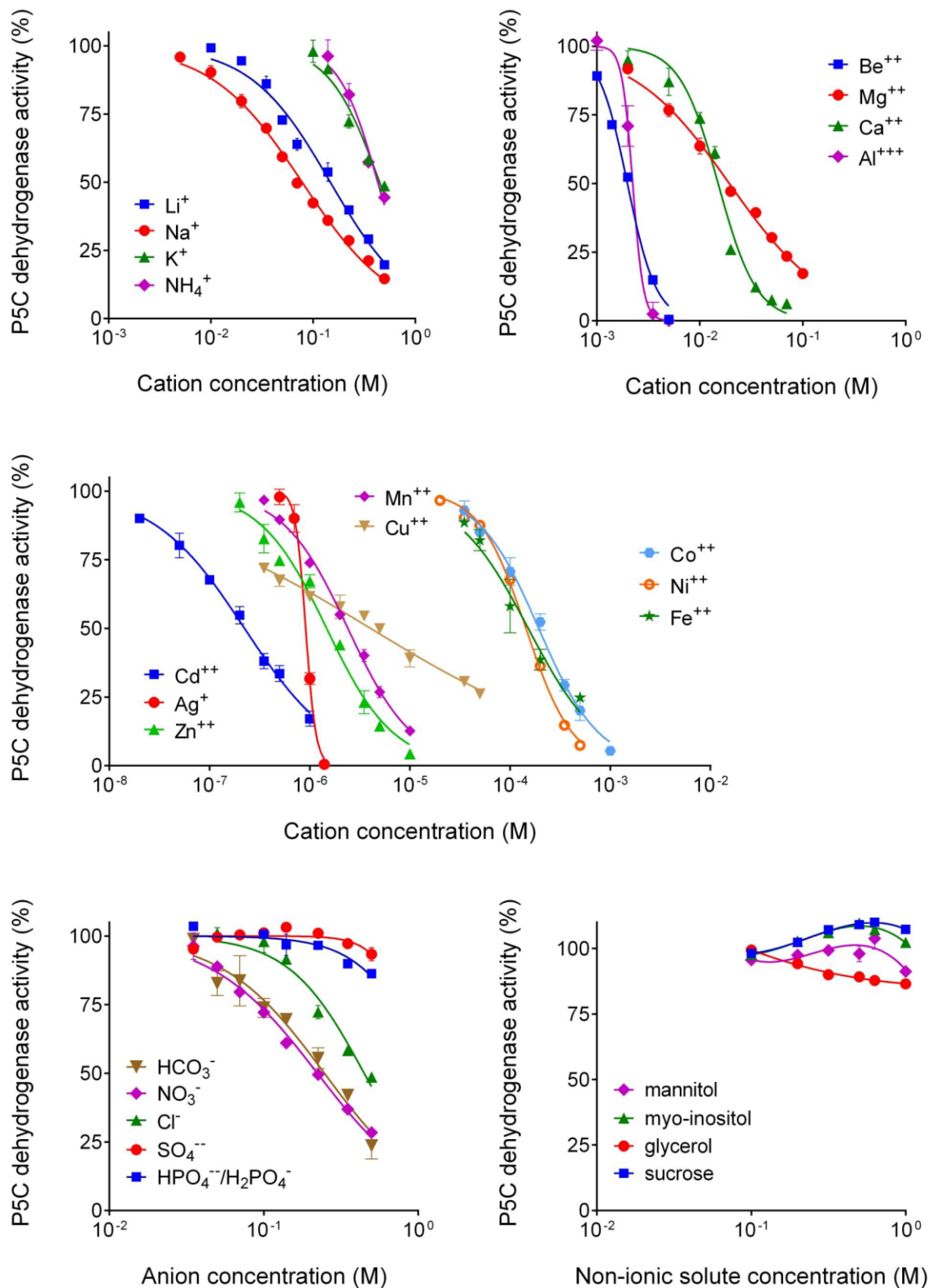
### 3.12. Caratterizzazione funzionale della P5C deidrogenasi di riso

Un analogo insieme di determinazioni è stato condotto anche sulla forma troncata di P5C deidrogenasi. I risultati, riassunti nella Tabella 33, indicano sia una costante catalitica nettamente inferiore, con soli 12 reazioni al secondo, che l'assenza di ambiguità di substrato. Pur potendo infatti l'enzima utilizzare sia il  $\text{NADP}^+$  che il  $\text{NAD}^+$  come accettore di elettroni, sia la  $V_{\text{max}}$  che l'affinità dell'enzima per quest'ultimo è nettamente superiore, portando a dedurre che esso sia in pratica il principale se non l'unico substrato fisiologico.

|                                                                  |                                             |
|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Denatured molecular mass (by SDS-PAGE)                           | 58,2 ± 1,3 kDa                              |
| Native molecular mass (by gel permeation)                        | 259 ± 14 kDa                                |
| Isoelectric point                                                | 5,60 ± 0,05                                 |
| pH optimum                                                       | 6,65                                        |
| Temperature optimum                                              | 46 ± 1°C                                    |
| Activation energy                                                | 54,6 ± 3,7 kJoules mol <sup>-1</sup>        |
| $V_{\text{max}}$ ( $\text{NAD}^+$ )                              | 196,9 ± 2,1 nkat (mg protein) <sup>-1</sup> |
| $V_{\text{max}}$ (P5C, with $\text{NAD}^+$ as the co-substrate)  | 207,7 ± 3,3 nkat (mg protein) <sup>-1</sup> |
| $V_{\text{max}}$ ( $\text{NADP}^+$ )                             | 49,2 ± 1,7 nkat (mg protein) <sup>-1</sup>  |
| $V_{\text{max}}$ (P5C, with $\text{NADP}^+$ as the co-substrate) | 51,0 ± 1,0 nkat (mg protein) <sup>-1</sup>  |
| $K_{\text{cat}}$ ( $\text{NAD}^+$ )                              | 12 s <sup>-1</sup>                          |
| $K_{\text{cat}}$ ( $\text{NADP}^+$ )                             | 3 s <sup>-1</sup>                           |
| $K_{\text{M(app)}}$ for L-P5C ( $\text{NAD}^+$ )                 | 358 ± 14 μM                                 |
| $K_{\text{M(app)}}$ for L-P5C ( $\text{NADP}^+$ )                | 265 ± 13 μM                                 |
| $K_{\text{M(app)}}$ for $\text{NAD}^+$                           | 644 ± 30 μM                                 |
| $K_{\text{M(app)}}$ for $\text{NADP}^+$                          | 4695 ± 462 μM                               |

**Tabella 33. Proprietà della P5C deidrogenasi di riso.** La proteina è stata analizzata sia relativamente a parametri strutturali, che per quanto riguarda la capacità di utilizzo dei possibili substrati. I dati e i loro limiti fiduciali sono stati calcolati per mezzo del *software* Prism 6 (versione 6.03, GraphPad Software, Inc., USA).

L'effetto dell'aggiunta di diverse concentrazioni di anioni e cationi alla miscela di reazione (Figura 90) si è rivelato in questo caso molto diverso da quanto evidenziato per la P5C reduttasi.



**Figura 90. Effetto dell'aumento della concentrazione di cationi, anioni e soluti non carichi sull'attività della P5C deidrogenasi di riso.** I risultati riportati sono stati ottenuti utilizzando il  $\text{NAD}^+$  come accettore di elettroni. I dati sono espressi come percentuale di controlli in assenza di tali aggiunte, e sono la media  $\pm$  SE di tre repliche.

La presenza di diversi sali di  $\text{Na}^+$  è risultata sostanzialmente ininfluenza, mostrando una progressiva inibizione dell'attività dell'enzima solo a concentrazioni superiori a 100 mM, e solo per anioni relativamente poco abbondanti nella cellula, come  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{NO}_3^-$ . Ancora meno rilevante è stato l'effetto della diminuzione della concentrazione dell'acqua libera, ottenuto con l'aggiunta di soluti non ionici come mannitolo, glicerolo e saccarosio. I cationi hanno invece causato una riduzione dell'attività della P5C deidrogenasi a concentrazioni inferiori, comprese tra 10 e 100 mM per i cationi monovalenti, e 1 e 100 mM per quelli divalenti. Considerando però gli ambiti di concentrazione a cui tali ioni sono solitamente presenti nella cellula, sembra plausibile che i soli  $\text{Na}^+$  e  $\text{Mg}^{2+}$  possano fluttuare in modo da determinare una modulazione dell'attività dell'enzima. Ciò nondimeno, considerando il primo, il contenuto intracellulare anche in piante sottoposte a condizioni severe di stress salino non sembra comunque in grado di determinare una completa soppressione dell'attività catalitica.

Risultati interessanti sono invece stati ottenuti aggiungendo nella miscela di saggio altri cationi, soprattutto metalli pesanti. Alcuni di questi, come il cadmio e l'argento ( $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Ag}^+$ ), non hanno valenza fisiologica e potrebbero agire semplicemente catalizzando l'ossidazione chimica di alcuni residui amminoacidici essenziali per la catalisi, ipotesi che per quest'ultimo sembra avvalorata dalla rapidità con cui l'aumento della concentrazione determina la completa inattivazione dell'enzima. Al contrario altri metalli, come il manganese, lo zinco e il rame, svolgono nella pianta un ruolo preciso come micronutrienti, e nella cellula vegetale ne è stata misurata la presenza in concentrazioni che vanno da  $10^{-6}$  a  $10^{-3}$  M.

In particolare, studi recenti su *A. thaliana* hanno evidenziato proprio all'interno dei mitocondri, dove co-localizza la P5C deidrogenasi, concentrazioni micromolari di ferro, zinco, rame e manganese. Inoltre, fluttuazioni rilevanti e selettive del contenuto mitocondriale di rame e ferro sono state misurate in risposta a condizioni di stress ossidativo, imposte sia *in vitro* direttamente sugli organelli isolati, sia *in vivo* sulle plantule integre (Tan *et al.*, 2010). Dal momento che, come visto, condizioni di stress osmo-salino si riflettono a livello cellulare in una situazione di stress ossidativo, vi è la possibilità che variazioni locali della concentrazione di questi ioni possano ridurre l'attività dell'enzima in un frangente in cui l'accumulo di prolina può contribuire a minimizzare le conseguenze dello stress.

