

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Biologia
Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Industriali



**Analisi dello sviluppo del meristema radicale di riso
(*Oryza sativa*, L) in risposta allo stress salino**

Relatore: Prof.ssa Elide Formentin
Dipartimento di Biologia (DiBio)

Controrelatore: Prof. Alessandro Alboresi
Dipartimento di Biologia (DiBio)

Laureando: Marcello Ammirati

Anno Accademico 2021/2022

Indice

1. Abstract	5
2. Introduzione:	6
2.1 Riso come alimento mondiale	6
2.1.1 La pianta di riso	7
2.1.2 l'Italia nel mercato mondiale del riso e importanza varietà	9
2.2 Varietà di riso analizzate	10
2.3 Il fenomeno del cuneo salino	11
2.3.1 Effetti della salinizzazione nel terreno e nel delta del Po	13
2.4 Stress salino e meccanismi di tolleranza nelle piante	14
2.4.1 La risposta delle piante allo stress salino	15
2.4.2 Meccanismi di difesa e tolleranza nelle glicofite	17
2.5 Stress salino nella pianta di riso	19
2.6 Lo sviluppo radicale in riso	20
2.7 Meristema radicale riso	21
2.8 Effetti del sale sul meristema radicale	23
2.9 Modello di sviluppo della radice di <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
2.9.1 Regolazione da parte dei ROS e ormonale	26
2.10 Sviluppo radicale per la selezione nuove varietà tolleranti e geni marcatori	
3. Scopo della tesi	31
4. Materiali e metodi	32
4.1 Sterilizzazione dei semi e crescita delle piante	32
4.2 Germinazione dei semi di riso	32
4.3 procedura di trattamento dei semi	34
4.4 Preparazione delle radici per l'analisi al microscopio confocale	35
4.5 Esperimento con ClearSee	36
4.6 Estrazione, quantificazione e preparazione della prima elica di cDNA	37
4.7 Real-Time PCR e geni testati	38
4.8 Imaging dell'acqua ossigenata	39
4.9 Imaging dello ione superossido	40
5. Risultati e discussione	41
5.1 Caratterizzazione della lunghezza di radice primaria	41
5.2 Caratterizzazione della radice primaria tramite microscopio confocale	43
5.3 Solvente ClearSee in radici di varietà di riso italiano	48
5.4 Analisi del gradiente di H ₂ O ₂ lungo la radice primaria	49
5.5 Analisi del gradiente di O ₂ ⁻ lungo la radice primaria	53

5.6	Analisi molecolare della crescita della radice in condizioni di stress	56
6.	Conclusioni	60
7.	Bibliografia	62

1. Abstract

Gli stress abiotici originati dal cambiamento climatico minacciano la sopravvivenza degli organismi vegetali. L'aumento della salinizzazione del suolo causa una forte riduzione della resa di produzione e crescita dell'organismo. Alcune varietà di riso mostrano una tolleranza allo stress salino che viene individuata dalle caratteristiche morfologiche e molecolari. Per questo motivo, ho deciso di indagare l'anatomia dell'apparato radicale. Di fatto, la radice rappresenta l'organo che determina la plasticità fenotipica. Durante il mio lavoro ho analizzato le radici di riso sottoposte alla situazione di stress tramite il microscopio confocale e fluorescenza per individuare la localizzazione delle tre zone istogeniche: Zona di divisione (DZ), Zona di allungamento (EZ) e Zona di transizione (TZ). L'ultima zona in questione è responsabile della dimensione della zona di divisione e per cui della crescita della radice. I risultati ottenuti hanno mostrato una considerevole riduzione della zona meristemica (DZ) se sottoposte a stress salino, indicando un'alterazione della crescita radicale. Inoltre, per appurare ciò ho condotto un'analisi del gradiente di distribuzione di due ROS: H_2O_2 e O_2^- . Nel modello di *Arabidopsis* hanno una distribuzione complementare, ciò che ho cercato di ottenere è la translazione di questo modello nella pianta di riso. I risultati hanno mostrato un'evidente concentrazione bassa di H_2O_2 nella zona di divisione e alta di O_2^- . Nella zona di transizione vi è un plateau, procedendo nella zona di allungamento vi è un innalzamento della concentrazione di H_2O_2 e abbassamento di O_2^- . Per questo motivo, le analisi confermano come H_2O_2 inibisce il ciclo cellulare, al contrario di O_2^- che stimola la crescita della radice e la divisione cellulare. Infine, per convalidare il coinvolgimento dei ROS e ormoni ho condotto un'analisi molecolare di tre geni: *PYL4*, *ZFP179* e *RBOH*.

2. Introduzione:

2.1 Riso come alimento base

Il riso viene coltivato dall'uomo da più di 7000 anni (Ruddiman et al., 2008). Viene considerato il secondo cereale più coltivato al mondo e costituisce la maggior fonte di sostentamento per più della metà della popolazione mondiale. In paesi come: Bangladesh, Cambogia, Indonesia, Laos, Myanmar, Thailandia e Vietnam si ha un consumo pro-capite annuo che varia tra i 130 e 180 chili. Secondo le statistiche della FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) più del 11% delle terre coltivabili del mondo, corrispondenti a circa 150 milioni di ettari, sono dedicate alla risicoltura. Nel 2021 sono state prodotte 783 milioni di tonnellate (520,3 milioni di tonnellate macinate) di riso sufficienti a sfamare un terzo della popolazione mondiale. Il maggiore produttore di riso nel mondo è l'Asia che nel 2021 ha prodotto 677 milioni di tonnellate di riso, seguita dall'Africa e America del Sud. In questo quadro, l'Europa si inserisce tra le nazioni con il più piccolo tasso di produzione equivalente 2,8 milioni di tonnellate (1,7 milioni di tonnellate macinate) (FAO). Il calo della produzione è dovuto a un grave deficit di precipitazioni che ha causato una disponibilità di acqua per irrigazione molto più basso, costringendo a come nel caso dell'uso di acqua salmastra. Di conseguenza, le aree risicole marginali (quelle meno produttive) non sono state piantate nelle condizioni previste.

Attualmente, 2022, la popolazione mondiale conta 8 miliardi di persone, dato in costante aumento stimato raggiungere i 9 miliardi entro il 2050 (Fig.1) (UN Population division 2009). La crescita demografica necessita di corrispondere un aumento della produzione delle risorse alimentari, un obiettivo che include una vasta gamma di settori interconnessi. Rispetto a quanto detto precedentemente, il riso copre i due terzi del fabbisogno calorico mondiale derivante da prodotti vegetali. La produzione attuale non è in grado di soddisfare la popolazione in crescita e la richiesta calorica (Ray et al., 2013). I principali propositi sono quelli di individuare nuove aree coltivabili, in linea con l'espansione urbanistica, in proporzione all'andamento demografico e inoltre tenere conto delle conseguenze

geofisiche e ambientali dell'utilizzo di coltivazione estensive che porterebbero a: perdita di biodiversità, impoverimento del terreno e desertificazione.

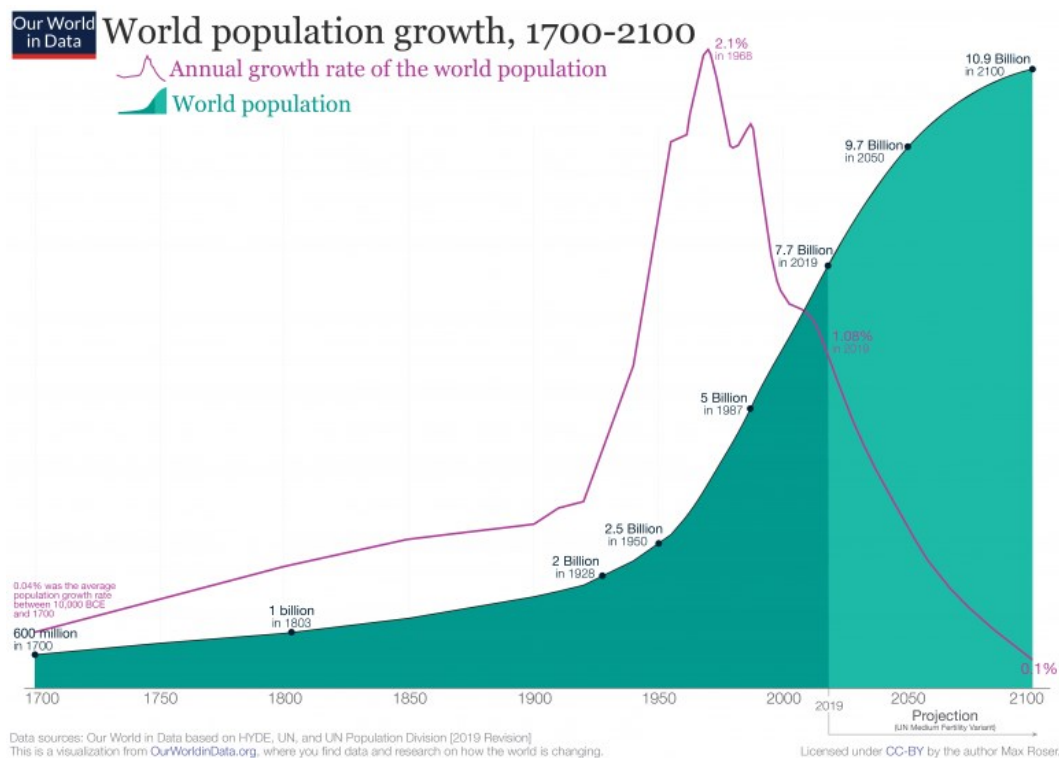


Figura 1 - andamento della crescita di popolazione dal 1700 al 2100. Fonte: Our World in Data, Roser and Rodés-Guirao et al., 2013.

In Italia la risicoltura è estesa su circa 230.000 ettari, con una produttività di 6,3 tonnellate per ettaro, concentrati per lo più nella Valle Padana e in generale dove sono possibili irrigazioni a basso costo. Il 90% della superficie italiana investita a riso è localizzata nelle province di Vercelli, Pavia, Novara e Milano, il restante è suddiviso nelle province di Mantova, Verona, Rovigo e Ferrara. Nel resto d'Italia troviamo anche coltivazioni più piccole nelle zone di Siena, Grosseto e Sardegna. L'Italia risulta molto attiva nel campo delle esportazione, gli scambi internazionali mostrano una quantità apprezzabile nella sua produzione. Considerando la produttività media per ettaro: ciò significa che possono essere sfamate più persone per unità di terreno.

2.1.1 La pianta di riso

Il riso (*Oryza sativa* L.) è una pianta erbacea annuale monocotiledone appartenente alla famiglia delle Graminacee *Poaceae*, di origine asiatica,

semiacquatica, le cui cariossidi ricche in amido sono abbondantemente usate come fonte di nutrimento. Il genere *Oryza* consiste di 23 specie e di queste solo *Oryza sativa* e *Oryza glaberrima* sono utilizzate in agricoltura (Nair et al., 2019, Chapter 4). Da entrambe viene prodotto il cereale riso inteso come alimento e *Oryza sativa* costituisce la stragrande maggioranza di quello coltivato su scala mondiale.

La crescita della pianta necessita di una parziale sommersione in acqua stagnante in concomitanza a elevati livelli di umidità. Inoltre, è fondamentale per la crescita e sopravvivenza della pianta una copertura idrica costante nelle regioni a clima temperato, con la funzione di proteggere la coltura da sbalzi di temperatura tra giorno e notte. Per questo motivo, la pianta di riso può crescere solo se parzialmente sommersa. Si calcola che per ottenere un chilogrammo di riso, in 3-4 mesi, si debbano impiegare dai 3.000 ai 10.000 litri d'acqua, in base alla permeabilità del suolo (Enterisi). La specie riso cresce in pianura e in altopiano, sia in campi irrigati artificialmente sia in campi irrigati da acque piovane, ma anche stagnanti di delta ed estuari. La necessità idrica è alta, tuttavia sopporta sia acqua piovana che acque stagnanti di delta ed estuari. L'altezza della pianta può variare dai 100 a 190 cm a seconda della varietà. *Oryza sativa* ha un ciclo vegetativo che varia da 150 a 180 giorni: la semina avviene in primavera mentre la raccolta viene effettuata in estate. Il frutto, detto cariosside, raggiunge la maturazione circa 4-5 settimane dopo la fioritura ed ha una forma ellittica o sferica generalmente compresa ai lati e oblunga con pericarpo bianco o pigmentato. Le varietà di riso vengono classificate sulla base del rapporto lunghezza/larghezza e altre caratteristiche morfologiche delle cariossidi (Enterisi). Il seme di riso, se sano, è deposto in condizioni favorevoli di umidità e temperatura, germina regolarmente secondo modalità dipendenti sia dal tipo varietale sia dalle condizioni ambientali. La dormienza è una caratteristica genetica per la quale in determinate varietà il seme del riso estrinseca la propria attitudine a germinare solo quando è trascorso un lasso di tempo più o meno lungo della maturazione.

2.1.2 L'Italia e nel mercato mondiale del riso

Per minimizzare gli sprechi, 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, dall'architettura paesaggistica del nord Italia. 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. La 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 delle varietà (Enterisi). 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. L'Italia è dunque il principale produttore europeo di riso e ha un peso sull'export del 40%. I maggiori produttori e consumatori tra gli abitanti, circa 200 milioni, lavorano nelle risaie e 520 milioni trovano nel riso il 50% dell'apporto calorico e una fonte di proteine (Muthayya et al., 2014) (Fig.2). Oggigiorno, la popolazione mondiale deve affrontare quattro delle maggiori complicazione che rappresentano una minaccia per la salute mondiale: perdita di biodiversità, inquinamento, cambiamento climatico e incertezza sulle provviste alimentari. In particolare, la mancanza di risorse alimentari causa carestie e malnutrizione lasciando 1 miliardo di persone nel mondo senza risorse alimentare. Questo andamento è la conseguenza della "Green Revolution" che ha avuto luogo tra il 1940 e il 1960. L'andamento di questo periodo storico ha portato alla richiesta di studi approfonditi per far fronte alla crescita della popolazione e a un aumento della richiesta di cibo tramite lo sviluppo di tecniche agronomiche moderne che possano favorire la produttività dei raccolti. La vulnerabilità del riso rispetto importanti eventi climatici e la sua richiesta sempre maggiore sul mercato agricolo fanno sì che il riso sia soggetto di interessi economici mondiali (Muthayya et al., 2014).

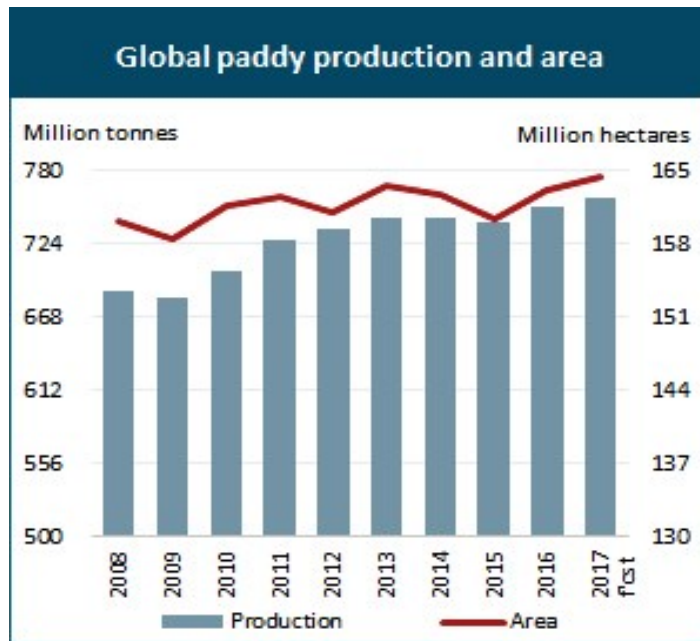


Figura 2 - Andamento della produzione mondiale di riso, FAO rice Market Monitor 2018.

2.2 Varietà di riso analizzate

Le tre sottospecie di *Oryza sativa* comunemente coltivate sono: *indica*, *japonica* e *javanica* le quali differiscono principalmente per caratteristiche morfologiche del seme e sviluppo della pianta. La specie *indica* è coltivata principalmente in regioni tropicali, tra 0° e 25°, brevidiurna e sensibile al fotoperiodo (tra i 0° e 25° di latitudine): ha granella lunga, stretta e appiattita. I risi "*japonica*" sono coltivati nelle regioni come l'Italia e sono meno sensibile al fotoperiodo, con meno esigenze termiche ed esibisce una granella corta e robusta. *Oryza sativa* è una pianta molto esigente in fatto di calore e di acqua, ma la sua più peculiare caratteristica ecologica è di tollerare la saturazione idrica del terreno. Pur non essendo una pianta acquatica, è adattato alle zone umide tropicali e subtropicali soggette anche a sommersione. La capacità del riso di sopravvivere parzialmente sommerso è dovuta allo sviluppo di aerenchimi (parenchimi aeriferi) a livello delle radici avventizie ed embrionali che consentono l'aerazione dei tessuti anche in un ambiente acquatico. In Italia sono coltivate numerose varietà di riso appartenenti alla sottospecie *japonica* temperato. Le tre cultivar di interesse per questo lavoro di tesi sono: Vialone Nano, Baldo e Nipponbare (Fig.3). Vialone Nano è una varietà derivata dall'incrocio di riso Nano e riso Vialone introdotto in agricoltura già a

partire dagli anni '30 e si classifica come riso medio. La varietà Baldo è ottenuta dall'incrocio di riso Arborio e Riso stirpe n.136 introdotto in agricoltura negli anni '70. Viene principalmente coltivato a nord della pianura Padana, principalmente in Lombardia e Piemonte, ma anche in Veneto lungo il Delta del Po (Enterisi). Per quanto riguarda Nipponbare, è una varietà principalmente coltivata e usata per scopi sperimentali all'interno del laboratorio (non in commercio).



Figura 3 – Tre stadi di lavorazione di Semi di Vialone Nano (sx) e Baldo (sx): cariosside in alto, chicchi sbramati a sinistra e chicchi di riso sbiancati (Enterisi)

Le temperature di germinazione si dividono in minima (10-12° C), ottimale (26-30° C) e massima (45° C). Le fasi di germinazione del seme si determinano nelle fasi: a) rigonfiamento del cariosside; b) rottura del tegumento esterno, apparizione della punta coleoptile; c) formazione della radice primaria, contemporanea allungamento del coleoptile e formazione radice secondarie. In situazioni anaerobiche si sviluppa più rapidamente l'apparato radicale di quello aereo.

2.3 Il fenomeno del cuneo salino

Come citato precedentemente, l'Italia è uno dei primi produttori dell'Europa con il 50% della produzione europea, le colture di riso nel territorio nazionale sono tra le più vaste. In particolare, le regioni primarie sono: Lombardia, Piemonte, Veneto ed Emilia-Romagna. A partire dagli anni '90 si è assistito ad un progressivo aumento della salinità del terreno nella regione del Delta del Po causata sia da fattori naturali che antropici. La salinizzazione primaria prevede un accumulo di sali nel suolo dovuto a processi naturali quali: erosione delle rocce, aerosol organico su suolo oceanico, scarsità delle precipitazioni ed elevata evapotraspirazione, tra cui accumulo di sali dovuto alla risalita di acqua arricchita

in sali dalla falda verso la superficie, generato anche dall'innalzamento delle acque marine. La salinizzazione secondaria, invece, è originata dall'azione antropica dovuta a tecniche agricole quali: irrigazione con acqua ricca in sali, pratiche di disboscamento ed eccessivo sfruttamento delle falde acquifere nelle pianure costiere (Shabala and Munns, 2017, Parihar et al., 2015).

Il suolo è ricco in composti inorganici (ioni Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} ecc.) 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. Di fatto, la tecnica di lisciviazione in cui si irrigano i raccolti con grandi quantità d'acqua può comportare lo spostamento dei sali nella zona delle radici e finire nelle falde acquifere. Altresì, nel suolo salinizzato, l'acqua per drenaggio è in grado di percolare verso gli strati più profondi del suolo; l'ambiente eccessivamente salino interferisce con la capacità delle radici di assorbire l'acqua (Shabala and Munns, 2012). In regioni dove il fiume si dirama e sfocia nel Mare Adriatico si assiste al fenomeno del cuneo salino, nel quale le acque dolci dell'entroterra si mescolano con l'acqua salata del mare. Tutto ciò è particolarmente favorito dalle portate d'acqua dolce in arrivo che, a causa dei periodi di magra sempre più prolungati, è in forte diminuzione soprattutto nel corso dei mesi estivi. Il motivo risiede nel fatto che, l'interfaccia ha forma e movimenti determinati dall'equilibrio idrodinamico che si stabilisce tra i due liquidi a diversa densità e a causa della sua inclinazione, il corpo idrico salato prende la forma di cuneo (Fig.4).

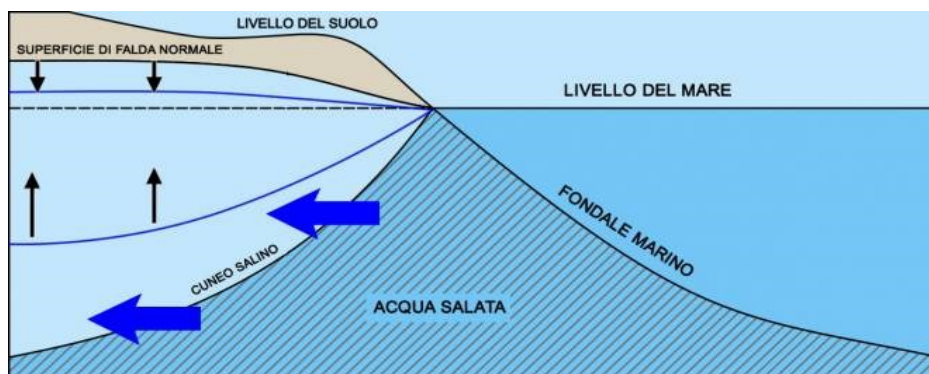


Figura 4 – Rappresentazione di risalita del cuneo salino: le frecce blu rappresentano l'acqua salata e le nere la direzione dell'acqua dolce

Inoltre, i motivi dell'aggravarsi del fenomeno possono essere ricercati nella subsidenza (estrazione di metano), nell'eustatismo marino o dall'approfondimento di alcuni tratti del fiume a causa di prelievi di ingenti quantità di acqua per usi industriali, civili e irrigui a monte. Tutto ciò determina la trasformazione delle acque dolci provenienti dal territorio in acque caratterizzate da gradi di salinità elevata, a seguito del fenomeno di mescolamento tra acque. (Savenije et al., 2005).

