

Università degli Studi di Padova

Facoltà di Scienze MM.FF.NN

Laurea di Primo Livello in Biotecnologie.

Elaborato di Laurea

“Miglioramento della resistenza allo stress idrico in piante geneticamente modificate”

Relatore: Prof. Livio Trainotti
Dipartimento di Biologia

Laureando: Ghelli Filippo

Anno Accademico 2006/2007

*...Se
puoi sforzare il tuo cuore, nervi e muscoli
per servire al tuo scopo ben al di là delle loro possibilità
e così andare avanti quando più nulla in te
tranne la Volontà dice loro "tieni duro!"...*

Rudyard Kipling

SOMMARIO

SOMMARIO	3
ABBREVIAZIONI	4
1. INTRODUZIONE	5
2. LA RISPOSTA DELLA PIANTA AGLI STRESS IDRICI	9
2.0 DEFICIT IDRICO E STRATEGIE DI RESISTENZA ALLO STRESS.....	9
2.1 PRIMA LINEA DI DIFESA: CHIUSURA DEGLI STOMI	11
2.2 SECONDA LINEA DI DIFESA: LIMITAZIONE DELL'AREA FOGLIARE.....	13
2.3 TERZA LINEA DI DIFESA: L'ACCRESIMENTO RADICALE	14
2.4 POTENZIALE IDRICO E REGOLAZIONE OSMOTICA	15
2.5 STRESS IDRICO E DISSIPAZIONE ENERGIA FOGLIARE.....	16
2.6 DEPOSIZIONE DI CERE	17
2.7 METABOLISMO ACIDO DELLE CRASSULACEE	17
3. MODIFICAZIONI BIOTECNOLOGI CHE INDUCONO LA SOVRAESPRESSIONE DI SOLUTI BIOCOMPATIBILI	18
3.1 GLICINABETAINA	18
3.2 PROLINA	22
3.3 POLIAMMINE	23
3.4 MANNITOLO	24
3.5 TREALOSIO.....	27
3.6 FRUTTANI	28
3.7 D-ONONITOLO	28
3.8 SORBITOLO	29
4. MODIFICAZIONI BIOTECNOLOGICHE CHE INDUCONO LA SOVRAESPRESSIONE DI PROTEINE COINVOLTE NELLA RESISTENZA ALLO STRESS IDRICO	31
4.2 DEIDRINE.....	34
4.3 PROTEINE HS (heat shock)	35
4.4 PROTEINE CANALE PER L'ACQUA: LE AQUAPORINE	35
4.5 FATTORI DI TRASCRIZIONE	37
5. PROGRESSI FUTURI	40
6. REFERENZE BIBLIOGRAFICHE	43
7. RINGRAZIAMENTI	45

ABBREVIAZIONI

ABA: acido abscissico; ABRE: elementi sensibili all'ABA; ADC: arginina decarbossilata; BADH: betainaldeide deidrogenasi; CBF: proteina legante fattore C; CDH: colina deidrogenasi; CMO: colina monoossigenasi; COD: colina ossidasi; COR: proteina regolatrice negli stress da freddo; DREB: proteina legante elementi sensibili la deidratazione; P5C: Δ^1 pirrolico-5-carbossilato R: riduttasi S: sintasi; S6PDH: sorbitolo-6-fosfato deidrogenasi; SAMDC: S-adenosinmetionina decarbossilata; WUE: efficienza dell'uso dell'acqua;

1. INTRODUZIONE

L'attuale situazione ambientale, il venire sempre meno di risorse idriche naturali, i recenti e repentini cambiamenti climatici stanno determinando un impatto atipico sul territorio e di conseguenza sulla produttività delle piante coltivate. La conseguenza della mancanza di acqua è la desertificazione, la quale causa una diminuzione della produttività economica e biologica in zone climaticamente aride. Le conseguenze di questo cambiamento sono: l'erosione, la degradazione dei suoli, la salinizzazione, la deforestazione e la perdita di biodiversità. Una recente analisi delle serie storiche termo-pluviometriche italiane ha mostrato un rilevante aumento delle temperature annue (0,4°C al nord, 0,7°C al sud) e una diminuzione delle precipitazioni in particolare nelle zone meridionali (Brunetti et al. 2000). Nelle regioni aride e semi-aride la variabilità dei fattori ambientali e meteorologici sono elementi chiave per determinare la produzione agricola. In queste regioni la variabilità interautunnale del clima rappresenta il principale fattore di rischio per le colture e la produzione agricola. Parry e Carter (1988) e Rosenzweig (1982) hanno evidenziato la difficoltà di attuare delle valutazioni climatiche in scala locale legate alle colture e alle aree agricole. Il Rapporto, pubblicato dalla Commissione Europea il 10 gennaio 2007 "Limiting Global Climate Change to 2 degrees Celsius. The way ahead for 2020 and beyond", nel capitolo 4 "Cost of action of Europe" attraverso il progetto PESETA del JRC, mette in rapporto l'impatto del cambiamento climatico e l'agricoltura. I cambiamenti climatici, previsti



Figura 1: pianta di frumento in sofferenza per mancanza di acqua

dal 2020 al 2080 nelle aree del sud Europa, determinerebbero una diminuzione della produttività agricola compresa tra 1,9% e 22,4% causando una diminuzione del periodo di crescita, eventi estremi più frequenti durante le fasi del ciclo riproduttivo, precipitazioni intense durante la semina, stress da calore durante la fioritura e lunghi periodi asciutti. La mancanza di acqua può portare ad un

ulteriore stress dovuto all'aumento della salinità del terreno che limita la produttività e la crescita delle piante coltivate: attualmente circa il 23% della superficie mondiale è considerata salina. Le piante, a livello fisiologico, subiscono tre tipi di danni: osmotico, nutrizionale e tossico ed a questi si aggiungono quelli da asfissia radicale causati dalla riduzione della permeabilità dei terreni. I danni osmotici, legati al potenziale idrico del terreno, provocano una riduzione del turgore cellulare che comporta alterazione dei processi metabolici e inibizione della crescita. Lo stress nutrizionale è, invece, determinato dalla competizione ionica nei processi di assorbimento a livello radicale e da ultimo il danno tossico che influisce sia sulla funzionalità di membrana alterandone la permeabilità ed il trasporto, sia sulle attività enzimatiche danneggiando i processi metabolici quali fotosintesi e respirazione.

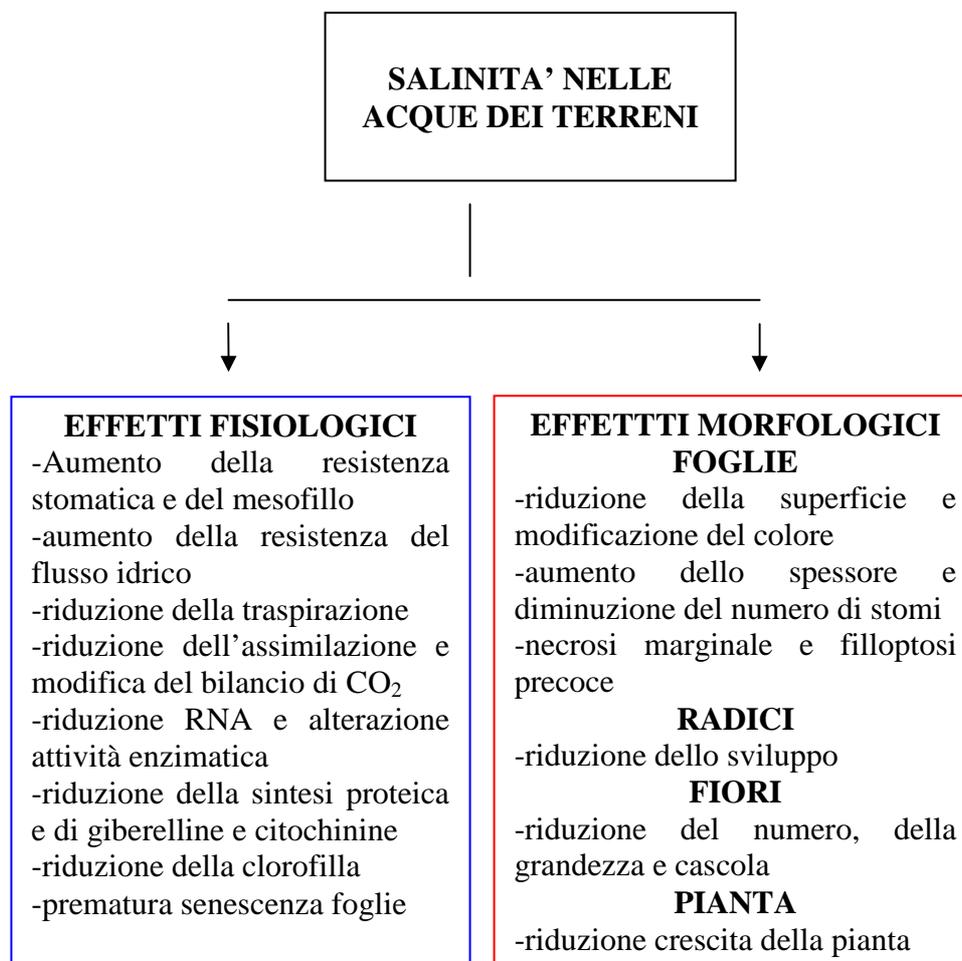


Figura 2: Effetti della salinità a livello fisiologico e morfologico nella pianta

Si può affermare quindi che la crescita e la produttività delle piante da raccolto dipendano largamente dalla loro vulnerabilità agli stress ambientali. Alta salinità, assenza di acqua e alte temperature sono le maggiori condizioni di stress che limitano la produzione agricola (Boyer 1982). Le piante rispondono a questi stress attraverso un insieme di adattamenti biochimici e fisiologici, che coinvolgono le funzioni di molti geni legati allo stress. Qualsiasi tentativo per migliorare la tolleranza agli stress richiede una migliore comprensione degli eventi fisiologici, biochimici e molecolari fondamentali (Cherian and Reddy 2003). Vari approcci sono stati testati, per la produzione di piante tolleranti, mediante l'uso di metodiche genetiche classiche ma anche migliorando le tecniche di coltura. La strategia usata nel trasferire geni dalle piante selvatiche, più resistenti, alle rispettive piante coltivate usando metodi di genetica classica ha dato limitati successi (Flowers and Yeo 1995). L'ingegneria genetica, attraverso l'introduzione di nuove vie per la biosintesi di vari soluti compatibili e costitutivi, ha segnato un passo in avanti per migliorare la tolleranza agli stress in piante transgeniche (Chen e Murata 2002). Le risposte delle piante variano in presenza delle diverse condizioni di stress, anche se spesso differenti tipi di stress conducono a risposte identiche o simili. A livello cellulare, stress abiotici, specialmente deficienza di acqua (siccità e salinità), causano una diminuzione del potenziale di pressione. I soluti, concentrati nella cellula, sono legati alla perdita di acqua e sono attivamente accumulati per mantenere il citoplasma osmoticamente equilibrato. L'adattamento osmotico è, perciò, uno dei maggiori componenti della tolleranza agli stress abiotici e contribuisce al mantenimento del potenziale di pressione. I principali soluti che sono impiegati nell'adattamento osmotico includono varie ammine quaternarie, amminoacidi oppure zuccheri alcolici. L'accumulo di questi osmoliti facilita la ritenzione idrica nel citoplasma, la protezione di membrane, di complessi proteici, e strutture cellulari. Inoltre, le cellule delle piante contengono sistemi enzimatici antiossidanti, perossidasi e superossidi dismutasi i quali rimuovono gli intermedi delle reazioni ossigeniche e provvedono alla protezione contro stress ossidativi. E' certa la conoscenza di vie biochimiche che conducono alla produzione di questi osmoprotettivi (Kavi Kishor et al. 1995, Hayashi et al. 1997). Parecchie sequenze di questi enzimi sono state clonate e l'espressione di specifici geni hanno indicato che la tolleranza è conferita da meccanismi codificati

geneticamente. Molte sono le proposte di strategie transgeniche per migliorare la resistenza agli stress nelle piante; un esempio è il trasferimento di geni coinvolti nella sintesi di osmoliti (Kavi Kishor *et al.* 1995, Hayashi *et al.* 1997), mentre un altro metodo è isolare e trasferire i geni direttamente implicati nella tolleranza agli stress come ad esempio i geni allotolleranti (Serrano and Gaxiola 1994, Cervera *et al.* 2000). Similarmente, il trasferimento di geni LEA (proteine presenti nella tarda embriogenesi) (Wu and Ho 1997), l'introduzione di protein chinasi o di geni calcio/calmodulina dipendenti (Pardo *et al.* 1998, Sheen 1998) hanno risposto positivamente per migliorare la resistenza a stress idrici nelle piante. Questo lavoro limiterà la discussione all'ingegnerizzazione delle piante transgeniche per il miglioramento della tolleranza agli stress di disidratazione, particolarmente provocate da salinità e siccità, con particolare rilievo ai geni per la biosintesi di osmoliti.