Anche in questi casi i risultati devono essere considerati preliminari, e opportune conferme dovranno essere ottenute prima di poter trarre delle conclusioni. Resta il fatto che anche nel caso della P5C deidrogenasi, accanto ai meccanismi di controllo trascrizionale descritti (Borsani *et al.*, 2005), potrebbero sussistere delle modalità di regolazione dell'attività enzimatica in grado di determinarne una modulazione in condizioni di stress.

#### 4. CONCLUSIONI e PROSPETTIVE

I risultati ottenuti nell'ambito del presente lavoro, all'interno del quadro più ampio del progetto RISINNOVA, hanno contribuito a far luce sull'esistenza nel germoplasma italiano di riso di una variabilità naturale riguardo alla suscettibilità a condizioni di stress osmo-salino, iniziando a individuare alcuni dei meccanismi di adattamento che ne potrebbero essere responsabili. Anche se alcuni aspetti richiederanno necessariamente un approfondimento futuro, qualche conclusione generale può essere già delineata. In particolare può essere sottolineato che:

- è stato messo a punto un metodo rapido di *screening* precoce per verificare la tolleranza allo stress salino di una data varietà; i risultati sono coerenti con l'impiego relativo dei diversi genotipi nelle regioni del Nord Italia interessate da elevate concentrazioni di sali nel suolo
- l'utilizzo di una complessa miscela salina, capace di simulare la composizione ionica del suolo, può fornire risultati più attendibili dell'uso del solo NaCl, visto che sono state evidenziate differenze significative tra le due metodiche da cui sembra che la seconda porti a una sovrastima dell'abilità di una data cultivar di crescere in presenza di elevati valori di conducibilità elettrica
- le colture in sospensione liquida non possono essere impiegate come sistema alternativo al *modello pianta*, visto che la risposta allo stress salino delle cellule indifferenziate è risultato diverso da un punto di vista sia quantitativo che qualitativo rispetto ai risultati ottenuti *in vivo*
- tra le 17 cultivar di riso italiano analizzate, le maggiori differenze sono state evidenziate a bassi valori di conducibilità elettrica, un fattore molto rilevante da un punto di vista agronomico visto che questi sono assimilabili a condizioni realistiche di campo.

Al fine di identificare i determinanti molecolari maggiormente coinvolti nella tolleranza differenziale al sale, 5-6 varietà divergenti per questo carattere sono state caratterizzate rispetto a numerosi parametri potenzialmente coinvolti nell'alleviare gli effetti delle condizioni di stress salino (Tabella 34). Anche in questo caso possono essere tratte alcune conclusioni:

- i genotipi analizzati non hanno mostrato differenze nel contenuto ionico delle foglie correlabili alla tolleranza differenziale al sale, che non sembra quindi dipendere dall'abilità di escludere in maniera selettiva il sodio limitandone l'ingresso a livello radicale o riducendone il trasporto alla parte aerea attraverso meccanismi di riestruzione dallo xilema
- tra gli enzimi antiossidanti esaminati, in condizioni di stress salino i livelli della Mn-SOD e della Cu/Zn-SOD, stimati immunologicamente, aumentano in maniera significativa con l'entità dello stress, portando a ipotizzarne un ruolo attivo nella detossificazione dei ROS e nella protezione delle cellule dal danno ossidativo; tuttavia i risultati relativi ai livelli di attività enzimatica nelle stesse condizioni non mostrano che lievi aumenti, suggerendo un meccanismo di inattivazione catalitica ROS-dipendente; ad ogni modo, le differenze evidenziate non sembrano connesse alla diversa tolleranza al sale
- al contrario, i livelli di glutatione e di prolina libera hanno mostrato una correlazione significativa con gli effetti *in vivo*: più resistente si era dimostrata una varietà nelle prove a livello di plantula, maggiore è risultato l'accumulo di questi metaboliti in risposta allo stress; considerando che entrambe le molecole hanno effetti antiossidanti, il risultato suggerisce che una più elevata capacità di prevenire il danno ossidativo possa corrispondere a una minore suscettibilità all'eccesso di sali nel terreno
- questa ipotesi, nel caso della prolina, è rafforzata dal fatto che l'analisi è stata eseguita su un numero molto elevato di varietà

|                                                   |                                | Loto | Baldo | Volano | Carnaroli | Vialone nano |
|---------------------------------------------------|--------------------------------|------|-------|--------|-----------|--------------|
| <b>Cu/Zn-SOD</b>                                  | Livello di attività            |      | ■     |        | ■         | ■            |
|                                                   | Livello di proteine            |      |       | ■      |           | ■            |
| <b>Mn-SOD</b>                                     | Livello di attività            |      |       |        |           | ■            |
|                                                   | Livello di proteine            | ■    | ■     |        | ■         | ■            |
| <b>TBARs</b>                                      |                                | ■    | ■     | ■      | ■         | ■            |
| <b>Glutazione</b>                                 | GSH                            | ■    | ■     |        | ■         | ■            |
|                                                   | GSSG                           | ■    | ■     |        | ■         | ■            |
|                                                   | GSH/GSSG                       |      |       | ■      | ■         | ■            |
| <b>Glutazione Reduttasi</b>                       | Livello di proteine citosolico | ■    |       |        | ■         |              |
|                                                   | Livello di proteine            |      | ■     |        | ■         |              |
| <b>Acido Ascorbico</b>                            | AsA                            | ■    | ■     | ■      | ■         | ■            |
|                                                   | DHA                            |      |       |        |           | ■            |
|                                                   | AsA/DHA                        |      |       | ■      | ■         | ■            |
| <b>Ascorbato perossidasi</b>                      | Livello di proteine citosolico |      | ■     | ■      |           |              |
|                                                   | Livello di proteine            |      | ■     |        |           |              |
| <b>Catalasi</b>                                   | Livello di proteine            | ■    |       | ■      | ■         | ■            |
| <b>Prolina</b>                                    | Parte aerea                    | ■    | ■     | ■      | ■         | ■            |
| <b>24-h di stress salino (shock)</b>              | K <sup>+</sup>                 |      |       |        |           | ■            |
|                                                   | Na <sup>+</sup>                | ■    | ■     | ■      | ■         | ■            |
|                                                   | Mg <sup>++</sup>               |      | ■     | ■      |           |              |
| <b>48-h di stress salino</b>                      | K <sup>+</sup>                 |      |       | ■      | ■         |              |
|                                                   | Na <sup>+</sup>                | ■    | ■     | ■      | ■         | ■            |
|                                                   | Mg <sup>++</sup>               |      |       |        |           |              |
| <b>2-settimane di stress salino (adattamento)</b> | K <sup>+</sup>                 | ■    | ■     | ■      | ■         | ■            |
|                                                   | Na <sup>+</sup>                | ■    | ■     | ■      | ■         | ■            |
|                                                   | Mg <sup>++</sup>               | ■    | ■     | ■      | ■         | ■            |

**Tabella 34. Fluttuazioni in riso di alcuni parametri potenzialmente coinvolti nella risposta allo stress salino.** I risultati ottenuti nei diversi esperimenti sono riassunti in un unico schema in cui una casella bianca denota l'assenza di effetto, una casella verde evidenzia un effetto positivo (il parametro considerato aumenta in conseguenza della esposizione a condizioni di stress), mentre una casella rossa segnala una diminuzione. I genotipi sono ordinati dal più resistente (Loto) al più sensibile (Vialone nano).

- contrariamente a quanto generalmente dato per assodato, l'accumulo di prolina in riso sembra avere un ruolo di adattamento a medio-lungo termine alle condizioni di stress salino, e non costituisce un meccanismo di aggiustamento osmotico attivato a tempi brevi; infatti l'entità dell'accumulo dell'imminoacido non appare sufficiente a compensare l'abbassamento del potenziale idrico dell'apoplasto derivante dall'alta concentrazione di Na<sup>+</sup>, rafforzando la possibilità che la sua principale azione protettiva sia legata alle proprietà che mostra come *scavenger* dei ROS
- anche se si tratta di dati ancora preliminari, la caratterizzazione di due degli enzimi coinvolti nel metabolismo della prolina, P5C reduttasi e P5C deidrogenasi, suggerisce che, accanto a fenomeni già noti di controllo trascrizionale, sintesi e catabolismo dell'imminoacido, possano essere modulati in tempi molto brevi anche da meccanismi di regolazione post-traduzionale.

Nonostante le numerose determinazioni eseguite, non è stato possibile identificare un singolo parametro che spieghi la tolleranza differenziale allo stress salino evidenziata tra i genotipi di riso italiano analizzati. Questa diversa suscettibilità sembra più realisticamente dipendere da più fattori, ognuno dei quali può avere in diverse cultivar un peso differente nel mitigare gli effetti negativi delle alte concentrazioni di sale nel terreno. Non bisogna dimenticare, infatti, che i genotipi analizzati derivano da un lungo processo di *breeding*, in cui sono state utilizzate linee parentali provenienti da tutto il mondo, contribuendo a determinare tra di essi delle notevoli differenze da un punto di vista genetico. È dunque più che plausibile che due cultivar che mostrano lo stesso grado di tolleranza al sale possano avere tale proprietà a due diversi meccanismi. D'altra parte queste considerazioni rafforzano la significatività delle correlazioni evidenziate al riguardo, avvalorando la possibilità che in un sottoinsieme meno numeroso di genotipi, geneticamente più omogeneo, il metabolismo della prolina e del glutatione possano spiegare in gran parte la diversa resistenza allo stress.

I risultati del presente lavoro rappresentano il primo insieme di dati ottenuti al fine di investigare i meccanismi di tolleranza al sale nel germoplasma di riso italiano. Essi, una volta approfonditi e confermati, potranno essere di aiuto in programmi di selezione assistita, fornendo ai *breeders* nuovi marcatori da utilizzare per la selezione di varietà di riso più adatte alla crescita in terreni affetti da elevate concentrazioni saline, una condizione che si prevede potrà estendersi nel prossimo futuro a causa dei cambiamenti climatici e di alcune pratiche agronomiche.