2.3.1 Effetti della salinizzazione nel terreno e nel delta del Po

Nel delta del Po il fenomeno è fortemente influenzato dalla presenza di portate ridotte, determinate da vari fattori. Gli elementi che in particolare influenzano sono: una riduzione dell'apporto primaverile/estivo d'acqua proveniente dai ghiacciai-nevai; innalzamento del livello del mare e cambiamenti climatici generali. Le elevate pressioni da parte degli usi civili, agricoli, zootecnici e industriali, provenienti dalle aree a monte del delta, provocano effetti significativi sulle portate del Po, le quali ricadono successivamente nella parte terminale del bacino. L'insieme dei fattori descritto determina portate ridotte tali da non garantire un normale deflusso di acque dolci nel delta, provocando di conseguenza la risalita nel cuneo salino. Gli effetti che causa la salinità incidono: sul terreno creando micro-desertificazioni, sulla flora con scomparsa di alcune specie di piante, sulla fauna perché cambia l'habitat, sulle strutture e la salinizzazione dei canali, sull'amministrazione; ma più di tutto sull'agricoltura, l'economia e di conseguenza nell'uomo. Prendendo d'esempio l'estate del 2022, siamo stati colpiti da una siccità senza precedenti che ha messo in crisi l'agricoltura danneggiando molte coltivazioni. In questo momento si stanno sperimentando nuovi sistemi di irrigazione mirata sviluppati in molti paesi, tra cui un sistema di irrigazione a secco o tramite tubi sotterranei che assicurano risparmio idrico e lo forniscono direttamente alle radici di riso. Oltre a ciò, si sta rivalutando il metodo tradizionale, andando ad alternare la semina in asciutta. Di fatto, è necessaria una gestione complessiva che tutela attraverso controlli e contingentando l'acqua per l'equità e i diritti dell'intero bacino, garantendo pari dignità anche ai poteri deboli.

In modo più realistico, le sperimentazioni su varietà di riso che possono essere coltivate in acqua salmastra sembrano essere più promettenti rispetto altri tipi di progetti. Scovare e commercializzare una varietà potenzialmente resistente o tollerante ad alte concentrazioni di stress potrebbe apportare la novità giusta. La risalita di acqua salmastra, il cosiddetto cuneo salino, è un problema che si pone davanti la siccità, poiché costretti ad usare l'acqua rimanente contenente alte concentrazione di sale. Altresì, ottenere una varietà con un apparato radicale più robusto, che resista o innesca meccanismi di elusione alla condizione di stress abiotico.

2.4 Stress salino e meccanismi di tolleranza delle glicofite DA RIDURRE

Lo stress salino appartiene alla classe degli stress abiotici, termine usato per descrivere una variazione nei parametri chimico-fisici ambientali in grado di indurre severe alterazioni dello stato fisiologico della pianta. In questo caso, sono rappresentati da fattori "non viventi" e influiscono, tendenzialmente, negativamente sulla sopravvivenza dell'organismo. In particolare, lo stress salino è causato dalla presenza eccessiva di sali nel terreno, in particolare, il cloruro di sodio (NaCl) e non solo. Le piante mostrano una serie di risposte e adattamenti che contribuiscono a determinare la tolleranza allo stress. Ciò comporta una serie di cambiamenti strutturali e chimici che possono portare anche alla restrizione del periodo di crescita in base alle condizioni (Fig.6). Lo stress salino si esplica in due livelli, separati spazialmente dal punto di vista temporale e in termini di effetti e risposta. Il primo livello è rappresentato dallo stress osmotico, l'aumento della concentrazioni sali di induce l'abbassamento della potenziale osmotico, per cui del potenziale idrico. Tutto ciò si traduce in una maggiore difficoltà della pianta ad assorbire l'acqua, con conseguente disidratazione. Quest'ultima innesca una serie di condizioni successive all'assorbimento di sale e continua per tutta la durata dell'esposizione. Di fatto, la perdita di acqua riduce il volume e turgore, avviene la chiusura stomatica fogliare che limita il processo fotosintetico, che risulta nella diminuzione dell'espansione cellulare e la divisione cellulare (T. J. Flowers, 2004; R. Munns 2002). Il secondo livello di tossicità, più tardivo, è rappresentato dallo

stress ionico, con conseguente accumulo di ioni di sodio all'interno delle cellule che spesso porta alla morte della pianta. Inoltre, questo stress causa una prematura senescenza delle foglie e una forte riduzione del rate fotosintetico a causa di alterazioni severe della diffusione di CO₂ bloccando la crescita della pianta (Cramer and Nowak, 1992). Infine, la senescenza prematura comporta alla pianta sintomi di tossicità quali clorosi e necrosi e l'eccessiva concentrazioni di ioni sodio danneggia la sintesi di proteine, interferisce con l'attività enzimatica, provoca deregolazioni metaboliche e induce danni a livello dei cloroplasti e altri organelli (Munns et al., 2002, Ashraf et al., 2013).

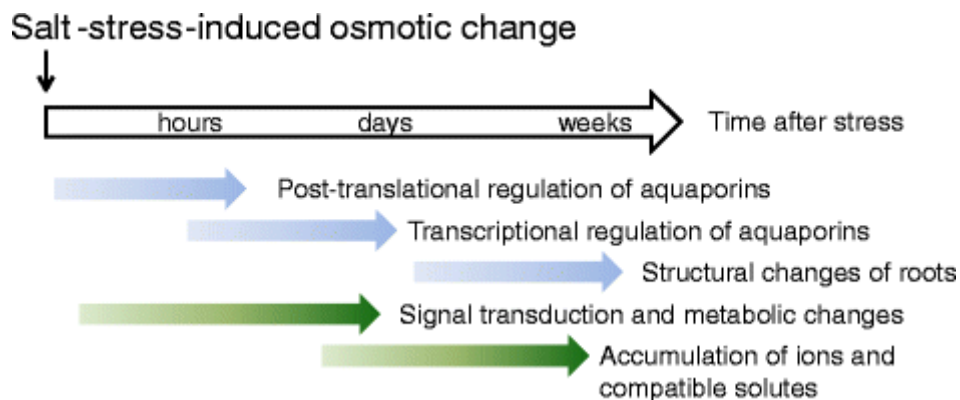


Figura 6 - Timeline di regolazione delle funzioni cellulari in condizioni di stress salino indotto (Horie & Karahara 2012)

L'accumulo di ioni sodio causa una mancato assorbimento di nutrimento minerale, quale potassio e calcio, che comporta una notevole riduzione della crescita cellulare nelle radici, compromettendo l'espansione della punta della radice (Larcher, 1980, A. Lauchli e Grattan, 2007). Anche la regione apicale durante periodi di salinità mostra una vacuolizzazione estensiva a perdita della tipica organizzazione radicale (Munns et al., 2008, Carillo et al., 2011).

2.4.1 La risposta delle piante allo stress salino

Le piante possono essere classificate in base alla loro sensibilità o tolleranza ad ambienti fortemente salini. Le piante in grado di sostenere periodi più o meno lunghi ad elevate concentrazione di sali nel suolo vengono definite alofite e si differenziano da quelle sensibili che, generalmente, prendono il nome di glicofite. Essendo le piante organismi sessili, impossibilitati al movimento, la capacità di

tolleranza delle piante dipende principalmente dalla loro capacità di percepire lo stimolo e di adottare prontamente tutti quei meccanismi di evasione, tramite cambiamenti morfologici e molecolari che consentano di prevenire gli effetti dello stress e oltre all'acclimatarsi alla condizione di stress tramite pathway metabolici.

In risposta allo stress osmotico indotto da elevate concentrazioni di sale, le piante hanno adottato meccanismi di elusione quali la chiusura degli stomi e la produzione di cere per ridurre la traspirazione a livello dei tessuti fogliari (Fig7). In un secondo momento si genera lo stress ionico, generato dopo l'esposizione prolungata al terreno salino ed è determinato dall'eccessivo influsso di ioni Na all'interno delle cellule risultando in un effetto tossico. L'alta concentrazione di sodio nel citosol inibisce l'attività del potassio (K^+), poiché molto simili a livello chimico-fisico. Inoltre, inibisce quindi i processi metabolici in cui il K^+ è coinvolto come coenzima per la sintesi di nuove proteine, attività enzimatica e fotosintesi. Tutto ciò comporta una risposta diffusa data dalla compartimentalizzazione dello ione sodio a livello dei vacuoli e dello xilema. Per ristabilire l'omeostasi ionica nel citosol vengono inoltre attivati canali specifici per l'assorbimento del potassio. L'uptake di quest'ultimo ione viene infatti compromesso dalla presenza di un'elevata concentrazione di ioni sodio. L'accumulo di sale ha effetti negativi inizialmente sulle foglie più vecchie, tuttavia se l'esposizione è prolungata si estende anche a organi e foglie più giovani della pianta (Munns & Tester et al., 2008). La radice è l'organo direttamente esposto allo stress salino è quindi fondamentale comprendere i meccanismi che contrastano l'elevato flusso di sodio. Gli ioni sodio sono in grado di entrare passivamente nelle radici attraverso la via apoplastica, accumularsi in concentrazioni elevate nello xilema ed essere trasportati nel germoglio. In particolare, effetto dello stress osmotico, relativo alla prima fase, ha un effetto immediato sulla crescita e maggiore rispetto la seconda fase di stress (Munns & Tester et al., 2008).

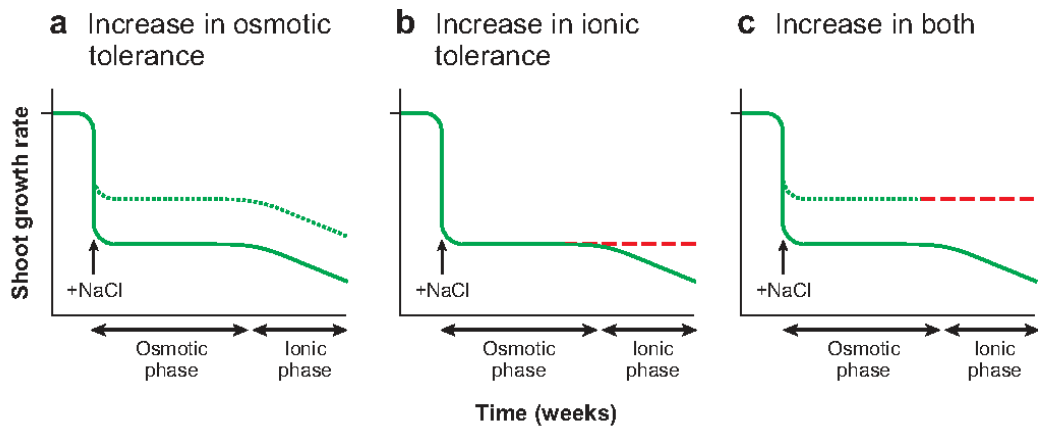


Figura 7 - Risposta delle piante alle due fasi di sviluppo dello stress salino: fase osmotica e ionica

2.4.2 Meccanismi di difesa e tolleranza nelle glicofite

Le glicofite attivano una serie di meccanismi per far fronte agli effetti indotti dalla salinizzazione, tra cui cambiare il potenziale idrico. Per far fronte a questa esigenza la pianta mette in atto tre processi:

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

Tra i primi meccanismi di risposta allo stress è quello di ridurre la permeabilità della membrana plasmatica impedendo l'efflusso in condizioni di concentrazione elevate di sale (sopravvivenza stress). La risposta descritta è mediata dall'attività delle acquaporine, proteine inserite nella membrana plasmatica in grado di mediare il trasporto d'acqua verso le membrane (Horie et al., 2012). Un secondo meccanismo che la pianta esplica è quello di accumulare a livello citoplasmatico soluti compatibili, quali ioni K^+ , o soluti organici, glicina betaina o la prolina, in grado di contrastare la pressione osmotica esercitata dal sale senza generare effetti tossici (Deinlein & Stephan et al., 2014). La loro funzione primaria è quella di aumentare il flusso d'acqua verso le cellule. Tra i vari soluti compatibili sono stati individuati alcuni capaci di agire da chaperoni nella protezione della struttura membranale e degli enzimi. Oltre a ciò, possono fungere da scavenger di specie reattive dell'ossigeno in condizioni di stress (Horie et., 2012). Questo perché, il perossido di idrogeno (H_2O_2) può attraversare la membrana diffondendo

attraverso le acquaporine o per diffusione semplice nella membrana cellulare. Il mantenimento di un elevato rapporto K^+/Na^+ sia a livello citosolico che intera pianta è fondamentale per contrastare l'effetto tossico. Il meccanismo di estrusione e compartimentalizzazione è presente in specie glicofite e alofite (più efficiente). Infatti, la tolleranza allo stress nella piante alofite è rappresentata dalla possibilità di attivare uno o più dei meccanismi sopracitati. Per quanto riguarda la risposta allo stress ionico, vi sono tre meccanismi fondamentali: estrusione dello ione sodio dal citoplasma, compartimentazione all'interno del vacuolo e riassorbimento a livello dello xilema.

L'alternativa valida e meno dispendiosa è l'accumulo di ioni inorganici quali K^+ , Na^+ , Cl^- nel vacuolo, la compartimentalizzazione permetterebbe di attenuare gli effetti tossici generati da questi ioni. Per l'appunto, lo ione sodio Na^+ è in grado di entrare nel citoplasma attraverso sistemi di trasporto ad alta e bassa affinità, gli stessi utilizzati per il trasporto ioni K^+ (HKT, high affinity transporter). Agire sui meccanismi responsabili del ripristino o del mantenimento del potenziale di membrana fisiologico, aiutano a prevenire l'uscita di K^+ . Questo è possibile attivando i canali ioni H^+ che trasportando all'esterno delle membrana permettono di mantenere il potenziale interno negativo. Il processo è efficiente in condizione di stress ma sconveniente dal punto di vista energetico (Chen et al., 2007, Shabala et al., 2012). Diversi lavori hanno dimostrato come le piante di interesse agro-economico, tra le quali il riso, sono soggette ad approcci biotecnologici e metodi tradizionali di breeding per aumentare la tolleranza al sale. La sensibilità all'alta concentrazione di sali nel terreno, nelle piante, è coordinata dall'azione multipla di una serie di geni responsivi, oltre a un complesso cross-talk con componenti trasduzionali della via di segnale allo stress. Tra quest'ultimi troviamo infatti una serie di fattori di trascrizione, ormoni e ROS che compongono un intricato pathway di molecole segnale e geni in grado di rivelare una potenziale situazione di stress (Fig.8).

2.5 Stress salino nella pianta di riso

Il riso rappresenta il cereale con la maggior sensibilità allo stress salino, rispetto all'orzo che mostra i livelli di tolleranza maggiori. In particolare, questa sensibilità è rappresentata dall'esistenza di un flusso apoplastico (bypass flow) di ioni sodio all'interno delle radici di riso che provoca un ingresso incontrollato di ioni Na^+ e un accumulo a livelli tossici in presenza di alte concentrazioni di sale (Munns et al., 2008). In generale, la soglia minima in cui viene mostrata una risposta negativa in funzione dello stress, quale ad esempio blocco della crescita, è delineata dalla concentrazione di NaCl intorno ai 60 mM. Esistono varietà, però, in grado di tollerare alte concentrazioni di sale. La tolleranza sembra essere rappresentata dalla capacità di eliminare gli ioni sodio in eccesso a livello fogliare mantenendo un rapporto basso di K/Na^+ . Nonostante ciò, è ancora poco chiaro come il sodio sia assorbito a livello radicale ed è fondamentale per comprendere il meccanismo in cui viene meno la tolleranza al sale. La discontinuità della banda di Caspary, che regolano il movimento degli ioni nello xilema, potrebbe essere una delle cause del controllo meno efficiente del flusso di ioni (Taiz & Zeiger, 2009). Il trasporto attraverso i canali ionici risulta minimo o nullo, perciò la cellula ha una minor capacità di regolare il passaggio degli ioni (Carillo et al., 2011). L'esclusione degli ioni Na^+ dalle foglie può essere rappresentato da un basso assorbimento netto di sodio all'interno delle cellule della corteccia in radice e uno controllo stress delle cellule dello xilema e parenchima in stele. L'esclusione degli ioni da parte della radici assicura all'organismo di sfuggire ad un accumulo di molecole a concentrazioni potenzialmente tossiche. Tuttavia, il sistema con cui la pianta percepisce il contenuto di Na^+ nel terreno è ancora sconosciuto nella maggior parte dei sistemi cellulari di piante.

Di fatto, nelle cultivar sensibili allo stress, non vi sono variazioni significative della permeabilità di membrana. Tuttavia, è stata osservata una risposta allo stress ionico tramite l'eliminazione dello ione sodio nel citosol tramite il pathway (SOS Salt overly sensitive, Fig.8) e anche la compartimentalizzazione dell' Na^+ nel vacuolo. Questa condizione comporta ad un notevole riduzione della media del

numero e lunghezza radici, indici della risposta allo stress. La divisione cellulare e l'allungamento delle cellule sono direttamente influenzate dall'alta concentrazione dei Sali nel terreno causando differenti cambiamenti morfologici nell'organismo (Munns et al., 2008).

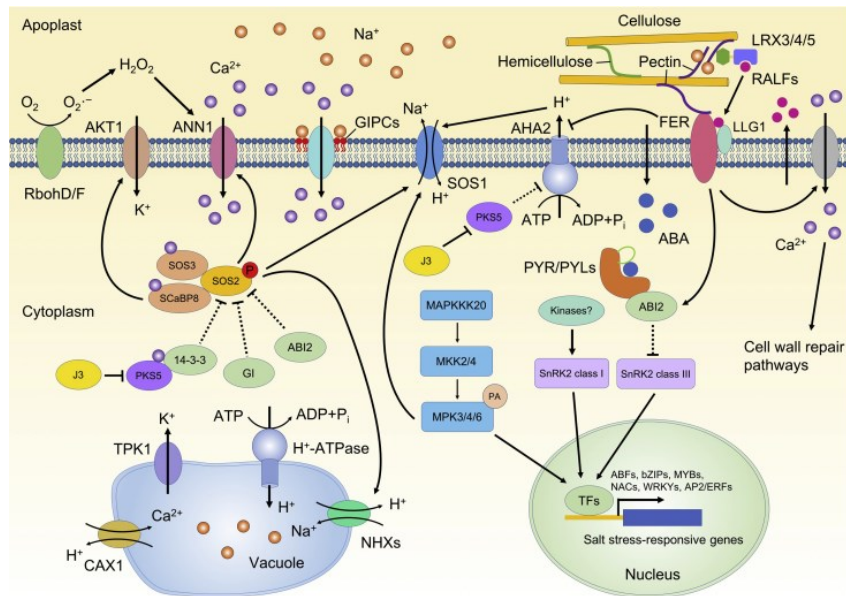


Figura 8 - Cascata di trasduzione del segnale mediata dai ROS innescata da alte concentrazioni di sale (Zhao et al., 2020)

2.6 Lo sviluppo radicale in riso

La sfida principale per le piante è rappresentata dalla complessità dell'ambiente in cui devono sopravvivere. La componente dell'apparato radicale e il suo sviluppo descrivono la capacità vitale della pianta. Oltre a fornire un supporto aereo per gli organi e l'assorbimento di acqua, le radici sono in grado di monitorare i cambiamenti delle condizioni del terreno, il contenuto di sali e di acqua oltreché di sostanze tossiche. Per assicurare un'adeguata risposta a questi cambiamenti, il sistema radicale è in grado di ridefinirsi e adattarsi tramite l'iniziazione e allungamento di nuove radici durante il periodo di sviluppo. Di fatto, l'architettura radicale della pianta è determinata dall'equilibrio dinamico tra il background genetico e i segnali ambientali esterni.

Nelle piante, lo sviluppo radicale post-embriale dipende dall'attività dei meristemi e dalle cellule staminali presenti nella nicchia dell'apice meristemato (SCN, Stem Cell Niche). L'equilibrio tra proliferazione e differenziamento delle

cellule permette la crescita indeterminata degli organi. Gli stress abiotici (calore, salinità, siccità) minacciano lo sviluppo radicale, il quale comporta una ridotta crescita della pianta e una grave riduzione dei raccolti. Nelle piante esistono due principali tipi di sistemi radicali e sono definiti dallo sviluppo e dalla ramificazione: radici a fittone e fibrosi. In quest'ultima categoria ricadono le monocotiledoni, tra cui il riso, invece le radici a fittone si ritrovano in dicotiledoni come *Arabidopsis thaliana*. La differenza principale è che nel sistema a fittone vi è la radice primaria principale con le ramificazioni, le radici laterali più piccoli e i peli radicali. Nell'apparato fibroso invece è presente una densa massa di radici avventizie (crown roots in cereali) che partono dallo stelo, ben distinte dalla radice primaria, le laterali e i peli radicali. La lunghezza e la complessità dell'architettura delle radici sono componenti essenziali per assicurare la sopravvivenza della pianta in risposta a determinate condizioni ambientali (Meng et al., 2019; Coudert et al., 2010). In riso, la formazione e suddivisione delle cellule della radice primaria non è stata ancora ben definita come nella pianta modello *Arabidopsis*. Si presume che le prime divisioni cellulari che danno origine alla prima cellula della radice provengano dalle cellule del meristema radicale adiacenti al cilindro periferico dei fasci vascolari. La divisione di queste cellule porta alla formazione di un meristema radicale a corona e potrebbe coinvolgere la regolazione specifica del trasporto polare dell'auxina, proprio come nella pianta *A. thaliana* (Dubrovsky et al., 2021).

