



Università Campus Bio-Medico di Roma

Corso di dottorato di ricerca in
Bioingegneria e Bioscienze
Scienze e Tecnologie degli Alimenti e della Nutrizione

XXIX ciclo a.a. 2013-2014

**Studio dei meccanismi coinvolti nello *scavenging* delle ROS in
due varietà di riso (*Oryza sativa* ssp. *japonica*) con diversa
sensibilità allo stress salino**

Maria Beatrice Ronci

Coordinatore
Prof. Giulio Iannello

Tutore
Dott.ssa Vittoria Locato

Cotutore
Prof.ssa Laura De Gara

04/05/2017

Maria Beatrice Ronci

Indice

| | |
|--|----|
| Abstract | I |
| 1. INTRODUZIONE | |
| 1.1 Il riso | |
| 1.1.1 Origini e domesticazione..... | 1 |
| 1.1.2 Morfologia e fisiologia..... | 4 |
| 1.1.3 L'importanza del riso nel mondo | 6 |
| 1.1.3.1 L'Italia, il suo ruolo nel mercato mondiale del riso e l'importanza della salvaguardia delle varietà | 8 |
| 1.1.3.2 Due cultivar di interesse: Vialone Nano e Baldo..... | 11 |
| 1.1.4 Lavorazione ed aspetti nutrizionali | 12 |
| 1.2 Stress abiotico: la salinizzazione | |
| 1.2.1 Introduzione: gli stress abiotici | 14 |
| 1.2.2 Suolo e salinizzazione | 14 |
| 1.2.2.1 Impatto socio-economico della salinizzazione | 16 |
| 1.2.2.2 Fisiologia dello stress salino..... | 17 |
| 1.2.2.2a Stress osmotico e stress ionico | 18 |
| 1.2.2.2b Strategie contro lo stress salino: esclusione e compartimentalizzazione degli ioni.. | 23 |
| 1.2.2.2c Glicofite: <i>Oryza sativa</i> | 27 |
| 1.3 Stress, specie reattive dell'ossigeno (ROS) e sistemi antiossidanti | |
| 1.3.1 Le specie reattive dell'ossigeno (ROS)..... | 29 |
| 1.3.1.1 Siti di produzione delle ROS..... | 31 |
| 1.3.2 Sistema di difesa dallo stress ossidativo | 35 |
| 1.3.2.1 Componenti non enzimatiche: ascorbato e glutazione | 35 |
| 1.3.2.2 Componenti enzimatiche..... | 37 |
| 1.4 Obiettivo tesi | 39 |
| 2. MATERIALI E METODI | |
| 2.1 Crescita delle plantule | 40 |
| 2.2 Colture cellulari: mezzo e condizione di crescita | 40 |
| 2.3 Vitalità e crescita cellulare | 41 |
| 2.4 Determinazione del H₂O₂ extra- ed intra- cellulare | 42 |
| 2.5 Determinazione del contenuto endogeno di ascorbato e glutazione | 43 |
| 2.5.1 Determinazione del contenuto di ascorbato: saggio colorimetrico | 43 |
| 2.5.2 Determinazione del contenuto di glutazione: saggio enzimatico..... | 44 |
| 2.6 Estrazione proteica e dosaggio con il metodo Bradford | 46 |
| 2.6.1 Saggio dell'attività enzimatica dell'ascorbato perossidasi (APX) totale e citosolica | 47 |
| 2.6.2 Saggio dell'attività enzimatica della deidroascorbato reductasi (DHAR)..... | 48 |
| 2.6.3 Saggio dell'attività enzimatica della monodeidroascorbato reductasi (MDHAR)..... | 48 |
| 2.6.4 Saggio dell'attività enzimatica della glutazione reductasi (GR) | 49 |
| 2.6.5 Saggio dell'attività enzimatica della catalasi (CAT)..... | 49 |
| 2.6.6 Saggio dell'attività enzimatica della superossido dismutasi (SOD) | 49 |
| 2.7 Estrazione dell'RNA totale mediante TRIzol e trattamento con DNasi | 49 |
| 2.7.1 Sintesi di cDNA..... | 51 |
| 2.7.2 Disegno dei primers e PCR semi quantitativa | 51 |
| 2.7.3 RT-PCR Sybr Green..... | 53 |

Indice

| | |
|---|-----------|
| 2.8 Determinazione dei livelli di Na⁺ e K⁺ in cellule di riso Vialone Nano e Baldo..... | 54 |
| 3. RISULTATI | |
| 3.1 Comparazione dei sistemi ROS <i>scavenging</i> in plantule di riso con diversa sensibilità allo stress salino | 55 |
| 3.2 Caratterizzazione di metaboliti redox in colture cellulari di riso | 59 |
| 3.3 Effetto dello stress salino su vitalità e sistemi redox in colture cellulari di riso Vialone Nano e Baldo..... | 62 |
| 3.3.1 Crescita e vitalità cellulare..... | 62 |
| 3.3.2 Livelli di H ₂ O ₂ extra-intra cellulare in colture di riso sottoposte a stress salino | 64 |
| 3.3.3 Ruolo dei sistemi ROS <i>scavenging</i> nella risposta allo stress salino in colture cellulari di riso | 66 |
| 3.4 Regolazione dell'espressione dei geni coinvolti nel ROS <i>scavenging</i> e <i>signalling</i> in colture cellulari di riso sottoposte a stress salino | 75 |
| 3.5 Effetto dello stress ossidativo indotto dal trattamento con glucosio/glucosio ossidasi in colture cellulari di riso Vialone Nano e Baldo..... | 78 |
| 3.6 Rapporto [K⁺]/[Na⁺] ed espressione genica dei canali ionici in colture cellulari di Vialone Nano e Baldo sottoposte a stress salino..... | 80 |
| 4. DISCUSSIONI E CONCLUSIONI..... | 82 |
| 5. BIBLIOGRAFIA | 88 |

Abstract

La salinizzazione dei suoli è un fenomeno in crescita che interessa sempre più i terreni agricoli, limitandone la produttività. L'Italia non è esente dal problema della salinizzazione e ad essere colpite sono diverse aree ed in particolare quelle comprese nelle regioni del nord della penisola in cui la coltivazione del riso, pianta altamente sensibile al sale, è tale da avere un peso importante nell'economia del Paese.

Durante lo stress di tipo salino c'è un aumento, oltre i livelli fisiologici, delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) che causano danni ubiquitari alle strutture e alle componenti cellulari. Le piante, per ristabilire l'equilibrio redox, producono metaboliti ed attivano enzimi di *scavenging* delle ROS. Le piante che producono, in maniera costitutiva o inducibile, maggiori livelli di molecole o enzimi di risposta alle ROS, hanno una maggiore tolleranza agli stress.

In questa tesi sono stati analizzati i principali sistemi di controllo REDOX (ascorbato e glutazione e *network* degli enzimi che collegano questi metaboliti) in plantule di due varietà di riso, molto coltivate nel nord Italia (Vialone Nano e Baldo), che hanno diversa resistenza allo stress salino. I risultati ottenuti mettono in evidenza come, anche in condizioni di crescita controllo, nelle piante della varietà Baldo (più resistente allo stress salino) alcuni enzimi del sistema ascorbato-glutazione siano sensibilmente potenziati rispetto alla varietà Vialone Nano più sensibile. Per approfondire le risposte di difesa delle due varietà, dai semi delle due cultivar sono state ottenute colture cellulari che, nella fase di più intensa crescita, sono state sottoposte a stress salino di diverse intensità (50-150 mM). I dati ottenuti sulle colture cellulari hanno confermato che la cultivar Baldo ha sistemi ROS-*scavenger* potenziati rispetto a Vialone Nano. Inoltre, alcuni geni coinvolti nelle risposte precoci di stress ossidativo (es. *APX1*) sono espressi più rapidamente in Baldo che in Vialone Nano. Un altro parametro per il quale le due varietà differiscono significativamente è l'efficienza nel mantenere elevati i livelli endogeni di K^+ e di ridurre quelli di Na^+ , attraverso un'espressione differenziata dei canali responsabili dei flussi di questi ioni.

Tesi di dottorato in Bioingegneria e Bioscienze, Scienze e Tecnologie degli Alimenti e della Nutrizione, di Maria Beatrice Ronci, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 04/05/2017.
La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte.

1. INTRODUZIONE

Maria Beatrice Ronci

1.1 Il riso

1.1.1 Origini e domesticazione

Il riso è tra gli alimenti quello maggiormente consumato dalla popolazione mondiale, rappresentando, quindi, una fonte di nutrimento per circa 3,5 miliardi di persone.

Per risalire alle origini del riso selvatico ci si deve collocare nella vasta area che si estende dall'India centrale fino alla Cina meridionale passando verso est lungo le rive del fiume Azzurro. Questa vasta area che include differenti zone che si sviluppano sia in regioni monsoniche che in regioni lungo valli e laghi, ha favorito, agli inizi dell'Olocene (seconda epoca del Quaternario) circa 10.000 anni fa, lo sviluppo di una vasta variabilità dei progenitori selvatici del riso, appartenenti alle specie *Oryza rufipogon* e *Oryza nivara* (Fig. 1.1). La specie *Oryza rufipogon*, pianta erbacea poliennale cresceva nelle paludi monsoniche ad acqua profonda. La specie *O. nivara*, annuale e autogama, cresceva lungo corsi d'acqua.

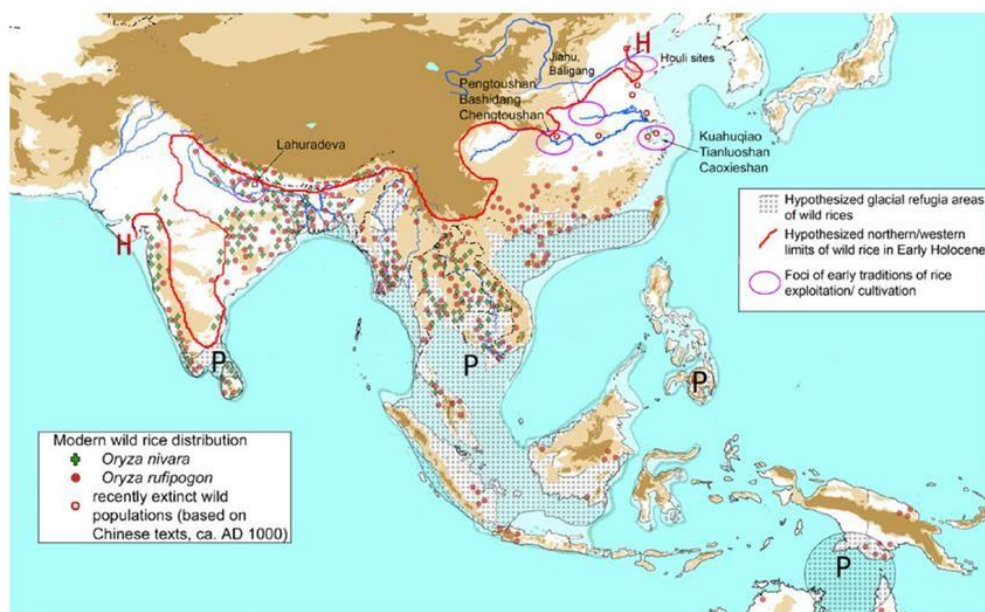


Fig. 1.1 Zone di origine del riso selvatico.

Nella mappa sono segnate con la "P" le zone dove si ipotizza la presenza di riso selvatico, durante l'ultima glaciazione. Con la lettera "H" il tratto d'insediamento del riso selvatico nel periodo del "Primo Olocene". Con i simboli verdi (croci) e rossi (circoli), invece, sono indicate le zone di distribuzione delle due specie selvatiche più moderne (Fuller, 2011).

1.1 Il riso

Dalla specie *O. rufipogon* ha avuto origine la sottospecie domesticata *O. sativa japonica*. La sottospecie *O. sativa indica*, invece, si pensa si sia originata dalla specie annuale *Oryza nivara* (Fuller, 2011).

Oltre alla zona che ricopre parte dell'India e della Cina, vi sono evidenze che dimostrano la presenza di progenitori selvatici del riso anche in Africa. A tal proposito si pensa che la specie *Oryza glaberrima* sia derivata dalla domesticazione del progenitore selvatico della specie *Oryza barthii* sviluppata lungo la piana alluvionale ai piedi del fiume Niger (Sweeney and Mc Couch, 2007).

Dopo l'ultima era glaciale, nell'epoca geologica dell'Olocene, si andò incontro a un cambiamento climatico. Questo cambiamento climatico costrinse le popolazioni ad organizzarsi e svilupparsi verso bacini idrici e a domesticare la vegetazione adattandola ai propri bisogni (Sweeney and Mc Couch, 2007).

La domesticazione, processo lungo e graduale, prevede l'intervento dell'uomo che seleziona le specie con le caratteristiche a lui più vantaggiose e, a seguito anche d'incroci, modifica alcune funzioni fisiologiche quali, ad esempio, sviluppo e riproduzione. Il riso ed altri cereali selvatici, appartenenti alla famiglia delle graminacee *Poaceae*, erano in grado di crescere in aree aperte ed ecologicamente difficili. I popoli che hanno iniziato a raccogliere e a cibarsi di queste graminacee hanno anche, probabilmente, contribuito alla dispersione dei semi nei pressi dei loro accampamenti. L'uomo, come già accennato sopra, ha quindi iniziato a selezionare particolari varietà genetiche facendo in modo di prediligere le specie più idonee alla raccolta, stoccaggio ed utilizzazione (Sweeney and Mc Couch, 2007).

La domesticazione del riso ha comportato dei cambiamenti fisiologici e morfologici quali la perdita della peluria lungo le auricole, la chiusura della pannocchia o infiorescenza, la perdita della dormienza a vantaggio di una germinazione più uniforme, la scomparsa della pigmentazione del pericarpo e della glumella.

Tutte queste caratteristiche acquisite con la pratica della domesticazione permettono di avere dei raccolti maggiormente controllabili da parte dell'uomo, sia nelle fasi di germinazione che di dispersione dei semi (Fig. 1.2).

1.1 Il riso

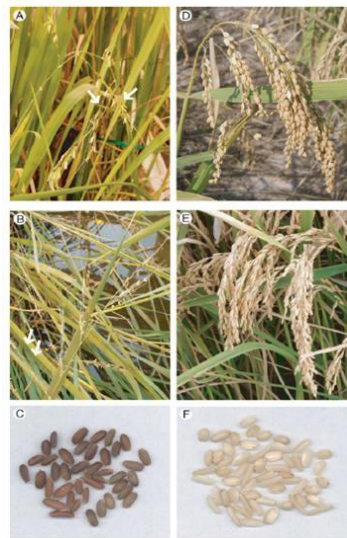


Fig. 1.2 Confronto tra il fenotipo selvatico e domestico del riso.

Nei pannelli A e B sono mostrate, rispettivamente, le pannocchie immature e mature, aperte, scure e con peluria di *O. rufipogon*. Nei pannelli D e E le pannocchie caratteristiche della specie *O. sativa* spp. *japonica* e *indica*, rispettivamente, chiuse e di color paglierino. Nei pannelli C e F i semi decorticati di *O. rufipogon* e *O. sativa* (Sweeney and Mc Couch, 2007).

Nel secolo attuale si è ottenuto il sequenziamento, completo, di questa pianta dalle origini molto antiche. Il progetto di sequenziamento del genoma del riso, all'inizio, ha visto protagonisti gruppi provenienti da Cina, Giappone e Stati Uniti d'America. Nel 1997 con il "Rice Genome Research Program (RGP)" si è aggiunta la partecipazione anche della Corea del Sud e dell'Europa. Il sequenziamento completo, pur se avvenuto già tra il 2000 ed il 2002 grazie al contributo di Monsanto e Syngenta (colossi internazionali delle biotecnologie agricole), è stato pubblicato nel 2006 dall'*International Rice Genome Sequencing* (<http://www.genoscope.cns.fr>).

Il vantaggio di sequenziare il genoma del riso è derivato non solo dal fatto che esso è relativamente piccolo (genoma diploide di 500 Mb ($n=12$)) rispetto a quello di cereali come mais e grano che hanno un genoma rispettivamente di 5 e 40 volte più grande (<http://plants.ensembl.org>). Il vantaggio è dovuto anche al fatto che, confrontando il genoma del riso con quello degli altri cereali, è emersa una conservazione parziale o completa della posizione dei geni sui cromosomi, fenomeno detto sintenia. Questi due aspetti fanno del riso un organismo modello per le monocotiledoni nello stesso modo in cui *Arabidopsis* rappresenta un organismo modello per le dicotiledoni (<http://plants.ensembl.org>; <http://www.genoscope.cns.fr>; Jackson, 2016).

1.1 Il riso

1.1.2 Morfologia e fisiologia

Il riso, phylum *Magnoliophyta* (Angiosperme) divisione monocotiledoni, appartenente alla famiglia delle Graminacee *Poaceae*, è una pianta erbacea annuale semiacquatica le cui cariossidi, ricche in amido, vengono abbondantemente usate come fonte di nutrimento dalla popolazione mondiale.

Il ciclo produttivo del riso, dalla germinazione alla maturazione del seme, dura dai 3 ai 6 mesi e si può suddividere in tre fasi: crescita vegetativa, sviluppo e maturazione.

Quando si verificano le opportune condizioni ambientali, vale a dire: disponibilità di acqua e livelli di temperatura, umidità ed ossigenazione idonei, inizia la germinazione. In condizioni ottimali, circa 25-28 °C, il processo di germinazione può avvenire in pochi giorni. La prima struttura che emerge (in condizioni di aerobiosi) è la radichetta, che ha la funzione di ancoraggio e assorbimento di acqua, seguita dalla parte aerea della plantula che sviluppa inizialmente il coleoptile, una struttura che avvolge la prima foglia. Le prime fasi di sviluppo, dalla germinazione fino alla comparsa della terza foglia, sono a carico delle riserve presenti nell'endosperma della cariosside. La pianta non è ancora un organismo strettamente autotrofo ma utilizza le sostanze derivanti dalla digestione delle macromolecole di riserva presenti nella cariosside. Dopo queste fasi di germinazione ed emergenza, vi è la fase di accostamento in cui il culmo o fusto si accresce con un progressivo allungamento degli internodi intervallati dai nodi. Essendo il riso una pianta prevalentemente acquatica il culmo, nello strato corticale, è caratterizzato da un parenchima aerifero. La fase della crescita più intensa consiste nell'allungamento degli internodi ed è chiamata levata. Dai nodi, pieni e con un diametro maggiore, originano le foglie formate dalla guaina e dalla lamina che hanno, rispettivamente, funzione di sostegno e fotosintetica. L'ultima foglia è chiamata "bandiera" e presenta un rigonfiamento a livello della guaina dovuto alla presenza, al suo interno, dell'infiorescenza (fase di botticella). Dopo la spigatura si ha l'infiorescenza ormai visibile, detta pannocchia, e quindi la fecondazione. Il fiore del riso è protetto dalle glume e dalle glumelle, ha 6 stami che portano le antere che producono il polline e l'ovario con stimmi piumosi che raccolgono il polline. In seguito alla germinazione del polline i due nuclei spermatici raggiungono la cellula uovo e il nucleo dell'endosperma. La fecondazione della cellula uovo da parte di un nucleo spermatico dà inizio all'embriogenesi, mentre la fusione del secondo nucleo spermatico con il nucleo dell'endosperma formerà l'endosperma secondario, tessuto di riserva fondamentale per la germinazione della futura plantula. In seguito alla fecondazione l'ovulo subisce una serie di trasformazioni che determineranno la formazione della cariosside. Durante l'embriogenesi vi è un continuo flusso di nutrienti dalla pianta madre ai tessuti

1.1 Il riso

dell'ovulo con una sintesi di sostanza di riserva nell'endosperma della cariosside in via di sviluppo.

La fase di accumulo delle sostanze di riserva è seguita da quella di disidratazione

(http://www2.unibas.it/loveli/index.php?option=com_phocadownload&view=category&download=44:risotesto&id=1:didattica).

La cariosside può essere considerata un frutto-seme in quanto si genera come struttura unitaria dalla trasformazione dei tessuti dell'ovario e dell'ovulo che in altre angiosperme danno origine a due strutture distinte, rispettivamente il frutto e il seme. Osservando la sezione longitudinale della cariosside, si possono distinguere vari strati (Fig. 1.3). L'involucro esterno rigido e non utilizzato per l'alimentazione umana, che riveste la cariosside, è costituito dalle glumelle. Il pericarpo, sviluppato dall'ovario maturo, che comprende anche i tegumenti e gli involucri seminali, rappresenta la parte ricca in fibra, vitamine e minerali.

Durante la macinazione questi strati vengono separati dall'endosperma andando a costituire i sottoprodotti (crusca e farinaccio). L'aleurone è costituito da uno o più strati che circondano l'endosperma, formato da cellule ricche di proteine sotto forma di granuli, che durante la molitura passano nella crusca. L'endosperma costituisce la riserva energetica che utilizza l'embrione quando germina per produrre una nuova pianta, è costituito per gran parte da amido, ma contiene anche proteine e zuccheri. Il germe o embrione, situato nella parte dorsale e basale della cariosside, contiene gli organi della futura pianta (radichetta, piumetta e fusticino) ed è ricco di lipidi, vitamine liposolubili, sali minerali e proteine (Muthayya *et al.*, 2014; http://www2.unibas.it/loveli/index.php?option=com_phocadownload&view=category&download=44:risotesto&id=1:didattica).

1.1 Il riso

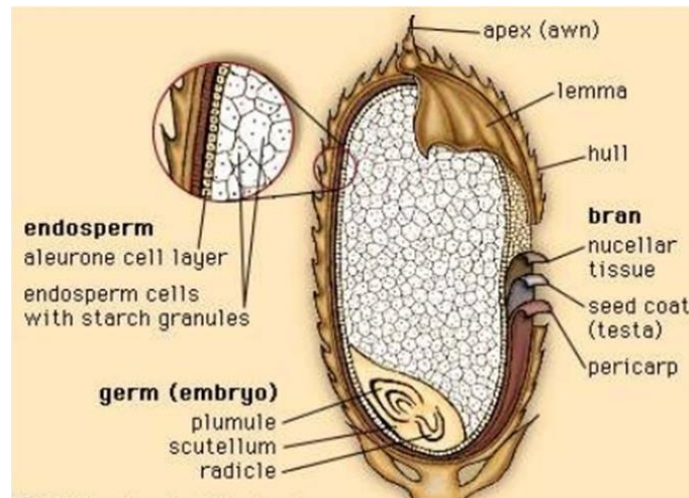


Fig. 1.3 Anatomia della cariosside di riso.

Si può osservare, partendo dall'esterno: la glumella (lemma); il pericarpio, composto da vari strati, ad alto contenuto di fibra; lo strato cellulare dell'aleurone, altamente proteico; l'endosperma, riserva energetica per l'embrione, composto da granuli di amido (<http://www.slideshare.net/parimitakhatri/structure-of-cereal-grains-and-legumes>).

1.1.3 L'importanza del riso nel mondo

Il riso, insieme a frumento e mais, rappresenta un alimento chiave per il sostegno del fabbisogno nutrizionale mondiale. Questo cereale è l'alimento base per 3,5 miliardi di persone nel mondo, quindi fornisce, ad oggi, nutrimento a circa il 50% della popolazione mondiale.

Un aumento della produttività nei sistemi di coltivazione del riso, secondo la FAO, contribuirebbe all'eradicazione della fame e della povertà a livello mondiale.

L'80/90% della produzione di riso avviene in aziende agricole di bassa scala, presenti nei paesi in via di sviluppo; tra questi l'Asia rappresenta un esempio classico con il 90% della produzione e del consumo. Le Americhe e l'Africa contribuiscono con il 5%, l'Europa con il 4% della produzione e gli altri continenti con il resto (Fig. 1.4) (Muthayya *et al.*, 2014).

1.1 Il riso

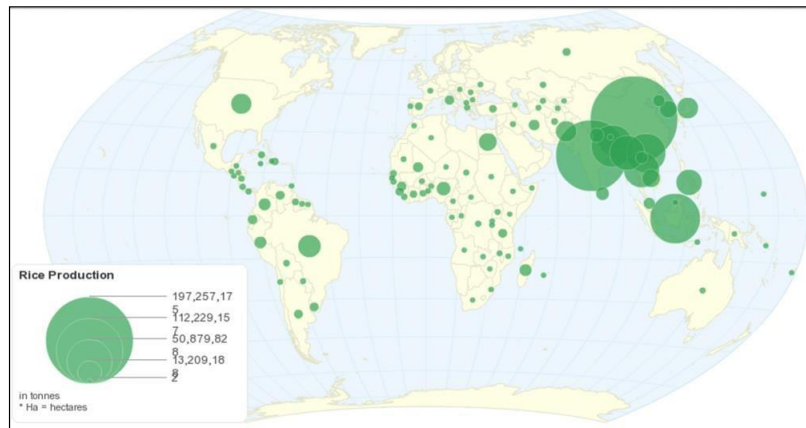


Fig. 1.4 Mappa della produzione di riso nel mondo
(<http://chartsbin.com/view/1009>).

Questi dati mettono in evidenza l'importanza del riso come risorsa primaria di impiego, guadagno e nutrimento per le popolazioni dei paesi in via di sviluppo. Questi paesi sono, infatti, i maggiori produttori e consumatori e tra gli abitanti circa 200 milioni lavorano nelle risaie e 520 milioni trovano nel riso il 50% dell'apporto calorico ed una fonte di proteine (Muthayya *et al.*, 2014).

Questo andamento è la conseguenza della "Green Revolution" che ha avuto luogo tra il 1940 ed il 1960. Durante questo periodo si è cercato di far fronte alla crescita della popolazione e a un conseguente aumento della richiesta di cibo, con lo sviluppo di tecniche agronomiche moderne e all'avanguardia che favorissero la produttività dei raccolti. Anche per mezzo di queste politiche oggi l'Asia è il produttore principale di riso (Muthayya *et al.*, 2014).

La vulnerabilità del riso a importanti eventi climatici e la sua richiesta sempre maggiore sul mercato agricolo fanno sì che il riso sia oggetto di interessi economici mondiali (<http://www.fao.org/RICE2004>; Muthayya *et al.*, 2014).

1.1 Il riso

1.1.3.1 L'Italia, il suo ruolo nel mercato mondiale del riso e l'importanza della salvaguardia delle varietà

Il riso nell'area mediterranea, al tempo dei Greci e dei Romani, era conosciuto come spezia o addirittura farmaco. In Italia, ancora nel medioevo, questo cereale non era utilizzato come alimento. Tra il 900 ed il 1200 d.c. iniziò la coltivazione in Italia e nelle aree del mediterraneo, solo nel 1400 d.c., però, si ebbe uno sviluppo effettivo con le coltivazioni lungo la Pianura Padana.

Per minimizzare gli sprechi e massimizzare l'efficienza e la resa della produzione di riso, il territorio Italiano ha visto lo sviluppo e la realizzazione di particolari strutture di reti di canali, caratteristiche, ormai, dell'architettura paesaggistica del nord Italia (Fig. 1.5). Le risaie sono rifugio anche per molte specie faunistiche che le rendono ecosistemi artificiali di grande ricchezza, contribuendo alla salvaguardia e al mantenimento della biodiversità. Le varietà di riso coltivate nelle risaie Italiane hanno, quindi, un valore unico in quanto tali coltivazioni non possono essere riproducibili in altre zone, ed è proprio questa la ricchezza della varietà (Ente Nazionale Risi, <http://www.enterisi.it/>).



Fig. 1.5 Risaie tipiche del Nord Italia (Ente Nazionale Risi, <http://www.enterisi.it/>).

1.1 Il riso

I dati forniti dall'Ente Nazionale Risi mostrano come l'Italia, in Europa, sia il primo paese in termini di superficie coltivabile (ettari) e produzione (Fig. 1.6).

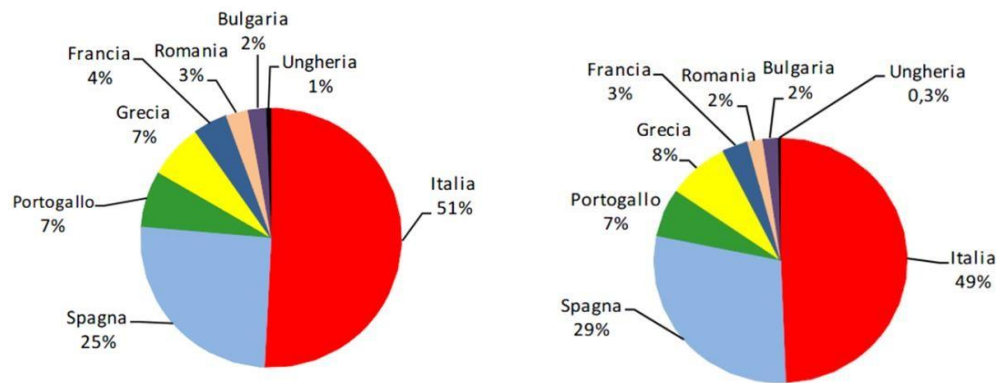


Fig. 1.6 Coltivazione e produzione di riso in Europa.

Nel diagramma a torta di sinistra è indicata la percentuale di superficie coltivabile di riso in Europa, in quello di sinistra la percentuale di produzione di riso in Europa (<http://www.enterisi.it>).

L'Italia è dunque il principale produttore europeo di riso e ha un peso sull'export del 40%. Nonostante questo primato, in qualità e produttività, negli anni si è visto come l'Italia stia subendo un calo nell'esportazione del riso sul mercato mondiale. Questo fenomeno è figlio del piano unilaterale UE, stipulato nel 2001, che prevede la liberalizzazione, quindi l'esenzione da dazi e contingenti, sull'importazione di prodotti, eccetto armi e munizioni, dai paesi sottosviluppati, definiti *Eba* (*Everything but arms*).

Da dati recenti della Commissione europea emerge che, dal 1° settembre 2013 al 30 giugno 2014, le importazioni di riso a dazio zero, dai Paesi *Eba*, sono aumentate del 60% rispetto allo stesso periodo dell'anno precedente: il totale importato è di 236.000 tonnellate di cui 204.000 dalla Cambogia; inoltre, oggi, in Italia sono 218.000 gli ettari coltivati a risaia a fronte dei 235.000 di un anno fa, con una produzione di oltre un milione e 300 tonnellate, in un'area che si estende nel triangolo Vercelli-Novara-Pavia, dove si coltiva il riso migliore del mondo.

Tale questione è stata recentemente all'attenzione del Parlamento Italiano. Come emerge dall'interrogazione del Senato n. 3-01116 è stato richiesto ai Ministri dello sviluppo economico e delle politiche agricole alimentari e forestali, di intervenire sulla crisi della produzione del riso in Italia. Riportiamo di seguito alcuni brani della citata interrogazione del Senato: "...nonostante le migliori intenzioni con le quali è nata l'iniziativa "Everything but Arms (Eba)", non si possono sottovalutare i problemi che sono derivati dall'azzeramento dei dazi all'import per alcuni prodotti agricoli in Europa da Paesi extraUE; seppur Eba si ispiri a condivisibili politiche di sostegno umano

1.1 Il riso

e sociale, non si può permettere che l'Unione europea sia disinteressata nel seguirne l'evoluzione commerciale; conseguentemente a tale accordo, in Italia si assiste infatti ad un progressivo e consistente incremento delle importazioni a prezzi estremamente competitivi dai Paesi asiatici di quantitativi di riso lavorato della varietà "indica", con i quali le nostre filiere non hanno alcuna possibilità di competere; tale iniziativa europea, inoltre, ha favorito, pur senza volerlo, l'insediamento di multinazionali nei Paesi meno avanzati dove si coltiva riso senza adeguate tutele del lavoro e con l'utilizzo di prodotti chimici vietati da decenni nelle campagne italiane ed europee; tutto ciò comporta gravi ripercussioni sul tessuto economico e occupazionale delle regioni italiane citate, determinando una situazione di estrema difficoltà per le imprese italiane della filiera risicola; considerato inoltre che: il riso made in Italy è una realtà da primato per qualità, tipicità e sostenibilità che è necessario difendere; le risaie sono fondamentali nel nostro Paese anche dal punto di vista ambientale e relativamente al regime delle acque superficiali e sotterranee, in particolare nella pianura Padana..." (Senato, 2014).