## 5. BIBLIOGRAFIA

- Achard P., Cheng H., De Grauwe L., Decat J., Schoutteten H., Moritz T., Van Der Straeten D., Peng J., Harberd N.P.; Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals; 2006; *Science*; 311 (5757), pp. 91-94
- Agrawal G.K., Rakwal R., Iwahashi H.; Isolation of novel rice multiple stress-responsive MAP kinase gene, OsMSRMK2, whose mRNA accumulates rapidly in response to environmental cues; 2002; *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 294, pp. 1009–1016
- Alia P.S., Mohanty P.; Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical-induced photodamage; 1997; *Journal of Photochemistry and Photobiology*; 38, pp. 253–257
- Anil V.S., Krishnamurthy H., Mathew M.; Limiting cytosolic Na<sup>+</sup> confers salt tolerance to rice cells in culture: a two-photon microscopy study of SBF1-loaded cells; 2007; *Physiologia Plantarum* 129, pp. 607–621
- Arango Y., Heise K.-P.; Tocopherol synthesis from homogentisate in *Capsicum annuum* L. (yellow pepper) chromoplast membranes: evidence for tocopherol cyclase; 1998; *Biochemical Journal*; 336, p. 531-533
- Ashikari M., Sasaki A., Ueguchi-Tanaka M., Itoh H., Nishimura A., Swapan D., Ishiyama K., Saito T., Kobayashi M., Khush G.S., Kitano H., Matsuoka M.; Loss of function of a rice gibberellin biosynthetic gene, GA20 oxidase (GA20ox-2), led to the rice 'Green Revolution'; 2002; *Breeding Science*; 52, pp. 143–150
- Ashraf M.; Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidant as markers; 2009; *Biotechnology advances*; 27, pp. 84-93
- Bagnaresi P., Marè C., Mazzucotelli E.; Il ruolo centrale dello stress idrico nelle avversità abiotiche delle piante; 2004; *Agroindustria*; 3 (2), pp. 101-117
- Ball L., Accotto G.P., Bechtold U., Creissen G., Funck D., Jimenez A., Kular B., Leyland N., Mejia-Carranza J., Reynolds H., Karpinski S., Mullineaux P.M.; Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in Arabidopsis; 2004; *Plant Cell*; 16 (9), pp. 2448-2462
- Bartels D., Sunkar R.; Drought and salt tolerance in plants; 2005; *Critical Reviews in Plant Sciences*; 24 (1), pp. 23-58
- Bartosz G.; Superoxide Dismutases and Catalase; 2005; *The Handbook of Environmental Chemistry Vol. 2, Part O*; pp. 109–149
- Bassil E., Ohto M.A., Esumi T., Tajima H., Zhu Z., Cagnac O., Belmonte M., Peleg Z., Yamaguchi T., Blumwald E.; The Arabidopsis intracellular Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters NHX5 and NHX6 are endosome associated and necessary for plant growth and development; 2011; *Plant Cell*; 23, pp. 224–239
- Bej S., Basak J.; MicroRNAs: The Potential Biomarkers in Plant Stress Response; 2014; *American Journal of Plant Sciences*; 5, pp. 748-759
- Ben Rejeb K., Abdelly C., Savouré A.; How reactive oxygen species and proline face stress together; 2014; *Plant Physiology and Biochemistry*; 80, pp. 278-284
- Blair M., Hedetale V., Mc Couch S.; Fluorescent-labeled microsatellite panel useful for detecting allelic diversity in cultivated rice (*Oryza sativa* L.); 2002; *Theoretical and Applied Genetic*; 105, pp. 449-457
- Bonales-Alatorre E., Shabala S., Chen Z.H., Pottosin I.; Reduced tonoplast FV and SV channels activity is essential for conferring salinity tolerance in a facultative halophyte, *Chenopodium quinoa*; 2013; *Plant Physiology*; 162, pp. 940–952
- Bordiga O., Silvestri L.; Del riso; 1880; Novara
- Borsani O., Zhu J., Verslues P.E., Sunkar R., Zhu J.-K.; Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis; 2005; *Cell*; 123 (7), pp. 1279-1291
- Boudsocq M., Sheen J.; CDPKs in immune and stress signalling; 2013; *Trends in Plant Science*; 18 (1), pp. 30-40

- Boudsocq M., Sheen J.; Stress signalling II: Calcium sensing and signalling; (Book Chapter); 2010; Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation; pp. 75-90
- Boudsocq M., Willmann M.R., McCormack M., Lee H., Shan L., He P., Bush J., Cheng, S.-H., Sheen, J.; Differential innate immune signalling via Ca<sup>2+</sup> sensor protein kinases; 2010; Nature; 464, pp. 418–422
- Boursiac Y., Boudet J., Postaire O., Luu D.T., Tournaire-Roux C., Maurel C.; Stimulus-induced downregulation of root water transport involves reactive oxygen species-activated cell signalling and plasma membrane intrinsic protein internalization; 2008; The Plant Journal; 56, pp. 207–218
- Burkhardt P.K., Beyer P., Wünn J., Klöti A., Armstrong G.A., Schledz M., Von Lintig J., Potrykus I.; Transgenic rice (*Oryza sativa*) endosperm expressing daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) phytoene synthase accumulates phytoene, a key intermediate of provitamin A biosynthesis; 1997; Plant Journal; 11 (5), pp. 1071-1078
- CAAS, GENOMICS & IRRRI; The 3,000 rice genomes project; 2014; GigaScience, 3 (7), pp. 1-6
- Cai X., Fan J., Jiang Z., Basso B., Sala F., Spada A., Grassi F., Lu B.-R.; The puzzle of Italian rice origin and evolution: Determining genetic divergence and affinity of rice germplasm from Italy and Asia; 2013; PLoS ONE; 8 (11), e80351
- Chang T.-T.; The origin, evolution, cultivation, dissemination, and diversification of Asian and African rices; 1976; Euphytica; 25 (1), pp. 425-441
- Chang-Quan W., Rui-Chang L.; Enhancement of superoxide dismutase activity in the leaves of white clover (*Trifolium repens L.*) in response to polyethylene glycol-induced water stress; 2008; Physiologiae Plantarum; 30 (6), pp. 841-847
- Chaumont F., Tyerman S.D.; Aquaporins: Highly regulated channels controlling plant water relations; 2014; Plant Physiology; 164 (4), pp. 1600-1618
- Chaves M.M., Flexas J., Pinheiro C.; Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell; 2009; Annals of Botany; 103, pp. 551–560
- Chehab E.W., Patharkar O.R., Hegeman A.D., Taybi T., Cushman J.C.; Autophosphorylation and subcellular localization dynamics of a salt and water deficit-induced calcium-dependent protein kinase from ice plant; 2004; Plant Physiology; 135, pp. 1430–1446
- Chen C., Dickman M.B.; Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*; 2005; PNAS; 102, pp. 3459–3464
- Chen C.T., Chen L.M., Lin C.C., Kao C.H.; Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper; 2001; Plant Science; 160, pp. 283–290
- Chen J., Zhang Y., Wang C., Lü W., Jin J.B., Hua X.; Proline induces calcium-mediated oxidative burst and salicylic acid signalling; 2011; Amino Acids; 40, pp. 1473-1484
- Chen Q., Arents J.C., Bader R., Postma P.W., Amster-Choder O.; BglF, the sensor of the *E. coli* bgl system, uses the same site to phosphorylate both a sugar and a regulatory protein; 1997; EMBO Journal; 16, pp. 4617-4627
- Chen Z., Gallie D.R.; The ascorbic acid redox state controls guard cell signalling and stomata movement; 2004; Plant Cell; 16, pp. 1143–1162
- Cheong Y.H., Kim K.N., Pandey G.K., Gupta R., Grant J.J., Luan S.; CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in Arabidopsis; 2003; Plant Cell; 15, pp. 1833–1845
- Chiappelli R.; Il Lady Wright nella selezione per linee pure; 1929; Il Giornale di Riscoltura; 7
- Chinpongpanich A., Limruengroj K., Phean-O-Pas S., Limpaseni T., Buaboocha T.; Expression analysis of calmodulin and calmodulin-like genes from rice, *Oryza sativa L.*; 2012; BMC Research Notes; 5, 625
- Danquah A., de Zelicourt A., Colcombet J., Hirt H.; The role of ABA and MAPK signalling pathways in plant abiotic stress responses; 2014; Biotechnology Advances; 32 (1), pp. 40-52
- De Gregory; Solution du problème économique et politique concernant la conservation ou la suppression de la culture du riz; 1818; Torino
- Deuschle K., Funck D., Forlani G., Stransky H., Biehl A., Leister D., van der Graaf E., Kunze R., Frommer W.B.; The role of  $\delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation; 2004; Plant Cell; 16, pp. 3413-3425