2. LA RISPOSTA DELLA PIANTA AGLI STRESS IDRICI

2.0 DEFICIT IDRICO E STRATEGIE DI RESISTENZA ALLO STRESS

E' bene iniziare la discussione sugli stress dandone la giusta definizione. Lo stress è solitamente definito come un fattore negativo esterno che esercita un'influenza svantaggiosa sulla pianta. Lo stress è considerato in merito alla sopravvivenza della pianta, alla resa delle colture, alla crescita o ai processi di assimilazione primaria che comunque sono in generale correlati alla crescita. Un ambiente stressante per una pianta può non esserlo per un'altra: ad esempio, il pisello (*Pisum sativum*) e la soia (*Glycine max*) che rispettivamente hanno una crescita ottimale a circa 20° C e 30° C, man mano che la temperatura aumenta il pisello mostra segni di stress da calore molto più velocemente di quanto non lo faccia la soia; quest'ultima mostra quindi una superiore tolleranza allo stress da calore. Se la tolleranza aumenta in seguito ad uno stress precedente, la pianta è detta acclimatata. L'acclimatazione deve essere distinta dall'adattamento; quest'ultimo è un determinato livello di resistenza acquisito geneticamente durante la selezione, attraverso le generazioni.

Nel caso di stress idrici, ossia in condizioni di siccità, la pianta mette in gioco alcuni meccanismi per contrastare il processo di mancanza di acqua: si deve fare una distinzione tra disidratazione ritardata (abilità a mantenere i tessuti idratati) e tolleranza alla disidratazione (abilità a funzionare durante la disidratazione) perchè spesso si definiscono erroneamente come tolleranti alla siccità a potenziali idrici rispettivamente alti e bassi. La vecchia letteratura indicava "evitazione della siccità" contrapposta a "tolleranza alla siccità", ma tale terminologia risulta essere inappropriata in quanto la siccità è una condizione meteorologica tollerata da tutte le piante che riescono a sopravvivere ad essa e che nessuna pianta può evitare. Esiste una categoria, la fuga dalla siccità, che comprende quelle piante che compiono il loro ciclo biologico durante la stagione umida, prima dell'arrivo della siccità.

Le piante, in base a quanto appena enunciato, possono essere classificate in tre gruppi a seconda delle condizioni idriche richieste per il normale

completamento del loro ciclo vitale. La prima classe è quella delle xerofite che richiedono un basso consumo di acqua e sono originarie di zone estremamente aride. Il loro punto di appassimento è a -70 bar. La seconda classe è quella delle mesofite, piante che vivono in zone temperate, con moderati apporti di acqua, il loro punto di appassimento è a -15 bar (ma possono arrivare anche a -30 bar). Infine la terza classe è quella delle idrofite, piante amanti dell'acqua, sono abituate alla sommersione parziale o completa e non sono in grado di crescere al di sotto del punto di appassimento di -5/-10 bar.

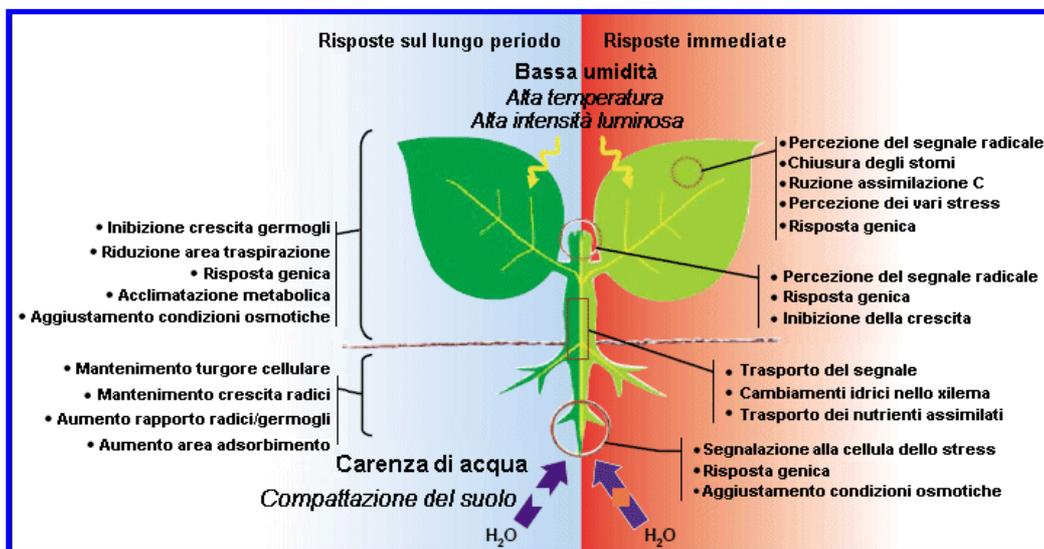


Figura 3: Risposta della pianta a stress abiotici

Vi sono delle zone del mondo, ad esempio il deserto sahariano, dove la quantità di acqua ricevuta dal terreno è pari a zero. Questa situazione è sicuramente atipica se prendiamo in considerazione il resto del mondo, ma nonostante ciò, la maggior parte dell'agricoltura mondiale presenta il problema della carenza di acqua. Anche nelle regioni umide vi sono problemi, a causa di una distribuzione irregolare delle piogge durante l'anno (Boyer 1982). La mancanza di acqua provoca effetti negativi alla crescita della pianta. Una pianta in grado di acquisire più acqua, o che possiede una migliore efficienza di utilizzo dell'acqua, avrà una migliore resistenza allo stress idrico. Alcune piante si adattano meglio alla mancanza di acqua, come i particolari metabolismi C4 e CAM, in quanto permettono loro di sfruttare ambienti più aridi; altre piante, invece, possiedono meccanismi di acclimatazione che vengono attivati in risposta allo stress idrico. Quando la mancanza di acqua procede lentamente fino a causare cambiamenti nei processi di

sviluppo, essa produce effetti negativi sulla crescita della pianta. Particolarmente importante è la limitata espansione fogliare: se le precipitazioni sono solo primaverili ed invernali la crescita veloce può portare a grandi superfici fogliari e precoci esaurimenti idrici con la conseguente impossibilità a completare il ciclo vitale; saranno, perciò, avvantaggiate quelle piante che presentano la capacità di conservare quantitativi idrici sufficienti al completamento del loro ciclo vitale oppure quelle piante che completano il loro ciclo vitale prima dell'arrivo della siccità (fuga dalla siccità). Una pianta con grande area fogliare sarà avvantaggiata da piogge estive copiose anche se sporadiche e sarà in grado di acclimatarsi a questo ambiente. Queste piante si definiscono ad accrescimento indeterminato rispetto a piante che presentano un accrescimento determinato con un numero stabilito di fiori e foglie in periodi brevi. Ad esempio c'è differenza di crescita tra il sorgo (*Sorghum bicolor*) ed il mais (*Zea mays*). Il sorgo è più resistente alla siccità rispetto al mais perché sviluppa facilmente germogli secondari che gli permettono di crescere e fiorire dopo che il germoglio principale è andato a maturazione, mentre il mais non è in grado di costituire germogli secondari quindi se non avviene la fruttificazione, per assenza di acqua, la pianta non ha la possibilità di recuperarne le perdite, anche con la presenza di piogge

2.1 PRIMA LINEA DI DIFESA: CHIUSURA DEGLI STOMI

Quando l'inizio dello stress è più rapido, o avviene a completa espansione fogliare, intervengono risposte che permettono alla pianta di proteggersi dalla disidratazione immediata come la chiusura degli stomi mediante i quali riduce l'evaporazione dalla superficie fogliare: la loro chiusura può essere considerata la prima linea di difesa contro la siccità. L'entrata e l'uscita di acqua dalle cellule di guardia ne cambia il turgore e modula la chiusura e l'apertura degli stomi. La possibilità con cui gli stomi si possono chiudere è legata all'esposizione delle cellule di guardia all'atmosfera con una conseguente variazione nella perdita di acqua per evaporazione. Questo meccanismo determina la chiusura idropassiva degli stomi. Altro ulteriore meccanismo di chiusura degli stomi è la cosiddetta chiusura idroattiva e avviene quando la foglia intera o la radice si disidratano. Ciò dipende dai processi metabolici delle cellule di guardia. Il meccanismo di perdita

dei soluti dalle cellule di guardia è innescato dalla diminuzione dello stato idrico del resto della foglia. Ci sono prove evidenti che l'acido abscissico abbia una funzione importante in questo processo. Un effetto della disidratazione è quello dell'abbassamento del pH dello stroma, che permette la liberazione di una certa quantità di ABA. Il processo di redistribuzione dell'ABA dipende dai gradienti di pH all'interno della foglia, dalle proprietà di acido debole dell'acido abscissico e

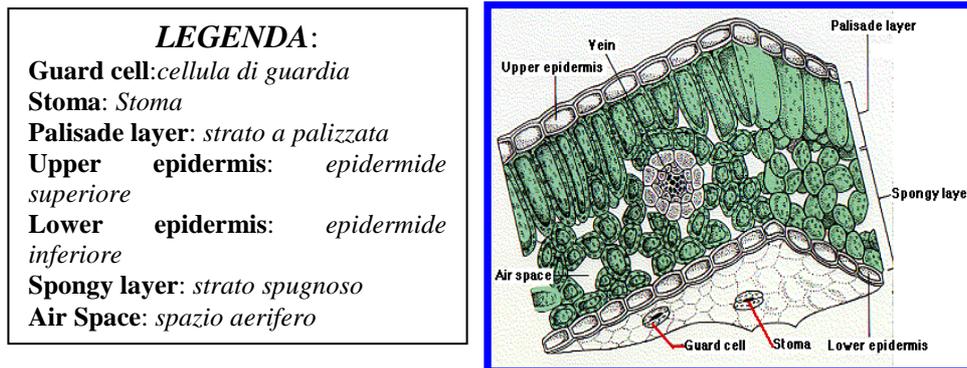


Figura 4 : Sezione di una foglia

dalla proprietà di permeabilità delle membrane cellulari. Accoppiato a questo processo vi è l'aumento del pH dell'apoplasto. Questi cambiamenti concomitanti causano, durante il deficit idrico, il trasferimento netto dell'ABA dai plastidi all'apoplasto (Hartung *et al.* 1988).

Le risposte degli stomi alla disidratazione fogliare variano ampiamente sia fra le varie specie che all'interno di una stessa specie. Messaggeri provenienti dal sistema radicale possono influire sulle risposte stomatiche allo stress idrico. Ci sono due dimostrazioni che determinano la presenza di messaggeri radicali: la prima è legata alla conduttanza stomatica ed è più spesso correlata alla presenza di acqua nel suolo piuttosto che allo stato idrico della foglia: l'impianto radicale è l'unica componente che può essere direttamente influenzata dallo stato idrico del suolo. La seconda è legata al fatto che le radici producono e rilasciano nel succo xilematico acido abscissico. Queste prove ci portano a concludere che gli stomi durante la siccità del suolo rispondono a due tipi di segnali: il primo è legato all'ABA della radice ed è un sistema di allarme precoce che indica che le radici cominciano a seccarsi; il secondo è legato alla traslocazione dell'ABA all'interno della radice che si sta seccando.

