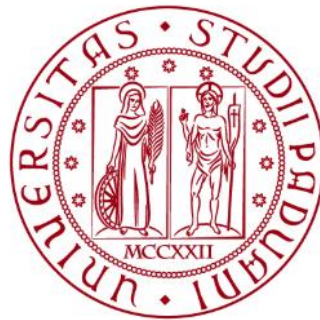


**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI  
BIOLOGIA**

Corso di Laurea magistrale in *Biotechnologie industriali*



Caratterizzazione delle dinamiche di  $H_2O_2$  citosolica in risposta allo stress salino in riso (*Oryza sativa*, *L. spp. japonica*).

**Relatore: Prof.ssa Elide Formentin**  
**Dipartimento di Biologia**

**Controrelatore: Prof. Alessandro Alboresi**  
**Dipartimento di Biologia**

**Laureando: Francesco Caleri**

**ANNO ACCADEMICO 2023/2024**



# Indice

<b>1) Abstract .....</b>	<b>3</b>
<b>2)Introduzione.....</b>	<b>4</b>
2.1 Produzione di cibo in relazione ai cambiamenti climatici.....	4
2.2 L'importanza del riso.....	5
2.3 Stress salino.....	6
2.4 Ruolo dei secondi messaggeri in risposta allo stress salino.....	7
2.4.1 Produzione di ROS in risposta a stress.....	8
2.4.2 Signaling dei ROS estrinseco.....	10
2.4.3 Signaling dei ROS intrinseco.....	12
2.4.4 Integrazione tra percezione dello stress e signaling dei ROS.....	13
2.5 Interazioni tra ROS e Ca <sup>2+</sup> nella risposta a stress salino in Baldo e Vialone Nano.....	14
2.5.1 Transienti di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> indotti dal sale e attivazione del fattore di trascrizione SERF1.....	17
2.5.2 Coinvolgimento delle NADPH ossidasi nella Risposta allo Stress Salino nelle Varietà di Riso Baldo e Vialone Nano.....	20
2.5.3 Ruolo delle Aquaporine .....	22
<b>3) Scopo della tesi.....</b>	<b>24</b>

<b>4) Materiali e metodi.....</b>	<b>26</b>
4.1 Sonda roGFP2-ORP1 .....	26
4.2 Setup esperimento.....	27
4.2.1 Sterilizzazione.....	27
4.2.2 Germinazione dei semi di riso.....	28
4.2.3 Condizione di crescita piante.....	28
4.2.4 Imaging Buffer (IB).....	29
4.2.5 Protocollo ex-novo per l'analisi di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Riso tramite Microscopio a Fluorescenza Nikon.....	30
4.2.6 Analisi dei dati.....	32
4.3 Inibitori utilizzati.....	34
4.4 Statistica.....	37
<b>5) Risultati.....</b>	<b>38</b>
5.1 Determinazione del range dinamico della sonda.....	38
5.2 Determinazione dei transienti di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> citosolica indotti da sale.....	39
5.3 Effetto della Reversina sui transienti di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> indotti da sale .....	42
5.4 Effetto di DNQX sui transienti di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> indotti da sale .....	46
5.5 Effetto di CHX sui transienti di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> indotti da sale Nano.....	50
5.6 Effetto di DMSO sui transienti di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> indotti da sale .....	54
<b>6) Discussione e conclusioni.....</b>	<b>57</b>
<b>7) Bibliografia.....</b>	<b>62</b>

# 1) Abstract

La salinizzazione del suolo rappresenta una delle maggiori minacce per la produzione agricola a livello globale, con gravi conseguenze economiche e qualitative.

In questo contesto, il riso (*Oryza sativa L.*) è particolarmente sensibile allo stress salino, il che rende cruciale lo studio dei meccanismi di tolleranza.

Il progetto si propone di indagare gli eventi di segnalazione precoce coinvolti nella risposta allo stress salino, utilizzando due varietà italiane di riso: Vialone Nano (sensibile) e Baldo (tollerante).

In questo lavoro sono state analizzate le dinamiche di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> citosolica in risposta allo stress salino, utilizzando due varietà di riso con diversa sensibilità allo stress, sfruttando una sonda geneticamente codificata.