- Di Martino C., Pizzuto R., Pallotta M.L., De Santis A., Passarella S.; Mitochondrial transport in proline catabolism in plants: the existence of two separate translocators in mitochondria isolated from durum wheat seedlings; 2006; *Planta*; 223, pp. 1123–1133
- Essah P.A., Davenport R., Tester M.; Sodium influx and accumulation in *Arabidopsis*; 2003; *Plant Physiology* 133, pp. 307–318
- Faize M., Burgos L., Faize L., Piqueras A., Nicolas E., Barba-Espin G., Clemente-Moreno M.J., Alcobendas R., Artlip T., Hernandez J.A.; Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress; 2011; *Journal of Experimental Botany*; 62 (8), pp. 2599-2613
- Fang Y., You J., Xie K., Xie W., Xiong L.; Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice; 2008; *Molecular Genetics and Genomics*; 280: 547–563
- FAO - Rice Market Monitor; Vol. XVII (4), December 2014
- FAO; FAO Land and Plant Nutrition Management Service; 2008; <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>
- Feierabend J.; Catalases in plants: molecular and functional properties and role in stress defence; In: N. Smirnoff. [ed.] 2005; *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell Publishing Ltd., Glasgow, UK
- Feng W., Hongbin W., Bing L., Jinfa W.; Cloning and characterization of a novel splicing isoform of the iron-superoxide dismutase gene in rice (*Oryza sativa* L.); 2006; *Plant Cell Reports*; 24, pp. 734–742
- Flowers T.J., Galal H.K., Bromham L.; Evolution of halophytes: Multiple origins of salt tolerance in land plants; 2010; *Functional Plant Biology*; 37, pp. 604-612
- Flowers T.J., Troke P.F., Yeo A.R.; The mechanism of salt tolerance in halophytes; 1977; *Annual Review Plant Physiology*; 28, pp. 89–121
- Flowers T.J.; Colmer T.D.; Salinity tolerance in halophytes; 2008; *New Phytologist*; 179, pp. 945-963
- Flowers T.J.; Improving crop salt tolerance; 2004; *Journal of Experimental Botany*; 55 (396), pp. 307-319
- Forlani G., Scainelli D., Nielsen E.;  $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase from cultured cells of potato: Purification and properties; 1997; *Plant Physiology*; 113 (4), pp. 1413-1418
- Foyer C.H., Noctor G.; Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub; 2011; *Plant Physiology* 155, pp. 2–18
- Franz S., Ehlert, B., Liese A., Kurth J., Cazalé A.-C., Romeis T.; Calcium-dependent protein kinase CPK21 functions in abiotic stress response in *Arabidopsis thaliana*; 2011; *Molecular Plant*; 4, pp. 83–96
- Fricke W., Akhiyarova G., Veselov D., Kudoyarova G.; Rapid and tissue-specific changes in ABA and in growth rate response to salinity in barley leaves; 2004; *Journal of Experimental Botany*; 55, pp. 1115–1123
- Fricke W., Peters W.S.; The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley. A study at the cell level; 2002; *Plant Physiology*; 129, pp. 374–388
- Fukuda A., Nakamura A., Tagiri A., Tanaka H., Miyao A., Hirochika H., Tanaka Y.; Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter from rice; 2004; *Plant and Cell Physiology*; 45, pp. 146–159
- Gao L.Z., Innan H.; Non independent domestication of the two rice subspecies, *Oryza sativa* ssp. *Indica* and ssp. *Japonica*, demonstrated by multilocus microsatellites; 2008; *Genetics*; 179(2), pp. 965-976
- Giberti S., Funck D., Forlani G.;  $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate reductase from *Arabidopsis thaliana*: Stimulation or inhibition by chloride ions and feedback regulation by proline depend on whether NADPH or NADH acts as co-substrate; 2014; *New Phytologist*; 202 (3), pp. 911-919
- Glenn E.P., Brown J.J., Blumwald E.; Salt tolerance and crop potential of halophytes; 1999; *Critical Reviews in Plant Sciences*; 18, pp. 227–255
- Gobetti V.; *Il Riso*; 1908; Biblioteca Ottavi; Casale (VC)
- Goyal M.M., Basak A.; Human catalase: looking for complete identity; 2010; *Protein Cell*; 1(10), pp. 888–897

- Grassini P., Eskridge K.M., Cassman K.G.; Distinguishing between yield advances and yield plateaus in historical crop production trends; 2013; *Nature Communications*; 4 (2918), pp. 1-11
- Grattan S.R., Zeng L., Shannon M.C., Roberts S.R.; Rice is more sensitive to salinity than previously thought; 2002; *California Agriculture*; 56 (6); pp. 189-195
- Gregorio G.B., Senadhira D., Mendoza R.D.; Screening rice for salinity tolerance; 1997; IRRI Discussion Paper Series N° 22
- Hall D., Evans A., Newbury H., Pritchard J.; Functional analysis of CHX21: a putative sodium transporter in *Arabidopsis*; 2006; *Journal of Experimental Botany* 57, pp. 1201–1210
- Hanson B., Grattan S.R., Fulton A.; Agricultural salinity and drainage; 1999; UC DANR
- Hare P., Cress W.; Metabolic implications of stress induced proline accumulation in plants; 1997; *Plant Growth Regulation*; 21, pp. 79–102
- Hauser F., Horie T.; A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K/Na ratio in leaves during salinity stress; 2010; *Plant, Cell & Environment*; 33, pp. 552–565
- Hayashi F., Ichino T., Osanai M., Wada K.; Oscillation and regulation of proline content by P5CS and ProDH gene expressions in the light/dark cycles in *Arabidopsis thaliana L.*; 2000; *Plant and Cell Physiology*; 41, pp. 1096–1101
- Hayashi M., Takahashi H., Tamura K., Huang J., Yu L.H., Kawai-Yamada M., Tezuka T., Uchimiya H.; Enhanced dihydroflavonol-4-reductase activity and NAD homeostasis leading to cell death tolerance in transgenic rice; 2005; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 102 (19), pp. 7020-7025
- Hong C.Y., Chao Y.Y., Yang M.Y., Cheng S.Y., Cho S.C., Kao C.H.; NaCl-induced expression of glutathione reductase in roots of rice (*Oryza sativa L.*) seedlings is mediated through hydrogen peroxide but not abscisic acid; 2009; *Plant and Soil*; 320, pp. 103–115
- Hong C.Y., Chao Y.Y., Yang M.Y., Cho S.C., Kao C.H.; Na<sup>+</sup> but not Cl<sup>-</sup> or osmotic stress is involved in NaCl-induced expression of glutathione reductase in roots of rice seedlings; 2009b; *Journal of Plant Physiology*; 166, pp. 1598–1606
- Hong C.Y., Hsu Y.T., Tsai Y.-C., Kao C.H.; Expression of ASCORBATE PEROXIDASE 8 in roots of rice (*Oryza sativa L.*) seedlings in response to NaCl; 2007; *Journal of Experimental Botany*; 58 (12), pp. 3273–3283
- Hong Z., Lakkineni K., Zhang Z., Verma D.P.S.; Removal of feedback inhibition of pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress; 2000; *Plant Physiology*; 122, pp. 1129–1136
- Horie T., Costa A., Kim T.H., Han M.J., Horie R., Leung H.Y., Miyao A., Hirochika H., An G., Schroeder J.I.; Rice OsHKT2;1 transporter mediates large Na<sup>+</sup> influx component into K<sup>+</sup>-starved roots for growth; 2007; *EMBO Journal*; 26, pp. 3003–3014
- Horie T., Hauser F., Schroeder J.I.; HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in *Arabidopsis* and monocot crop plants; 2009; *Trends in Plant Science*; 14, pp. 660–668
- Horie T., Kaneko T., Sugimoto G., Sasano S., Panda S.K., Shibasaka M., Katsuhara M.; Mechanisms of water transport mediated by PIP aquaporins and their regulation via phosphorylation events under salinity stress in barley roots; 2011b; *Plant and Cell Physiology*; 52, pp. 663–675
- Horie T., Karahara I., Katsuhara M.; Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: An overview with the central focus on rice plants; 2012; *Rice*; 5 (11), pp 1-18
- Horie T., Sugawara M., Okada T., Taira K., Kaothien-Nakayama P., Katsuhara M., Shinmyo A., Nakayama H.; Rice sodium-insensitive potassium transporter, OsHAK5, confers increased salt tolerance in tobacco BY2 cells; 2011; *Journal of Bioscience and Bioengineering*; 111, pp. 346–356
- Hu H., Dai M., Yao J., Xiao B., Li X., Zhang Q., Xiong L.; Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice; 2006; *PNAS*; 103, pp. 12987–12992
- Huang T.-C., Teng C.-S., Chang J.-L., Chuang H.-S., Ho C.-T., Wu M.-L.; Biosynthetic mechanism of 2-acetyl-1-pyrroline and its relationship with  $\delta$ 1-pyrroline-5-carboxylic acid and methylglyoxal in aromatic rice (*Oryza sativa L.*) callus; 2008; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 56 (16), pp. 7399–7404