La velocità fotosintetica della foglia risponde raramente a moderati stress idrici al contrario dell'espansione fogliare: questo perchè la fotosintesi è molto meno sensibile al turgore di quanto non lo sia l'espansione fogliare.

Inoltre, durante lo stress idrico, la concentrazione di Mg^{2+} dei cloroplasti può influire sulla fotosintesi attraverso il suo ruolo nell'accoppiamento tra il trasporto elettronico e la produzione di ATP.

Lo stress idrico influisce, poi, sia sulla conduttanza stomatica, e in parte, anche sull'attività fotosintetica della foglia. Al momento della chiusura degli stomi, durante le prime fasi dello stress idrico, l'efficienza del utilizzo dell'acqua può aumentare poiché la chiusura degli stomi inibisce la traspirazione. Le limitazioni stomatiche alla fotosintesi possono essere superate attraverso una maggiore concentrazione esterna di CO_2 , ma qualsiasi effetto diretto dello stress idrico sul metabolismo del mesofillo non sarà evitato all'esposizione di alte concentrazioni di CO_2 .

Altra questione critica riguarda la possibilità che il processo di stress influisca o meno direttamente sulla traslocazione. Il trasporto del floema nei tessuti pozzo è accoppiato alla fotosintesi, che provvede sia ai substrati che al metabolismo. Lo stress idrico diminuisce la fotosintesi e il consumo di assimilati nelle foglie in espansione, di conseguenza diminuisce indirettamente la quantità di fotosintati che vengono esportati dalle foglie.

Alcuni esperimenti hanno dimostrato che solo alla fine del periodo di stress la traslocazione viene influita quando, altri processi come la fotosintesi, sono stati fortemente inibiti.

2.2 SECONDA LINEA DI DIFESA: LIMITAZIONE DELL'AREA FOGLIARE

Il processo che determina una riduzione dell'area fogliare non è legato a cambiamenti chimici ma piuttosto a reazioni biologiche. Quando il contenuto idrico della pianta diminuisce, le cellule rimpiccioliscono perchè la parete cellulare si affloscia in conseguenza ad una diminuzione della pressione di turgore: questa diminuzione determina un aumento della concentrazione dei soluti all'interno della cellula. Una prima conseguenza è legata alla membrana plasmatica, la quale diventa più spessa, poiché ricopre una superficie più piccola.

La perdita del turgore cellulare è il secondo effetto della mancanza di acqua. L'inibizione dell'espansione cellulare si verifica con un rallentamento dell'espansione fogliare che si manifesta all'inizio del deficit idrico. Un'area fogliare più piccola traspira meno acqua e in tal modo riesce a mantenerla per poi utilizzarla per un periodo più lungo. La limitazione dell'area fogliare è quindi la seconda linea di difesa contro la siccità.

Lo stress, inoltre, diminuisce l'estendibilità della parete poiché inibisce il trasporto di protoni dalla membrana plasmatica verso la parete cellulare innalzando il pH di quest'ultima. Piante che soffrono per mancanza di acqua diurna tendono a reidratarsi durante la notte e con sostanziale crescita notturna delle foglie.

Lo stress idrico non limita solo la dimensione delle singole foglie, ma anche il numero di foglie di una pianta ad accrescimento indeterminato, poiché diminuisce sia la velocità di crescita sia il numero di rami. Il processo di crescita del fusto è stato meno studiato in rapporto alle conoscenze ottenute dell'espansione fogliare.

Le piante stressate per mancanza di acqua, dopo un notevole sviluppo della superficie fogliare, vanno incontro a senescenza fogliare con eventuale caduta delle foglie. Questa calibrazione dell'area fogliare migliora la capacità di una pianta di adattarsi ad un ambiente con limitata disponibilità di acqua.

2.3 TERZA LINEA DI DIFESA: L'ACCRESIMENTO RADICALE

Moderati deficit idrici influiscono sullo sviluppo del sistema radicale. Quando l'assorbimento dell'acqua diminuisce, il processo di espansione fogliare viene precocemente inibito, ma lo è molto di meno l'attività fotosintetica. Un'ulteriore crescita del sistema radicale, risultato di una omogenea distribuzione dei composti assimilati, è la conseguenza dell'inibizione dell'espressione fogliare con una riduzione del consumo di energia e di carbonio. Tutti questi fattori portano alla crescita delle radici nelle zone del suolo che rimangono umide. Per questo motivo la crescita delle radici in un suolo umido è considerata la terza linea di difesa contro la siccità. Un aumento della crescita radicale in zone di terreno umido, durante lo stress, dipende dall'allocazione dei composti assimilati negli apici radicali in via di crescita. Per questo motivo l'assorbimento maggiore di quantità

di acqua della radice è meno pronunciato in piante in fase riproduttiva che in fase vegetativa. La pianta, durante la fase riproduttiva, è più sensibile allo stress idrico perché vi è una accentuata competizione per i composti assimilati tra la radice e i frutti.

2.4 POTENZIALE IDRICO E REGOLAZIONE OSMOTICA

Le piante possono continuare ad assorbire acqua solo fino a quando il loro potenziale idrico è minore di quello della sorgente d'acqua. La regolazione osmotica è il processo mediante il quale il potenziale idrico può essere abbassato senza una corrispondente diminuzione del turgore. La regolazione osmotica non deve essere confusa con l'incremento della concentrazione dei soluti che avviene durante la disidratazione e l'afflosciamento cellulare. La regolazione osmotica è, invece, l'aumento netto della quantità di soluto per cellula, indipendentemente dai cambiamenti di volume che avvengono a causa della perdita di acqua. La maggior parte delle regolazioni osmotiche possono dipendere dagli aumenti di concentrazione di una determinata quantità di soluti comuni come gli zuccheri, gli amminoacidi, e gli ioni. Gli enzimi estratti dal citosol di cellule vegetali si dimostrano molto inibiti da alte concentrazioni di ioni. A causa della compartimentazione degli ioni, una determinata quantità di soluti può accumularsi nel citosol in modo da mantenere l'equilibrio del potenziale idrico all'interno della cellula. Questi soluti sono chiamati soluti compatibili e sono composti organici che non interferiscono con le funzioni enzimatiche. I soluti compatibili più ampiamente studiati sono la glicinabetaina, la prolina, le poliammine e alcune molecole che fanno parte del metabolismo dello zucchero come il mannitolo, i fruttani, il trealosio, e il D-ononitolo. La sintesi di soluti compatibili è importante nella regolazione che le piante attuano in risposta all'aumento della salinità nelle zone di radicazione. La regolazione osmotica che avviene nei meristemi radicali, aumentando il turgore e mantenendo l'accrescimento della radice, è una componente importante nei cambiamenti dei modelli di crescita della radice durante i periodi di siccità. Non è ancora chiaro se la regolazione osmotica sia o meno una risposta allo stress idrico o se sia invece il risultato di qualche altro fattore come la diminuzione della capacità di crescita. La regolazione osmotica

avviene anche a livello radicale anche se il processo non è stato studiato così in dettaglio come per le foglie. Tentativi per aumentare la regolazione osmotica nelle foglie, sia genetici che fisiologici, hanno avuto come risultato piante con crescita lenta.

2.5 STRESS IDRICO E DISSIPAZIONE ENERGIA FOGLIARE

Quando lo stress idrico limita la traspirazione, la foglia si riscalda, a meno che altri processi ne controbilancino la perdita di raffreddamento. A causa di queste interazioni, lo stress idrico e lo stress da calore risultano essere strettamente correlati. Per mantenere una foglia molto più fresca dell'aria è necessaria l'evaporazione di una grande quantità di acqua. In tal modo gli adattamenti che raffreddano le foglie tramite altre strategie aumentano l'efficacia della conservazione dell'acqua. Quando la traspirazione si abbassa ed aumenta la temperatura della foglia una determinata quantità extra di energia fogliare viene dissipata sotto forma di perdita di calore. Foglie piccole, a causa della loro scarsa resistenza allo strato limite, tendono a rimanere chiuse a temperatura ambiente anche quando la traspirazione è fortemente ridotta. Foglie grandi posseggono spessi strati limite e dissipano meno energia termica attraverso il trasferimento diretto. Questa limitazione può essere compensata dai movimenti della foglia che permettono un'ulteriore protezione dal calore durante lo stress idrico. Al punto permanente di appassimento l'acqua che raggiunge la foglia è troppo lenta per permettere una reidratazione notturna delle piante che si sono appassite durante il giorno. Durante la disidratazione numerosi fattori possono contribuire all'aumento della resistenza delle piante al flusso d'acqua. Quando l'avvizzimento diurno delle radici diventa pronunciato, la superficie radicale può allontanarsi dalle particelle del suolo che trattengono l'acqua e i peli radicali possono essere asportati e quindi danneggiati. Da non sottovalutare è la cavitazione o rottura della colonna di acqua sotto pressione. La cavitazione inizia nella maggior parte delle piante a potenziali idrici abbastanza moderati e vasi più grandi cavitano prima. Ad esempio, negli alberi a porosità anulare come la quercia, i vasi di largo diametro vengono depositati in primavera e fungono da via a bassa resistenza con una grande disponibilità di acqua mentre cessano di funzionare in estate, lasciando a quelli

più piccoli il compito di trasportare il flusso. Questo scambio ha un effetto a lungo termine in quanto anche se la pianta viene nuovamente innaffiata la via originale rimane non funzionante, riducendo l'efficacia del flusso di acqua.

2.6 DEPOSIZIONE DI CERE

Una risposta comune dello sviluppo durante lo stress idrico è la produzione di una spessa cuticola che riduce la perdita di acqua dall'epidermide. Una spessa cuticola blocca anche il passaggio di CO₂ ma ciò non influisce sulla fotosintesi fogliare. L'evaporazione cuticolare rappresenta il 5-10% della traspirazione fogliare totale diventando significativa solo se lo stress è estremamente pronunciato o se la cuticola viene danneggiata.

2.7 METABOLISMO ACIDO DELLE CRASSULACEE

Il metabolismo acido delle Crassulacee (CAM) è un esempio di adattamento nel quale gli stomi si aprono di notte e si chiudono di giorno. Come risultato, l'efficienza di utilizzo dell'acqua delle piante CAM risulta tra le più alte che si possano misurare nelle piante superiori. Il fenomeno CAM è caratteristico di molte piante succulente come i cactus. Alcune specie succulente possono essere CAM facoltative, innescando il meccanismo quando sono sottoposte a deficit idrico o a condizioni saline (Hanscom e Tig 1978). Questo scambio di metabolismo è piuttosto complesso. .

3. MODIFICAZIONI BIOTECNOLOGI CHE INDUCONO LA SOVRAESPRESSIONE DI SOLUTI BIOCAMPATIBILI

Sono stati fatti vari tentativi a livello biotecnologico per ottenere piante transgeniche con una migliore tolleranza agli stress abiotici e in particolare a stress idrici. Sono stati studiati alcuni composti che prendono il nome di soluti compatibili i quali hanno un ruolo importante nella protezione della pianta a tali stress e tra questi i più studiati sono la glicinabetaina, la prolina, le poliammine e alcuni componenti del metabolismo degli zuccheri come il mannitolo, il trealosio, il D-ononitolo, i fruttani e il sorbitolo.