L'interrogazione ha ricevuto risposta da parte del sottosegretario di Stato per le politiche agricole alimentari e forestali, on. Castiglione: *"... Dalla campagna 2009-2010 ad oggi (2014), le importazioni di riso in Europa dalla Cambogia (che è un Paese EBA) sono aumentate..., raggiungendo il 23 per cento di tutto l'import dell'Unione europea...Come noto, l'Italia è il primo produttore di riso dell'Unione europea,... di cui 300.000 di tipo indica che, attualmente, è la categoria merceologica maggiormente colpita dall'impennata del volume delle importazioni cambogiane. La concorrenza cambogiana sta riducendo i prezzi di mercato del riso greggio (di tipo indica) prodotto nell'Unione europea al di sotto dei costi di produzione. I principali Paesi acquirenti del riso cambogiano sono proprio quelli ove si sono registrate le riduzioni più consistenti delle consegne italiane di riso indica: Francia, Polonia, Paesi Bassi e Belgio...Si è verificata, dunque, la temuta penalizzazione delle nostre produzioni a causa delle importazioni a dazio zero, provenienti, in particolare, dalla Cambogia e dalla Birmania."* Il ministro conclude dicendo che la questione è stata sottoposta anche al Consiglio dell'Unione europea e che, inoltre, insieme al Ministro dello Sviluppo Economico e l'Ente Nazionale Risi, ci si sta muovendo verso la salvaguardia e la valorizzazione del riso Italiano (Senato, 2014 a).

Inoltre, è stato approvato definitivamente il 06/07/2016 un Progetto di Legge con il quale, all'articolo 31, si delega il Governo ad adottare provvedimenti per il sostegno al settore del riso Italiano (Parlamento Italiano, 2016).

1.1 Il riso

1.1.3.2 Due cultivar di interesse: Vialone Nano e Baldo

Nel territorio nazionale la produzione è collocata nella pianura padana, lungo il Po, interessando 4 regioni di cui solo le regioni Piemonte e Lombardia coprono il 90% della produzione (Fig. 1.7).

Nel territorio Italiano si contano ~ 70 varietà di riso, tra le più pregiate ricordiamo: Arborio, Carnaroli, Vialone Nano, Roma, Baldo.

Di queste varietà si porrà l'attenzione a due:

- Vialone Nano: sottospecie japonica, prodotto IGP coltivato nel territorio Veronese.
- Baldo: sottospecie japonica, considerato il figlio del riso Arborio, deriva dall'incrocio tra la varietà indicata e Stirpe 136, coltivato tra Novara, Vercelli e Pavia.

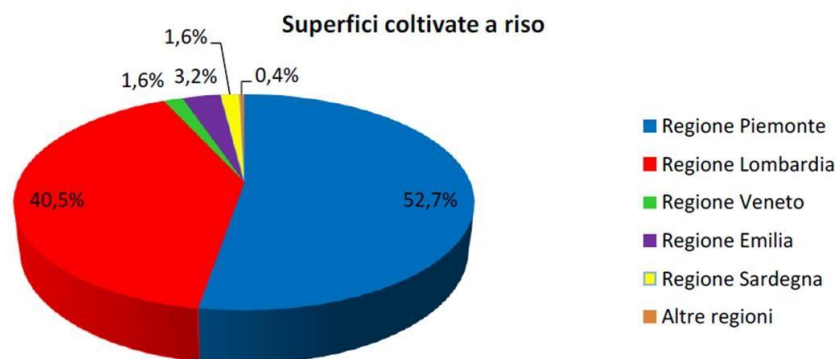


Fig. 1.7 Percentuale della superficie coltivata di riso in Italia (<http://www.enterisi.it>).

1.1 Il riso

1.1.4 Lavorazione ed aspetti nutrizionali

La lavorazione del riso prevede varie fasi. Dopo la prima fase, che consiste nel processo di raccolta e trebbiatura, si ottiene il risone che è caratterizzato ancora dalla presenza di glumelle, gli strati del pericarpo, l'endosperma e l'embrione. Le fasi successive prevedono la rimozione degli strati più esterni come le glumelle, per ottenere il riso cargo o marrone, ed infine la sbiancatura ed il lavaggio. Durante la fase finale di sbiancatura si ha una significativa perdita di nutrienti, infatti questo processo prevede l'ulteriore rimozione degli strati più esterni, rimasti dalle precedenti fasi, che sono ricchi in proteine, vitamine e minerali (Fig. 1.8) (Muthayya *et al.*, 2014).

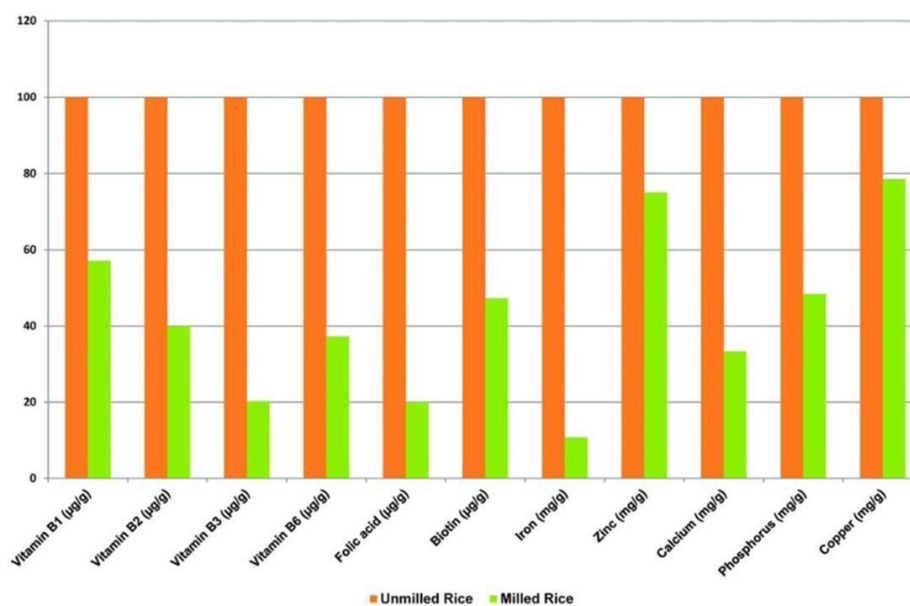


Fig. 1.8 Contenuto di micronutrienti nel riso.

Nel grafico è rappresentata la variazione, in %, del contenuto di micronutrienti nel riso non lavorato (barra arancione) e nel riso lavorato (barra verde) (Muthayya *et al.*, 2014).

Per minimizzare la perdita di nutrienti si effettua un processo molto antico detto parboilizzazione che, come descritto dall'ente risi, consiste nei passaggi riportati di seguito: "il risone viene bagnato o immerso in acqua calda sotto pressione. Quindi, per provocare la gelatinizzazione dell'amido contenuto nel chicco, che avviene ad una temperatura superiore ai 100 °C, il prodotto è parzialmente cotto in un recipiente a vapore. Il risone così trattato viene successivamente essiccato in modo da portarlo al giusto grado di umidità e lavorato secondo il procedimento usuale.

1.1 Il riso

Le vitamine e le sostanze minerali vengono prima sciolte dall'acqua calda e pressate nel chicco di riso sotto forte pressione idraulica, poi sigillate nel nucleo col vapore. In ultimo il riso viene essiccato" (Fig. 1.9) (www.enterisi.it).

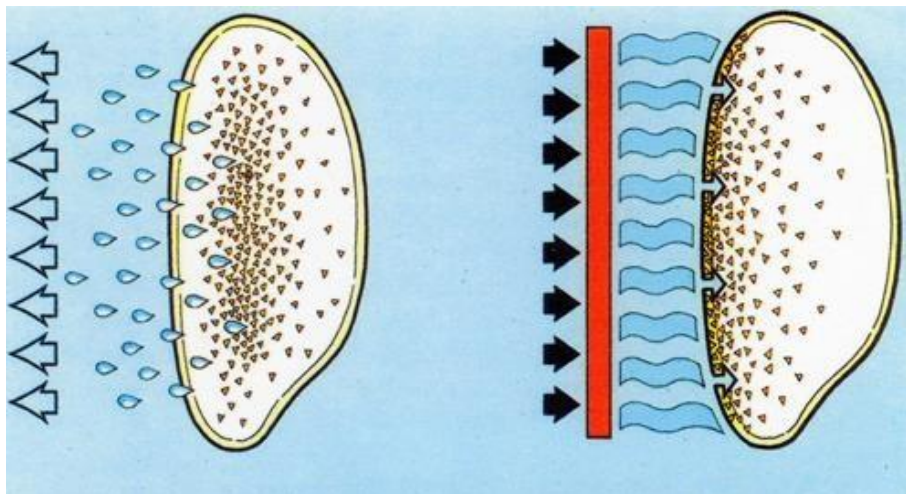


Fig. 1.9 Processo di parbolizzazione.

Nel processo di parbolizzazione i nutrienti vengono prima sciolti in acqua e poi pressati nel chicco sotto pressione idraulica (www.enterisi.it).

1.2 Stress abiotico: la salinizzazione

1.2.1 Introduzione: gli stress abiotici

Le piante, in natura, sono sottoposte a molteplici cambiamenti ambientali ed essendo organismi sessili hanno sviluppato una serie di meccanismi cellulari, biochimici e molecolari che permettono loro di rispondere, acclimatarsi e adattarsi ai cambiamenti esterni, in modo da minimizzare i danni che tali cambiamenti potrebbero causare.

Lo stress è, quindi, una condizione sfavorevole, generata sia da fattori ambientali e climatici subottimali che da patogeni (rispettivamente stress abiotico e biotico); esso incide comunque negativamente sulla fisiologia dell'organismo. Cambiamenti della temperatura, condizioni di siccità, eccesso di sali nel suolo o deficit di nutrienti, infezioni da parte di virus, batteri o altri patogeni, possono avere conseguenze negative sulla crescita e sulla produttività della pianta stessa e, quindi, sull'entità e qualità del raccolto (Atkinson and Urwin, 2012).

1.2.2 Suolo e salinizzazione

Il suolo è definito come un sistema naturale complesso formato da più strati composti da materia organica ed inorganica, risultato di trasformazioni chimico, fisiche e biologiche.

La Commissione europea insieme al *Joint Research Center* (JRC) hanno riconosciuto al suolo sette funzioni vitali:

1. Produzione di biomassa e fonte di nutrienti necessari per il metabolismo delle piante
2. Sistema di filtraggio di elementi potenzialmente tossici
3. Ruolo chiave per la ricchezza della biodiversità, costituendo un habitat per organismi animali e vegetali
4. Mezzo utilizzato dagli uomini come base per edifici, infrastrutture e sistemi di distribuzione
5. Fonte di materie prime come argilla, sabbia e ghiaia
6. Pool di riserva per lo svolgimento del ciclo del carbonio
7. Eredità geologica ed archeologica

La Commissione europea ha messo in luce anche alcune criticità legate al suolo, ovvero ha riconosciuto alcuni fenomeni, di origine naturale e antropica, come possibili fattori responsabili del danneggiamento del suolo e delle sue funzioni. L'erosione dell'acqua e del vento, l'impoverimento di materia organica e la perdita di biodiversità dovuti a un eccessivo sfruttamento dei terreni, inondazioni, frane, desertificazione, compattazione e fenomeni di salinizzazione contribuiscono, progressivamente, alla perdita e all'impoverimento biologico della

1.2 Stress abiotico: la salinizzazione

terra (Costantini and Lorenzetti, 2013; European Commission, 2006; European Commission, 2012; JRC, 2011).

Il suolo è ricco in composti inorganici (ioni Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- e CO_3^{2-} , NO_3^- e PO_4^{3-}) che derivano dai sali presenti nel terreno, come, cloruri, solfati, carbonati e bicarbonati, nitrati e fosfati di sodio, di magnesio, di calcio e di potassio che ne determinano la salinità, si parla di sodicità quando si fa riferimento alla presenza di solo Na^+ . La salinità dell'acqua del suolo o dell'acqua d'irrigazione esprime, quindi, la concentrazione di sali solubili presenti nel suolo e viene misurata in termini di Conducibilità Elettrica (EC) di un estratto a pasta satura. Un suolo è definito salino quando la sua conducibilità elettrica (EC) supera 4 dS m^{-1} (Shabala and Munns, 2012).

La salinizzazione è uno di quei fenomeni che la Commissione europea ha dichiarato dannosi per il suolo. Questo fenomeno colpisce la maggior parte del suolo terrestre e può avere origine naturale (salinità primaria) o può essere dovuto a fattori provocati dall'attività dell'uomo (salinità secondaria) (Shabala and Munns, 2012).

La salinizzazione primaria riguarda un accumulo di sali nel suolo dovuto a processi naturali quali: l'erosione atmosferica delle rocce; l'aerosol oceanico trasportato dal vento e dalle piogge, con deposito di sali sulla superficie del suolo nelle regioni costiere; la scarsità delle precipitazioni e l'elevata evapotraspirazione; l'accumulo di sali nel sottosuolo dovuto alla risalita di acqua arricchita in sali dalla falda verso la superficie, generato anche dall'innalzamento delle acque marine (Shabala and Munns, 2012).

La salinizzazione secondaria è causata, invece, dall'azione antropica dovuta a tecniche agricole, come: irrigazione con acqua ricca in sali; pratiche di diboscamento e l'eccessivo sfruttamento delle falde lungo le pianure costiere, che comporta l'intrusione nell'acquifero di acque marine (Shabala and Munns, 2012).

La liscivazione ed il drenaggio sono due delle tecniche utilizzate per far fronte all'eccessiva concentrazione di sali nel suolo (Shabala and Munns, 2012).

La liscivazione consiste nell'irrigare i raccolti con una quantità d'acqua appena maggiore di quella di cui hanno bisogno. I sali scendono sotto la zona delle radici e finiscono nelle falde acquifere. Grazie al drenaggio effettuato con canali di scolo o tubazioni sotterranee, l'acqua salinizzata percola verso gli strati più profondi del suolo. Tuttavia la tecnica della percolazione, eseguita con un eccessivo utilizzo di acqua e non accompagnata da un drenaggio sufficiente, può causare l'innalzamento della falda acquifera che, a causa di alte temperature, può evaporare e creare,

1.2 Stress abiotico: la salinizzazione

introno alla zona delle radici, un ambiente eccessivamente salino, il che interferisce con la capacità delle radici medesime di assorbire l'acqua (Shabala and Munns, 2012) (Fig. 1.10).

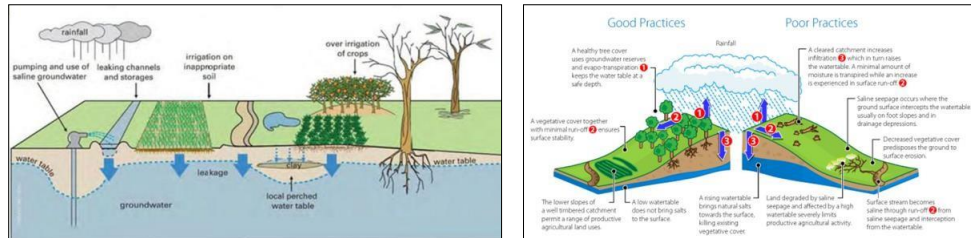


Fig. 1.10 Salinità dei suoli e pratiche agricole, cause ed effetti (Bosco de Oliveira et al., 2013; <http://www.blueplanet.nsw.edu.au/wi--salinity/.aspx>).

1.2.2.1 Impatto socio-economico della salinizzazione

Secondo le stime dell'*United Nations World Population Prospects 2010* la popolazione mondiale raggiungerà, nel 2050, i 10 miliardi. La produzione agricola globale, per soddisfare il fabbisogno alimentare, dovrà raddoppiare. La necessità di aumentare la produttività agricola deve però fare i conti con i sempre più evidenti cambiamenti climatici. Le coltivazioni per la produzione di cibo, di foraggio o di mangimi, nonché lo stato di salute del bestiame, il commercio di cibo e dei generi alimentari sono sensibili ai cambiamenti climatici quali l'innalzamento e la variabilità della temperatura, cambiamenti nelle precipitazioni ed un aumento della salinità del suolo. La salinizzazione rappresenta, quindi, sia un problema ecologico che economico-produttivo (Flowers and Muscolo, 2015).

Circa 800 milioni di ettari di terre, in tutto il mondo, sono colpite dal fenomeno della salinizzazione. Di questo totale, le terre irrigate occupano circa 230 milioni di ettari e di questi, 45 milioni, cioè il 20%, sono territori salini. Il fenomeno è preoccupante dato che le terre irrigate dall'uomo, nonostante siano il 15% delle terre coltivate, hanno una produttività 2 volte maggiore rispetto alle terre irrigate dalle piogge, con una resa di circa un terzo del totale del cibo prodotto su scala mondiale (FAO, 2008; Munns and Tester, 2008).

La salinizzazione dei suoli è, quindi, uno dei fattori che maggiormente limita la produttività dei raccolti ed il costo, in termini di perdita dei raccolti, è stimato intorno ai 12 miliardi di dollari all'anno. In generale i danni economici dovuti alla salinizzazione differiscono da Paese a Paese e dipendono sia dai costi di produzione che dai profitti ricavati nelle stagioni più produttive. Un terreno agricolo ha dei costi medi pari a \$ 300 ha⁻¹ con un reddito lordo di \$ 600 ha⁻¹. In condizioni

1.2 Stress abiotico: la salinizzazione

di salinità vi è una diminuzione della resa del raccolto ed il reddito lordo risulta di \$ 400 ha⁻¹ (Munns and Gilliam, 2015; Pitman and Lauchli, 2002).

L'JRC (JRC, 2011) ha stimato che in Europa circa da 1 a 3 milioni di ettari di terreno, soprattutto nell'area del Mediterraneo siano affetti dal fenomeno della salinizzazione e, come già precedentemente accennato, a causa dei progressivi cambiamenti climatici uniti alla scarsa qualità e quantità di acqua di irrigazione, questo fenomeno sarà sempre più crescente.

In Italia si pensava che il fenomeno fosse circoscritto alle aree costiere del territorio siciliano ma, a seguito di successive indagini, si è evidenziato come il fenomeno riguardi l'intera penisola dal sud al nord, passando per le regioni del centro (Fig. 1.11).

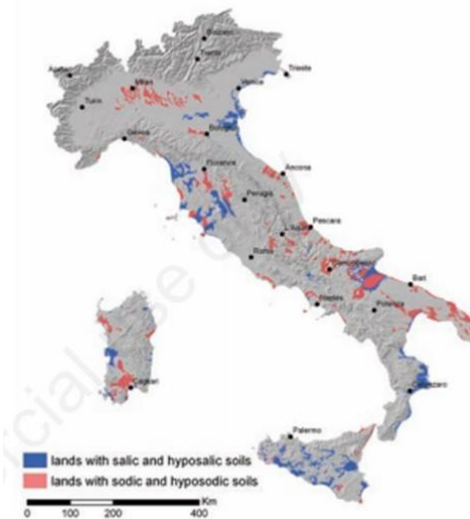


Fig. 1.11 Territori affetti da suoli salini (in blu) e sodici (in rosa) (Costantini and Lorenzetti, 2013).

1.2.2.2 Fisiologia dello stress salino

La salinizzazione dei suoli rappresenta uno stress per le piante. Lo stress, in termini di costi energetici, è definito tale quando l'energia, accumulata dalle piante a seguito della fotosintesi, è ridotta o è utilizzata per attivare meccanismi di difesa allo stress (Munns and Gilliam, 2015).

Il grafico (Fig. 1.12) evidenzia come l'energia chimica fornita, a seguito dei processi di fotosintesi, venga utilizzata in funzione della salinità del suolo (Munns and Gilliam, 2015).

1.2 Stress abiotico: la salinizzazione

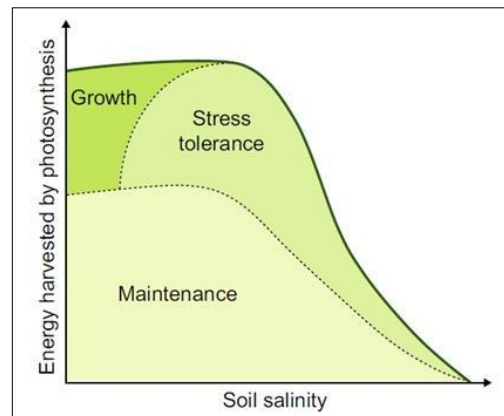


Fig. 1.12 Produzione ed utilizzo dell'energia chimica in piante sottoposte a stress salino (Munns R. and Gilliam M., 2015).

La maggior parte dell'energia chimica è utilizzata per i processi di mantenimento della biomassa quali: turnover delle proteine, sintesi di lipidi e carboidrati, mantenimento del gradiente ionico, accumulo di nutrienti. Solo una minor parte di energia è utilizzata per l'accrescimento (Munns and Gilliam, 2015).

In condizioni di stress salino le cellule subiscono danni sia strutturali che metabolici: in particolare respirazione mitocondriale e fotosintesi riducono la propria efficienza. Le cellule mettono anche in atto una serie di meccanismi di tolleranza allo stress con un conseguente dispendio energetico. Come si vede nella Fig. 1.12 l'energia chimica fornita nei processi fotosintetici, man mano che aumenta lo stress salino, è pari all'energia impiegata per l'attivazione di sistemi di difesa o di stress tolleranza con conseguente limitazione dei processi di accrescimento e sviluppo. Quando l'equilibrio tra energia prodotta e consumata si sposta verso quest'ultima, la pianta entra in uno stato di senescenza e morte cellulare (Munns and Gilliam, 2015).

1.2.2.2a Stress osmotico e stress ionico

Quando le piante sono esposte ad un ambiente di tipo salino gli stress a cui vanno incontro sono molteplici e comportano un'inibizione della crescita. Per comprendere come e con che tempistiche la salinità incide sulla fisiologia della pianta si distinguono due fasi, quella osmotica e quella ionica (Fig. 1.13).

1.2 Stress abiotico: la salinizzazione

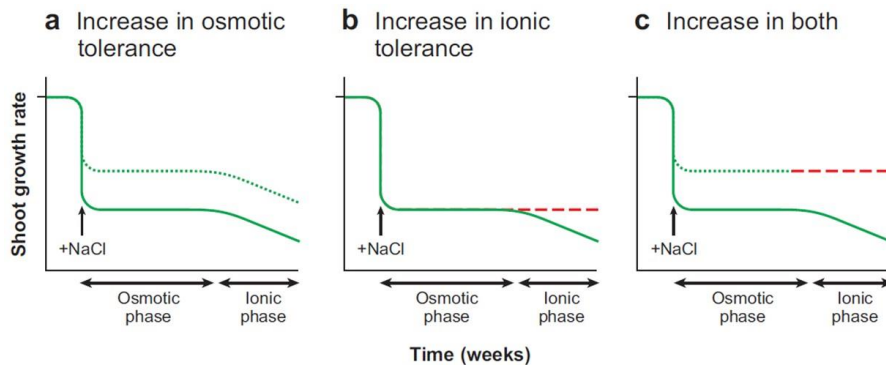


Fig. 1.13 Stress salino: fase osmotica e fase ionica.

La crescita è inibita a seguito di stress salino. Due sono le fasi in cui si articola la risposta allo stress, la fase osmotica e quella salina. La line continua verde rappresenta lo stato della crescita a seguito di aggiunta di sale. Le linee tratteggiate, verdi e rosse, corrispondono allo stato di crescita di una ipotetica pianta tollerante allo stress salino (Munns and Tester, 2008).

Com'è schematizzato nella fig. 1.13, il primo stress per la pianta è a livello osmotico, quindi, non appena la pianta percepisce, intorno alle radici, un eccesso di salinità, inizia la così detta fase osmotica (Munns and Tester, 2008).

A concentrazioni superiori a 4 dS m^{-1} che corrisponde a circa 40 mM , l'NaCl risulta essere dannoso per la fisiologia della cellula e della pianta. Tali concentrazioni dei soluti inducono l'abbassamento della pressione osmotica del terreno, circa $0,2 \text{ MPa}$, che genera un abbassamento del potenziale idrico dovuto all'aumento dei soluti nell'acqua. Questo si traduce in una maggiore difficoltà delle piante ad assorbire acqua. Il problema di un terreno ricco in sali non è tanto la disponibilità di acqua in termini quantitativi, quanto l'incapacità delle radici di assorbire acqua a causa di un potenziale idrico delle soluzioni esterne più basso, rispetto a quello delle soluzioni cellulari. Le foglie devono sviluppare un potenziale idrico più negativo per far sì che il gradiente di potenziale idrico fra il suolo e le foglie sia a favore di quest'ultime, ciò comporta che il bilancio idrico della pianta è perturbato. La perdita d'acqua dal tessuto fogliare, con conseguente riduzione di volume e turgore, la chiusura stomatica nelle foglie con una diminuita conduttanza stomatica di CO_2 che limita il processo fotosintetico, la diminuzione dell'espansione cellulare nei tessuti in crescita con un rallentamento dei processi di crescita, la riduzione del numero di germogli e delle foglie, che inoltre hanno dimensioni più piccole e più spesse, sono tra i possibili effetti causati dallo stress osmotico. Le radici, nonostante siano maggiormente esposte al sale rispetto alle foglie, riescono a rispondere meglio allo stress osmotico in quanto attivano una serie

1.2 Stress abiotico: la salinizzazione

di meccanismi in grado di eliminare il sale in eccesso evitando, così, fenomeni di tossicità (Shabala and Munns, 2012).

La seconda fase, detta ionica, è più tardiva ed è causata da un accumulo di ioni a livello di foglie e germogli.

Il sodio può entrare nel citoplasma per trasporto attivo o passivo, ad alta e bassa affinità, HKT (*high-affinity potassium transporter*) e NSCCo (*nonselective cation channel*), rendendo più competitivo l'ingresso di ioni K^+ ma anche Mg^{2+} e NH_4^+ a favore del Na^+ e del Cl^- . L'eccesso di Na^+ in entrata dissipa il potenziale di membrana che risulta fortemente depolarizzata e questo porta sia all'entrata di Cl^- che all'attivazione di canali voltaggio dipendenti come il KOR (*potassium outward rectifier*) favorendo così l'uscita dello ione K^+ .

L'organo radicale, come già accennato, è quello che è direttamente esposto al suolo e al sale ed è quindi importante capire come le radici rispondano e contrastino questo "flusso di sodio". Gli ioni sodio possono entrare passivamente nelle radici, attraverso la via apoplastica, e accumularsi nello xilema fino ad essere trasportati verso il germoglio. L'endoderma e l'esoderma delle radici di gimnosperme e angiosperme, hanno sviluppato una struttura particolare, la banda di Caspary, presente nelle pareti di questi tessuti. La funzione della banda di Caspary è quella di evitare il passaggio non selettivo degli ioni, lungo la via apoplastica, e indirizzare l'ingresso di specifici ioni nella via simplastica (Fig. 1.14). A livello di questi tessuti possono essere attivati meccanismi finalizzati alla riduzione del passaggio di ioni nello xilema, con conseguente riduzione del loro trasporto per via xilematica nella parte aerea della pianta. In generale, quindi, se la pianta non attiva meccanismi di difesa, l'eccesso di sale lungo il flusso traspiratorio può comportare uno squilibrio elettrochimico e risultare dannoso, provocando danni a livello cellulare e inibendo, anch'esso, la crescita (Horie *et al.*, 2012; Parihar *et al.*, 2015; Shabala and Munns, 2012).

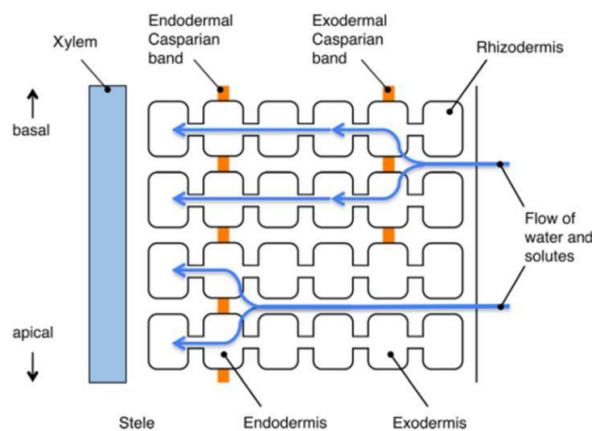


Fig. 1.14 Schema del flusso ionico attraverso le radici (Horie *et al.*, 2012).

1.2 Stress abiotico: la salinizzazione

Le alte concentrazioni di Na^+ cellulare interferiscono con i livelli citoplasmatici di alcuni cationi il cui ruolo è importante per alcuni processi cellulari. Uno dei cationi che maggiormente risente dell'eccesso di Na^+ è il K^+ . In condizioni fisiologiche il citosol della cellule vegetali ha $[\text{K}^+]$ di circa 100 mM e $[\text{Na}^+]$ di circa 10 mM, concentrazioni ottimali per il corretto funzionamento di enzimi e lo svolgimento delle normali funzioni metaboliche come la sintesi proteica. Solo mantenendo un giusto rapporto di $[\text{K}^+]/[\text{Na}^+]$, minimizzando l'uscita di K^+ e l'ingresso di Na^+ , la cellula può rispondere efficacemente allo stress salino. Un rapporto anomalo $[\text{K}^+]/[\text{Na}^+]$ induce dei danni cellulari. A concentrazioni superiori a 100 mM il Na^+ inibisce la maggior parte degli enzimi citosolici (Munns, 2002), provoca una disorganizzazione della membrana, riduce la crescita ed inibisce la divisione cellulare (Mahajan and Tuteja, 2005).

Questo sbilanciamento ionico comporta un disordine nell'assimilazione di nutrienti minerali da parte della pianta ed una conseguente riduzione della crescita. Sono molti gli studi che sottolineano la problematica tra salinità e nutrizione minerale. Durante la salinizzazione si verifica una competizione tra nutrienti come K^+ , Ca^{2+} , NO_3^- e gli ioni tossici, Na^+ e Cl^- . Questa competizione è causata da una limitata traspirazione, alterata permeabilità della membrana, competizione tra i siti di legame dei trasportatori e alterate proprietà chimico fisiche, come il pH, del terreno salinizzato (Hu and Schmidhalter, 2005).

La conduttanza stomatica è un altro dei processi fisiologici che maggiormente risente della salinità del suolo. Una delle prime risposte della pianta, sottoposta a stress salino e, per via indiretta, a carenza idrica, è la chiusura degli stomi per preservare la perdita d'acqua tramite traspirazione. Uno degli ormoni maggiormente coinvolto nell'adattamento a situazioni di stress, in particolar modo allo stress salino, è l'acido abscissico (ABA). Piante di girasole ben idratate hanno una concentrazione di ABA, nel succo xilematico, pari a 1-15 nM, in condizioni di stress idrico (i cui effetti osmotici sono assimilabili a quelli dello stress salino) l'ormone ha una concentrazione pari a 3000 nM in tutta la pianta, vale a dire aumenta di circa 200 volte (Schurr *et al.*, 1992). La chiusura degli stomi causata dalla disidratazione delle foglie intere e delle radici, viene detta chiusura idroattiva e dipende dai processi metabolici della cellule guardia. L'ABA può essere prodotto nelle radici e venir trasportato, attraverso il flusso xilematico, ai germogli, provocando la chiusura stomatica e l'inibizione della crescita cellulare. Si è visto che l'ABA può anche essere sintetizzato, rapidamente, nei tessuti fotosintetici come prima risposta alla stress salino, accumulato nelle cellule del mesofillo e rilasciato nell'apoplasto, e solo in seguito trasportato dalle radici (Fricke *et al.*, 2004; Fricke *et al.*, 2006). Recenti evidenze mostrano come il pH di xilema/apoplasto influenzi la compartimentalizzazione e il trasporto di ABA a livello delle cellule di guardia. Durante un

1.2 Stress abiotico: la salinizzazione

deficit idrico il pH dello xilema e dell'apoplasto aumenta a circa pH 7.2 (Wilkinson and Davies, 1997), ciò favorisce la dissociazione di ABAH in ABA-, che nella forma dissociata non passa facilmente attraverso le membrane e può raggiungere le cellule di guardia ed indurne la chiusura, evitando così l'eccessiva traspirazione e perdita di acqua (Chaves *et al.*, 2009; Mahajan and Tuteja, 2005).