Particolare attenzione è stata posta sulla componente proteica delle membrane cellulari, utilizzando vari inibitori per studiare il ruolo ed il coinvolgimento di diverse proteine nella formazione dei transienti di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in risposta al sale.

## **2) Introduzione**

### **2.1 Produzione di cibo in relazione ai cambiamenti climatici**

La produzione di cibo è una componente fondamentale della sopravvivenza umana e dello sviluppo economico globale. Tuttavia, questa produzione è strettamente legata alle condizioni ambientali e climatiche. I cambiamenti climatici rappresentano una delle sfide più significative per l'agricoltura e la sicurezza alimentare nel XXI secolo. Con l'aumento delle temperature globali, i cambiamenti nei modelli di precipitazione e la frequenza crescente di eventi meteorologici estremi, le implicazioni per la produzione di cibo sono enormi e complesse.

I cambiamenti climatici influenzano la produzione agricola in molteplici modi. L'aumento delle temperature può ridurre i rendimenti delle colture in regioni già calde, accelerando la maturazione delle piante e riducendo il periodo di crescita. Secondo un rapporto dell'Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC, 2014), ogni grado di aumento della temperatura media globale può ridurre i rendimenti delle principali colture come il grano, il mais e il riso di circa il 5-7%.

Inoltre, i cambiamenti nei modelli di precipitazione possono portare a siccità più frequenti e prolungate, nonché a piogge intense e alluvioni. La siccità può devastare i raccolti e ridurre la disponibilità di acqua per l'irrigazione, mentre le alluvioni possono causare danni alle infrastrutture agricole e alla perdita di terreni coltivabili (Lobell et al., 2008).

I cambiamenti climatici influenzano anche la distribuzione e la prevalenza di malattie e parassiti che colpiscono le colture. Temperature più calde possono favorire la proliferazione di insetti dannosi e la diffusione di malattie fungine e batteriche. Ad esempio, il riscaldamento globale può estendere l'areale geografico

di alcuni parassiti, portando a nuove minacce per le colture in regioni precedentemente non colpite (Rosenzweig et al., 2001).

Per affrontare le sfide poste dai cambiamenti climatici, è essenziale adottare strategie di adattamento. L'adattamento può includere lo sviluppo e l'implementazione di varietà di colture resistenti al caldo e alla siccità, l'adozione di pratiche agricole sostenibili e l'ottimizzazione dell'uso delle risorse idriche (Howden et al., 2007). Le tecnologie avanzate, come l'agricoltura di precisione, possono migliorare l'efficienza produttiva e ridurre gli impatti ambientali.

I cambiamenti climatici rappresentano una minaccia significativa per la produzione alimentare globale, con potenziali impatti devastanti sulla sicurezza alimentare e sul benessere umano. Tuttavia, attraverso l'adozione di strategie di adattamento, è possibile affrontare queste sfide e garantire un futuro sostenibile per l'agricoltura. La ricerca continua e l'innovazione tecnologica saranno fondamentali per sviluppare soluzioni efficaci e resilienti che possano sostenere la produzione alimentare in un clima in rapido cambiamento.

## **2.2 L'importanza del riso**

È ampiamente riconosciuto che il riso (*Oryza sativa L.*) occupa una posizione fondamentale nella nutrizione globale, essendo la principale fonte di cibo per oltre la metà della popolazione mondiale (Khush, 2005). Infatti, la sua coltivazione si estende a più di 100 paesi, sottolineando la sua importanza universale (Muthayya et al., 2014).

Tuttavia, le piante di riso sono suscettibili a diversi stress fondamentali, tra cui siccità, freddo, alte temperature e salinità, e l'escalation di eventi meteorologici estremi dovuti ai cambiamenti climatici minaccia significativamente la produzione futura di riso (Wassmann et al., 2009). In particolare, la salinità del

suolo si distingue come uno dei fattori abiotici più critici che influenzano la crescita e la resa del riso (Formentin et al., 2018).

Come molte colture, il riso è classificato come glicofita, un gruppo di piante particolarmente vulnerabili allo stress salino. Di conseguenza, livelli elevati di salinità compromettono la crescita e lo sviluppo delle glicofite, riducendo significativamente le rese delle colture e minacciando la sicurezza alimentare (Zhu, 2001).