3.1 GLICINABETAINA

La glicinabetaina (GB) è una molecola con un azoto quaternario, completamente metilato, e si trova in natura in alcuni gruppi di piante, in alcuni animali e in vari microrganismi (Rhodes and Hanson 1997, Jagendorf and Takabe 2001). Ad alte concentrazioni non interferisce con le funzioni citoplasmatiche e stabilizza la struttura e la funzione di molte macromolecole. Essa perciò appartiene ad un gruppo di composti che sono collettivamente conosciuti come soluti compatibili. La GB sembra essere un determinante critico per la tolleranza agli stress nelle piante. Studi fisiologici su piante transgeniche hanno suggerito che GB può accelerare la sintesi proteica *de novo* durante l'adattamento e il recupero dallo stress (Alia *et al*). Furono studiate delle trasformazioni di piante con lo scopo di modificare le vie della biosintesi della glicinabetaina. L'alterazione della sintesi di quest'ultima è possibile cambiando 1) la via colina monossigenasi/betaina aldeide deidrogenasi (CMO/BADH), 2) via colina deidrogenasi/betaina aldeide deidrogenasi (CDH/BADH), 3) via diretta colina ossigenasi (COD). Tra queste diverse strategie la COD presenta chiaramente un maggiore vantaggio rispetto alla CMO/BADH e alla CDH/BADH perché in essa vi è un singolo step per la conversione della colina a glicinabetaina ed inoltre non richiede nessun cofattore per questa catalisi. Per esempio, sono stati descritti cianobatteri transgenici e piante transgeniche, la cui sintesi di glicinabetaina veniva determinata dalla via

COD, con resistenza al freddo, alla siccità e al calore (Deshnium *et al.* 1996, Nomura *et al.* 1995, Huang *et al.* 2000). Allo stesso modo, il gene *betA* di *E. coli*, che codifica la colina deidrogenasi, è stato introdotto in piante di tabacco ottenendo un aumento della tolleranza salina (Lilius *et al.* 1996). Gao *et al.* (2000) ha riportato un successo nella trasformazione e rigenerazione di una pianta legnosa: il caco giapponese. L'integrazione di *codA* in *Brassica juncea* ha permesso di migliorare la tolleranza allo stress salino (Prasad *et al.* 2000). Inoltre in piante con sovraespressione del gene *codA* è stato riportato un miglioramento alla tolleranza salina, ad elevate temperature, al congelamento e al freddo (Hayashi *et al.* 1997, Alia *et al.* 1998, Sakamoto *et al.* 1998, 2000). Il possibile meccanismo dell'azione di GB nelle piante potrebbe essere, in molti casi, la stabilizzazione della struttura e della funzione delle proteine, nel momento in cui la concentrazione raggiunta viene considerata insufficiente per gli aggiustamenti osmotici (Takabe *et al.* 1998). GB potrebbe avere un ruolo più importante nella protezione di membrane e macromolecole a causa degli effetti negativi dello stress. Piante da raccolto come patata e riso generalmente non accumulano glicinabetaina. Applicazioni estese di GB hanno mostrato un incremento della tolleranza al congelamento, al freddo e ad allo stress salino in piante transgeniche. Nakamura *et al.* (1997), Hayashi *et al.*(1998). Sakamoto *et al.* (1998) hanno riportato dei successi creando piante di riso transgenico con produzione in eccesso di glicinabetaina, Holmstrom *et al.* (2000) ci ha fatto conoscere che l'accumulo di betaina, in tabacco transgenico, è determinato dall'espressione di due geni *betA* e *betB* di *E. coli*. È stato mostrato che linee transgeniche che esprimono solo *betA* accumulano betaina 2-3 volte in più rispetto a piante transgeniche che esprimono entrambi i geni. Queste linee transgeniche incrementano resistenza agli stress salini ed accrescimento della tolleranza alla fotoinibizione a bassa temperature. In varie condizioni di stress, GB protegge il fotosistema 2 (PS 2) in cellule transgeniche di *Synechococcus* e in piante superiori (Deshnium *et al.* 1997, Alia *et al.* 1999, Holmstrom *et al.* 2000) Il ruolo di GB nella protezione dell'integrità della membrana è stato determinato osservando l'accrescimento della tolleranza agli stress termici e l'inibizione nei semi. (Alia *et al.* 1998). Il coinvolgimento di GB è riscontrato nella protezione dei meccanismi trascrizionali e di traduzione, in

condizioni di stress (Rajendrakumar *et al.* 1997, Allard *et al.* 1998). Buorot *et al.* (2000) ha suggerito che GB può assistere in vivo al folding delle chaperonine.

Piante transgeniche di tabacco che sovraesprimono fosfoetanolamina N-metiltransferasi mostrano un aumento della sintesi di colina e di GB (McNeil *et al.* 2001). Recentemente è stato riscontrato che la co-espressione dei geni della N-metiltransferasi in *Syneococcus* causa una importante quantità di GB e conferisce tolleranza salina consentendo ai cianobatteri marini di vivere nel mare (Waditee *et al.* 2005). La pianta di *Arabidopsis* esprime geni della metil N-transferasi e accumula GB in radici, foglie e fiori, migliorando la produzione dei semi in condizioni di stress (Waditee *et al.* 2005). Questi risultati mostrano l'utilità dei geni della glicina N-metiltransferasi per il miglioramento della tolleranza a stress abiotici nelle piante coltivate.

La sovrapproduzione di GB, in piante desiderate, attraverso la manipolazione genetica della via *BADH* in cloroplasti, può essere una importante strategia per conferire tolleranza salina. Un recente studio mostra che piante transgeniche di carota che esprimono *BADH* riescono a crescere in presenza di alte concentrazioni di NaCl, il più alto livello di tolleranza salina verificatosi finora tra le piante da raccolto geneticamente modificate (Kumar *et al.* 2004).

TABELLA N. 1: risposta agli stress in piante geneticamente modificate che sovraesprimono geni per la biosintesi di GB e di prolina

GENE	PRODOTTO	PIANTA TRANSGENICA	PERFORMANCE DELLA PIANTA
CodA	Colina Ossidasi	<i>Syneococcus</i>	Tolleranza a 0-4M di NaCl
CodA	Colina Ossidasi	<i>Arabidopsis</i>	Piante resistenti 0-4M di NaCl per 48 h e 0.1 M per 20 giorni.
CodA	Colina Ossidasi	<i>Arabidopsis</i>	Tolleranza al freddo e al calore da 0°C a 55°C.
CodA	Colina Ossidasi	Riso	Incremento della resistenza al congelamento da -5°C a -10°C.
CodA	Colina Ossidasi	<i>Arabidopsis</i>	Tolleranza salina a 0.15 - 0.1 NaCl e tolleranza al freddo a 5 gradi
CodA	Colina Ossidasi	<i>Arabidopsis</i>	Aumento della tolleranza salina

			<i>durante gli stadi riproduttivi.</i>
CodA	Colina Ossidasi	Caco giapponese	<i>Rigenerazione e resistenza salina a 0.1M NaCl</i>
CodA	Colina Ossidasi	<i>Brassica</i>	<i>Migliore crescita e germinazione del seme in condizioni di stress salini</i>
CodA/coz	Colina Ossidasi	<i>Arabidopsis</i>	<i>Incrementa la tolleranza salina, al congelamento e alla siccità</i>
CodA/coz	Colina Ossidasi	Tabacco	<i>Aumento della tolleranza salina a 0.15M di NaCl</i>
CodA/coz	Colina Ossidasi	<i>Brassica</i>	<i>Incremento della tolleranza salina e della siccità</i>
betA betB	Colina Ossidasi	<i>Syneococcus</i>	<i>Incremento della tolleranza salina a 0.2-0.4 M di NaCl per 4 giorni</i>
betA modificato	Colina Deidrogenasi	Riso	<i>Tolleranza salina a 0.15 M di NaCl e a bassa umidità relativa</i>
betA modificato	Colina Deidrogenasi	Tabacco	<i>Aumento della tolleranza salina e al freddo, a 0.2M di NaCl e a 4°C</i>
betA	Colina Deidrogenasi	Tabacco	<i>Migliore crescita a 0.3M di NaCl</i>
badh	Betaina Aldeide Deidrogenasi	Carota	<i>Crescita a 400 mM di NaCl</i>
ApDMT	Dimetilglicina Metiltransferasi	<i>Syneococcus</i>	<i>Sufficiente tolleranza salina per la crescita nel mare</i>
ApGSMT	Glicina sarcosina metiltransferasi	<i>Arabidopsis</i>	<i>Alto accumulo di betaina e migliorata crescita dei semi in campo sotto stress</i>
PEAMT eDNA	Fosfoetanolamina N-metiltransferasi	Tabacco	<i>Aumento della sintesi di GB e prolina</i>
P5CS	Δ^1 piridina-5-carbssilato sintasi	Tabacco	<i>Aumento della biomassa e sviluppo dei fiori in condizioni di stress idrici e salini</i>
P5CS	Δ^1 piridina-5-carbssilato sintasi	Riso	<i>Aumento della biomassa in condizioni di stress molteplici</i>
P5CS	Δ^1 piridina-5-carbssilato sintasi	Frumento	<i>Aumento della tolleranza a stress salini</i>
P5CS	Δ^1 piridina-5-carbssilato sintasi	<i>Clamydomonas</i>	<i>Elevato accumulo di prolina e migliore crescita in condizione di</i>

			<i>stress</i>
<i>NtHAL3</i>	<i>Proteina HAL3</i>	<i>Tabacco</i>	<i>Aumento della tolleranza a stress idrici, salini e a stress da litio</i>

3.2 PROLINA

La prolina è un soluto compatibile che non interferisce con le normali reazioni biochimiche e le attività cellulari, dando osmoprotezione durante gli stress osmotici. L'accumulo di prolina non è stato osservato solo in piante ma anche nei protozoi, negli invertebrati e in alcuni eubatteri (Mc Cue and Hanson 1990, Dalauney and Verma 1993). La presenza di prolina, in risposta a stress ambientali, indica che la sua biosintesi è una risposta non specifica ad una diminuzione del potenziale idrico (Reddy and Ijengar 1999). Appare che l'azione di questo osmolita abbia effetto sugli enzimi stabilizzandoli nella loro conformazione attiva ed inoltre li protegga contro perturbazioni conformazionali causate dagli ioni (McCue and Hanson 1990). Nelle piante, la prolina è sintetizzata a partire dal glutammato (Glu) o dall'ornitina. La via del glutammato è quella primaria per la sintesi della prolina in condizione di stress osmotico e limitazioni di azoto, mentre la via dell'ornitina è predominante in presenza di alti livelli di azoto disponibile (Delauney *et al.* 1993). Nella via di biosintesi dal Glu alla prolina è coinvolta la via di conversione del Glu a prolina con intermedi il Δ^1 pirrolico 5-carbossilato (P5C), il γ -glutamil-fosfato e il glutammico γ -semialdeide (GSA); la reazione è catalizzata da due enzimi, il Δ^1 pirrolico5-carbossilato sintasi (P5CS), e il Δ^1 pirrolico5-carbossilato reductasi (P5CR). L'ingegnerizzazione genetica della via di biosintesi della prolina conduce all'aumento della tolleranza agli stress in piante transgeniche (Tabella 1). Per esempio, in piante transgeniche di tabacco, che sovraesprimono il P5CS di fagiolo, la prolina viene accumulata in 10 volte in più, rispetto alle piante controllo. (Kavi Kishor *et al.* 1995). La sovrapproduzione di prolina in riso con il gene P5CS aumenta la biomassa in condizioni di stress idrici (Zhu *et al.* 1998). Piante di *Arabidopsis*, che sovraesprimono l'attivatore trascrizionale CBF3, presentano un elevato trascritto di P5CS e contenuto di prolina (Gilmour *et al.* 2000). E' stato osservato in piante transgeniche di frumento un elevato contenuto di tale osmolita, con incremento della tolleranza

agli stress salini (Sawael and Hassan, 2002). Un'elevata espressione dei geni NtHAL3 conferisce un incremento della biosintesi della prolina e in colture cellulari di tabacco un aumento alla tolleranza salina, osmotica e al litio (Yonamine *et al.* 2004). Recentemente, è stato dimostrato che piante di tabacco trasformate per accumulare differenti osmoliti (prolina, fruttani e glicinabetaina) sopravvivono con successo a stress da congelamento (Parvanova *et al.* 2004). L'elevato livello di prolina migliora significativamente l'abilità della pianta transgenica a crescere in un medium contenente più di 200mM di NaCl. L'incremento della presenza di questo composto riduce i livelli di radicali liberi. Così è stato dimostrato che, in aggiunta all'azione di osmolita, la prolina può giocare un ruolo importante nella riduzione degli stress ossidativi.