L'ABA inoltre ha anche un effetto sui canali ionici che, come descritto precedentemente, hanno un ruolo principale nell'omeostasi ionica durante lo stress salino. L'ABA induce un aumento degli ioni Ca^{2+} nel citosol, con conseguente attivazione dei canali degli anioni che consentono al Cl^- di lasciare la cellula e inibisce anche la pompa H-ATPasi, con l'attivazione dei canali, voltaggio dipendenti, uscenti del K^+ . L'ABA induce la formazione di specie reattive dell'ossigeno che, a loro volta, attivano canali del Ca^{2+} . Quindi l'aumento del Ca^{2+} citosolico attiva i canali in uscita del K^+ e del Cl^- e inibisce i canali in entrata del K^+ . Il risultato netto è un grande movimento di ioni fuori dalla cellula. Come gli ioni lasciano le cellule di guardia, l'acqua fuoriesce per osmosi determinando la loro riduzione di volume e la chiusura della rima stomatica (Taiz and Zeiger, 2009).

La chiusura stomatica che comporta una diffusione limitata di CO_2 , un'alterazione del metabolismo fotosintetico, la degradazione dei pigmenti fotosintetici e lo stress ossidativo, sono tutte cause dirette o indirette di una riduzione nella fotosintesi (Chaves *et al.*, 2009).

Il tasso fotosintetico espresso per unità di area fogliare, in condizioni di stress salino, è spesso immutato, sebbene la conduttanza stomatica si riduca (James *et al.*, 2002). Questo paradosso è spiegato dal cambiamento dell'anatomia cellulare, che porta ad avere foglie più sottili, più piccole e di conseguenza una maggiore densità di cloroplasti per unità di area (Shabala and Munns, 2012). E' stato però anche riportato che un eccesso di Na^+ può raggiungere l'apoplasto, le cellule del mesofillo e inibire, a livello citoplasmatico, enzimi coinvolti nel metabolismo del carbonio e compromettere le fotosintesi (Munns and Tester, 2008).

Una minore efficienza fotosintetica determina la formazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (approfondimento nel Capitolo 3). Le ROS causano perossidazione lipidica, danni al DNA, denaturazione proteica e dei pigmenti e alterazioni all'attività enzimatica. La produzione di ROS avviene non solo a livello fogliare ma anche a livello delle radici. In *Arabidopsis* si è osservato come uno stress salino pari ad una $[NaCl]$ 100 mM e 250 mM possa, rispettivamente, incrementare di 3 e 4,5 volte la produzione del radicale idrossilico ($\cdot OH$). Nelle radici l'accumulo di ROS è molto rapido e ha degli effetti negativi sul metabolismo (Demidchik *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2008). Le ROS possono attivare i canali del Ca^{2+} e l'aumento del Ca^{2+} a livello citosolico

1.2 Stress abiotico: la salinizzazione

aumenta l'attività della NADPH ossidasi. Le ROS possono attivare anche una classe di canali NSCC che comportano una fuoriuscita di ioni K^+ generando una diminuzione di questo ione a livello citosolico. Un aumento del Ca^{2+} intracellulare e la diminuzione del K^+ attivano delle caspasi coinvolte nella morte cellulare programmata (Fig. 1.15) (Demidchik *et al.*, 2003; Lecourieux *et al.*, 2002; Shabala, 2009).

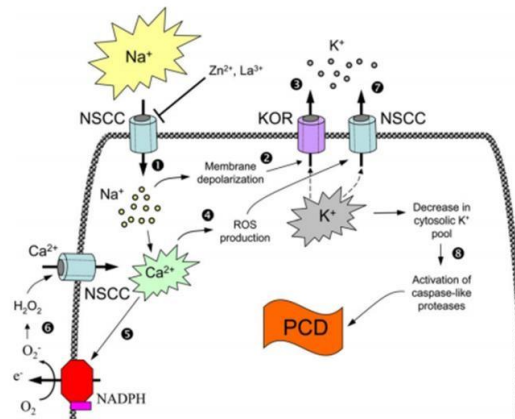


Fig. 1.15 Modifiche dell'equilibrio ionico in condizioni di stress salino (Shabala S. and Munns R., 2012).

1.2.2.2b Strategie contro lo stress salino: esclusione e compartimentalizzazione degli ioni

Le piante attivano una serie di meccanismi per far fronte agli effetti indotti dalla salinizzazione. Per ripristinare o mantenere il giusto livello di crescita, la pianta deve cambiare il suo potenziale idrico, rendendolo più negativo rispetto a quello del suolo, abbassando il potenziale di soluto e "liberare" il citosol dall'eccesso di ioni Na^+ . Per far fronte a questa esigenza la pianta mette in atto tre processi:

1. Sintetizzare i soluti compatibili nel citosol
2. Estrudere o accumulare gli ioni tossici nel vacuolo
3. Ristabilire il rapporto fisiologico K^+/Na^+ , nel citoplasma

Le piante possono sintetizzare *de novo* soluti organici, anche detti soluti compatibili. Zuccheri, polioli (mannitolo e inositolo), amminoacidi, composti quaternari dell'ammonio (sali d'ammonio), glicina betaina e prolina sono tra i principali "soluti compatibili" che hanno le caratteristiche di essere idrosolubili e non tossici per il metabolismo cellulare, una volta accumulati nelle cellule, anche ad alte concentrazioni. Il processo di sintesi di questi composti oltre ad essere lento,

1.2 Stress abiotico: la salinizzazione

comporta dei costi in termini energetici anche maggiori rispetto alla resa, si consumano dalle 30 alle 80 moli di ATP per sintetizzare 1 mole di soluti compatibili (Oren, 1999; Shabala and Munns, 2012).

La loro funzione dipende dalle caratteristiche chimico fisiche di questi composti. Oltre ad aumentare il flusso d'acqua verso le cellule, sono in grado di interagire con i domini, idrofili ed idrofobici, di enzimi e complessi proteici, agendo come *chaperon* a basso peso molecolare per proteggerli dagli effetti inibitori del Na^+ (Sakamoto and Murata, 2002). A sostanze come mannitolo, sorbitolo, glicerolo, prolina è stata attribuita la proprietà di *scavenging* contro le ROS che possono danneggiare varie strutture cellulari, tra cui il complesso PS II, anch'esso protetto da questi soluti compatibili (Noctor and Foyer, 1998, Shabala and Munns, 2012).

Un'alternativa più rapida e meno dispendiosa alla sintesi di soluti compatibili è l'accumulo di ioni inorganici quali Na^+ , Cl^- , K^+ nel vacuolo. In condizioni fisiologiche l'*uptake* di ioni inorganici non sembrerebbe svantaggioso e dannoso per il metabolismo cellulare come invece accade in situazioni di stress, in cui l'equilibrio ionico è già compromesso e sbilanciato verso un *uptake* di Na^+ .

La pianta, in condizioni di stress salino, deve quindi rispondere ed attivare meccanismi in grado di compartimentalizzare o escludere il Na^+ che, oltre certe concentrazioni, risulta tossico. Questi meccanismi di estrusione e compartimentalizzazione sono presenti e conservati sia nelle glicofite che nelle alofite, in quest'ultime sono più efficienti. La resistenza delle alofite a terreni salini sta nell'attivare i meccanismi sopra elencati e non nell'avere enzimi maggiormente resistenti ad alte $[\text{Na}^+]$.

Le radici, primo sistema che entra in contatto con i sali presenti nel suolo, hanno nella parte più interna della corteccia, un singolo strato di cellule, detto endoderma, caratterizzato dalle bande del Caspary che, come abbiamo detto, controlla e regola il movimento degli ioni nello xilema. Gli ioni, infatti, devono muoversi attraverso la via simplastica, transmembrana, ed entrare nello xilema solo attraverso processi di trasporto attivi. Quindi, le bande del Caspary rappresentano già una prima barriera al trasporto di ioni potenzialmente tossici (Taiz and Zeiger, 2009).

Nonostante la barriera del Caspary, come già precedentemente accennato, il Na^+ può entrare nel citoplasma attraverso vari sistemi di trasporto ad alta e bassa affinità, voltaggio dipendenti o indipendenti, alcuni dei quali servono per il trasporto anche di K^+ (HKT, High affinity K^+ transporter). I canali NSCC, non selettivi, possono però essere bloccati da $[\text{Ca}^{2+}]$ fisiologiche, che quindi limitano l'assorbimento di Na^+ (Rus *et al.*, 2001).

1.2 Stress abiotico: la salinizzazione

La cellula possiede anche altri sistemi di trasporto, Ca^{2+} indipendenti, che sfruttano il potenziale elettrochimico di H^+ , generato dalla forza proton-motrice di ATPasi, e attivano l'antiporto Na^+/H^+ permettendo il trasporto di Na^+ (contro il suo potenziale elettrochimico) all'interno del vacuolo. In *Arabidopsis thaliana* è stata identificata la proteina AtNHX1, primo antiporto vacuolare Na^+/H^+ identificato nelle piante. E' stato visto come piante transgeniche di *Arabidopsis*, che sovraesprimono la proteina in questione, mostrino una maggiore tolleranza al sale e che, invece, piante di *Arabidopsis* in cui vi è stato un silenziamento del gene per questo trasportatore, mostrino un'alterata espansione fogliare (Fig. 1.16) (Apse *et al.*, 1999; Apse *et al.*, 2003; Gaxiola *et al.*, 1999).

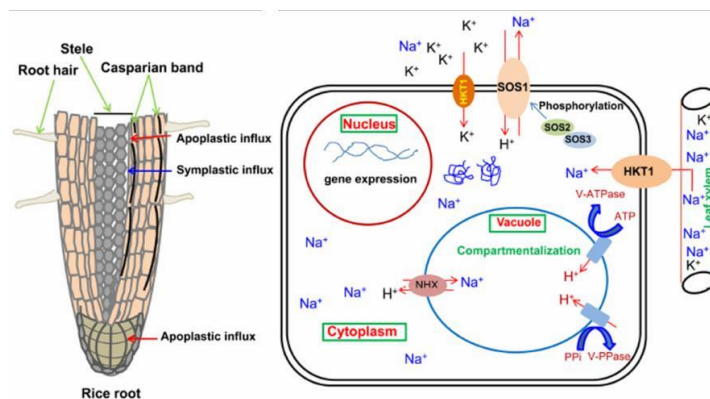


Fig. 1.16 Trasportatori intermembrana responsabili del movimento ionico (NHX, HKT, SOS1) (Das *et al.*, 2015)

Un sistema che permette, viceversa, l'efflusso di Na^+ dalla membrana plasmatica è l'antiporto SOS1 Na^+/H^+ . Si pensa che l'eccesso di Na^+ venga percepito da un ipotetico recettore di membrana Ca^{2+} dipendente. Il Ca^{2+} attiva la via di segnale legandosi a SOS3 che, a sua volta, attiva una chinasi SOS2 che fosforila e attiva SOS1, antiporto Na^+/H^+ . Grazie a questo meccanismo le piante possono regolare l'entrata di Na^+ , in quanto si è visto che la cascata SOS regola negativamente anche il canale HKT, che a sua volta regola AKT (canali entranti del K^+) (Fig. 1.17) (Gupta and Huang, 2014; Mahajan and Tuteja, 2005; Shabala and Munns, 2012).

1.2 Stress abiotico: la salinizzazione

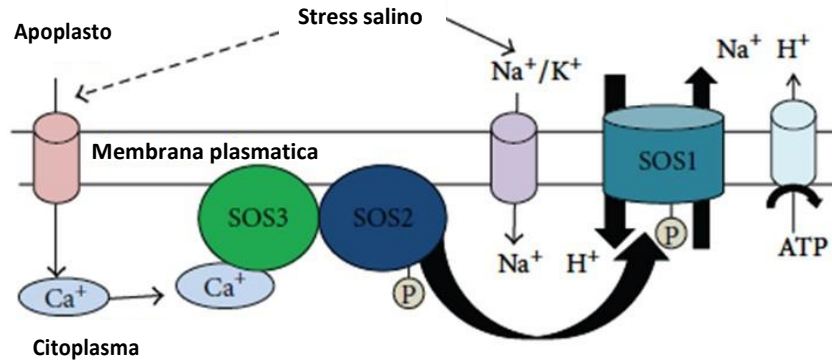


Fig. 1.17 Modello della via di trasduzione del segnale SOS in risposta allo stress salino (Gupta and Huang, 2014).

In condizioni ambientali fisiologiche il K^+ trasloca all'interno della cellula per mezzo del trasportatore selettivo per il K^+ (KIR). In condizioni di stress salino vi è una depolarizzazione della membrana conseguente all'ingresso di ioni Na^+ . In queste condizioni il passaggio di ioni K^+ , attraverso il canale KIR, è termodinamicamente sfavorevole e causa un'uscita di K^+ dai canali GORK, necessaria per ristabilire il potenziale di membrana. Questi due fenomeni portano ad una diminuzione della concentrazione di K^+ nel citoplasma con un conseguente costo metabolico per la pianta. La capacità di ristabilire il fisiologico rapporto tra K^+/Na^+ è uno degli aspetti fondamentali della tolleranza allo stress salino. Le piante mettono in atto una serie di meccanismi che però non sono sempre favorevoli alla loro fisiologia generale. Alcune piante cercano di ristabilire la giusta $[K^+]$ citosolica, per mezzo del trasporto di questo ione dal vacuolo. Questo processo è però sfavorevole in quanto comporterebbe, specialmente a lungo termine, una perdita del turgore, una diminuzione della crescita fino al collasso della struttura cellulare (Cuin *et al.*, 2003). Al contrario, agire sui meccanismi in grado di ripristinare o mantenere il potenziale di membrana fisiologico, aiuta a prevenire l'uscita di K^+ . Questo è possibile attivando canali che pompano ioni H^+ verso l'esterno della membrana mantenendo così un potenziale interno negativo. E' un processo efficiente in situazioni di stress ma anch'esso sconveniente da un punto di vista energetico, comportando un eccessivo consumo di ATP (Fig. 1.18) (Chen *et al.*, 2007; Shabala and Munns, 2012).

1.2 Stress abiotico: la salinizzazione

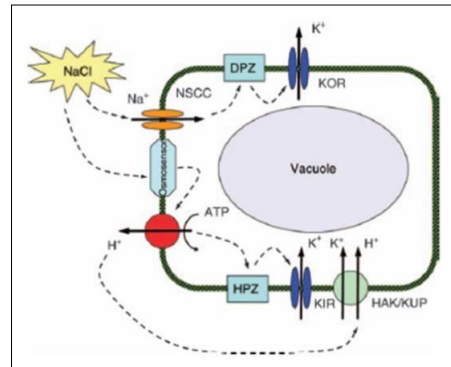


Fig. 1.18 Risposta cellulare allo stress salino. L'entrata di Na^+ provoca la depolarizzazione della membrana e l'attivazione dei canali KOR che provocano l'uscita di K^+ . La cellula può far fronte all'eccessivo efflusso di K^+ attivando le pompe protoniche che ristabiliscono il potenziale di membrana riattivando i canali entranti del K^+ (Shabala and Cuin, 2007).

1.2.2.2c Glicofite: *Oryza sativa*

Tra i cereali, il riso (*Oryza sativa*) è il più sensibile allo stress salino (Fig. 1.19).

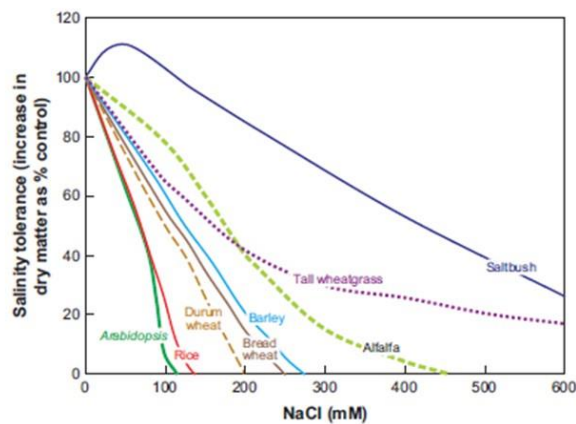


Fig. 1.19 Diversa tolleranza allo stress salino di varie specie (Munns and Tester, 2008).

Tra le molteplici varietà di riso, però, ce ne sono alcune più resistenti di altre. Confrontando queste diverse varietà e sottospecie si è evidenziato che la maggior tolleranza è data dalla capacità di eliminare il Na^+ in eccesso a livello fogliare e di mantenere un basso rapporto K^+/Na^+ . La varietà IR29, sensibile, accumula da 5 a 10 volte più Na^+ nelle foglie rispetto alla varietà tollerante Pokkali (Golldack *et al.*, 2003). È stato visto che i geni codificanti le proteine in grado di

1.2 Stress abiotico: la salinizzazione

regolare il trasporto a lunga distanza ed il riassorbimento del K^+ sono espressi anche nel riso, infatti il gene *HKT1* è espresso principalmente a livello delle radici piuttosto che nelle foglie (Golladack *et al.*, 2002). Ciò che, però, è ancora poco chiaro è come il Na^+ sia assorbito a livello radicale e forse è proprio questa la fase in cui viene meno la tolleranza del riso allo stress salino. Si pensa che la discontinuità a livello dell'endoderma radicale, quindi la mancanza delle bande di Caspary, possa contribuire ad un controllo meno efficiente del flusso di ioni, che quindi passano per la via apoplastica. Questo fenomeno è detto *bypass flow* proprio perché il trasporto attraverso i canali ionici è minimo se non nullo (Koyama *et al.*, 2001; Schreiber *et al.*, 2005). Conseguenza diretta di questo sistema è la minore capacità della cellula di regolare il trasporto stesso degli ioni ed un maggiore passaggio del Na^+ nello xilema. Inoltre l'accumulo, seppur minimo, di Na^+ nello spazio apoplastico delle foglie di riso induce un cambiamento nella concentrazione. Da quanto avevano già stimato Yeo and Flowers (1983), anche se il 99% del Na^+ viene sequestrato nelle foglie, la $[Na^+]$ apoplastica potrebbe arrivare a 500 nM in pochi giorni, con danni a livello fisiologico. L'accumulo di Na^+ a livello apoplastico è quindi correlato alla sopravvivenza delle varietà di riso, incluse quelle più tolleranti come la cultivar Pukkali (Krishnamurthy *et al.*, 2011).

1.3 - Stress, specie reattive dell'ossigeno (ROS) e sistemi antiossidanti

1.3.1 Le specie reattive dell'ossigeno (ROS)

La capacità di utilizzare ossigeno come accettore finale di elettroni per produrre una grande quantità di energia sotto forma di ATP, è un processo altamente conservato a livello delle membrane plasmatiche dei procarioti fino alle membrane dei mitocondri nelle cellule eucariotiche (De Gara *et al.*, 2010).

La produzione di energia per mezzo di questo complesso trasferimento multi step di elettroni porta inevitabilmente alla formazione, lungo la catena di trasporto di elettroni, di specie altamente reattive derivate dall'ossigeno stesso. Si può, quindi, affermare che una delle conseguenze del metabolismo aerobio è la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (De Gara *et al.*, 2010).

L'ossigeno possiede due elettroni spaiati, su orbitali diversi con spin paralleli, che lo rendono stabile nel suo stato basale, cioè quello in cui si trova l'O₂ atmosferico. Questi elettroni spaiati gli permettono di reagire facilmente come agente ossidante. È importante sottolineare che affinché l'O₂ possa ossidare una molecola non radicalica, sequestrandogli due elettroni, è necessario che gli elettroni in questione abbiano spin paralleli ma, dato che una coppia di elettroni, normalmente, ha spin opposti, l'O₂ accetta un elettrone alla volta. Questo spiega il perché l'O₂ reagisca più facilmente con specie radicaliche andando incontro ad una riduzione incompleta, dando così origine a specie reattive radicaliche come l'anione superossido (O₂^{•-}) e il radicale idrossilico (OH[•]) e non radicaliche come perossido di idrogeno (H₂O₂) (De Gara *et al.*, 2010; Halliwell, 2006).

La concentrazione di O₂ nelle piante raggiunge valori di gran lunga superiori anche a quelli presenti nel mondo animale. La diffusione di O₂ è possibile grazie alla presenza di spazi aeriferi intracellulari ed è necessaria per la produzione di energia a livello mitocondriale. Inoltre, durante i processi fotosintetici vi è una produzione di O₂ con un conseguente aumento della sua concentrazione cellulare. Nei tessuti non fotosintetici, come le radici, si ha una concentrazione di O₂ pari a 100-120 μM, nei tessuti fotosintetici si arriva, invece, a 260-280 μM, mentre nelle cellule animali la concentrazione di O₂ si aggira attorno a valori di circa 20-30 μM (De Gara *et al.*, 2010; Steiger *et al.*, 1977).

Come mostrato in Fig. 1.20, la prima tra le ROS ad esser prodotta nella cellula, per mezzo di una riduzione monovalente, è l'anione superossido (O₂^{•-}). Dall'anione superossido per reazioni spontanee di dismutazione o, più comunemente, grazie a reazione enzimatica catalizzata dalla superossido dismutasi (SOD), si forma il perossido di idrogeno (H₂O₂). Contribuiscono alla

1.3 - Stress, specie reattive dell'ossigeno (ROS) e sistemi antiossidanti

produzione di perossido d'idrogeno (H_2O_2) nella cellula anche le reazioni di fotossidazione o alcuni enzimi tra cui xantina ossidasi e ammino ossidasi (AOs) (Sharma *et al.*, 2012).

Diversamente da altri radicali dell'ossigeno il H_2O_2 può attraversare la membrana diffondendo attraverso le acquaporine o per diffusione semplice attraverso le membrane, questo permette di provocare danni anche in compartimenti cellulari lontani dal suo sito di produzione (Bienert *et al.*, 2007). Sia l'anione superossido ($O_2^{\bullet -}$) che il perossido d'idrogeno (H_2O_2) non sono tanto reattivi quanto il radicale idrossilico ($\bullet OH$), la cui formazione è dipendente da anione superossido e perossido di idrogeno a seguito della reazione di Haber-Weiss ($H_2O_2 + O_2^{\bullet -} \rightarrow \bullet OH + OH^- + O_2$) o da perossido di idrogeno e metalli come Fe^{2+} e Cu^+ a seguito della reazione di Fenton ($H_2O_2 + Fe^{2+} (Cu^+) \rightarrow Fe^{3+} (Cu^{2+}) + \bullet OH + OH^-$). Il radicale ossidrilico ($\bullet OH$) avendo un elettrone spaiato può reagire con l' O_2 nel suo stato basale e con molecole biologiche causando perossidazione lipidica e danni cellulari a livello di proteine e membrane. Un'eccessiva produzione di $\bullet OH$ può produrre danni con conseguente morte cellulare dato che le cellule non hanno enzimi in grado di eliminare questa specie radicalica (Foyer *et al.*, 1997; Pinto *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2012).

L'ossigeno singoletto (1O_2) si forma a seguito di assorbimento di energia. Come detto precedentemente gli elettroni nell'ossigeno hanno spin paralleli ma, l'assorbimento di energia permette di invertire lo spin di uno dei due elettroni portando così alla formazione di un stato nel quale i due elettroni hanno spin opposti, rendendoli così in grado di poter partecipare a reazioni che coinvolgono il trasferimento di due elettroni (riduzione divalente) (Apel and Hirt, 2004; Sharma *et al.*, 2012).

1.3 - Stress, specie reattive dell'ossigeno (ROS) e sistemi antiossidanti

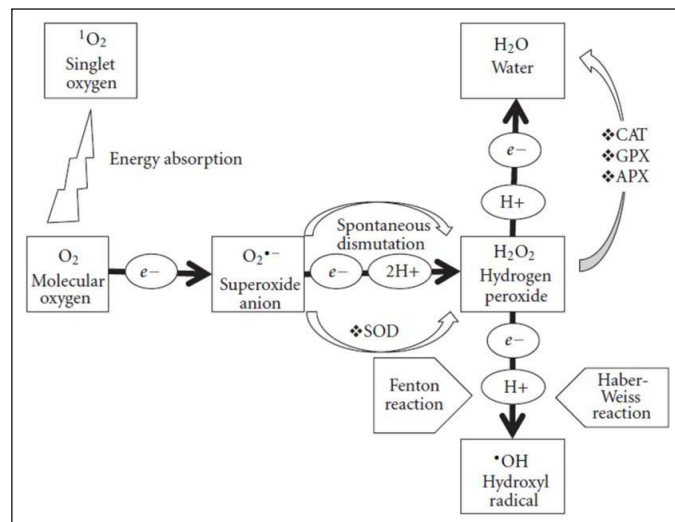


Fig. 1.20 Rappresentazione schematica della generazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS).

L'O₂ può andare incontro ad una serie di riduzioni (monovalenti) con produzione di O₂^{•-}, H₂O₂ e [•]OH; oppure, per trasferimento di energia, si ha la produzione dell'ossigeno singoletto (¹O₂). L'O₂^{•-} per mezzo di processi non enzimatici o catalizzati da enzimi (SOD) è dismutato a H₂O₂. Il H₂O₂ è convertito in H₂O per mezzo degli enzimi catalasi (CAT), ascorbato perossidasi (APX) e guaiacolo perossidasi (GPX) (Sharma *et al.*, 2012).

1.3.1.1 Siti di produzione delle ROS

Le ROS all'interno di una cellula possono essere prodotte a differenti livelli cellulari e a seguito di vari processi metabolici. I principali siti di produzione delle ROS sono, cloroplasti, mitocondri e perossisomi, seguiti da apoplasto, reticolo endoplasmatico, membrana plasmatica e parete cellulare (Apel *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2012).

In condizioni fisiologiche, la produzione e rimozione delle specie reattive sono processi finemente controllati al fine di mantenere un equilibrio dello stato redox, questo equilibrio, però, può venire meno quando, in situazioni di stress, vi è un eccesso di sintesi di ROS.

Una produzione a basse concentrazioni ma costante e definibile fisiologica delle ROS avviene in seguito al metabolismo aerobio a causa di un passaggio non corretto di elettroni che vengono deviati sull'O₂ in punti sbagliati nella catena di trasporto mitocondriale.

Nei cloroplasti i processi che portano alla produzione delle ROS sono principalmente due: riduzione dell'ossigeno molecolare da parte del flusso di elettroni del fotosistema I (PSI) a livello della ferridossina, processo noto come reazione di Mehler; sovraeccitazione, mediata dalla luce, della clorofilla nel fotosistema II (PSII) (Apel and Hirt, 2004).

1.3 - Stress, specie reattive dell'ossigeno (ROS) e sistemi antiossidanti

In condizioni fisiologiche il flusso di elettroni termina con la riduzione del NADP⁺ a NADPH, fornendo potere riducente per il ciclo di Calvin (Sharma *et al.*, 2012).

In condizioni di stress ambientale in cui si verifica la chiusura stomatica, per limitare l'eccessiva perdita di H₂O, come nel caso di situazioni di stress salino, si va incontro ad una minore disponibilità di CO₂. La minore fissazione di carbonio, conseguenza diretta della minore quantità di CO₂ ridotta nel ciclo di Calvin, causa una diminuzione della rigenerazione di NADP⁺ con un conseguente aumento del flusso degli elettroni dalla ferridossina (Fd) verso l'O₂ e successiva produzione di O₂^{•-} a seguito della reazione di Mehler ($2O_2 + 2Fd_{red} \rightarrow 2O_2^{\bullet-} + 2Fd_{ox}$) nel PSI. Una volta formato il O₂^{•-} è convertito in H₂O₂ per mezzo della superossido dismutasi (SOD) nello stroma o protonato a HO[•] nel lume (Gill and Tuteja, 2010; Sharma *et al.*, 2012; Venkateswarlu *et al.*, 2012).

Quando le piante sono esposte ad una intensità luminosa superiore alla loro reale capacità di assimilare CO₂ si verifica una sovrariduzione della catena di trasporto di elettroni che può portare all'inattivazione del fotosistema II (PSII) e ad un'inibizione della fotosintesi. Le piante sono in grado di dissipare questo eccesso di energia in vari modi ad esempio sotto forma di calore (quenching non fotochimico), per risonanza (da un pigmento all'altro) o per trasferimento di elettroni a vari accettori all'interno del cloroplasto (quenching fotochimico). Un'insufficiente dissipazione di energia può portare alla formazione di uno stato tripletto della clorofilla che può trasferire la sua energia all'O₂ con formazione dell'ossigeno singoletto (Ozgur *et al.*, 2013; Smirnov, 2005).

Un'altra via di produzione di ROS che dipende dal metabolismo cloroplastico è la fotorespirazione. In condizioni ambientali che comportano un aumento della temperatura o quando la concentrazione di CO₂ intracellulare è diminuita la Rubisco utilizza maggiormente l'O₂ come substrato, invece che la CO₂, rispetto a quanto avviene in condizioni normali. La Rubisco, quindi, agendo come ossigenasi, invece che come carbossilasi, favorisce la formazione di fosfoglicolato che, defosforilato, è traslocato dai cloroplasti ai perossisomi. Nei perossisomi avviene l'ossidazione del glicolato, per mezzo della glicolato ossidasi, con la produzione di H₂O₂.

In generale la produzione delle ROS nei mitocondri avviene principalmente a livello del complesso I e III. L'O₂ può essere ridotto a seguito del "trasporto inverso" degli elettroni dal complesso II al complesso I, quando ad esempio vi è una minore disponibilità di NAD⁺ (Turrens, 2003). A livello del complesso III invece l'ubiquinone ridotto dona gli elettroni al citocromo c₁ con la formazione di un intermedio radicalico instabile, l'ubisemiquinone il quale può, a sua volta, reagire facilmente con l'O₂ formando l'anione superossido (Murphy, 2009). I mitocondri sono

1.3 - Stress, specie reattive dell'ossigeno (ROS) e sistemi antiossidanti

dotati di specifici isoenzimi di SOD (MnSOD), di specifiche perossidasi (ascorbato perossidasi e glutatione perossidasi) e, secondo alcuni autori, di catalasi, enzimi deputati a rimuovere le ROS (Sharma *et al.*, 2012).

Nei tessuti vegetali, la produzione delle ROS a livello mitocondriale, è limitata dalla presenza di una ossidasi terminale diversa dalla citocromo ossidasi, ma che catalizza una reazione di riduzione dell'ossigeno tetravalente, la cosiddetta ossidasi alternativa (AOX). L'AOX porta gli elettroni direttamente dall'ubichinone all'ossigeno con formazione di acqua riducendo la presenza di ossigeno in questo compartimento cellulare e la sua possibile riduzione univalente (Vanlerberghe, 2013).

Nei perossisomi, a seguito di processi ossidativi come la β ossidazione degli acidi grassi, dell'attivazione di enzimi quali la glicolato ossidasi e flavina ossidasi, si produce H_2O_2 come anche $O_2^{\cdot-}$ (Sharma *et al.*, 2012) (Fig. 1.21).

Nella parete cellulare sono presenti diversi sistemi di produzione delle ROS, coinvolti sia in meccanismi di difesa che di differenziamento della parete cellulare. Tra questi particolarmente studiati anche per le loro implicazioni negli stress ricordiamo ammino ossidasi e poliammino ossidasi, che si possono trovare anche a livello citosolico (Angelini *et al.*, 2010; Cona *et al.*, 2006; Saha *et al.*, 2015). Le NADPH ossidasi presenti sul plasmalemma sono un altro importante sistema di produzione di superossido apoplastico fortemente coinvolto nelle risposte di difesa della pianta (Saha *et al.*, 2015) (Fig. 1.21).