- Hur J., Jung K.H., Lee C.H., An G.; Stress-inducible OsP5CS2 gene is essential for salt and cold tolerance in rice; 2004; *Plant Science*; 167, pp. 417–426
- Ichimura K.; Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: A new nomenclature; 2002; *Trends in Plant Science*; 7 (7), pp. 301-308
- International Rice Genome Sequencing Project; The map-based sequence of the rice genome; 2005; *Nature*; 436 (7052), pp. 793-800
- James R.A., Rivelli A.R., Munns R., von Caemmerer S.; Factors affecting CO<sub>2</sub> assimilation, leaf injury and growth in salt-stressed durum wheat; 2002; *Functional Plant Biology*; 29, pp. 1393–1403
- Jeong D.H., Green P.J.; The Role of Rice microRNAs in Abiotic Stress Responses; 2013; *Journal of Plant Biology*; 56, pp. 187-197
- Jeong M.J., Lee S.K., Kim B.G., Kwon T.R., Cho W.S., Park Y.T., Lee J.O., Kwon H.B., Byun M.O., Park S.C.; A rice (*Oryza sativa* L.) MAP kinase gene, OsMAPK44, is involved in response to abiotic stress; 2006; *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*; 85, pp. 151-160
- Ji H., Pardo J.M., Batelli G., Van Oosten M.J., Bressan R.A., Li X.; The salt overly sensitive (SOS) pathway: Established and emerging roles; 2013; *Molecular Plant*; 6 (2), pp. 275-286
- Jiang M., Zhang J.; Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings; 2002; *Planta*; 215, pp. 1022–1030
- Jiang X., Leidi E.O., Pardo J.M.; How do vacuolar NHX exchangers function in plant salt tolerance?; 2010; *Plant Signalling & Behavior*; 5 (7), 792-795
- Johansson I., Karlsson M., Shukla V.K., Chrispeels M.J., Larsson C., Kjellbom P.; Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation; 1998; *Plant Cell*; 10, pp. 451–459
- Kader M.A., Lindberg S., Seidel T., Gollmack D., Yemelyanov V.; Sodium sensing induces different changes in free cytosolic calcium concentration and pH in salt-tolerant and -sensitive rice (*Oryza sativa*) cultivars; 2007; *Physiologia Plantarum*; 130, pp. 99–111
- Kader M.A., Lindberg S.; Uptake of sodium in protoplasts of salt-sensitive and salt tolerant cultivars of rice, *Oryza sativa* L. determined by the fluorescent dye SBFI; 2005; *Journal of Experimental Botany*; 56, pp. 3149–3158
- Kader Md.A., Seidel T., Gollmack D., Lindberg S.; Expressions of OsHKT1, OsHKT2, and OsVHA are differentially regulated under NaCl stress in salt-sensitive and salt-tolerant rice (*Oryza sativa* L.) cultivars; 2006; *Journal of Experimental Botany*; 57 (15), pp. 4257-4268
- Kaminaka H., Morita S., Tokumoto M., Yokoyama H., Masumura T., Tanaka K.; Molecular cloning and characterization of a cDNA for an iron-superoxide dismutase in rice (*Oryza sativa* L.); 1999; *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*; 63, pp. 302–308
- Kaminaka H., Morita S., Yokoi H., Masumura T., Tanaka K.; Molecular cloning and characterization of a cDNA for plastidic copper/zinc-superoxide dismutase in rice (*Oryza sativa* L.); 1997; *Plant and Cell Physiology*; 38, pp 65–69
- Kellogg E.A.; Evolutionary history of grasses; 2001; *Plant Physiology*; 125, pp. 1198-1205
- Kim D.-W., Shibato J., Agrawal G.K., Fujihara S., Iwahashi H., Kim D.H., Shim I.-S., Rakwal R.; Gene transcription in the leaves of rice undergoing salt-induced morphological changes (*Oryza sativa* L.); 2007; *Molecules and Cells*; 24 (1), pp. 45-59
- Kishitani S., Takanami T., Suzuki M., Oikawa M., Yokoi S., Ishitani M., Alvarez-Nakase A.M., Takabe T., Takabe T.; Compatibility of glycinebetaine in rice plants: Evaluation using transgenic rice plants with a gene for peroxisomal betaine aldehyde dehydrogenase from barley; 2000; *Plant, Cell and Environment*; 23 (1), pp. 107-114
- Kobayashi Y., Yamamoto S., Minami H., Kagaya Y., Hattori T.; Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid; 2004; *Plant Cell*; 16 (5), pp. 1163-1177
- Kolukisaoglu U., Weini S., Blazevic D., Batistic O., Kudla J.; Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the Arabidopsis and rice CBL-CIPK signalling networks; 2004; *Plant Physiology*; 134, pp. 43–58
- Kong-ngern K., Bunnag S., Theerakulpisut P.; Proline, hydrogen peroxide, membrane stability and antioxidant enzyme activity as potential indicators for salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.); 2012; *International Journal of botany*; 8 (2), pp. 54-65

- Krasensky J., Jonak C.; Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks; 2012; *Journal of Experimental Botany*; 63 (4), pp. 1593-1608
- Krishnamurthy P., Ranathunge K., Franke R., Prakash H.S., Schreiber L., Mathew M.K.; The role of root apoplastic transport barriers in salt tolerance of rice (*Oryza sativa* L.); 2009; *Planta*; 230, pp. 119–134
- Kruszka K., Pieczynski M., Windels D., Bielewicz D., Jarmolowski A., Szweykowska-Kulinska Z., Vazquez F.; Role of microRNAs and other sRNAs of plants in their changing environments; 2012; *Journal of Plant Physiology*; 169 (16), pp. 1664-1672
- Kumar V., Shriram V., Kishor P.B.K., Jawali N., Shitole M.G.; Enhanced proline accumulation and salt stress tolerance of transgenic indica rice by over-expressing *P5CSF129A* gene; 2010; *Plant Biotechnology Reports*; 4, pp. 37–48
- Kumari A., Jewaria P.K., Bergmann D.C., Kakimoto T.; Arabidopsis reduces growth under osmotic stress by decreasing SPEECHLESS protein; 2014; *Plant and Cell Physiology*; 55 (12), pp. 2037-2046
- Lata C., Yadav A., Prasad M.; Role of Plant Transcription Factors in Abiotic Stress Tolerance; Chapter 10 of *Abiotic Stress Response in Plants - Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives*"; edited by A. Shanker and B. Venkateswarlu; 2011
- Läuchli A.; Salt exclusion: an adaptation of legumes for crops and pastures under saline conditions; 1984; In: *Salinity Tolerance in Plants: Strategies for Crop Improvement*; ed. RC Staples, New York; Wiley; pp. 171–187
- Lee K.S.; Variability and genetics of salt tolerance in japonica rice (*Oryza sativa* L.); 1995; PhD thesis, University of Philippines Los Baiios, Laguna, Philippines
- Lee M.H., Cho E.J., Wi S.G., Bae H., Kim J.E., Cho J.Y., Lee S., Kim J.H., Chung B.Y.; Divergences in morphological changes and antioxidant responses in salt-tolerant and salt-sensitive rice seedlings after salt stress; 2013; *Plant Physiology and Biochemistry*; 70, pp. 325-335
- Lee S., Hirt H., Lee Y.; Phosphatidic acid activates a wound-activated MAPK in *Glycine max*; 2001; *Plant Journal*; 26, pp. 479–486
- Lewitt J.; Responses of plant to environmental stresses; Vol. II. water, radiation, salt and other stresses; 1980; Lewitt J. (Ed), Academic Press; New York; 1: 606
- Li J., Kinoshita T., Pandey S., Ng C.K., Gygi S.P., Shimazaki K.-I., Assmann S.M.; Modulation of an RNA-binding protein by abscisic-acid-activated protein kinase; 2002; *Nature*; 418 (6899), pp. 793-797
- Lin C.C., Hsu Y.T., Kao C.H.; The effect of NaCl on proline accumulation in rice leaves; 2002; *Plant Growth Regulation*; 36, pp. 275–285
- Lin C.C., Kao C.H.; Osmotic stress-induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings; 2002; *Plant Growth Regulation*; 37, pp. 177–183
- Lin Z., Griyth M.E., Li X., Zhu Z., Tan L., Fu Y, Zhang W., Wang X., Xie D., Sun C.; Origin of seed shattering in rice (*Oryza sativa* L.); 2007; *Planta*; 226, pp. 11–20
- Liu J.G., Zhang Z., Qin Q.L., Peng R.H., Xiong A.S., Chen J.M., Xu F., Zhu H., Yao Q.H.; Isolated and characterization of a cDNA encoding ethylene-responsive element binding protein (EREBP)/AP2-type protein, RCBF2, in *Oryza sativa* L.; 2007; *Biotechnology Letters*; 29, pp. 165–173
- Lorenz M.C., Heitman J.; The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*; 1998; *EMBO Journal*; 17, pp. 1236-1247
- Lutts S., Majerus V., Kinet J.M.; NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings; 1999; *Physiologia plantarum*; 105, pp. 450–458
- Maas E.V., Grattan S.R.; Crop yields as affected by salinity; 1999; In: Skaggs R.W., van Shilfgaarde J.; eds. *Agricultural Drainage; Agronomy monography*; 38; ASA, CSSA, SSA; Madison, WI; pp. 55-108
- Maathuis F.J.M., Ahmad I., Patishtan J.; Regulation of Na<sup>+</sup> fluxes in plants; 2014; *Frontiers in Plant Science*; 5, Article 467, pp. 1-9
- Maathuis F.J.M., Amtmann A.; K<sup>+</sup> nutrition and Na<sup>+</sup> toxicity: the basis of cellular K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ratios; 1999; *Annals of Botany*; 84, pp. 123–133

- Maathuis F.J.M., Sanders D.; Sodium uptake in *Arabidopsis thaliana* roots is regulated by cyclic nucleotides; 2001; *Plant Physiology*; 127, pp. 1617–1625
- Maathuis F.J.M.; Sodium in plants: perception, signalling, and regulation of sodium fluxes; 2013; *Journal of Experimental Botany*; 65 (3), pp. 849–858
- Macovei A., Gill S.S., Tuteja N.; microRNAs as promising tools for improving stress tolerance in rice; 2012; *Plant signalling & behavior*; 7 (10), pp. 1296–1301
- Mäkelä P., Munns R., Colmer T.D., Peltonen-Sainio P.; Growth of tomato and its ABA-deficient mutant (sitien) under saline conditions; 2003; *Physiologia Plantarum*; 117, pp. 58–63
- Malberti G.; Continuazione dell'esperienza del riso secco della Cina; 1829; *Calendario Georgico*
- Malinverni A.; Il riso vercellese alla esposizione di Vienna; 1872 Torino
- Mangrauthia S.K., Agarwal S., Sailaja B., Madhav M.S., Voleti S.R.; MicroRNAs and their role in salt stress response in plants; 2013; *Salt Stress in Plants*; Chapter 2, pp. 15–46
- Maratelli A.; Maratelli: un uomo, un riso; 2003; Grafica Santhianese; Santhià (VC)
- Mäser P., Eckelman B., Vaidyanathan R., Horie T., Fairbairn D.J., Kubo M., Yamagami M., Yamaguchi M., Nishimura M., Uozumi N., Robertson W., Sussman M.R., Schroeder J.I.; Altered shoot/root Na<sup>+</sup> distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na<sup>+</sup> transporter AtHKT1; 2002; *FEBS Letters* 531, pp. 157–161
- Matsukura S., Mizoi J., Yoshida T., Todaka D., Ito Y., Maruyama K., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.; Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes; 2010; *Molecular Genetics and Genomics*; 283, pp. 185–196
- Mehta S.K., Gaur J.P.; Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*; 1999; *New Phytologist*; 143, pp. 253–259
- Mian A., Oomen R.J.F.J., Isayenkov S., Sentenac H., Maathuis F.J.M., Véry A.A.; Over-expression of a Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>-permeable HKT transporter in barley improves salt tolerance; 2011; *The Plant Journal*; 63, pp.468–479
- Miller G., Honig A., Stein H., Suzuki N., Mittler R., Zilberstein A.; Unraveling delta1-pyrroline-5-carboxylateproline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes; 2009; *The Journal of Biological Chemistry*; 284, pp. 26482–26492
- Mittler R.; Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance; 2002; *Trends in Plant Science*; 7 (9), pp. 405–410
- Mohanty A., Kathuria H., Ferjani A., Sakamoto A., Mohanty P., Murata N., Tyagi A.K.; Transgenics of an elite indica rice variety Pusa Basmati 1 harbouring the coda gene are highly tolerant to salt stress; 2002; *Theoretical and Applied Genetics*; 106 (1), pp. 51–57
- Molina J., Sikora M.; Molecular evidence for a single evolutionary origin of domesticated rice; 2011; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 108(20), pp. 8351–8356
- Motta E.; La storia della coltura del riso in Lombardia; 1913; *Giornale di Riscoltura*
- Munns R., James R.A.; Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid wheat; 2003; *Plant Soil*; 253, pp. 201–218
- Munns R., Passioura J.B., Guo J., Ehazen O., Cramer G.R.; Water relations and leaf expansion: Importance of timing; 2000; *Journal of Experimental Botany*; 51, pp. 1495–1504
- Munns R., Tester M.; Mechanisms of salinity tolerance; 2008; *Annual Review of Plant Biology*; 59, pp. 651–681
- Munns R.; Genes and salt tolerance: bringing them together; 2005; *New Phytologist*; 167; pp. 645–663
- Murashige T., Skoog F.; A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures; 1962; *Physiologia Plantarum*; 15, pp. 473–497
- Murata K., Mitsuoka K., Hirai T., Walz T., Agre P., Heymann J.B., Engel A., Fujiyoshi Y.; Structural determinants of water permeation through aquaporin-1; 2000; *Nature*; 407, pp. 599–605
- Nagae M., Nozawa A., Koizumi N., Sano H., Hashimoto H., Sato M., Shimizu T.; The crystal structure of the novel calcium-binding protein AtCBL2 from *Arabidopsis thaliana*; 2003; *Journal of Biological Chemistry*; 278, pp. 42240–42246