3.3 POLIAMMINE

Le poliammine sono un gruppo di composti cellulari azotati che si accumulano in una serie di condizioni di stress abiotici inclusi alti valori di salinità e di siccità (Krishnamurthy and Bhagwat 1989). L'implicazione delle poliammine in risposta a stress abiotici è stata per la prima volta documentata attraverso l'accumulo di putresceina in risposta a livelli subottimali di potassio in piante di orzo (Richard and Coleman 1952). Questo studio ha evidenziato una connessione tra l'incremento del contenuto di putresceina e gli stress abiotici (Bouchereau *et al.* 1999). Il ruolo fisiologico della putresceina, nella risposta a stress abiotici, è soggetto a controversie in quanto è difficile stabilire la relazione causa/effetto. La manipolazione genetica del metabolismo delle poliammine è diventato uno strumento prezioso per studiare il loro ruolo nelle piante. Il contenuto delle poliammine nelle piante può essere modulato da una co-espressione/sotto regolazione di arginina decarbossilasi (*adc*), ornitina decarbossilasi (*odc*) e S-adenosin metionina decarbossilasi (*samdc*) (Minocha and Sun, 1997, Capell *et al.* 1998; 2004, Roy and Wu, 2001, Kakkar and Sawhney 2002, Thu-Hang *et al.* 2002). Una sovraespressione della spermidina sintasi in *Arabidopsis* aumenta la tolleranza a stress multipli. Nel confronto con piante wild type, si nota che piante transgeniche t_2 e t_3 mostrano un significativo incremento dell'attività della spermidina sintasi e spermidina contenute nelle foglie con un aumento della

tolleranza a vari stress come raffreddamento, congelamento, salinità, iperosmosi e siccità (Kasukabe *et al.* 2004). Similarmente, la sovraespressione di *samdc* cDNA di *Datura stramonium* in riso transgenico è stata riconosciuta sufficiente per l'accumulo di spermidina e spermina in foglie e spermidina in semi (Thu-Hang *et al.* 2002). Linee cellulari transgeniche di carote con sovrapproduzione di ornitina decarbossilasi di topo, mediante la quale convertivano ornitina in diamina putrescina, erano capaci di resistere per brevi periodi a stress abiotici e salini (Minocha and Sun, 1997). Sono state riportate piante di riso transgenico che sovraesprimevano il gene della arginina di avena (Capell *et al.* 1998, Roy and Wu 2001). La sovraespressione, dei geni *adc* e *samdc* incrementa, il contenuto di poliammine in riso transgenico e conferisce tolleranza allo stress da siccità (Capell *et al.* 2004).

3.4 MANNITOLO

In aggiunta alla discussione fino ad ora riportata che riguarda l'accumulo di osmoliti, sono stati riscontrati accumuli di composti relativi al metabolismo dello zucchero con risposta della pianta a stress idrici e aggiustamenti osmotici: i più studiati sono gli zuccheri alcolici come mannitolo, trealosio, fruttani, e D-ononitolo. Il mannitolo, uno degli zuccheri alcolici più largamente distribuiti in natura (Stoop *et al.* 1996), è normalmente sintetizzato in numerose specie di piante, ma non in tabacco e in *Arabidopsis*. L'incremento, dell'accumulo di questo zucchero, avviene quando le piante sono esposte ad un basso potenziale idrico (Patonnier *et al.* 1999). Il mannitolo è determinante nell'aumento della tolleranza agli stress idrici, mediante gli aggiustamenti osmotici (Loescher *et al.* 1992). Inoltre, negli aggiustamenti osmotici, questo zucchero migliora la tolleranza a stress attraverso la pulizia di radicali OH e stabilizza la struttura di macromolecole (Abebe *et al.* 2003) come ad esempio fosforibulosio kinasi (un enzima regolatore), tiredoxina, ferredoxina e glutatione (Shen *et al.* 1997). L'effetto protettivo sembra essere dato dalla formazione di legami idrogeno tra le macromolecole e gli osmoliti in limitata presenza di acqua. Il mannitolo previene la formazione di legami idrogeno intermolecolari che potrebbero modificare in modo irreversibile la struttura tridimensionale della molecola (Abebe *et al.* 2003).

Le piante di tabacco e *Arabidopsis* non sono accumulatori di mannitolo, la sovraespressione del gene di *E. coli* per il mannitolo 1-fosfato deidrogenasi (*mt1D*) è risultato nella biosintesi dello zucchero, in tabacco e *Arabidopsis*, con un aumento della tolleranza alla salinità (Tarczynski *et al.* 1993, Thomas *et al.* 1995). Nei semi delle piante di *Arabidopsis* la concentrazione di mannitolo arrivava a 10 $\mu\text{mol g}^{-1}$ e questi semi erano capaci di germinare in un medium con 400mM di NaCl, mentre i semi di controllo cessavano di germinare a 100mM $\mu\text{mol g}^{-1}$ di NaCl. Karakas *et al.* (1997) potrebbe aver visto solamente un incremento della crescita e della massa secca con lo stesso gene, nelle piante transgeniche di tabacco in condizioni di stress salini. Shen *et al.* (1997) ha riportato un incremento della resistenza a stress ossidativi in piante transgeniche di tabacco. L'espressione ectopica del gene *mt1D* per la biosintesi di mannitolo, in piante transgeniche di frumento, incrementa la tolleranza a stress idrici e salini a partire dal callo e a tutti i livelli della pianta (Abebe *et al.* 2003). Abebe *et al.* (2003) ha osservato che l'ammontare del mannitolo accumulato è troppo basso per garantire protezione ad aggiustamenti osmotici ma efficace nel migliorare la tolleranza agli stress. L'esperimento è stato condotto su pianta e su callo, stressati in due modi diversi: con aggiunta di polietilene glicole (PEG) e con aggiunta di NaCl nel medium di coltura.

TABELLA 2: risposta agli stress di piante transgeniche che overesprimono geni per la biosintesi di osmoliti

<i>GENE</i>	<i>PRODOTTO</i>	<i>PIANTA TRANSGENICA</i>	<i>PERFORMANCE DELLA PIANTA</i>
<i>TPSI</i>	Trealosio-6-fosfato sintetasi	Tabacco	Incremento della tolleranza alla siccità e migliore sopravvivenza del seme dopo 15 giorni di stress idrico
<i>TPSI</i>	Trealosio-6-fosfato sintetasi	Patata	Incremento della tolleranza alla siccità
<i>otsA</i>	Trealosio-6-fosfato sintetasi	Tabacco	Aumento della massa secca e migliore efficienza della fotosintesi in condizioni di stress

<i>otsB</i>	Trealosio-6-fosfato sintetasi	Riso	Sostenuta crescita della pianta, minori danni fotossidativi, migliore bilanciamento dei minerali
<i>IMT1</i>	D-ononitolo	Tabacco	Aumento delle performance in condizioni di stress idrico e incremento del tasso fotosintetico
<i>mt1D</i>	Mannitolo-1-fostato deidrogenasi	Tabacco	Migliore crescita in condizioni di alta salinità
<i>mt1D</i>	Mannitolo-1-fostato deidrogenasi	<i>Arabidopsis</i>	Aumento della germinazione dei semi in condizione di alta salinità
<i>mt1D</i>	Mannitolo-1-fostato deidrogenasi	Tabacco	Aumento della tolleranza a stress ossidativi, aumento della ritenzione di clorofilla in condizioni di stress
<i>mt1D</i>	Mannitolo-1-fostato deidrogenasi	Tabacco	Marginale aumento della massa secca in condizioni di stress salino
<i>mt1D</i>	Mannitolo-1-fostato deidrogenasi	Frumento	Migliore performance di crescita in condizioni di stress idrico e alta salinità
<i>SacB</i>	Fruttosiltransferasi	Tabacco	Migliore crescita sotto controllo PEG inducibile in condizioni di stress osmotico
<i>adc</i>	Arginina decarbossilasi	Riso	Minimizza la perdita di clorofilla in condizioni di siccità
<i>Datura adc</i>	Arginina decarbossilasi	Riso	Elevato contenuto di putrescina e incremento della tolleranza alla siccità
<i>Odc</i>	Ornitina decarbossilasi	Carota	Linee cellulari possono sopravvivere per brevi periodi ad alti contenuti di sale
<i>SPDS cDNA</i>	Spermidina sintasi	<i>Arabidopsis</i>	Aumento della tolleranza al congelamento, salinità, siccità, e raffreddamento
<i>Samdc cDNA</i>	S-adenosilmetionin decarbossilasi	Riso	Significativo accumulo di spermidina in germogli e

3.5 TREALOSIO

Il trealosio è un disaccaride di glucosio non riducibile ed è stato osservato essere uno stabilizzatore delle strutture biologiche e delle macromolecole sottoposte a stress ambientali (Crowe *et al.* 1992), è presente in molti batteri, funghi e molte piante superiori tolleranti all'essiccamento. L'incremento dell'accumulo di trealosio in piante coltivate potrebbe migliorare la tolleranza agli stress da salinità e siccità (Penna, 2003). Nei batteri, questo zucchero è prodotto dall'azione di due enzimi: trealosio fosfato sintasi, che produce trealosio fosfato (T-6-P) e trealosio fosfato fosfatasi che degrada il T-6-P in trealosio. Quando questi due enzimi si trovano nelle piante transgeniche (Goddjin *et al.* 1997, Pilon-Smits *et al.* 1998), producono foglie larghe, crescita del fusto alterata ma migliore tolleranza allo stress. Quando la crescita avviene in situazione di siccità, due piante selezionate di tabacco mostrano un aumento del 28 e 39% totale di massa secca rispetto alle piante controllo. Si suppone che questo risultato positivo sia legato alla modifica della *via* T6P, il cui enzima è capace di idrolizzare il trealosio in due molecole di glucosio (Goddjin *et al.* 1998). L'espressione del gene del trealosio-6-fosfato sintasi di lievito esibisce alterazioni fenotipica multipla nonostante ciò migliora la tolleranza alla siccità (Romero *et al.* 1997). Due geni batterici, trealosio-6-fosfato sintetasi (*otsA*) e trealosio-6-fosfato fosfatasi (*otsB*), sono stati introdotti in piante di tabacco e danno come risultato un aumento della dimensione della pianta, in quanto esibiscono una migliore crescita in condizioni di stress da siccità (Pilon-Smith *et al.* 1998). Piante transgeniche di patata e di tabacco presentano un aumento significativo della tolleranza alla siccità. Questo avviene quando il gene del lievito TPS1, guidato dal promotore 35S del mosaico del cavolfiore (CaMV) è inserito nelle piante di patata e nelle piante di tabacco quando è inserito il promotore inducibile RD29 (sensibile all'essiccamento) (Zhao *et al.* 2000, Yeo *et al.* 2003). La sovrapproduzione di trealosio, in piante transgeniche di riso, mostra un'alta tolleranza a diversi stress abiotici (Garg *et al.* 2002). Queste piante transgeniche mantengono un ottimale proporzione K^+/Na^+ necessaria per la

funzione delle cellule. L' accumulo di trealosio, in condizioni di siccità, è importante per l'incremento della protezione del fotosistema II contro danni fotossidativi.

