

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia (DiBio)

Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Industriali



**Caratterizzazione del ruolo di alcuni membri della
famiglia *GH3* di riso (*Oryza sativa*, L.) nello sviluppo della
radice primaria**

Relatore: Prof.ssa Elide Formentin

Dipartimento di Biologia (DiBio)

Controrelatore: Prof. Alboresi Alessandro

Dipartimento di Biologia (DiBio)

Laureando: Lo Scavo Matteo

Anno Accademico 2021/2022

INDICE

1.	Abstract	Pag. 1
2.	Introduzione	Pag. 3
2.1	Erosione del terreno e sicurezza alimentare	Pag. 3
2.2	Il riso e la sua importanza	Pag. 5
2.3	Salinità del terreno	Pag. 6
2.3.1	Stress salino e danni alle piante	Pag. 8
2.4	Risposta allo stress salino in <i>O. sativa</i>	Pag. 10
2.5	L'auxina e lo sviluppo della radice	Pag. 13
2.6	La famiglia <i>GH3</i>	Pag. 14
2.7	L'uso di biotecnologie per sopperire al problema	Pag. 17
3.	Scopo della tesi	Pag. 19
4.	Materiali e metodi	Pag. 20
4.1	Protocollo di sterilizzazione e germinazione dei semi di riso	Pag. 20
4.2	Protocollo di sterilizzazione e germinazione dei semi <i>A. thaliana</i>	Pag. 20
4.3	Protocollo per l'amplificazione dei semi <i>A. thaliana</i>	Pag. 21
4.4	Protocollo per la selezione di <i>A. thaliana</i> trasformata	Pag. 21
4.5	Protocollo per il confronto di <i>A. thaliana</i> WT e <i>gh3.17</i>	Pag. 21
4.6	Estrazione dell'RNA e sintesi della prima elica di cDNA	Pag. 22
4.7	Analisi del profilo di espressione dei geni <i>OsGH3.9</i> , <i>OsGH3.11</i> e <i>OsGH3.8</i>	Pag. 22
4.8	Primers usati per la creazione del vettore pGRHYG	Pag. 23
4.9	Trasformazione di <i>E. coli</i> e <i>A. tumefaciens</i>	Pag. 23
4.10	Trasformazione di <i>A. thaliana</i>	Pag. 24
4.11	Statistica	Pag. 25
5.	Risultati	Pag. 26
5.1	Effetto di sale e citochinine sullo sviluppo della radice primaria in <i>O. sativa</i>	Pag. 26
5.2	Effetto delle citochinine sullo sviluppo della radice	

	in piante di <i>A. thaliana</i> WT e <i>gh3.17</i>	Pag. 28
5.3	Analisi del profilo di espressione di geni candidati	
5.4	Design e creazione dei costrutti per la trasformazione di <i>Arabidopsis</i>	Pag. 31 Pag. 33
5.5	Sovraespressione e complementazione in <i>A. thaliana</i>	Pag. 37
6.	Discussione	Pag. 38
7.	Sitografia e Bibliografia	Pag. 41

1. Abstract

Durante questo progetto di tesi si è cercato di capire l'effetto delle citochinine nelle varietà di riso italiane Baldo e Vialone Nano, che presentano comportamento opposto, rispettivamente tollerante e sensibile, allo stress salino, e di identificare possibili geni candidati che possano aumentare la tolleranza allo stress salino, andando poi ad osservare il loro effetto sull'organismo modello *A. thaliana*.

All'inizio si è cercato di capire l'effetto di citochinine (trans-zeatina riboside, tRZ) e NaCl sulla crescita delle due varietà di riso, osservando come effettivamente tRZ diminuisca la lunghezza media della radice, mentre il sale influenza solo Vialone Nano.

Dopo questo risultato, ci si è concentrati sui geni che sembrano regolare l'accrescimento della radice andando a legare in maniera irreversibile l'auxina: la famiglia di *GH3*. Per fare questo si è osservato il fenotipo di crescita di piante WT e *gh3.17* o *gh3.5* di *A. thaliana*. Si è paragonata la lunghezza della radice in condizioni normali ed esposte a CKs, osservando come la pianta WT risulti più corta, mentre le mutanti risultino insensibili alla condizione.

Dopo questa conferma, dove sia riso che pianta modello rispondono in maniera uguale, si è osservato il profilo di espressione genica dei geni candidati: *OsGH3.8*, *OsGH3.9* e *OsGH3.11*, da piante di Vialone Nano in condizioni di controllo, NaCl e CKs. Dai risultati si vede che il sale diminuisce la produzione dei geni *OsGH3.9* e *OsGH3.11* mentre la tRZ sembra ridurre solo *OsGH3.9*. *OsGH3.8* invece non sembra essere influenzato, ma dati gli errori alti sarebbe da eseguire nuovamente l'analisi per ottenere risultati più solidi. Questi risultati sono in contrasto con la letteratura trovata, possono essere spiegati con fenomeni di fluttuazione nelle tempistiche delle CKs o ai ritmi circadiani della pianta.

Infine, si sono trasformate le piante di *Arabidopsis* WT e *gh3.17* con il vettore pGRHYG-35S-*OsGH3.9*-YFP creato per la selezione in batteri e piante. Le piante sono tuttora in fase di selezione. Al termine, avendo ottenuto i semi T2 omozigoti, si potrà osservare il fenotipo di sovraespressione e di complementazione.

Per concludere, questo lavoro di tesi ha cercato di comprendere il nesso che è presente tra le CKs e la risposta della pianta, trovando che è presente una similarità tra riso e *Arabidopsis*. Inoltre, l'analisi di espressione dei geni candidati della famiglia di *GH3* apre alla possibilità di capire il loro ruolo nell'allungamento

della radice; infatti, nonostante la down regolazione non prevista, nuovi studi possono essere svolti per identificare le anomalie e trovare un nuovo meccanismo che riesca a spiegare anche queste incongruenze, Infine, la complementazione e sovraespressione per ottenere piante mutanti possono porre le basi per un'analisi dell'effetto dei geni selezionati sulla resistenza allo stress salino e sul meccanismo d'azione.

2. Introduzione

2.1 Erosione del terreno e sicurezza alimentare

Il terreno che diamo molto per scontato si sta consumando sempre di più. Il termine “consumare” in questo caso non si riferisce a una semplice sparizione del suolo, ma a una sua graduale perdita di capacità di effettuare tutte quelle sue funzioni che normalmente dovrebbe eseguire. Alcune delle sue azioni possono essere scontate e visibili a tutti quanti come la produzione alimentare e sostegno per le infrastrutture create dall’uomo. Inoltre, può servire anche a purificare l’acqua e assorbire e rilasciare gas nell’atmosfera.

Tutte queste funzioni sono compromesse quando il terreno viene sfruttato o consumato più del dovuto senza lasciargli il tempo di rigenerarsi e permettergli così di eseguire le azioni fondamentali per il nostro benessere (Carlos et al 2020).

Il cambiamento climatico e l’aumento della popolazione stanno portando questo fenomeno ad aumentare nel tempo e a peggiorare una situazione che si sta aggravando sempre di più. Durante il 2012 c’è stato un incremento generale dell’erosione del terreno pari al 2.5 %.

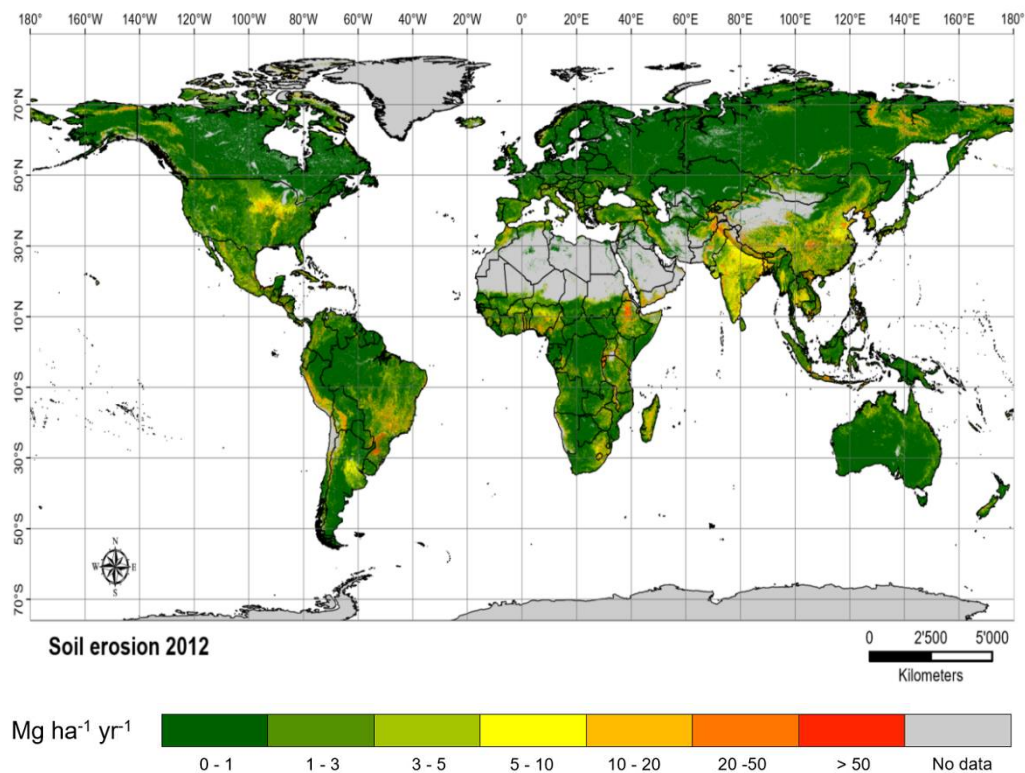


Figura 2.1: Erosione del suolo durante il 2012. Fonte: Global soil erosion, ESDAC.

Per quanto piccolo, un aumento del genere continuativo negli anni si trasforma in un cambiamento significativo. Difatti un altro modo per rappresentare questa perdita è descriverla con la quantità di terreno e non la percentuale rispetto al totale. In questo caso il 2.5 % si trasforma in 35.9 Pg (1×10^{15} g) persi all'anno (<https://esdac.jrc.ec.europa.eu>). Dal punto di vista economico si sta parlando di perdite nel giro dei miliardi di dollari. E' stato stimato che la perdita di 23–42 Mt di N e 15–26 Mt di P da suolo agricolo all'anno costa agli agricoltori fino a 60 miliardi per l'azoto e 140 per il fosforo all'anno.

Inoltre è stato osservato come una perdita di 10 cm di suolo arabile per via dell'erosione possa comportare una perdita del 4 % nella resa. Questo è dovuto a una minore capacità del terreno a trattenere l'acqua creando così un ambiente meno favorevole alla pianta.

Questo fenomeno, l'erosione del terreno, unito all'aumento della popolazione mondiale presenta un rischio per la sicurezza alimentare dei prossimi anni. Difatti, con il numero di persone in costante rialzo, alcuni studi ipotizzano un numero di esseri umani pari a 9.1 miliardi per il 2050 (cioè il 15 % in più rispetto al numero attuale di 7,9) (Ray et al., 2013).

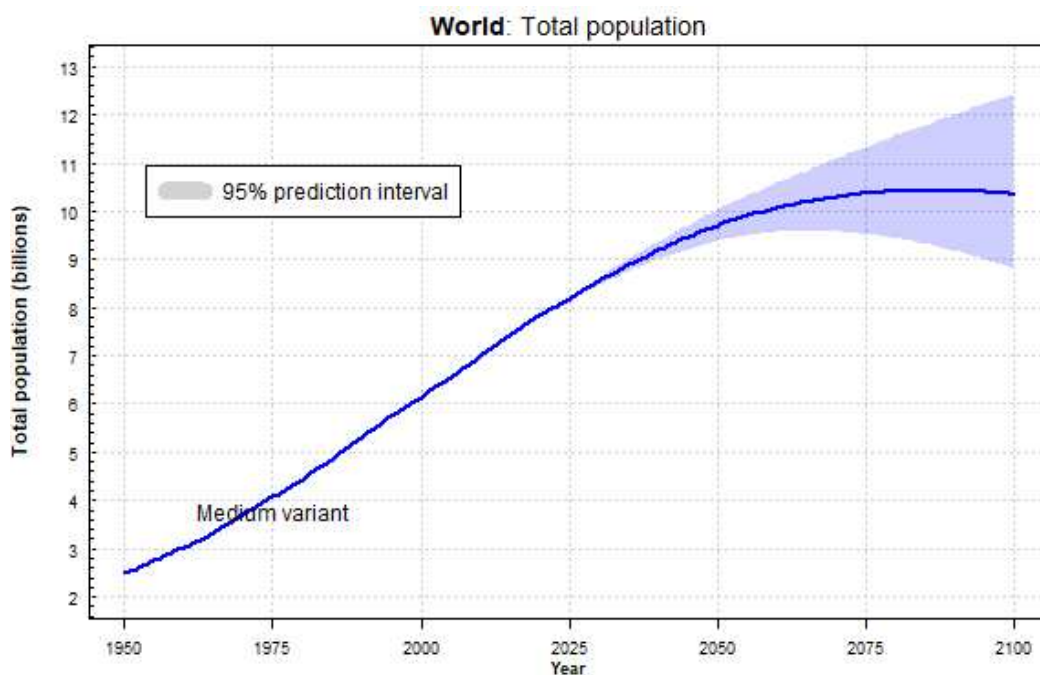


Figura 2.2: Aumento della popolazione nel periodo 1950-2100. Fonte: United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division

Volendo sfamare questa popolazione con i consumi attuali comporterebbe un aumento a livello mondiale dei vari alimenti non indifferente e probabilmente non sostenibile. Il settore alimentare nel suo insieme dovrebbe produrre il 70 % in più di quanto fa già oggi, ma al suo interno ci sono alcune differenze. I cereali dovrebbero passare da 2.1 miliardi di tonnellate prodotte a 3, con un incremento quasi del 100 %, mentre la carne dovrebbe aumentare la produzione di 200 milioni di tonnellate (pari quasi a un +75 %, rispetto a un consumo odierno) (Peter M. K., 2019). Inoltre, secondo varie stime, questo aumento, verrebbe a doversi verificare soprattutto in terreni già sviluppati in gran parte, mentre solo una piccola percentuale provrebbe dalla creazione di nuovi campi. Le statistiche affermano che l'80 % sarebbe da attribuire a una resa maggiore delle coltivazioni e solo il 20 % dall'espansione della terra arabile (per il riso, ad esempio, ci si aspetta che il 93 % dell'aumento della sua produzione sia dovuto a una maggiore resa). Difatti è osservabile da alcuni dati come la percentuale di terra arata non è più cresciuta di pari passo con la popolazione. Fino al 1950 la percentuale di terreno usato per l'agricoltura era del 9.2 %, con una popolazione di 2.5 miliardi. Nel 2016 abbiamo toccato i 7.3 miliardi di persone con un aumento di terreno coltivabile pari al 3 % (arrivando così al 12.2 % sul totale di terreno disponibile, non coperti da ghiacci). Nello stesso arco temporale però la produzione è quasi raddoppiata, passando da 15.1 milioni di tonnellate nel 1961 a 31.2 nel 2014. Questo è dovuto soprattutto a una maggiore resa produttiva data dalla 'Rivoluzione verde' causata da vari fattori come l'uso di pesticidi, coltivazioni migliori dal punto di vista genetico (più resistenti e con una maggiore resa) e fertilizzanti. Nonostante questo, sapendo che la sola produzione di riso, soia, grano e mais, che coprono i due terzi del fabbisogno calorico mondiale derivante da prodotti vegetali, è stato stimato che l'attuale aumento annuale delle rese non sarà in grado di assecondare l'aumento demografico già entro il 2050 (www.fao.org).