- Nagaraj Kumar M., Jane W.-N., Verslues P.E.; Role of the putative osmosensor Arabidopsis histidine kinase1 in dehydration avoidance and low-water-potential response; 2013; *Plant Physiology*; 161, pp. 942–953
- Nakashima K., Tran L.S., Van Nguyen D., Fujita M., Maruyama K., Todaka D., Ito Y., Hayashi N., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.; Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice; 2007; *The Plant Journal*; 51, pp. 617–630
- Negrão S., Courtois B., Ahmadi N., Abreu I., Saibo N., Oliveira M.M.; Recent updates on salinity stress in rice: From physiological to molecular responses; 2011; *Critical Reviews in Plant Sciences*; 30 (4), pp. 329-377
- Ning J., Xianghua L., Hicks L.M., Xiong L.; A Raf-like MAPKKK gene DSM1 mediates drought resistance through reactive oxygen species scavenging in rice; 2010; *Plant Physiology*; 152, pp., 876-890
- Noctor G., Foyer C.H.; Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control; 1998; *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*; 49, pp.249–279
- Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., Y. Han, J. Neukermans, B. Marquez-Garcia, Queval G., Foyer C.H.; Glutathione in plants: An integrated overview; 2012; *Plant, Cell and Environment*; 35 (2), pp. 454-484
- Nounjan N., Nghia P.T., Theerakulpisut P.; Exogenous proline and trehalose promote recovery of rice seedlings from salt-stress and differentially modulate antioxidant enzymes and expression of related genes; 2012; *Journal of Plant Physiology*; 169 (6), pp. 596-604
- Nunch M.; Des Petrus de Crescentiis, Buch ueber die Landshaft und seine Illustrationen; 1910; *Zeitschrift fuer Buchfreunde*; 9
- O'Brien J.A., Daudi A., Butt V.S., Bolwell G.P.; Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism; 2012; *Planta*; 236 (3), pp. 765-779
- Örvar B.L., Ellis B.E.; Transgenic tobacco plants expressing antisense RNA for cytosolic ascorbate peroxidase show increased susceptibility to ozone injury; 1997; *Plant Journal*; 11 (6), pp. 1297-1305
- Osakabe Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Tran L.-S.P.; Sensing the environment: Key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress; 2013; *Journal of Experimental Botany*; 64 (2), pp. 445-458
- Osorio J., Osorio M. L., Chaves M.M., Pereira, J.S.; Water deficits are more important in delaying growth than in changing patterns of carbon allocation in *Eucalyptus globules*; 1998; *Tree Physiology*; 18, pp. 363–373
- Ouyang S.Q., He S.J., Liu P., Zhang W., Zhang J.S., Chen S.Y.; The role of tocopherol cyclase in salt stress tolerance of rice (*Oryza sativa L.*); 2011; *Science China, Life Science*; 54 (2), pp. 181–188
- Paine J.A., Shipton C.A., Chaggar S., Howells R.M., Kennedy M.J., Vernon G., Wright S.Y., Hinchliffe E., Adams J.L., Silverstone A.L., Drake R.; Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content; 2005; *Nature Biotechnology*; 23 (4), pp. 482-487
- Phean-o-Pas S., Punteeranurak P., Buaboocha T.; Calcium signalling-mediated and differential induction of calmodulin gene expression by stress in *Oryza sativa L.*; 2005; *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*; 38 (4), pp. 432-439
- Piacco R.; Le razze di riso cultivate in Italia; 1954; *Quaderni della stazione sperimentale di risicoltura*; 38
- Pilon M., Ravet K., Tapken W.; The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases; 2011; *Biochimica et Biophysica Acta*; 1807, pp. 989–998
- Pujni D., Chaudhary A., Rajam M.V.; Increased tolerance to salinity and drought in transgenic indica rice by mannitol accumulation; 2007; *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*; 16 (1), pp. 1-7
- Quintero F.J., Martinez-Atienza J., Villalta I., Jiang X., Kim W.-Y., Ali Z., Fujii H., Mendoza I., Yun D.-J., Zhu J.-K., Pardo J.M.; Activation of the plasma membrane Na/H antiporter Salt-Overly-Sensitive 1 (SOS1) by phosphorylation of an auto-inhibitory C-terminal domain; 2011; *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*; 108, pp. 2611–2616



- Raven J.A.; Regulation of pH and generation of osmolarity in vascular plants: A cost-benefit analysis in relation to efficiency of use of energy, nitrogen and water; 1985; *New Phytologist*; 101, pp. 25–77
- Re F.; *Il riso* Chinese; in: *Calendario reale georgico ossia almanacco d'agricoltura*, Torino, 1826
- Ren Z.-H., Gao J.-P., Li L.-G., Cai X.-L., Huang W., Chao D.-Y., Zhu M.-Z., Z.-Y. Wang, Luan S., Lin H.-X.; A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter; 2005; *Nature Genetics*; 37, pp. 1141–1146
- Renuka Devi P.S., Sabu A., Sheeja T.E., Nambisan P.; Proline Accumulation and Salt Tolerance in Rice; 1997; *Biotechnological Applications of Plant Tissue and Cell Culture*; book, pp. 410-414
- Riechmann J.L., Heard J., Martin G., Reuber L., Jiang C., Keddie J., Adam L., Pineda O., Ratcliffe O.J., Samaha R.R., Creelman R., Pilgrim M., Broun P., Zhang J.Z., Ghandehari D., Sherman B.K., Yu G.; *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes; 2000; *Science*; 290, pp. 2105–2110
- Roy D., Bhunia A., Basu N., Banerjee S.K.; Effect of NaCl-salinity on metabolism of proline in salt-sensitive and salt-resistant cultivars of rice; 1992; *Biologia Plantarum*; 34 (1-2), pp. 159-162
- Rozkowicz A., Picco A.M., Rodolfi M., Pinamonti S., Forlani G.; Differential responses in vitro of rice cultivars to Italian lineages of the blast pathogen *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. 1. Oxidative burst; 2003; *Journal of Plant Physiology*; 160 (9), pp. 1033-1040
- Ruiz J.M., Blumwald E.; Salinity-induced glutathione synthesis in *Brassica napus*; 2002; *Planta*; 214, pp. 965-969
- Sahi C., Singh A., Kumar K., Blumwald E., Grover A.; Salt stress response in rice: Genetics, molecular biology, and comparative genomics; 2006; *Functional and Integrative Genomics*; 6 (4), pp. 263-284
- Sakamoto A., Nosaka Y., Tanaka K.; Cloning and sequencing analysis of a complementary DNA for manganese-superoxide dismutase from rice (*Oryza sativa* L.); 1993; *Plant Physiology*; 103, pp. 1477–1478
- Sakamoto A., Okumura T., Kaminaka H., Sumi K., Tanaka K.; Structure and differential response to abscisic acid of two promoters for the cytosolic copper/zinc-superoxide dismutase genes, *SodCc1* and *SodCc2*, in rice protoplasts; 1995; *FEBS Letters*; 358, pp. 62–66
- Sanchez-Barrena M.J., Martinez-Ripoll M., Zhu J.K., Albert A.; The structure of the *Arabidopsis thaliana* SOS3: molecular mechanism of sensing calcium for salt stress response; 2005; *Journal of Molecular Biology*; 345, pp. 1253–1264
- Saslis-Lagoudakis C.H., Moray C., Bromham L.; Evolution of salt tolerance in angiosperms: a phylogenetic approach; 2014; In: Rajakaruna N., Boyd R.S., Harris T.B.; eds. *Plant ecology and evolution in harsh environments*; Hauppauge, NY, USA: Nova Science Publishers; pp. 77–95
- Schmidt R., Mieulet D., Hubberten H.-M., Obata T., Hoefgen R., Fernie A.R., Fisahn J., San Segundo B., Guiderdoni E., Schippers J.H.M., Mueller-Roebera B.; SALT-RESPONSIVE ERF1 regulates reactive oxygen species-dependent signalling during the initial response to salt stress in rice; 2013; *Plant Cell*; 25 (6), pp. 2115-2131
- Shi H., Xiong L., Stevenson B., Lu T., Zhu J.K.; The *Arabidopsis* salt overly sensitive 4 mutants uncover a critical role for vitamin B6 in plant salt tolerance; 2002; *Plant Cell*; 14, pp. 575-588
- Shin Kim Y., Han S.; Nitric oxide protects Cu,Zn-superoxide dismutase from hydrogen peroxide-induced inactivation; 2000; *FEBS Letters*; 479 (1–2), pp. 25–28
- Shirasawa K., Takabe T., Takabe T., Kishitani S.; Accumulation of glycinebetaine in rice plants that overexpress choline monooxygenase from spinach and evaluation of their tolerance to abiotic stress; 2006; *Annals of Botany*; 98 (3), pp. 565-571
- Shukla V., Mattoo A.K.; Sucrose non-fermenting 1-related protein kinase 2 (SnRK2): A family of protein kinases involved in hyperosmotic stress signalling; 2008; *Physiology and Molecular Biology of Plants*; 14 (1-2), pp. 91-100
- Sickler C.M., Edwards G.E., Kiirats O., Gao Z., Loescher W.; Response of mannitol-producing *Arabidopsis thaliana* to abiotic stress; 2007; *Functional Plant Biology*; 34, pp. 382–391
- Signorelli S., Coitiño E.L., Borsani O., Monza J.; Molecular mechanisms for the reaction between •OH radicals and proline: Insights on the role as reactive oxygen species scavenger in plant stress; 2014; *Journal of Physical Chemistry B*; 118 (1), pp. 37-47