1.3 - Stress, specie reattive dell'ossigeno (ROS) e sistemi antiossidanti

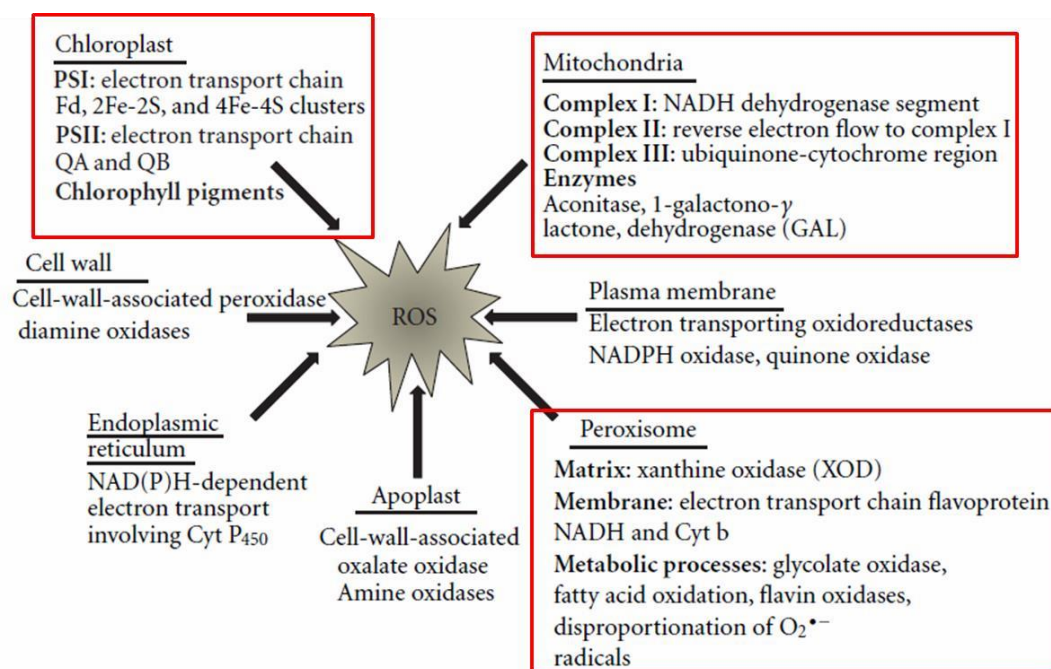


Fig. 1.21 Siti di produzione delle ROS in pianta.

Sono evidenziati in rosso i principali siti di produzione: cloroplasti, mitocondri e perossisomi (Modificato da Sharma *et al.*, 2012).

1.3 - Stress, specie reattive dell'ossigeno (ROS) e sistemi antiossidanti

1.3.2 Sistema di difesa dallo stress ossidativo

Le ROS hanno ruoli opposti che le vedono protagoniste tanto nel *signaling* quanto nel generare tossicità a livello cellulare, soprattutto quando viene meno l'equilibrio tra la loro produzione e la loro rimozione. Le ROS a basse concentrazioni partecipano come secondi messaggeri anche in processi di risposta cellulare agli stress come la chiusura stomatica e la morte cellulare programmata. E' stato osservato in *Arabidopsis*, come la chiusura stomatica non sia una conseguenza dell'aumento del H₂O₂ bensì una conseguenza della produzione di acido abscissico (ABA), dovuta all'aumento citosolico di H₂O₂ (Jannat *et al.*, 2011). Diversi sono i processi fisiologici che vengono controllati da alterati livelli delle ROS, dal ciclo cellulare all'irrigidimento delle pareti cellulari (Locato *et al.*, 2015)

Le cellule devono, quindi, attivare sistemi con diversi gradi di affinità per le ROS in modo sia da modularne i livelli e assicurarne basse concentrazioni intracellulari, per il loro corretto differenziamento, sia come secondi messaggeri in grado di attivare processi di difesa che hanno come risultato anche di evitare che le ROS vengano prodotte in quantità eccessive con conseguenti danni ossidativi di cellule e tessuti (Mittler, 2002; Sharma *et al.*, 2012).

I sistemi di difesa si possono schematizzare in non enzimatici ed enzimatici.

1.3.2.1 Componenti non enzimatiche: ascorbato e glutazione

Tra le componenti non enzimatiche hanno grande importanza alcune molecole tra cui ascorbato, glutazione, tocoferolo, carotenoidi e composti fenolici.

Le molecole più abbondanti e con un ruolo cruciale nel rispondere all'aumento della concentrazione delle ROS sono l'ascorbato (ASC) e il glutazione (GSH).

L'ascorbato o acido ascorbico è sintetizzato in tutte le piante, nei tessuti fotosintetici e non fotosintetici, raggiungendo, soprattutto nei tessuti verdi concentrazioni di diverse unità mM (Foyer *et al.*, 1983). E' una molecola a basso peso molecolare con un forte potere antiossidante, data la capacità di donare un elettrone in reazioni non enzimatiche ed enzimatiche. Questa molecola reagisce direttamente con il radicale idrossilico, anione superossido e l'ossigeno singoletto, preserva l'attività di enzimi con gruppi prostetici contenenti ioni metalli di transizione ed inoltre ha la capacità di ridurre la forma ossidata di un altro importante componente antiossidante, cioè l' α -tocoferolo (Noctor and Foyer, 1998; Padh, 1990).

Smirnof-Wheeler ipotizzarono e dimostrarono i meccanismi alla base della via di biosintesi dell'ascorbato (che prende, appunto, il nome dei due scopritori) che coinvolge le forme attivate degli zuccheri GDP-D-mannosio, GDP-L-galattosio, L-galattosio ed infine L-galactono-1,4-lactone

1.3 - Stress, specie reattive dell'ossigeno (ROS) e sistemi antiossidanti

che è convertito a L-acido ascorbico (Wheeler *et al.*, 1998), step identificato molto prima che l'intera via di Smirnoff-Wheeler fosse chiarita (Mapson and Breslow, 1958). Altra via di biosintesi è quella dell'acido D-galatturonico che è ridotto a acido L-galatturonico che è successivamente convertito in L-galactono-1,4-lactone, quest'ultimo è poi ossidato per mezzo dell'enzima L-galactono-1,4-lactone deidrogenasi (GALDH) ad acido ascorbico. L'enzima GALDH si trova a livello mitocondriale così che l'acido ascorbico sintetizzato può traslocare agli altri compartimenti cellulari o grazie al gradiente protonico elettrochimico o per diffusione facilitata. L'ascorbato non è distribuito in modo omogeneo nei vari compartimenti cellulari, il 90% è localizzato nel citoplasma ed una parte è esportato a livello apoplastico dove si pensa possa avere una funzione di prima difesa (Omasa *et al.*, 2002; Shao *et al.*, 2008) nonché di controllo della distensione cellulare (de Pinto and De Gara, 2004). Alterazioni dello stato redox e dei livelli di ASC in un tessuto sono spesso associati a stress ossidativi (de Pinto *et al.* 2012).

Il glutatione è un tripeptide formato da glutammina-cisteina-glicina, idrosolubile come l'ascorbato. Ha una localizzazione cellulare ubiquitaria, è presente a livello del citosol ed in organelli come cloroplasti, mitocondri, reticolo endoplasmatico e vacuoli (Foyer and Noctor, 2003). E' sintetizzato nel citosol e nei cloroplasti dalla γ -glutamylcisteina sintetasi (γ -ECS) e successivamente dalla glutatione sintetasi (GS) (Sharma *et al.*, 2012).

Il glutatione è coinvolto in molti processi quali crescita e divisione cellulare, trasduzione del segnale, regolazione enzimatica, sintesi di proteine e acidi nucleici, regolazione dell'espressione di geni stress-dipendenti, inibizione dell'attività di prodotti tossici. Reagisce con le ROS come l'anione superossido, il radicale idrossilico ed il perossido di idrogeno fungendo da forte agente riducente impedendo, così, danni a livello delle macromolecole. Nel suo stato ossidato è formato da due molecole di glutatione legate da un ponte disolfuro tra residui di cistina, ed è tipicamente indicato con la sigla GSSG. Data l'importanza del glutatione come molecola coinvolta nei meccanismi di detossificazione dai radicali liberi, i suoi livelli e il suo stato redox possono essere usati come marker di stress. Similmente a quanto si verifica per l'ASC, l'alterazione del rapporto tra la forma ridotta e ossidata (GSH/GSSG), durante la degradazione del H₂O₂, rappresenta un segnale per la cellula (Foyer and Mullineaux, 1994; Foyer and Mullineaux, 1998; Li and Jin, 2007).

E' stato dimostrato in piante di pomodoro (*Lycopersicon esculentum*) come durante lo stress salino, che comporta un aumento della concentrazione delle ROS, un aumento esogeno di ascorbato nel mezzo di crescita favorisca la risposta e la sopravvivenza allo stress con un aumento della germinazione e una diminuzione della perossidazione lipidica (Shalata and Neumann, 2001). Un'altra dimostrazione dell'importanza dell'ascorbato in condizioni di stress salino è data dal

1.3 - Stress, specie reattive dell'ossigeno (ROS) e sistemi antiossidanti

confronto tra un mutante *vtc-1* di *Arabidopsis* e il modello wild-type (WT). Il mutante *vtc-1* ha un contenuto di ASC pari al 30-60% rispetto al WT. A causa dei diversi livelli di ASC, in condizioni di stress, le piante mutate hanno una concentrazione maggiore di H₂O₂ rispetto al WT. Nei mutanti *vtc-1*, infatti, come conseguenza di un basso rapporto tra ascorbato ridotto e ascorbato totale, si verifica anche una ridotta attività degli enzimi implicati nel ciclo ASC-GSH (Huang *et al.*, 2005).

Anche il glutathione gioca un ruolo protettivo in condizioni di stress salino, ciò è dimostrato dalle osservazioni condotte su *Brassica napus L.* WT e su un suo mutante tollerante al sale. Le piante WT mostrano un aumento del contenuto di glutathione rispetto alle piante mutate. Questo dimostrerebbe l'importanza per la piante WT di attivare la biosintesi di glutathione al fine di mitigare i danni ossidativi indotti dallo stress salino (Hussain *et al.*, 2008). Oltre ai livelli di glutathione è importante la capacità di cellule e tessuti di mantenere il glutathione nello stato ridotto. In piante di cotone, per esempio, è stato visto come le cultivar tolleranti allo stress salino abbiano un rapporto glutathione ridotto/glutathione ossidato più alto rispetto alle cultivar stress-sensibili (Gosset *et al.*, 1996; Hossain *et al.*, 2011).

1.3.2.2 Componenti enzimatiche

La capacità delle piante di modulare la produzione di ROS in presenza o meno di uno stress è anche dovuta all'attività di enzimi che utilizzano come substrati le ROS.

Questi enzimi possono essere divisi in due gruppi. La superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT) e l'ascorbato perossidasi (APX) fanno parte del gruppo di enzimi coinvolti nel metabolismo delle ROS. Altri enzimi importanti, anche se con un ruolo indiretto, sono monodeidroascorbato reduttasi (MDHAR), deidroascorbato reduttasi (DHA) e glutathione reduttasi (GR), che rappresentano il gruppo di enzimi implicati nel riciclo dei due metaboliti redox, di cui si è discusso nel precedente paragrafo, ascorbato e glutathione. Molti altri enzimi contribuiscono direttamente o indirettamente a regolare l'omeostasi redox cellulare e i livelli di ROS (tioredossine, glutaredossine, glutathione perossidasi, perossidasi di secrezione, solo per citare i più studiati), ma non vengono trattati in questa tesi perché non sono stati presi in considerazione nella parte sperimentale.

Come abbiamo detto la SOD catalizza la dismutazione dell'O₂⁻ a H₂O₂, sia l'APX che la CAT reagiscono con il H₂O₂ portando alla formazione di H₂O e O₂. La diversa affinità dell'APX (μM) e della CAT (mM) verso il perossido è indice del diverso ruolo dei due enzimi; l'APX è responsabile della modulazione fine delle ROS quando queste hanno funzione di secondi messaggeri al contrario, in condizioni di elevate produzioni di perossido di idrogeno, interviene la CAT

1.3 - Stress, specie reattive dell'ossigeno (ROS) e sistemi antiossidanti

responsabile della rimozione delle ROS, enzima chiave per diverse condizioni di forte stress ossidativo (Mittler, 2002), anche se tra i *pathway* di *scavenging* delle ROS attivati in situazioni di stress ossidativo vi è anche quello del ciclo ASC-GSH, di cui l'APX è il primo enzima coinvolto (Fig. 1.22).

Come detto sopra l'APX riduce il H_2O_2 ad H_2O per mezzo dell'ascorbato che viene così ossidato a monodeidroascorbato (MDHA). Il MDHA è un radicale, non tossico per la cellula in quanto può reagire con l' O_2 per dar luogo a superossido solo molto lentamente, mentre va in contro a dismutazione spontaneo molto più rapidamente. Il processo di dismutazione, che produce ASC e deidroascorbato (DHA), oltre ad avvenire spontaneamente è anche catalizzato dall'enzima MDHA riduttasi (MDHAR), che riduce il MDHA ad ASC con ossidazione del NADPH ad $NADP^+$. Il DHA, ultimo prodotto dell'ossidazione dell'ASC, può essere ridotto ad ascorbico per mezzo dell'enzima deidroascorbato riduttasi (DHAR). La DHAR usa come donatore di elettroni il GSH con produzione della forma ossidata, GSSG che, a sua volta, viene ridotto nuovamente a GSH per mezzo della glutatione reduttasi (GR) NADPH dipendente (De Gara *et al.*, 2010).

Il ciclo ASC-GSH ha la funzione di rigenerare i metaboliti coinvolti nel ripristino dell'equilibrio redox, ascorbato, glutatione e NAD(P)H oltre a contribuire direttamente alla rimozione delle ROS (Foyer and Noctor, 2011; Sgobba *et al.*, 2014)

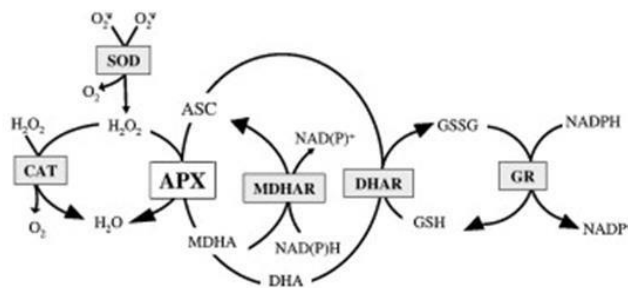


Fig. 1.22 Ciclo ASC-GSH.

Ruolo centrale dell'APX nello *scavenging* delle ROS e nel ciclo ASC-GSH

1.4 – Obiettivo della tesi

Sulla base di quanto detto, abbiamo voluto verificare se la maggior resistenza allo stress salino della varietà Baldo rispetto a Vialone Nano potesse essere dovuta ad un miglior capacità metabolica di controllare lo stress ossidativo. L'identificazione di specifiche vie metaboliche (sintesi e turnover di metaboliti, attività di enzimi ROS *scavenger* o correlati al controllo di specie reattive, funzionalità di specifici canali e trasportatori ionici) coinvolte nelle risposte allo stress salino e potenziate nelle varietà resistenti, rappresenta un obiettivo importante per la selezione di nuove varietà o per la scelta delle varietà da coltivare in uno specifico ambiente.

Pertanto plantule di riso varietà Baldo, maggiormente resistente allo stress salino, e varietà Vialone Nano, sono state analizzate per le principali vie metaboliche coinvolte nel controllo redox cellulare, il sistema ascorbato – glutatione.

Dalle due varietà sono state inoltre ottenute colture cellulari che, data la maggior omogeneità e uniformità di trattamento rispetto al sistema pianta, permettono uno studio più fine dei parametri di cui si vogliono studiare le variazioni indotte dalla presenza di uno stress salino.

Utilizzando le linee cellulari ottenute dalle due varietà sono stati studiati in modo più dettagliato l'andamento dei singoli metaboliti e sistemi enzimatici coinvolti nel controllo delle ROS, a livello di attività enzimatica e/o di espressione genica. Le colture cellulari sono anche state sottoposte a studi di ionomica e di espressione genica di canali responsabili dei flussi ionici di Na⁺, Cl⁻ e K⁺.

Tesi di dottorato in Bioingegneria e Bioscienze, Scienze e Tecnologie degli Alimenti e della Nutrizione, di Maria Beatrice Ronci, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 04/05/2017.
La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte.

2. MATERIALI E METODI

Maria Beatrice Ronci

2. Materiali e metodi

2.1 Crescita delle plantule

Per effettuare gli esperimenti sulle piante delle varietà Vialone Nano e Baldo sono stati ottenuti dei *seedling* come di seguito descritto. Prima della semina i semi, delle rispettive varietà Vialone Nano e Baldo, sono stati sterilizzati. Il processo di sterilizzazione prevede un lavaggio, di circa 1 min, con una soluzione contenente NaClO 1:10. Dopo aver eliminato la soluzione di NaClO sono stati effettuati 5 lavaggi, di 1 min l'uno, con d₂H₂O sterile. Dopo i lavaggi i semi sono stati lasciati in imbibizione per 3 h in d₂H₂O sterile. Al termine dell'imbibizione si è proceduto alla semina su due dischi, posti in piastre Petri, di carta assorbente. I semi sono stati fatti crescere in camere di propagazione secondo i seguenti parametri di crescita: 25 °C e buio.

Ipocotili di circa 2-3 cm di lunghezza sono stati raccolti per la determinazione del contenuto di ascorbato e glutatione (paragrafo 2.5) e per i saggi dell'attività enzimatiche (paragrafo 2.6).

2.2 Colture cellulari: mezzo e condizione di crescita

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando come modello sperimentale sospensioni cellulari, non embriogeniche, di due varietà di riso (*Oryza sativa japonica* L.), Vialone Nano e Baldo.

Per la generazione del callo sono state utilizzate cariossidi mature, delle due varietà di riso, decorticate e sterilizzate secondo il seguente protocollo:

- Incubazione con una soluzione contenente NaClO 3,5% e TWEEN20 per 20 min sotto agitazione e successivamente con una soluzione contenente solo NaClO 3,5% per 5 min.
- 5 lavaggi con d₂H₂O.

Dopo sterilizzazione e lavaggio, i semi sono stati fatti crescere nel terreno solido N6 contenente, per 1 L di soluzione:

- L-1 saccarosio (30 g)
- Chu [N6] *Medium Salt Mixture and Vitamins* (C0204, Duchefa) (4 g)
- L-1 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) (2 mg)
- Agar (0,8%)

La soluzione è stata portata a pH 5.8 e versata su piastre Petri su cui sono stati fatti crescere i semi in assenza di luce, a 25 °C e ogni due settimane trasferiti in un nuovo mezzo di crescita.

Dopo pochi mesi dalla semina, il callo, divenuto friabile, è stato trasferito nel terreno N6 liquido. La sospensione cellulare è stata fatta crescere a 25 °C in condizioni di buio e sotto agitazione. Le cellule, ogni settimana, sono state filtrate per eliminare gli aggregati cellulari e rendere la sospensione cellulare più omogenea possibile. Ottenuta una sospensione omogenea,

2. Materiali e metodi

ogni settimana, 2 mL di cellule, dopo centrifugazione, sono stati trasferiti in 50 mL del mezzo di crescita.

Le cellule sono state trattate con NaCl 50, 100 e 150 mM, aggiunto al terreno al terzo giorno di crescita, e raccolte, per filtrazione, a diversi tempi dal trattamento in base al tipo di esperimento (Fatto in collaborazione con l'Università di Padova).

2.3 Vitalità e crescita cellulare

La morte cellulare è stata valutata misurando allo spettrofotometro l'assorbanza della sospensione cellulare sottoposta a colorazione con Evans blue, in accordo con Gaff and Okong'o-Ogola, (1971). Questo saggio si basa sulla capacità del colorante, sopracitato, di permeare le membrane delle cellule morte che vanno incontro a perdita dell'integrità.

Il saggio è stato condotto a partire da 1 mL di sospensione cellulare (generata secondo il protocollo al paragrafo 2.2) sottoposta a trattamento con NaCl 50, 100 e 150 mM, a diversi intervalli di tempo. La sospensione cellulare è stata incubata 15 min a temperatura ambiente con la soluzione di Evans blue ad una concentrazione finale di 0,05%. Dopo l'incubazione sono stati effettuati una serie di lavaggi con d_2H_2O fino all'eliminazione completa del colorante. Dopo i lavaggi le cellule sono state incubate a 55 °C per 30 min con una soluzione contenente 50% MeOH e 1% di sodiododecilsolfato (SDS).

Al termine dell'incubazione il sovrantante è stato misurato spettrofotometricamente a 600 nm. Il risultato è stato espresso confrontando l'assorbanza di cellule morte al 100% bollite per 45 min.

Per la valutazione della crescita sono state filtrate, a diversi giorni di crescita, cellule in coltura non trattate o sottoposte a trattamento con NaCl 50, 100 e 150 mM. Dopo la filtrazione le cellule sono state pesate per registrare il peso fresco e poi messe in stufa a 40 °C per 24 h per la valutazione del peso secco.

I dati della vitalità e crescita cellulare sono stati analizzati con il T TEST e sono state considerate statisticamente significative le differenze con $p < 0,01$.

2. Materiali e metodi

2.4 Determinazione del H₂O₂ extra- ed intra- cellulare

Il saggio colorimetrico per la determinazione del H₂O₂ **extracellulare**, in accordo con Bellincampi *et al.*, (2000), si basa sulla capacità del H₂O₂ (presente nel mezzo di crescita) di ossidare, in un ambiente acido, il Fe²⁺ a Fe³⁺ con la formazione del complesso Fe³⁺ + xilenolo arancio, misurabile spettrofotometricamente.

Al mezzo di crescita cellulare (V= 500 µL) è stato aggiunto un egual volume di una soluzione contenente:

- Ammonio solfato ferroso ((NH₄)₂Fe(SO₄)₂) (500 µM)
- Acido solforico (H₂SO₄) (50 mM)
- Xilenolo arancio (200 µM)
- Sorbitolo (200 mM)

La miscela di reazione è stata incubata per 45 min a temperatura ambiente al buio. Al termine dell'incubazione si è proceduto alla lettura allo spettrofotometro dei campioni alla lunghezza d'onda fissa di 560 nm.

Una volta registrati i valori di Abs per ciascun campione si è proceduto al calcolo basato sul principio della legge di Lambert-Beer, ovvero $Abs = c \cdot \epsilon \cdot l$.

La concentrazione (c) rappresenta l'incognita ed il cammino ottico (l) si assume che, per una cuvetta, sia di 1 cm. A seguito di queste semplificazioni risulta quindi che $c = Abs/\epsilon$.

Il valore di ϵ è stato ricavato costruendo una curva standard con concentrazioni note di H₂O₂. I valori sono stati espressi come µmoli di H₂O₂/g di peso secco.

La determinazione del H₂O₂ **intracellulare** è stata eseguita per mezzo dell'utilizzo della sonda non-fluorescente diidrorodamina 123 (DHR123) (Sigma-Aldrich) che reagendo con il H₂O₂ porta alla formazione della rodamina 123, fluorescente.

La sospensione cellulare (V= 1 mL) è stata incubata, sotto agitazione, con la sonda DHR123 ad una Cf= 20 µM per 15 min. Dopo l'incubazione sono stati effettuati 3 lavaggi con 1 mL di mezzo di crescita ed è stata misurata la fluorescenza con il microscopio DM5000 (Leica) con un filtro di eccitazione con range da 450 a 490 nm e un filtro barriera a 510 nm.

I dati del H₂O₂ intra ed extracellulare sono stati analizzati con il T TEST e sono state considerate statisticamente significative le differenze con $p < 0,01$.

2. Materiali e metodi

2.5 Determinazione del contenuto endogeno di ascorbato e glutatione

I saggi sono stati condotti su aliquote da 0,5 g di cellule ottenute secondo il protocollo descritto nel paragrafo 2.2 e conservate a -80 °C.

Per l'omogenizzazione delle cellule è stato utilizzato pestello e mortaio in ceramica (preraffreddato e mantenuto in ghiaccio per tutta la procedura sperimentale) e N₂ liquido.

Al campione, ridotto in polvere, è stato aggiunto Acido Metafosforico (AM) al 5%, in rapporto 1:4 (peso: volume) (p/v).

La soluzione, contenente AM 5% e il campione, è stata raccolta e centrifugata in una centrifuga da banco (Eppendorf Centrifuge 5804R) secondo le seguenti condizioni sperimentali: 20.000*g per 15 min a 4 °C. Dopo la fase di centrifugazione il sovrantante (SN) deproteinizzato e contenente i metaboliti d'interesse (ASC e GSH), è stato raccolto e conservato in ghiaccio.

Sia per la determinazione dell'ASC (ascorbato) che del GSH (glutatione) è stato utilizzato uno spettrofotometro UV-VIS modello UV – 1800 (Shimadzu).

2.5.1 Determinazione del contenuto di ascorbato: saggio colorimetrico

In accordo con Kampfenkel *et al.*, (1995) il protocollo utilizzato, a cui sono state apportate delle modifiche, si basa su una misurazione spettrofotometrica di un composto che si forma a seguito di una reazione colorimetrica di ossido-riduzione.

Il principio base vede la riduzione di una soluzione di FeCl₃ (cloruro ferrico) a FeCl₂ (cloruro ferroso) e l'ossidazione di ASC a DHA (deidroascorbato). L'ascorbato quindi cede i suoi elettroni al Fe³⁺ che, nella sua forma ridotta Fe²⁺ si lega con l' α , α' – dipiridil formando un complesso, di colore rosa, che ha il suo massimo di assorbimento a 525 nm.

Partendo dal presupposto che tramite questo saggio si può determinare il contenuto di ASC totale (ASC + DHA) e di ASC ridotto e considerato che nel SN (estratto secondo la procedura del paragrafo 2.5) si trova una miscela composta sia da ASC ridotto che ASC ossidato (DHA), prima di tutto si deve procedere alla conversione di tutto il DHA nella forma ridotta, per mezzo di un agente riducente, in questo caso il ditiotreitolo (DTT).

Sono state allestite due reazioni, rispettivamente, per la determinazione dell'ASC totale e per la determinazione dell'ASC ridotto.

La miscela di reazione per l'ASC totale è stata allestita secondo l'ordine riportato di seguito in un volume finale (Vf) di 1 mL:

- Campione (SN) (max. 100 μ L)
- Tampone sodio-fosfato 0,15 M pH 7.4 + EDTA 5mM (250 μ L)

2. Materiali e metodi

- DTT 10 mM sciolto in acqua (50 μ L)

Dopo l'aggiunta di DTT i campioni sono stati incubati per 10 min a temperatura ambiente e dopo l'incubazione sono stati aggiunti 50 μ L di N-Etilmaleimide (NEM) 0,5% per disattivare la reazione con il DTT.

Ai campioni sono stati aggiunti i composti di seguito riportati:

- Acido tricloroacetico (TCA) 10% (p/v) sciolto in acqua (150 μ L)
- Acido Orto-fosforico (H_3PO_4 85%) 44% (v/v) sciolto in acqua (200 μ L)
- α, α' - dipiridil 4% (p/v) sciolto in EtOH 70% (v/v) (200 μ L)
- $FeCl_3$ 6,3% (p/v) sciolto in TCA 10% (p/v) (50 μ L)

La miscela di reazione per l'ASC ridotto è stata allestita sostituendo il DTT ed il NEM con 100 μ L di acqua.

Le provette così allestite sono state incubate per 40 min a 40 °C. Al termine dell'incubazione si è proceduto alla lettura allo spettrofotometro dei campioni alla lunghezza d'onda fissa di 525 nm.

Prima della lettura dei campioni si è proceduto all'azzeramento dello strumento per mezzo dei bianchi preparati secondo lo schema sopra riportato, sostituendo il campione con un volume pari di AM 5%.

Una volta registrati i valori di Abs per ciascun campione si è proceduto al calcolo.

Il calcolo si basa sul principio della legge di Lambert-Beer, ovvero $Abs = c \cdot \epsilon \cdot l$. La concentrazione (c) rappresenta l'incognita ed il cammino ottico (l) si assume che, per una cuvetta, sia di 1 cm. A seguito di queste semplificazioni risulta quindi che $c = Abs / \epsilon$.

Il valore di ϵ è stato ricavato costruendo una curva standard con concentrazioni note di ASC, su un range da 0 μ g/mL a 10 μ g/mL. Una volta calcolati i livelli di ASC totale e ridotto è stato possibile determinare, per sottrazione, anche il contenuto di DHA (DHA = ASC TOT - ASC ridotto).

2.5.2 Determinazione del contenuto di glutazione: saggio enzimatico

Il saggio per la determinazione del GSH, in accordo con Zhang and Kirkham, (1996), si basa su due reazioni, una di ossidoriduzione ed un'altra che prevede un riciclo enzimatico.

- La prima reazione di ossidoriduzione è tra il GSH ridotto ed il composto 5, 5'-ditio-bis 2-nitrobenzoic acid (DTNB). Dalla reazione si forma, per riduzione di DTNB, il TNB, composto cromoforo di colore giallo misurabile spettrofotometricamente a 412 nm, ed il complesso GS-TNB (derivato dalla fusione di GSH + TNB).

2. Materiali e metodi

- Il GS-TNB, prodotto dalla reazione di ossidoriduzione, viene "ciclicamente" ridotto, per mezzo dell'enzima glutatione riduttasi (GR) NADPH dipendente, con la rigenerazione di GSH ed il rilascio di TNB.

La GR, inoltre, oltre a ridurre il GSSG eventualmente prodotto nella prima reazione, può anche ridurre il GSSG presente, in forma endogena, nel SN (come per l'ASC anche per il GSH vale il principio secondo cui nel SN si trova un pool di metaboliti come l'ASC ed il GSH nelle loro forme ridotte o ossidate in proporzione e relazione allo stato redox della cellula).

Questo metodo permette sia la determinazione del contenuto di GSH totale (GSH + GSSG) che del contenuto del GSSG. Per la determinazione del GSSG si deve "mascherare" la forma ridotta GSH per mezzo dell'aggiunta di 2-vinilpiridina, in grado di "schermare" i gruppi -SH del glutatione ridotto.

Per la determinazione del GSH totale e del GSSG sono state allestite, rispettivamente, due reazioni.

Prima dell'allestimento della reazione sono state allestite due serie di provette per la preparazione del campione (il campione (SN) è stato preparato secondo il protocollo riportato al paragrafo 5.5):

| GSH TOTALE | GSSG |
|--|--|
| Campione (SN) (100 µL) | Campione (SN) (100 µL) |
| Tampone sodio-fosfato 0,5 M pH 7.5 In rapporto 1:1,5 (campione:tampone (v/v)) (150 µL) | Tampone sodio-fosfato 0,5 M pH 7.5 In rapporto 1:1,5 (campione:tampone (v/v)) (150 µL) |
| d ₂ H ₂ O (10 µL) | 2- vinylpiridine (10 µL) |
| | La 2- vinylpyridine è stata fatta reagire, sotto cappa chimica, per 1 h a RT |

L'analisi spettrofotometrica della cinetica enzimatica è stata condotta allestendo la seguente miscela di reazione in cuvetta (V_f= 1 mL):

- Tampone sodio-fosfato 143 mM pH 7.5 + EDTA 7,14 mM + DTNB 0,86 mM (700 µL)
- NADPH (N7505, Sigma) 40 mM (5 µL)
- Campione (allestito secondo la procedura descritta sopra) (volumi variabili: 5-10 µL per la determinazione del GSH; 50-100 µL per la determinazione del GSSG)
- d₂H₂O per arrivare a V_f= 1 ml

2. Materiali e metodi

La reazione è stata attivata al momento dell'aggiunta dell'enzima GR (G3664, Sigma) (Cf in cuvetta di 3 U/mL) ed è stata monitorata seguendo la variazione di assorbanza a 412 nm in 90 sec.