2.2 Il riso e la sua importanza

Il riso, pianta per cui è necessaria molta acqua e condizioni ottimali di crescita, è molto suscettibile rispetto allo stress salino. Fa parte della famiglia delle Poacee, di cui esistono 23 specie. Solo due specie, *Oryza sativa L.* e *Oryza glaberrima L.*,

presentano un interesse agricolo per l'essere umano. La prima è la specie più sfruttata, ed è suddivisa in due sottospecie: *indica*, usata principalmente in climi temperati, e *japonica*, più coltivata nelle zone tropicali.

Anno	Riso	Grano	Cereali
	Produzione in tonnellate		
2018/19	508,2	731,4	2.644,1
2019/20	503,8	759,7	2.713,6
2020/21	518,1	775,0	2.776,6
2021/22	525,1	779,3	2.814,3
2022/23	512,6	783,8	2.763,5

Tabella 2.1: Produzione annua di riso, grano e cereali in tonnellate. Fonte: FAO, World Food Situation, 2022.

È uno degli alimenti più consumati al mondo e permette di sfamare miliardi di persone, soprattutto in Asia, principalmente nel sud-est asiatico, dove è un cibo fondamentale per la dieta locale. Il ciclo vitale della pianta del riso si divide in due fasi distinte: vegetativa e riproduttiva. La prima comprende le fasi di germinazione, sviluppo della piantina e accrescimento. La seconda continua con formazione della spiga e termina con la maturazione dei semi. Il periodo di crescita può variare tra i 3 e i 6 mesi a seconda delle condizioni e dell'ambiente in cui si trova. Presenta un genoma diploide molto compatto di approssimativamente 500 Mbp (n=12) (<https://plants.ensembl.org>). Alcune sue specie (soprattutto le commercialmente interessanti e sfruttate) sono sensibili al sale, che ne provoca la morte o una minore resa produttiva (www.fao.org).

2.3 Salinità del terreno

Un problema collegato all'erosione del terreno, alla sicurezza alimentare nel mondo e alla coltivazione di riso è l'aumento della salinità nei terreni e il loro incremento sul totale di terra arabile. Questo fenomeno causa un abbassamento del potenziale idrico del suolo causando così alla pianta una situazione di stress dato che ricavare l'acqua dal terreno risulterà più complicato. Il suolo è definito salino se presenta una concentrazione di NaCl pari a 40 mM, ovvero avere valori

di conduttività fra i 2 e i 4 dS/m (Munns e Tester, 2008). E' possibile che siano presenti altri composti diversi dal sale da cucina che causano il fenomeno, ma questo rimane il più comune.

Questa problematica è molto studiata e osservata poiché pone la produzione di vari alimenti a rischio. Si è calcolato che si perdono fino a 1.5 milioni di ettari di terreno arabile all'anno a livello globale per colpa della salinità. Difatti, la perdita di 10 cm di terreno, in profondità, può causare una perdita di resa fino al 4 %. Questo succede poiché il terreno ha più difficoltà a trattenere l'acqua e la percentuale di sale aumenta.

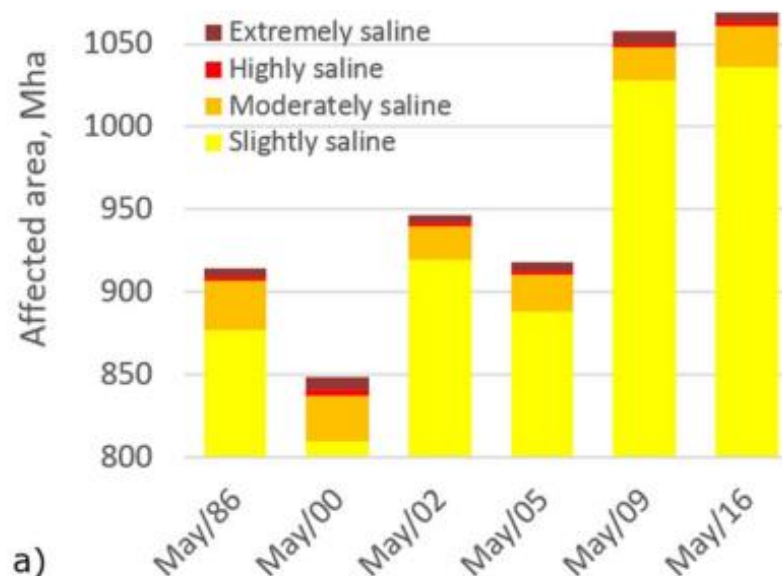


Figura 2.3: Area di terreno in milioni di ettari affetta da diversi livelli di salinità. Fonte: Luis de Sousa et al, 2019. Global mapping of soil salinity change.

Oltre a questo deficit, i terreni influenzati dal fenomeno possono avere una diminuzione di produttività variabile (dal tipo di coltivazione, dal livello di degradazione, ecc.) dal 15 & fino al 69 % di un terreno sano. Questo porta a perdite enormi a livello economico, si parla di decine di miliardi di dollari, alcune stime dicono oltre i 27 (uno studio riporta come in Australia si perdano 1.5 miliardi di dollari in sola mancata produzione di grano).

Il fenomeno può avvenire naturalmente o essere indotto. Eventi spontanei di salinizzazione di terreno capitano spesso vicino al mare o giacimenti di sali

nell'entroterra. Mareggiate, venti improvvisi e forti possono portare l'acqua marina sui terreni disposti per l'agricoltura. Terremoti, piogge torrenziali e cambiamenti di percorsi di fiumi possono portare a contatto il sale in giacimenti sotterranei con l'acqua dolce che gli scioglierà rendendola salata. D'altro canto, i terreni possono essere resi artificialmente più salati se durante periodi di siccità si usano le acque vicino all'estuario di un fiume per irrigare i terreni. In questo caso è possibile che l'acqua marina risalga il corso del fiume (o attraverso le falde riesca a raggiungere l'entroterra) e venga poi utilizzata per l'agricoltura. Inoltre, rimozione di piante a lunga radice, utilizzo di acque di scarsa qualità, un drenaggio non efficiente sono tutti fattori antropici per l'aumento di salinità (Konstantin et al, 2019).

2.3.1 Stress salino e danni alle piante

Nelle piante lo stress è una condizione che affligge in maniera negativa la crescita, lo sviluppo o la produttività della pianta. Gli stress possono essere classificati in due grandi classi: stress biotici, causati da altri organismi come virus, batteri, funghi, e stress abiotici, derivati da condizioni ambientali avverse.

In quest'ultimo gruppo, le più frequenti in gradi di affliggere maggiormente la resa delle coltivazioni per l'agricoltura sono la siccità, la salinità del terreno, le alte e basse temperature, la parziale o totale assenza di ossigeno e la scarsità di nutrienti.

Per resistere a queste problematiche le piante hanno sviluppato vari meccanismi di difesa che possono essere raggruppati in due gruppi principali: l'evasione e la tolleranza. Il primo sistema permette all'organismo di non essere esposto allo stress; nella specie vengono selezionati dei tratti molecolari o fisiologici che rappresentano un adattamento evolutivo per la sopravvivenza in un dato ambiente. Il secondo sistema permette invece di sviluppare caratteristiche che permettono di sopportare la condizione avversa; un esempio è il meccanismo di acclimatazione, una risposta adattativa della pianta che consiste nella modifica della propria omeostasi per far fronte allo stimolo avverso.

Le piante sono organismi sessili, ovvero incapaci di muoversi, perciò devono essere in grado, prima di tutto, di percepire i cambiamenti nell'ambiente che le circonda in modo da poter rispondere in maniera efficace e repentina. Reception e capito lo

stimolo, la capacità con cui la pianta può gestirlo dipende da vari fattori. Importanti sono le caratteristiche dello stress, come intensità e durata, e l'eventuale sovrapporsi di stress multipli. La sensibilità ad uno stimolo varia notevolmente anche in base alla specie, al genotipo, allo stadio di sviluppo e al tessuto o organo a cui si fa riferimento (Olayinka et al, 2021).

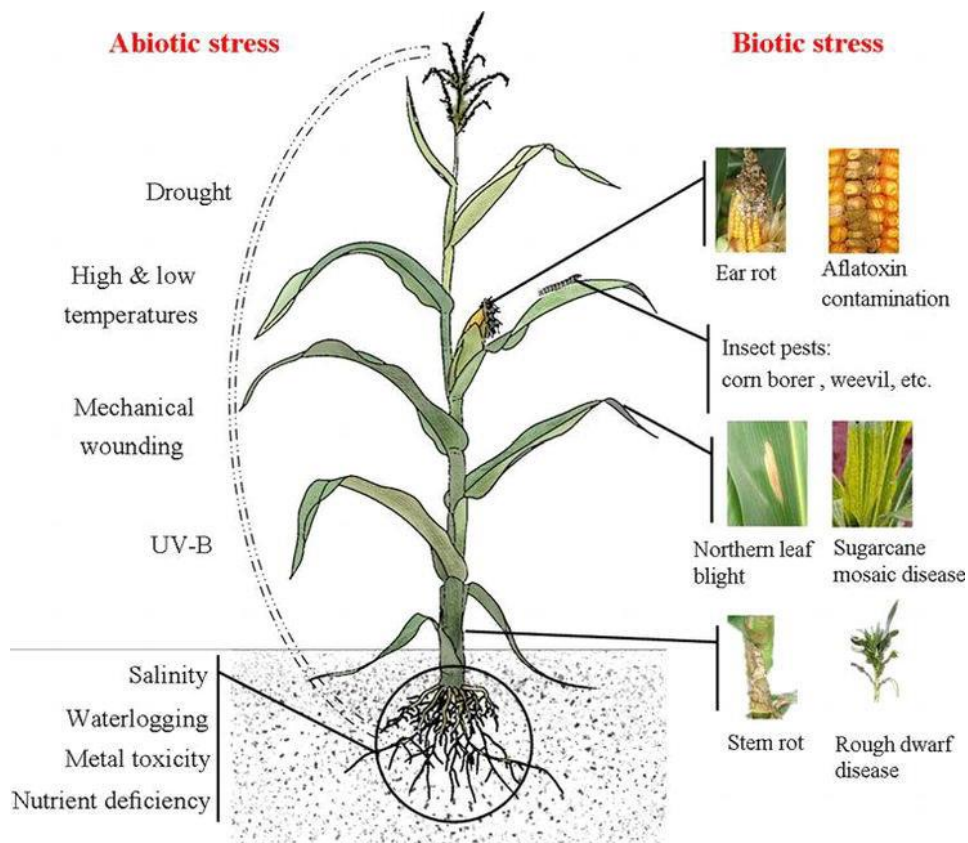


Figura 2.4: Elenco di possibili stress abiotici e biotici che affliggono le piante. Fonte: Current Trends in Wheat Research. Libro di Mahmood-ur-Rahman Ansari (2021)

Lo stress salino in particolare si manifesta con due fenomeni diversi, separati sia dal punto di vista temporale, che in termini di effetti e risposta. Il primo fenomeno causa una tossicità che è data dallo stress osmotico, durante il quale l'aumento della concentrazione di ioni nell'ambiente extracellulare provoca una ridotta capacità delle radici di assorbire acqua dal terreno, con conseguente disidratazione e perdita di funzionamento e danno alla pianta (Munns et al. 1995). Un secondo fenomeno di tossicità, più tardivo, è dato invece dallo stress ionico, ossia

dall'accumulo di ioni sodio all'interno delle cellule, che portano progressivamente alla morte della pianta. L'aumento di questi ioni all'interno delle cellule inibisce la sintesi proteica, provoca deregolazioni metaboliche, e induce danni a livello dei cloroplasti ed altri organelli e la degradazione dei pigmenti fotosintetici (Taiz, L., & Zeiger, E. 2002). In generale, lo stress salino si manifesta con una ridotta o totalmente inibita fioritura e produzione di semi, riduzione della crescita di biomassa, fino ad arrivare alla morte della pianta causando in questa maniera perdite produttive o di resa per gli agricoltori. Difatti un adattamento che la pianta può effettuare, e che riso adotta infatti, è una variazione della trasformazione dei carboidrati. In questo modo la pianta presenta minori riserve di amido. Quest'azione comporta però anche una minore o totale inibizione degli apparati riproduttivi portando una minore produzione di semi, obiettivo commerciale della coltivazione, e una maggiore crescita vegetativa, parte della pianta che non interessa dal punto di vista economico (Zeng e Shannon, 2000).

2.4 Risposta allo stress salino in *O. sativa*

Come detto in precedenza il riso è una pianta sensibile al sale, di conseguenza appartiene alla categoria delle glicofite. Al mondo esistono migliaia di varietà diverse di riso che nel loro insieme costituiscono un bacino di variabilità genetica che permette l'identificazione di particolari caratteri, come la tolleranza allo stress salino. Difatti, uno studio (Formentin et al. 2018) ha notato come le due sottospecie di riso italiano: Vialone Nano e Baldo (piante di importante valore economico in Italia), presentino due risposte a questo stress quasi opposte. Vialone Nano è sensibile al sale, mentre Baldo è tollerante. (Bertazzini et al. 2011).

Le foto della figura 2.5 mostra come una concentrazione di sale nel terreno pari a 100 mM possa influenzare in maniera diversa le due varietà. È facilmente osservabile come la variante tollerante, Baldo, risponda in maniera decisamente migliore rispetto alla variante sensibile, Vialone Nano. Baldo, nonostante non sia cresciuta quanto e rigogliosamente come nel controllo dimostra una vitalità superiore di Vialone Nano. In questo lavoro, viene dimostrato anche che la varietà Baldo riesce a sopravvivere allo stress perché è in grado di allocare il Na⁺ in

foglie più vecchie, preservando le foglie più giovani che quindi mantengono la loro efficienza fotosintetica.