3.6 FRUTTANI

I fruttani fanno parte della classe di composti di riserva accumulati da alcune categorie di piante. Si tratta di polimeri di fruttosio che vengono riversati nel vacuolo ed al contrario dell'amido sono molecole solubili. Per questa ragione si pensa che i fruttani possono avere un ruolo importante nell'aggiustamento osmotico. Gli effetti dei fruttani, sulla tolleranza agli stress abiotici, sono stati dimostrati dalla trasformazione delle piante di tabacco con un costrutto che contiene il gene *sacB* del *Bacillus Subtilis* fuso con segnale della carbopeptidasi Y di lievito posto a valle del promotore costitutivo 35S (Pilon-Smits *et al.* 1995). Le piante transgeniche sono migliori rispetto alle piante di controllo in condizioni di stress: possiedono il 55% in più di velocità di crescita rapida, il 33% in più di massa e il 59% di massa secca in più rispetto alle piante wild type. Quando piante di barbabietola vengono trasformate con lo stesso costrutto, i fruttani vengono accumulati per lo 0,5% della loro massa secca in radici e germogli e le piante transgeniche mostrano una crescita migliore sotto stress da siccità rispetto alle piante wild type (Pilon-Smits *et al.* 1999). Esistono parecchie supposizioni riguardanti le funzioni di questi zuccheri ma le conoscenze disponibili non sono sufficienti a sostenere nessuna ipotesi. Comunque è abbastanza chiaro che i fruttani promuovono il processo di diramazione delle radici e anche l'incremento della loro superficie e velocità di reperimento dell'acqua (Datta 2002).

3.7 D-ONONITOLO

Il mioinositolo e i suoi derivati sono comunemente studiati come segnale cellulare e come molecola per la sintesi della membrana, ma è importante anche la loro partecipazione nella risposta a stress nelle piante e negli animali relativamente a stress salini (Nelson *et al.* 1998). In molte piante, l'inositolo funziona da substrato per la produzione e l'accumulo di soluti compatibili quali pinitolo e ononitolo e

aiuta a far diminuire il potenziale osmotico e bilanciare l'accumulo di sodio nei vacuoli. Nelson *et al.* (1998) ha studiato la regolazione del metabolismo dell'inositolo cellulospecifico e il suo trasporto nelle piante sempre per la tolleranza alla salinità. I risultati dimostrano che il metabolismo fornisce molto zucchero ma che per un'alterazione nell'allocazione del carbonio è destinato a diventare un osmolita stabile e può anche agire come facilitatore nel isolare il sodio e nella protezione della fotosintesi. Sono disponibili pochi risultati che riguardano la trasformazione genetica del mio-inositolo *O*-metiltransferasi (IMT1) nelle piante. Per esempio, in piante di tabacco, l'espressione di un cDNA codificante mio-inositolo *O*-metiltransferasi, durante stress salini e di siccità dà come risultato l'accumulo di inositolo metilato (D-ononitolo) (Sheveleva *et al.* 1997, 2000). Quando queste piante transgeniche sono esposte a stress salini e a siccità, il D-ononitolo viene accumulato in concentrazioni che eccedono di 35 $\mu\text{mol g}^{-1}$ nel citosol. Inoltre, l'anidride carbonica della fissazione fotosintetica si riduce durante stress salini e di siccità nelle piante transgeniche con accumulo di D-ononitolo rispetto alle piante wild type. Oltre a questo, l'osmolita in questione è importante in quanto provvede in modo adeguato alla protezione contro stress salini e idrici in piante transgeniche. La tolleranza osservata dagli osmoliti compatibili è molto più efficace nella tutela dagli effetti osmoprotettivi piuttosto che il loro contributo nel aggiustamento osmotico (Chinnusamy *et al.* 2005).

3.8 SORBITOLO

Sheveleva *et al.* ha prodotto e analizzato linee transgeniche di tabacco che esprimevano un cDNA per il sorbitolo-6-fosfato deidrogenasi (S6PDH) da mela. L'ammontare di sorbitolo prodotto dalle piante di tabacco variava circa da 0.2 a 130 $\mu\text{mol g}^{-1}$. Piante che accumulano più di 2-3 $\mu\text{mol g}^{-1}$ sono fenotipicamente normali ma piante che accumulano elevati livelli di sorbitolo sviluppano lesioni necrotiche nelle foglie, infertilità e incapacità di rigenerare le radici. Un costrutto S6PDH è stato usato per trasformare il caco giapponese e il livello di tale zucchero, nella pianta transgenica, si presentava tra 14,5-61,5 $\mu\text{mol g}^{-1}$. In condizioni di stress salini, l'attività fotosintetica diminuisce meno in piante

produttrici di sorbitolo rispetto alla piante wild type e ciò sta ad indicare che le piante che lo producono, resistono meglio alla condizione di stress.

3.9 FAMIGLIA DEI RAFFINOSIDI

I raffinoidi sono degli oligosaccaridi, a questa famiglia appartengono il raffinoso e il galattinolo: sono degli zuccheri coinvolti nella tolleranza all'essiccamento. Taji *et al* (2002) ha ingegnerizzato piante di *Arabidopsis Thaliana* con la sovraespressione di *AtGSoL* 1,2 e 3, tutti geni che codificano per galattosil-sintasi di *Arabidopsis Thaliana*. La sovraespressione di *AtGOIS2* può non incrementare la presenza di galattinolo endogeno in piante transgeniche ed è stato appurato che riduce la traspirazione dalle foglie migliorando la tolleranza alla siccità, oltre che ad agire come osmoprotettivo.

4. MODIFICAZIONI BIOTECNOLOGICHE CHE INDUCONO LA SOVRAESPRESSIONE DI PROTEINE COINVOLTE NELLA RESISTENZA ALLO STRESS IDRICO

Nella protezione della pianta agli stress idrici sono stati scoperti alcuni elementi importanti come i promotori inducibili e i fattori di trascrizione e l'azione di alcune proteine come le proteine LEA, le acquaporine e le proteine HS.

4.1 PROTEINE LEA

Gli stress osmotici inducono proteine LEA (proteine presenti nella tarda embriogenesi), che sono in grado, nei tessuti vegetativi delle piante, di conferire tolleranza alla disidratazione. Yamaguchi-Shinozaki *et al* (2002) hanno mostrato come le proteine LEA e le chaperonine agiscono nella protezione di macromolecole da disidratazione come enzimi, lipidi e mRNA (Tabella 3). Le proteine LEA sono state trovate per la prima volta nel cotone. Durante l'essiccamento dei semi e in risposta a stress idrici, le proteine LEA si sono accumulate principalmente nell'embrione. L'espressione del gene LEA o l'accumulo di proteina LEA nelle piante in condizioni di stress, indicano il loro ruolo nella tolleranza nei confronti degli stress. Manca, comunque, un'evidenza sperimentale che supporti l'esatta funzione delle proteine LEA e il loro ruolo fisiologico rimane largamente sconosciuto (Xu *et al* 1996). I geni che decodificano queste proteine sono di differente tipo come RD (sensibili alla disidratazione), ERD, KIN (sensibile al freddo), COR (regolato dal freddo), e SAB (sensibile all'AB) (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki *et al* 2000, Zhu 2002). La sovraespressione di un gene 3-LEA di orzo, *HAV1* in riso, ha mostrato una migliore tolleranza alla siccità e a stress salini rispetto alle piante wild type (Xu *et al.* 1996, Wu e Ho 1997, Zhu *et al.* 1998). E' stato riscontrato che specifiche proteine potrebbero non essere responsabili nella tolleranza all'essiccamento o la loro presenza, da sola, potrebbe non essere sufficiente a prevenire ferite, mentre queste proteine, insieme a zuccheri solubili, potrebbero contribuire alla tolleranza di tali stress (Xu *et al.* 1998). L'espressione di geni simili a LEA, in condizioni di

stress osmotici, è regolata da fattori dipendenti da ABA e dalla via segnale indipendente (Chinnusamy *et al.* 2005). La sovraespressione costitutiva di *ABF3* e di *ABREB2* in *Arabidopsis* accresce i livelli di target dei geni LEA. Queste piante transgeniche, durante lo stadio della germinazione, sono ipersensibili all'ABA, agli stress zuccherini e agli stress salini, ma nella fase di accrescimento sono solo tolleranti a stress salini nella pianta (Kang *et al.* 2002). Piante transgeniche di *Arabidopsis*, che sovraesprimono *AtMYC2* e *AtMYB2*, mostrano un'alta tolleranza allo stress osmotico, nonostante la loro tolleranza ad alta salinità non sia conosciuta.

TABELLA 3: risposte agli stress di piante transgeniche che sovraesprimono LEA e fattori di LEA relativamente a geni, proteine trasporto e fattori di trascrizione

GENE	PRODOTTO	PIANTA TRANSGENICA	PERFORMANCE DELLA PIANTA
<i>Osm1, Osm4</i>	Proteine da 24 kDA	Tabacco	Ritardata senescenza della foglia e migliorata germinazione a 200mM di NaCl
<i>TLP-D34</i>	Proteina simile alla taumatina	Riso	Accrescimento dell'aggiustamenti osmotici e protezione della pianta da funghi
<i>HVA-1</i>	Proteine del gruppo 3-LEA	Riso	Miglioramento della tolleranza a stress idrici e salini
<i>HVA-1</i>	Proteine del gruppo 3-LEA	Frumento	Aumento della biomassa in condizioni di stress
<i>COR15A</i>	Proteina di 15 kDA	<i>Arabidopsis</i>	Miglioramento della tolleranza al congelamento di protoplasti e cloroplasti
<i>CuCOR19</i>	Proteina da 19 Kda	Tabacco	accrescimento della tolleranza al freddo
<i>Yeast CAN/CNB</i>	Proteina regolatoria	Tabacco	Accrescimento della capacità di sopravvivere a shock da NaCl
<i>AtNHX1</i>	Antiporto Na ⁺ /H ⁺	<i>Arabidopsis</i>	Sostenuta crescita e sviluppo a più di 200mM di NaCl
<i>AtNHX1</i>	Antiporto Na ⁺ /H ⁺	<i>Brassica</i>	Pianta capace di crescere,

			produrre fiori e frutti in condizioni e in presenza di 200mM di NaCl
<i>AtNHX1</i>	Antiporto Na ⁺ /H ⁺	Pomodoro	In presenza di un'elevata salinità capacità della pianta di crescere e produrre frutti
<i>HAL1</i>	Ione omeostatico	Melone	Piante mostrano un incremento della tolleranza salina
<i>HAL1</i>	Ione omeostatico	Pomodoro	Incremento della tolleranza salina con capacità di trattenere protoni in condizioni di stress
<i>HAL2</i>	Ione omeostatico	Limone	Tolleranza non osservata
<i>AtHAL3</i>	Ione omeostatico	<i>Arabidopsis</i>	Aumento della tolleranza salina
<i>SOS1</i>	Antiporto Na ⁺ /H ⁺	<i>Arabidopsis</i>	Piante capaci di crescere e di rimanere verdi in presenza di 200mM di NaCl
<i>ApNhaP</i>	Antiporto Na ⁺ /H ⁺	<i>Synechococcus</i>	Capacità di crescere nel mare
<i>AVPI</i>	Proteina trasporto	<i>Arabidopsis</i>	Miglioramento della tolleranza alla salinità e alla siccità
<i>Alfin1</i>	Fattori di trascrizione finger zinco	<i>Arabidopsis</i>	Miglioramento della tolleranza salina
<i>OSISAPI</i>	Fattori di trascrizione finger zinco	<i>Alfalfa</i>	Miglioramento della tolleranza agli stress salini, al freddo e alla deidratazione
<i>ABF3, ABF4</i>	Fattori leganti ABRE	<i>Arabidopsis</i>	Ridotta traspirazione e aumento della tolleranza alla siccità
<i>CBF1</i>	Fattori di trascrizione	Pomodoro	Piante molto resistenti a deficit idrico
<i>CBF1, CBF3</i>	Fattori di trascrizione	<i>Brassica</i>	Miglioramento della tolleranza al freddo
<i>CBF4</i>	Fattori di trascrizione	<i>Arabidopsis</i>	Piante molto resistenti al congelamento e agli stress salini
<i>DREB1A</i>	Fattori di trascrizione	<i>Arabidopsis</i>	Miglioramento della tolleranza al freddo, alla siccità
<i>DREB1A</i>	Fattori di trascrizione	Tabacco	Miglioramento della tolleranza agli stress da bassa temperatura, siccità, stress salini
<i>DREB1A</i>	Fattori di trascrizione	Frumento	Miglioramento della tolleranza agli stress idrici

<i>OsDREB</i>	Fattori di trascrizione	<i>Arabidopsis</i>	Elevata tolleranza all'alta salinità, al congelamento e alla siccità
<i>AtMYC2</i> <i>AtMYB2</i>	Fattori di trascrizione	<i>Arabidopsis</i>	Elevata tolleranza osmotica, ipersensibilità all'ABA
<i>CpMYB10</i>	Fattori di trascrizione	<i>Arabidopsis</i>	Veloce germinazione sotto NaCl e sorbitolo
<i>PDH45</i>	Elica DNA	Tabacco	Aumento della crescita, della maturazione, e del set vitale dei semi sotto continua salinità.