Oltre ai campioni sono stati preparati i bianchi (sia per la serie del GSH totale che per la serie del GSSG) allestiti sostituendo al posto del volume del campione un uguale volume di AM 5%.

I valori ottenuti dalla lettura del bianco sono stati sottratti ai valori ottenuti dal calcolo dei campioni.

Il calcolo è stato condotto sempre basandosi sulla legge di Lambert-Beer e prendendo come valore di ϵ quello ottenuto dalla retta di taratura costruita analizzando l'attività della cinetica enzimatica della GR su una serie di concentrazioni note di GSSG (5, 10, 15, 25 e 35 μ M). I valori di GSSG sono stati calcolati in modo analogo al calcolo del GSH totale ma con l'accortezza di dividere per due i valori ottenuti. Il livello di GSH ridotto è stato calcolato sottraendo al GSH totale il valore del GSSG.

2.6 Estrazione proteica e dosaggio con il metodo Bradford

I saggi sono stati condotti su aliquote da 0,5 g di cellule, ottenute secondo il protocollo descritto nel paragrafo 2.2 e conservate a -80 °C.

Per l'omogenizzazione delle cellule è stato utilizzato pestello e mortaio in ceramica (preraffreddato e mantenuto in ghiaccio per tutta la procedura sperimentale) e N₂ liquido.

Una volta ridotto il campione in polvere, è stato aggiunto il buffer di estrazione, in rapporto 1:6 (peso: volume) (p/v) costituito da:

- Tris-HCl 50 mM pH 7.5
- BSA 0,1% (p/v) (aggiunto al momento)
- Cisteina 0,05% (p/v) (aggiunto al momento)
- ASC 1 mM (aggiunto al momento) per il saggio dell'APX totale (citosolica + plasmidiale)

L'omogenato è stato recuperato e centrifugato secondo le seguenti condizioni sperimentali:

20.000*g per 15 min a 4 °C (Eppendorf Centrifuge 5804R).

Al termine della centrifugazione il SN, contenente l'estratto proteico, è stato raccolto e si è proceduto alla determinazione della concentrazione proteica tramite il metodo di Bradford (1976).

Il saggio è stato allestito aggiungendo in provetta i reagenti secondo il seguente ordine:

- 200 μ L di colorante BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (500-0006, Bio-Rad)

2. Materiali e metodi

- Campione (SN) (5 μ L)
- d_2H_2O (quantità per arrivare ad un Volume finale (Vf) di 1 mL) (795 μ L)

I campioni sono stati incubati per 15 min a RT. Durante i 15 min di incubazione si verifica un legame tra il colorante ed i residui amminoacidici (es. arginina) presenti nelle catene amminoacidiche in soluzione. Il complesso colorante-amminoacidi ha il suo massimo di assorbimento a 595 nm, lunghezza d'onda a cui sono state effettuate le letture.

Prima della lettura dei campioni si è proceduto all'azzeramento dello spettrofotometro (UV-visibile modello Shimadzu UV-1800) per mezzo dei bianchi preparati secondo lo schema sopra riportato, sostituendo il campione con un egual volume di d_2H_2O .

La concentrazione proteica dei campioni (espressa in mg/mL) è stata calcolata seguendo il principio di Lambert – Beer, ovvero dividendo l'Abs media registrata per ciascun campione per il coefficiente di estinzione molare (ϵ) della retta di taratura costruita su concentrazioni note di albumina di siero bovino (BSA) (A4503, Sigma).

Dopo la quantificazione, l'estratto proteico è stato utilizzato per i saggi enzimatici riportati nei paragrafi di seguito utilizzando uno spettrofotometro UV-VIS modello UV – 1800 (Shimadzu).

2.6.1 Saggio dell'attività enzimatica dell'ascorbato perossidasi (APX) totale e citosolica

L'attività dell'APX (EC 1.11.1.11), in accordo con de Pinto *et al.*, (2000), è stata misurata seguendo l'ossidazione dell'ASC H_2O_2 dipendente a 290 nm in una mix di reazione (Vf= 1 mL) composta da:

- Tampone sodio-fosfato 100 mM pH 6.4 per arrivare a Vf= 1 ml
- Estratto proteico (volume corrispondente a 5-10 μ g)
- ASC 50 mM (7 μ L)
- H_2O_2 17 mM (10 μ L)

E' stato usato un ϵ di 2,7 $mM^{-1}cm^{-1}$ per l'ASC

L'attività dell'APX totale è stata misurata usando lo stesso protocollo utilizzato per l'APX citosolica, l'unica modifica vede la presenza di ASC 1 mM nel tampone di estrazione (vedi paragrafo 2.6).

2. Materiali e metodi

2.6.2 Saggio dell'attività enzimatica della deidroascorbato reduttasi (DHAR)

L'attività della DHAR (EC 1.8.5.1), in accordo con de Pinto *et al.*, (2000), è stata misurata seguendo la produzione di ASC, a partire dal DHA, per mezzo dell'ossidazione di GSH a GSSG, a 265 nm in una mix di reazione ($V_f = 1$ mL) composta da:

- Tampone sodio-fosfato 100 mM pH 6.4 per arrivare a $V_f = 1$ ml
- Estratto proteico (volume corrispondente a 5-10 μ g)
- GSH 100 mM (20 μ L)
- DHA 100 mM (10 μ L)

Il DHA è stato preparato facendo reagire l'ASC 100 mM con qualche goccia di bromo. All'inizio della reazione la soluzione ha una colorazione arancione (colore del bromo) che diventa incolore man mano che l'ASC viene ossidato a DHA e viene rimosso l'eccesso di bromo per aspirazione sotto cappa chimica.

E' stato usato un ϵ di 13,5 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ per il GSH.

2.6.3 Saggio dell'attività enzimatica della monodeidroascorbato reduttasi (MDHAR)

L'attività della MDHAR (EC 1.6.5.4), in accordo con de Pinto *et al.*, (2000), è stata misurata seguendo l'ossidazione di NADH, a seguito della riduzione del MDHA ad ASC, a 340 nm in una mix di reazione ($V_f = 1$ mL) composta da:

- TRIS HCl 50 mM pH 8 per arrivare a $V_f = 1$ ml
- Estratto proteico (volume corrispondente a 20-50 μ g)
- ASC 100 mM (10 μ L)
- NADH (N8129, Sigma) 10 mM (20 μ L)
- AOX 50 U/mL (A0157, Sigma) (4 μ L)

E' stato usato un ϵ di 6,2 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ per il NADH.

2. Materiali e metodi

2.6.4 Saggio dell'attività enzimatica della glutatione reduttasi (GR)

L'attività della GR (EC 1.6.4.2), in accordo con de Pinto *et al.*, (2000), è stata misurata seguendo l'ossidazione del NADPH, a seguito della riduzione del GSSG a GSH, a 340 nm in una mix di reazione ($V_f = 1$ mL) composta da:

- Tampone sodio-fosfato 100 mM pH 7.2 per arrivare a $V_f = 1$ ml
- Estratto proteico (volume corrispondente a 50-100 μ g)
- NADPH (N7505, Sigma) 10 mM (10 μ L)
- GSSG 100 mM (10 μ L)

E' stato usato un ϵ di 6,2 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ per l'NAD(P)H.

2.6.5 Saggio dell'attività enzimatica della catalasi (CAT)

L'attività della CAT (EC 1.11.1.6), in accordo con Sgobba *et al.*, (2014), è stata misurata seguendo la dismutazione del H_2O_2 a H_2O e O_2 a 240 nm in una mix di reazione ($V_f = 1$ mL) composta da:

- Tampone sodio-fosfato 100 mM pH 7 per arrivare a $V_f = 1$ ml
- Estratto proteico (volume corrispondente a 50-100 μ g)
- H_2O_2 (5-10 μ L della diluizione 1:3)

E' stato usato un ϵ di 0,04 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ per l' H_2O_2 in accordo con Veljovic-Jovanovic *et al.*, (2001).

2.6.6 Saggio dell'attività enzimatica della superossidodismutasi (SOD)

Per il saggio dell'attività della SOD (EC 1.15.1.1), in accordo con Beauchamp and Fridovich, (1971), è stata misurata la riduzione del Nitroblu di tetrazolio (NBT) a blu di formazano, per mezzo dell'anione superossido ($\text{O}_2^{\bullet-}$); che ha il suo massimo di assorbimento a 560 nm. La SOD compete con l'NBT, inibendone la riduzione (Fatto in collaborazione con l'Università di Padova).

2.7 Estrazione dell'RNA totale mediante TRIzol e trattamento con DNasi

L'RNA è stato estratto da aliquote da 0,1 g di cellule, a campione, generate secondo il protocollo al paragrafo 2.2 e conservate a -80 °C.

Per l'estrazione dell'RNA totale è stato utilizzato il reagente TRIzol (15596, Thermo Fisher Scientific), una soluzione monofasica contenente fenolo e guanidina isotiocianato.

2. Materiali e metodi

Per l'omogenizzazione delle cellule è stato utilizzato pestello e mortaio in ceramica (preraffreddato e mantenuto in ghiaccio per tutta la procedura sperimentale) e N₂ liquido.

In accordo con il protocollo riportato sulla scheda tecnica, sono stati aggiunti 2 mL di TRIzol al campione, precedentemente ridotto in polvere. Il campione è stato recuperato e centrifugato secondo le seguenti condizioni sperimentali: 20.000*g per 10 min a 4 °C (Eppendorf Centrifuge 5804R). Il SN è stato recuperato e vi sono stati aggiunti 200 µL di cloroformio freddo, il tutto è stato incubato 10 min a temperatura ambiente e successivamente centrifugato a 20.000*g per 10 min a 4 °C.

Dopo la centrifugazione è stata recuperata la fase superiore, acquosa e contenente l'RNA (facendo attenzione a non contaminare con la fase inferiore contenente DNA e proteine) a cui sono stati aggiunti 500 µL di isopropanolo, il tutto è stato incubato 10 min a RT e successivamente centrifugato a 20.000*g per 10 min a 4 °C.

Dopo la fase di centrifugazione il SN è stato eliminato ed il pellet, contenente l'RNA, lavato con EtOH 80% freddo e riprecipitato centrifugando a 7.500*g per 5 min a 4 °C, la procedura è stata eseguita per tre volte.

Il pellet è stato fatto asciugare sotto cappa chimica per 1 h per eliminare completamente eventuali tracce di EtOH. Il pellet asciutto è stato risospeso, delicatamente, in H₂O nuclease-free. Il campione risospeso è stato incubato 5 min a 65 °C, per assicurare una completa risospensione del campione.

Per verificare la purezza del campione è stata fatta una lettura allo spettrofotometro (TECAN Infinite 200 PRO) del rapporto a 260/280. Il rapporto a 260/280 indica la contaminazione da proteine e deve essere circa pari a 2. L'RNA è stato quantificato a 260 nm.

Per eliminare il DNA genomico è stato effettuato un trattamento con il kit TURBO DNA-free (AM1907, Applied Biosystems), secondo il protocollo di seguito riportato in un volume di reazione pari a 50 µL:

- Turbo DNase Buffer 10X (5 µL)
- Turbo DNase 2 U/µL (1 µL)
- RNA [200] ng/µL (39 µL, corrispondenti a 8 µg)

La reazione è stata attivata incubando i campioni in un termociclatore (Eppendorf Mastercycler nexus gradient flexid) impostato a 37 °C per 1 h. A fine incubazione sono stati aggiunti, alla mix di reazione, 5 µL di Inactivation Reagent che è stato fatto reagire 5 min a RT, mixando di tanto in

2. Materiali e metodi

tanto per evitarne la precipitazione. In seguito i campioni sono stati centrifugati a 10.000*g per 1,5 min ed il SN è stato recuperato e quantificato nuovamente a 260 nm.

2.7.1 Sintesi di cDNA

Per la sintesi di cDNA è stato utilizzato il kit High Capacity cDNA Reverse Transcription, (4368814, Applied Biosystems) secondo il protocollo di seguito riportato in un volume di reazione pari a 20 µL:

- RT Buffer 10X (4 µL)
- dNTP mix 100 mM (1,6 µL)
- RT Random Primers 10X (4 µL)
- Multi Scribe Reverse Transcriptase (2 µL)
- RNase Inhibitor (2 µL)Nuclease-free H₂O (6,4 µL)
- RNA (20 µL, corrispondenti a 2 µg)

La reazione è stata attivata incubando i campioni in un termociclatore (Eppendorf Mastercycler nexus gradient flexid) impostato a 37 °C per 1 h e poi per 5 min a 95 °C.

Il campione è stato conservato a - 20 °C.

2.7.2 Disegno dei primers e PCR semi quantitativa

I primers utilizzati per l'amplificazione dei geni d'interesse (tabella 1) sono stati disegnati manualmente, utilizzando le regioni delle sequenze dei cDNA di interesse fornite dal genome browser *Ensamble Plant* (http://plants.ensembl.org/Oryza_sativa/Info/Index), e validati con il software *Primer 3* (<http://primer3.ut.ee/>).

Tabella 1

| Nome gene | gene ID | FORWARD | REVERSE | Lunghezza trascritto |
|-----------|--------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| UBQ5 | Os05g0160200 | TTCTACAAGGTGGACGACGC | AGATCAGAGCAAAGCGAGCA | 191 bp |
| APX1 | Os03g0285700 | AAGACTACAAGGAGGCCAC | CAAGAGTACCACGGGCAATG | 103 bp |
| APX-2 | Os07g0694700 | CCTGATGCCACACAAGTTTC | TGTGACCACCAGAAAGAGCA | 97 bp |
| CAT1 | Os03g0131200 | ATGAAGTCCCGGACATGGT | GTGGTGGGAGAAGAAGTCGA | 93 bp |

2. Materiali e metodi

| | | | | |
|-------------|--------------|----------------------|----------------------|--------|
| CATA | Os02g0115700 | GTGCCGGGGATCTACTACTC | CGTAGTGGTTGTTGTGGTGG | 145 bp |
| CATB | Os06g0727200 | AGAGAGCCTGCACATGTTCT | AAACCCTCCATGTGCCTGTA | 75 bp |

Per verificare l'amplificazione dei trascritti è stata eseguita una PCR semi quantitativa utilizzando il kit Advantage-GC cDNA PCR Polymerase Mix (639112, CLONTECH), secondo il protocollo descritto di seguito, in un volume finale di reazione di 15 μ L:

- GC Buffer 5X (3 μ L)
- GC Melt 5M (3 μ L)
- Advantage-GC cDNA Polymerase Mix 50X (0,3 μ L)
- dNTP 50X (10mM) (0,3 μ L)
- Primer Forward 10 μ M (0,6 μ L)
- Primer Reverse 10 μ M (0,6 μ L)
- cDNA (1 μ L)
- Nuclease-free H₂O per arrivare a Vf 15 μ L

La mix di reazione è stata incubata in un termociclatore (EPPENDORF Mastercycler Nexus gradient flexid), secondo un protocollo termico che prevede una fase iniziale di denaturazione a 93 °C 5 min seguita da 40 cicli che prevedono gli step di seguito descritti, impostando un gradiente di temperatura:

- Fase di denaturazione: 30 sec a 93 °C
- Fase di appaiamento: 30 sec alla temperatura specifica per ogni coppia di primers
- Fase di polimerizzazione: 1 min a 72°C

I prodotti dell'amplificazione sono stati caricati con il loading buffer (LB) in rapporto 1:4 (LB: campione) su un gel di agarosio (1,3%) in TAE 1X con Bromuro di Etidio (EtBr) in rapporto 1:10.000 e la corsa elettroforetica è stata effettuata a 80 V per 40 min.

Protocollo per la preparazione del TAE 50X 1L:

- TRIS (242 g)
- Acido Acetico glaciale (57,1 mL)
- EDTA 0,5 M pH 8 (con NaOH): 50 mL
- Arrivare a 1 L con H₂O

2. Materiali e metodi

Protocollo per la preparazione del LB 6X:

- 50% glicerolo
- Blu di bromofenolo (una puntina)
- Arrivare ad 1mL con TAE 1X

Il EtBr è un intercalante del DNA che, quindi, si va a legare alla doppia elica ed emette fluorescenza quando viene eccitato dalla luce ultravioletta (UV). Dopo la corsa elettroforetica il gel è stato visualizzato al ChemiDoc MP (Bio Rad).

2.7.3 RT-PCR Sybr Green

La RT-PCR (PCR quantitativa) è una tecnica che permette la quantificazione dei prodotti di PCR grazie all'utilizzo di una sonda fluorescente. Tra le sonde maggiormente utilizzate si conosce il Sybr Green che è un agente intercalante, con attività fluorofora, in grado di legarsi alla doppia elica di cDNA formando un complesso che una volta eccitato può emettere fluorescenza. I dati di RT-PCR mostrati in questa tesi sono stati ottenuti per mezzo dell'utilizzo del kit Power Sybr Green PCR Master Mix (4367660, Applied Biosystems). Il protocollo prevede la preparazione di una miscela di reazione, in un volume finale di 20 μ L, composta da:

- SYBR Green PCR Master Mix 2X (10 μ L)
- cDNA + Nuclease-free H₂O (se necessaria per diluire il campione) (8 μ L)
- Primer Forward 10 μ M (1 μ L)
- Primer Reverse 10 μ M (1 μ L)

La miscela di reazione è stata caricata su piastre MicroAmp Fast Optical (4346906, Applied Biosystems) e per la reazione è stato utilizzato il termociclatore 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) secondo il protocollo termico di seguito riportato:

- Attivazione polimerasi 2 min a 50 °C
- Fase di denaturazione 10 min a 95 °C
- Appaiamento e amplificazione 15 sec a 95 °C
1 min a 60 °C 40 cicli
- Step di dissociazione 15 sec a 95 °C
15 sec a 60 °C
15 sec a 95 °C

2. Materiali e metodi

Per i geni *RBOHA* e *SODCC2* codificanti gli enzimi coinvolti nella produzione di H_2O_2 e per i geni *HAK5*, *OsTPKa*, *OsTPKb*, *NHX1* e *SOS1* codificanti i canali del K^+ e Na^+ è stata eseguita una RT-PCR utilizzando il kit di espressione genica TaqMan OpenArray Real Time PCR Plate, costituito da piastre contenenti primers customizzati disegnati e forniti da Thermo Fisher Scientific (tabella 2). Per la reazione è stato utilizzato il termociclatore QuantStudio 12K Flex real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific).

Tabella 2

| Saggio_ID | Gene_ID MSU | Gene_ID RAP | Descrizione del gene |
|----------------|----------------|--------------|---|
| AOs03472546_m1 | LOC_Os01g53294 | Os01g0734200 | respiratory burst oxidase homolog protein A (rbohA) |
| AJS08CU | LOC_Os07g46990 | Os07g0665200 | superoxide dismutase [Cu-Zn] 2 (SODCC2) |
| AJ39RWY | LOC_Os01g70490 | Os01g0930400 | HAK5 |
| AJQJBOJ | LOC_Os03g54100 | Os03g0752300 | OsTPKa |
| AJ39RWU | LOC_Os07g01810 | Os07g0108800 | OsTPKb |
| AJAAZRK | LOC_Os07g47100 | Os07g0666900 | OsNHX1 |
| Os03619633_g1 | LOC_Os12g44360 | Os12g0641100 | OsSOS1 |

2.8 Determinazione dei livelli di Na^+ e K^+ in cellule di riso Vialone Nano e Baldo

I campioni sono stati digeriti con HNO_3 concentrato in un sistema a micro-onde. La concentrazione degli elementi è stata determinata attraverso una tecnica di spettroscopia ad accoppiamento induttivo a plasma ICP-OES, Cirus Vision EOP (Spectro A.I. GmbH, Kleve, Germany). La quantificazione degli elementi è stata eseguita per mezzo di standard multi-elemento certificati (Fatto in collaborazione con l'Università di Padova).

Tesi di dottorato in Bioingegneria e Bioscienze, Scienze e Tecnologie degli Alimenti e della Nutrizione, di Maria Beatrice Ronci, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 04/05/2017.

La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte.

3. RISULTATI

Maria Beatrice Ronci

3. Risultati

3.1 Comparazione dei sistemi ROS *scavenging* in plantule di riso con diversa sensibilità allo stress salino

Con lo scopo di comprendere i meccanismi molecolari che in piante di interesse alimentare concorrono a conferire tolleranza allo stress salino, in una fase preliminare di questo studio è stata analizzata la capacità antiossidante endogena di due cultivar italiane di riso che mostravano differente sensibilità a questo tipo di stress (Fig. 3.1). In particolare, plantule ottenute dalle varietà Vialone Nano e Baldo (vedi dettagli in Materiali e metodi) sono state caratterizzate per livelli di metaboliti antiossidanti quali ascorbato (ASC+DHA) e glutatione (GSH+GSSG) totale e di attività dei principali enzimi redox coinvolti nella rimozione delle ROS.

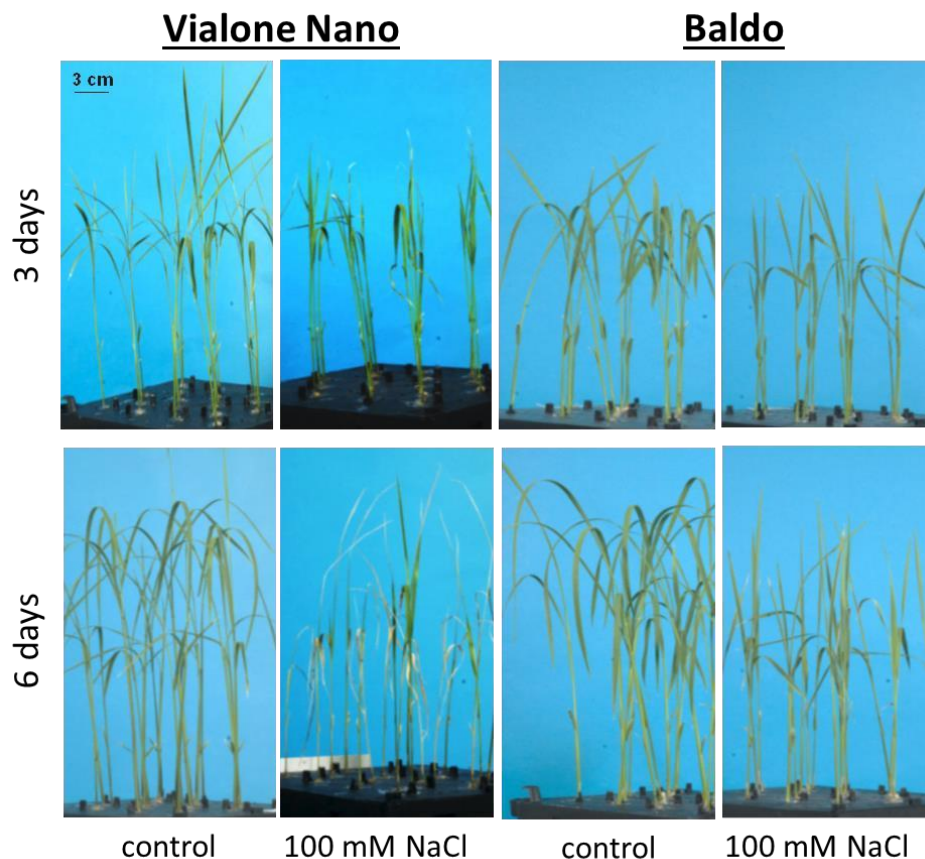


Fig. 3.1 Different response to salt stress of the two rice varieties, Vialone Nano and Baldo.

3. Risultati

Come si evince dalla Fig. 3.2, Baldo, che ha maggiore tolleranza allo stress salino, presenta un contenuto endogeno di ascorbato totale superiore a quello della varietà Vialone Nano, più sensibile allo stress da sale.

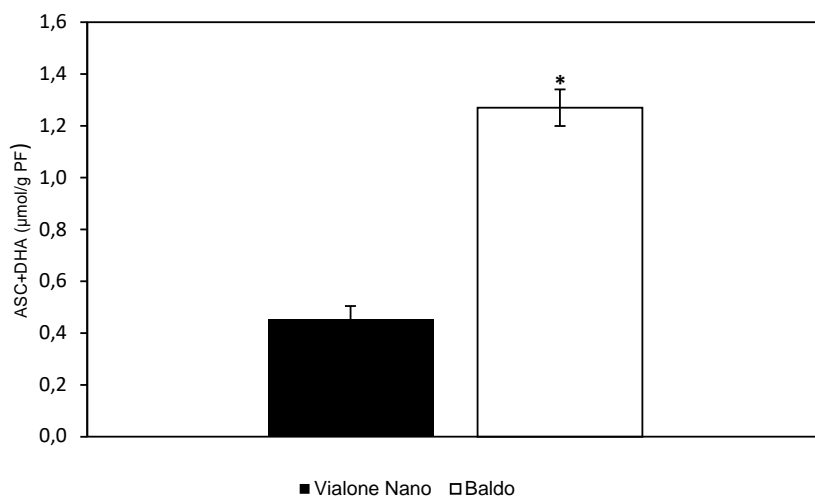


Fig. 3.2 Contenuto di ascorbato totale nelle plantule delle varietà Vialone Nano e Baldo. PF: peso fresco. L'asterisco indica i valori medi statisticamente diversi per $p < 0.05$ (test T-Student).

3. Risultati

Per quanto riguarda i livelli di glutazione totale, invece, non si evincono differenze tra le due varietà (Fig. 3.3).

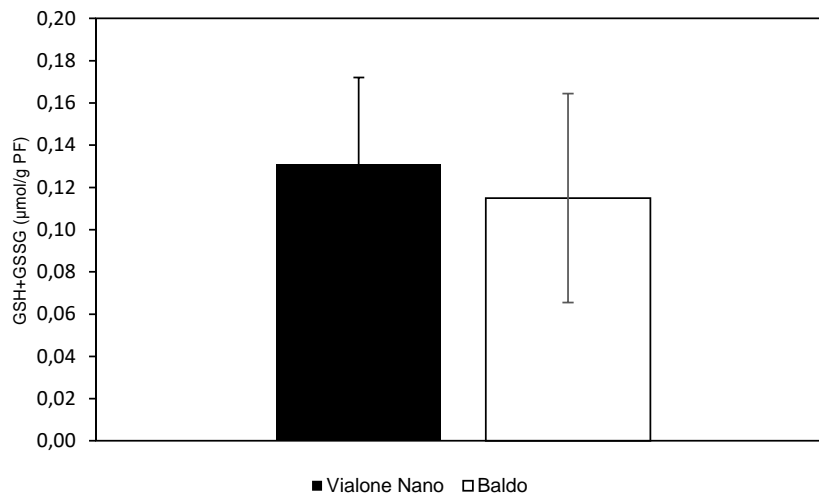


Fig. 3.3 Contenuto di glutazione totale nelle plantule delle varietà Vialone Nano e Baldo. PF: peso fresco.

Lo stato redox di ASC e GSH, determinato come rapporto tra la forma ridotta di tali metaboliti e i livelli totali degli stessi (ASC/ASC+DHA; GSH/GSH+GSSG), non mostra invece differenze tra le due linee.

Poiché la capacità antiossidante dei metaboliti redox analizzati dipende dalla loro capacità di essere rigenerati, ovvero riconvertiti nella loro forma ridotta, è stata saggiata l'attività degli enzimi deputati al riciclo delle forme ossidate di ASC e GSH. I livelli di attività degli enzimi deputati alla rigenerazione dell'ASC, DHAR e MDHAR, non variano, in maniera significativa, tra le due varietà (Fig. 3.4 e 3.5), mentre la varietà Baldo mostra avere livelli più alti di attività della GR, enzima deputato al ripristino della forma ridotta del glutatione, rispetto alla varietà Vialone Nano (Fig. 3.6).

3. Risultati

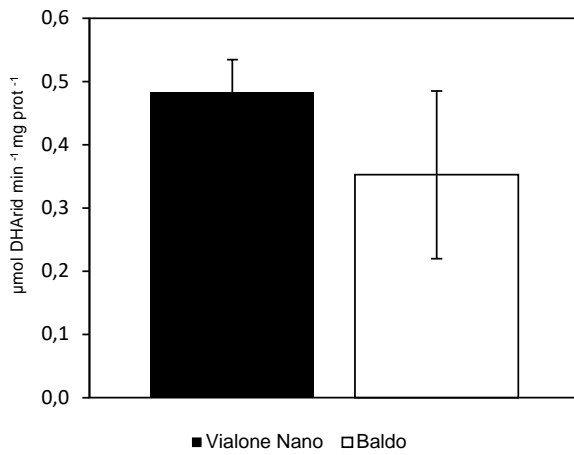
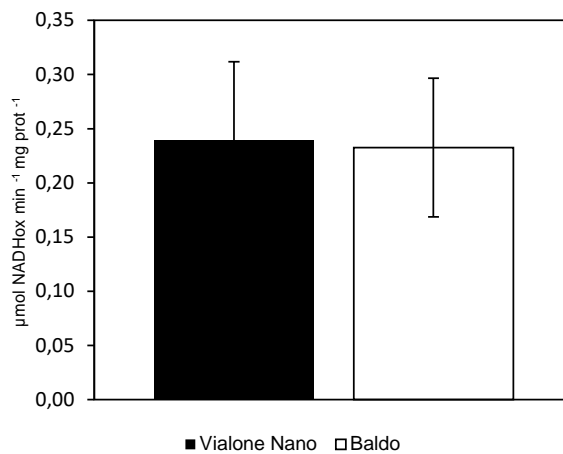


Fig. 3.4 Attività enzimatica della DHAR nelle plantule di Vialone Nano e Baldo.

Fig. 3.5 Attività enzimatica della MDHAR nelle plantule di Vialone Nano e Baldo.



■ Vialone Nano □ Baldo

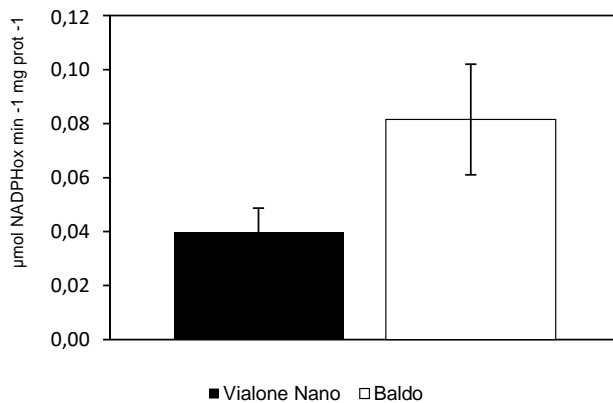


Fig. 3.6 Attività enzimatica della GR nelle plantule di Vialone Nano e Baldo. L'asterisco indica valori medi statisticamente diversi per $p < 0,05$ (test T-Student).

3. Risultati

L'attività degli enzimi maggiormente coinvolti nella rimozione del H_2O_2 , generalmente prodotto in condizioni di stress abiotico è stata determinata nelle due varietà di riso. Come mostrato nella Fig. 3.7 i livelli di attività dell'ascorbato perossidasi (APX) non mostrano variazioni significative tra Vialone Nano e Baldo.

Anche i livelli di attività della CAT (Fig. 3.8) non mostrano variazioni significative tra le due varietà.

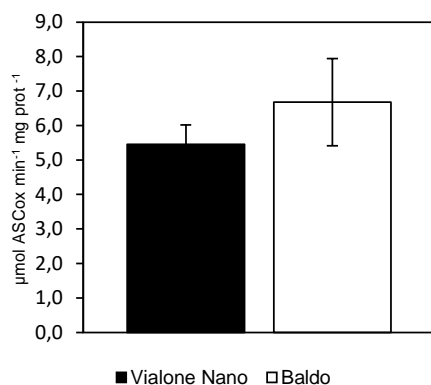


Fig. 3.7 Attività enzimatica dell'APX nelle plantule delle varietà Vialone Nano e Baldo.