- Singh K.B., Foley R.C., Onate-Sanchez L.; Transcription factors in plant defense and stress response; 2002; *Current Opinion in Plant Biology*; 5, pp. 430–436
- Singh R.K., Flowers T.J.; The physiology and molecular biology of the effects of salinity on rice. In Third Edition of "Handbook of Plant and Crop Stress"; 2010; edited by M. Pessarakli. Publisher: Taylor and Francis, Florida, USA; pp 899-939
- Somboonwattanakul I., Dorling S., Leung S., McManus M.T.; Proline biosynthetic gene expression in tissue cultures of rice (*Oryza sativa* L.) in response to saline treatment; 2010; *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*; 103, pp. 369–376
- Storey R., Walker R.R.; Citrus and salinity; 1999; *Scientia Horticulturae*; 78, pp. 39–81
- Sümer A., Zörb C., Yan F., Schubert S.; Evidence of sodium toxicity for the vegetative growth of Maize (*Zea mays* L.) during the first phase of salt stress; 2004; *Journal of Applied Botany*; 78, pp. 135–139
- Sun S.J., Guo S.Q., Yang X., Bao Y.M., Tang H.J., Sun H., Huang J., Zhang H.S.; Functional analysis of a novel Cys2/His2-type zinc finger protein involved in salt tolerance in rice; 2010; *Journal of Experimental Botany*; 61, pp. 2807–2818
- Sunarpri, Horie T., Motoda J., Kubo M., Yang H., Yoda K., Horie R., Chan W.Y., Leung H.Y., Hattori K., Konomi M., Osumi M., Yamagami M., Schroeder J.I., Uozumi N.; Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na<sup>+</sup> unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells; 2005; *Plant Journal*; 44, pp. 928–938
- Szabados L., Savaure A.; Proline: a multifunctional amino acid; 2009; *Trends in Plant Science*; 15 (2), pp. 89-97
- Taiz L., Zeiger E.; *Fisiologia vegetale*, edito da Piccin; 2002; p. 612
- Taiz L.; Agriculture, plant physiology, and human population growth: past, present, and future; 2013; *Theoretical and Experimental Plant Physiology*; 25(3), pp. 167-181
- Tamura T., Hara K., Yamaguchi Y., Koizumi N., Sano H.; Osmotic stress tolerance of transgenic tobacco expressing a gene encoding a membrane located receptor-like protein from tobacco plants; 2003; *Plant Physiology*; 131, pp. 454–462
- Tan Y.F., O'Toole N., Taylor N.L., Harvey Millar A.I.; Divalent metal ions in plant mitochondria and their role in interactions with proteins and oxidative stress-induced damage to respiratory function; 2010; *Plant Physiology*; 152 (2), pp. 747-761
- Teige M., Scheikl E., Eulgem T., Dóczy R., Ichimura K., Shinozaki K., Dangl J.L., Hirt H.; The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signalling in Arabidopsis; 2004; *Molecular Cell*; 15, pp. 141–152
- Teixeira F.K., Menezes-Benzvente L., Galvão V.C., Margis R., Margis-Pinheiro M.; Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments; 2006; *Planta*; 224, pp. 300–314
- Teixeira F.K., Menezes-Benzvente L., Margis R., Margis-Pinheiro M.; Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: inferences from the rice genome; 2004; *Journal of Molecular Evolution*; 59, pp. 761–770
- Thruber C.S.; The evolutionary genetics of seed shattering and flowering time, two weed adaptive traits in US weedy rice; 2012; Ph.D. dissertation
- Trovato M., Mattioli R., Costantino P.; Multiple roles of proline in plant stress tolerance and development; 2008; *Rendiconti Lincei*; 19 pp. 325–346
- Tsai Y.C., Hong C.Y., Liu L.F., Kao C.H.; Relative importance of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> in NaCl-induced antioxidant systems in roots of rice seedlings; 2004; *Physiologia Plantarum*; 122, pp. 86–94
- Türkan I., Demiral T.; Recent developments in understanding salinity tolerance; 2009; *Environmental and Experimental Botany*; 67, pp. 2-9
- Udvardi M.K., Kakar K., Wandrey M., Montanri O., Murray J., Andraiankaja A., Zhang J.-Y., Benedito V., Hofer J.M.I., Cheng F., Town C.D.; Legume transcription factors: global regulators of plant development and response to the environment; 2007; *Plant Physiology*; 144, pp. 538-549
- Urao T., Yakubov B., Satoh R., Yamaguchi-Shinozaki K., Seki M., Hirayama T., Shinozaki K.; A transmembrane hybrid-type histidine kinase in Arabidopsis functions as an osmosensor; 1999; *Plant Cell*; 11, pp. 1743–1754

- Urzica E.I., Adler L.N., Page M.D., Linster C.L., Arbing M. A., Casero D., Pellegrini M., Merchant S.S., Merchant S.S., Clarke S.G.; Impact of oxidative stress on ascorbate biosynthesis in *Chlamydomonas* via regulation of the VTC2 gene encoding a GDP-L-galactose phosphorylase; 2012; *Journal of Biological Chemistry*; 287 (17), pp. 14234-14245
- Vaidyanathan H., Sivakumar P., Chakrabarty R., Thomas G.; Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.)- differential response in salt tolerant and sensitive varieties; 2003; *Plant Science*; 165, pp. 1411-1418
- Vaughan D.A., Lu B.-R., Tomooka N.; The evolving story of rice evolution; 2008; *Plant Science*; 174 (4), pp. 394-408
- Vaughan D.A., Morishima H., Kadowaki K.; Diversity in the *Oryza* genus; 2003; *Current Opinion in Plant Molecular Biology*; 6, pp. 139–146
- Verbruggen N., Villarreal R., Van Montagu M.; Osmoregulation of pyrroline-5-carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana*; *Plant Physiology*; 1993; 103, pp. 771–781
- Verslues P.E., Batelli G., Grillo S., Agius F., Kim Y.S., Zhu J., Agarwal M., Katiyar-Agarwal S., Zhu J.K.; Interaction of SOS2 with nucleoside diphosphate kinase 2 and catalases reveals a point of connection between salt stress and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signalling in *Arabidopsis thaliana*; 2007; *Molecular and Cellular Biology*; 27, pp. 7771–7780
- Voisin A., Reidy B., Parent B., Rolland G., Redondo E., Gerentes D., Tardieu F., Muller B.; Are ABA, ethylene or their interaction involved in the response of leaf growth to soil water deficit? An analysis using naturally occurring variation or genetic transformation of ABA production in maize; 2006; *Plant Cell and Environment*; 29, pp. 1829–1840
- Wang X., Hou C., Liu J., He W., Nan W., Gong H., Bi Y.; Hydrogen peroxide is involved in the regulation of rice (*Oryza sativa* L.) tolerance to salt stress; 2013; *Acta Physiologiae Plantarum*; 35 (3), pp 891-900
- Wang Z.-Y., Xiong L., Li W., Zhu J.-K., Zhu J.; The plant cuticle is required for osmotic stress regulation of abscisic acid biosynthesis and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*; 2011; *Plant Cell*; 23, pp. 1971–1984
- West K.P. Jr., Darnton-Hill I.; Vitamin A deficiency. in *Nutrition and health in developing countries*; 2001; eds. Semba, R.D. & Bloem, M.W.; pp. 267–306
- Willekens H., Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langebartels C., Van Montagu M., Inze D., Van Camp W.; Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C3 plants *EMBO Journal*; 16 (16), pp. 4806-4816
- Williams I., Frank L.; Improved chemical synthesis and enzymatic assay of delta-1-pyrroline-5-carboxylic acid; 1975; *Analytical Biochemistry*; 1975; 64, pp. 85-97
- Wohlbach D.J., Quirino B.F., Sussman M.R.; Analysis of the *Arabidopsis* histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation; 2008; *Plant Cell*; 20 (4), pp. 1101-1117
- Wu T.-M., Lin W.-R., Kao Y.-T., Hsu Y.-T., Yeh C.-H., C.-Y. Hong, Kao C.H.; Identification and characterization of a novel chloroplast/mitochondria co-localized glutathione reductase 3 involved in salt stress response in rice; 2013; *Plant Molecular Biology*; 83, pp. 379–390
- Xiong L., Yang Y.; Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase; 2003; *Plant Cell*; 15, pp. 745-759
- Xiong Y., Liu T., Tian C., Sun S., Li J., Chen M.; Transcription factors in rice: a genome-wide comparative analysis between monocots and eudicots; 2005; *Plant Molecular Biology* 59: 191-203
- Yamaguchi T., Aharon G.S., Sottosanto J.B., Blumwald E.; Vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter cation selectivity is regulated by calmodulin from within the vacuole in a Ca<sup>2+</sup> and pH-dependent manner; 2005; *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 102, pp. 16107–16112
- Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.; The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of rd22, a gene responsive to dehydration-stress in *Arabidopsis thaliana*; 1993; *Molecular and General Genetics* 238, pp. 17–25
- Yanhui C., Xiaoyuan Y., Kun H., Meihua L., Jigang L., Zhaofeng G., Zhiqiang L., Yunfei Z., Xiaoxiao W., Xiaoming Q., Yunping S., Xiaohui D., Jingchu L., Xing-Wang D., Zhangliang C., Hongya G., Li-Jia Q.; The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and