2.7 Meristema radicale riso

L'architettura radicale cambia in risposta a differenti stimoli ambientali apportando modifiche di sviluppo del sistema in funzione dei nutrienti e segnali ormonali. Il sistema del meristema radicale (RAM) si forma durante l'embriogenesi che genera la radichetta o la radice primaria a seguito della germinazione del seme. Il RAM è composto dalla nicchia delle cellule staminali (SCN) e cellule in divisione indifferenziate. In *Arabidopsis*, SCN ospita il centro di quiescenza (QC) e le cellule staminali circostanti che danno origine ai diversi tipi cellulari della radice, tra cui la columella, epidermide, cuffia della radice, corteccia/endoderma e stele (periciclo, floema, xilema e procambio) attraverso la divisione cellulare, espansione

e differenziamento (Fig.9). Il QC si trova al centro della punta della radice ed è composto da cellule inattive mitoticamente il cui compito è quello di organizzare la nicchia dell'apice meristemico. In *Arabidopsis* il QC è composto da 4 cellule non in divisione e 2 in *Oryza sativa* e provvedono a mantenere uno stato indifferenziato le cellule staminali circostanti e durante la rottura dell'equilibrio in uno stato differenziato (Stahl & Strotmann, 2021). Per l'appunto, la zona mitoticamente attiva viene definita Zona di divisione (DZ), nella Zona di transizione (TZ) le cellule in attiva divisione smettono di dividersi per acquisire la morfologia tessuto specifica in base alla loro posizione radiale nella zona di allungamento (EZ).

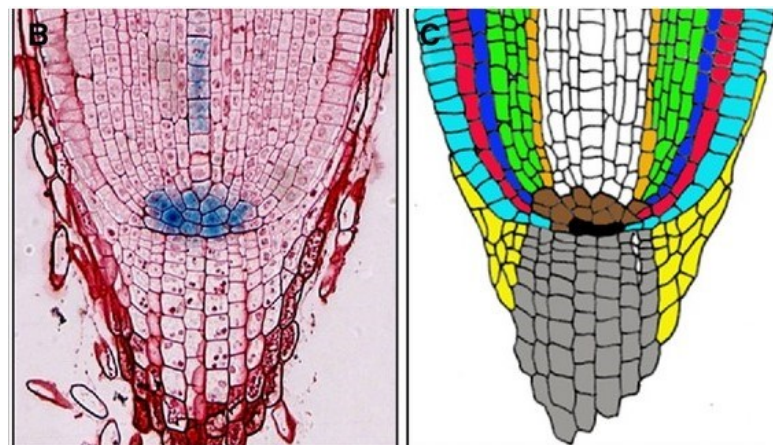


Figura 9 - Diagramma schematico dei differenti tipi cellulari in *Arabidopsis*: epidermide (azzurro), esodermide (rosso), sclerenchima (blu), cortex (verde), endodermide (arancione), cuffia laterale gialla, columella grigio, stele bianca e centro quiescente (QC, nero) (Ni et al., 2014)

La crescita dell'apparato radicale ha inizio con otto successive divisioni cellulari asimmetriche periclinali seguite alla prima divisione anticlinale nella cellula iniziale e generano infine: epidermide, esoderma, la corteccia, endoderma, sclerenchima, corteccia ed endoderma. Di fatto, rispetto ad altri cereali coltivati, la radice di riso è costituita da uno strato di sclerenchima altamente composto da suberina rispetto all'esoderma e consiste in piccole cellule strettamente impacchettate (Zhang et al., 2021). In linea di ciò, il centro di quiescenza in *Arabidopsis* è stato ampiamente descritto, al contrario della riso nel qual rimane ancora oggetto di studi (Ni et al., 2014). Differenti ricercatori hanno mostrato come il QC della pianta di riso sia una struttura relativamente stabile, la carenza nutrizionale o il trattamento ormonale di auxina e citochinine non cambiano il pattern cellulare di

questa struttura. Per cui, il meristema apicale della radice può essere suddiviso in tre zone istogeniche: la zona che genera la cuffia della radice, zona che origina l'endoderme e l'epiderme e infine la zona dello stelo che circonda il centro di quiescenza. Il RAM mostra livelli di cellule iniziali al confine tra la radice e la cuffia col resto delle cellule collegandosi tra loro formano un sistema chiuso. Tutti i tessuti tra l'epiderme-endoderme originano da divisione successive tra i singoli strati iniziali che generano i rimanenti tessuti. Tuttavia il meccanismo che controlla le divisioni addizionali dello strato iniziale epiderme-endoderme in radici di riso rimangono ancora non definiti (Ni & Shen et al., 2014; Kirschner et al., 2017).

2.8 Effetti del sale sul meristema radicale

La struttura radicale riscontrata in riso ha un'organizzazione radiale simile a quella della radice di *Arabidopsis*, fatta eccezione per il numero di strati cellulari nella corteccia. Le radici di riso sono composte dai 7 ai 10 strati cellulari corticali ed endodermici a seconda del tipo di radice, i quali sono ridotti da 1 a 2 strati in *Arabidopsis*. L'anatomia radiale della radice della pianta di riso si è sviluppata adattandosi a condizioni semi-acquatiche, caratterizzate dalla differenziazione dell'aerenchima nel cortex (tessuto coinvolto negli scambi gassosi durante sommersione). Le cellule esterne degli strati sono composte da tre tessuti: l'epiderme con i peli radicali, l'esoderme che non è presente in *Arabidopsis* e lo sclerenchima. Gli altri tessuti sono formati da differenti strati di cortex e endoderme (Fig.10). La variazione del diametro radicale osservata nei diversi tipi di radice è correlata al numero di strati cellulari della corteccia. Questi pattern radicali alternativi sono diretta conseguenza della diversa attività di divisione delle cellule iniziali dell'epiderme-endoderma nel RAM (Coudert et al., 2010).

La salinizzazione dei terreni ostacola la divisione ed espansione cellulare, comportando una riduzione della dimensione del meristema apicale e altri organi. Di fatto, ha una diretta conseguenza e riduzione sulla crescita del seme che può comportare blocco della crescita ad alte concentrazioni di sale. Cambiamenti morfologici e anatomici strutturali sembrano essere la causa principale che influisce sulla riduzione della crescita della pianta in condizione di stress (Islam et

al., 2019). La radice di riso possiede una considerevole plasticità in termini di pattern di crescita e architettura in condizioni di stress salino. Lo spessore radicale aumenta e le radici sono più corte per affrontare questa condizione. Studi precedenti hanno quindi dimostrato l'anatomia del meristema apicale della radice di riso, tuttavia la definizione molecolare e fenotipica delle cellule che la compongono rimane incompleta (Zhang et al., 2021). In aggiunta, la transition Zone, i cui confini sono dettati dall'interconnessione tra ormoni quali auxina e altri segnali regolatori, sembra essere un marker anatomico di risposta a segnali esogeni come gli stress abiotici.

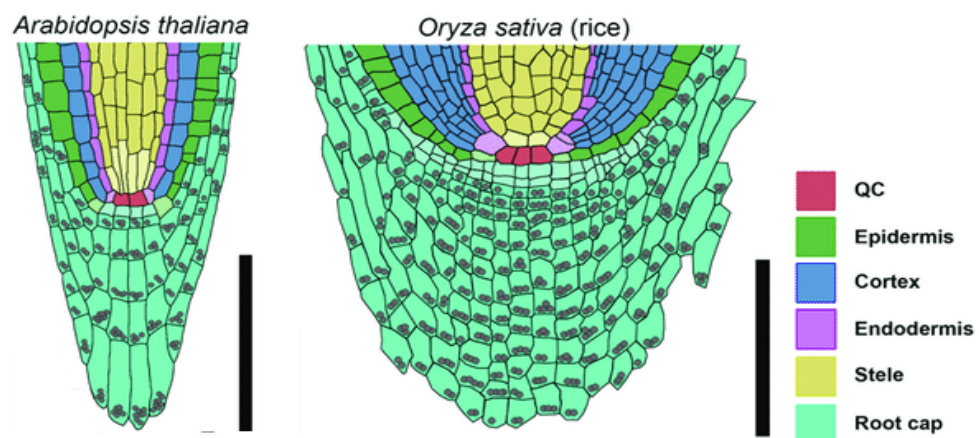


Fig. 10 – Modello di radice con la nicchia cellulare dell'apice distale del meristema radical in *A. thaliana* e *Oryza sativa* (rice) (Kirschner et al., 2017)

2.9 Modello di sviluppo della radice di *Arabidopsis thaliana*

La crescita cellulare è assicurata dai segnali transienti generati dalle cellule staminali localizzati nella nicchia dell'apice meristemato (SCN). Alla germinazione del seme, la nicchia delle cellule staminali si attiva, costituendo il meristema radicale e dando inizio alla crescita delle radici. In queste prime fasi, la divisione cellulare si pone di fronte alla differenziazione causando l'espansione del meristema. Viene raggiunto un equilibrio dinamico in cui la divisione cellulare alimenta l'espansione del meristema, bilanciato dalla differenziazione delle cellule che riduce costantemente le dimensioni dei meristemi, stabilendo un numero adeguato di cellule meristematiche. A questo punto, lungo l'asse longitudinale, la radice viene suddivisa in zone: la zona di divisione (DZ), zona di transizione (TZ) e zona di allungamento (EZ) (Eljebbawi et al., 2021) (Fig.11). La prima area è costituita dalla

zona di divisione (meristema) che comprende l'SCN e cellule figlie che amplificano il segnale transiente cellulare. Nella zona di allungamento le cellule smettono di dividersi, si allungano e si differenziano acquisendo una morfologia differente. All'interno di queste due aree si trova la zona di transizione, il confine tra le cellule in divisione e quelle in allungamento. In particolare, la posizione della zona di transizione determina la dimensione della zona di divisione ed è direttamente correlata con il mantenimento della crescita radicale. Per questo motivo, comprendere il meccanismo che regola il posizionamento della TZ è fondamentale per studiare la plasticità radicale durante lo sviluppo in condizioni di stress salino.

Nella specie *A. thaliana* sono stati proposti due modelli che potrebbero spiegare il processo di posizionamento tra la zona di divisione e differenziamento. In particolar modo, i due sono caratterizzati dalla presenza di un signaling molecolare che regola la TZ: nel primo, il confine tra DZ e ED è stabilito da un gradiente di ROS con una propensione per la presenza di O_2^- nella DZ e H_2O_2 in EZ (Eljebbawi et al., 2021); nel secondo modello invece il posizionamento è modulato da un signaling ormonale i cui protagonisti sono citochinine che mediano i livelli di auxina, con un minimo di concentrazione nei pressi delle cellule della TZ, inducendo uno shift metabolico nelle successive cellule in allungamento. La crescita e sviluppo radicale è assicurato dalla costante generazione di cellule nella zona meristemica (divisione). Successivamente, queste cellule si specializzano e acquisiscono una forma differente (allungata) e una specifica funzione tramite differenziamento (Fig.11). Il ciclo cellulare controlla il numero di cellule che si dividono e la durata di queste divisioni, le quali determinano il tasso di crescita della radice. Un ciclo cellulare corretto e ben definito è fondamentale per una corretta crescita della radice mantenere costante le dimensioni nella DZ e prevenire la differenziazione matura (Eljebbawi et al., 2021). La differenza principale delle radici di riso è che sono molto più complesse, caratterizzate da uno stadio embrionico e postembrionico per formare un sistema radicale fibroso. (Salvi, Rutten et al., 2020).

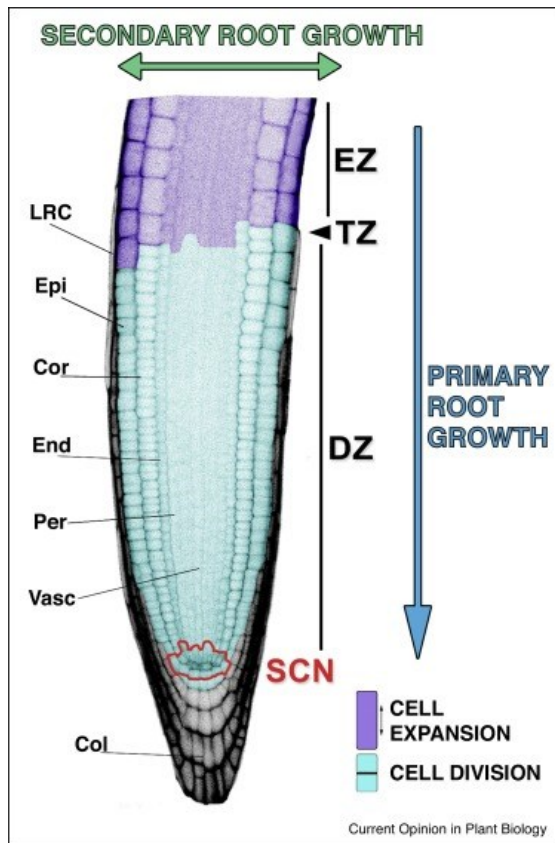


Figura 11 – Panoramica sul meristema apicale della radice di *A. thaliana* con i tessuti e processi per la crescita primaria (Svolacchia, Sabatini et al., 2020).

2.9.1 Regolazione da parte dei ROS e ormonale

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono composti dell'ossigeno a elevata attività ossidante, che hanno la potenzialità di causare danno ossidativo alle cellule durante uno stato di stress. Studi precedenti hanno dimostrato come i ROS giocano un ruolo fondamentale come molecole segnale che regolano la crescita delle piante, l'adattamento allo stress e la morte cellulare programmata (PCD) (Apel & Hirt, 2004; Mittler et al., 2004; Torre and Dangel 2005; Gechev and hill, 2005). Il signaling dei ROS, in particolare, è controllato da un accurato bilanciamento tra la produzione dei composti e lo scavenging. La risposta di queste molecole è altamente legata all'identità chimica dei ros, l'intensità e la localizzazione cellulare che creano una risposta dose specifica. Basse dosi di H_2O_2 sembrano indurre una meccanismo di protezione e acclimatazione contro vari stress abiotici, mentre alte concentrazioni stimolano la morte cellulare.

Rimane ancora sconosciuto il meccanismo che innesca il posizionamento della TZ, fondamentale per il corretto sviluppo e crescita della radice, oltre al bilanciamento tra la DZ e EZ necessario per avere una dimensione stabile del meristema. In particolare, è richiesta la riprogrammazione costante e dinamica delle cellule meristematiche in cellule con caratteristiche di differenziazione in una posizione controllata. La formazione e localizzazione della TZ è perciò di fondamentale interesse per l'organismo vegetale (Svolacchia, Sabatini et al., 2020). Il profilo trascrizionale di tessuti e di singole cellule della radice ha identificato due tipi principali di gradienti opposti che hanno un picco nel SCN/DZ o nella EZ/DiffZ. Questi gradienti sono descritti come ondate successive spazio-temporali di cambiamenti di espressione genica tra le singole cellule. Il gradiente di auxina raggiunge un massimo nel SCN, che diminuisce lungo la DZ fino a raggiungere un minimo nella TZ. La distribuzione dipende direttamente da proteine trasportatrici della famiglia PIN che generano un efflusso cellulare (Svolacchia, Sabatini et al., 2020) (Figura 12).

In *A. thaliana*, la morfologia radicale è dettata dal bilanciamento dinamico di queste tre zone. Nello stabilimento dell'architettura cellulare, i ROS sono direttamente coinvolti come molecole segnale che determinano la struttura e anatomia della radice (Eljebbawi et al., 2021). Il coinvolgimento e mantenimento dei ROS all'interno della nicchia dell'apice meristematico è fondamentale per mantenere l'identità cellulare e regolare l'organogenesi. I fattori regolatori responsivi ai ROS guidano l'equilibrio cellulare tra proliferazione e differenziamento. L'allungamento nella zona EZ è direttamente connesso alla struttura e plasticità della parete primaria cellulare. Il tasso di espansione cellulare è strettamente correlato all'equilibrio tra irrigidimento e allentamento della parete cellulare per permettere di acquisire la forma allungata alle cellule. In questo processo è direttamente collegata l'omeostasi dei ROS, durante il ciclo perossidativo le perossidasi (PRX) ossidano i componenti della parete aumentando l'irrigidimento e i legami crociati dei suoi componenti. In questo senso, la parete cellulare si irrigidisce e la capacità di allungamento si riduce. Nel ciclo idrossilico però le PRX producono ROS che favoriscono l'allungamento non-enzimatico della

parete (a scapito del irrigidimento). La dismutazione di H_2O_2 in OH^- catalizza la scissione ossidativa degli xiloglucani e pectine che indebolisce la parete e promuove l'espansione cellulare. Durante il processo di sviluppo radicale, la regolazione redox presenta un picco di complessità nella zona di transizione, all'interfaccia tra DZ e EZ. Il fattore di trascrizione UPBEAT1 è il principale modulatore dell'equilibrio dinamico tra proliferazione e differenziazione cellulare direttamente modulando le perossidasi. Quest'ultime sono altamente presenti al confine tra la DZ e EZ, in particolare è stata rilevata un'alta concentrazione di O_2^- : H_2O_2 che stimola la divisione cellulare. Al contrario, una concentrazione bassa di O_2^- collegata ad un'alta concentrazione di H_2O_2 viene rivelata lungo la EZ che stimola il differenziamento cellulare (*Arabidopsis*) (Eljebbawi et al., 2021).

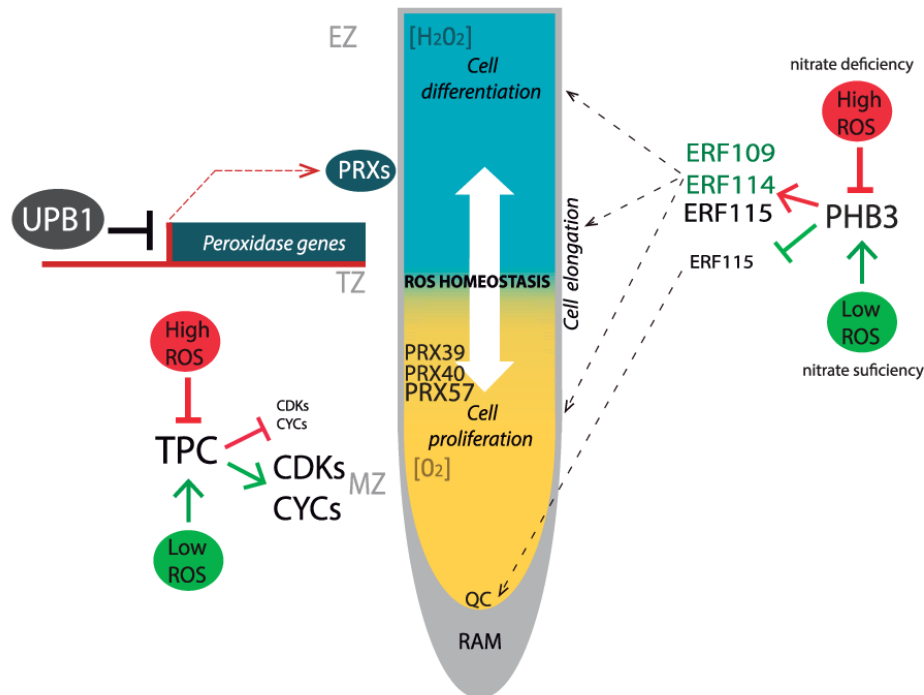


Figura 12 – Regolazione dei ROS sull'equilibrio tra cellule in proliferazione e differenziazione in radice di *Arabidopsis* (Eljebbawi et al., 2021)

2.10 Sviluppo radicale per la selezione nuove varietà tolleranti e geni marcatori

Le radici sono l'organo deputato allo sviluppo della pianta e giocano un ruolo fondamentale nell'adattamento e sopravvivenza in risposta a stimoli esterni. Come detto precedentemente, sono le principali responsabili nel rivelare la presenza di alte concentrazioni di sale che determinano lo stress salino. Di fatto,

questo causa un'alterazione dell'architettura radicale e della fisiologia della pianta. Lo studio degli effetti degli stress abiotici sull'apparato radicale potrebbe fornire conoscenza e strumenti per migliorare l'adattamento delle colture. In presenza di stress, le radici subiscono alterazioni strutturali e funzionali per mitigare gli effetti negativi sulla crescita della pianta causati da modifica di equilibrio: un esempio, la modifica della lunghezza e profondità e formazione di radici secondarie. In particolar modo, le specie tolleranti possiedono dei meccanismi di risposta stress-specifici che sono assenti nelle piante sensibili. I profili genomici, quando combinati con le analisi sistematiche, rivelano un network di segnale che controlla la tolleranza allo stress (Munns et al., 2005). Nello specifico, i geni in grado di aumentare la tolleranza allo stress salino appartengono a tre gruppi: quelli responsabili dell'uptake del sale e del trasporto, quelli con funzione protettiva e osmotica e quelli che controllano la crescita della pianta nel terreno salino. In particolare, il pathway SOS (salt overly sensitive) che codifica quattro geni responsabili della tolleranza allo stress in *Arabidopsis*. Oppure, la famiglia delle pompe P-type H^+ -ATPases che generano una forza proton-motrice che dirige il trasporto attivo di soluti e ioni, inclusi K^+ e Na^+ . Vi sono poi molecole con funzione protettiva che sono individuati in piccoli composti organici e sono definiti osmoliti e osmoprotettanti o soluti compatibili. Altri geni codificano per enzimi in grado di generare dei radicali liberi. Infine geni candidati responsabili della crescita e coinvolgimento in pathways di segnalazione che cominciano come sensori e coinvolgono ormoni e fattori di trascrizione, protein chinasi e fosfatasi.