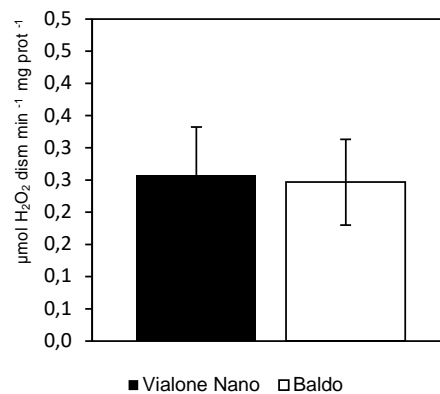


Fig. 3.8 Attività enzimatica della CAT nelle plantule delle varietà Vialone Nano e Baldo.

3.2 Caratterizzazione di metaboliti redox in colture cellulari di riso

L'analisi dei sistemi antiossidanti delle cultivar Vialone Nano e Baldo sembra suggerire un potenziamento di alcuni di questi nella varietà più tollerante allo stress salino. Per poter studiare in dettaglio il coinvolgimento dei sistemi redox nei meccanismi di difesa attivati dallo stress salino, sono state ottenute colture cellulari dai semi delle due varietà analizzate (vedi Materiali e metodi per dettagli). In diversi studi è stato riportato che i livelli di ascorbato totale e glutatione totale cambiano in funzione della crescita cellulare (de Pinto *et al.*, 1999; Pellhny *et al.*, 2009; Locato *et al.*, 2015). Pertanto i livelli di tali metaboliti redox sono stati saggati nei diversi giorni di crescita delle colture cellulari ottenute.

Come si evince dal grafico, i livelli di ascorbato aumentano in entrambe le linee a partire dal terzo giorno di crescita e rimangono inalterati per la varietà Baldo, mentre tendono a diminuire in Vialone Nano man mano che si arresta la crescita cellulare. Inoltre, nella varietà Vialone Nano si hanno livelli più bassi di ASC al secondo e decimo giorno di crescita, rispetto a quelli della varietà Baldo (Fig. 3.9 e Fig. 3.10).

3. Risultati

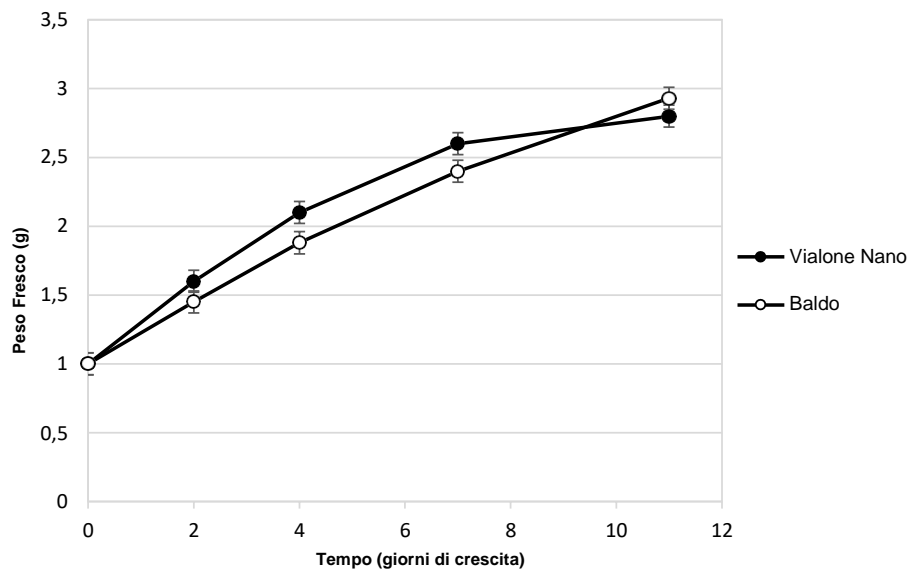


Fig. 3.9 Curve di crescita cellulare. Andamento della crescita delle colture cellulari, nelle due varietà di riso Vialone Nano e Baldo, in termini di variazione del PF: peso fresco, in funzione dei giorni di crescita.

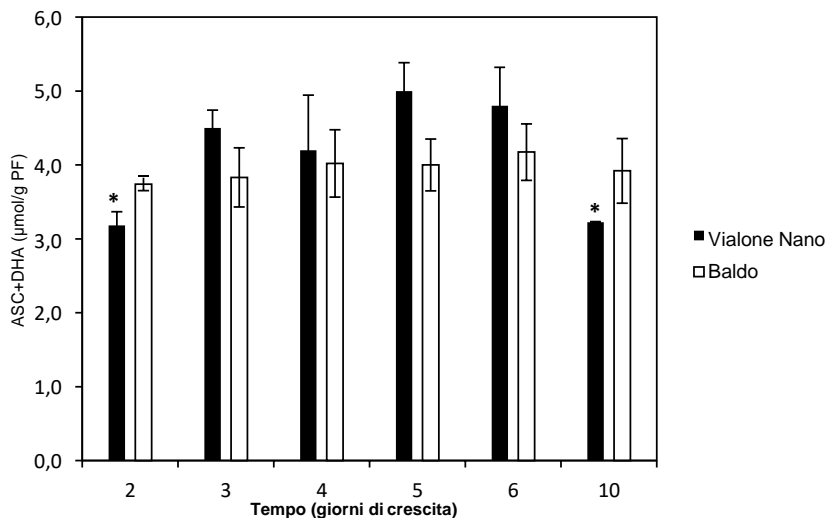


Fig. 3.10 Contenuto di ascorbato totale nelle sospensioni cellulari di Vialone Nano e Baldo a diversi giorni di crescita. PF: peso fresco. L'asterisco indica valori medi statisticamente diversi, tra le due varietà a diversi giorni di trattamento, per $p < 0.05$ (test T-Student).

3. Risultati

Per quanto riguarda i livelli di glutatione totale (Fig. 3.11) entrambe le linee presentano i livelli più alti di questo metabolita al terzo giorno di crescita. Si osserva, inoltre, un calo del contenuto dei livelli di glutatione totale in corrispondenza di una diminuzione di crescita cellulare che risulta più repentino e accentuato nella varietà Vialone Nano. In particolare, nella varietà Vialone Nano si hanno livelli più bassi di glutatione totale al quarto e quinto giorno di crescita, rispetto a quelli della varietà Baldo; tuttavia la varietà Baldo mostra livelli di glutatione totale più bassi al decimo giorno di crescita, quando le sospensioni cellulari si trovano nella fase stazionaria (Fig. 3.9).

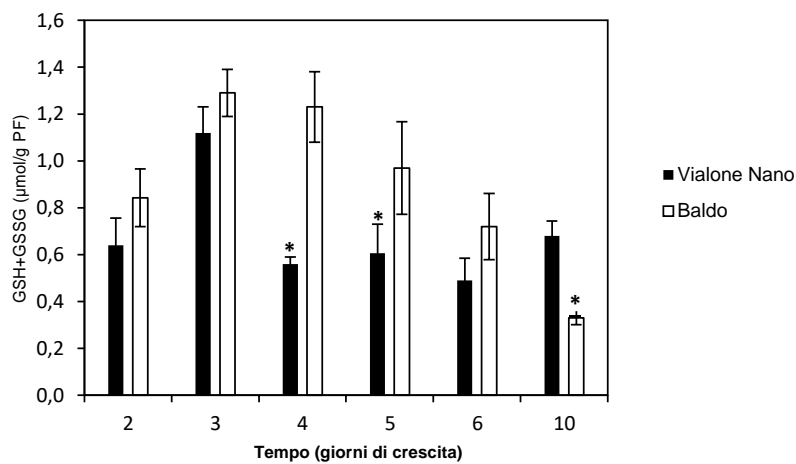


Fig. 3.11 Contenuto di glutatione totale nelle sospensioni cellulari di Vialone Nano e Baldo a diversi giorni di crescita. PF: peso fresco. L'asterisco indica valori medi statisticamente diversi, tra le due varietà a diversi giorni di trattamento, per $p < 0.05$ (test T-Student).

Allo scopo di verificare se una differente modulazione dei sistemi redox in risposta allo stress salino, possa contribuire a conferire una maggiore tolleranza verso tale stress alla cultivar Baldo, le linee cellulari sono state trattate con NaCl.

3. Risultati

3.3 Effetto dello stress salino su vitalità e sistemi redox in colture cellulari di riso Vialone Nano e Baldo

3.3.1 Crescita e vitalità cellulare

Allo scopo di verificare la diversa sensibilità allo stress salino delle cultivar di riso Vialone Nano e Baldo, è stato monitorato l'effetto di diverse concentrazioni di NaCl sulla crescita cellulare. È stato scelto di effettuare il trattamento al terzo giorno di crescita delle colture cellulari, in quanto le cellule sono in attiva proliferazione cellulare e nelle due linee i livelli di metaboliti redox sono comparabili (Fig. 3.9; 3.10; 3.11). I grafici riportati in Fig. 3.12 mostrano le curve di crescita delle due linee cellulari ottenute dai semi di Vialone Nano (Fig. 3.12a) e Baldo (Fig. 3.12b) in condizioni di controllo ed in seguito ad esposizione a differenti concentrazioni di NaCl.

In condizioni controllo le due linee cellulari mostrano un andamento della crescita simile, mentre la diversa sensibilità delle due linee al sale si ripercuote sulla crescita cellulare. In particolare, in seguito al trattamento con NaCl 150 mM la varietà Vialone Nano mostra un calo progressivo della crescita del 25% al quarto giorno di coltura dopo il trattamento e del 43% al decimo giorno di coltura, il calo è del 25% (quarto giorno) e 36% (decimo giorno) dopo trattamento con NaCl 100 mM. La concentrazione di NaCl pari a 50 mM induce una diminuzione della crescita di circa il 15-20% a partire dal settimo giorno. La varietà Baldo, rispetto a Vialone Nano, presenta minori effetti in termini di riduzione di crescita cellulare in seguito all'esposizione alle differenti concentrazioni di NaCl. Il grafico in Fig. 3.12b, infatti, mostra come al settimo giorno di crescita i trattamenti con NaCl 150 e 100 mM inducano una diminuzione della crescita del 13% rispetto al controllo, mentre al decimo giorno la diminuzione della crescita è del 31% e del 19% nelle cellule trattate rispettivamente con NaCl 150 e 100 mM. Il trattamento con NaCl 50 mM non determina variazioni significative rispetto al controllo per tutto il periodo della curva di crescita cellulare.

3. Risultati

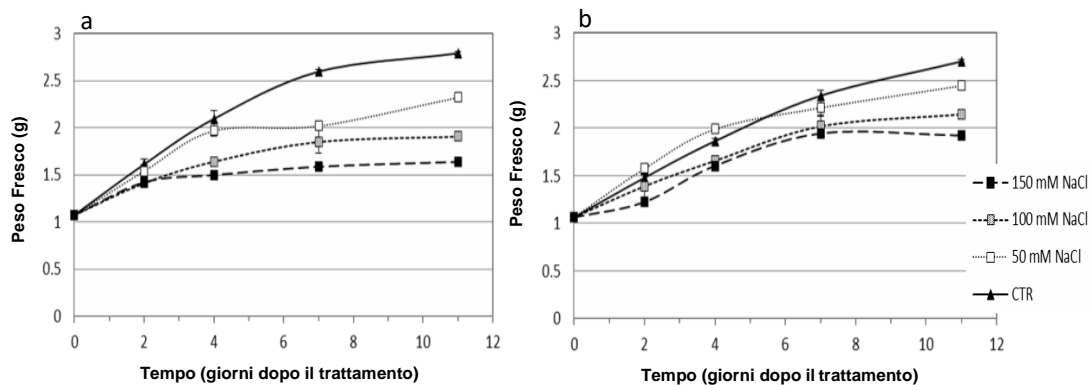


Fig. 3.12 Curve di crescita delle colture cellulari delle varietà Vialone Nano (a) e Baldo (b) in condizioni controllo e di stress salino.

Le colture cellulari sono state trattate, a 3 giorni di crescita, con diverse concentrazioni di NaCl. Triangolo e linea dritta: controllo; quadrato bianco e linea dritta: NaCl 50 mM; quadrato grigio e linea tratteggiata: NaCl 100 mM; quadrato nero e linea tratteggiata: NaCl 150 mM.

Allo scopo di comprendere se la riduzione di crescita cellulare, causata dall'esposizione delle cellule alle diverse concentrazioni di NaCl, fosse dovuta ad un effetto letale dello stress, è stata monitorata la percentuale di morte cellulare a differenti tempi di crescita a seguito di trattamento con differenti concentrazioni di NaCl (Fig. 3.13).

La varietà Vialone Nano (Fig. 3.13a) mostra una mortalità a seguito di trattamento con NaCl 150 e 100 mM rispettivamente del 50% e 30% a partire dal secondo giorno dopo il trattamento fino ad arrivare al 60% e 40% al quarto giorno di crescita.

La varietà Baldo (Fig. 3.13b) mostra un lento aumento, circa del 30% e 20%, della morte cellulare al secondo giorno di crescita a seguito di trattamento con NaCl 150 e 100 mM, rispettivamente. La percentuale di morte cellulare rimane stabile fino al quarto giorno ma, dal settimo giorno si ha un ulteriore aumento, rispetto al controllo, di circa il 50% e il 20% nelle cellule trattate con NaCl 100 e 150 mM rispettivamente. Al decimo giorno la percentuale di mortalità cellulare rimane pressoché invariata.

A seguito del trattamento con NaCl 50 mM non è stata evidenziata una significativa mortalità cellulare in entrambe le varietà.

3. Risultati

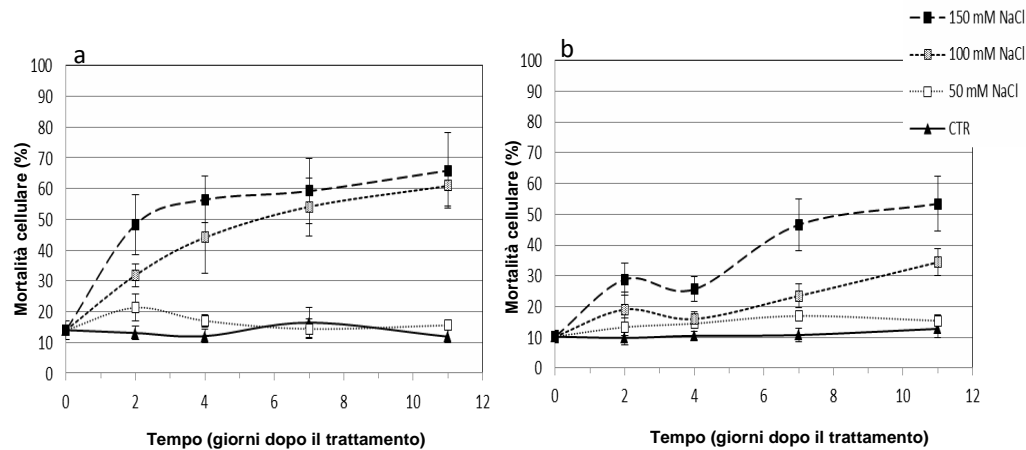


Fig. 3.13 Mortalità cellulare delle colture Vialone Nano (a) e Baldo (b) in seguito a stress salino.

Le cellule sono state trattate, a 3 giorni di crescita, con diverse concentrazioni di NaCl. Triangolo e linea dritta: controllo; quadrato bianco e linea dritta: NaCl 50 mM; quadrato grigio e linea tratteggiata: NaCl 100 mM; quadrato nero e linea tratteggiata: NaCl 150 mM.

3.3.2 Livelli di H₂O₂ extra- e intra- cellulare in colture di riso sottoposte a stress salino

Come riportato in letteratura, l'esposizione delle piante a condizioni di stress induce un'iperproduzione di H₂O₂, molecola reattiva nota oltre che per il suo potenziale tossico, per la sua funzione di segnale molecolare nei meccanismi di difesa attivati dalle piante (De Gara *et al.*, 2010). Il coinvolgimento del H₂O₂ nelle vie di *signalling* è possibile grazie alla proprietà di questa ROS di attraversare le membrane biologiche e alla sua emivita significativamente più lunga rispetto alle altre ROS. Pertanto, la produzione di H₂O₂ indotta dallo stress salino è stata monitorata sia nel mezzo di crescita che all'interno delle cellule (vedi Materiali e metodi per dettagli). I grafici in Fig. 3.14 mostrano il rilascio di H₂O₂ nel mezzo di coltura cellulare a diversi giorni di crescita dopo trattamento con diverse concentrazioni di NaCl.

La linea cellulare ottenuta dalla varietà Vialone Nano (Fig. 3.14a) mostra un picco di H₂O₂ a 5 min dai trattamenti con concentrazioni di NaCl pari a 100 e 150 mM, mentre a 24 h dai trattamenti si osserva un incremento di concentrazione di H₂O₂ nel mezzo di crescita pari al 17%, 33% e 77% rispetto ai livelli controllo rispettivamente a seguito dei trattamenti con NaCl 50, 100 e 150 mM.

Nella linea cellulare ottenuta dalla varietà Baldo (Fig. 3.14b) non è stato rilevato alcun rilascio di H₂O₂ sia in condizioni controllo che a seguito di trattamento.

3. Risultati

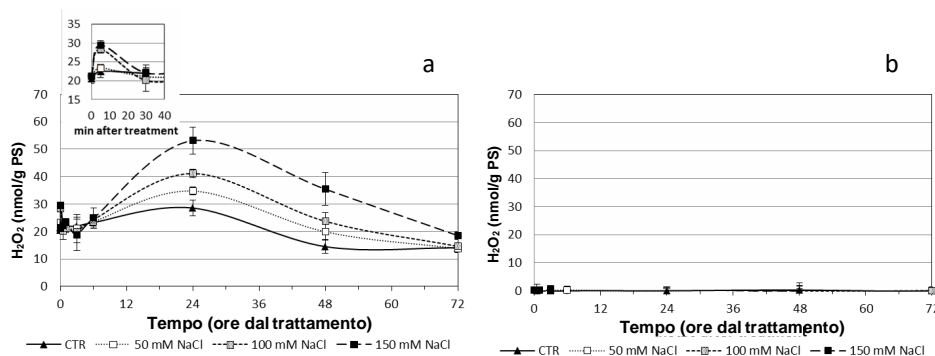


Fig. 3.14 Livelli di H₂O₂ nel mezzo di crescita delle sospensioni cellulari delle varietà Vialone Nano (a) e Baldo (b) in condizioni di stress salino.

I livelli di H₂O₂ sono stati misurati a diversi tempi dopo il trattamento con NaCl a diverse concentrazioni. Triangolo e linea dritta: controllo; quadrato bianco e linea dritta: NaCl 50 mM; quadrato grigio e linea tratteggiata: NaCl 100 mM; quadrato nero e linea tratteggiata: NaCl 150 mM. PS: Peso secco.

Dalla determinazione dei livelli di H₂O₂ intracellulare si osserva che la varietà Vialone Nano (Fig. 3.15a) mostra due picchi di H₂O₂ in seguito allo stress salino. Il primo picco è dovuto ad un aumento del 50% dei livelli di H₂O₂ rispetto al controllo a 30 min dal trattamento con NaCl 150 e 100 mM. A 24 h si osserva un ulteriore incremento dei livelli di H₂O₂ del 50% e 80% rispetto al controllo a seguito di trattamento con NaCl 150 e 100 mM. Dopo le 24 h i livelli di H₂O₂ aumentano progressivamente nel tempo in seguito a trattamento con NaCl alle diverse concentrazioni.

La varietà Baldo (Fig. 3.15b) mostra un picco dell'accumulo di H₂O₂ intracellulare di circa 100% e 50% rispetto al controllo dopo 5 min dai trattamenti con NaCl 150, 100 e 50 mM. Dopo questo primo picco, molto più stretto di quello evidente per la varietà Vialone Nano, la produzione di H₂O₂ intracellulare torna a valori controllo e rimane costante a seguito dei diversi trattamenti. Solo dopo 48 h si evidenzia un aumento del 50% del H₂O₂ intracellulare, rispetto al controllo, a seguito di trattamento con NaCl 150 mM e a 72 h a seguito del trattamento con NaCl 50 e 100 mM.

3. Risultati

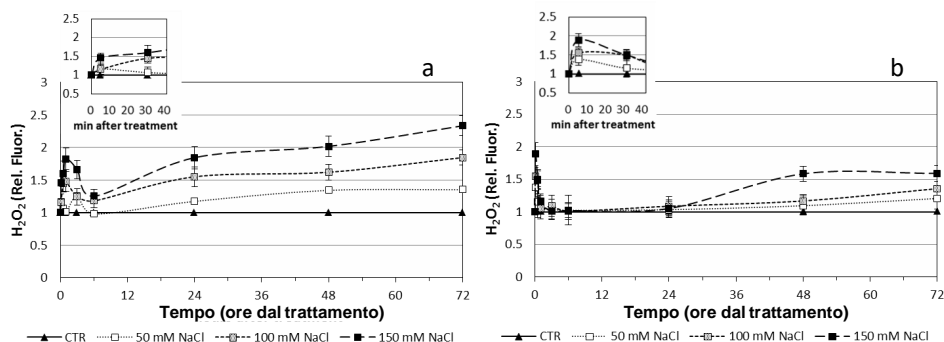


Fig. 3.15 Livelli di H_2O_2 intracellulare nelle sospensioni cellulari delle varietà Vialone Nano (a) e Baldo (b) in condizioni di stress salino.

I livelli di H_2O_2 sono stati misurati a diversi tempi dopo il trattamento con NaCl a diverse concentrazioni. Per la misurazione è stato applicato il metodo che prevede l'utilizzo della sonda DHR-123. I valori di fluorescenza sono stati normalizzati sui valori ottenuti dai controlli, a cui è stato assegnato un valore di 1. Triangolo e linea dritta: controllo; quadrato bianco e linea dritta: NaCl 50 mM; quadrato grigio e linea tratteggiata: NaCl 100 mM; quadrato nero e linea tratteggiata: NaCl 150 mM.

3.3.3 Ruolo dei sistemi ROS scavenging nella risposta allo stress salino in colture cellulari di riso

L'effetto dello stress salino sui metaboliti redox del ciclo ascorbato e glutatione è stato studiato in seguito a trattamento con NaCl 100 mM, in quanto tale condizione risultava la più idonea per evidenziare la diversa sensibilità allo stress delle due linee analizzate. Il grafico in Fig. 3.16 mostra il contenuto di ASC totale (ASC + DHA) nelle due varietà Vialone Nano e Baldo a 30 min e 24 h dal trattamento con NaCl 100 mM.

In entrambe le linee non si osservano differenze significative dei livelli di ASC tra il controllo ed il trattato dopo 30 min e 24 h di trattamento.

3. Risultati

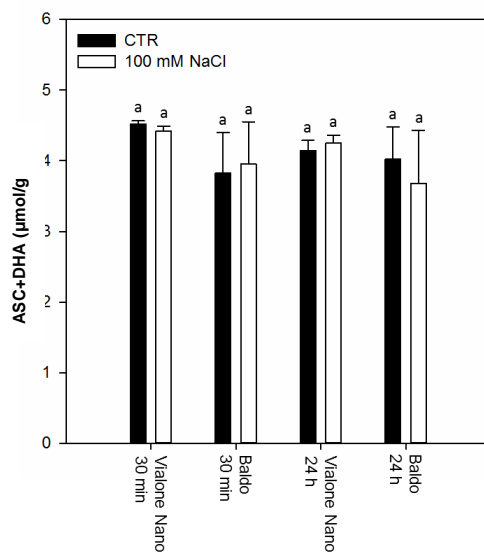


Fig. 3.16 Contenuto di ascorbato totale in colture cellulari delle varietà Vialone Nano e Baldo. I livelli di ASC sono stati determinati dopo 30 min e 24 h dal trattamento con NaCl 100 mM. PF: peso fresco.

Dall'analisi dei livelli di glutazione totale (GSH + GSSG), si osserva che il trattamento con NaCl ne induce un lieve decremento in Vialone Nano a 24 h dallo stress, mentre non si osservano differenze significative tra controllo e trattato a 30 min dal trattamento in entrambe le linee e in Baldo a 24 h (Fig. 3.17). Coerentemente con quanto evidenziato dall'analisi dei metaboliti redox nei diversi giorni di crescita delle due linee cellulari, Baldo presenta livelli di glutazione totale superiori a Vialone Nano in condizioni controllo a 24 h dal trattamento, corrispondente al quarto giorno di crescita cellulare.

3. Risultati

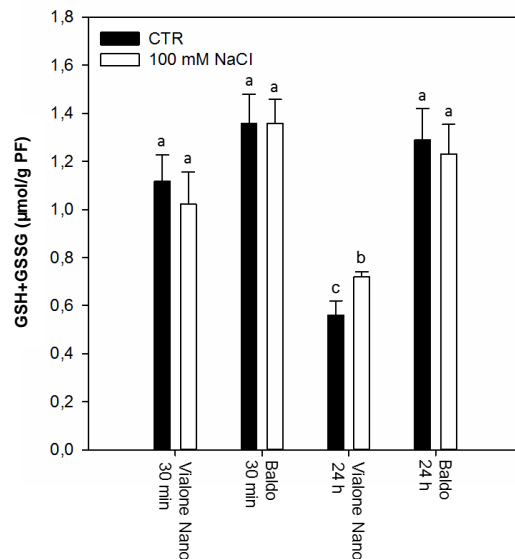


Fig. 3.17 Contenuto di glutazione totale in colture cellulari delle varietà Vialone Nano e Baldo.

I livelli di GSH sono stati determinati dopo trattamento, a 30 min e 24 h, con NaCl 100 mM. PF: peso fresco. Le diverse lettere indicano valori medi statisticamente diversi per $p < 0.05$ (test ANOVA).

Lo stato redox di ASC e GSH determinato come rapporto tra la forma ridotta di tali metaboliti e i livelli totali degli stessi (ASC/ASC+DHA; GSH/GSH+GSSG) non mostrano invece differenze tra le due linee in condizioni controllo e di stress salino.

L'attività degli enzimi maggiormente coinvolti nel controllo delle ROS è stata saggiata nelle due linee cellulari esposte a stress salino con NaCl 100 mM. In Baldo non si evidenziano differenze significative nell'attività della SOD a 30 min dal trattamento con NaCl 100 mM, mentre in Vialone Nano si osserva allo stesso tempo una lieve diminuzione dell'attività della SOD. Si evidenzia un aumento dell'attività della SOD del 27% e del 33%, rispetto al controllo, dopo 24 h dal trattamento con NaCl 100 mM rispettivamente in Vialone Nano e Baldo (Fig. 3.18).

Inoltre, come mostrato in Fig. 3.18, l'attività della SOD risulta più alta in Vialone Nano rispetto a Baldo in condizioni controllo a tutti i tempi analizzati.

3. Risultati

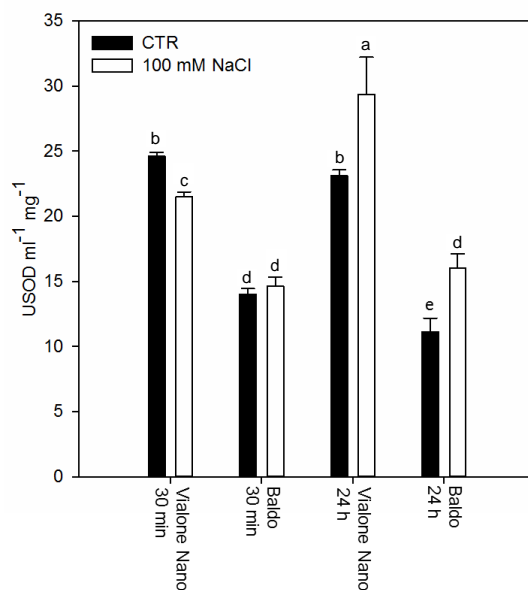


Fig. 3.18 Attività enzimatica della SOD in colture cellulari delle varietà Vialone Nano e Baldo. L'attività enzimatica è stata analizzata dopo trattamento di 30 min e 24 h con NaCl 100 mM. Le diverse lettere indicano valori medi statisticamente diversi per $p < 0.05$ (test ANOVA).

Anche per l'attività dell'APX si osservano differenze significative in entrambe le linee a 24 h dal trattamento. In particolare, l'attività dell'enzima aumenta in entrambe le linee in seguito a trattamento e tale aumento risulta più marcato in Vialone Nano (Fig. 3.19).

3. Risultati

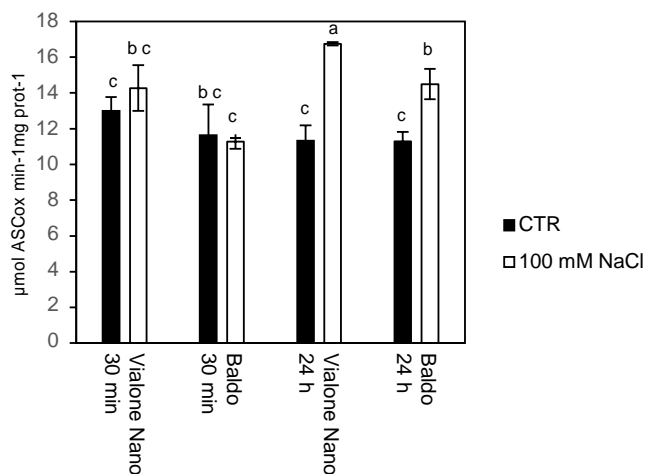


Fig. 3.19 Attività enzimatica della APX in colture cellulari delle varietà Vialone Nano e Baldo.

L'attività enzimatica è stata analizzata dopo trattamento di 30 min e 24 h con NaCl 100 mM. Le diverse lettere indicano valori medi statisticamente diversi per $p < 0.05$ (test ANOVA).

Studi precedenti hanno messo in luce un particolare coinvolgimento dell'attività delle APX citosoliche, rispetto agli isoenzimi attivi negli altri compartimenti cellulari, nei meccanismi di difesa delle piante attivati in conseguenza di stress abiotici (de Pinto *et al.*, 2013; Locato *et al.*, 2009). L'attività dell'APX citosolica (cAPX), nella varietà Vialone Nano, aumenta del 27% a 30 min dal trattamento, mentre a 24 h non si evidenzia alcuna variazione significativa tra controllo e trattato (Fig. 3.20). In Baldo l'attività della cAPX aumenta (36%) a 30 min e tale aumento è ancora presente a 24 h dal trattamento. Inoltre, la cultivar Baldo mostra, un'attività della cAPX maggiore rispetto alla cultivar Vialone Nano in condizioni controllo a 30 min dal trattamento, ovvero al terzo giorno di crescita cellulare.

3. Risultati

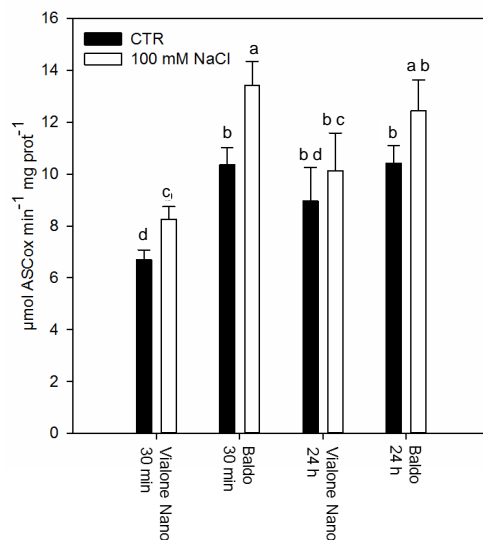


Fig. 3.20 Attività enzimatica della cAPX in colture cellulari delle varietà Vialone Nano e Baldo. L'attività enzimatica è stata analizzata dopo trattamento di 30 min e 24 h con NaCl 100 mM. Le diverse lettere indicano valori medi statisticamente diversi per $p < 0.05$ (test ANOVA).

Anche l'attività della CAT risulta più alta in Baldo che in Vialone Nano nelle condizioni controllo, mentre non si evidenziano differenze significative a seguito di trattamento in entrambe le linee cellulari (Fig. 3.21).