Tenendo conto di ciò, la sostenibilità della produzione futura di riso dipende significativamente dall'uso di varietà resilienti capaci di adattarsi alle sfide ambientali in evoluzione. Sicuramente, mentre i progressi nelle agrotecnologie, inclusa la selezione genetica, hanno portato ad aumenti nelle rese del riso, migliorare la resilienza della coltura contro gli stress ambientali è fondamentale per garantirne la coltivazione sostenibile di fronte ai cambiamenti climatici (Zhang, 2007).

## **2.3 Stress salino**

Lo stress salino ha un impatto significativo sulla produzione globale di cereali, rendendo improduttivi fino a 1,5 milioni di ettari di terreni agricoli ogni anno e riducendo le rese su ulteriori 46 milioni di ettari (UNESDOC Unesco) (RiEnergia).

Con oltre un miliardo di ettari e più della metà della popolazione mondiale che affrontano sfide severe legate alla salinità, il riso è il cereale più vulnerabile a questo tipo di stress (Munns and Tester et al., 2008).

Nonostante i progressi compiuti nella comprensione delle risposte allo stress, della segnalazione e della selezione per la tolleranza alla salinità, lo sviluppo di varietà di riso resistenti al sale rimane sfuggente a causa della complessa natura dei meccanismi di tolleranza alla salinità.



Infatti, la nostra comprensione dei processi fondamentali che permettono alle piante di adattarsi agli stress abiotici è ancora incompleta. Questa situazione evidenzia la necessità critica di ulteriori ricerche sui meccanismi di resilienza e adattamento delle piante, insieme allo sviluppo di strategie efficaci per contrastare gli effetti di tali stress (Formentin et al., 2018).

Lo stress salino influisce negativamente sulle piante interferendo con processi come la germinazione dei semi, la crescita, lo sviluppo e le fasi di fioritura e fruttificazione. Induce principalmente stress ionico e osmotico, innescando una vasta gamma di complessi percorsi di segnalazione (Munns e Tester, 2008). Di conseguenza, l'elevata presenza di sodio nel suolo salino limita la capacità delle piante di assorbire acqua e nutrienti, portando all'insorgenza di stress primari come lo stress osmotico e ionico, che causano stress ossidativo e scatenano una cascata di stress secondari che provocano varie alterazioni fisiologiche e molecolari (Zhu, 2001). In risposta, le piante rallentano la loro crescita e attivano processi metabolici attraverso specifici percorsi di trasduzione del segnale per migliorare la loro tolleranza al sale (Formentin et al., 2018).

## **2.4 Ruolo dei secondi messaggeri in risposta allo stress salino**

Il calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e le specie reattive dell'ossigeno (ROS) svolgono un ruolo cruciale nella risposta del riso agli stress abiotici, fungendo da mediatori chiave nei percorsi di segnalazione cellulare. Quando il riso è esposto a stress abiotici come salinità, siccità o temperature estreme, l'omeostasi cellulare è compromessa, portando all'accumulo di ROS. Questi ROS, sebbene possano causare danni cellulari ossidando lipidi, proteine e DNA, agiscono anche come molecole di segnalazione che attivano le risposte di difesa. L'aumento dei livelli di ROS induce un flusso di  $\text{Ca}^{2+}$  nel citosol, il quale attiva varie proteine di segnalazione come calmoduline e chinasi dipendenti dal calcio. Queste proteine modulano

l'espressione genica e le attività enzimatiche, aiutando la pianta ad adattarsi e a mitigare i danni causati dallo stress (Barkha et al., 2023).

L'interazione tra ROS e  $\text{Ca}^{2+}$  è essenziale per attivare vie di segnalazione che portano alla chiusura degli stomi, riducendo così la traspirazione e prevenendo ulteriori perdite d'acqua durante la siccità. Inoltre,  $\text{Ca}^{2+}$  modula l'attività di enzimi antiossidanti come superossido dismutasi e catalasi, che disintossicano i ROS, mantenendo l'equilibrio redox cellulare. Questo equilibrio è fondamentale per prevenire i danni ossidativi e promuovere la sopravvivenza della pianta sotto stress abiotico. Le proteine sensibili al calcio, come le calmoduline, svolgono un ruolo significativo nella regolazione di queste risposte di stress. Inoltre, le chinasi dipendenti dal calcio sono coinvolte nell'attivazione di trascrittori specifici che regolano l'espressione dei geni di risposta allo stress.