L'analisi proteomica ha rivelato un'attività alterata delle proteine responsabili della risposta allo stress in piante tolleranti rispetto quelle sensibili. Tuttavia, la semplice analisi della quantità di una proteina nelle due varietà non è sufficiente a convalidare lo studio proteomico. Altri approcci di studio quali: analisi modificazioni post trasduzionali, interazione proteina-proteina, localizzazione subcellulare tissutale e l'influenza fenotipica, potrebbero rivelare il ruolo di molecole direttamente collegate alla crescita della pianta in condizioni di stress. In linea di ciò, i ricercatori devono essere in grado di indentificare quelle regioni QTLs che definiscono una varietà tollerante rispetto le altre. Di fatto, queste regioni

possono essere incluse nei programmi di incroci e selezioni di varianti in grado di resistere o adattarsi allo stress salino. Il limite di questo approccio è la capacità di resistere allo stress salino, la quale è definita da una vasta gamma di caratteri multidisciplinari. Per questo motivo non sono presenti varietà in commercio tolleranti a questo stress (Parihar et al., 2015). In aggiunta, a queste analisi viene accoppiata la selezione assistita di marcatori, definita come un approccio che collega un tratto quantitativo con un marcatore genetico polimorfico tra linee parentali. I metodi di genotipizzazione high throughput odierni permettono di analizzare multiple porzioni genomiche in poco tempo atte a determinare il posizionamenti di fattori o geni responsabili del meccanismo di tolleranza (o carattere). L'individuazione di queste regioni è fondamentale per ampliare l'efficienza dei programmi breeding e mappaggio di geni controllato. Il fatto che i genomi di molti cereali, tra cui riso, sono stati e sono sequenziati tramite next generation sequencing (NGS) aiuta a costruire una mappa genetica atta a ottenere varietà tolleranti. La manipolazione genetica al passo con gli approcci di breeding saranno necessarie per rivelare i meccanismi di tolleranza alla salinità nelle varietà che meglio si adattano a questi ambienti (Meng et al., 2019, Hanina & Ebel et al., 2016).

Nonostante ciò, gli incroci basati sulla selezione assistita di marker possono presentare limitazioni quali il passaggio di tratti caratteristici non desiderati nel locus QTLs. Oltre che, le piante ottenute tramite incrocio devono essere convalidate in differenti condizioni e background genetici, ciò questo comporta una mole di analisi elevata. La selezione molecolare insieme ai metodi avanzati biotecnologici combinati ad altri approcci di ricerca possono accelerare il rilascio di varietà tolleranti al sale. Alcuni tratti legati alla tolleranza allo stress salino sono stati identificati e si sono dimostrati efficaci per l'ingegnerizzazione della tolleranza allo stress in piante modello. Infine, il genoma target e editing tramite tecnologia CRISPR-Cas9 potrebbe rappresentare un'alternativa per i metodi classici di incrocio e metodi transgenici (GMO). In particolare, quest'approccio mostra un'aggiunta di precisione agli alleli designati (Hanin & Ebel et al., 2016)

3. Scopo della tesi

Gli stress ambientali sono una diretta conseguenza del cambiamento climatico che attualmente minaccia la sopravvivenza di numerosi organismi. Gli stress abiotici definiscono una classe di stress generata dalla componente non vivente dell'ambiente, che delinea una variazione dei parametri chimico-fisici, con diretta conseguenza sulla produttività di numerose specie vegetali di interesse alimentare. La salinizzazione del terreno conduce ad alterazione dello sviluppo e crescita delle piante, portando anche alla morte. L'obiettivo di questo studio è quello di identificare in che modo lo sviluppo della radice primaria di riso (*Oryza sativa*, L.) è influenzata dallo stress salino. In questo contesto è necessario condurre un'analisi anatomica e strutturale del meristema radicale. Il lavoro svolto durante il mio internato di tesi si focalizza principalmente nel descrivere le zone cellulari della radice. In particolare, mi sono basato sul modello di *A. thaliana* cercando di ottenere il corrispettivo nella varietà di riso in esame. L'analisi si è concentrata nell'osservare come sono coinvolti le specie reattive dell'ossigeno (ROS) in condizioni fisiologiche e di stress, caratterizzandone il gradiente di concentrazione nella radice. L'anatomia radicale nelle due diverse condizioni mostra un'alterazione dell'indice della crescita della radice in Vialone Nano, la varietà sensibile allo stress salino. La distribuzione di concentrazione di H_2O_2 e O_2^- sono state necessarie per definire le zone istogeniche cellulari di riferimento. Infine, per convalidare la reazione delle cellule allo stress ho attuato un'analisi molecolare dei fattori trascrizionali posizionati a valle del pathway di segnalazione dello stress salino.

4. Materiali e metodi

4.1 Sterilizzazione dei semi e crescita delle piante

I semi di riso italiano impiegati nel mio lavoro di tesi, Vialone Nano e Baldo, provengono dal campo e sono stati forniti da Enterisi Nazionale Risi (Codigoro) e Melzi d'Eril Sementi (Società agricola), raccolti durante l'anno 2020-2021. Per quanto riguarda i semi della varietà tropical Nipponbare sono un dono del prof Tomoaki Horie (Shinshu University, Giappone) e sono stati raccolti durante l'anno 2021.

Tutte e tre le varietà necessitavano di un passaggio primario di decorticazione atto a eliminare il tegumento di rivestimento di protezione. Successivamente, vengono selezionati i semi, ottimali e intatti, per iniziare col protocollo di sterilizzazione:

- 1) Lavaggio con Etanolo 70% v/v (diluito con acqua Milli Q) → 1 minuto
- 2) Lavaggio con Acqua Milli Q sterile → 5 minuti
- 3) Lavaggio con Ipoclorito di Sodio 5% v/v (diluito con acqua Milli Q) con aggiunta dello 0,1% v/v di Tween 20 → 15 minuti
- 4) 5 lavaggi con Acqua Milli Q sterile → 10 minuti

Il dosaggio dei solventi avviene in base al numero dei semi, fino a 150 semi 20 ml, 300 semi 50ml. Il passaggio in ipoclorito, in base alla varietà, può essere ripetuto diversamente: Vialone Nano e Nipponbare necessitano di 2 e per Baldo invece 3. Il motivo di questa ripetizione risiede nel fatto che la varietà Baldo esaminata proviene da campo ed è quindi più soggetto alla contaminazione da muffe.

4.2 Germinazione dei semi di riso

I semi sterilizzati vengono fatti germinare in piastre Petri quadrate, o su carta da filtro sterile bagnata con acqua milli Q sterile, oppure tramite il terreno agar MS $\frac{1}{2}$. Per quanto riguarda la preparazione di un litro di medium MS $\frac{1}{2}$ i componenti inseriti sono:

- 2,2 g Murashige and Skoog (MS) con vitamin (Micropoli)
- 15 g di saccarosio (Sigma)

8,0 g di plant agar (Micropoli)

Portare a pH 5.7 con KOH

Le piastre sono riempite con 50 ml di medium e lasciate raffreddare all'interno della cappa sterile. Una volta solidificato, per ogni piastra vengono posti 8 semi di Vialone Nano o Nipponbare, oppure 6 semi nel caso di Baldo. La distanza tra un seme e l'altro è di 1 cm e l'embrione viene sempre posto dalla stessa parte di modo tale da non creare antagonismo tra le radici. Una volta inseriti, le piastre vengono sigillate con il Parafilm® e poste all'interno di una camera di crescita: temperatura 27°/24°C giorno/notte, umidità relativa tra 20-50% e 450 µE di intensità di luce, fotoperiodo di 16h/8h tra giorno/notte. Ogni step di sterilizzazione, semina e diffusione dei semi in piastra è stato condotto in condizioni sterili sotto cappa a flusso orizzontale.

Per quanto riguarda l'altra modalità, è possibile inserire due fogli di carta da banco precedentemente sterilizzati e umidificati con 8 mL di Acqua milliQ sterile. Per ogni piastra possono essere appoggiati e seminati, in base alla dimensione del seme, fino a 50-60 semi. Le piastre sono sigillate con Parafilm®, inserite in una scatola per mantenere la condizione di buio e poste all'interno della camera di crescita dentro: temperatura 24-26°, relativa umidità 20-50% e 450 µE di intensità di luce, fotoperiodo di 16h/8h tra giorno/notte. e 450 µE di intensità di luce, fotoperiodo di 16h/8h tra giorno/notte.

Prima della semina, i semi della varietà Nipponbare vengono incubati all'interno della falcon (asciugati) in camera fredda 4°C per una 16h. Questo step permette ai semi della varietà di rendere più omogenea la germinazione e quindi la lunghezza delle radici. In aggiunta, in vista del fatto che i semi di Baldo rispetto alle altre varietà hanno una probabilità maggiore di sviluppare muffe, sempre tra il passaggio di sterilizzazione e semina i semi sono lasciati in agitazione con acqua MilliQ sterile e 0,1% della soluzione di Plants Pleasure Mixture (PPM) (Plant Cell Technology, Inc.) per tre ore consecutive.

Componente	Concentrazione (mg/l)
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
KH ₂ PO ₄	170
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA	37,3
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
Myo-inositol	100
Acido Nicotinico	0,5
Pirodossina idrocloruro	0,5
Tioamina idrocloruro	0,1-1
Glicina	2
Saccarosio	15000
pH = 5,8, sterilizzato a 125°C 1 atm per 20 minuti (autoclave)	

Tabella 1. *Composizione del terreno MS ½ utilizzato per la germinazione dei semi di riso*

4.3 Procedura di trattamento dei semi

La semina delle varietà nella piastra con le modalità precedentemente descritte è stata fatta sotto differenti condizioni per monitorare la crescita della radice primaria. La prima riguarda proprio lo stress salino, in particolare 100 mM sembra essere il punto limite per il quale le radici sono condizionate dalla situazione di stress. Il secondo trattamento effettuato riguarda il composto N-Acetilcisteina (NAC), composto con attività antiossidante. Per cui, si è voluto testare il NAC sia da solo che con l'aggiunta di sale, rispettivamente 1 mM e 100 mM. Gli ultimi due trattamenti riguardano l'induzione di due messaggeri secondari: H₂O₂ e Citochinine. Il perossido di idrogeno ha una concentrazione di 2mM in 50 ml di soluzione e le citochinine invece 2 µM sotto forma di Trans-Zeatina Riboside per osservare eventuali variazioni della radice in risposta all'applicazione esogena di citochinine. I trattamenti descritti vengono inseriti direttamente nella falcon da 50 ml contenente il medium MS ½ ad una temperatura sotto i 40°C altrimenti

potrebbero essere degradati. Una volta ottenuto la lunghezza delle radici desiderate, le piastre sono poste su di un cartoncino blu (contrasto col bianco radicale) e fotografate (Fig.13). Successivamente, verranno analizzate tramite il software Fiji, suite open source di ImageJ. Nel caso dei plates contenenti Acqua milliQ, vengono cresciute le radici in condizioni di controllo, raccolte quelle che raggiungono una lunghezza di 2-3cm finale. Lasciate una notte in piastre multiwell con 3 ml di acqua per una notte incubate in camera di crescita, onde evitare che venga innescata una risposta dei ROS. Durante il secondo giorno viene rimossa l'acqua sterile MilliQ e rimossa l'acqua: inserire 3 ml d'acqua con il relativo trattamento e lasciare 6h al buio in camera di crescita.

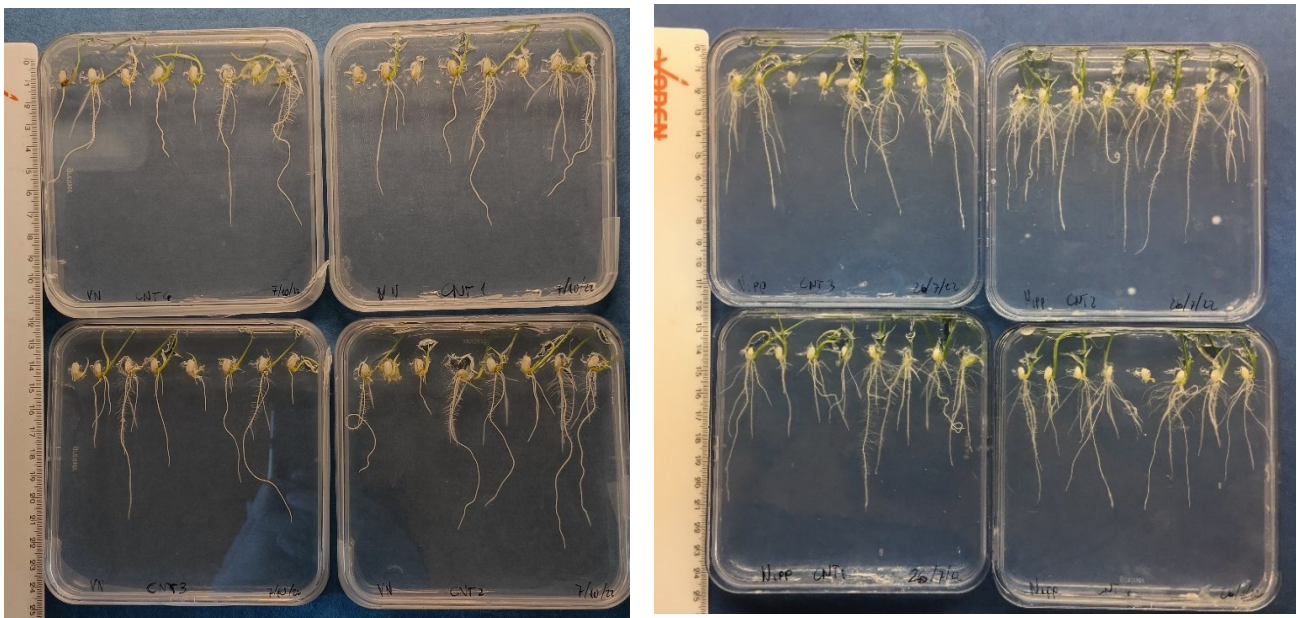


Figura 13 - Semi di Vialone Nano e Nipponbare germinati in condizioni di controllo nel medium MS 1/2

4.4 Preparazione delle radici per l'analisi al microscopio confocale

L'esperimento di colorazione mi ha permesso di delineare la morfologia cellulare della radice primaria di riso in condizioni fisiologiche e di stress salino.

Il colorante utilizzato per questa procedura è il Propidio Ioduro (PI), rosso fluorescente visualizzabile al microscopio confocale tramite fluorescenza. Viene principalmente utilizzato per saggiare la vitalità cellulare, non è in grado di permeare l'integrità della membrana cellulare e viene escluso dalle cellule in divisione. Posizionandosi sulla parte della cellula vegetale, si è in grado di ottenere

un'immagine strutturale della morfologia cellulare. Le radici poste nella multiwell vengono incubate in una soluzione di acqua milli Q con aggiunta di propidio ioduro 10 mM. Le radici sono trattate per venti minuti nella soluzione e successivamente vi è lo step di lavaggio in acqua milli Q. Le quantità dipendono da quante radici sono analizzate (da 1 a 3 ml di acqua, 10-30 µl di PI).

Una volta formato il complesso, la sua fluorescenza è aumentata dalle 20 a 30 volte e l'eccitazione massima è shiftata di 30-40 nm nel rosso, l'emissione è shiftata di 5 nm nel blue. L'eccitazione/emissione massima del composto è tra 493/636 e può risultare fino a 532 e una fluorescenza di 617. Il PI è stato eccitato a 562 nm e la fluorescenza è stata raccolta a 493-617 utilizzando il microscopio confocale diretto Zeiss 900LSM con obiettivo N-Achroplan 10x/0,25 M27. In un secondo momento è stato utilizzato anche il microscopio "Leica SP5" con obiettivo HCX IRAPO L 25.0x0.95 water, il PI è stato eccitato a 543nm e l'emissione è stata catturata a 570-620 nm. L'elaborazione dei dati delle immagini ottenuta avviene tramite il software Fiji, una suite open source di ImageJ, utilizzando i parametri descritti nei risultati.

4.5 Esperimento con Clear See

L'obiettivo di questo esperimento è quello di ottenere delle immagini più pulite della struttura della radice e la morfologia cellulare per localizzare le zone citate. La procedura parte dall'ottenimento di semi sterilizzati e seminati all'interno delle piastre con medium MS ½. Successivamente, vi è lo step di fissazione in cui la materia organica, nel mio caso le radici, viene "bloccata" nella condizione istologica in cui si trova in quel momento, evitando modificazioni morfologiche. Lo step successivo è quello di eliminare il rumore e diminuire l'autofluorescenza. La composizione del solvente ClearSee è stata preparata seguendo studi (Kurihara et al., 2015, Imoto et al., 2021) precedentemente fatti e viene scritta di seguito:

Xilitolo	final 10% w/v
Sodio Deoxicolato	final 15% w/v
Urea	final 10% w/v
Acqua milli Q	fino al volume totale

La soluzione è stata preparata secondo il protocollo nell'articolo citato precedentemente, nella sezione dei metodi supplementari (*Protocol for combined observation of fluorescent proteins with classical histological stains*, Kurihara 2015).

Per quanto riguarda le radici che ho analizzato, il passaggio di fissazione istologica avviene con PFA (paraformaldeide) in 1x PBS per un'ora a temperatura ambiente sottovuoto per aumentare il fissaggio. La soluzione viene rimossa e le radici sono lavate per 1 minuto con 1x PBS. Solo dopo questo passaggio è possibile incubare le radici nella soluzione ClearSee e deve essere sostituita ogni due giorni se tenuta per più di una settimana.

4.6 Estrazione, quantificazione e preparazione prima elica cDNA

Una volta germinati i semi e raggiunta la lunghezza ottimale, sotto cappa biologica ho collezionato, almeno, dieci radici per trattamento con una lunghezza simile (max differenza 1cm). Radici di lunghezza compresa tra i 2-3 cm sono state tagliate dalle plantuline trattate come descritto qua sotto e congelate immediatamente in N₂ I campioni sono stati polverizzati in N₂ liquido e l'RNA totale è stato estratto seguendo il protocollo fornito dalla ditta Qiagen. Per l'analisi sono stati scelti sei trattamenti applicati direttamente nel terreno medium per sei giorni:

Controllo

NaCl 100 mM

N-acetilcisteina (NAC) 2,5 mM

Perossido di idrogeno (H₂O₂) 2mM

Citochinine (CK) 2 μM

NaCl 100 mM + NAC 1 mM

La retrotrascrizione è una reazione che permette di polimerizzare i filamenti di DNA complementare all'RNA. Di fatto, si procede alla sintesi del cDNA effettuata utilizzando l'enzima SuperScript™ IV (Invitrogen) seguendo il protocollo dell'azienda Thermo Fisher Scientific.

- preparare un mix di 12 μl contenente 2 μg di RNA (per campione) portare a volume secondo il campione con acqua milli Q sterile
- prelevare 1 μL di Random Primers (Promega) e 1 μL DNTPs (6 μL ciascuno), unisco ottenendo una soluzione di 14 μL di Primer Reaction Mix. Porre in termoblocco a 65°C per 5 minuti, incubare in ghiaccio
- vortexare e spinnare il buffer
- aggiungo 4 μl di buffer prima elica per campione, 1 μl di DTT 100 mM e 1 μl di enzima per la retrotrascrizione (volume totale 20 μl). Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti
- amplificazione finale è avvenuta a 55°C per 10 minuti e l'enzima è stato inattivato a 80°C per 10 minuti. I campioni sono raccolti e inseriti nel frigo a -20°C

4.7 Real-Time PCR

La Real-Time PCR è una tecnica che permette amplificare uno o più geni e di quantificarli mettendoli a confronto con un gene con espressione costante (Housekeeping), che nel nostro caso è ubiquitina (UBQ). L'analisi effettuata avviene tramite la tecnica del SYBR green e la soluzione di reazione è composta da:

cDNA	1 μl
Master mix 2x	5 μl
H2O	3.8 μl
Mix Primer F e R	0.2 μl
Volume totale	10 μl

Per quanto riguarda l'esperimento di sono state utilizzate piastre da pozzetti (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) contenenti per ognuno 5 μl di GoTaq qPCR Master Mix 2X, con primers gene-specific 200 nM (forward e reverse) e 100 ng di templatato. Le analisi sono condotte utilizzando lo strumento QuantStudio 12K Flex (Thermo Fisher Scientific). L'amplificazione è impostata come segue:

50°C per 2 minuti, 95°C per 10 minuti

95°C per 15 secondi, 60°C per 1 minuto → per 40 cicli totali

95°C per 15 secondi, 60°C per 1 minuto e 95°C per 15 secondi

Gene	ID	Primer forward	Primer reverse
PYL4	Os03g0297600	AGCCCCAGGCGTACAAGC	GTGGTGACCGAGAGGTAGTTC
ZFP179	Os01g0839100	ATGTGAATTGAATTGGCGTCT	ATCATCACGCTCCAAAATTTA
RBOHA	Os01g0734200	TGGCTAAGGCCAGAAGCAC	GCCCAACCTGGAGCCAATAA
Ubiquitin	Os05g0160200	TTCTACAAGGTGGACGACGC	AGATCAGAGCAAAGCGAGCA

4.8 Imaging dell'acqua ossigenata

Il perossido di idrogeno si posiziona all'interno della radice di riso in condizione fisiologiche e in risposta a determinati stress. L'imaging consiste nell'utilizzare una molecola non fluorescente e non carica nominata diidrorodamina 123 (DHR 123, Sigma Aldrich). La sonda è in grado di diffondere passivamente all'interno della membrana cellulare e viene ossidata nella molecola fluorescente R123 dalla presenza di Reactive Oxygen Species (ROS) (Fig.14). La forma cationica e fluorescente rodamina 123 viene utilizzata per analizzare i profili di concentrazione di acqua ossigenata intracellulare in radici di riso. La molecola rodamina123 si localizza nel mitocondrio e mostra una fluorescenza nel verde con λ_{max} di emissione a 529 nm ed eccitazione a 505 m.