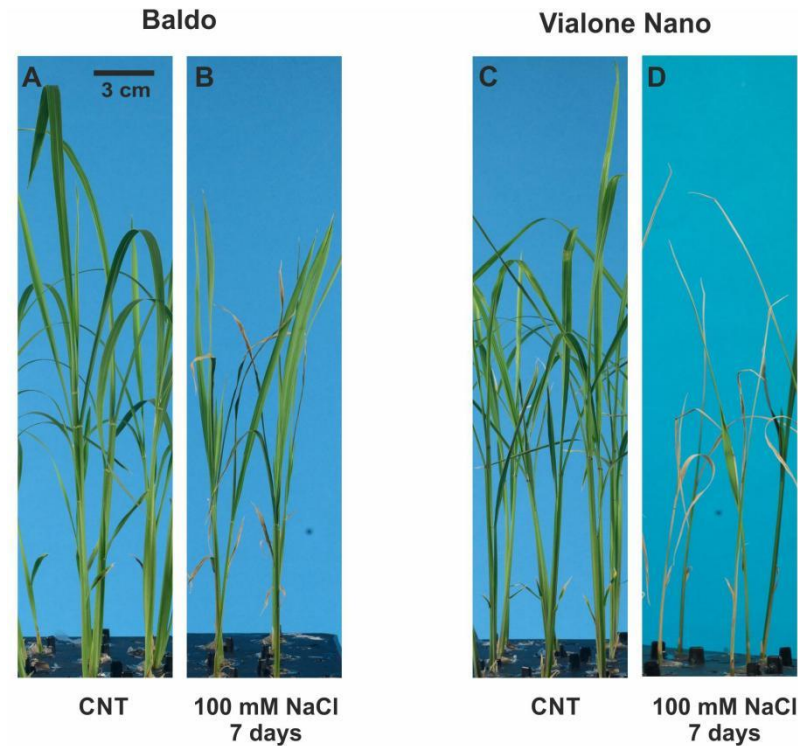


Figura 2.5: Analisi morfo-fisiologica di Baldo e Vialone Nano in condizioni normali e di stress. Fonte: Formentin et al. Transcriptome and Cell Physiological Analyses in Different Rice Cultivars Provide New Insights Into Adaptive and Salinity Stress Responses (2018).

Le maggiori differenze tra le due sottospecie, in risposta alla stress indotto, sono state riscontrate a livello trascrizionale. Entrambe le varianti, come sistema di difesa, attivano o inibiscono diversi geni, quali acquaporine, proteine LEA, annexine e deidrine, caratteristici di una risposta generale allo stress osmotico. La varietà di Vialone Nano ha mostrato però una regolazione differente della trascrizione di geni rispetto a Baldo, andando ad attivare molte più risposte. In particolare, sono stati accertati essere indotti geni coinvolti nell'interazione pianta-patogeno, indicando una risposta non specifica. Per quanto riguarda Baldo, invece, i geni differentemente espressi codificano per proteine più specificamente coinvolte nella risposta allo stress ossidativo o coinvolte nella regolazione della omeostasi ionica.

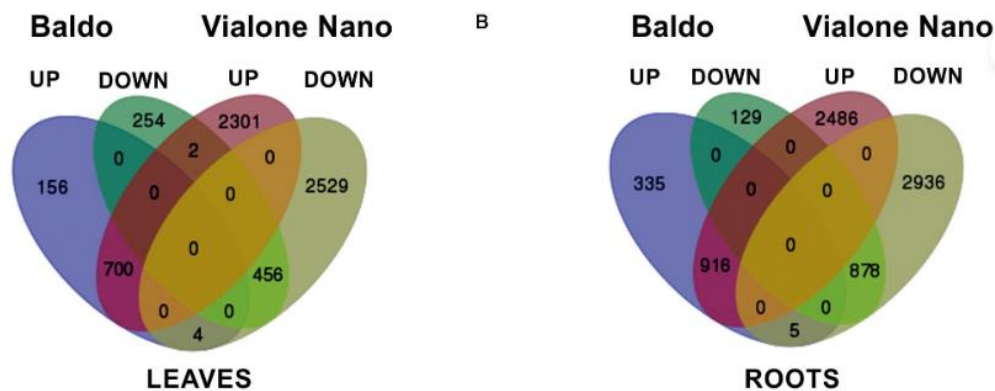


Figura 2.6: Analisi trascrittomiche di foglie e radici dopo 3 giorni di stress salino. Diagrammi di Venn dei geni up e down regolati. Fonte: Formentin et al. Transcriptome and Cell Physiological Analyses in Different Rice Cultivars Provide New Insights Into Adaptive and Salinity Stress Responses (2018).

Oltre a una differenza nella trascrizione di geni fra le due varietà, è presente anche una variazione a livello ormonale. In Baldo, si può notare come nelle foglie lo stress salino induce una diminuzione del rapporto fra acido abscissico (ABA) e citochinine (CKs), che è collegata ad una riduzione dell'apertura dello stoma, che causa una minore capacità di conservare il contenuto idrico durante lo stress. A livello delle radici, invece, sono stati riscontrati differenti rapporti fra ABA e auxina, il cui maggior rappresentante è l'acido indol-3-acetico (IAA) rispetto alla variante di Vialone Nano. Durante lo sviluppo radicale, l'auxina stimola la formazione di radici laterali, mentre l'ABA svolge un ruolo inibitorio. Il rapporto ABA/IAA contribuisce quindi a determinare la morfologia dell'apparato radicale. Alti livelli di ABA sono necessari per rallentare la crescita della radice, ma comunque ha bisogno del signaling di IAA per svolgere questa funzione (Li et al. 2017). La varietà Baldo, tollerante al sale, mostra la peculiarità di mantenere la crescita della radice primaria anche sotto stress, proprio perché è in grado di mantenere un rapporto ABA/IAA ottimale. Questa caratteristica è di fondamentale importanza nella resistenza allo stress idrico e salino perché garantisce alla pianta la possibilità di estendere la radice in cerca di acqua dolce.

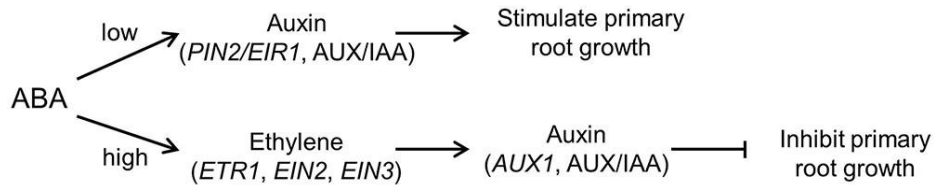


Figura 2.7: Meccanismo di azione di ABA sulla crescita della radice. Fonte: Li et al. The Biphasic Root Growth Response to Abscisic Acid in Arabidopsis Involves Interaction with Ethylene and Auxin Signalling Pathways (2017).

2.5 L'auxina e lo sviluppo della radice

Le auxine sono una classe di fitormoni coinvolti nella morfogenesi della pianta, fenomeno che include: la distensione e divisione cellulare, la differenziazione dei tessuti vascolari, la dominanza apicale, il tropismo della pianta e lo sviluppo di radici laterali e avventizie e degli organi fiorali. Nella pianta di riso questo ormone regola sia la crescita della radice primaria che la formazione delle radici avventizie (Coudert et al., 2010).

L'operato dell'auxina è significativamente correlato alla sua concentrazione, infatti gradienti di concentrazione diversi influenzano diversamente lo sviluppo di nuovi organi. Nella radice ad esempio, auxina in concentrazioni superiori a 10^{-8} M è collegata all'inibizione della crescita delle radici primarie, mentre concentrazioni superiori sono associate alla formazione di radici secondarie. La quantità di acido indolacetico (IAA) attivo in un particolare tessuto è regolata da diversi e specifici processi metabolici, anche se livelli minimi di auxina sono rintracciabili in tutta la pianta (Ljung et al., 2005). I principali responsabili della biosintesi di IAA sono i tessuti in rapida divisione, dei giovani tessuti in crescita, in particolare i meristemi apicali di germogli e radici, semi e le foglie giovani. (Ljung et al., 2005). I processi che possono influenzarne la concentrazione possono includere la sua biosintesi, il trasporto da o verso altre cellule e tessuti e la sua inattivazione mediante coniugazione ad altre molecole, ovvero l'attivazione o l'inattivazione temporanea o permanente, oppure attraverso processi catabolici di smaltimento.

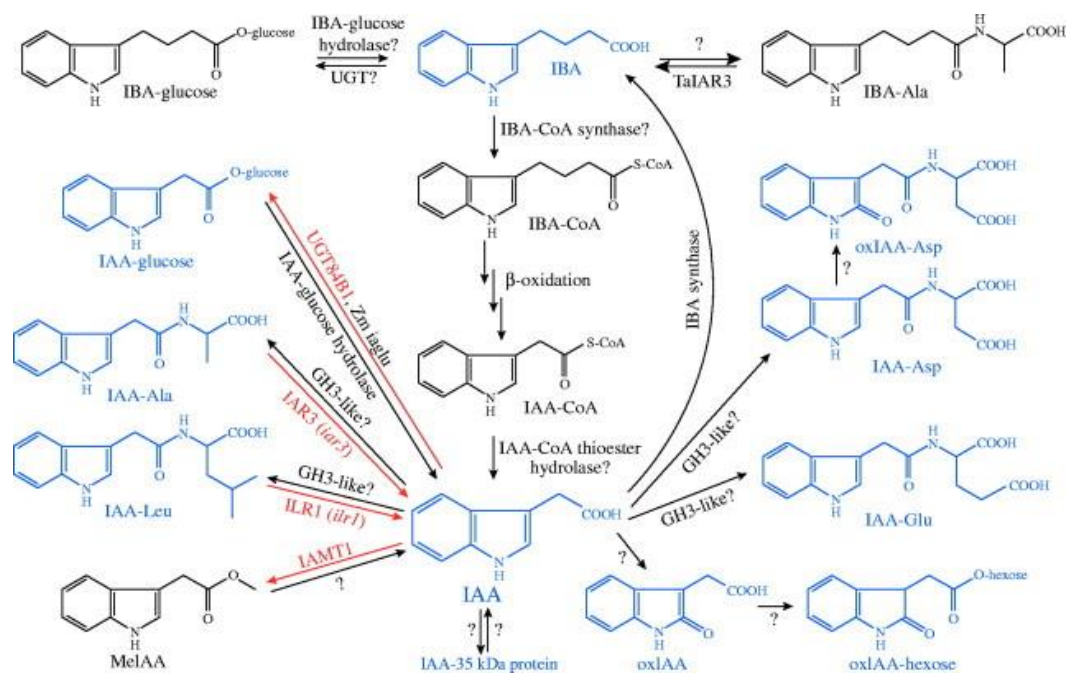


Figura 2.8: Potenziali vie del metabolismo dell'IAA. Fonte: Woodward et al. *Auxin: Regulation, Action, and Interaction* (2005).

L'ormone può essere indirizzato alla degradazione, o venire accumulato per essere reso disponibile successivamente tramite l'idrolisi dei suoi coniugati sulla base delle molecole coniugate, principalmente aminoacidi e zuccheri.

2.6 La famiglia *GH3*

La famiglia *GH3* comprende tutta una serie di geni coinvolti nella coniugazione di ormoni, principalmente dell'auxina, e nell'idrolisi dei coniugati, andando di conseguenza a regolare la concentrazione dell'ormone (Terol et al, 2006).

Le diverse proteine della famiglia *GH3* sono state identificate e raggruppate in tre classi: le proteine del gruppo I sono coinvolte nella sintesi di coniugati con acidi jasmonici e acido salicilico (come *AtGH3.11*), quelle del gruppo II producono complessi con l'IAA e aminoacidi (come *AtGH3.17*), mentre le proteine del gruppo III sono coinvolte nella coniugazione di aminoacidi a benzoato 4-sostituito.

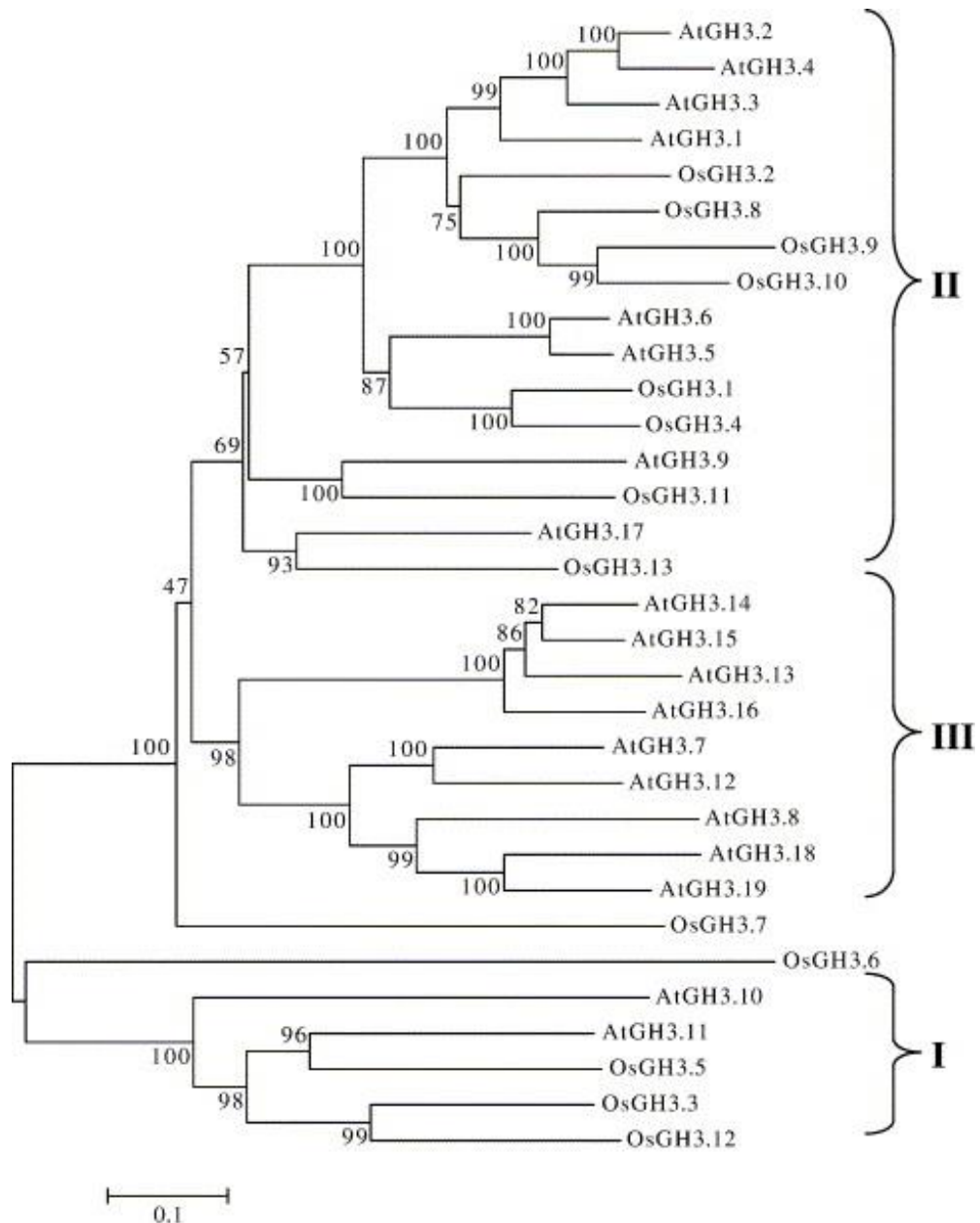


Figura 2.9: Albero filogenetico di *GH3* scoperti in riso e *A. thaliana*. Le proteine organizzate in tre cluster principali, corrispondenti ai gruppi funzionali descritti per *A. thaliana*, in base all'affinità di substrato della loro attività di coniugazione amminoacidica con JA (I), IAA (II) e nessuno di essi (III). Javier et al. 2006.