4.2 DEIDRINE

Le deidrine sono un gruppo di proteine 2-LEA (possono anche essere definite DHN o LEA-11). Alcune delle molte proteine omnipresenti e sensibili agli stress idrici nelle piante (Ingram and Bartels, 1993), sono formate da una catena definita di aminoacidi altamente conservata e ricca di glicina. Studi sulle deidrine di agrumi hanno dimostrato che hanno proprietà crioprotettive nella protezione di enzimi sensibili al congelamento (Hara *et al.* 2001). Recenti approcci genetici e transgenici hanno dimostrato che vi è una relazione tra l'accumulo di deidrine e l'acclimatazione al freddo (Stepankus *et al.* 1998, Seki *et al.* 2002, Hara *et al.* 2003).

L'osmotina, appartenente alla famiglia di queste molecole, è presente nelle cellule di tabacco, e consente alla pianta di adattarsi all'ambiente salino (Singh *et al.* 1985), e il suo accumulo è correlato ad adattamenti osmotici (LaRosa *et al.* 1987). In molte specie di piante sono stati isolati degli mRNA che codificano proteine omologhe all'osmotina (Kononowicz *et al.* 1993). In aggiunta a questo ruolo di osmoprotettivi, questi geni possono funzionare in difesa contro i patogeni (Liu *et al.* 1994). Piante di patata transgeniche con sovraespressione di osmotina di tabacco (Liu *et al.* 1994) presentano una buona tolleranza agli stress idrici e il gene è indotto da funghi e da proteine virali oltre che da stress osmotici e con una migliore tolleranza alla disidratazione, alla salinità e al freddo (LaRosa *et al.* 1992). Piante di tabacco transgenico con sovraespressione del gene dell'osmotina, mostrano una ritardata senescenza fogliare e una migliore germinazione del seme in condizioni di stress salini (Barthakur *et al.* 2001, 2002). Piante di riso

transgenico contenenti la regione di codice della proteina PR-5, proteina simile alla taumatina (TLP-D34), presentano una migliore protezione contro i funghi e aggiustamenti osmotici (Datta *et al.* 2000).

4.3 *PROTEINE HS (heat shock)*

Vi è un altro gruppo di proteine che potrebbero giocare un ruolo importante nella protezione contro gli stress idrici. E' il caso della numerosa famiglia delle proteine HS, comprendenti anche piccole proteine come ad esempio *At-HSP17.6a* di *Arabidopsis*, e una volta sovraesprese, migliorano la tolleranza al freddo, e alla siccità. Questa capacità è legata all'attività delle proteine chaperonine ed è stata dimostrata *in vitro* (Sui *et al.* 2001). L'azione di queste proteine è di prevenire la denaturazione delle proteine e assistere il refolding di proteine denaturate durante lo stress. In piante transgeniche di tabacco, l'aumento della presenza di proteine BIP, che legano chaperonine nel reticolo endoplasmico (che risulta essere indotto da una serie di stress ambientali) conferiscono tolleranza agli stress idrici (Alvim *et al.* 2001). In condizioni di progressiva siccità, la concentrazione di proteine BIP nelle foglie è correlata a un ridotto contenuto di acqua. La funzionalità dell'attività fotosintetica, in piante transgeniche con mancanza di acqua, è mantenuta a valori simili a confronto con la funzionalità misurata in piante wild type in presenza di abbondante acqua.

4.4 *PROTEINE CANALE PER L'ACQUA: LE AQUAPORINE*

Il trasporto dell'acqua nelle piante avviene sia per via apoplastica che per via simplastica. Questo sta a significare che un alto numero di molecole di acqua devono attraversare più volte la membrana cellulare. Tale processo è facilitato dalle aquaporine, proteine intrinseche la membrana, presenti in tutti gli organismi viventi, atte a costituire dei complessi permeabili all'acqua. Il potenziale idrico apoplastico influisce sullo stato di fosforilazione delle aquaporine. Queste proteine giocano un ruolo fondamentale nel controllo dello stato idrico cellulare in risposta a deficit idrici. Una differente espressione dei geni che codificano aquaporine isoformi, durante lo sviluppo della pianta, sono stati osservati essere

associati a differenti processi fisiologici, tra cui l'apertura stomatica. Non è ancora chiara la relazione tra il ruolo delle aquaporine nella regolazione degli stati idrici nelle piante e la regolazione dell'espressione dei geni .

Le proteine canale per l'acqua sono proteine che funzionano per il trasporto di acqua, zucchero e prolina attraverso la membrana plasmatica, per il controllo della pressione osmotica in condizioni di stress (Yamaguchi-Shinozaki *et al.* 2001). Studi riguardanti proteine che trasportano sodio, come AtHKT1 e AtNHX1, indicano che possono proteggere le cellule vegetali dall'effetto secco del sale tramite il trasporto di ioni sodio dal citoplasma al vacuolo. La manipolazione genetica delle proteine che trasportano sale, trasporto veloce in *Arabidopsis Thaliana*, mostra un incremento alla tolleranza salina. Per esempio, la sovraespressione del antiporto K^+/Na^+ in piante di *Arabidopsis* promuove una notevole crescita e uno sviluppo sotto stress di NaCl (Apse *et al.* 1999, Shi *et al.* 2001, 2002). Sono stati riportati risultati simili nella sovraespressione di *AtNHX1* in piante transgeniche di pomodoro (Zhang and Blumwald, 2001, Zhang *et al.* 2001). La sovraespressione di *AVP1* che codifica la pompa H^+ -vacuolare in *Arabidopsis* produce un incremento della ritenzione idrica e una conseguente tolleranza alla siccità (Gaxiola *et al.* 2001). Rus *et al.* (2001) ha recentemente dimostrato che il trascritto di AtHKT1 è rilevante per la tolleranza al sale.

Una metodologia alternativa, per generare piante tolleranti al sale, è l'introduzione di geni halotolleranti coinvolti nella regolazione di ioni omeostatitici come HAL1, HAL2 e HAL3 di lievito (Cervera *et al.* 2001, Albert *et al.* 2000, Yang *et al.* 2001). La sovraespressione di HAL1, nelle piante di pomodoro, migliora la tolleranza salina mantenendo internamente un'alta concentrazione di K^+ ed una diminuzione intracellulare di Na^+ durante gli stress salini (Gisbert *et al.* 2000, Rus *et al.* 2001). Modificare le proteine del calcio risulta essere un altro metodo per migliorare la tolleranza agli stress nella pianta. Si è osservato che l'introduzione di un gene calcio calmodulina dipendente con l'attività della calcineurina conduce ad un aumento della tolleranza agli stress nelle piante transgeniche (Yang *et al.* 1997, Pardo *et al.* 1998,1999). Alcuni geni sovraespressi, indotti da particolari condizioni di stress, come *OSISAP1* di riso, *PDH45*, portano ad un incremento della tolleranza al freddo, alla disidratazione e a stress salini in piante transgeniche (Mukhopadhyay *et al.* 2004, Mishra *et al.* 2005).

4.5 FATTORI DI TRASCRIZIONE

I fattori di trascrizione sono piccole molecole che si attaccano a specifici siti in molecole di DNA in un ordine di espressione attiva o disattiva di certi geni. In *Arabidopsis*, il fattore di trascrizione DREB/CBF interagisce specificatamente con elementi ripetitivi *cis*-attivi, sensibili alla disidratazione, controllando l'espressione di molti geni. Proteine DREB/CBF sono codificate da una famiglia multigene *AP2/EREBP* e possono mediare la trascrizione di un certo numero di geni come ad esempio rd29, rd17, in risposta a stress idrici e a freddo. La sovraespressione, in *Arabidopsis*, di *DREB1* e *DREB2* migliora la tolleranza alla disidratazione. Sotto il controllo di un promotore costitutivo, l'effetto di DREBIA è risultato essere dannoso nelle piante in assenza di stress mentre risultava, con effetto positivo sotto stress. L'uso del promotore inducibile rd29a, al posto del promotore CaMV 35S, fa sì che la sovraespressione di DREBIA minimizzi gli effetti negativi sulla crescita della pianta. I geni *DREB* sotto il controllo del promotore rd29a sono stati testati in piante di riso tropicale. Il fattore CBF1 di *Arabidopsis*, ectopicamente espresso in pomodoro, ha mostrato un accrescimento alla resistenza a stress idrici, e contemporaneamente è stato osservato un ritardo nella crescita ed una riduzione del numero di semi e di frutti.

Il promotore ABA inducibile non ha effetto sulla morfologia e sulla crescita della pianta e si presenta con meno efficacia in condizioni di stress. Nei pomodori transgenici, il fattore CBF1, in assenza di acqua, fa chiudere più velocemente gli stomi rispetto le piante wild type, in presenza di una elevata concentrazione di prolina, e una diminuzione della presenza di H₂O₂ apporta un incremento dell'attività catalitica rispetto alle piante controllo.

I fattori di trascrizione regolano la produzione di speciali proteine: le chaperonine che vengono prodotte con particolari temperature e CBF che vengono prodotte in presenza in stress da disidratazione. Queste proteine regolatrici aiutano a proteggere le cellule delle piante dagli effetti dannosi degli stress idrici e di calore. La trasformazione delle piante con geni che codificano per proteine regolatrici è un importante approccio verso studi molecolari, riguardanti la risposta della pianta agli stress abiotici. (Thomashow 2001). L'analisi dell'espressione di geni, implicati nella disidratazione, ha permesso di capire che le strategie per la

costituzione di segnali indipendenti, coinvolti nella risposta a stress idrici sono quattro: due sono ABA dipendenti (Abe *et al.* 1997) e due ABA indipendenti. La regolazione ABA indipendente di geni LEA è mediata da fattori di trascrizione che attivano *cis*-elementi *DRE/CRT* per la codifica di proteine LEA. La sovraespressione di geni *CBF* dà come risultato una attivazione degli elementi *cis DRE/CRT* e dirige l'espressione dei geni LEA (Jaglo *et al.* 2001, Haake *et al.* 2002) per migliorare la tolleranza al congelamento e agli stress osmotici in *Arabidopsis* (Jaglo-Ottosen *et al.* 1998, Gilmour *et al.* 2000) e in *Brassica napus* (Jaglo *et al.* 2001), mentre nelle piante di pomodoro migliora la tolleranza agli stress di siccità e di freddo (Hsieh *et al.* 2002). Sono stati riscontrati miglioramenti nella tolleranza allo stress, in *Arabidopsis*, con cDNA codificante DREBIA (con elementi BIA sensibili alla disidratazione, omologhi di CBF1) usando il promotore 35S CaMV oppure il promotore rd29A (Kasuga *et al.* 1999, Yamaguchi-Shinozaki *et al.* 2002). Piante transgeniche di frumento, esprimendo il gene DREBIA sotto il controllo del promotore rd29, presentano una maggiore resistenza agli stress idrici rispetto alle piante controllo (Pellegrineschi *et al.* 2004). L'espressione di questi geni ha un effetto minimo sulla crescita delle piante e provvede ad un aumento della tolleranza in condizioni di stress rispetto al gene regolato dal promotore 35S. Recenti studi su *Arabidopsis*, trasformato con un promotore *CpMYB10* fuso ad un gene *GUS*, mostrano l'espressione del *reporter* sotto il controllo di ABA in parecchi organi della pianta in condizioni di stress. La resistenza agli stress abiotici, assieme ad un aumento dell'espressione dei geni LEA, determina una sovraespressione di *CBF* in piante transgeniche e ciò è stato attribuito all'accumulo di osmoliti compatibili (Gilmour *et al.* 2000), e a un aumento della tolleranza agli stress ossidativi (Hsieh *et al.* 2002). Non è ancora chiaro come *CBF*, sovraespresso in piante, attivi la biosintesi degli osmoliti e le strategie per la difesa dagli antiossidanti. Studi sull'analisi del genoma mostrano che la sovraespressione di *CBF* può generare un dominio proteico *AP2* come *RAP2-1* e *RAP2-6* e *R2R3-MYB73* il quale può regolare la biosintesi degli osmoliti. E' stato riportato che la sovraespressione di un fattore trascrizionale finger zinco *ALFIN1* attiva l'espressione di *MsPRP* ed incrementa la tolleranza salina in alfalfa (Winicov and Bastola 1999). Perciò il trasferimento di fattori di

trascrizione di CBF, in piante coltivate sotto il controllo di specifici promotori, è un valido approccio per l'ingegnerizzazione della tolleranza a molteplici stress.