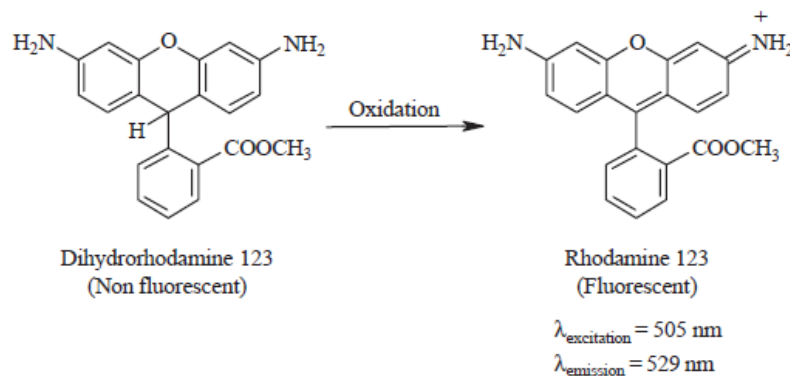


Figura 14 - Ossidazione della Diidrorodamina 123 in Rodamina 123 (Lamani et al., 2015)

Gli esperimenti sono stati condotti sulle radici primarie di riso cresciute in piastre con Medium e Acqua milliQ. In particolare, la radice primaria viene recisa a partire dalla punta fino ad un minimo di due centimetri e inserita all'interno delle

multiwell da 6 pozzetti con 3 ml di acqua. Il quantitativo di colorante da aggiungere in 3 ml di acqua milliQ equivale a 3 μ l, ovvero DHR123 con concentrazione finale 0,1 mM. Le radici sono lasciate in soluzione per 30 minuti, successivamente vi è un passaggio di lavaggio in acqua milliQ per altri 30 minuti. Le radici sono raccolte e poste su di un vetrino con silicone a cerchio di modo tale che racchiuda la porzione di acqua per mantenere la radice in ammollo. Questo metodo è applicabile per il microscopio con obiettivo dritto, per quanto riguarda quello con obiettivo invertito è utile inserire le radici in multiwell da 24 pozzetti.

La fluorescenza è stata analizzata tramite il microscopio a fluorescenza (Leica Microsystems, Germany) utilizzando un obiettivo NPLAN 5X / 0,15 e un filtro per GFP (ex BP 450-490; BP 520/50). Il microscopio a fluorescenza con obiettivo dritto è il modello "Leica DM6 B", quello invertito invece "Leica DMI4000". Per quanto riguarda l'elaborazione dei dati delle immagini ottenute, è stata effettuata tramite il software Fiji, suite open source di ImageJ. I parametri e analisi saranno descritti nella sezione dei risultati.

4.9 Imaging dello ione superossido O_2^-

La complessità dei segnali redox e intracellulari di ROS regola principalmente i processi di sviluppo presenti tra le zone della radice. L'imaging della specie reattiva dell'ossigeno O_2^- e la sua concentrazione ci permettono di comprendere in quale zone viene preferito lo stadio di proliferazione o differenziazione. Nitroblue tetrazolium (NBT) è un composto che si presenta giallo pallido e solubile in acqua composto da anello aromatico tetrazolio. In particolare, è un accettore artificiale di elettroni e il saggio con NBT viene largamente utilizzato per lo studio di radicali liberi. Il colorante entra nelle cellule target tramite incubazione delle radici in soluzione con l'NBT. L'interazione di questo composto con lo ione superossido distrugge l'anello tetrazolico e si forma un radicale definito "tetrazoinyl", la susseguente dismutazione genera un composto insolubile in acqua. Il precipitato sotto forma di cristallo viola/blue viene definito "Formazan" che corrisponde al prodotto ridotto e può essere misurato al microscopio (Javvaji et al., 2020, Volk and Moreland, 2014). NBT è quindi un indicatore sotto forma di precipitato blu

scuro/viola in contatto con gli ioni superossidi presenti nell'apoplasto o membrana plasmatica, in particolare nelle cellule in divisione o precoci allungate.

Il trattamento delle radici avviene all'interno delle multiwell da 6 pozzetti, per ognuno vengono disposte 8-10 radici. Queste sono immerse nella soluzione di NBT corrispondente ad una concentrazione finale di 2 mM in 3 ml di acqua MilliQ sterile. Il precipitato è stato analizzato tramite lo Stereomicroscopio MZ16F (Leica Microsystems, Germany) utilizzando un obiettivo PLANAPO 1X. In questo caso non è necessaria la fluorescenza perché il precipitato è osservabile in campo chiaro allo stereomicroscopio e presenta una colorazione blu. Per quanto riguarda l'elaborazione dei dati delle immagini ottenute, è stata effettuata tramite il software Fiji e i parametri e analisi saranno descritti nella sezione dei risultati.

4.10 Statistica

I grafici ottenuti dalle analisi effettuate con il software Fiji sono stati analizzati mediante il test statistico One-way ANOVA ($\alpha = 0,05$). In particolare, il software usato per ottenere l'indagine statistica è denominato "Prism" (graphpad.com)

5. Risultati e Discussione

5.1 Caratterizzazione della lunghezza di radice primaria

Durante gli studi effettuati precedentemente nel laboratorio in cui ho realizzato il mio progetto di tesi, sono state identificate le risposte delle varietà allo stress salino: Vialone Nano e Nipponbare le varietà sensibili e Baldo come cultivar tollerante. Per questo motivo ho deciso di apportare un'ulteriore caratterizzazione di composti che possono influenzare la germinazione del seme, per cui la crescita della radice.

Innanzitutto, la condizione di stress salino è stata testata in tre differenti concentrazioni di NaCl: 75 mM, 100 mM e 150 mM. La prima concentrazione, 75 mM, non mostra differenze di crescita in tutte le tre varietà. La condizione più stressante, a 150 mM, invece ha un istantaneo effetto di morte o non germinazione dei semi, per questo motivo non utilizzabile per l'analisi (varietà VN). Per quanto riguarda 100 mM invece risulta essere la concentrazione ideale per ottenere comunque delle radici primarie di una lunghezza sufficiente per le future analisi in varietà quali Vialone Nano. In Baldo, come si può osservare dal grafico (Fig.16) ho una percentuale di germinati maggiore e una lunghezza delle radici più alta nella condizione di sale.



Figura 15 - Semi di Vialone Nano germinati sottoposti a stress salino, cresciuti in medium MS $\frac{1}{2}$ per giorni = 6

N-Acetilcisteina (NAC) è un derivato di N-acetilato dell'amminoacido "solforato" cisteina ed è stata aggiunta nel terreno poiché presenta un'attività antiossidante. L'acetilcisteina quale donatore di elettroni agisce da scavenger e antagonizza i radicali liberi dell'ossigeno (ROS). Anche qui sono state testate tre concentrazioni per osservare la crescita radicale: 1mM, 2,5 mM e 5mM. La prima concentrazione non sembra mostrare differenza rispetto i semi nelle piastre di controllo. La seconda concentrazione (2,5mM) sembra indurre un blocco della crescita della radice. Se aggiungiamo 5mM di NAC invece viene mostrato un effetto contrario,

ovvero tossico, per i semi che non riescono a germinare. Infine, la soluzione di NAC 1mM aggiunta insieme a 100mM di NaCl nel medium hanno dimostrato un leggero di germinazione dei semi di pianta di riso delle cultivar sensibili. Come si può osservare dal grafico, in Vialone Nano, l'aggiunta di NAC insieme allo stress salino non mostra una ripresa significativa (Figura 16 A), nel caso di Baldo non sono state osservate differenze significative per nessun trattamento (Figura 16 B).

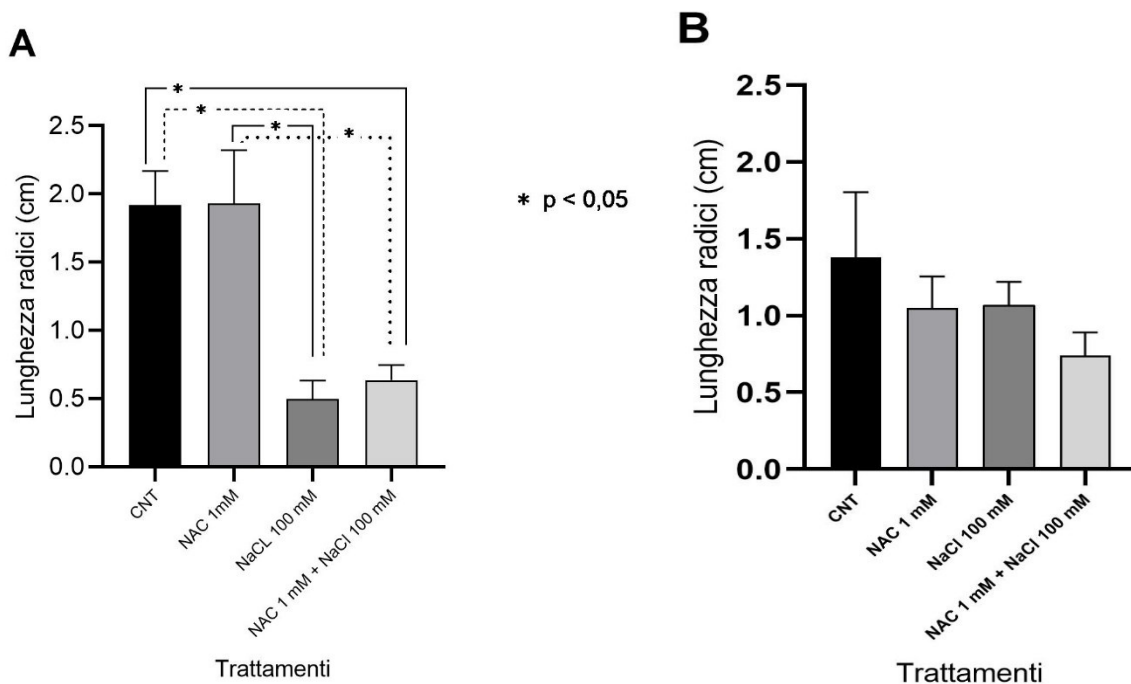


Fig.16 – Analisi statistica della lunghezza delle radici. A: radici di Vialone Nano cresciute nelle quattro condizioni differenti, in terreno MS ½, 6 giorni di crescita in condizioni controllate. Valori: media ± SEM, n=4 *: P<0,05 One-Way ANOVA test. B radici di Baldo cresciute nelle quattro condizioni differenti, in terreno MS ½, 5 giorni di crescita in condizioni controllate. Valori: media ± SEM, n=4 One-Way ANOVA test

Nel grafico (figura 16, B) si può osservare come la lunghezza media delle radici di Baldo sia più bassa, tuttavia questo è dovuto alla diversa tempistica dei giorni di crescita. Inoltre Baldo richiede più giorni di crescita rispetto Vialone Nano che ha un tasso di germinazione più rapido. Detto ciò, si può comunque apprezzare la differenza di crescita delle radici cresciute in situazione di stress salino.

5.2 Caratterizzazione della radice Primaria tramite microscopio confocale

L'analisi al microscopio confocale della radici di riso è stata fondamentale per osservare la morfologia cellulare. In particolare, seguendo le linee cellulari che partono dalla nicchia dell'apice distale meristemato, è possibile condurre un'analisi fenotipica delle cellule che appartengono alle tre zone istogeniche descritte nel modello di *Arabidopsis* dello studio precedentemente citato (Ni et al., 2014).

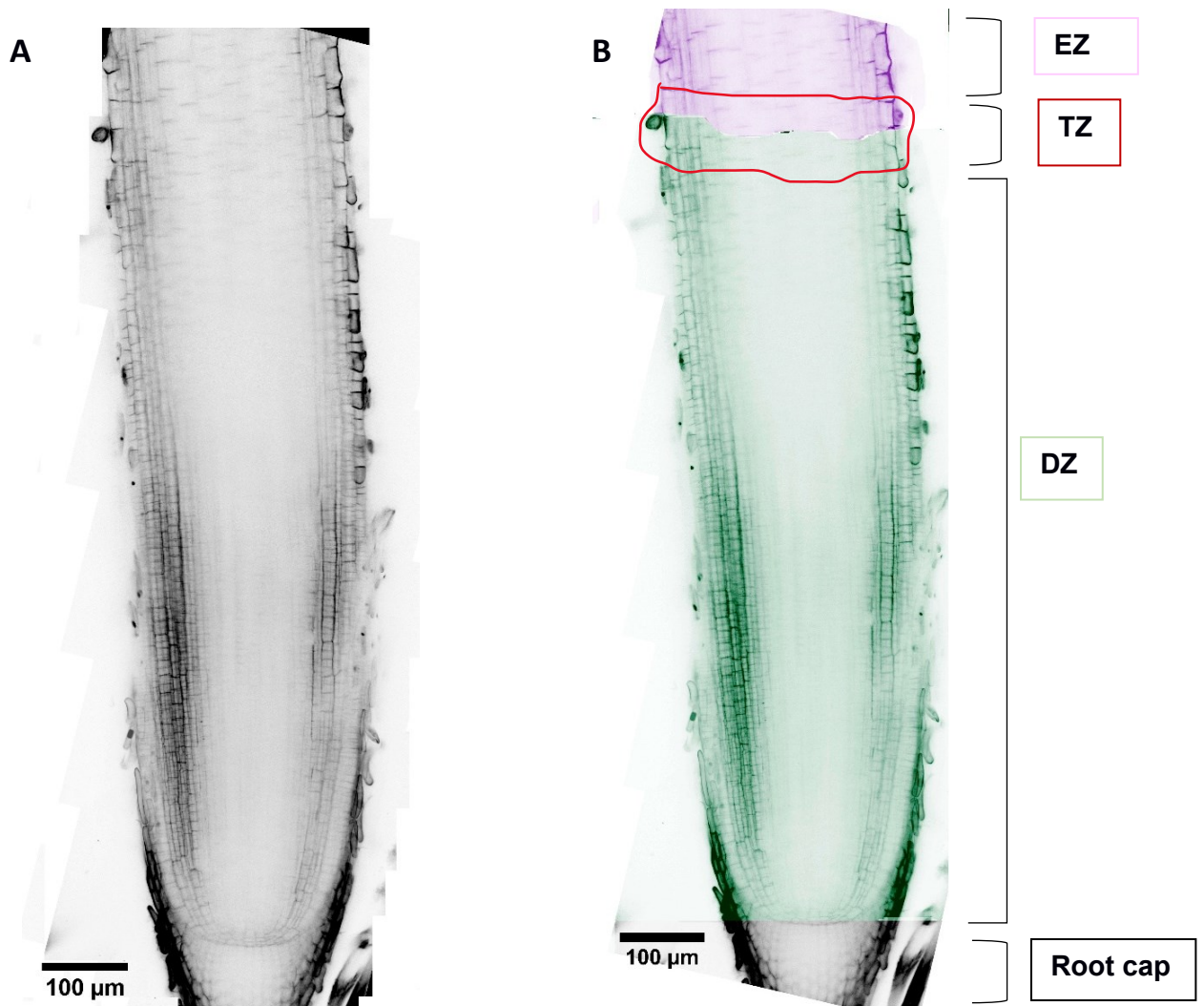


Figura 17 – Radice di Vialone Nano cresciute in condizioni di controllo, terreno MS ½, giorni = 6. Microscopio confocale SP5 25X, colorazione: propidio ioduro. **B**: zone istogeniche in questione: zona di divisione (verde), zona di transizione (verde/viola) e allungamento (viola)

Le immagini ottenute con il microscopio sono state successivamente analizzate e generate tramite il software ImageJ (Fig.17). Per ottenere una figura della radice con una lunghezza considerevole per la mia analisi, è stato necessario acquisire differenti sezioni mantenendo gli stessi parametri. Tramite il plugin del software

Fiji ho poi ricomposto l'immagine. In particolare, le radici sono state ottenute tramite microscopio confocale Leica SP5 ad obiettivo invertito. Come si può evincere dalle immagini, non sono riuscito ad ottenere un protocollo adatto che mi permettesse di acquisire un'immagine chiara dell'intero apparato radicale con tutte le cellule che lo compongono. Il motivo risiede nel fatto che essendo la radice molto densa e compatta, costituita da più strati, è necessario apportare una sezione verticale oppure utilizzare un microscopio con un impulso di laser più potente rispetto quello utilizzato.

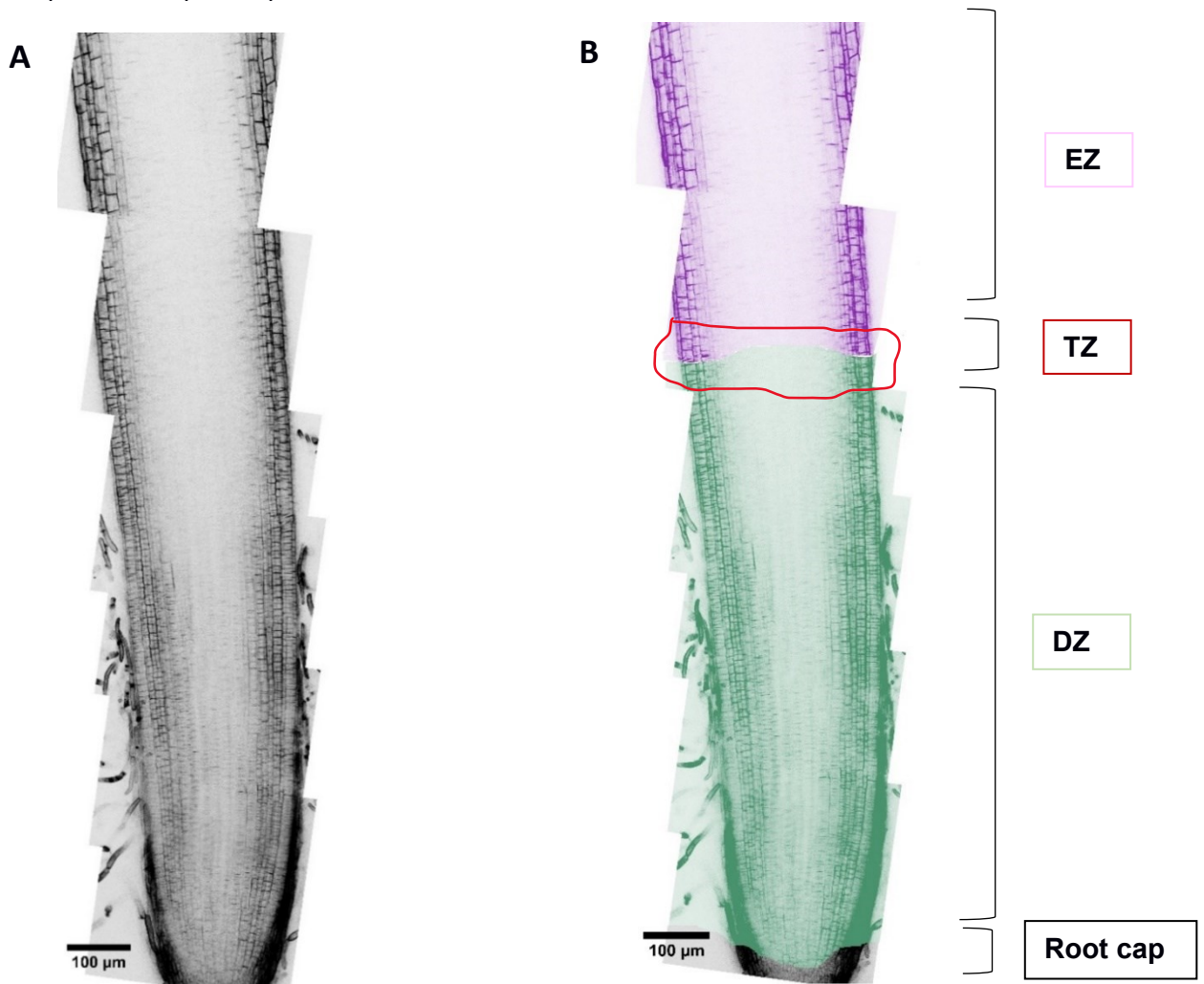


Figura 18 – AB: Radice di Vialone Nano cresciute in condizioni di controllo, terreno MS ½, giorni = 6. Microscopio confocale Zeiss LSM900 10X, colorazione: propidio ioduro. **B:** zone istogeniche in questione: zona di divisione (verde), zona di transizione (verde/viola) e allungamento (viola)

Tuttavia, dalle immagini precedente mostrate è possibile individuare la zona di transizione in cui le cellule smettono di dividersi e assumono una forma più allungata. Questo processo è stato fondamentale per condurre un'indagine

statistica sulla localizzazione della TZ in termini di lunghezza, in condizioni fisiologiche e di stress salino. L'analisi eseguita ha mostrato una diminuzione dell'espansione cellulare e della divisione cellulare poiché direttamente influenzate dall'alta concentrazione dei sali nel terreno (Fig.19) (Munns et al., 2002).