Il primo gene *GH3* descritto è stato isolato in soia nel 1985 (Hagen e Guilfoyle, 1985). Negli anni a seguire, sono stati identificati svariati membri di questa famiglia in altre specie vegetali, fra cui riso e *A. thaliana* (Mukesh et al, 2006). In quest'ultima sono stati identificati 19 membri, mentre per *O. sativa* ne sono stati scoperti 13, derivanti da eventi di duplicazione genica, e inseriti soltanto nei primi

due gruppi ma non nel terzo., e spesso sono coinvolti nella risposta a stress abiotici.

L'identificazione di questi geni è stata possibile anche grazie alla scoperta di motivi conservati nelle regioni promotrici a monte dei geni sensibili all'auxina. Questi elementi sono stati chiamati AuxRE e presentano la sequenza nucleotidica TGTCTC, o qualche sua variante come TGTCCC o TGTCAC (Chao et al, 2018) Molti geni *GH3* sono chiaramente implicati nella regolazione della statura delle piante, caratteristica agronomica di grande rilevanza, dati i molti studi che affermano questo fenomeno: *AtGH3.11* è stato proposto come un repressore dello sviluppo fotomorfogenico (Hsieh et al., 2000), *AtGH3.6* controlla l'allungamento dell'ipocotile con uno o più partner (Nakazawa et al., 2001).

La correlazione tra la famiglia *GH3* e l'auxina è stata molto studiata in *A. thaliana*; infatti, si conosce anche il meccanismo d'azione del gene *AtGH3.17*.

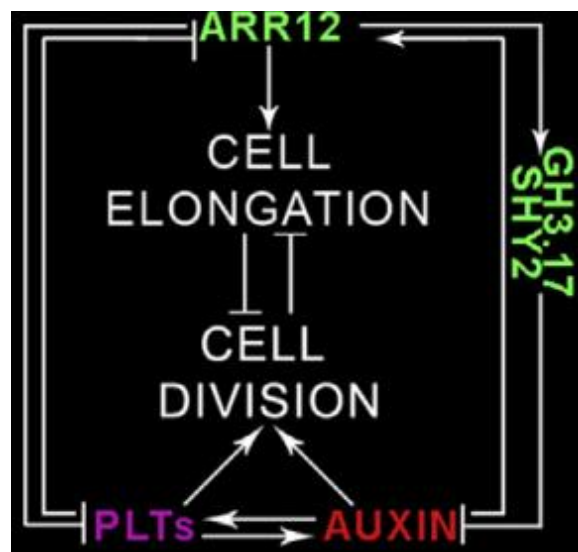


Figura 2.10: Meccanismo d'azione e network dell'auxina e di *GH3.17*. Fonte: Sabatini et al, 2020.

L'auxina può regolare infatti sia la divisione cellulare ma può anche andare a promuovere ARR12, (Arabidopsis Response Regulator 12). Questo fattore di trascrizione a sua volta promuove la trascrizione di *Short Hypocotyl 2 (SHY2)* e *GH3.17* geni coinvolti nel controllo, rispettivamente del trasporto dell'auxina e nella sua coniugazione irreversibile.

Inoltre, isoforme differenti di *GH3* possono essere osservati in parti differenti della pianta, andando così probabilmente ad influenzare la crescita e lo sviluppo in maniera distinta. Questo, infatti, è possibile osservarlo nei grafici della Figura 2.11, viene mostrata l'espressione tessuto specifica dei membri della famiglia *GH3* in riso (Kong et al., 2019).

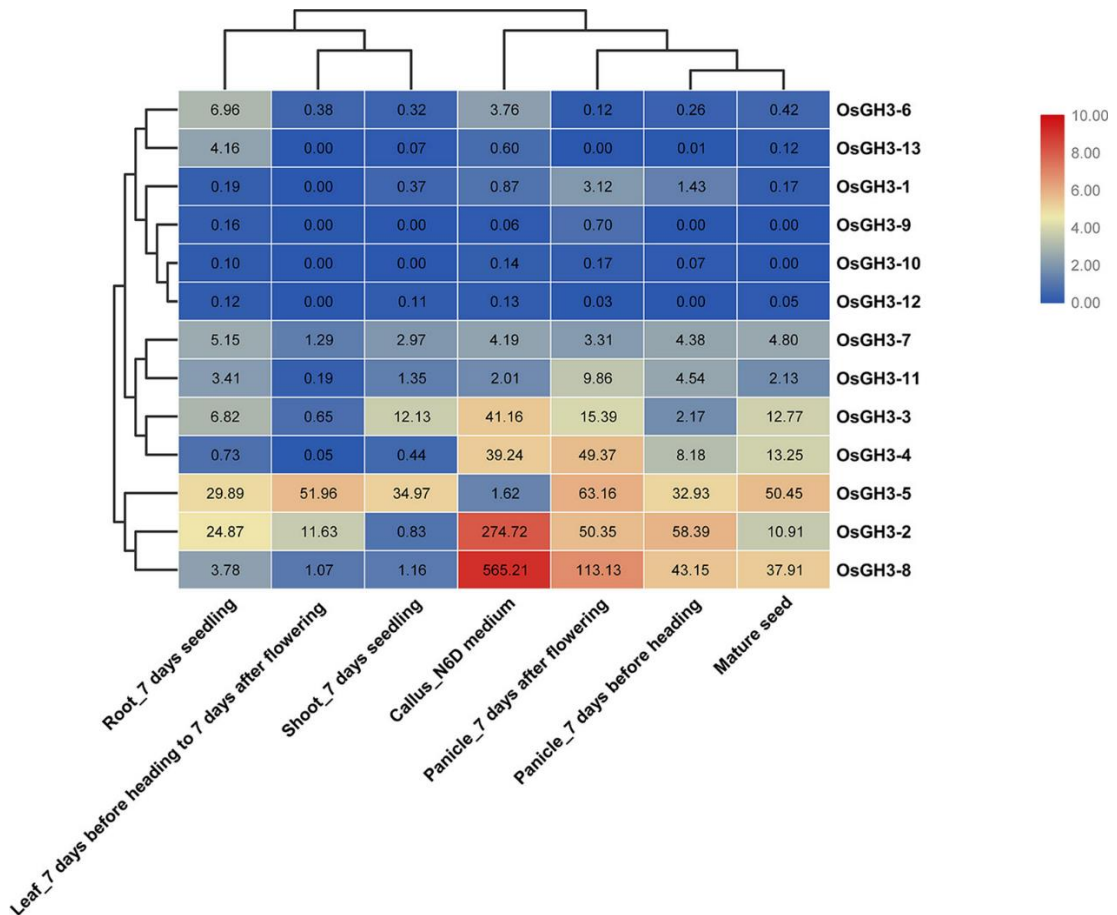


Figura 2.11: Livelli di espressi di mRNA di *O. sativa* in differenti parti della pianta. I valori nella scala dei colori rappresentano \log_2^{FPKM} : rosso/blu indica un livello alto/basso di abbondanza di trascrizioni. Fonte: Kong et al. Comparative Genomic and Transcriptomic Analysis Suggests the Evolutionary Dynamic of *GH3* Genes in Gramineae Crops, (2019).

2.7 L'uso di biotecnologie per sopperire al problema

La 'Rivoluzione verde' iniziata negli anni '60 ha portato un cambiamento radicale nella resa potenziale delle coltivazioni ed è stata fondamentale nell'evitare gravi crisi alimentari nel mondo. Allo stesso tempo, i nuovi sistemi di coltivazione

intensiva hanno promosso una maggiore pressione sui terreni e lo sfruttamento di aree più marginali (Hasan N. et al, 2021). Per modificare le piante e renderle migliori dal punto di vista produttivo, garantendo una maggiore resistenza agli stress a cui sono sottoposte o a parassiti e malattie, sono stati trovati tutta una serie di nuove metodologie. Ognuna di queste nuove tecnologie presenta punti di forza e debolezza, per questo bisogna analizzare in maniera ottimale il problema che si vuole affrontare e optare per la soluzione migliore. Esistono metodi che coinvolgono l'utilizzo di nanoparticelle per l'inserimento di DNA, siRNA e miRNA in foglie e protoplasti, ma hanno una resa bassa, si può usare *A. tumefaciens* per inserire il DNA in radici, germogli, foglie e fiori con una bassa resa di riuscita e anche con l'elettroporazione per l'aggiunta di DNA, siRNA, miRNA e proteine in foglie e protoplasti, ma con una bassa specificità e un possibile danneggiamento dei tessuti.

Una delle tecniche più usate è però la marker-assisted selection, un processo di selezione indiretta in cui una caratteristica di interesse agronomico viene collegata a un marker molecolare (morfologico, biochimico o genetico) che a sua volta viene manifestato con un fenotipo spiccato (produttività, resistenza alle malattie, tolleranza allo stress). Per fare questo una forte correlazione tra i marker e la caratteristica di interesse e una tecnica di analisi che permetta l'analisi di molte piante è necessaria (Hasan N. et al, 2021). Inoltre modelli e algoritmi possono tornare utile nell'identificare correlazione e sviluppare nuovi metodi di selezione per velocizzare le tempistiche e ridurre i costi, la modellazione difatti consente di testare scenari al di là di cosa è sperimentalmente fattibile (Jennifer et al, 2018).

3. Scopo della tesi

La costante crescita della popolazione pone il sistema alimentare sotto un sempre maggiore stress. Questo fa sì che i terreni vengano sempre più sfruttati portando così a un aumento della loro erosione, che causa una perdita produttiva. Inoltre, il sempre più grave cambiamento climatico sta facilitando fenomeni di salinizzazione delle terre arabili, che aumenta l'erosione e lo stress subito dalle piante, rendendole meno prolifiche. Il riso, coltura di grande importanza a livello globale, è una delle piante di interesse agronomo più colpite da questi fenomeni, perché spesso coltivato in prossimità delle foci dei fiumi. Sono stati osservati però diversi fenotipi di tolleranza a questo stress tra le migliaia di varietà di riso esistenti. Di conseguenza, lo studio delle differenze fisiologiche e molecolari di queste varietà rappresenta un punto fondamentale per l'identificazione di marker per la marker-assisted selection, al fine di ottenere varietà in grado di mantenere la produttività anche in condizioni di salinità elevata. La caratteristica mostrata dalla varietà Baldo, in grado di mantenere la crescita della radice primaria sotto stress, è di estremo interesse per la selezione di varietà "deep root" più resilienti allo stress idrico, sia esso dovuto a siccità che salinità.

In *Arabidopsis*, la dimensione del meristema radicale e di conseguenza il tasso di crescita della radice, è regolato da citochinine attraverso l'attività di enzimi di coniugazione dell'auxina, appartenenti alla famiglia proteica *GH3*. Sfortunatamente non è ancora noto se le citochinine e i geni *GH3* siano coinvolti nella regolazione della crescita della radice anche in condizioni di stress salino.

Una delle linee di ricerca del laboratorio in cui ho svolto il tirocinio si occupa di comprendere se il meccanismo di regolazione della crescita della radice di *Arabidopsis* sia conservato anche in riso e se sia coinvolto nella regolazione dello sviluppo radicale sotto stress salino. Alcuni dati preliminari suggeriscono che un membro della famiglia *GH3* di riso, *OsGH3.9*, sia un marcatore di tolleranza al sale. Questo gene è infatti espresso solo in varietà di riso tolleranti al sale, come la varietà Baldo.

La mia tesi si inserisce in questo progetto ed è mirata all'identificazione di membri della famiglia *GH3* di riso omologhi di *AtGH3.17* (Figura 2.10) attraverso un'analisi della letteratura più recente, il clonaggio di alcuni geni candidati e la loro espressione in *Arabidopsis*.

4. Materiali e metodi

4.1 Protocollo di sterilizzazione e germinazione dei semi di riso

I semi di Vialone Nano e Baldo, forniti rispettivamente da Ente Nazionale Risi di Codigoro e Società Melzi d'Eril sementi, sono stati sterilizzati con un primo lavaggio di alcol al 70% v/v per un minuto, seguito da due lavaggi di 20 minuti in ipoclorito di sodio 5% v/v e infine da 5 lavaggi da 5 minuti in acqua milliQ sterile. Per una maggiore sicurezza, per la sterilizzazione, i semi sono stati anche lavati con una miscela al 2 % v/v di PPM (plant preservative mixture, biocida ad ampio spettro che uccide batteri e cellule fungine, fornito dalla Plant Cell Technology Inc).

I semi sterilizzati sono stati quindi depositati in piastre Petri quadrate, su terreno MS-1/2, composta da 2.2 g di terreno base di Murashige e Skoog (MS) con vitamine, 15 g di saccarosio, e 8 g di plant agar per 1 L di terreno, il tutto a pH 5.7. Infine, prima che il terreno solidificasse sono state aggiunti NaCl 100 mM e CKs (tZR) 2uM per influenzare la crescita. Ogni step di sterilizzazione, di semina e di manipolazione dei semi è stato condotto in condizioni sterili sotto cappa.

4.2 Protocollo di sterilizzazione e germinazione dei semi *A. thaliana*

I semi di *A. thaliana*, Col-0 WT e mutanti knockout *gh3.17* e *gh3.5* forniti dalla professoressa A. Sabatini (La Sapienza, Roma), sono stati sterilizzati con un primo lavaggio di etanolo al 70% v/v, agitati per 30-50s e risciacquati con un lavaggio finale con etanolo assoluto agitato per 30-50s. I semi sterilizzati sono stati quindi depositati in piastre Petri quadrate con uno stuzzicadenti sterile sotto cappa, su terreno MS-1/2 per *Arabidopsis*, composto da 2.2 g di terreno base di Murashige e Skoog con vitamine, 10 g di saccarosio (1 %), 0.5 g di MES monoidrato, e 8 g di plant agar per 1 L di terreno, il tutto a pH 5.8, modificato con KOH. Infine, è stato aggiunto al terreno Kanamicina (K) solo nel terreno delle piante mutanti per permettere la selezione. Successivamente le piante cresciute sono state spostate in terreno sterile per la raccolta di semi.

4.3 Protocollo per l'amplificazione dei semi *A. thaliana*

Sono state eseguite delle amplificazioni di piante per ottenere un numero maggiore di semi. Per eseguire questo passaggio i semi sono stati semplicemente messi a crescere su terreno sterilizzato, in condizioni di lavoro non sterili.

4.4 Protocollo per la selezione di *A. thaliana* trasformata

Per la selezione delle piante trasformate è stato usato il seguente terreno: 2,15 g MS senza vitamine, 0.8% Phyto Agar, 0.5g MES, il tutto per 1 L. Infine si aggiunge l'igromicina (50 mg/mL) in quantità 1:1000 rispetto al volume finale. I semi delle piante trasformate sono stati poi messi a vernalizzare su questi terreni per due giorni a 4° C per sincronizzare la crescita. Successivamente esposti alla luce in fitotrone per 6h (temperatura a 22° e umidità al 60 %) per poi essere lasciate crescere al buio per 3 giorni. Al termine di questi le piante che mostravano una crescita migliore sono state spostate nello stesso medium utilizzato per la selezione, ma senza l'antibiotico. Dopo un periodo variabile di 2-5 giorni, in base a come la pianta rispondeva al nuovo terreno, quelle ancora vitali sono state spostate in terra per completare la crescita ed effettuare una genotipizzazione per confermare il fenotipo.