- phylogenetic comparison with the rice MYB family; 2006; *Plant Molecular Biology*; 60, pp. 107–124
- Yeo A.R., Lee K.S., Izard P., Boursier P.J., Flowers T.J.; Short- and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa L.*); 1991; *Journal of Experimental Botany*; 42, pp. 881–889
- Yu L., Nie J., Cao C., Jin Y., Yan M., Wang F., Liu J., Xiao Y., Liang Y., Zhang W.; Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana*; 2010; *New Phytologist*; 188, pp. 762–773
- Yuan F., Yang H., Xue Y., Kong D., Ye R., Li C., Zhang J., Theprungsirikul L., Shrift T., Krichilsky B., Johnson D. M., Swift G. B., He Y., Siedow J.N., Pei Z.-M.; OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca<sup>2+</sup> increases vital for osmosensing in *Arabidopsis*; 2014; *Nature*; 514 (7522), pp. 367–371
- Zhang B.H., Pan X.P., Wang Q.L., Cobb G.P., Anderson T.A.; Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis; 2005; *Cell Research*; 15, pp. 336–360
- Zhang Z., Yang X., Meng L., Liu F., Shen C., Yang W.; Enhanced amplification of GC-rich DNA with two organic reagents; 2009; *BioTechniques*; 47 (3), pp. 775–779
- Zhou Y., Lu D., Li C., Luo J., Zhu B., Zhu J., Shangguan Y., Wang Z., Sang T., Zhou B., Han B.; Genetic control of seed shattering in rice by the APETALA2 transcription factor shattering abortion1; 2012; *Plant Cell*; 24 (3), pp. 1034–1048
- Zhu B., Su J., Chang M., Verma D.P.S., Fan Y.L., Wu R.; Overexpression of a δ<sup>1</sup>-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water- and salt-stress in transgenic rice; 1998; *Plant Science*; 139, pp. 41–48
- Zhu J.K.; Regulation of ion homeostasis under salt stress; 2003; *Current Opinion in Plant Biology*, 6, pp. 441–445
- Zou M., Guan Y., Ren H., Zhang F., Chen F.; A bZIP transcription factor, OsABI5, is involved in rice fertility and stress tolerance; 2008; *Plant Molecular Biology*; 66, pp. 675–683

## 6. ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI

di MICHELE BERTAZZINI

anni 2011-2015

### *Articoli recensiti ISI:*

- 1) Forlani G.\*, **Bertazzini M.**, Giberti S., Wieczorek D., Kafarski P. and Lipok J. (2013) Sublethal detergent concentrations increase metabolism of recalcitrant polyphosphonates by the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **20**, 3263–3270.
- 2) Forlani G.\*, Berlicki Ł., Duò M., Dziędziola G., Giberti S., **Bertazzini M.** and Kafarski P. (2013) Synthesis and evaluation of effective inhibitors of plant  $\delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate reductase. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 6792–6798.
- 3) Demuner A.J., Barbosa L.C.A.\*, Mendes Miranda A.C., Carvalho Geraldo G., Moreira da Silva C., Giberti S., **Bertazzini M.** and Forlani G.\* (2013) The fungal phytotoxin alternariol 9-methyl ether and some of its synthetic analogues inhibit the photosynthetic electron transport chain. *J. Nat. Prod.* **76**, 2234–2245.
- 4) Forlani G.\*, **Bertazzini M.** and Giberti S. (2014) Differential accumulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid in elicited cells of two rice cultivars showing contrasting sensitivity to the blast pathogen. *Plant Biol.* **16**, 1127–1132.
- 5) Forlani G.\*, **Bertazzini M.**, Barillaro D. and Rippka R. (2015) Divergent properties and phylogeny of 5-*enol*-pyruvyl-shikimate-3-phosphate synthases from cyanobacteria: evidence supporting horizontal gene transfer in the *Nostocales*. *New Phytol.* **205**, 160–171.
- 6) Pereira U.A., Barbosa L.C.A.\*, Maltha C.R.A., Demuner A.J., Silva A.A., **Bertazzini M.** and Forlani G.\* (2015) The use of rubrolides as a model for the development of new lactones and their corresponding aza-analogue as potential herbicides. *Chem. Biodiv.*, in press.
- 7) Forlani G.\*, **Bertazzini M.**, Zarattini M., Funck D., Ruszkowski M.J. and Nocek B.P. – Functional properties and preliminary structural characterization of rice  $\delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate reductase. *Front. Plant Sci.*, manuscript in preparation.
- 8) Forlani G.\*, **Bertazzini M.**, Zarattini M. and Funck D. – Functional characterization and expression analysis of rice  $\delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase provide a deeper insight into its role in proline and arginine catabolism. *Front. Plant Sci.*, manuscript in preparation.
- 9) Forlani G., Makarova K., Ruszkowski M.J., **Bertazzini M.** and Nocek B.P.\* – Evolution of plant  $\delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate reductases from phylogenetic and structural perspectives. *Front. Plant Sci.*, manuscript in preparation.

### Comunicazioni a congressi

- 1) **Bertazzini M.** and Forlani G. (2011) Differential sensitivity of Italian rice cultivars to salt stress conditions. Atti del Congresso Congiunto AGI-SIBV-SIGA, Assisi, 6A-40.
- 2) Forlani G., Giberti S. and **Bertazzini M.** (2011) Purification and properties of *Malus domestica* carotenoid cleavage dioxygenase 4. Atti del Congresso Congiunto AGI-SIBV-SIGA, Assisi, 3A.11.
- 3) Giberti S., **Bertazzini M.** and Forlani G. (2011) Lipoxygenase activity in *Triticum durum*: differential properties of enzyme forms. Atti del Congresso Congiunto AGI-SIBV-SIGA, Assisi, 8.13.
- 4) **Bertazzini M.**, Lucchini G., Sacchi G.A. and Forlani G. (2012) Cation homeostasis in Italian rice cultivars showing differential tolerance to salt stress. Proceed. of the FESPB - EPSO Plant Biology Congress Freiburg 2012.
- 5) **Bertazzini M.**, Cagnano G. and Forlani G. (2012) Antioxidative response in Italian rice cultivars showing differential tolerance to salt stress. Atti del XII Congresso della Federazione It. di Scienze della Vita, Roma, P18.2, 114.
- 6) Forlani G., **Bertazzini M.** and Giberti S. (2012) Phenolic metabolism in durum wheat genotypes producing anthocyanin pigmented seeds. Atti del XII Congresso della Federazione It. di Scienze della Vita, Roma, P19.9, 119.
- 7) Giberti M., **Bertazzini G.** and Forlani G. (2012) Subcellular localization and hormone-regulated expression of durum wheat lipoxygenases. Atti del XII Congresso della Federazione It. di Scienze della Vita, Roma, P19.12, 120.
- 8) Milan D., **Bertazzini M.**, Giberti S. and Forlani G. (2012) Effects of amino acid analogues on plant metabolism:  $\beta$ -pyrazol-yl-L-alanine. Atti del XII Congresso della Federazione It. di Scienze della Vita, Roma, P19.19, 121.
- 9) **Bertazzini M.** and Forlani G. (2012) Natural variability in salt tolerance among Italian rice genotypes. Proceed. of the Int. Workshop on Crop Improvement in a Changing Environment. Venice, 1.5.
- 10) Forlani G., **Bertazzini M.** and Giberti S. (2012) ROS scavenging systems in Italian rice genotypes showing differential tolerance to salt stress. Proceed. of the Int. Workshop on Crop Improvement in a Changing Environment. Venice, 1.10.
- 11) **Bertazzini M.** and Forlani G. (2012) Phenylalanine-ammonia lyase expression in rice genotypes showing differential tolerance to *Magnaporthe oryzae*. Proceed. of the Int. Workshop on Crop Improvement in a Changing Environment. Venice, 1.12.
- 12) **Bertazzini M.** and Forlani G. (2013) Uncovering the role of glutathione in the antioxidative defense response to salt stress in rice. Atti del V Congresso della Società Italiana di Biologia Vegetale, Foggia, PII-20, 36.
- 13) **Bertazzini M.**, Giberti S., Funck D. and Forlani G. (2014) Salts modulate  $\delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate metabolism in rice. Atti del XIII Congresso della Federazione Ital. di Scienze della Vita, Pisa, P19.3, 97.
- 14) **Bertazzini M.**, Nansi Tchappnda R., Zarattini M. and Forlani G. (2014) Proline metabolism in salt-shocked versus salt-adapted rice seedlings. Atti del XIII Congresso della Federazione Ital. di Scienze della Vita, Pisa, P19.14, 99.
- 15) Petrollino D., Nansi Tchappnda R., **Bertazzini M.** and Forlani G. (2014) Redox status of the pyridine nucleotide pools and proline synthesis in tobacco. Atti del XIII Congresso della Federazione Ital. di Scienze della Vita, Pisa, P19.28, 102.
- 16) Sardella A., **Bertazzini M.**, Marieschi M., Zanni C., Forlani G. and Torelli A. (2014) Different FeSOD levels are associated with different Cr(VI) tolerance in two strains of *Scenedesmus acutus*. Annual meeting of the Italian Phycological Group (SBI) in conjunction with the Annual General Meeting of the Federation of European Phycological Society (FEPS). Padova, 14-15 Novembre 2014. p. 31.