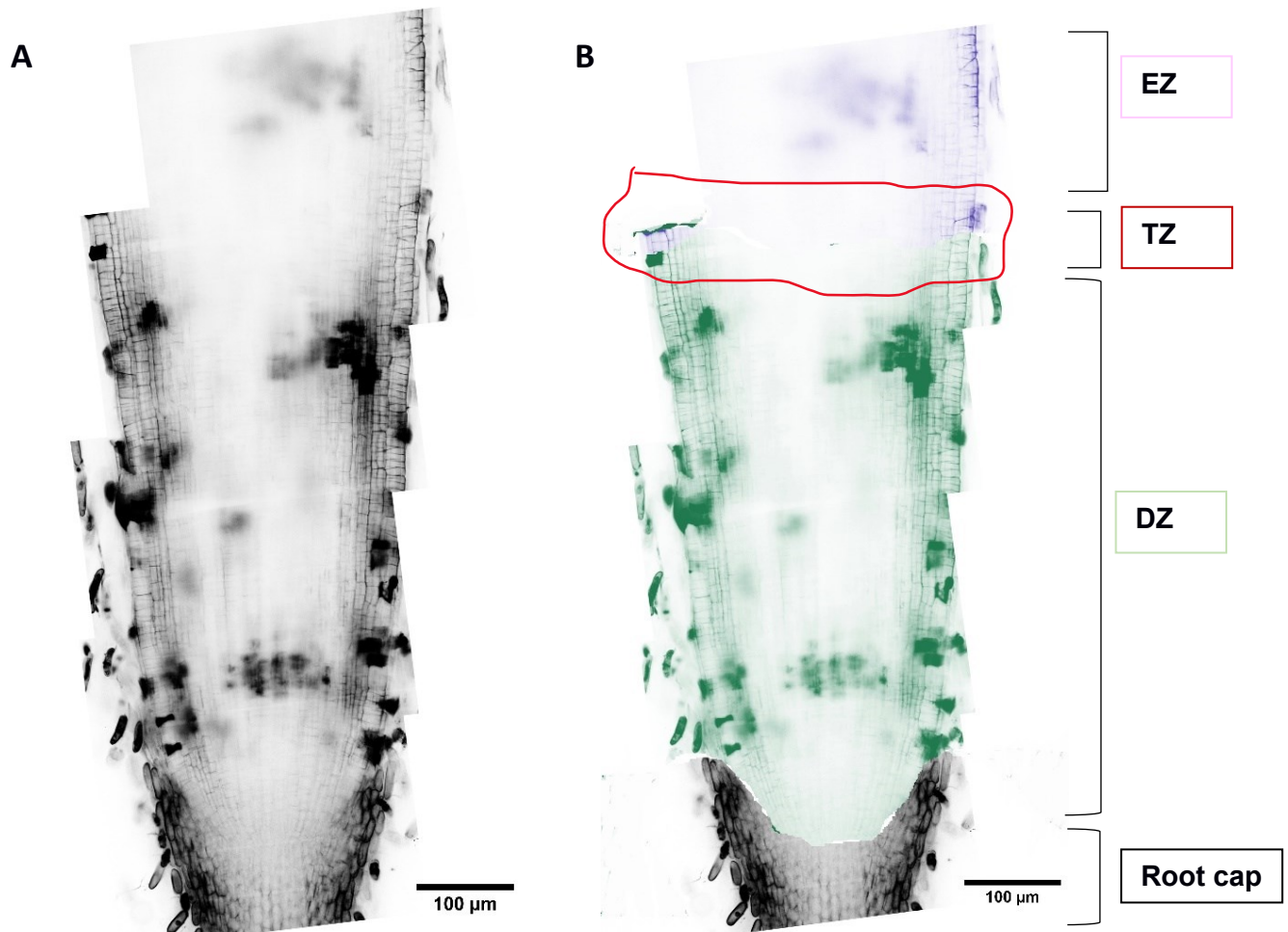


Figura 19 – AB: Radice di Vialone Nano cresciute con stress salino, terreno MS ½, giorni = 6. Microscopio confocale SP5 25X. **B**: zone istogeniche in questione: zona di divisione (verde), zona di transizione (verde/blu) e allungamento (blu)

Di fatto, la differenza è significativa, vi è una diminuzione della lunghezza delle radici che risulta in una diminuzione delle cellule in divisione e quindi della crescita radicale in varietà sensibili. Apparentemente, anche nelle radici della varietà di Baldo vi è una riduzione della zona meristemica. Tuttavia, la crescita della radice risulta maggiore in termini di lunghezza (Fig.21). Probabilmente, la riduzione della crescita per divisione cellulare è compensata in Baldo dall'allungamento delle

cellule (Fig.21). Questa ipotesi andrà verificata analizzando la morfologia delle cellule mature della radice. Inoltre, l'immagine mostrata è molto sporca in alcuni punti, ciò è dovuto al fatto che il colorante è penetrato nelle cellule e questo ci indica con molta probabilità che sono morte. Per questo motivo, affinare il protocollo e ottenere un quadro cellulare completo ci potrebbe indicare in radice di Baldo chiaramente se la zona meristemica è in parte mantenuta e saggiare la vitalità cellulare.

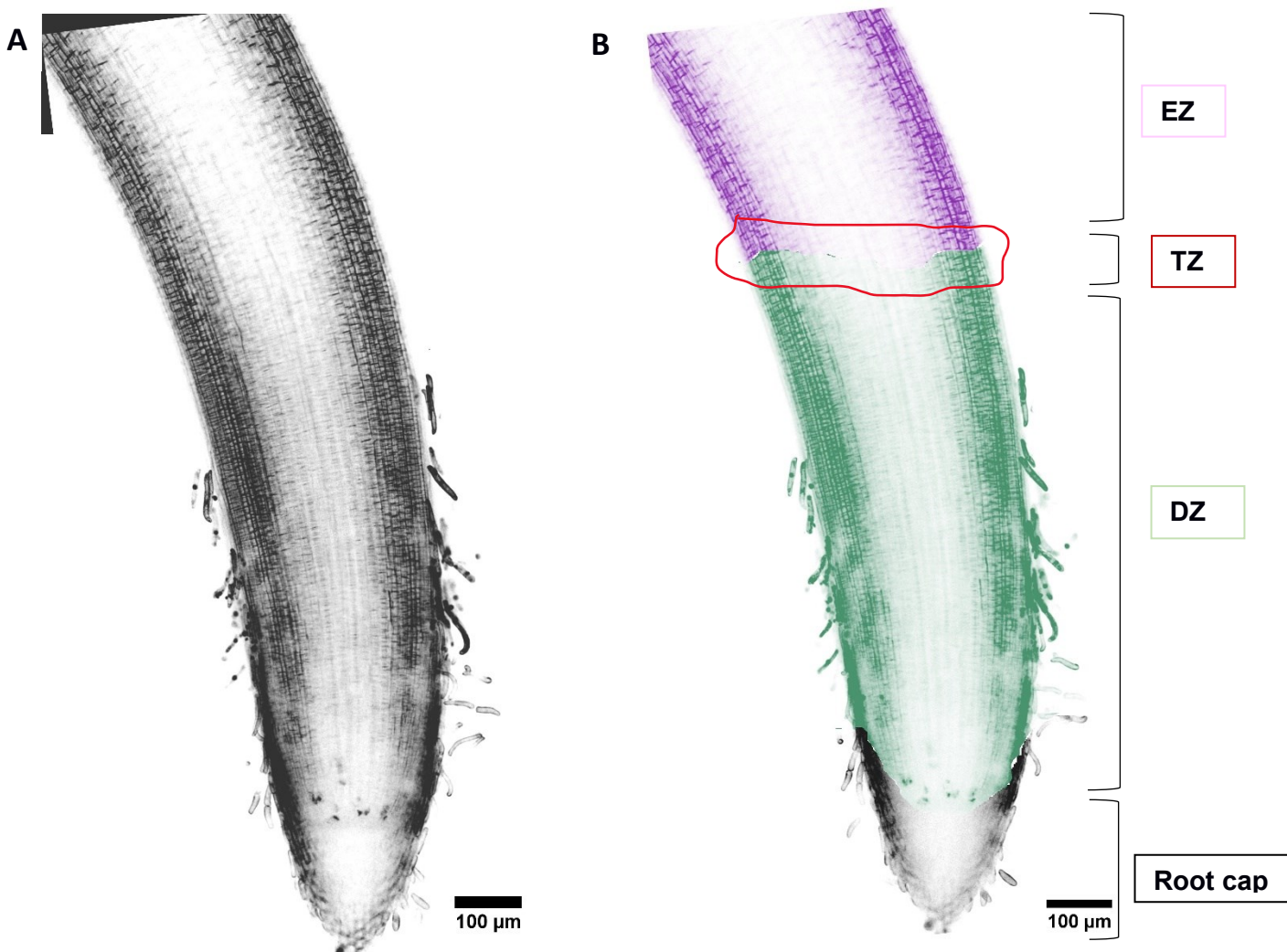


Figura 20 – AB: Radice di Baldo cresciute in condizioni di controllo, terreno MS ½, giorni = 5. Microscopio confocale Zeiss LSM900 10X, colorazione: propidio ioduro. **B**: zone istogeniche in questione: zona di divisione (verde), zona di transizione (verde/viola) e allungamento (viola)

In conclusione, le radici ottenute con il microscopio confocale Leica SP5 ad obiettivo invertito hanno mostrato dei risultati migliori rispetto le analisi

effettuate con il microscopio confocale Leica LSM900 con obiettivo diritto, colorate con Propidio Ioduro.

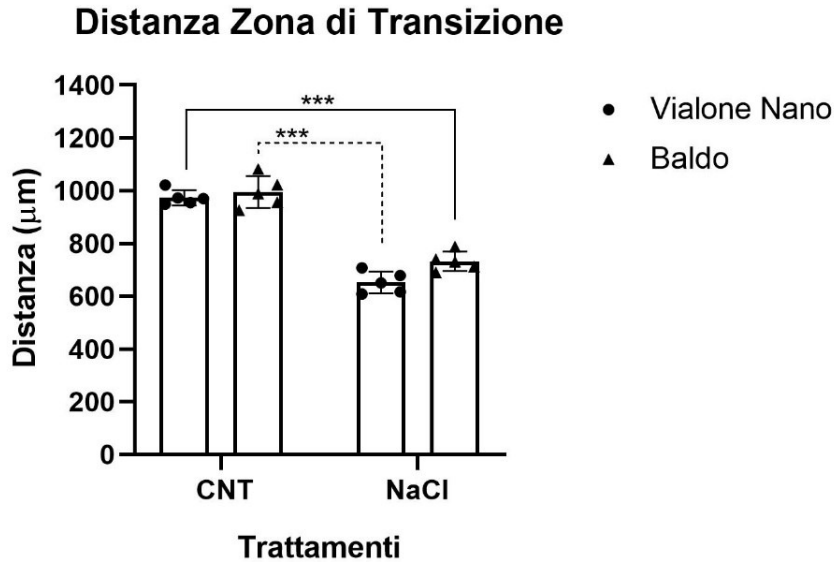


Figura 21 – Distribuzione della zona di transizione delle varietà Vialone Nano e Baldo cresciute, rispettivamente, 6 giorni e 5 giorni in terreno di crescita MS ½. Valori : media ± SEM, n=5, ***: $P < 0,0001$ t test

5.3 Solvente ClearSee in radici di varietà di riso italiano

Il solvente utilizzato ci ha permesso di ottenere delle radici che risultano più pulite visivamente e di più facile colorazione. L'obiettivo era quello di aver meno materia organica, oltre che fissare sul vetrino le radici, per riuscire ad ottenere un'immagine chiara e pulita dell'anatomia della radice e le cellule che si trovano al centro (floema e xilema). Di fatto, la radice di riso è composta da più strati, proprio per questo motivo non è stato possibile affinare l'analisi e stilare un protocollo adatto per il mio obiettivo. Inoltre, il ClearSee è un solvente in grado di annullare quasi del tutto l'autofluorescenza, tuttavia nel mio caso la fluorescenza è praticamente nulla. Per i motivi citati, ho deciso di scartare l'idea di utilizzare questo solvente per quanto riguarda le mie analisi. Nell'immagine mostrata (Fig.22) è possibile riconoscere in modo chiaro il Centro di quiescenza (QC) in radice primaria di riso e le due cellule staminali iniziali. Tuttavia, il Propidio ioduro non ha colorato le cellule nel modo corretto, ovvero rimanendo all'esterno sulla parete cellulare, al contrario è penetrato all'interno della cellula. Di fatto, questo

colorante è in grado di legarsi agli acidi nucleici e cromosomi delle cellule. Tuttavia, viene utilizzato per saggiare la morte cellulare, se le cellule sono morte il PI è in grado di passare la membrana cellulare e colorare l'interno. Nel mio caso, il colorante è entrato nelle cellule perché sono permeabilizzate dal passaggio istologico di fissazione.

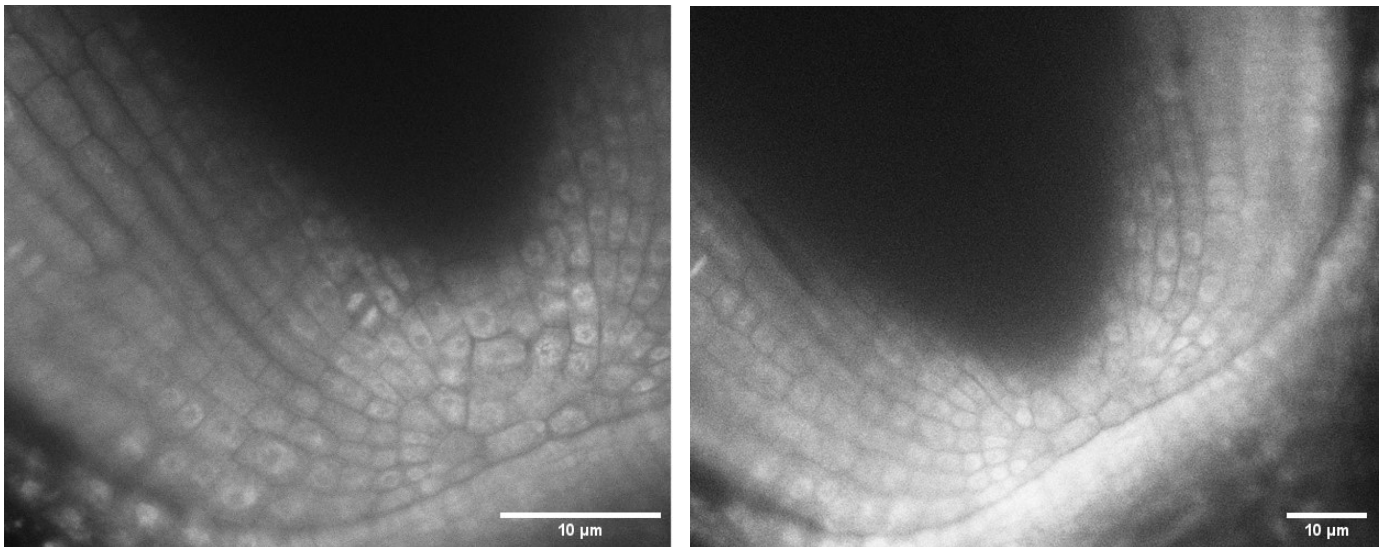


Figura 22 – Radice di Vialone Nano cresciute in condizioni fisiologiche, terreno MS ½, giorni = 6
analizzate al Microscopio confocale LSM900 40x

5.4 Analisi del gradiente di H₂O₂ lungo la radice primaria

L'analisi del gradiente di concentrazione di H₂O₂ è stata effettuata con la sonda DHR123 che viene ossidata nella molecola fluorescente R123 in presenza dell'acqua ossigenata per analizzare l'alterazione dell'architettura radicale. Le radici in condizioni fisiologiche mostrano nella zona meristemica vi è un minimo di intensità, poiché le cellule sono in attiva divisione. Per quanto riguarda la zona di allungamento invece si ha un procedurale aumento di concentrazione dell'acqua ossigenata. Questo conferma come un ciclo cellulare adeguato è fondamentale per un corretta crescita della radice e mantenere costante le dimensioni della DZ. Come si può osservare dal grafico, l'intensità di fluorescenza subisce un aumento nella DZ e raggiunge un plateau nella TZ attorno i 1000 µm in cui non si ha induzione di ulteriore acqua ossigenata, per poi innalzarsi nella zona successiva, ovvero quella di allungamento. Questo ci suggerisce come il minimo di H₂O₂ definisce la posizione della TZ e segna il confine tra DZ e EZ. In particolare,

H₂O₂ inibisce il ciclo cellulare, perciò è in concentrazione minima, al contrario della zona di allungamento in cui ha una concentrazione più alta. Nelle immagini (Fig.23) sono evidenziate le tre zone istogeniche suddivise in base alla lunghezza della radice e le analisi precedentemente mostrate. Per mostrare il minimo di acqua ossigenata nella zona di transizione e l'innalzamento progressivo andando verso la zona di differenziazione ho optato per estendere l'analisi fino ai 2300 µm (Fig.24).

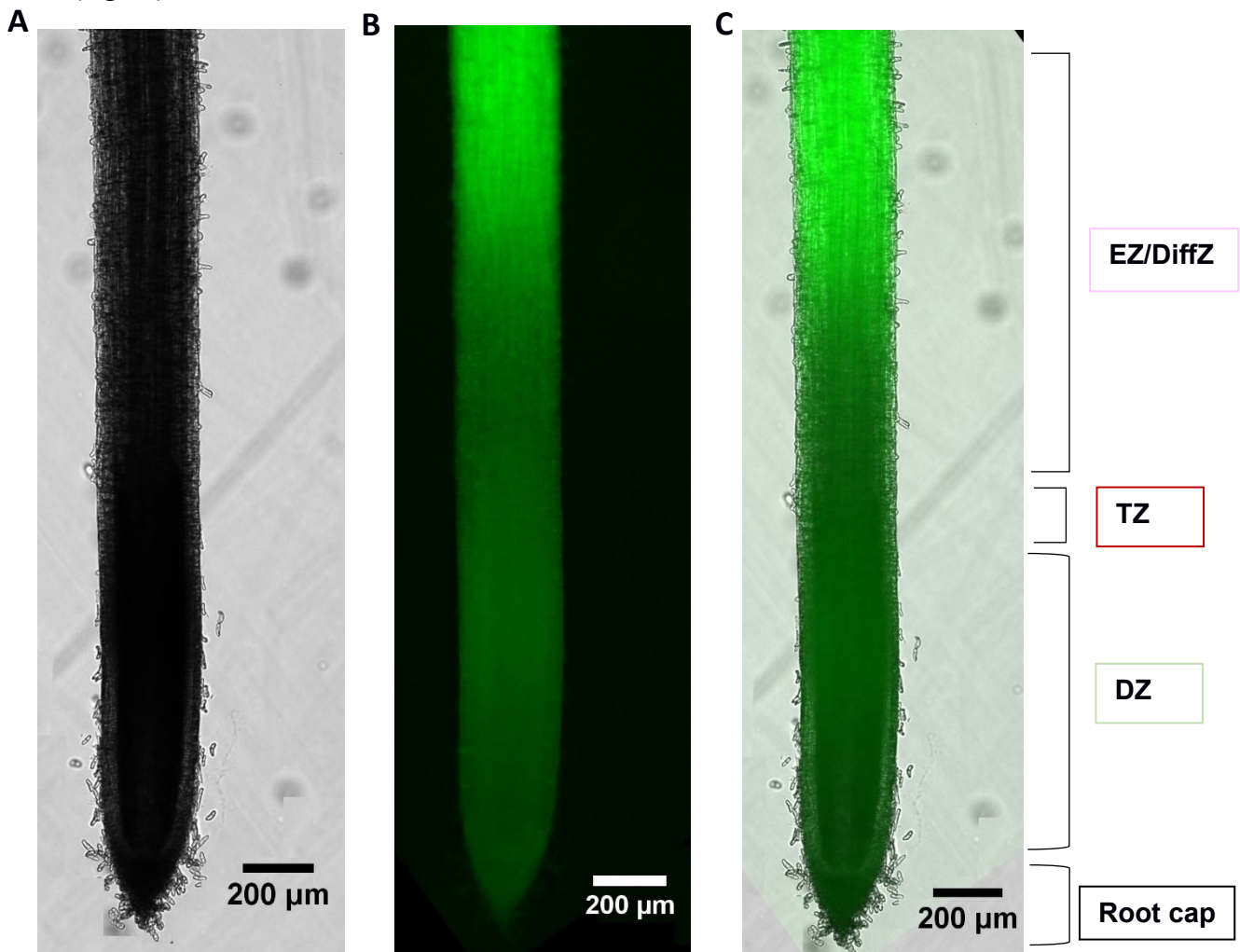


Figura 23 – Radice di Vialone Nano in condizioni fisiologiche analizzata al microscopio fluorescenza DMI4000 5X, cresciuta in terreno MS ½, giorni=6, colorate con: DHR123. **A:** bright field, **B:** fluorescenza, **C:** merge

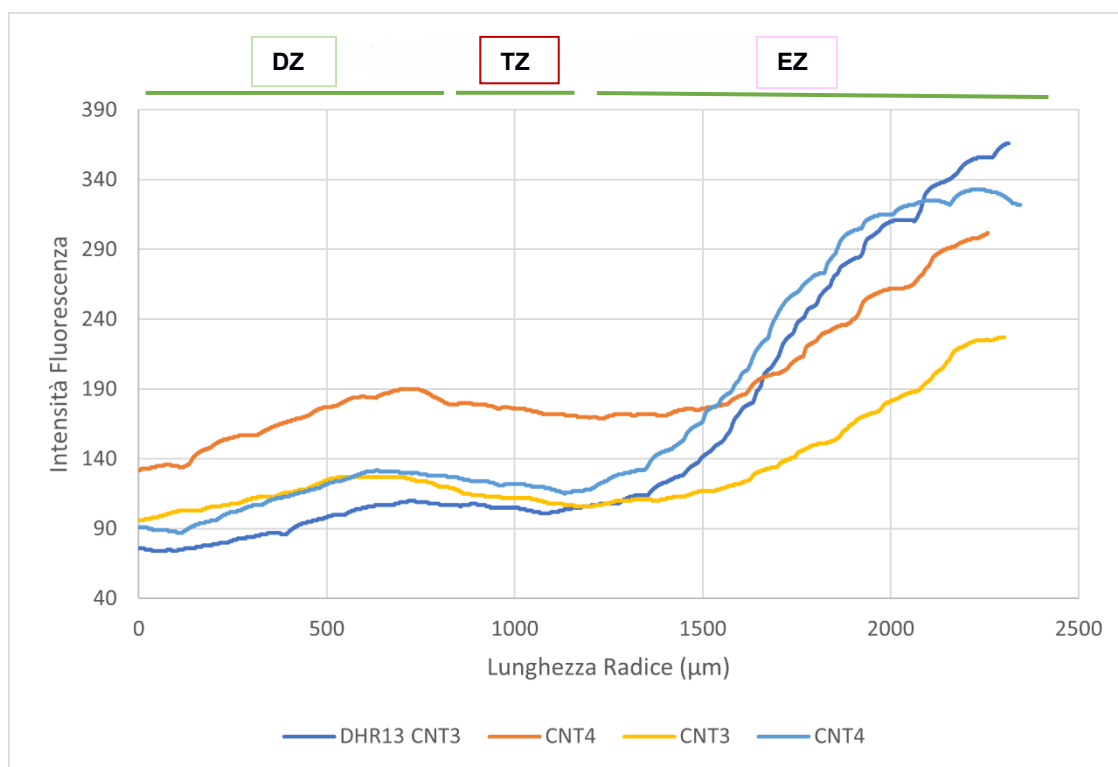


Figura 24 – Andamento dell'intensità di fluorescenza in funzione della lunghezza della radice primaria. microscopio fluorescenza DMI4000 5X, cresciuta in terreno MS ½, giorni=6, colorate con: DHR123

Dalle analisi effettuate si può osservare come nelle radici cresciute nel terreno con aggiunta di 100 mM di NaCl, presentano un'intensità di fluorescenza maggiore rispetto quelle cresciute in condizioni fisiologiche. Come detto precedentemente, l'analisi è supportata dal fatto che se sottoposto a stress salino, le radici di riso innescano cascate di molecole e messaggeri secondari in grado di segnalare la presenza di un'eccesso di ioni Na^+ . In aggiunta, seguendo la disposizione del gradiente di concentrazione dell'acqua ossigenata spiegato precedentemente, il minimo di intensità si osserva attorno ai 650 μm nella quale si posiziona la TZ (Figura 26). Questo risultato viene confermato anche dalle analisi precedentemente mostrate sull'osservazione fenotipica della radice in condizioni di stress salino tramite il microscopio confocale. In particolare, viene confermato come lo sbilanciamento di produzione di acqua ossigenata, mostrato da un forte aumento di fluorescenza, sembra indurre un'alterazione delle zone istogeniche della pianta. Ciò è dato dal fatto che, un aumento della concentrazione di acqua ossigenata sembra essere collegato alla morte cellulare. Questa ipotesi viene confermata anche dall'analisi dell'architettura radicale mostrata dalle foto

ottenute tramite microscopio confocale (Figura 21). Il “premature” posizionamento della zona di transizione è direttamente collegato allo sviluppo e crescita della radice, per cui al bilanciamento tra la DZ e EZ necessario per una dimensione stabile del meristema radicale. Difatti, l’allungamento nella zona EZ è correlato alla plasticità della radice e in questo caso, l’alterazione delle zone di crescita conferma la non tolleranza allo stress e il meccanismo dei ROS come possibile adattamento delle radici.