3. Risultati

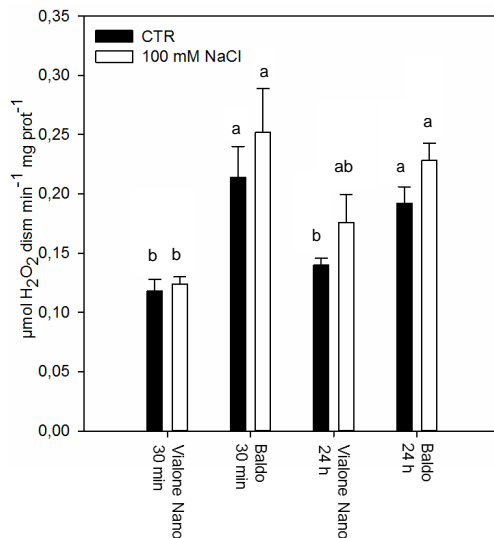


Fig. 3.21 Attività enzimatica della CAT in colture cellulari delle varietà Vialone Nano e Baldo. L'attività enzimatica è stata analizzata dopo trattamento di 30 min e 24 h con NaCl 100 mM. Le diverse lettere indicano valori medi statisticamente diversi per $p < 0.05$ (test ANOVA).

Dall'analisi dell'attività degli enzimi coinvolti nel riciclo delle forme ossidate dell'ASC, si evince che l'attività enzimatica della DHAR e della MDHAR (Fig. 3.22 e 3.23) non mostrano variazioni tra le due varietà e a seguito di trattamento.

Tuttavia, l'attività della MDHAR (Fig. 3.22) risulta essere maggiore di circa il 60% nella varietà Baldo rispetto alla varietà Vialone Nano in condizioni controllo a tutti i tempi analizzati.

3. Risultati

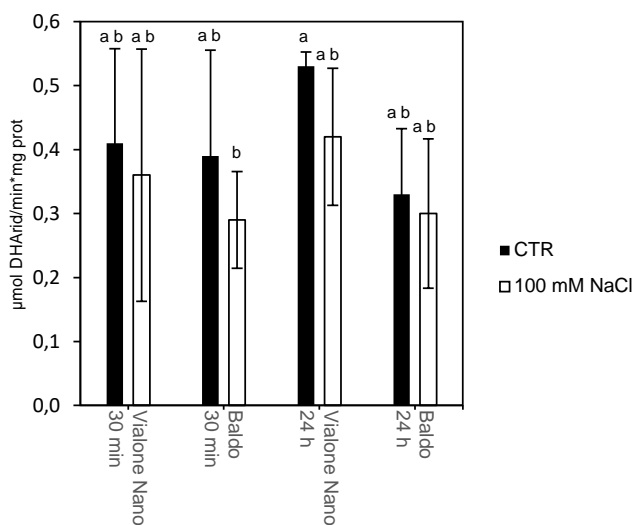


Fig. 3.22 Attività enzimatica della DHAR in colture cellulari delle varietà Vialone Nano e Baldo.

L'attività enzimatica è stata analizzata a 30 min e 24 h dal trattamento con NaCl 100 mM. Le diverse lettere indicano valori medi statisticamente diversi per $p < 0.05$ (test ANOVA).

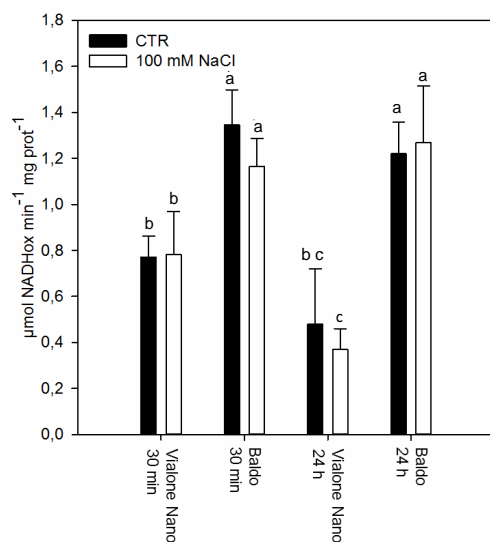


Fig. 3.23 Attività enzimatica della MDHAR in colture cellulari delle varietà Vialone Nano e Baldo.

L'attività enzimatica è stata analizzata a 30 min e 24 h di trattamento con NaCl 100 mM. Le diverse lettere indicano valori medi statisticamente diversi per $p < 0.05$ (test ANOVA).

3. Risultati

Analogamente a quanto osservato per l'attività della MDHAR, la varietà Vialone Nano mostra un'attività della GR, enzima coinvolto nel controllo dello stato redox del glutatione, più bassa rispetto a quello presente nella varietà Baldo in condizioni controllo (Fig. 3.24), mentre non ci sono differenze tra i controlli ed i rispettivi trattati delle due cultivar sia a 30 min che a 24 h.

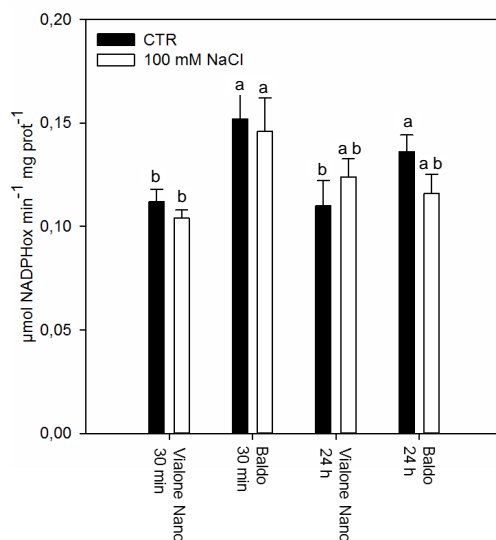


Fig. 3.24 Attività enzimatica della GR in colture cellulari delle varietà Vialone Nano e Baldo.

L'attività enzimatica è stata analizzata a 30 min e 24 h di trattamento con NaCl 100 mM. Le diverse lettere indicano valori medi statisticamente diversi per $p < 0.05$ (test ANOVA).

3. Risultati

3.4 Regolazione dell'espressione dei geni coinvolti nel ROS scavenging e signalling in colture cellulari di riso sottoposte a stress salino

L'espressione dei geni codificanti per i principali enzimi coinvolti nella rimozione del H_2O_2 è stata saggiata mediante analisi Real-Time PCR. L'espressione dei geni codificanti per le due isoforme di riso dell'APX citosolica (*APX1* e *APX2*) ha rivelato che solo nella varietà Baldo si osserva un aumento dell'espressione dell'*APX1* a 6 h e 24 h dal trattamento con NaCl 100 mM. L'espressione dell'*APX2* non subisce invece alcuna variazione in seguito a stress in entrambe le linee (dati non mostrati). La modulazione dell'espressione genica dell'*APX1* in Baldo potrebbe giustificare il ridotto contenuto di H_2O_2 che si osserva in questa linea in seguito a stress (Fig. 3.25).

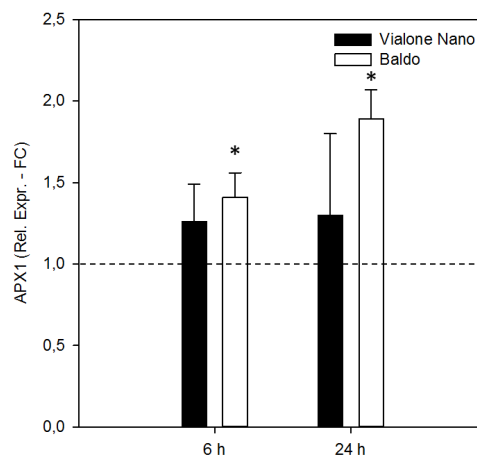


Fig. 3.25 Espressione relativa del gene *APX-1* in colture cellulari delle varietà Vialone Nano e Baldo in seguito a stress salino.

L'analisi dell'espressione genica è stata effettuata dopo 6 h e 24 h di trattamento con NaCl 100 mM. Gli asterischi indicano valori medi statisticamente diversi per $p < 0.05$ (test T-Student), tra i trattati e i relativi controlli i cui valori, assegnati come 1, non sono riportati nel grafico.

Dall'analisi dell'espressione genica della *CATA*, non emerge nessuna differenza significativa tra le due linee in seguito a stress (dato non mostrato), mentre l'espressione della *CATB* aumenta lievemente nella varietà Vialone Nano dopo 6 h di trattamento con NaCl, probabilmente in risposta all'elevata produzione di H_2O_2 che si osserva in questa linea in seguito a stress (Fig. 3.26).

3. Risultati

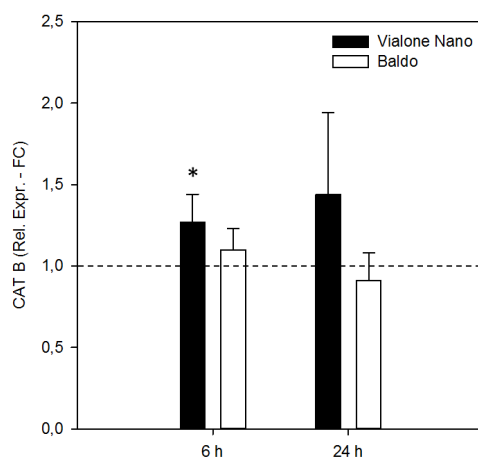


Fig. 3.26 Espressione relativa del gene *CATB* in colture cellulari delle varietà Vialone Nano e Baldo.

L'analisi dell'espressione genica è stata effettuata dopo 6 h e 24 h di trattamento con NaCl 100 mM. L'asterisco indica valori medi statisticamente diversi per $p < 0.05$ (test T-Student), tra il trattato e il relativo controllo i cui valori, assegnati come 1, non sono riportati nel grafico.

Il controllo dei livelli di ROS dipende anche da quanto ne venga modulata la produzione. Pertanto è stata analizzata l'espressione dei geni codificanti per una NADPH ossidasi (*RBOHA*) e una superossido dismutasi (*SODCC2*). Da tale analisi si evince che l'espressione genica di *RBOHA* e *SODCC2* presenta un aumento tardivo, a 24 h dal trattamento con NaCl, nella varietà Vialone Nano, mentre nella varietà Baldo l'aumento dell'espressione dei due geni è evidente già a 6 h dal trattamento con NaCl. In Vialone Nano l'aumento dell'espressione della *RBOHA*, enzima deputato alla produzione di anione superossido e della *SODCC2*, enzima deputato a convertire l'anione superossido in H_2O_2 e ossigeno, appare in linea con i livelli di H_2O_2 registrati nell'ambiente extra e intracellulare di questa varietà (Fig. 3.27 e 3.28).

3. Risultati

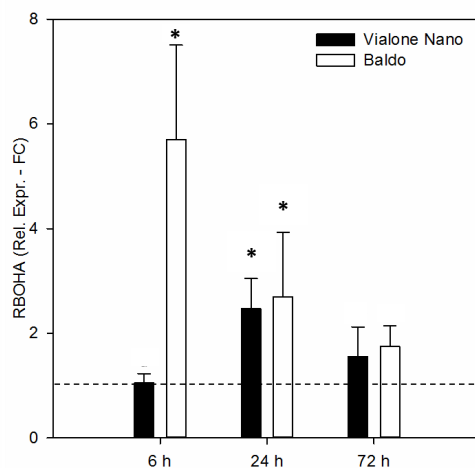


Fig. 3.27 Espressione relativa del gene *RBOHA* in colture cellulari delle varietà Vialone Nano e Baldo.

L'analisi dell'espressione genica è stata effettuata dopo 6 h, 24 h e 72 h di trattamento con NaCl 100 mM. Gli asterischi indicano valori medi statisticamente diversi per $p < 0.05$ (test T-Student), tra i trattati e i relativi controlli i cui valori, assegnati come 1, non sono riportati nel grafico.

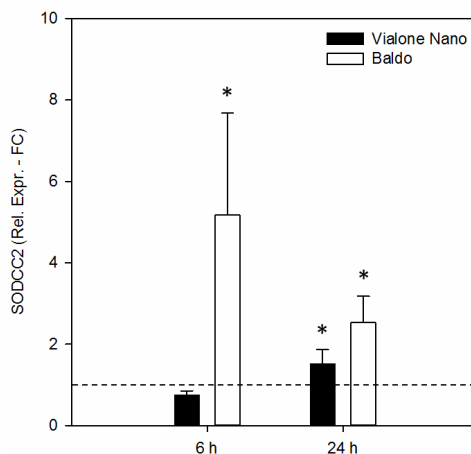


Fig. 3.28 Espressione relativa del gene *SODCC2* in colture cellulari delle varietà Vialone Nano e Baldo.

L'analisi dell'espressione genica è stata effettuata dopo 6 h e 24 h di trattamento con NaCl 100 mM. Gli asterischi indicano valori medi statisticamente diversi per $p < 0.05$ (test T-Student), tra i trattati e i relativi controlli i cui valori, assegnati come 1, non sono riportati nel grafico.

3. Risultati

3.5 Effetto dello stress ossidativo indotto dal trattamento con glucosio/glucosio ossidasi in colture cellulari di riso Vialone Nano e Baldo

Al fine di appurare il ruolo che la differente capacità antiossidante riscontrata nelle due cultivar ha nei meccanismi di difesa dalle stesse, le linee cellulari corrispondenti sono state sottoposte a stress ossidativo. Come mostrato nella Fig. 3.29, dopo 24 h dal trattamento con glucosio-glucosio ossidasi (GGOX), i livelli di H_2O_2 aumentano in entrambe le varietà. Tuttavia, la cultivar Vialone Nano mostra livelli più alti di H_2O_2 rispetto alla varietà Baldo suggerendo, ancora una volta, una maggiore capacità di Baldo di rimuovere il H_2O_2 , prodotto mediante il sistema enzimatico GGOX.

Per verificare l'esistenza di una correlazione tra l'aumento dei livelli di H_2O_2 e l'aumento della mortalità cellulare, è stato analizzato anche questo parametro biologico a seguito di trattamento con glucosio-glucosio ossidasi. Come si vede nella Fig. 3.30 la varietà più sensibile, Vialone Nano, mostra un aumento del 100% della mortalità dopo 48 h dal trattamento mentre la varietà Baldo non mostra un aumento significativo della mortalità, sottolineando ulteriormente la correlazione stress ossidativo-induzione morte cellulare e un maggiore effetto protettivo dei sistemi antiossidanti in Baldo.

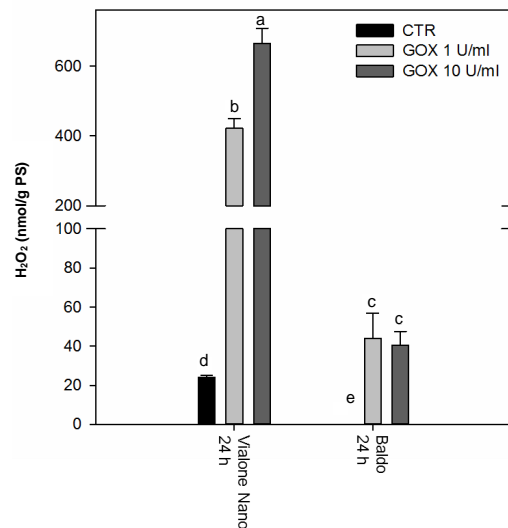


Fig. 3.29 Effetti del sistema GGOX sulla produzione di H_2O_2 in colture cellulari di Vialone Nano e Baldo. In figura sono mostrati i livelli di H_2O_2 a seguito di trattamento con glucosio 14 mM e GOX (glucosio ossidasi) 1 o 10 $U\ ml^{-1}$. PF: peso fresco. Le diverse lettere indicano valori medi statisticamente diversi per $p < 0.05$ (test ANOVA) tra i trattati e il relativo controllo.

3. Risultati

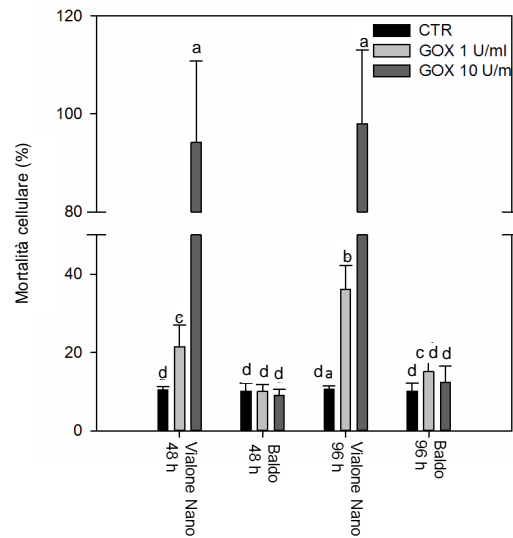


Fig. 3.30 Effetti del sistema GGOX sulla mortalità nelle colture cellulari di Vialone Nano e Baldo.

E' mostra la vitalità cellulare a seguito di trattamento con glucosio 14 mM e GOX (glucosio ossidasi) 1 o 10 U ml⁻¹. Le diverse lettere indicano valori medi statisticamente diversi per p<0.05 (test ANOVA) tra i trattati e il relativo controllo.

3. Risultati

3.6 Rapporto $[K^+]/[Na^+]$ ed espressione genica dei canali ionici in colture cellulari di Vialone

Nano e Baldo sottoposte a stress salino

In una fase più tardiva dello stress salino la pianta può andare incontro ad uno stress di tipo ionico causato da un alterato rapporto $[K^+]/[Na^+]$ a livello citoplasmatico; infatti una $[Na^+]$ oltre i livelli fisiologici provoca la depolarizzazione della membrana e la conseguente attivazione di canali voltaggio-dipendenti che favoriscono l'uscita del K^+ .

Dalle analisi delle concentrazioni degli ioni K^+ e Na^+ , condotte in questo studio (in collaborazione con l'Università di Padova) è emerso che, a 24 h dal trattamento, nelle colture cellulari di entrambe le varietà, si verifica un calo del contenuto di K^+ (Fig. 3.31a) accompagnato da un aumento del contenuto intracellulare di Na^+ (Fig. 3.31b). Nella varietà Baldo, più tollerante allo stress salino, i livelli intracellulari di K^+ riprendono ad aumentare a 48 h dal trattamento, mentre nella varietà Vialone Nano rimangono invariati (Fig. 3.31a). Come si osserva nella Fig. 3.31b, i livelli di Na^+ rimangono sempre alti, anche a tempi più tardivi dal trattamento, in entrambe le varietà. La diversa tolleranza delle due varietà, allo stress salino, è data dalla capacità della varietà Baldo di ripristinare l'intake di K^+ durante lo stress, come anche evidenziato dai dati ottenuti dall'analisi del rapporto $[K^+]/[Na^+]$ (Fig. 3.31c) che mostrano come nella varietà Baldo ci sia un aumento del rapporto $[K^+]/[Na^+]$ a tempi lunghi in seguito a trattamento mentre nella varietà Vialone Nano questo rapporto diminuisce durante tutti i giorni di trattamento. Questi dati sono indice del fatto che la strategia adottata dalla varietà più resistente non coinvolge tanto i canali del Na^+ deputati all'esclusione o alla compartimentalizzazione dello ione quanto i canali del K^+ .

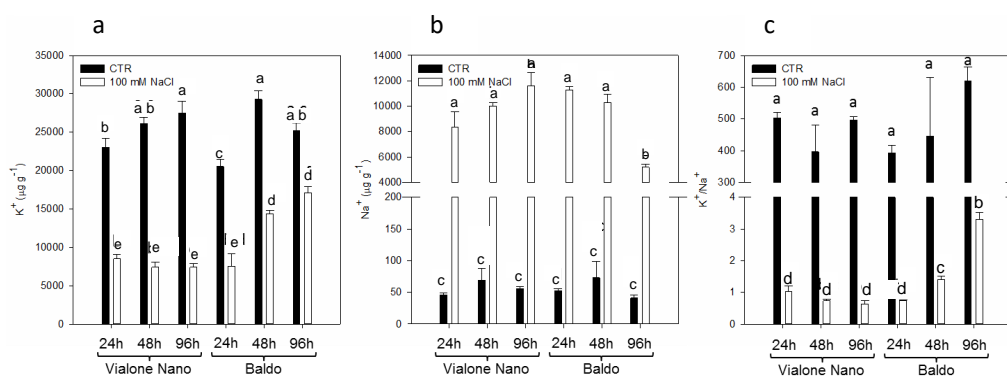


Fig. 3.31 Analisi dei livelli di K^+ (a) e Na^+ (b) registrati nelle colture cellulari delle due varietà Vialone Nano e Baldo.

L'analisi è stata effettuata a 24h, 48h e 72h di trattamento con NaCl 100 mM. Nella Fig. c è rappresentato il rapporto $[K^+]/[Na^+]$ nelle due varietà a diversi tempi di trattamento con NaCl 100 mM. Per i controlli è stata utilizzata H_2O . Le diverse lettere indicano valori medi statisticamente diversi per $p < 0.05$ (test ANOVA) tra i trattati ed il relativo controllo.

3. Risultati

Quanto enunciato sopra viene confermato dall'analisi dell'espressione dei geni codificanti il canale ad alta affinità per il K^+ (*HAK5*) ed i canali del K^+ localizzati nel vacuolo (*OstPKa*, *OstPKb*) (Fig. 3.32). Questi canali hanno un ruolo chiave nel ripristino delle $[K^+]$ a livelli fisiologici.

Come si vede nella Fig. 3.32a il gene codificante per il canale responsabile del passaggio del K^+ dal vacuolo al citosol, è sovra-espresso più precocemente, a 6 h dal trattamento, nella varietà Baldo rispetto alla varietà Vialone Nano. E' possibile trarre conclusioni simili anche osservando l'espressione dei geni *OstPKa* e *OstPKb* codificanti canali implicati nell'*uptake* di K^+ . Entrambe i geni sono up-regolati già a 6 h dal trattamento nella varietà Baldo.

Un'ulteriore conferma dell'ipotesi secondo cui i canali del Na^+ non sembrerebbero implicati nella resistenza allo stress di queste due varietà è data dai risultati ottenuti dall'analisi dell'espressione dei geni codificanti i canali del Na^+ (*NHX1*, *SOS1*). I risultati, non mostrati, evidenziano come l'espressione di questi geni non cambia a seguito di trattamento e nelle due varietà.

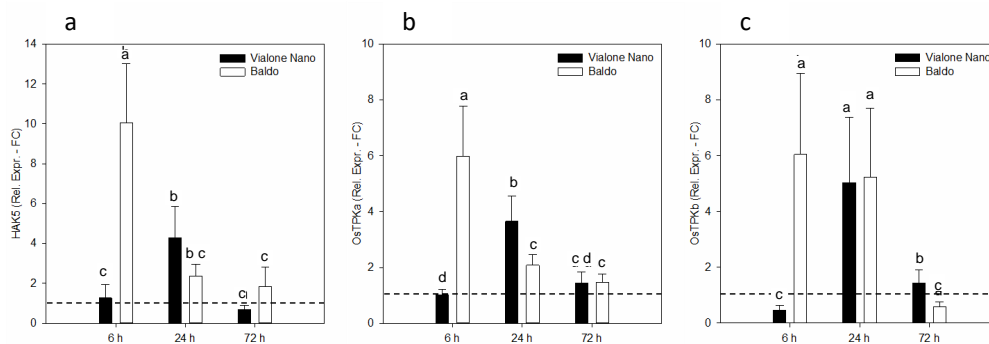


Fig. 3.32 Espressione relativa dei geni *HAK5* (a), *OstPKa* (b), *OstPKb* (c) nelle in colture cellulari delle varietà Vialone Nano e Baldo.

L'analisi dell'espressione genica è stata effettuata dopo 6h, 24h e 72h di trattamento con NaCl 100 mM. Le diverse lettere indicano valori medi statisticamente diversi per $p < 0.05$ (test ANOVA) tra i trattati ed i relativi controlli.

Tesi di dottorato in Bioingegneria e Bioscienze, Scienze e Tecnologie degli Alimenti e della Nutrizione, di Maria Beatrice Ronci, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 04/05/2017.

La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte.

4. DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Maria Beatrice Ronci

4. Discussioni e conclusioni

La salinizzazione dei suoli è, tra gli stress abiotici, uno dei fattori ambientali che maggiormente limita la produttività delle piante. Le piante, sulla base della loro capacità di resistere ad un ambiente salino, possono essere suddivise in due grandi categorie, le alofite e le glicofite. Si definiscono glicofite le piante per cui una concentrazione pari a 200 mM di NaCl rappresenta un fattore limitante per la crescita, mentre sono dette alofite le piante in grado di crescere e svilupparsi anche a tale concentrazione di sale (English and Colmer, 2013; Flowers and Colmer, 2008; Gupta and Huang, 2014).

La maggior parte delle piante destinate al mercato agricolo appartengono alla categoria delle glicofite e tra queste ha grande rilevanza il riso, in quanto rappresenta un alimento essenziale per il 50% della popolazione mondiale. Nonostante il riso sia classificato come una tra le specie maggiormente sensibile al sale, si distinguono cultivar, come la Pokkali appartenente alla sottospecie (*ssp.*) *indica*, che mostrano elevata tolleranza al sale (Kavitha *et al.*, 2012).

Differentemente dalla *ssp. indica*, la *ssp. japonica*, da quanto riportato in letteratura, risulta essere più sensibile agli stress salini (Hasthanasombut *et al.*, 2011; Lutts *et al.*, 1995). Inoltre, poiché le cultivar appartenenti alla *ssp. japonica* sono maggiormente coltivate nel territorio italiano, gli studi e le ricerche volte a comprendere i meccanismi di tolleranza allo stress salino (problematica che colpisce anche le terre Italiane) sono di particolare importanza per aumentare e migliorare la produttività, senza rinunciare alla qualità dei prodotti risicoli Italiani. A tal proposito nel presente lavoro sono state utilizzate come modello due cultivar, Vialone Nano e Baldo, particolarmente importanti nel mercato Italiano.

Le due varietà, già dalle prime evidenze fenotipiche, hanno mostrato una diversa risposta allo stress salino (Fig. 3.1). Anche i risultati relativi alle analisi dei parametri cellulari evidenziano che la varietà Vialone Nano mostra una diminuzione della crescita e un aumento della mortalità, già a pochi giorni dal trattamento con diverse concentrazioni di NaCl. Baldo, invece, va incontro ad un calo della crescita, e un aumento della mortalità, solo a tempi più tardivi dai trattamenti e a concentrazioni più alte di NaCl (Fig. 3.12 e 3.13).

E' largamente riportato in letteratura come in condizioni di stress si assista ad un aumento della produzione delle ROS in pianta (Ozgur *et al.*, 2013). A seguito di stress salino l'aumento della produzione delle ROS, oltre i normali livelli fisiologici, è dovuto ad una serie di fattori in parte riconducibili ad uno dei meccanismi di risposta primaria, cioè la chiusura stomatica.

La chiusura stomatica diminuisce la perdita di acqua contrastando lo stress salino ma, nello stesso tempo, riduce gli scambi gassosi limitando, così, l'efficienza fotosintetica ma anche determinando un aumento della concentrazione di O₂ all'interno delle cellule verdi. La reazione

4. Discussioni e conclusioni

luminosa ed il ciclo di Calvin-Benson risultano disaccoppiati, da una parte vi è una minore disponibilità di CO₂ e dall'altra un "sovraccarico" delle catene di trasporto di elettroni (dovuto ad una diminuita disponibilità degli accettori di elettroni come il NADP⁺), con conseguente maggior facilità a indurre una riduzione parziale dell'O₂ e quindi un'iper-produzione delle ROS (Asada, 2006; Ozgur *et al.*, 2013).

Tra le ROS prodotte a seguito di stress salino, ha particolare importanza il H₂O₂. L'incremento della produzione di H₂O₂, in piante sottoposte a stress salino, potrebbe essere in parte anche dovuto all'attività ossigenasica della Rubisco che, avendo una minore disponibilità di CO₂, sposta la propria attività catalitica verso il processo di ossigenazione con conseguente produzione di fosfoglicolato e attivazione della fotorespirazione, processo nel quale si ha una massiccia produzione di H₂O₂ nei perossisomi. È interessante notare che le alofite evitano questo processo usando una fotosintesi tipica delle piante C₄ (Bauwe *et al.*, 2010; Bauwe *et al.*, 2012). Anche nel presente lavoro è emerso che a seguito di stress salino ci sia un aumento della produzione di H₂O₂, anche se nel nostro caso tale aumento non può essere imputabile alla fotorespirazione in quanto saggiato in colture cellulari tenute al buio e che per le condizioni di crescita, in continua agitazione, non presentano alterazioni dei livelli di CO₂ e O₂ indotti dallo stress.

Le ROS possono anche essere prodotte da enzimi, attivati in risposta ad una serie di stimoli, e agire come molecole segnale in risposta a stress di tipo biotico ed abiotico (Karkonen and Kuchitsu, 2015; Marino *et al.*, 2012). Tra gli enzimi produttori di ROS hanno una grande importanza le NADPH ossidasi.

Le NADPH ossidasi appartenenti alla famiglia delle RBOH (*respiratory burst oxidase homolog*), sono in grado di produrre O₂^{•-} a seguito dell'ossidazione del NADPH e il trasferimento di un elettrone all'ossigeno. Le RBOHs sono attivate in seguito all'aumento dei livelli di Ca²⁺ citosolico che si osserva conseguentemente all'accumulo di Na⁺ nella cellula (Lecourieux *et al.*, 2006). Le ROS prodotte direttamente o indirettamente dall'attivazione delle RBOHs attivano una via di *signalling* che porta al potenziamento dei meccanismi di risposta allo stress salino (Shabala and Pottosin, 2014). Un'evidenza dell'importanza delle RBOHs è data anche da esperimenti condotti su *Arabidopsis thaliana* in cui sono presenti 10 geni *RBOHA-J* con un differente pattern di espressione in relazione ai fattori ambientali (Marino *et al.*, 2012). I geni *RBOHD* e *RBOHF* sono espressi soprattutto in condizioni di stress salino e, infatti, è stato dimostrato come mutanti deficitari in tali geni mostrino una maggiore sensibilità al Na⁺ (Jiang *et al.*, 2012; Kurusu *et al.*, 2015).

4. Discussioni e conclusioni

Coerentemente con i dati di letteratura, nel presente studio è stato mostrato che la varietà Baldo, quella in grado di rispondere meglio allo stress salino, mostra un aumento dell'espressione del gene *RBOHA* già a poche ore dal trattamento con NaCl 100 mM (Fig. 3.27).