4.5 Protocollo per il confronto di *A. thaliana* WT e *gh3.17*

Per l'analisi della crescita della radice, 442 semi di *Arabidopsis* sono stati disposti in linee orizzontali in piastre quadrate da 12 cm di lato contenenti il mezzo MS-1/2 ottenendo 5 repliche per condizione (controllo e citochinina 2uM). I semi sono stati vernalizzati per 2 giorni a 4°C al buio e in seguito posti alla luce in camera di crescita, in posizione verticale (temperatura 22°, umidità 60 %). La lunghezza delle radici è stata misurata con ImageJ (Fiji imagej.net).

Nelle ultime due repliche il terreno è stato modificato portando il saccarosio a 1 g (0.1 %) per ottenere un fenotipo più forte, e per l'ultima è stata usata *gh3.5*. Ogni step di processo è stato condotto in condizioni sterili sotto cappa a flusso orizzontale. La piastra è divisa a metà tra pianta WT e mutante (*gh3.17*) per poter effettuare il confronto in maniera più diretta, sia nella condizione di controllo che con l'aggiunta di CKs.

4.6 Estrazione dell'RNA e sintesi della prima elica di cDNA

L'RNA dei semi di Vialone Nano e Baldo è stato estratto con il protocollo fornito dalla Qiagen: DNeasy Plant Mini Kit per poi essere conservato a -80°C per futuri utilizzi. È stata usata l'opzione di aggiungere la DNase al secondo passaggio con RW1 buffer.

La sintesi del cDNA, a partire dall'RNA totale estratto precedentemente, è stata eseguita a partire da 2 μ g di RNA utilizzando il kit Superscript IV (Invitrogen) seguendo le indicazioni del fornitore.

La concentrazione finale di cDNA viene considerata pari a quella iniziale di RNA; perciò, per la reazione di Real Time sono stati usati 100 ng di cDNA per campione.

4.7 Analisi del profilo di espressione dei geni *OsGH3.9*, *Os GH3.11* e *OsGH3.8*

Il cDNA estratto prodotto con i metodi precedenti da piante di VN (Baldo deve essere ancora analizzato al momento della stesura della tesi) esposte ai seguenti trattamenti: controllo, NaCl 100 mM e CKs 2 μ M, è stato preparato per la Real-Time PCR usando piastre da 384 pozzetti. Ogni pozzetto contiene 5 μ L di GoTaq qPCR Master Mix 2X, i primers gene-specifici (forward e reverse) con concentrazione finale di 200 nM e 100 ng di cDNA. I primers usati per l'analisi sono i seguenti:

Primer	Sequence	Len	%GC	3' Tm
OsGH3-9F	GTCCATTGGGCAGTACAAGGTG	22	54.5	67.5
OsGH3-9R	GGTGTACGTTTTCTTTCTAAAAT	25	36	63.1
OsGH3-11F	CATCGAATCTAGCCTTGCACTGAAG	25	48	68.7
OsGH3-11R	AAGCTCCTAAAGCCTGCAGCC	21	57.1	67.8
OsGH3-8F	GTCCGAATAGTCGGTCAAATCC	22	50	65.5
OsGH3-8R	TGCCACTAACTGACAGAGTTGACAG	25	48	66.5

Tabella 4.1: Elenco dei primers usati per l'analisi Real-Time PCR

I dati ottenuti di lunghezza, temperatura di melting e percentuale di GC sono stati ottenuti con lo strumento OligoEvaluator della Sigma-aldrich.

4.8 Primers usati per la creazione del vettore pGRHYG

Name Primer	5' (overlap/ANNEAL) 3'	Len	%GC	3' Tm
Backbone_fwd	aactagtttagCTGCAGCCCGGGGATCC	28	61	75
Backbone_rev	aaaggaatagGCGGGACTCTGGGGTTCG	28	57	71.6
Igromicina_fwd	agagtcccgcCTATTCCTTTGCCCTCGG	28	61	62.6
Igromicina_rev	cgatcgaggcATGAAAAGCCTGAACTCAC	30	50	60.1
Intermedio_fwd	gcttttcatGCCTCGATCGAGTTGAGAG	29	48	64.8
Intermedio_rev	ccataccggtGAATTCGATATCAAGCTTATCGATAC	36	42	60.5
GH3.9 AgeI_fwd	tatcgaattcACCGGTATGGCGACGCCA	28	54	72.9
GH3.9 AgeI_rev	tgctcacatACCGGTGTCGGATCGTGG	28	61	70.4
YFP SpeI_fwd	cgacaccggtATGGTGAGCAAGGGCGAG	28	64	68.1
YFP SpeI_rev	cgggctgcagCTAACTAGTTCTTGTACAGCTCG	35	54	63.9

Tabella 4.2: Elenco dei primers usati per l'assemblaggio del vettore pGRHYG. Forniti dal sito NEBuilder Assembly Tool.

I primer appena elencati sono stati creati in maniera tale da avere delle regioni sovrapponibili per permettere una corretta costruzione del vettore: oltre a una sequenza di annealing tra primers e frammento, viene aggiunta una reazione di overlap che permetterà così l'unione nella sequenza corretta dei vari frammenti, non dovendo incorrere in rischi come sequenze invertite o assemblate nell'ordine sbagliato.

Per la verifica del corretto inserimento dei vari frammenti il vettore è stato sequenziato con l'utilizzo dei seguenti primer: CGCAAGGAATCGGTCAATACA, per la verifica dell'inserimento del frammento contenente l'igromicina e il frammento Intermedio, CGGTGGTGCAGATGAACTT, per la verifica dell'inserimento della YFP on sequenza al gene di interesse. Questa procedura è stata eseguita solo per pGRHYG-35S-GH3.9-YFP, in quanto successivamente i geni si potevano inserire solo dove tagliato con l'enzima di restrizione AgeI.

4.9 Trasformazione di *E. coli* e *A. tumefaciens*

I costrutti così ottenuti sono stati trasformati in batteri *A. tumefaciens* GV3101 con il vettore pSOUP che serve per il funzionamento del sistema binario e il trasferimento del T-DNA nel genoma della pianta ospite. Il protocollo eseguito è stato il seguente:

- crescita di *A. tumefaciens* in 5 mL di YEP con l'aggiunta di Rifampicina (RF, seleziona *A. tumefaciens*, uccidendo *E. coli*), Tetraciclina (TC, serve a selezionare i batteri con il vettore complementare pSOUP) e Gentamicina (GM, seleziona il ceppo GV3101), tutti diluiti 1:1000, per almeno due giorni, fino a un massimo di tre nel caso sia necessario;
- prelevare 2 mL di soluzione così preparata e inoculare 50 mL di YEP con gli stessi antibiotici, lasciare crescere overnight;
- raffreddare la coltura in ghiaccio e poi centrifugare a 3000 g per almeno 10';
- scartare il surnatante, risospendere le cellule in 1 mL di CaCl₂ raffreddata e dispensare 0.1 mL di soluzione in eppendorf già in ghiaccio;
- aggiungere 1 ug di DNA a ogni tubetto
- congelare le cellule con l'azoto liquido;
- mettere le cellule in un bagno caldo a 37° C per 5';
- aggiungere 1 mL di YEP a ogni eppendorf e incubare a 28° C per 2-4 h, così il batterio riesce ad esprimere l'antibiotico resistenza;
- centrifugare i tubetti a 4000 g per 4', togliere il surnatante e risospendere in 0.1 mL di YEP;
- piastrare la soluzione così ottenuta su piastra contenente YEP e con gli antibiotici elencati prima, dopo due giorni dovrebbero comparire le prime colonie.

4.10 Trasformazione di *A. thaliana*

Mentre si ottenevano i batteri con i vettori, *A. thaliana*, WT e *osgh3.17*, veniva fatta crescere, in fitotroni a 22° e umidità al 60 % con 16 ore di luce al giorno, fino alla comparsa dei fiori, di solito dopo 5-6 settimana dalla semina. Una volta comparsi, vengono tagliate le silique già formate e si può procedere con la tecnica del floral dip per l'infezione da parte di *A. tumefaciens*:

- ottenere almeno 200 mL di batteri, si può effettuare un preinoculo e poi un inoculo, così da velocizzare la crescita. Aggiungere sempre gli antibiotici necessari;
- preparare una soluzione al 5 % di saccarosio, se si usa sul momento non serve autoclavare;

- centrifugare i batteri a 4000 g per 15' e poi scartare il surnatante;
- risospendere il pellet di batteri nella soluzione al 5 % di saccarosio e aggiungere Silwet-77 per una concentrazione finale di 0.02 %;
- adagiare la parte superiore con i fiori della pianta nella soluzione e lasciarla immersa per 3-5 s, ripetere questo passaggio 4-5 per ogni pianta;
- adagiare le piante on maniera orizzontale su una bacinella ricoperta da pellicola, chiudere il contenitore con altra pellicola e lasciare le piante al buio per 16-24 h, in caso si può coprire con carta stagnola;
- innaffiare e crescere le piante normalmente;
- quando i semi sono maturi si può smettere di dare da bere alla pianta, nel giro di due settimane dovrebbe seccarsi e i semi diventano così disponibili per essere raccolti;

4.11 Statistica

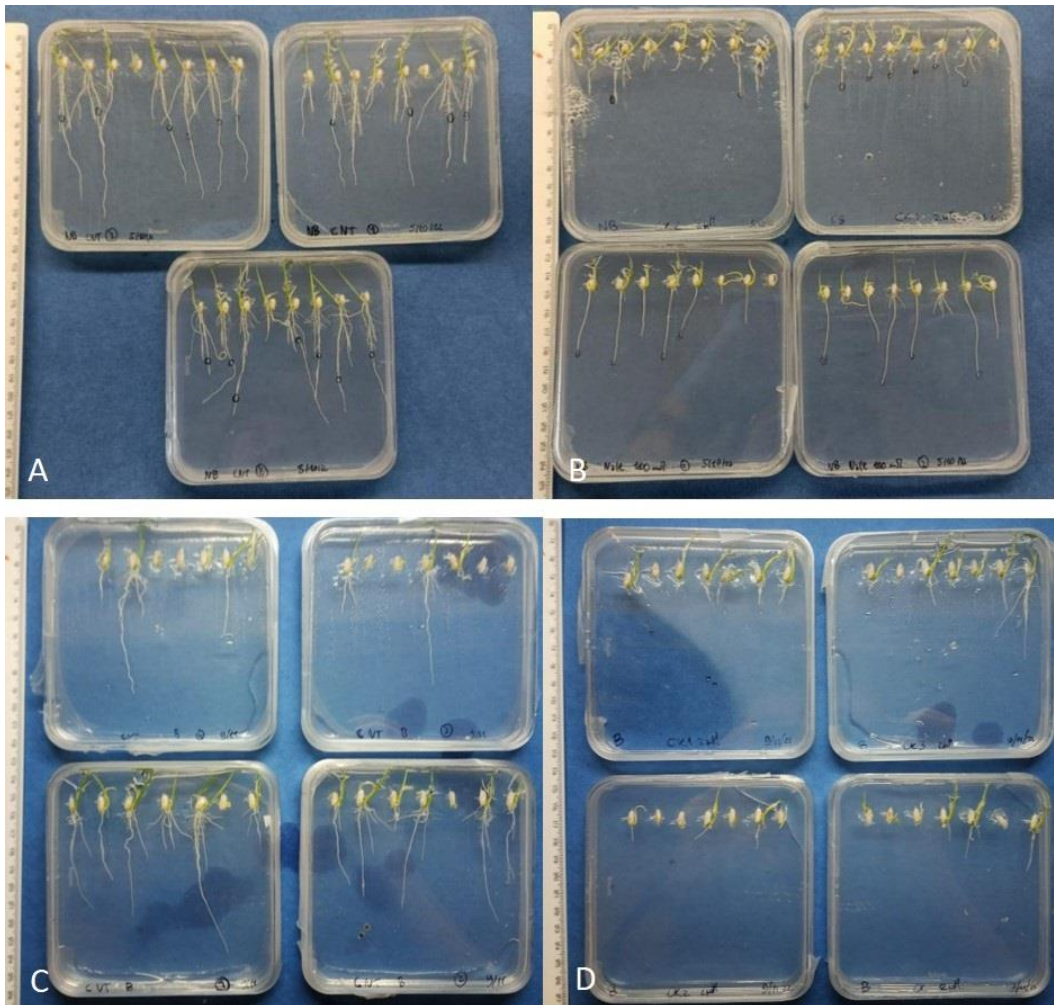
I dati di crescita e di confronto tra *A. thaliana* WT e osgh3.17 sono stati analizzati mediante il software Prism, più comunemente noto come GraphPad. Le statistiche usate sono state t-test e One way Anova. I dati della Real-Time PCR invece sono stati analizzati con il metodo del $-\Delta\Delta C_t$.

5. Risultati

La prima parte del mio progetto di tesi si è focalizzato sull'analisi dell'effetto di sale e citochinine sulla crescita della radice delle due varietà di riso Vialone Nano e Baldo, e di *Arabidopsis* wt e mutanti knockout per *AtGH3.17*, perché non c'erano dati presenti in laboratorio sulle fasi iniziali dello sviluppo della radice embrionale.

5.1 Effetto di sale e citochinine sullo sviluppo della radice primaria in *O. sativa*

Per verificare che effettivamente NaCl e citochinine (tZR) avessero un effetto sulla crescita delle varietà di Baldo e Vialone Nano, si sono sottoposte queste a 100 mM di NaCl e CKs 2uM.



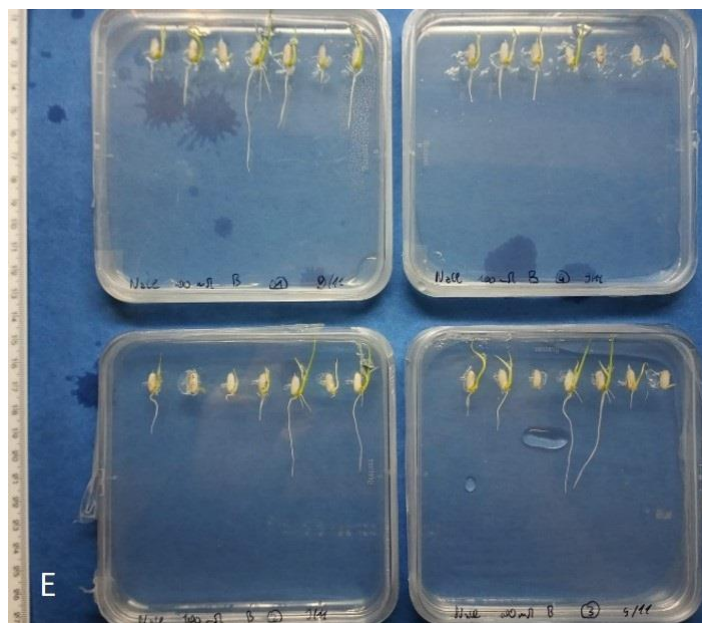


Figura 5.1: Foto dell'esperimento riguardante l'effetto di sale e CKs sulle due varietà di riso Vialone Nano e Baldo dopo 6 giorni di germinazione. Nella piastra A è presente Vialone Nano in condizioni di controllo (3 repliche, 24 campioni), nella piastra B invece in condizioni di CKs 2 μ M (2 repliche, 16 campioni) e NaCl 100 mM (2 repliche, 16 campioni). Nelle piastre C, D, E è presente Baldo rispettivamente in controllo (4 repliche, 28 campioni), citochinine (4 repliche, 28 campioni) e sale (4 repliche, 28 campioni).