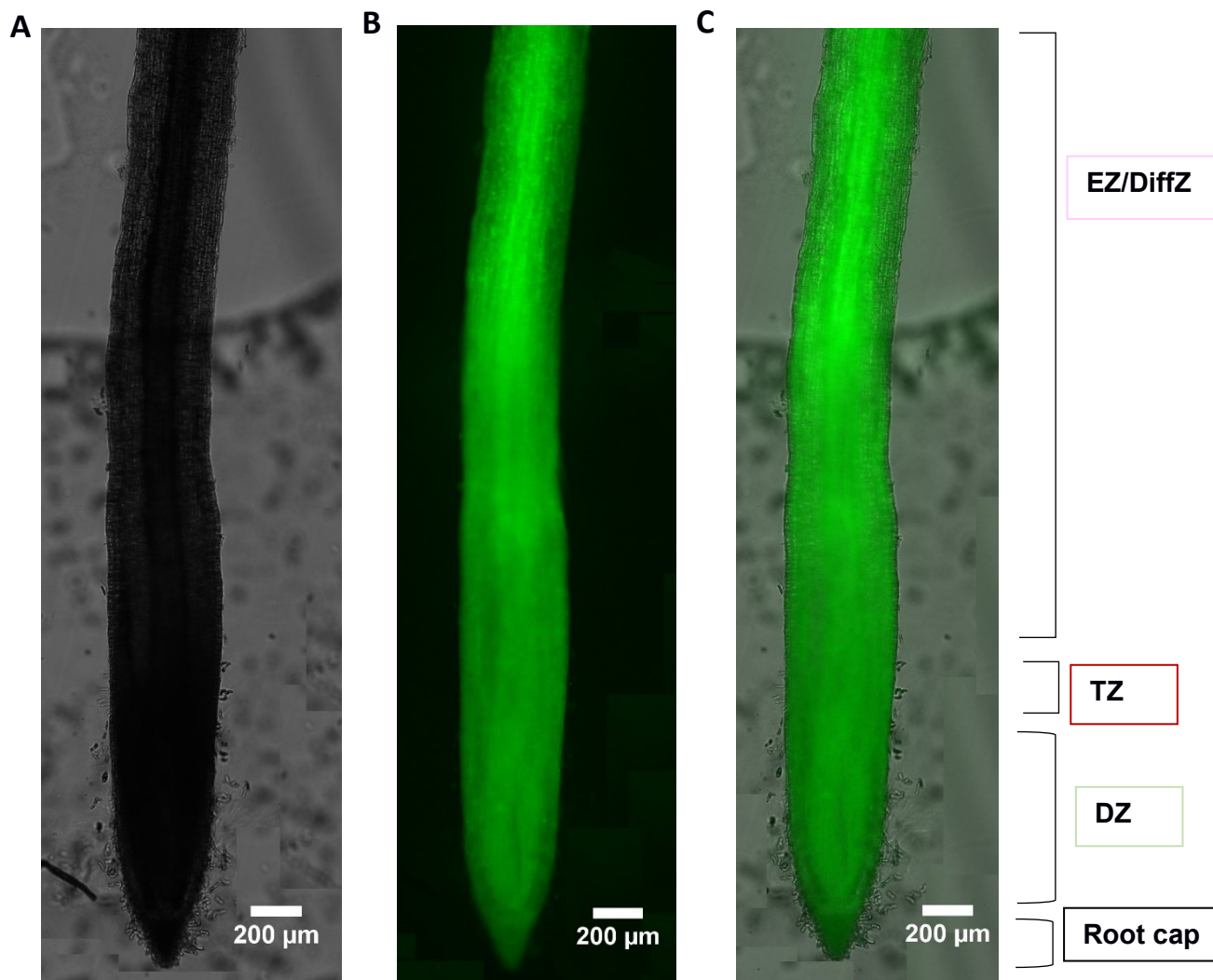


Figura 25 – Radice di Vialone Nano sottoposta a stress salino analizzata al microscopio fluorescenza DMI4000 5X, cresciuta in terreno MS ½, giorni=6, colorate con: DHR123. **A:** bright field, **B:** fluorescenza, **C:** merge

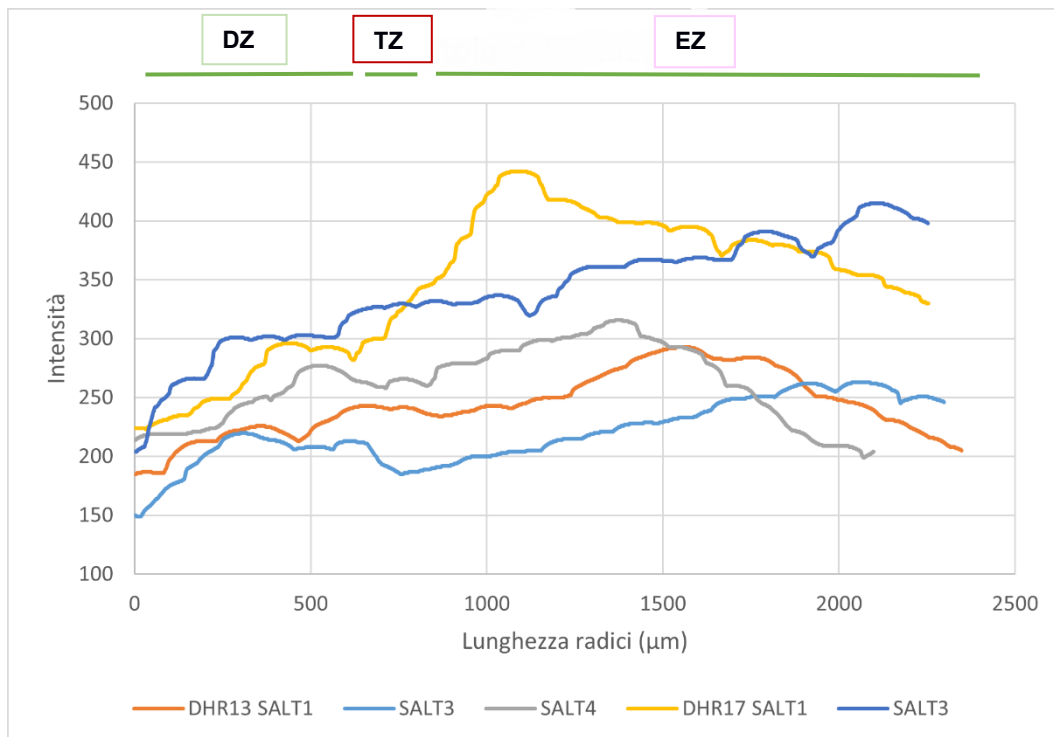


Figura 26 – Andamento dell'intensità di fluorescenza in funzione della lunghezza della radice primaria sottoposto a stress salino

5.5 Analisi del gradiente di O_2^- lungo la radice primaria

L'analisi del gradiente di concentrazione di O_2^- è stata eseguita tramite il composto NBT, un accettore artificiale di elettroni e utilizzato per saggiare la presenza di radicali liberi. La procedura è stata realizzata sulle radici primarie della varietà di Vialone Nano sottoposte allo stress salino di modo tale da convalidare l'alterazione dell'architettura radicale. In radici di controllo, nella zona meristemica vi è un massimo di accumulo del precipitato "Formazan" poiché le cellule sono in attiva divisione, che si mostra come un colore intenso. Per quanto riguarda la zona di allungamento, invece, si ha una procedurale diminuzione del precipitato e del colore che risulta essere più chiaro. Il formazan si mostra come precipitato blu scuro allo stereomicroscopio e proseguendo sulla zona di transizione diminuisce la concentrazione del composto generato (Fig.27). La zona di transizione viene individuata proprio nel punto in cui la radice inizia a schiarirsi, dove si forma meno precipitato a causa delle diminuzione di O_2^- . Questo conferma come per l'acqua ossigenata, i ROS sono responsabili della crescita della radice. Soprattutto, in questo caso la distribuzione è complementare all' H_2O_2 proprio

come si è mostrato nel modello di *Arabidopsis* precedentemente discusso (Eljebbawi et al., 2021).

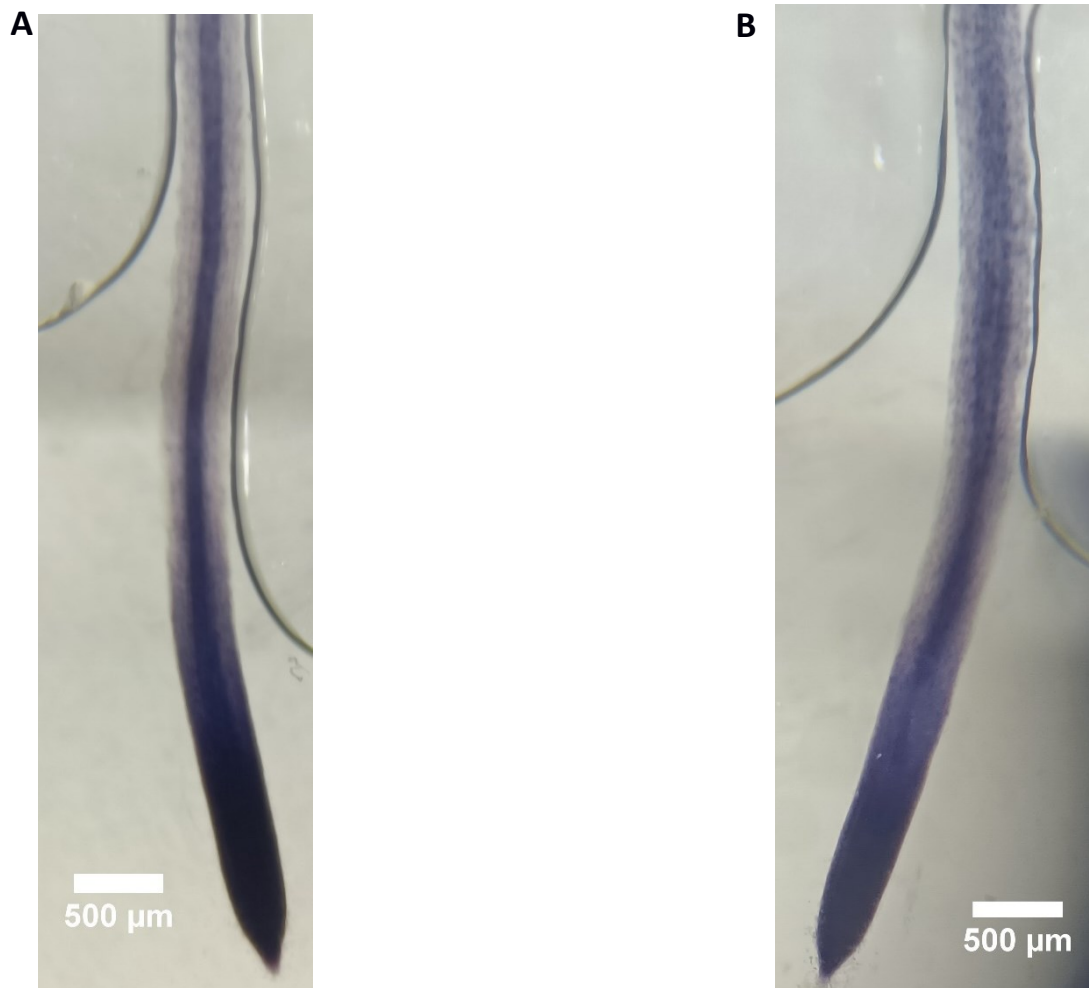


Figura 27 – Radice di Vialone Nano analizzata allo stereomicroscopio MZ16F, cresciuta in terreno MS ½, giorni=6, colorazione: NBT

In questo caso non si può parlare di intensità di fluorescenza, quindi per le mie misurazioni mi sono basato sulla scala di grigi presente nel software Fiji (ImageJ), in cui lo 0 corrisponde al punto più scuro, ovvero il nero, fino a 255 che è il più alto, il colore bianco. L'andamento nei grafici è stato quindi invertito per evidenziare come la distribuzione sia complementare, ponendo lo 0 come punto più chiaro (colore bianco); per fare ciò, ho sottratto il valore 255 ai dati di misurazione dell'intensità. Inoltre, la zona di transizione è stata confermata tramite le analisi fatte in precedenza con il microscopio confocale. Nel grafico si può osservare come l'intensità di colore nelle radici sottoposte allo stress salino abbia un forte abbassamento attorno i 700 µm come nel caso del DHR e dell'analisi effettuata

dalle immagini ottenute con il microscopio confocale. Nel caso delle radici in condizioni di controllo non ho notato dei cambiamenti significativi attorno i 1000 μm , se non una forte diminuzione di precipitato (di intensità di colore) dell'NBT superando la zona di transizione (Fig.28).

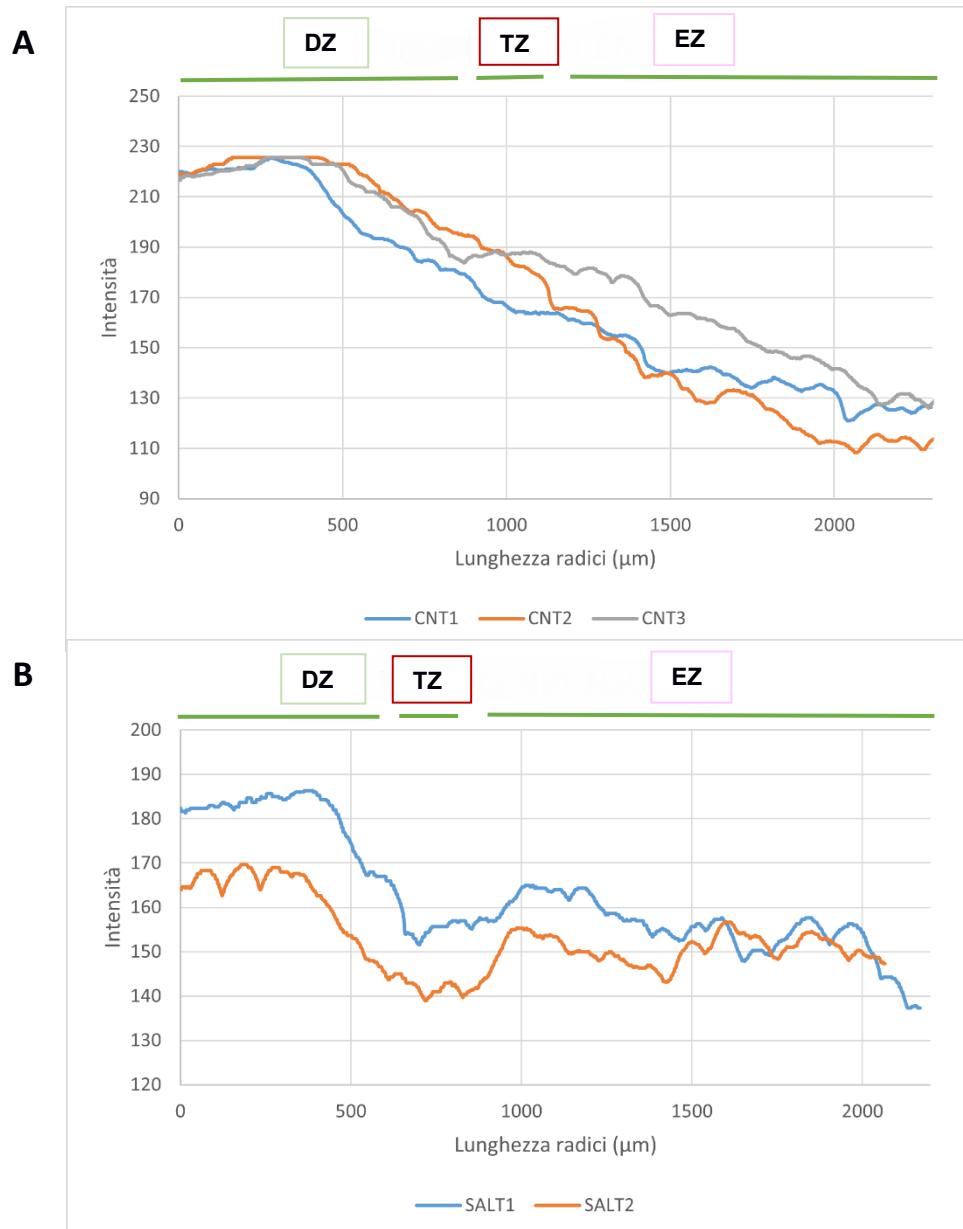


Figura 28– Andamento dell'intensità di colore del composto NBT in radici primarie di Vialone Nano. In alto l'intensità, A: condizioni fisiologiche, B: stress salino

Anche in questo caso, le misurazioni sono state effettuate al di sopra della zona di transizione, proseguendo nella zona di differenziamento. La mancanza di un filtro per l'NBT non mi ha permesso di ottenere delle immagini ad alta risoluzione. Inoltre, lo stereomicroscopio MZ16F consente di ottenere delle immagini ad alta

risoluzione, tuttavia l'aspetto delle immagini non permetteva una corretta analisi. Le luci dell'obiettivo interferivano con l'acquisizione delle immagini, compromettendo l'analisi dell'intensità

5.6 Analisi molecolare della crescita della radice in condizioni di stress

Per cercare di caratterizzare le componenti molecolari che regolano il posizionamento della TZ e vedere un eventuale correlazione con i ROS, ho effettuato l'analisi del profilo di espressione di tre geni: *PYL4*, *ZFP179* e *RBOHA*. Le analisi dei profili di espressione dei fattori di trascrizione sono state messe a punto seguendo il protocollo di realizzazione della prima elica di cDNA del paragrafo 4.6 e amplificati seguendo il paragrafo 4.7 della qRT-PCR. L'acido abscissico (ABA) viene considerato l'ormone dello stress nelle piante in condizioni ambientali avverse e gioca un ruolo vitale durante tutto il ciclo di vita della pianta. Specialmente, nelle radici di riso, la condizione di stress abiotico induce l'aumento dell'ABA. La famiglia di proteine Pyrabactin resistance 1-like (*PYR/PYL*) è la protagonista principale nella regolazione di questo ormone, lega ABA e permette la trasduzione del segnale, la germinazione del seme, la chiusura degli stomi e crescita della radice. Inoltre, studi hanno dimostrato che questa famiglia di recettori è in grado di promuovere la crescita in *Arabidopsis* durante la condizione di stress abiotico (Nian et al., 2021).

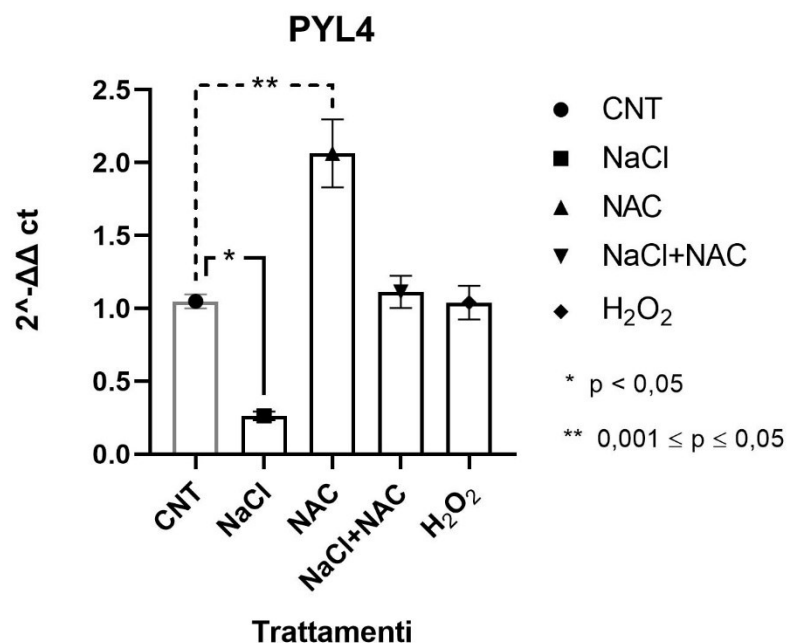


Figura 29 – Profilo di espressione della proteina PYL4 in radici di Nipponbare cresciute in terreno MS ½, giorni=6. Valori : media ± SEM, n=4, *: P<0,05, One-Way ANOVA test

In un altro studio è stato isolato e caratterizzato un gene codificante una proteina per un Zinc finger protein, *ZFP179*, in riso. In particolare, questa proteina viene indotta in condizioni di stress salino, H₂O₂ e trattamento con ABA. Difatti, è stato suggerito come la sua overespressione mostra un aumento di tolleranza dello stress salino in piante. In particolare, è stata suggerito come *ZFP179* media la risposta allo stress tramite un pathway di segnale ABA-indipendente per mediare lo scavenging delle molecole reattive dell'ossigeno. Di fatto, gli stress abiotici possono aumentare i livelli di ROS e la loro accumulazione nelle cellule. Per questo motivo, l'induzione della proteina è correlata in riso la risposta allo stress ossidativo causato dall'aumento di acqua ossigenata (Sun et al., 2010). Infine, *ZFP179* media l'attivazione di geni correlati allo stress e accompagnati da fattori regolatori.