5. PROGRESSI FUTURI

Le tecnologie transgeniche hanno ampliato le possibilità per il migliorare le piante da coltivare. Durante il passato decennio, molte piante da raccolto sono state create usando tecnologie come il trasferimento di geni che ne hanno migliorato la sopravvivenza e la crescita. Le reazioni agli stress abiotici, a deficit idrici e ad alta salinità, sono complesse e coinvolgono molti geni, ognuno con molteplici funzioni ma con un unico ruolo nel determinare una maggiore tolleranza agli stress e all'acclimatazione delle piante (Chen and Murata, 2002). Questo fa sì che la possibilità di miglioramento agli stress abiotici sia difficile e lenta. Si sono ottenuti considerevoli progressi nella produzione di piante transgeniche migliorando la tolleranza a varie condizioni di stress, anche se a vari stadi di successo.

Nonostante ciò, molti risultati delle ricerche di questi anni recenti hanno ottenuto un maggiore rilievo e una maggiore considerazione. Un aumento della tolleranza agli stress abiotici si ha nello sviluppo di piante transgeniche di riso con il gene del trealosio, l'espressione del gene *mt1D* per la biosintesi di mannitolo in piante transgeniche di frumento, la sovraespressione dei geni *adc* e *samdc* per la biosintesi di poliammine e l'espressione plastidiale del gene *badh* in piante di carota (Garg *et al.* 2002, Abebe *et al.* 2003, Capell *et al.* 2004, Kumar *et al.* 2004). Il recente studio riguardante la sovraespressione del gene del trealosio in riso transgenico è un notevole passo avanti nelle ricerche transgeniche per la tolleranza agli stress ottenendo una crescita migliore in presenza di siccità, salinità, e basse temperature.

In passato, sono stati fatti studi scientifici per introdurre enzimi detossificanti in piante transgeniche per migliorare la tolleranza a stress ossidativi compresi stress ambientali (Moffat 2002, Datta 2002, Sunkar *et al.* 2003). Nei prossimi anni sarà possibile che le conoscenze ottenute dallo studio di piante transgeniche modello, tolleranti agli stress come *Arabidopsis*, potranno essere incorporate in altre piante coltivate e il loro potenziale potrà essere esteso e usato in vari studi per migliorare le coltivazioni.

L'identificazione di parecchi geni ha creato la necessità di esprimerli con l'aiuto di promotori adatti. Con un promotore costitutivo, un gene è espresso nella

maggior parte dei tessuti a sviluppo completo della pianta e questo presenta un numero considerevole di inconvenienti nelle future piante coltivate (Gitting *et al.* 2000). Per esempio, la sovraespressione costitutiva di trealosio (Romero *et al.* 1997) o di poliammine (Capell *et al.* 1998) causa anomalie nella crescita della pianta in assenza di stress mentre l'uso di specifici promotori inducibili potrebbe proteggerle da anomalie durante la crescita.

Questo è stato dimostrato dalla stabile trasformazione di sistemi ABA inducibile, come l'espressione del gene per codificare, nel riso, una prolina chiave per migliorarne la resistenza agli stress. (Su *et al.* 1998, Su and Wu 2004). L'uso di promotori inducibili, in questi studi, ha rimosso l'inibizione della crescita a basse condizioni di stress. Molti di questi promotori contengono un array di elementi specifici con azione *cis* riconosciuti da un fattore di trascrizione specifico. L'identificazione e la caratterizzazione di promotori inducibili, in particolare quelli indotti da condizioni anaerobiche, sono stati descritti sia con alte o con basse temperature sia con stress salini (Busk and Pages, 1998, Grover *et al.* 2001). Recentemente, Kasuga *et al.* (2004) ha sovraespresso un cDNA *DREB1A* in *Arabidopsis* guidato dal promotore costitutivo CaMV 35S o dal promotore inducibile rd29A. Piante nelle quali *DREB1A* era espresso a livello costitutivo sono state osservate anomalie morfologiche in condizioni di stress prolungato, mentre piante che esprimevano *DREB1A* sotto il controllo del promotore rd29A erano sane e altamente tolleranti stress abiotici. Recentemente, l'uso di una combinazione del gene *DREB1A* di *Arabidopsis* con il promotore inducibile rd29A, nelle piante di tabacco, ha dimostrato maggiore tolleranza alla siccità e agli stress a basse temperature (Kasuga *et al.* 2004). Questi risultati indicano che la combinazione del promotore rd29A e *DREB1A* è utile per migliorare i vari tipi di piante transgeniche che sono tolleranti a stress ambientali.

Queste applicazioni biotecnologiche saranno utili per limitare l'espressione del transgene in particolari tessuti attraverso l'uso di promotori tessuto specifici, strategia che ha attivato recentemente un aumento dell'attenzione (Gittins *et al.* 2004).

La produzione di specifici organelli target è un'ulteriore strategia che favorisce l'accumulo in cloroplasti di GB e mannitolo in condizioni di stress abiotici (Shen *et al.* 1997, Sakamoto *et al.* 1998, Kumar *et al.* 2004)

La praticabilità di approcci transgenici per il miglioramento delle tolleranze agli stress abiotici è stata largamente accettata. Il trasferimento di singoli geni, in molte piante transgeniche prodotte negli anni passati, potrebbe portare tolleranza agli stress; perciò l'uso dell'approccio multigene attraverso il trasferimento simultaneo di parecchi geni offre sostanziali promesse per la possibilità di eredità di tutto il transgene nello stesso locus (Bajaj et al. 1999). Attualmente, le strategie proposte per la produzione di piante transgeniche altamente tolleranti agli stress avviene mediante specifici promotori inducibili testati sulle piante transgeniche per parecchie generazioni confermano l'alta stabilità di espressione e il possibile uso di linee omozigote per la prova sul campo. Nei prossimi anni, metodologie come RNAi e l'inserimento di trasposoni in knockout per il gene candidato sono strategie previste per la produzione di molte piante da coltivare per la loro tolleranza agli stress e appetibile promessa per ottenere piante transgeniche di qualità per l'agricoltura del domani (Xiong and Zhu 2002).

6. REFERENZE BIBLIOGRAFICHE

- T. Antonioli *et. al* - 2007 “Rapporto Enea per lo studio dei cambiamenti climatici e dei loro effetti” Ente per le nuove tecnologie, l’energia e l’ambiente.
- T. Abebe, A. Guenzi, B. Martin, J. Cushman - 2003 “Tolerance of mannitol-accumulating transgene wheat to water stress and salinity” *Plant Physiology*, vol. 131, pp. 1748-1755
- T. Chen, N. Murata - 2002 “Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes” *Plant Biology* vol. 5 pp. 250-257
- S. Cherian, M.P. Reddy, R.B. Ferreira - 2006 “Transgenic plants with improved dehydration-stress tolerance: progress and future prospects” *Biologia Plantarum* 50 (4), pp. 481-495
- M. M. Chaves, M. Oliveira 2004 “Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture *Journal of Experimental Botany*. Vol. 55, pp. 2365-2384
- Z. Flagella, V. Cantore, F. Boari, D. Volpe, A. De Cero “Tolleranza allo stress delle specie coltivate in relazione agli aspetti fisiologici, produttivi e quantitativi” URL: http://www.inea.it/otris/salinità/flagella_txt.htm
- F. Nacca, P. Carillo, G. Mastrolonardo, C. Cuzzolino, A. Fuggi “Stress salino e nutrizione in piante” URL: <http://www.sifv.it/risorse/abstractSIFV/>
- Y. Sakuma, K. Maruyama - 2006 “Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB1A in water stress responsive and heat stress responsive gene expression” – *Plant Biology* vol. 103 pp. 18828-18833
- R. Sunkar, D. Bartels, H.H. Huber - 2003 “Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from Arabidopsis thaliana in transgenic plants improves stress tolerance”; *The Plant Journal* vol. 35, pp. 453-464
- T. Taiz, Zeiger, “Fisiologia Vegetale” Seconda Edizione, Edizione PICCIN cap. 25 pp. 869-881
- M. Taster, A. Bacic, 2005 “Tolerance abiotic stress in grasses: from model plants to crop plants” *Plant Physiology*, vol. 137 pp. 791-793

- W.W. Wang, P. Vinocur - 2003 "Plant response to drought, salinity and extreme temperature: towards genetic engineering for stress tolerance" *Planta* vol. 218 (3) pp. 1-14

7. RINGRAZIAMENTI

Quando ho iniziato questo cammino universitario, ormai ben sette anni fa, mi trovai a vivere contemporaneamente un altro cammino ben più impegnativo legato alla mia salute. Non fu facile mettere, specialmente all'inizio, impegno nello studio perché la testa era occupata da altri pensieri. Devo dire che lungo il cammino non ho sempre trovato persone disponibili, comprensive della mia situazione, ma ho trovato persone legate, in maniera assoluta, al loro essere docenti, alla loro professione, alle loro nozioni. Non sempre ho trovato persone elastiche mentalmente disponibili a trovare un punto d'accordo per cercare di superare il problema, ma persone disposte a nessun compromesso. Credo, e alla fine di questo cammino lo posso dire, che in alcuni casi il compromesso è l'unica strada possibile, credo altresì che debba esserci tra studente e professore, non soltanto un legame professionale ma anche umano rimanendo comunque sempre in un reciproco rispetto. Nonostante tutto, ho anche trovato persone disponibili ad aiutarmi, mai in maniera scontata attraverso favori o regali: è per questo che va il mio ringraziamento al prof. Martin, docente di Fisica durante Diploma per la sua capacità di capire la mia situazione e per la sua lungimiranza, alla prof.ssa Furlan, docente presso il dipartimento di Biologia per il suo aiuto in un momento di difficoltà, nel cercare di controbilanciare la mia vita con lo studio, alla prof.ssa Baldan, per tutte le volte che le chiedo un aiuto magari anche in modo un po' pressante. Va un ringraziamento sincero ai tanti amici che ho incontrato in questi sette anni, amici con i quali si è stabilito un rapporto di amicizia e con i quali si sono vissute molte "battaglie" universitarie tra gli altri, Luca V., Nicola, Massimo, Thomas, Luca A., e tanti altri. Un ringraziamento agli amici con i quali si vive il resto della vita per la loro presenza anche se non sempre continua ma efficace nel momento del bisogno. Un' ultima menzione al professore della mia tesi, il prof. Trainotti, il quale non è sempre stato lineare durante la stesura di questo lavoro, ma va ringraziato per la sua pazienza e per avermi insegnato la giusta cattiveria e determinazione che deve essere messa nel fare le cose. Un ultimo ringraziamento, ma non per ordine di importanza, va alla mia famiglia, che mi è stata vicina in questi anni e specialmente in questo ultimo periodo. Chiudendo questa pagina e questo ciclo, mi viene da dire che non sempre lo studio è stato un diritto, credo

che bisogna lottare e sudare per ottenere qualcosa, ma alla fine di tutto, prima di essere docenti e studenti, si è uomini e come tali si deve essere trattati.