Lo sviluppo della radice embrionale è influenzato negativamente sia dal trattamento con citochinina che con il sale (Figura 5.2 A) in Vialone Nano. Con la differenza che il trattamento con sale inibisce anche lo sviluppo delle radici avventizie, che invece emergono ugualmente in presenza di citochinine (Figura 5.1 B). In Baldo non sono state osservate differenze significative rispetto al controllo per quanto riguarda il trattamento con sale, mentre la citochinina inibisce la crescita della radice primaria (Figura 5.2 B). La risposta in presenza del sale era attesa visto che Baldo è tollerante al sale e una delle sue caratteristiche è proprio la capacità di mantenere la crescita della radice in condizioni di alta salinità (vedi paragrafo 2.7). Mentre l'effetto della citochinina sulla crescita della radice embrionale non era mai stato riportato prima in riso.

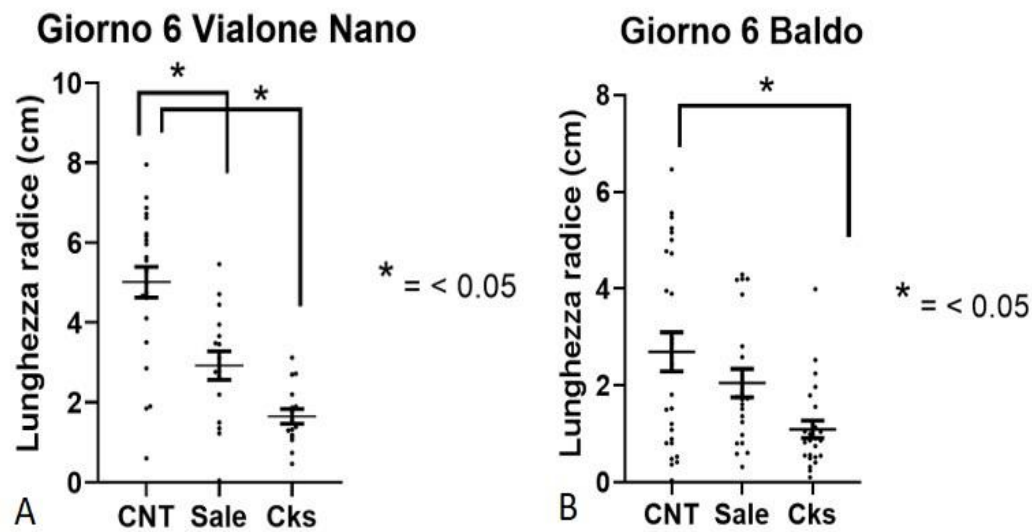


Figura 5.2: Dati sulla lunghezza della radice Vialone Nano (A) e Baldo (B) in condizioni di controllo (3 repliche, 24 campioni per Vialone Nano e 4 repliche, 28 campioni per Baldo), NaCl 100 mM (2 repliche, 16 campioni per Vialone Nano e 4 repliche, 28 campioni per Baldo) e CKs 2 uM (2 repliche, 16 campioni per Vialone Nano e 4 repliche, 28 campioni per Baldo).

Nessuna differenza significativa è stata riscontrata sui tassi di germinazione dei semi delle due varietà nelle diverse condizioni

5.2 Effetto delle citochinine sullo sviluppo della radice in piante di *A. thaliana* WT e *gh3.17*

In letteratura non esistono dati sull'effetto delle citochinine sulla lunghezza della radice in *Arabidopsis*. Gli articoli pubblicati dal gruppo della prof.ssa Sabatini si concentrano sulle dimensioni del meristema radicale nelle prime fasi di sviluppo. In vista degli studi futuri da effettuare sulle piante trasformate con i geni *GH3* di riso, ho analizzato la lunghezza della radice di piante di *Arabidopsis* wt, *gh3.17* e *gh3.5* trattate con citochinina (tZR 2 uM).

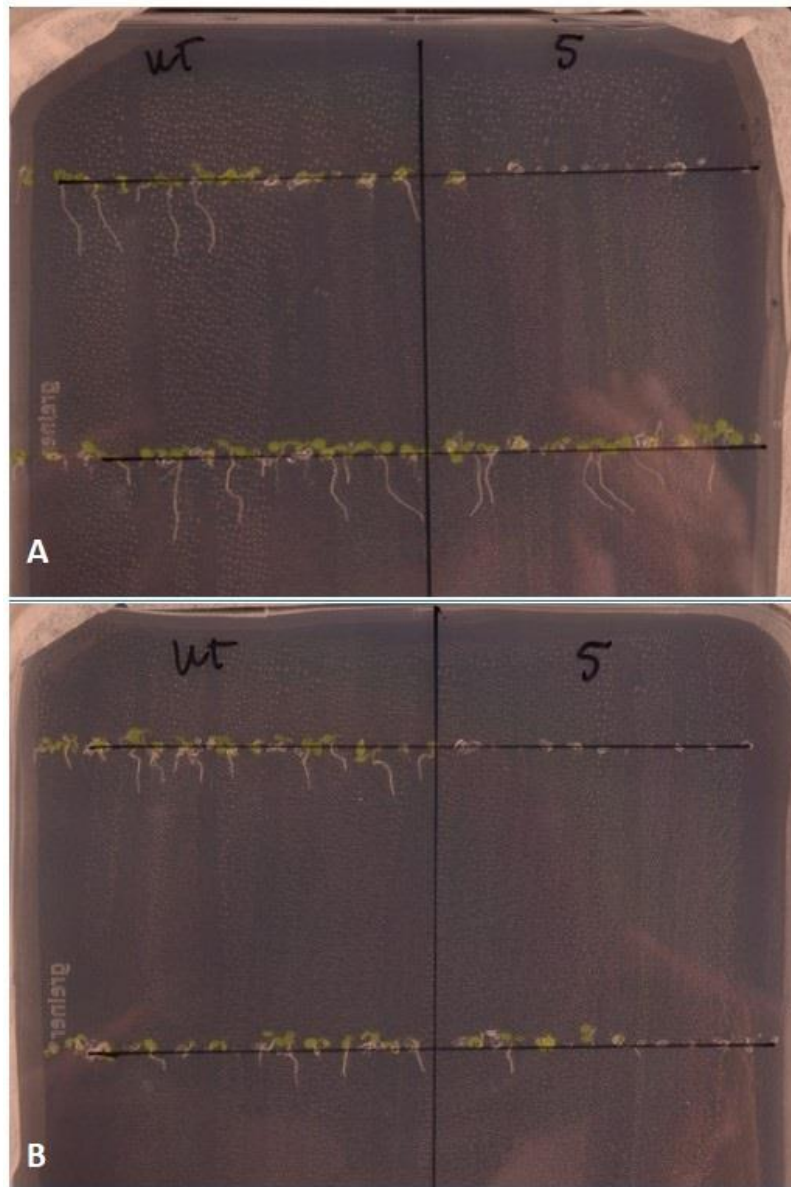


Figura 5.8: Rappresentazione dell'esperimento svolta sul confronto dei due genotipi WT e *gh3.5* in condizioni normali (1 replica, 30 campioni per WT e 1 replica, 28 campioni per *gh3.5*), foto A, e con l'aggiunta di citochinine 2.5 mg/ml (1 replica, 28 campioni per WT e 1 replica, 27 campioni per *gh3.5*), foto B.

L'esperimento è stato svolto con tre repliche biologiche per ottenere più dati possibili. Le prime due sono state eseguite con *A. thaliana gh3.17*, mentre l'ultima con *gh3.5*, pianta knockout che dovrebbe avere lo stesso fenotipo di *gh3.17*.

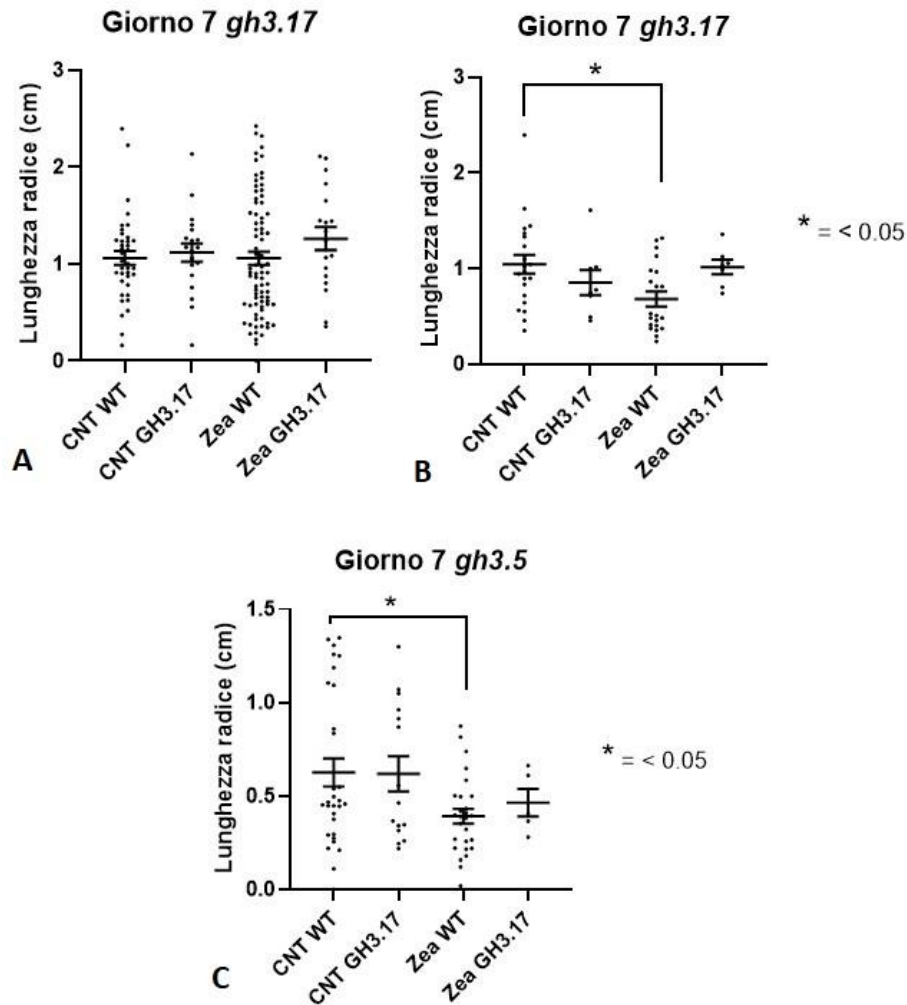


Figura 5.9: Risultati della differenza di crescita al settimo giorno con il setup sperimentale descritto per i tre esperimenti volti su piante di *A. thaliana* WT e *gh3.17* (grafico A e B), WT e *gh3.5* (grafico C). Sono stati piastrati 442 semi in 5 repliche per condizione. Concentrazione di CKs pari a 2 uM. In A la concentrazione di saccarosio nel mezzo è 1%, mentre in B e C è 0.1%

La prima replica è stata svolta con MS-1/2 che presentava saccarosio all'1 %, ma non ha dato i risultati previsti in quanto le piante sono cresciute in maniera omogenea. Le altre due repliche sono state svolte con lo zucchero all'0.1 %, cercando di favorire la manifestazione del fenotipo, il quale si è espresso nella maniera attesa: le piante WT hanno mostrato una diminuzione della crescita della radice quando esposte alla citochina, mentre le piante mutanti sono rimaste insensibili alla modifica.

Repliche	CNT		Zeatina 2 uM		Concentrazione saccarosio
	WT	<i>osgh3.17</i>	WT	<i>osgh3.17-osgh3.5</i>	
1-3	84.44%	50.00%	97.53%	27.14%	1 %
4	91.67%	39.13%	91.30%	37.50%	0.1 %
5	96.67%	53.57%	96.43%	18.52%	0.1 %

Tabella 5.1: Tassi di germinazione delle piante di *Arabidopsis*.

Un fatto particolare però, come osservabile nella Tabella 5.1, è la grande differenza sul tasso di germinazione delle piante WT rispetto al mutante. Si nota come la germinazione dei mutanti sia sempre inferiore alle piante WT e che peggiori quando vengono esposte a valori elevati di citochinine. Questo potrebbe indicare un possibile ruolo fondamentale dei geni knockout nella crescita, che di conseguenza aggrava la capacità delle piante a raggiungere la fase di sviluppo. Un'altra possibilità è che i semi non siano stati conservati in maniera opportuna, caso possibile durante il trasporto da Roma, perciò bisognerebbe ripartire da semi nuovi. Per questo motivo è in corso l'amplificazione delle piante knockout.

5.3 Analisi del profilo di espressione di geni candidati

I geni *OsGH3.9*, *OsGH3.11* e *OsGH3.8* sono stati scelti come bersagli da analizzare, dopo un'attenta analisi tra bibliografia (*GH3.1*, *GH3.6*, *GH3.8* selezionati dall'articolo di Ruben et al, 2022) e risultati ottenuti precedentemente in laboratorio (*GH3.9* dai risultati tesi della tesi magistrale di Daniele Lubian e *GH3.11* dalle analisi del dottorando Mingxing C.) con una Real-Time PCR.

Il profilo di espressione di questi geni è stato analizzato per confermare la regolazione da parte di sale e/o citochinine anche durante le fasi iniziali dello sviluppo della radice embrionale. La figura 5.3 mostra i risultati per i geni *OsGH3.8*, *OsGH3.9* e *OsGH3.11* in radici di Vialone Nano. Le piante sono state fatte germinare e crescere per 6 giorni in presenza di NaCl 100mM o CK 2uM, e in condizioni di controllo.

Gene	LOC	Fonte	Motivazione
GH3.1	LOC4327043	Ruben et al 2022	Regolati da CKs, espresso in radici
GH3.6	LOC4337780	Ruben et al 2022	Regolati da CKs, espresso in radici
GH3.8	LOC4343785	Ruben et al 2022	Regolati da CKs, espresso in radici
GH3.9	LOC4343704	Laboratorio	Espresso solo in radici di varietà tolleranti
GH3.11	LOC4344247	Laboratorio	Regolato da CKs, alta similarità con <i>AtGH3.17</i>

Tabella 5.2: Elenco dei geni candidati.