Un'altra classe di enzimi candidati alla produzione di H₂O₂ in condizioni di stress salino sono le Ammino Ossidasi (AO). Le AO catalizzano la deaminazione ossidativa delle poliammine (PAs) (putresceina, spermina e spermidina). Le putresceine vengono ossidate dalle CuAOs, presenti soprattutto nelle dicotiledoni, mentre le spermine e spermidine dalle PAOs, rappresentate per lo più nelle monocotiledoni, con la formazione di prodotti di reazione come amminoaldeidi e H₂O₂ (Angelini *et al.*, 2010; Cona *et al.*, 2006;). I prodotti del metabolismo delle PAs sono coinvolti in molti processi cellulari, tra cui la risposta agli stress abiotici (Cona *et al.*, 2006). Il catabolismo delle PAs, infatti, portando alla formazione di amminoaldeidi e H₂O₂, può sia promuovere la resistenza allo stress abiotico sia indurre la morte cellulare programmata (PCD). Dagli studi di Xing *et al.*, (2007), condotti su radici di soia, è emerso che, durante lo stress salino, si assiste ad un aumento dell'attività della AOs con produzione di amminoaldeidi da cui, per mezzo della amminoaldeidi deidrogenasi (AMADH), si forma l'acido γ -amminobutirrico (GABA) che ha vari ruoli nei processi cellulari tra cui quello di protezione contro le ROS e di difesa della pianta dallo stress salino (Angelini *et al.*, 2010). Dall'altro lato, però, il H₂O₂ prodotto dal catabolismo delle PAs può essere coinvolto nell'attivazione di processi di induzione della PCD. In studi condotti da Moschou *et al.*, (2008) su piante transgeniche di tabacco (*Nicotiana tabacum* cv Xanthi), sovraespressanti ZmPAO, è emerso che queste piante, sottoposte a stress salino, a seguito dell'ossidazione della spermidina, ad opera della ZmPAO, producevano alti livelli di H₂O₂ e andavano incontro a PCD a differenza di altre piante transgeniche, in cui era stata indotta una *down* regolazione delle PAOs endogene (Angelini *et al.*, 2010). Le PAs possono essere anche implicate nello *scavenging* delle ROS, grazie alla loro natura chimica policationica, oppure possono indurre una tolleranza allo stress salino influenzando, direttamente o indirettamente, l'attività di trasportatori ionici (Saha *et al.*, 2015). Inoltre, si ritiene che gli enzimi appartenenti alle AO e alle RBOH possano avere, entrambi, un ruolo nella regolazione del processo di chiusura stomatica durante lo stress di tipo salino (Gemes *et al.*, 2016). Da questi studi si può dedurre che i ruoli delle PAs e dei prodotti derivati dal loro metabolismo sono molteplici e con funzioni diverse. I processi di anabolismo e catabolismo delle PAs devono essere dei processi finemente regolati al fine di determinare la resistenza o la morte della pianta a seguito di stress. Pertanto, sarà interessante verificare in un prossimo lavoro se anche l'espressione/attività delle AO/PAO subisca

4. Discussioni e conclusioni

delle variazioni indotte dallo stress nei nostri sistemi vegetali o presenti delle differenze significative nelle due varietà.

La varietà più sensibile, Vialone Nano, mostra un aumento del H_2O_2 extracellulare ed intracellulare (Fig. 3.14a). In Baldo, invece, si osserva un picco di H_2O_2 intracellulare a 5 min dal trattamento seguito da una sua rapida diminuzione (Fig. 3.14b). Questo picco transiente è tipico di molte risposte di difesa in cui il H_2O_2 agisce come molecola segnale. I livelli di H_2O_2 sono anche dipendenti dall'attività di enzimi coinvolti nel processo di detossificazione, come l'APX e la CAT. È infatti noto in letteratura che gli enzimi con capacità antiossidante siano indispensabili per il ripristino dell'omeostasi redox e la resistenza agli stress (Rangani *et al.*, 2016).

I livelli di attività di cAPX e CAT sono più alti nella varietà Baldo, coerentemente con i più bassi livelli di H_2O_2 registrati in questa varietà sia in condizioni controllo che in seguito a stress (Fig. 3.20 e 3.21). Tali risultati fanno ipotizzare la presenza di un potenziamento dei meccanismi endogeni di *scavenging* delle ROS nella linea cellulare ottenuta da Baldo, meccanismo che spiegherebbe almeno in parte la maggiore resistenza di questa varietà di riso allo stress salino.

In letteratura è riportata la presenza di 8 isoforme dell'APX in *Oryza sativa*; ci sono infatti 2 APX citosoliche (APX1 e APX2), 2 perossisomiali e 4 cloroplastiche (Teixeira *et al.*, 2006). Nelle cellule ottenute da Baldo, l'APX citosolica sembra essere maggiormente coinvolta nei meccanismi di difesa dallo stress salino. Coerentemente dati di letteratura dimostrano come in piante di prugno un aumento dell'espressione dell'APX-1 citosolica determina un aumento della tolleranza allo stress salino (Diaz-Vivancos *et al.*, 2013). L'aumento dell'attività dell'APX citosolica (cAPX) registrata in Baldo in seguito a stress è in accordo anche con i risultati ottenuti dall'analisi dell'espressione genica in cui si evidenzia un aumento dell'espressione dell'APX1 (Fig. 3.25). L'espressione della CATB aumenta invece in VN (Fig. 3.26), anche se tale aumento non sembra essere evidente quando ne viene valutata l'attività enzimatica. Tuttavia è bene ricordare che l'APX è un enzima capace di modulare più finemente della CAT i livelli di H_2O_2 , data la sua bassa Km per questo substrato, e il fatto che Baldo mostri un incremento dell'attività e dell'espressione della cAPX è pertanto coerente sia con i ridotti livelli di H_2O_2 accumulato in questa linea e sia con l'ipotesi del potenziamento dei sistemi redox come parte dei meccanismi di difesa che aumentano la tolleranza di questa varietà allo stress salino.

L'aumento del H_2O_2 nelle prime fasi, successive allo stress, può anche trovare spiegazione nell'attivazione dell'enzima SOD che, come noto, viene utilizzato come prima linea di difesa (Alscher *et al.*, 2002). La SOD dismuta $O_2^{\bullet -}$ con produzione di H_2O_2 che può agire da secondo messaggero per l'attivazione di meccanismi di difesa che includono il potenziamento dei sistemi di

4. Discussioni e conclusioni

scavenging delle ROS (Bose *et al.*, 2014; Dodd *et al.*, 2010). L'espressione genica della *SODCC2* mostra nella varietà Baldo un aumento dopo 6 h dal trattamento; nella varietà Vialone Nano l'aumento di espressione di questo gene risulta più tardiva (Fig. 3.28). Inoltre, dall'analisi dell'attività enzimatica, è possibile notare che, nonostante i livelli basali della SOD siano più alti in Vialone Nano, dopo 24 h dal trattamento si assiste ad un incremento % dell'attività della SOD maggiore in Baldo, supportando l'ipotesi che il sistema di risposta allo stress salino sia più efficiente in Baldo rispetto a Vialone Nano (Fig. 3.18).

L'ASC viene utilizzato come donatore di elettroni dall'APX per ridurre il H_2O_2 a H_2O con conseguente produzione di MDHA. L'ASC può essere rigenerato, tramite una reazione di ossido riduzione-NADPH dipendente, per mezzo dell'enzima MDHAR che riduce il MDHA ad ASC (Ozgun *et al.*, 2013). Nel presente studio l'attività enzimatica della MDHAR ha livelli basali più alti in Baldo rispetto a Vialone Nano, questo potrebbe indicare un riciclo più efficace dell'ASC, sia in situazioni fisiologiche che in situazioni di stress (Fig. 3.23).

Anche nel caso della GR, a seguito dell'analisi dell'attività enzimatica, si vede come la varietà Baldo abbia un'attività basale più alta, rispetto a Vialone Nano. Questo dato viene confermato anche dai risultati dell'analisi dei livelli di GSH+GSSG in cui si evidenzia come Baldo abbia livelli di glutazione maggiori, sia in condizioni controllo che in seguito a stress (Fig. 3.17).

La cultivar Baldo quindi sembrerebbe essere più tollerante allo stress salino grazie alla sua maggiore capacità di contrastare lo stress ossidativo. Al fine di validare questa tesi, le linee cellulari Vialone Nano e Baldo sono state esposte direttamente a stress ossidativo mediante l'utilizzo di un sistema enzimatico (GGOX) rilasciante H_2O_2 . In seguito a trattamento con GGOX, la varietà Baldo mostrava una maggiore capacità di metabolizzare il H_2O_2 senza subire effetti deleteri in termini di riduzione della vitalità cellulare. La varietà sensibile, Vialone Nano, invece, mostrava una minore capacità di contrastare il H_2O_2 con conseguente incremento della mortalità cellulare (Fig. 3.29 e 3.30).

La capacità di rispondere e contrastare i danni a livello cellulare, derivati dallo stress salino, non è solo indice di una maggiore attivazione dei sistemi di *scavenging* ma, anche, della capacità delle cellule di mantenere costante il rapporto $[K^+]/[Na^+]$ attivando canali implicati nel passaggio di questi ioni.

L'analisi dell'espressione di alcuni dei geni codificanti canali coinvolti nel trasporto del K^+ , *HAK5*, *OsTPK1a* e *OsTPK1b*, ha evidenziato come nella varietà Baldo l'attivazione dell'espressione di questi geni sia più precoce rispetto a quanto avviene nella varietà Vialone Nano (Fig. 3.32).

4. Discussioni e conclusioni

Altre evidenze scientifiche confermano come la sovraespressione di questi ed altri geni, conferisca una maggiore tolleranza allo stress in cellule di riso (Ahmad *et al.*, 2016; Horie *et al.*, 2011).

Questi dati sono confermati anche dalle analisi dei livelli di K^+ e Na^+ che evidenziano come, in un primo momento, ci sia un efflusso dello ione K^+ dalle cellule in entrambe la varietà e, successivamente, solo la varietà Baldo sia in grado di ridurre la perdita di K^+ a tempi lunghi successivi allo stress (Fig. 3.31). Quando la pianta non è in grado di contrastare gli effetti ionici dello stress salino si va incontro alla depolarizzazione della membrana. In queste condizioni ad essere attivati sono i canali GORK che favoriscono l'uscita degli ioni K^+ . In letteratura, è noto che l'attivazione di questi canali sia ROS dipendente. Questo giustificherebbe ulteriormente l'alterazione del rapporto $[K^+]/[Na^+]$, a favore del Na^+ nella varietà Vialone Nano (Demidchik *et al.*, 2010). Le ROS, infatti sono in grado di indurre modificazioni post-traduzionali modificando l'attività biologica di diverse proteine come parte del *signalling* indotto dalla percezione dello stress (de Pinto *et al.*, 2013)

In conclusione i dati ottenuti in questa tesi indicano che, pur trattandosi di due cultivar appartenenti ad una sottospecie poco tollerante al sale, la varietà Baldo ha maggiore capacità di risposta allo stress ossidativo causato da un eccesso di NaCl. Questa peculiarità sembra essere soprattutto dovuta ad un più alto livello endogeno di enzimi e metaboliti redox coinvolti in questi meccanismi di difesa, anche se è probabile che la varietà Baldo abbia anche una miglior capacità di modulare i propri sistemi di difesa attivando precocemente, rispetto a Vialone Nano, l'espressione di geni coinvolti nella regolazione delle ROS e di specifici canali ionici.

Sono in corso ulteriori studi per caratterizzare meglio le vie di segnalazione attivate dallo stress salino nelle due varietà di riso per comprendere più approfonditamente i meccanismi molecolari che determinano tolleranza allo stress salino nella cultivar Baldo. Questi risultati potranno contribuire all'identificazione di strategie biotecnologiche atte ad ottenere nuove varietà di riso resistenti allo stress salino.

Tesi di dottorato in Bioingegneria e Bioscienze, Scienze e Tecnologie degli Alimenti e della Nutrizione, di Maria Beatrice Ronci, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 04/05/2017.
La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte.

5. BIBLIOGRAFIA

Maria Beatrice Ronci

Bibliografia

Ahmad P., Arafat A.A.L., Abd_Allah E.F., Hashem A., Sarwat M., Anjum N.A., Salih G. (2016) Calcium and potassium supplementation enhanced growth, osmolyte secondary metabolite production, and enzymatic antioxidant machinery in cadmium-exposed Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Frontiers in Plant Science* 7, 513.

Alscher R.G., Erturk N. and Heath L.S. (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53, 1331-1341.

Angelini R., Cona A., Federico R., Fincato P., Tavladoraki P., Tisi A. (2010) Plant amine oxidase "on the move": An update. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 560-564.

Apel K. and Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55, 373-399.

Apse M.P., Aharon G.S., Snedden W.A., Blumwald E. (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in *Arabidopsis*. *Science* 285, 1256-1258.

Apse M.P., Sottosanto J.B. and Blumwald E. (2003) Vacuolar cation/H⁺ exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of AtNHX1, the *Arabidopsis* vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter. *Plant Journal* 36, 229-239.

Asada K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141, 391-396.

Atkinson N.J. and Urwin P.E. (2012) The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to field. *Journal of Experimental Botany* 63, 3523-3544.

Bauwe H., Hagemann M. and Fernie A.R. (2010) Photorespiration: players, partners and origin. *Trends in Plant Science* 15, 330-336.

Bauwe H., Hagemann M., Kern R., Timm S. (2012) Photorespiration has a dual origin and manifold links to central metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 15, 269-275.

Beauchamp C. and Fridovich I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44, 276-287.

Bellincampi D., Dipierro N., Salvi G., Cervone F., De Lorenzo G. (2000) Extracellular H₂O₂ induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated rolB gene expression in Tobacco leaf explants. *Plant Physiology* 122, 1379-1386.

Bienert G.P., Møller A.L., Kristiansen K.A., Schulz A., Møller I.M., Schjoerring J.K., Jahn T.P. (2007) Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *Journal of Biological Chemistry* 282, 1183-1192.

Bosco de Oliveira A., Mendes Alencar N.L. and Gomes-Filho E. (2013). Comparison between the water and salt stress effects on plant growth and development, responses of organisms to water stress. *Responses of Organisms to Water Stress*. InTech ed. Sener Akinci.

Bibliografia

- Bose J., Rodrigo-Moreno A. and Shabala S. (2014)** ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. *Journal of Experimental Botany* 65, 1241-1257.
- Bradford M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Chaves M.M., Flexas J. and Pinheiro C. (2009)** Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103, 551-560.
- Chen Z., Pottosin I.I., Cuin T.A., Fuglsang A.T., Tester M., Jha D., Zepeda-Jazo I., Zhou M., Palmgren M.G., Newman I.A., Shabala S. (2007)** Root plasma membrane transporters controlling K^+/Na^+ homeostasis in salt-stressed barley. *Plant Physiology* 145, 1714–1725.
- Cona A., Rea G., Angelini R., Federico R., Tavladoraki P. (2006)** Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science* 11, 80-88.
- Costantini A.C. and Lorenzetti R. (2013)** Soil degradation processes in the Italian agricultural and forest ecosystems. *Italian Journal of Agronomy* 8, 233-243.
- Cuin T.A., Miller A.J., Laurie S.A., Leigh R.A. (2003)** Potassium activities in cell compartments of salt-grown barley leaves. *Journal of Experimental Botany* 54, 657-661.
- Das P., Nutan K.K., Singla-Pareek S.L., Pareek A. (2015)** Understanding salinity responses and adopting 'omics-based' approaches to generate salinity tolerant cultivars of rice. *Frontiers in Plant Science* 6, 712-728.
- De Gara L., Locato V., Dipierro S., de Pinto M.C. (2010)** Redox homeostasis in plants. The challenge of living with endogenous oxygen production. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 173S, S13-S19.
- de Pinto M.C., Francis D. and De Gara L. (1999)** The redox state of the ascorbate dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma* 209, 90–97.
- de Pinto M.C., Tommasi F. and De Gara L. (2000)** Enzymes of the ascorbate biosynthesis and ascorbate-glutathione cycle in cultured cells of tobacco Bright Yellow 2. *Plant Physiology and Biochemistry* 38, 541–550.
- de Pinto M.C. and De Gara L. (2004)** Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. *Journal of Experimental Botany* 55, 2559-2569.
- de Pinto M.C., Locato V. and De Gara L. (2012)** Redox regulation in plant programmed cell death. *Plant, Cell and Environment* 35, 234–244.

Bibliografia

de Pinto M.C., Locato V., Sgobba A., Romero-Puertas M. del C., Gadaleta C., Delledonne M., De Gara L. (2013) S-nitrosylation of ascorbate peroxidase is part of programmed cell death signaling in tobacco bright yellow-2 cells. *Plant Physiology* 163, 1766-75.

Demidchik V., Shabala S.N., Coutts K.B., Tester M.A., Davies J.M. (2003) Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca^{2+} - and K^{+} -permeable channels in plant root cells. *Journal of Cell Science* 116, 81-88.

Demidchik V., Cuin T.A., Svistunenko D., Smith S.J., Miller A.J., Shabala S., Sokolik A., Yurin V. (2010) Arabidopsis root K^{+} -efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *Journal of Cell Science* 123, 1468-1479.

Diaz-Vivancos P., Faize M., Barba-Espin G., Faize L., Petri C., Hernández J.A., Burgos L. (2013) Ectopic expression of cytosolic superoxide dismutase and ascorbate peroxidase leads to salt stress tolerance in transgenic plums. *Plant Biotechnology Journal* 11, 976-985.

Dodd A.N., Kudla J. and Sanders D. (2010) The language of calcium signaling. *Annual Review of Plant Biology* 61, 593-620.

English J.P. and Colmer T.D. (2013) Tolerance of extreme salinity in two stem-succulent halophytes (Tecticornia species). *Functional Plant Biology* 40, 897-912.

European Commission (2006) Communication from the Commission to the Council, the European parliament, the council, the European economic and social committee and the committee of the regions. Thematic strategy for soil protection. Thematic strategy for soil protection. (COM (2006)231 final). European Commission, Bruxelles, Belgium.

European Commission (2012) Report from the Commission to the Council, the European parliament, the council, the European economic and social committee and the committee of the regions. The implementation of the Soil Thematic Strategy and ongoing activities. (COM/2012/046 final). European Commission, Bruxelles, Belgium.

FAO (2008) FAO Land and plant nutrition management service. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>

Flowers T.J. and Colmer T.D. (2008) Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist* 179, 945-963.

Flowers T.J. and Muscolo A. (2015) Introduction to the special issue: halophytes in a changing world. *AoB Plants* 7, 1-5.

Foyer C. H., Rowell J. and Walker D. (1983) Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta* 157, 239-244.

Foyer C.H. and Mullineaux P.M. (1994) Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. CRC Press ed. Boca Raton.

Bibliografia

Foyer C.H., Lopez-Delgado H., Dat J.F., Scott I.M. (1997) Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiologia Plantarum* 100, 241-254.

Foyer C.H. and Mullineaux P.M. (1998) The presence of dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase in plant tissues. *FEBS Letters* 425, 528-529.

Foyer C.H. and Noctor G. (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* 119, 355-364.

Foyer C.H. and Noctor G. (2011) Ascorbate and Glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology* 155, 2-18.

Fricke W., Akhiyarova G., Veselov D., Kudoyarova G. (2004) Rapid and tissue-specific changes in ABA and in growth rate in response to salinity in barley leaves. *Journal of Experimental Botany* 55, 1115-1123.

Fricke W., Akhiyarova G., Wei W., Alexandersson E., Miller A., Kjellbom P.O., Richardson A., Wojciechowski T., Schreiber L., Veselov D., Kudoyarova G., Volkov V. (2006) The short-term growth response to salt of the developing barley leaf. *Journal of Experimental Botany* 57, 1079-1095.

Fuller D.Q. (2011) Pathways to Asian civilizations: tracing the origins and spread of rice and rice cultures. *Rice* 4, 78-92.

Gaff D.F. and Okong'o-Ogola O. (1971) The use of non-permeating pigments for testing the survival of cells. *Journal of Experimental Botany* 22, 756-758.

Gaxiola R.A., Rao R., Sherman A., Grisafi P., Alper S.L., Fink G.R. (1999) The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 1480-1485.

Gémes K., Kim Y.J., Park K.Y., Moschou P.N., Andronis E., Valassaki C., Roussis A., Roubelakis-Angelakis K.A. (2016) An NADPH-oxidase/polyamine oxidase feedback loop controls oxidative burst under salinity. *Plant Physiology* 172, 1418-1431.

Gill S.S. and Tuteja N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909-930.

Golldack D., Su H., Quigley F., Kamasani U.R., Muñoz-Garay C., Balderas E., Popova O.V., Bennett J., Bohnert H.J., Pantoja O. (2002) Characterization of a HKT-type transporter in rice as a general alkali cation transporter. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* 31, 529-542.

Golldack D., Quigley F., Michalowski C.B., Kamasani U.R., Bohnert H.J. (2003) Salinity stress-tolerant and -sensitive rice (*Oryza sativa*) regulate AKT1-type potassium channel transcripts differently. *Plant Molecular Biology* 51, 71-81.

Bibliografia

Gossett D.R., Banks S.W., Millhollon E.P., Lucas M.C. (1996) Antioxidant response to NaCl stress in a control and an NaCl-tolerant cotton cell line grown in the presence of paraquat, buthionine sulfoximine, and exogenous glutathione. *Plant Physiology* 11, 803-809.

Gupta B. and Huang B. (2014) Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International Journal of Genomics* Article ID 701596.

Halliwell B. (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141, 312-322.

Hasthanasombut S., Supaibulwatana K., Mii M., Nakamura I. (2011) Genetic manipulation of Japonica rice using the OsBADH1 gene from Indica rice to improve salinity tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 104, 79-89.

Horie T., Sugawara M., Okada T., Taira K., Kaothien-Nakayama P., Katsuhara M., Shinmyo A., Nakayama H. (2011) Rice sodium-insensitive potassium transporter, OsHAK5, confers increased salt tolerance in tobacco BY2 cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111, 346-356.

Horie T., Karahara I. and Katsuhara M. (2012) Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: An overview with the central focus on rice plants. *Rice* 5, 11-29.

Hossain M.A., Hasanuzzaman M. and Fujita M. (2011) Coordinate induction of antioxidant defense and glyoxalase system by exogenous proline and glycinebetaine is correlated with salt tolerance in mung bean. *Frontiers of Agriculture in China* 5, 1-14.

Hu Y. and Schmidhalter U. (2005) Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168, 541-549.

Huang C., He W., Guo J., Chang X., Su P., Zhang L. (2005) Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient Arabidopsis mutant. *Journal of Experimental Botany* 56, 3041-3049.

Hussain T.M., Chandrasekhar T., Hazara M., Sultan Z., Saleh B.K., Gopal G.R. (2008) Recent advances in salt stress biology – a review. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* 3, 8-13.

Jackson S.A. (2016) Rice: the first crop genome. *Rice* 9, 14-16.

James R.A., Rivelli A.R., Munns R., von Caemmerer S. (2002) Factors affecting CO₂ assimilation, leaf injury and growth in salt-stressed durum wheat. *Functional Plant Biology* 29, 1393-1403.

Jannat R., Urajia M., Morofujia M., Islama M.M., Bloomc R.E., Nakamura Y., Mc Clungd C.R., Schroeder J.I., Morib I.C., Murataa Y. (2011) Roles of intracellular hydrogen peroxide accumulation in abscisic acid signaling in Arabidopsis guard cells. *Journal of Plant Physiology* 168, 1919-1926.

JCR (Joint Research Centre) (2011) The state of soil in Europe. Publication Office of the European Union, Luxembourg, 78.

Bibliografia

Jiang C., Belfield E.J., Mithani A., Visscher A., Ragoussis J., Mott R., Smith J.A., Harberd N.P. (2012) ROS-mediated vascular homeostatic control of root-to-shoot soil Na⁺ delivery in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal* 31, 4359-4370.

Kampfenkel K., Van Montagu M. and Inzé D. (1995).Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Analytical Biochemistry* 225, 165-167.

Kavitha P.G., Miller A.J., Mathew M.K., Maathuis F.J.M. (2012) Rice cultivars with differing salt tolerance contain similar cation channels in their root cells. *Journal of Experimental Botany* 63, 3289–3296.

Kärkönen A. and Kuchitsu K. (2015) Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants. *Phytochemistry* 112, 22-32.

Koyama M.L., Levesley A., Koebner R.M., Flowers T.J., Yeo A.R. (2001) Quantitative trait loci for component physiological traits determining salt tolerance in rice. *Plant Physiology* 125, 406-422.

Krishnamurthy P., Ranathunge K., Nayak S., Schreiber L., Mathew M.K. (2011) Root apoplastic barriers block Na⁺ transport to shoots in rice (*Oryza sativa L.*). *Journal of Experimental Botany* 62, 4215-4228.

Kurusu T., Kuchitsu K. and Tada Y. (2015) Plant signaling networks involving Ca²⁺ and Rboh/Nox-mediated ROS production under salinity stress. *Frontiers in Plant Science* 6, 427.

Lecourieux D., Mazars C., Pauly N., Ranjeva R., Pugin A. (2002) Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell* 14, 2627-2641.

Lecourieux D., Ranjeva R. and Pugin A. (2006) Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytologist* 171, 249-269.

Li J. and Jin H. (2007) Regulation of brassinosteroid signaling. *Trends in Plant Science* 12, 37-41.

Locato V., de Pinto M.C. and De Gara L. (2009) Different involvement of the mitochondrial, plastidial and cytosolic ascorbate-glutathione redox enzymes in heat shock responses. *Physiologia Plantarum* 135, 296-306.

Locato V., Novo Uzal E., Cimini S., Zonno M.C., Evidente A., Micera A., Foyer C.H., De Gara L. (2015) Low concentrations of the toxin ophiobolin. A lead to an arrest of the cell cycle and alter the intracellular partitioning of glutathione between the nuclei and cytoplasm. *Journal of Experimental Botany* 66, 2991-3000.

Lutts S., Kinet J.M. and Bouharmont J. (1995) Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa L.*) varieties differing in salinity resistance. *Journal of Experimental Botany* 46, 1843-1852.

Bibliografia

Mahajan S. and Tuteja N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444, 139-158.

Mapson L.W. and Breslow E. (1958) Biological synthesis of ascorbic acid: L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase. *The Biochemical Journal* 68, 395-406.

Marino D., Dunand C., Puppo A., Pauly N. (2012) A burst of plant NADPH oxidases. *Trends in Plant Science* 17, 9-15.

Miller G., Shulaev V. and Mittler R. (2008) Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum* 133, 481-489.

Mittler R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7, 405-410.

Moschou P.N., Paschalidis K.A., Delis I.D., Andriopoulou A.H., Lagiotis G.D., Yakoumakis D.I., Roubelakis-Angelakis K.A. (2008) Spermidine exodus and oxidation in the apoplast induced by abiotic stress is responsible for H₂O₂ signatures that direct tolerance responses in tobacco. *Plant Cell* 20, 1708-1724.

Munns R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 25, 239-250.

Munns R. and Tester M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59, 651-681.

Munnus R. and Gilliam M. (2015) Salinity tolerance of crops – what is the cost? *New Phytologist* 208, 668-673.

Murphy M. P. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal* 417, 1-13.

Muthayya S., Sugimoto J.D., Montgomery S., Maberly G.F. (2014) An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1324, 7-14.

Noctor G. and Foyer C.H. (1998) Ascorbate and Glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, 249-279.

Omasa K., Saji H., Youssefian S., Kondo N. (2002) Air pollution and plant biotechnology. Springer ed. Tokyo.

Oren A. (1999) Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63, 334-348.

Ozgun R., Uzilday B., Sekmen A.H., Ismail Turkan I. (2013) Reactive oxygen species regulation and antioxidant defence in halophytes. *Functional Plant Biology* 40, 832-847.

Bibliografia

Padh H. (1990) Cellular functions of ascorbic acid. *Biochemistry and Cell Biology* 68, 1166-1173.

Parihar P., Singh S., Singh R., Singh V.P., Prasad S.M. (2015) Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 4056-4075.

Parlamento Italiano (2016) AS 1328-AC3119 AS 1328-B (Art. 31) approvato definitivamente 6 luglio 2016.

Pellny T.K., Locato V., Vivancos P.D., Markovic J., De Gara L., Pallardó F.V., Foyer C.H. (2009) Pyridine nucleotide cycling and control of intracellular redox state in relation to poly (ADP-ribose) polymerase activity and nuclear localization of glutathione during exponential growth of *Arabidopsis* cells in culture. *Molecular Plant* 2, 442-456.

Pinto E., Sigaud-Kutner T.C.S., Leitao M.A.S., Okamoto O.K., Morse D., Colepicolo P. (2003) Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology* 39, 1008-1018.

Pitman M. and Lauchli A. (2002) Global impact of salinity and agricultural ecosystems. *Salinity: Environment – Plants – Molecules* 1, 3-20.

Rangani J., Parida A.K., Panda A., Kumari A. (2016) Coordinated changes in antioxidative enzymes protect the photosynthetic machinery from salinity induced oxidative damage and confer salt tolerance in an extreme halophyte *Salvadora persica* L. *Frontiers in Plant Science* 7, 50.

Rus A., Yokoi S., Sharkhuu A., Reddy M., Lee B.H., Matsumoto T.K., Koiwa H., Zhu J.K., Bressan R.A., Hasegawa P.M. (2001) AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na(+) entry into plant roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 14150-14155.

Saha J., Brauer E.K., Sengupta A., Popescu S.C., Gupta K., Gupta B. (2015) Polyamines as redox homeostasis regulators during salt stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* 3, 21.

Sakamoto A. and Murata N. (2002) The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant Cell Environment* 25, 163-171.

Schreiber L., Franke R., Hartmann K.D., Ranathunge K., Steudle E. (2005) The chemical composition of suberin in apoplastic barriers affects radial hydraulic conductivity differently in the roots of rice (*Oryza sativa* L. cv. IR64) and corn (*Zea mays* L. cv. Helix). *Journal of Experimental Botany* 56, 1427-1436.

Schurr T.F., Gollan T. and Schulze E.D. (1992) Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. II. Stomatal sensitivity to abscisic acid imported from the xylem sap. *Plant Cell Environment* 15, 561-567.

Senato (2014) Atto di sindacato ispettivo n. 3-01116

Senato (2014 a) Atto di sindacato ispettivo n. 3-01116 risposta il 13/11/2014 seduta del Senato 314.

Bibliografia

Sgobba A., Paradiso A., Dipierro S., De Gara L., de Pinto M.C. (2014) Changes in antioxidants are critical in determining cell responses to short- and long-term heat stress. *Physiologia Plantarum* 153, 68-78.

Shabala S. and Cuin T.A. (2007) Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum* 133, 651-669.

Shabala S. (2009) Salinity and programmed cell death: unravelling mechanisms for ion specific signaling. *Journal of Experimental Botany* 60, 709-712.

Shabala S. and Munns R. (2012) Salinity stress: physiological constraints and adaptive mechanism. *Plant Stress Physiology* 3, 59-93.

Shabala S. and Pottosin I. (2014) Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance. *Physiologia Plantarum* 151, 257-79.

Shalata A. and Neumann P.M. (2001) Exogenous ascorbic acid (Vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany* 52, 2207-2211.

Shao H.B., Chu L.Y., Lu Z.H., Kang C.M. (2008) Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences* 4, 8-14.

Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessarakli M. (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 2012, 1-26.

Smirnoff N. (2005) Antioxidants and reactive oxygen species in plants. Blackwell Publishing Ltd Ed. Oxford.

Steiger H.M., Beck E. and Beck R. (1977) Oxygen Concentration in Isolated Chloroplasts during Photosynthesis. *Plant Physiology* 60, 903-906.

Sweeney M. and Mc Couch S. (2007) The complex history of the domestication of rice. *Annals of Botany* 100, 951-957.

Taiz L. and Zeiger E. (2009) Fisiologia Vegetale, PICCIN IV ed. Padova.

Teixeira F.K., Menezes-Benavente L., Galvão V.C., Rogério Margis R., Margis-Pinheiro M. (2006) Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. *Planta* 224, 300-314.

Turrens J. F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology* 552, 335-344.

Vanlerberghe G.C. (2013) Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *International Journal Molecular Science* 14, 6805-6847.

Bibliografia

Veljovic-Jovanovic S.D., Pignocchi C., Noctor G., Foyer C.H. (2001) Low ascorbic acid in the vtc-1 mutant of Arabidopsis is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system. *Plant Physiology* 127, 426-435.

Venkateswarlu B., Shanker A.K., Shanker C., Maheswari M. (2012) Crop stress and its management: perspectives and strategies. Springer ed. Netherlands.

Wheeler G.L., Jones M.A. and Smirnoff N. (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 28, 365-369.

Wilkinson S. and Davies W.J. (1997) Xilem sap pH increase: A drought signal received at the apoplastic face of the guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermal symplast. *Plant Physiology* 113, 559-573.

Xing S.G., Jun Y.B., Hau Z.W., Liang L.Y. (2007) Higher accumulation of gamma-aminobutyric acid induced by salt stress through stimulating the activity of diamine oxidases in *Glycine max* (L.) Merr. roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 45, 560-566.

Yeo A.R. and Flowers T.J. (1983) Varietal differences in the toxicity of sodium ions in rice leaves. *Physiologia Plantarum* 59, 189-195.

Zhang J.X. and Kirkham M.B. (1996) Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytologist* 132, 361-373.