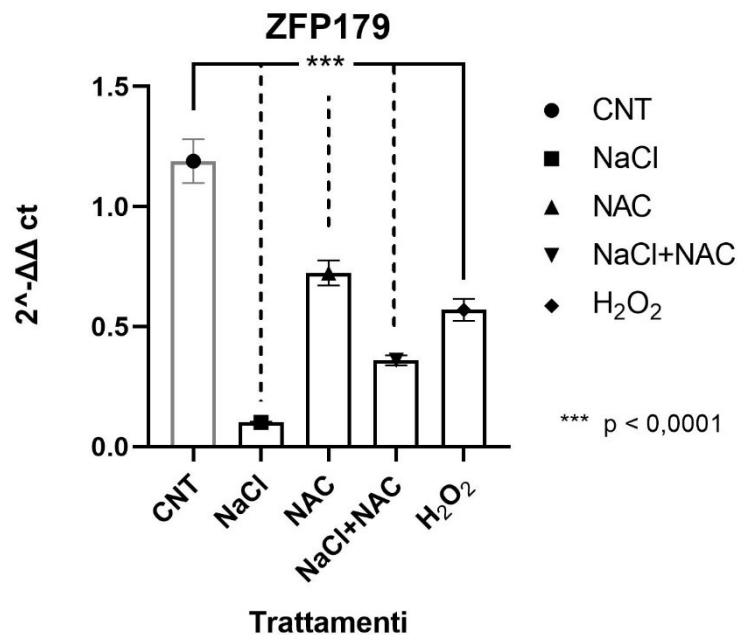


Figura 30 – Profilo di espressione della proteina ZFP179 in radici di Nipponbare cresciute in terreno MS ½, giorni=6. Valori : media ± SEM, n=4, ***: P<0,0001, One-Way ANOVA test

Un'altra classe di enzimi con funzione di protagonisti principali del signaling dei ROS sono le NADPH ossidasi. In particolare, codificate dai geni *RBOH* (respiratory burst oxidase homologues), in grado di produrre radicali di ione superossido e si

possono trovare diverse isoforme in piante e sono attivati durante la risposta allo stress salino (Formentin et al., 2018). L'attivazione trascrizionale e post-trasduzionale nella membrana innesca la risposta allo stress salino tramite la produzione di perossido di idrogeno. In particolar modo, nelle piante alofite vengono attivati immediatamente le superossido dismutasi (SOD) in grado di generare una risposta tollerante della pianta di riso allo stress salino. *RBOHA*, in questo contesto richiama in sede, le radici, la produzione di ROS per velocizzare la risposta (Hong et al., 2009; . Il gene scelto codifica per *RBOHA* (respiratory burst oxidase homolog protein C-like family), una subunità regolatrici di RBOHD che sembra essere indotta in condizioni di stress abiotico (Macho et al., 2012; Wang et al., 2020). L'espressione di questo gene sembra essere una conseguenza della rapida risposta dell'acqua ossigenata in piante tolleranti se sottoposte alla condizione di stress salino.

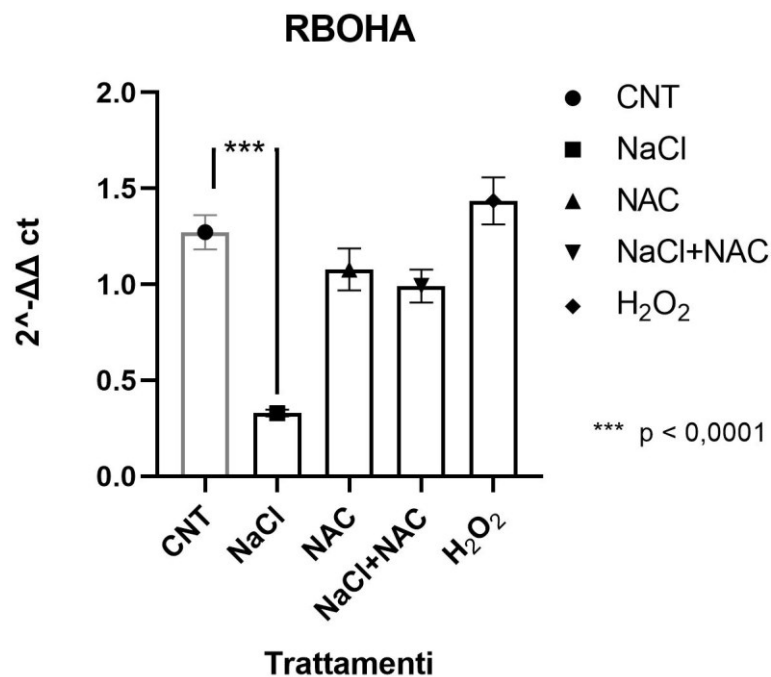


Figura 31 – Profilo di espressione della proteina RBOHA in radici di Nipponbare cresciute in terreno MS ½, giorni=6. Valori : media ± SEM, n=4, ***: P<0,0001, One-Way ANOVA test

L'analisi di questi tre geni è stata condotta secondo le modalità di crescita delle radici di Nipponbare, seguendo le modalità di sterilizzazione e germinazione del paragrafo 4.1 e 4.2. Infine le radici sono trattate nel terreno di crescita MS ½

seguendo il protocollo del paragrafo 4.3. A differenza degli studi fatti precedentemente, i semi e radici sono state trattate direttamente nel terreno di coltura per sei giorni di crescita. Una volta ottenuti i dati delle analisi della qRT-PCR, i risultati sono stati analizzati tramite graphpad e realizzati i grafici mostrati precedentemente (Figure: 25-26-27). Per quanto riguarda l'analisi statistica, è stato eseguito per ognuno un One-way ANOVA test ($\alpha = 0,05$).

Si può osservare come per quanto riguarda *PYL4*, alcuni trattamenti hanno un errore standard troppo grande. Per questo motivo l'analisi sarebbe da ripetere. Ciò che ci aspettavamo era un'espressione più alta del gene nelle condizioni di stress salino a causa della produzione di ABA, invece le mie analisi hanno mostrato una downregolazione (Fig.29). Tutto ciò avviene anche in presenza dell'ormone citochinina. Per quanto riguarda *ZFP179*, la situazione è simile al gene appena descritto, mi aspettavo una forte induzione in condizioni di stress salino. Inoltre, in tutti i trattamenti, il gene sembrerebbe essere downregolato; per questo motivo sarebbe sicuramente da ripetere (Fig.30). Il gene *RBOHA* non mostra profili di espressioni significativamente diversi rispetto la radice in condizione di controllo, a parte per la condizione di stress salino in cui sembra essere downregolato (Fig.31). In particolare, questo sembrerebbe essere in accordo col fatto che viene indotto nelle varietà tolleranti, quindi non in Vialone Nano. In conclusione, queste analisi sono del tutto preliminari e sicuramente sarebbero da ripetere per potere essere associate allo studio mostrato. Inoltre, di particolare interesse sarebbe ottenere i profili di espressione dei suddetti geni sia in Vialone Nano che Baldo, essendo la varietà tollerante. Il confronto tra queste varietà ci mostrerebbe quali sono i protagonisti principali del tratto caratteristico di tolleranza allo stress salino.

6. Conclusioni e Prospettive future

Il riso rappresenta una delle fonti caloriche vegetale fondamentale nella dieta, è necessaria l'individuazione di nuove sistemi di produzione alimentare sostenibile. Oltre a ciò, in vista di un notevole e rapido aumento della crescita demografica, ottimizzare la resa e la produzione di piante coltivate risulta una sfida prioritaria. Tra i principali antagonisti, gli stress indotti dai cambiamenti climatici rappresentano un grave ostacolo per la coltivazione, in particolare lo stress salino. La salinizzazione dei terreni affligge la metà dei terreni agricoli e comporta una drastica diminuzione della resa di produzione e qualità dei semi di riso. La pianta di riso, che si classifica come glicofita, è particolarmente sensibile a questa condizione. Di fatto, la plasticità delle varietà di riso è rappresentata da una serie di tratti e caratteristiche che insieme sono in grado di contrastare la condizione di stress. Le radici sono il primo organo a riscontrare lo stress salino e in particolare rappresentano la componente che descrive la capacità di sopravvivenza della pianta di riso.

Per questo motivo, nel mio lavoro di tesi ho deciso di focalizzarmi sull'analisi anatomica della radice primaria di riso sottoposta allo stress salino. Nella varietà di Vialone Nano e Baldo viene mostrata un'evidente differenza di crescita e sviluppo della radice se sottoposte a stress salino. In entrambe la risposta allo stress causa un blocco o modifica della crescita dovuta alla componente osmotica, tuttavia Baldo dimostra di crescita più alta rispetto la varietà sensibile.

L'analisi fenotipica della radice è stata condotta al microscopio confocale, le radici di Vialone Nano e Baldo ottenute mi hanno permesso di delineare le zone istogeniche: divisione (proliferazione), allungamento (differenziazione) e transizione. L'individuazione di quest'ultima è fondamentale perché responsabile della dimensione della zona di divisione e condiziona la crescita radicale. In condizioni di stress, l'architettura radicale e la distribuzione delle zone risulta modificata. Ciò che ho ottenuto è sicuramente un risultato preliminare da cui si può partire per condurre studi comparati e di confronto. Inoltre, per convalidare se la zona meristemica si è effettivamente accorciata in condizioni di stress

salino, sarebbe interessante condurre un saggio di vitalità cellulare. Nelle mie analisi ho condotto un'iniziale esperimento con il colorante Evans Blue, in grado di saggiare la morte cellulare. Nelle varietà sensibili ho notato un aumento dell'intensità di fluorescenza collegato ad un aumento della mortalità cellulare. La convalida in Baldo ci potrebbe spiegare quale meccanismo viene indotto per sopravvivere allo stress e come risulta l'architettura della radice se sottoposta allo stress salino.

L'analisi appena citata mi ha convinto ad avviare un'indagine del gradiente di concentrazione dei ROS. In particolare, le specie reattive dell'ossigeno sono direttamente coinvolte nel determinare la struttura e anatomia della radice, guidando l'equilibrio tra proliferazione e differenziamento. I risultati hanno dimostrato come le radici sottoposte a stress salino mostrino un aumento significativo dell'intensità di fluorescenza, rispetto le radici di controllo. Inoltre, la curva di intensità sembra mostrare un minimo di fluorescenza nella zona di transizione. Inoltre, per convalidare ulteriormente questa ipotesi, ho condotto l'analisi complementare della distribuzione del perossido di idrogeno, ovvero l'indagine di distribuzione dello ione superossido. I risultati ottenuti hanno dimostrato come questa specie reattiva, in modo opposto al H_2O_2 , l' O_2^- si localizza principalmente nella zona di divisione andando a diminuire nella zona di allungamento. Nella zona di transizione vi è una notevole diminuzione del colore. In ultima analisi, ciò che è mancato nel mio studio e che sarebbe interessante mostrare è la stessa analisi condotta nella varietà di Baldo.

In ultima analisi, ho condotto un'analisi molecolare del profilo di espressione di tre geni direttamente coinvolti nella regolazione ormonale, la quale è protagonista principale dello sviluppo e crescita della radice. L'intenzione è quella di saggiare la presenza di ABA e l'induzione di geni di resistenza agli stress abiotici. L'ormone ABA potrebbe essere direttamente coinvolto nella regolazione dell'omeostasi dei ROS e della crescita della radice sotto stress salino. In riferimento a ciò, ci sono dei dati a supporto di questa teoria nel modello di pianta *Arabidopsis* (Yang et al.,

2014). I risultati ottenuti sono sicuramente preliminari poiché presentano un errore standard troppo alto per essere considerati validi.

In conclusione, la caratterizzazione del modello della distribuzione dei ROS in concomitanza con l'analisi molecolare dei geni coinvolti nella distribuzione ormonale è di particolare interesse per comprendere la crescita della radice e la sua plasticità durante l'acclimatazione allo stress salino

7. Bibliografia

Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signaling transduction. *Annual review of plant biology*, 55, 373

Ashraf, M., Harris, P.J.C. Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica* 51, 163–190 (2013)

Bureau, C., Lanau, N., Ingouff, M., Hassan, B., Meunier, A. C., Divol, F., ... & Périn, C. (2018). A protocol combining multiphoton microscopy and propidium iodide for deep 3D root meristem imaging in rice: application for the screening and identification of tissue-specific enhancer trap lines. *Plant methods*, 14(1), 1-9.

Buti, M., Baldoni, E., Formentin, E., Milc, J., Frugis, G., Lo Schiavo, F., ... & Francia, E. (2019). A meta-analysis of comparative transcriptomic data reveals a set of key genes involved in the tolerance to abiotic stresses in rice. *International journal of molecular sciences*, 20(22), 5662.

Carillo, P., Annunziata, M. G., Pontecorvo, G., Fuggi, A., & Woodrow, P. (2011). Salinity stress and salt tolerance. *Abiotic stress in plants-mechanisms and adaptations*, 1, 21-38.

Chang, J., Cheong, B. E., Natera, S., & Roessner, U. (2019). Morphological and metabolic responses to salt stress of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars which differ in salinity tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 144, 427-435.

Coudert, Y., Périn, C., Courtois, B., Khong, N. G., & Gantet, P. (2010). Genetic control of root development in rice, the model cereal. *Trends in plant science*, 15(4), 219-226.

Deinlein, U., Stephan, A. B., Horie, T., Luo, W., Xu, G., & Schroeder, J. I. (2014). Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends in plant science*, 19(6), 371-379.

Dubrovsky, J. G., & Ivanov, V. B. (2021). The quiescent centre of the root apical meristem: conceptual developments from Clowes to modern times. *Journal of Experimental Botany*, 72(19), 6687-6707.

Eljebbawi, A., Guerrero, Y. D. C. R., Dunand, C., & Estevez, J. M. (2021). Highlighting reactive oxygen species as multitaskers in root development. *Iscience*, 24(1), 101978.

Formentin, E., Barizza, E., Stevanato, P., Falda, M., Massa, F., Tarkowskà, D., ... & Lo Schiavo, F. (2018). Fast regulation of hormone metabolism contributes to salt tolerance in rice (*Oryza sativa* spp. Japonica, L.) by inducing specific morpho-physiological responses. *Plants*, 7(3), 75.

Formentin, E., Sudiro, C., Perin, G., Riccadonna, S., Barizza, E., Baldoni, E., ... & Lo Schiavo, F. (2018). Transcriptome and cell physiological analyses in different rice cultivars provide new insights into adaptive and salinity stress responses. *Frontiers in plant science*, 9, 204.

Galinha, C., Hofhuis, H., Luijten, M., Willemsen, V., Blilou, I., Heidstra, R., & Scheres, B. (2007). PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature*, 449(7165), 1053-1057

Gechev, T. S., & Hille, J. (2005). Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *The Journal of cell biology*, 168(1), 17-20.

Hanin, M., Ebel, C., Ngom, M., Laplaze, L., & Masmoudi, K. (2016). New insights on plant salt tolerance mechanisms and their potential use for breeding. *Frontiers in plant science*, 7, 1787.

Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Nahar, K., & Biswas, J. K. (Eds.). (2018). *Advances in rice research for abiotic stress tolerance*. Woodhead Publishing.

Horie, T., Karahara, I., & Katsuhara, M. (2012). Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: An overview with the central focus on rice plants. *Rice*, 5(1), 1-18.

Imoto, A., Yamada, M., Sakamoto, T., Okuyama, A., Ishida, T., Sawa, S., & Aida, M. (2021). A ClearSee-based clearing protocol for 3D visualization of Arabidopsis thaliana embryos. *Plants*, 10(2), 190.

Islam, F., Wang, J., Farooq, M. A., Khan, M. S., Xu, L., Zhu, J., ... & Zhou, W. (2018). Potential impact of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. *Environment international*, *111*, 332-351.

Islam, F., Wang, J., Farooq, M. A., Yang, C., Jan, M., Mwamba, T. M., ... & Zhou, W. (2019). Rice responses and tolerance to salt stress: deciphering the physiological and molecular mechanisms of salinity adaptation. In *Advances in rice research for abiotic stress tolerance* (pp. 791-819).

Javvaji, P. K., Dhali, A., Francis, J. R., Kolte, A. P., Mech, A., Roy, S. C., ... & Bhatta, R. (2020). An efficient nitroblue tetrazolium staining and bright-field microscopy based method for detecting and quantifying intracellular reactive oxygen species in oocytes, cumulus cells and embryos. *Frontiers in cell and developmental biology*, *8*, 764.

Kirschner, G. K., Stahl, Y., Von Korff, M., & Simon, R. (2017). Unique and conserved features of the barley root meristem. *Frontiers in plant science*, *8*, 1240

Kong, X., Liu, G., Liu, J., & Ding, Z. (2018). The root transition zone: a hot spot for signal crosstalk. *Trends in Plant Science*, *23*(5), 403-409.

Kurihara, D., Mizuta, Y., Sato, Y., & Higashiyama, T. (2015). ClearSee: a rapid optical clearing reagent for whole-plant fluorescence imaging. *Development*, *142*(23), 4168-4179.

Li, J., Zhao, Y., Chu, H., Wang, L., Fu, Y., Liu, P., ... & Xu, J. (2015). SHOEBOX modulates root meristem size in rice through dose-dependent effects of gibberellins on cell elongation and proliferation. *PLoS Genetics*, *11*(8), e1005464.

Macho, A. P., Boutrot, F., Rathjen, J. P., & Zipfel, C. (2012). Aspartate oxidase plays an important role in Arabidopsis stomatal immunity. *Plant physiology*, *159*(4), 1845-1856.

Maeda, H. (2008). Which are you watching, an individual reactive oxygen species or total oxidative stress?. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1130*(1), 149-156.

- Meng, F., Xiang, D., Zhu, J., Li, Y., & Mao, C. (2019). Molecular mechanisms of root development in rice. *Rice*, 12(1), 1-10.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual review of plant biology*, 59, 651.
- Nair, K. P. (2019). Utilizing crop wild relatives to combat global warming. *Advances in Agronomy*, 153, 175-258.
- Ni, J., Shen, Y., Zhang, Y., & Wu, P. (2014). Definition and stabilisation of the quiescent centre in rice roots. *Plant Biology*, 16(5), 1014-1019.
- Nian, L., Zhang, X., Yi, X., Liu, X., Yang, Y., Li, X., ... & Zhu, X. (2021). Genome-wide identification of ABA receptor PYL/RCAR gene family and their response to cold stress in *Medicago sativa* L. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27(9), 1979-1995.
- 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(6), 4056-4075.
- Ray DK, Mueller ND, West PC, Foley JA (2013) Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. *PLOS ONE* 8(6): Muthayya, S., Sugimoto, J.D., Montgomery, S. and Maberly, G.F. (2014), An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1324: 7-14.
- Ruddiman, W. F., Guo, Z., Zhou, X., Wu, H., & Yu, Y. (2008). Early rice farming and anomalous methane trends. *Quaternary Science Reviews*, 27(13-14), 1291-1295.
- Salvi, E., Rutten, J. P., Di Mambro, R., Polverari, L., Licursi, V., Negri, R., ... & Ten Tusscher, K. (2020). A self-organized PLT/Auxin/ARR-B network controls the dynamics of root zonation development in *Arabidopsis thaliana*. *Developmental Cell*, 53(4), 431-443.
- Savenije, H. H. (2005). Salinity and tides in alluvial estuaries. Gulf Professional Publishing.

Schmidt, R., Mieulet, D., Hubberten, H. M., Obata, T., Hoefgen, R., Fernie, A. R., ... & Mueller-Roeber, B. (2013). SALT-RESPONSIVE ERF1 regulates reactive oxygen species-dependent signaling during the initial response to salt stress in rice. *The Plant Cell*, 25(6), 2115-2131.

Shabala, S. and Munns, R. (2017) 'Salinity stress: physiological constraints and adaptive mechanisms.', CABI Books. CABI International.

Strotmann, V. I., & Stahl, Y. (2021). At the root of quiescence: function and regulation of the quiescent center. *Journal of Experimental Botany*, 72(19), 6716-6726.

Svolacchia, N., Salvi, E., & Sabatini, S. (2020). Arabidopsis primary root growth: let it grow, can't hold it back anymore!. *Current Opinion in Plant Biology*, 57, 133-141.

Torres, M. A., & Dangl, J. L. (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current opinion in plant biology*, 8(4), 397-403.

Wang, R., He, F., Ning, Y., & Wang, G. L. (2020). Fine-tuning of RBOH-mediated ROS signaling in plant immunity. *Trends in plant science*, 25(11), 1060-1062.

Wang, Y., Huan, Q., Li, K., & Qian, W. (2021). Single-cell transcriptome atlas of the leaf and root of rice seedlings. *Journal of Genetics and Genomics*, 48(10), 881-898.

Warner, C. A., Biedrzycki, M. L., Jacobs, S. S., Wisser, R. J., Caplan, J. L., & Sherrier, D. J. (2014). An optical clearing technique for plant tissues allowing deep imaging and compatible with fluorescence microscopy. *Plant physiology*, 166(4), 1684-1687.

Yamada, M., Han, X., & Benfey, P. N. (2020). RGF1 controls root meristem size through ROS signalling. *Nature*, 577(7788), 85-88.

Sitografia:

http://www.enterisi.it/servizi/notizie/notizie_homepage.aspx

<http://www.fao.org/home/en/>

<http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>