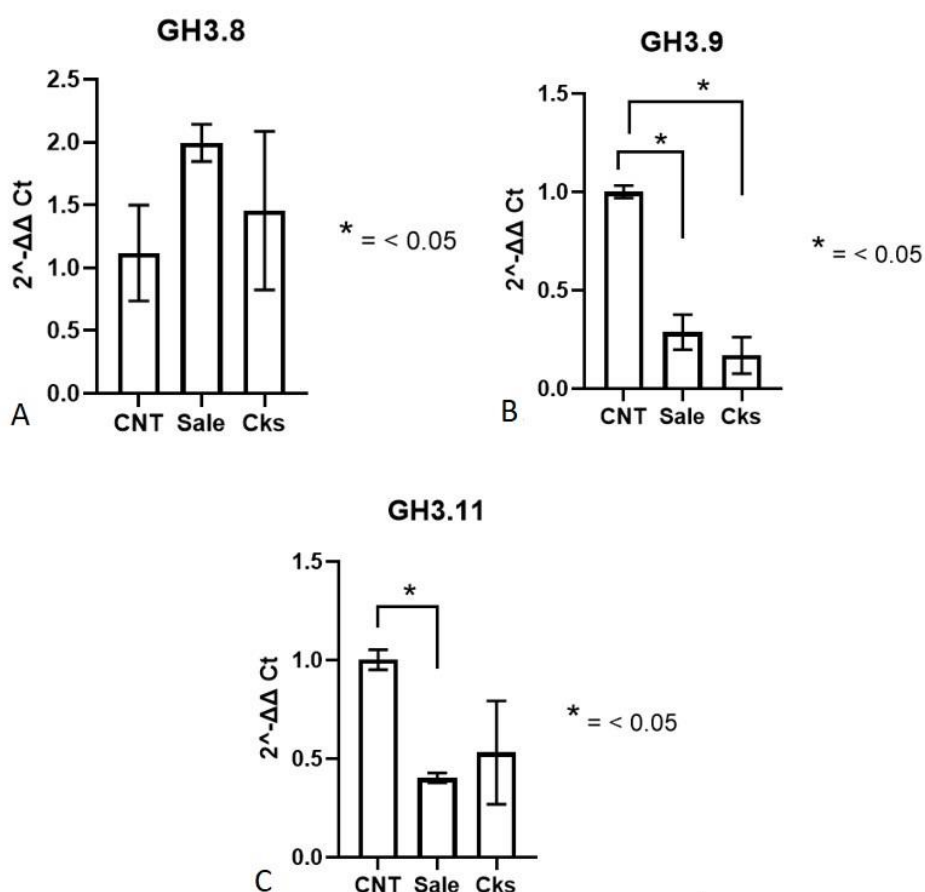


Figura 5.3: Risultati della Real-Time PCR con i campioni di Vialone Nano per i geni GH3.8 (A), GH3.9 (B) e GH3.11 (C) in condizioni di controllo, NaCl 100 mM e CKs 2 uM (3 repliche per ogni condizione).

Come osservabile dai grafici sembra che una condizione di stress salino o di aggiunta di citochinine influenzi solo il gene *OsGH3.9*, che dimostrano una differenza significativa dal controllo. *OsGH3.11* dall'altro canto mostra che solo il sale abbia un effetto sulla sua espressione, mentre *OsGH3.8* non mostra nessun cambiamento significativo. Gli errori molto alti purtroppo influenzano in maniera negativa i test per la verifica di una effettiva differenza tra i campioni, di conseguenza è consigliata una ripetizione per ottenere più dati da analizzare. La stessa analisi è in via di completamento per Baldo durante la stesura di questa tesi.

5.4 Design e creazione dei costrutti per la trasformazione di *Arabidopsis*

Il vettore pGRHYG è stato prodotto utilizzando la metodica di NEBuilder HiFi DNA Assembly fornita da New England Biolabs, insieme ai reagenti. L'immagine 13 rappresenta in maniera semplificata il workflow necessario per l'assemblaggio del vettore a partire dai vari frammenti a disposizione. In base al numero di questi ci sono varie concentrazioni di utilizzo che possono variare come il rapporto molare tra vettore e frammenti e la quantità stessa di quest'ultimi. Oltre che per la costruzione de novo, o l'inserimento di nuove parti come nel mio caso, questa metodica può essere usata per la mutagenesi sito specifica.

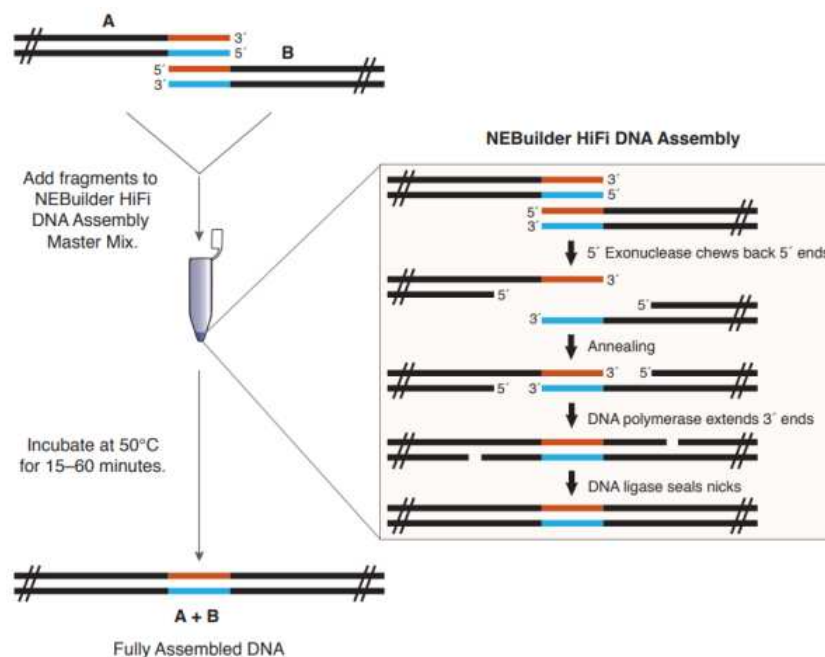
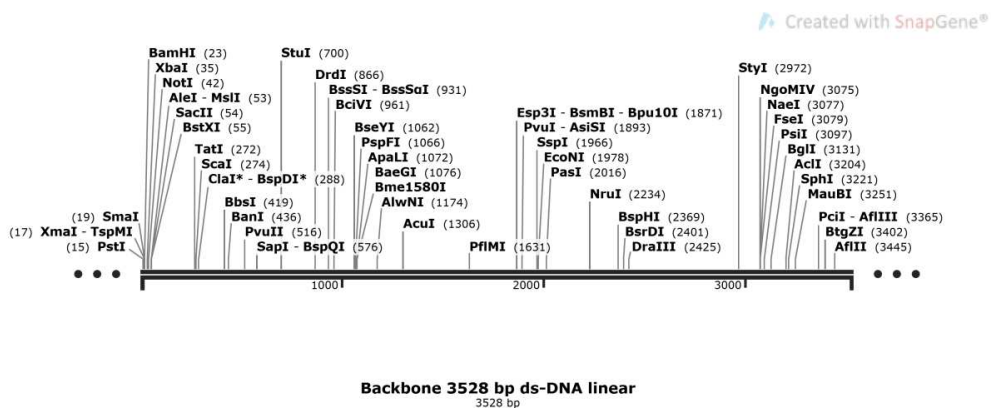
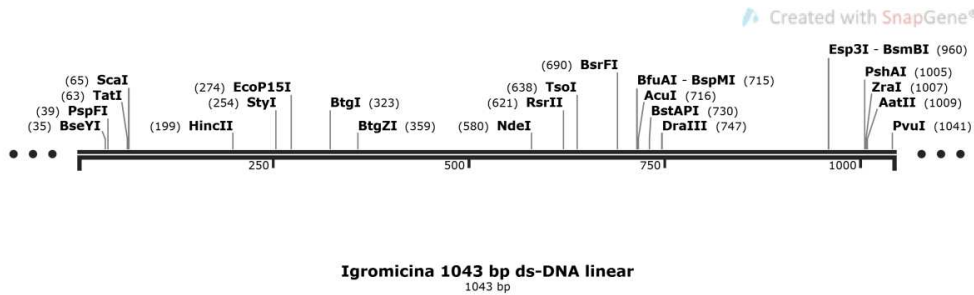
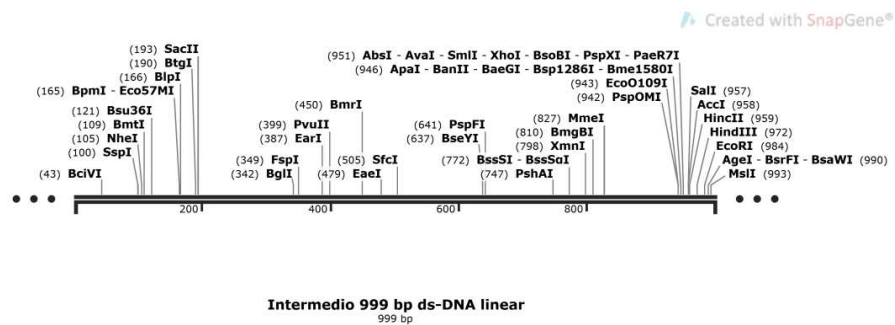


Figura 5.4: Rappresentazione schematica dell'assembly.

Sono stati usati 5 frammenti nominati rispettivamente: (i) *backbone*, dove sono presenti le origini di replicazione per i batteri, (ii) *intermedio*, zona cuscinetto tra altri due frammenti, (iii) *igromicina*, dove è presente l'omonimo antibiotico, (iv) *GH3.9*, dove è presente il gene di interesse e che può essere sostituito con altri frammenti dato l'inserimento di due siti di restrizione di AgeI (non presente in nessun gene considerato), e (v) *YFP*, dove si trova la sequenza codificante la proteina fluorescente YFP a cui sono stati aggiunti due siti di restrizione a valle per togliere il codone di stop (SpeI) e inserire così non a monte ma al 3' il gene in caso creasse problematiche al 5'.



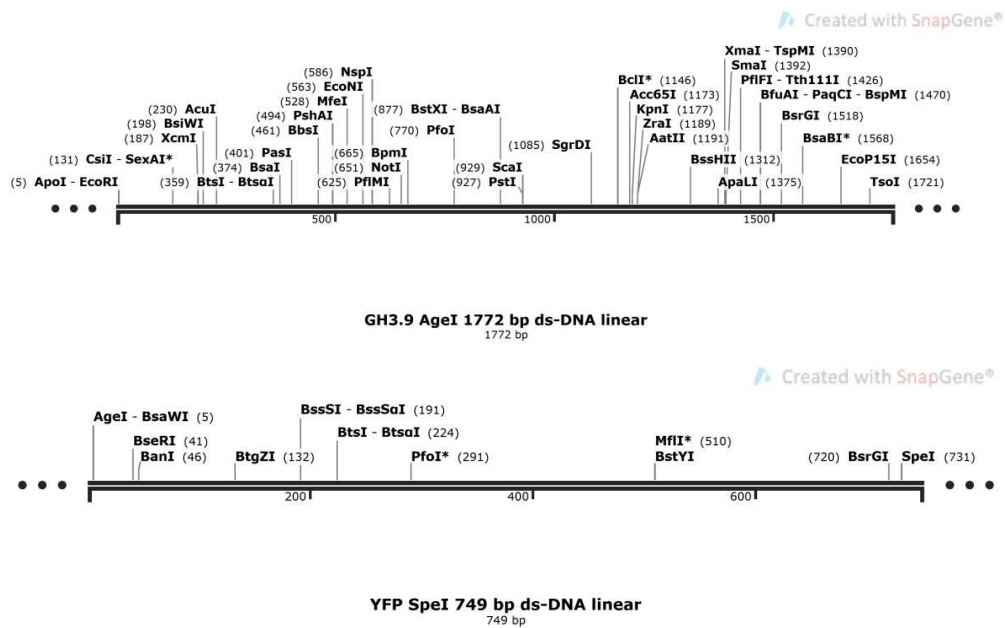


Figura 5.5: Rappresentazione lineare dei frammenti per il vettore pGRHYG con il gene GH3.9. Fonte: SnapGene.

I geni di interesse *GH3.1*, *GH3.6*, *GH3.8*, *GH3.9* sono stati recuperati da cDNA di Vialone Nano e Baldo che era già stato prodotto in laboratorio precedentemente. I componenti per i frammenti *dell'igromicina* e *YFP* sono stati ottenuti da un costrutto presente in laboratorio e i pezzi per *intermedio* e *backbone* dal vettore binario pGreen0029.

Per ottenere i frammenti si è ricorsi a una normale PCR con i primers forniti da NEBuilder Assembly Tool. Per il gene di interesse *GH3.9* è stato eseguito un passaggio in più dove il cDNA è stato amplificato con primers specifici per lui già presenti in laboratorio. Per queste PCR è stata usata una polimerasi ad alta fedeltà (Platinum SuperFi II, Invitrogen) con il seguente programma:

95°C 5'	}	x35
95°C 30"		
60°C 30"		
72°C 1		
72°C 5'		

Il tempo di allungamento è stato adattato di caso in caso. Il costrutto è stato amplificato in *E. coli* e le colonie positive alla PCR colony sono state sequenziate. Il vettore così ottenuto è stato nominato pGRHYG-35S-OsGH3.9-YFP (Fig. 5.6) ed è stato utilizzato per il clonaggio delle sequenze codificanti (CDS) degli altri

geni di interesse sfruttando i siti di restrizione per AgeI. Per evitare la ricircularizzazione del vettore dopo la rimozione della CDS per *GH3.9*, il DNA è stato defosforilato e in seguito ligato con gli inserti.

I plasmidi sono stati poi inseriti in cellule di *A. tumefaciens* (ceppo GV3101 contenente il plasmide helper pSOUP) per la trasformazione di *Arabidopsis* (tabella 5.3).

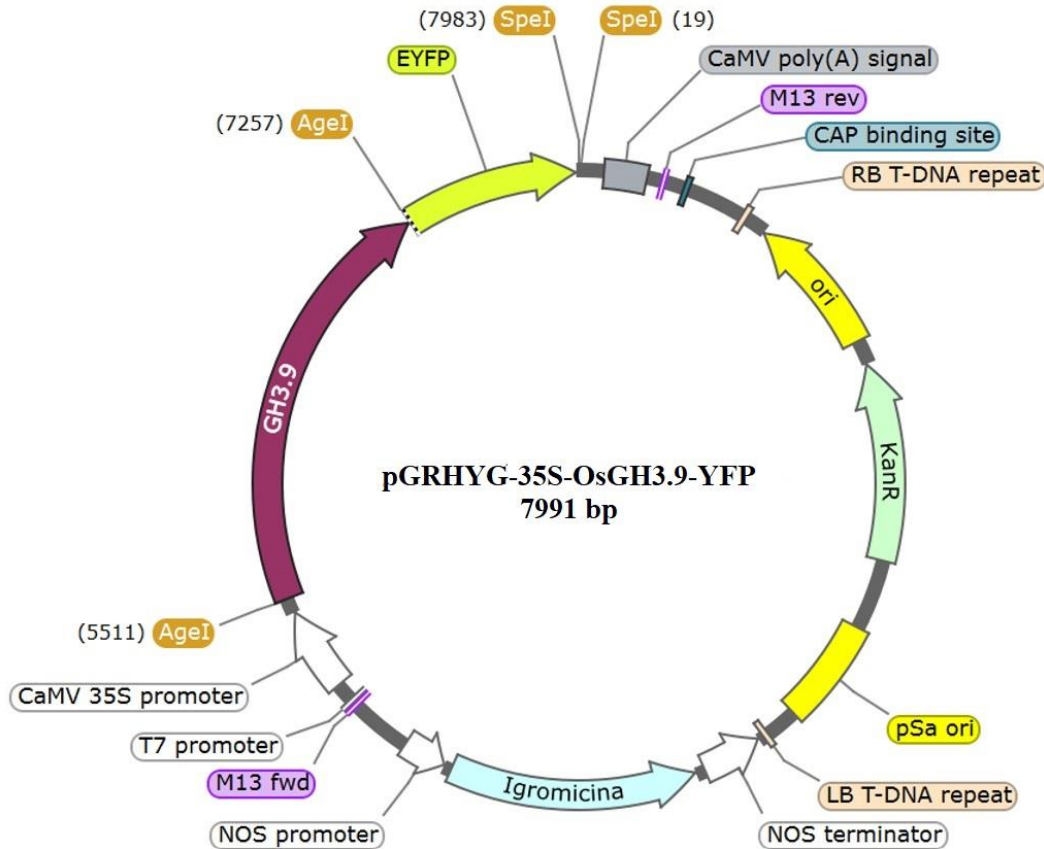


Figura 5.6: Vettore pGRHYG con il gene di interesse *GH3.9*

Una volta ottenuto il costrutto con la sequenza codificante *OsGH3.9* fusa alla *YFP*, l'ho utilizzato per il clonaggio delle sequenze codificanti gli altri geni di interesse (tabella 5.3), sfruttando i siti di restrizione per AgeI. Tutti i costrutti sono stati amplificati in *E. coli* e trasformati in *Agrobacterium tumefaciens* ceppo GV3101 contenente il plasmide helper pSOUP.

Batterio	Vettore			
	OsGH3.1	OsGH3.6	OsGH3.8	OsGH3.9
<i>E. coli</i>	Ottenuto	Ottenuto	Ottenuto	Ottenuto
<i>A. tumefaciens</i>	Ottenuto	Ottenuto	Ottenuto	Ottenuto

Tabella 5.3: Riassunto su quali batteri è stato inserito il vettore.

5.5 Sovraespressione e complementazione in *A. thaliana*

Le piante di *Arabidopsis* WT e *gh3.17* sono state trasformate con il vettore pGRHYG-35S-OsGH3.9-YFP entrambe, mentre per pGRHYG-35S-OsGH3.1-YFP, pGRHYG-35S-OsGH3.6-YFP e pGRHYG-35S-OsGH3.8-YFP si è riusciti solo a trasformare le piante WT. Al momento sono in crescita le piante T1 e si dovrà effettuare una genotipizzazione per confermare l’inserimento del vettore, dato che al momento si sta procedendo con la selezione delle più vitali in terreno con igromicina, ma non abbiamo prova certa della trasformazione.



Figura 5.7: Diversi stadi di crescita di *A. thaliana*. Nella foto A sono state appena trasferite dopo la selezione in igromicina e sono nella fase di germinazione. Nella foto B hanno raggiunto la fase di maturazione per la raccolta dei semi. Entrambe rappresentano piante T1.

6. Discussione

Con un continuo aumento della popolazione mondiale i terreni agricoli sono sempre più sottoposti a uno stress intensivo per sopperire al fenomeno che porta a un'erosione accelerata del terreno. In concomitanza con questo fenomeno l'aumento della salinità dei campi arabili diminuisce ancor di più la produttività, se non porta alla perdita totale del terreno.

Il riso, specie di pianta coltivata particolarmente sensibile alla salinità, è una risorsa fondamentale per molti paesi data la loro dieta basata su questo alimento. Nonostante sia però una specie glicofita, è stato dimostrato come la varietà italiana Baldo mostri un'opposta sensibilità con un notevole grado di tolleranza ad elevate concentrazioni di NaCl, al contrario Vialone Nano segue il comportamento normale (Formentin et al., 2018). Baldo, che è capace di mantenere la crescita della radice in condizioni di alta salinità, è di forte interesse per la selezione di varietà "deep root" più resistenti alla salinità. In *Arabidopsis* la crescita della radice è regolata da citochinine attraverso l'attività della famiglia di *GH3*, enzimi che coniugano l'auxina in maniera irreversibile. Non è confermato però se i geni *GH3* e le citochinine siano coinvolti nella regolazione della crescita della radice anche in condizioni di stress salino. Durante questo progetto di tesi, quindi, si è cercato di identificare possibili geni candidati della famiglia di *GH3* e approfondire questa relazione tra membri della famiglia *GH3* di riso omologhi di *AtGH3.17* e il loro effetto su piante di *Arabidopsis* WT e mutanti.

All'inizio del tirocinio si è andati a osservare l'effetto di alte concentrazioni di NaCl e CKs sulle due varietà italiane di riso. Come da risultati precedenti si è osservato un effetto della salinità solo su Vialone Nano, mentre la citochinina ha influenzato negativamente la crescita della radice in tutte e due le varietà. Questo risultato è un ottimo punto di partenza per verificare se effettivamente le CKs hanno un effetto sulla crescita della radice anche in condizioni di stress. Per confermare questa ipotesi si è andati a effettuare un esperimento di comparazione tra le piante WT e *gh3.17* o *gh3.5* di *Arabidopsis*. In una prima replica non è stata osservata nessuna differenza significativa tra piante in condizioni di controllo e esposte a CKs, sia per le WT che per le mutanti. Successivamente si è cercato di rafforzare un possibile fenotipo discorde nei knockout con la riduzione del

saccarosio nel terreno. Questa modifica ha portato ad osservare che effettivamente la pianta mutante è insensibile alla citochinina, mentre la pianta WT presenta una diminuzione nella crescita della radice. Questi risultati sono in linea con quanto osservato in Baldo e Vialone Nano, portando perciò a poter dire anche in riso lo sviluppo della radice primaria è influenzato dalle citochinine. Resta però da dimostrare che il meccanismo d'azione delle citochinine agisca mediante enzimi della famiglia *GH3*, ovvero mediante regolazione del contenuto di auxina. Da considerare però che in questo esperimento comparativo si è notato un notevole calo di germinazione nelle piante knockout; perciò, sarebbe da indagare se questo fenomeno sia dovuto all'elevata concentrazione di CKs che influisce su processi fondamentali per la germinazione o al fatto che i semi non siano stati conservati o trasportati correttamente.

Dopo aver almeno ipotizzato la correlazione tra CKs e sviluppo della radice, ci siamo concentrati sulla famiglia di geni *GH3* che in *Arabidopsis* è coinvolta nella riduzione del contenuto di auxina attiva nelle cellule della transition zone (TZ), segnando così il confine tra cellule in attiva divisione e cellule in via di differenziamento. Dopo aver ricercato i geni candidati migliori da una ricerca bibliografica e da risultati di laboratorio precedenti, abbiamo ottenuto 5 geni target: *OsGH3.1*, *OsGH3.6*, *OsGH3.8*, *OsGH3.9* e *OsGH3.11*. Per tre di questi (*OsGH3.8*, *OsGH3.9* e *OsGH3.11*) sono stati analizzati i profili di espressione nelle radici in piante di Vialone Nano in condizioni di controllo, NaCl e CKs, i restanti geni e da piante di Baldo sono in fase di preparazione e analisi durante questa stesura. È stato osservato che il sale diminuiva in maniera significativa la trascrizione dei geni *OsGH3.9* e *OsGH3.11* mentre la citochinina sembra ridurre solo *OsGH3.9*. *OsGH3.8* sembrerebbe non essere regolato da nessuna delle due condizioni, ma i dati non sono molto buoni e l'analisi andrà ripetuta. La down regolazione dei geni è un risultato inatteso, perché ci si aspettava un'attivazione dei geni da parte della citochinina (Ruben et al., 2022). Guardando i dati in letteratura e analisi condotte in precedenza nel laboratorio dove ho svolto la tesi, questa differenza può essere spiegata con il fatto che gli esperimenti presentati in questa tesi sono stati effettuati crescendo le piante direttamente sul terreno contenente la citochinina, mentre gli esperimenti di riferimento erano condotti su radici già sviluppate e per brevi periodi (ore) e non per giorni.

Infine, è stato pensato e costruito un vettore per poter osservare l'effetto dei geni candidati in piante di *Arabidopsis* WT e mutanti (*gh3.17*). Successivamente, tramite *A. tumefaciens* le piante sono state trasformate e adesso sono in fase di selezione. Al termine della selezione e con piante omozigoti (T2) si potranno osservare i fenotipi, paragonarli con le piante WT e vedere se le piante hanno revertito dal fenotipo mutante.

In conclusione, questo lavoro di tesi ha cercato di capire la correlazione tra le citochinine e la risposta della pianta rivelando come anche in riso le citochinine regolino la crescita della radice, con un funzionamento simile rispetto a quello in *Arabidopsis*. Inoltre, l'analisi dei geni candidati della famiglia di *GH3* potrebbe confermare il loro ruolo nello sviluppo della radice grazie alla loro interazione con le CKs, difatti, anche se non regolati con gli effetti previsti, questo apre a possibilità di ricerca nuove. La down regolazione scoperta può essere dovuta a fenomeni di fluttuazione nelle tempistiche delle Cks o ai ritmi circadiani della pianta; perciò, analizzare l'espressione dei geni con tempistiche diverse potrebbe essere un approccio da seguire in futuro per comprendere meglio il meccanismo di regolazione. Inoltre, la complementazione in *Arabidopsis* potrà fornire nuove informazioni e delucidare il ruolo dei geni *GH3* di riso nello sviluppo della radice e confermare il funzionamento simile tra le due specie. Infine, l'ottenimento delle piante sovraesprimenti GH3.9 è di fondamentale importanza per la caratterizzazione di questo gene come marcatore di tolleranza al sale e il suo utilizzo nella selezione di varietà più resilienti in condizioni di alta salinità.

7. Sitografia e Bibliografia

<https://plants.ensembl.org>

www.fao.org

<https://www.qiagen.com>

<https://www.plantcelltechnology.com>

<https://www.ebi.ac.uk/interpro>

<https://esdac.jrc.ec.europa.eu>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

<https://international.neb.com>

<https://www.thermofisher.com>

<https://www.sigmaaldrich.com>

Fiji (imagej.net)

Tutti i siti elencati sono stati visitati nel periodo di ottobre e novembre 2022.

Brophy JAN, LaRue T, Dinneny JR. Understanding and engineering plant form. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. pag. 68-77. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.08.051. PMID: 28864344.

Chinnusamy, V., Schumaker, K., & Zhu, J. K. (2004). Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of experimental botany*, 55(395), 225-236.

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* Volume 15, Issue 4, April 2010, pag. 219-226.

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 MorphoPhysiological Responses. *Plants*, vol. 7(3), pag. 75.

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

Guerra, C.A., Rosa, I.M.D., Valentini, E. et al. Global vulnerability of soil ecosystems to erosion. *Landscape Ecol*, vol. 35, pag. 823–842 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10980-020-00984-z>

Hagen, G., & Guilfoyle, T. J. (1985). Rapid induction of selective transcription by auxins. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 5, pag. 1197–1203.

Hasan N, Choudhary S, Naaz N, Sharma N, Laskar RA. Recent advancements in molecular marker-assisted selection and applications in plant breeding programmes. *J Genet Eng Biotechnol*. doi: 10.1186/s43141-021-00231-1. PMID: 34448979; PMCID: PMC8397809.

Jain, Mukesh & Kaur, Navneet & Tyagi, Akhilesh & Khurana, Paramjit. (2006). The auxin-responsive GH3 gene family in rice (*Oryza sativa*). *Functional & integrative genomics*, vol. 6, pag. 36-46.

Jones, B., & Ljung, K. (2012). Subterranean space exploration: the development of root system architecture. *Current opinion in plant biology*, vol. 15, issue 1, pag. 97-102.

Kong W, Zhang Y, Deng X, Li S, Zhang C, Li Y. Comparative Genomic and Transcriptomic Analysis Suggests the Evolutionary Dynamic of GH3 Genes in Gramineae Crops. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2019.01297. PMID: 31681387; PMCID: PMC6803601.

Kong, W., Zhong, H., Deng, X., Gautam, M., Gong, Z., Zhang, Y., ... Li, Y. (2019). Evolutionary Analysis of GH3 Genes in Six *Oryza* Species/Subspecies and Their Expression under Salinity Stress in *Oryza sativa* ssp. *japonica*. *Plants*.

Konstantin Ivushkin, Harm Bartholomeus, Arnold K. Bregt, Alim Pulatov, Bas Kempen, Luis de Sousa (2019). Global mapping of soil salinity change. *Remote Sensing of Environment*, vol. 231.

Lalit M. Srivastava, *Plant Growth and Development: Hormones and Environment*, 2002.

Li X, Chen L, Forde BG, Davies WJ. The Biphasic Root Growth Response to Abscisic Acid in Arabidopsis Involves Interaction with Ethylene and Auxin Signalling Pathways. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2017.01493. PMID: 28890725; PMCID: PMC5574904.

Ljung, K., Hull, A. K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J., & Sandberg, G. (2005). Sites and Regulation of Auxin Biosynthesis in Arabidopsis Roots. *The Plant Cell*, vol. 17, pag. 1090–1104.

Maclean, J., Hardy, B., & Hettel, G. (2013). *Rice Almanac: Source book for one of the most important economic activities on earth.* IRRI

Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, vol. 58 pag. 651–681.

Munns, R., Schachtman, D., & Condon, A. (1995). The Significance of a Two-Phase Growth Response to Salinity in Wheat and Barley. *Functional Plant Biology*, vol. 22, pag. 561.

Peter M. Kopittke, Neal W. Menzies, Peng Wang, Brigid A. McKenna, Enzo Lombi (2019). Soil and the intensification of agriculture for global food security. *Environment International*, vol. 132.

Ray, D. K., Mueller, N. D., West, P. C., & Foley, J. A. (2013). Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. *PLoS ONE*.

Ruben C. S., Mateo-Bonmatí E, Šimura J, Pěňčík A, Novák O, Staswick P, Ljung K. Inactivation of the entire Arabidopsis group II GH3s confers tolerance to salinity and water deficit. *New Phytol.* 2022 Jul;235(1):263-275. doi: 10.1111/nph.18114. Epub 2022 Apr 16. PMID: 35322877; PMCID: PMC9322293.

Taiz, L. and Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. 3rd Edition, Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, MA, USA.

Terol J, Domingo C, Talón M. The GH3 family in plants: genome wide analysis in rice and evolutionary history based on EST analysis. *Gene*. 2006 Apr

26;371(2):279-90. doi: 10.1016/j.gene.2005.12.014. Epub 2006 Feb 20. PMID: 16488558.

Todaka, D., Nakashima, K., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). Toward understanding transcriptional regulatory networks in abiotic stress responses and tolerance in rice.

Umar, O. B. , Ranti, L. A. , Abdulbaki, A. S. , Bola, A. L. , Abdulhamid, A. K. , Biola, M. R. , & Victor, K. O. (2021). Stresses in Plants: Biotic and Abiotic. Current Trends in Wheat Research. <https://doi.org/10.5772/intechopen.100501>

Zeng, L., Shannon, M. & Grieve, C. Evaluation of salt tolerance in rice genotypes by multiple agronomic parameters. *Euphytica* vol. 127, pag. 235–245 (2002). <https://doi.org/10.1023/A:1020262932277>

Zhang C, Zhang L, Wang D, Ma H, Liu B, Shi Z, Ma X, Chen Y, Chen Q. Evolutionary History of the Glycoside Hydrolase 3 (GH3) Family Based on the Sequenced Genomes of 48 Plants and Identification of Jasmonic Acid-Related GH3 Proteins in *Solanum tuberosum*. *Int J Mol Sci*. 2018. doi: 10.3390/ijms19071850. PMID: 29937487; PMCID: PMC6073592.