La segnalazione reciproca tra  $\text{Ca}^{2+}$  e ROS è fondamentale per l'attivazione delle risposte di difesa delle piante, consentendo alla pianta di percepire rapidamente e rispondere agli stress abiotici. Questo meccanismo integrato migliora la tolleranza e la sopravvivenza del riso in condizioni ambientali avverse, dimostrando l'importanza della regolazione redox e della segnalazione del calcio nella gestione dello stress abiotico (Barkha et al., 2023).

## **2.4.1 Produzione di ROS in risposta a stress**

Il signaling ROS rappresenta un meccanismo chiave per consentire alle cellule di rispondere rapidamente a diversi stimoli. Nelle piante, le ROS svolgono un ruolo cruciale nel rilevare lo stress abiotico e biotico, nell'integrare diversi segnali ambientali e nell'attivare reti di risposta allo stress, contribuendo così alla creazione di meccanismi di difesa e resilienza delle piante (Mittler et al., 2022).

Le ROS sono prodotte in vari compartimenti cellulari in risposta a diversi tipi di stress. Durante lo stress da luce eccessiva, ad esempio, le ROS sono principalmente prodotte nei cloroplasti dai fotosistemi I e II e durante la fotorespirazione, mentre durante lo stress da siccità e da calore, le ROS sono prodotte principalmente nei mitocondri e nei cloroplasti e si accumulano anche

nel citosol e nel nucleo.

Gli avanzamenti recenti nello studio del signaling ROS nelle piante includono l'identificazione di recettori ROS e centri di regolazione chiave che collegano il signaling ROS con altre importanti vie di trasduzione del segnale di risposta allo stress e ormoni, nonché nuovi ruoli per le ROS nella segnalazione da organulo a organulo e da cellula a cellula.

È emerso che durante le diverse risposte allo stress si accumulano diversi tipi di ROS in diversi compartimenti cellulari, il che suggerisce che i diversi tipi di stress attivano vie di trasduzione del segnale specifiche per lo stress che attivano meccanismi di difesa specifici.

E' importante considerare che le piante sono evolute in presenza di ROS, suggerendo che la maggior parte delle cellule sia in grado di prevenire la tossicità delle ROS e che queste siano principalmente utilizzate per il rilevamento dello stress e per la segnalazione (Mittler et al., 2022).

Le conclusioni e le prospettive delineate nel lavoro evidenziano una trasformazione nel campo della biologia dei ROS nelle piante, che è passata dall'accento sulla rimozione e produzione di ROS, principalmente nei cloroplasti, allo studio dell'attiva produzione di ROS, ad esempio attraverso le RBOHs, e della sua regolazione attraverso diverse modificazioni post-traduzionali.

Poiché i livelli di ROS dipendono dall'interazione tra produzione, eliminazione e trasporto, sarà importante determinare i meccanismi che regolano il trasporto dei ROS, ad esempio attraverso AQP o altri trasportatori. Inoltre, sarà necessario rivalutare la nostra prospettiva su come i ROS vengono prodotti nelle cellule durante lo stress. Ulteriori ricerche sono necessarie per determinare come il signaling ROS degli organelli sia collegato al citosol, al nucleo e all'apoplasto, nonché per capire come le informazioni sotto forma di firme ROS vengono trasmesse tra questi diversi compartimenti (Mittler et al., 2022).

Inoltre, è fondamentale comprendere meglio i meccanismi che mediano i segnali ROS autopropaganti nelle piante e il loro collegamento alle risposte allo stress.

È necessario anche stabilire se diversi canali possono trasportare attivamente (pompaggio)  $H_2O_2$  contro un potenziale gradiente e se le cellule contengono diverse molecole chaperone che possono trasportare ROS, come  $H_2O_2$ , da una

posizione all'altra, proteggendoli dalla degradazione.

L'identificazione di nuovi sensori ROS, redox e hub redox, e lo studio delle reti trascrizionali responsivi ai ROS, aumenterà la nostra comprensione di come i segnali ROS siano integrati in risposta allo stress.

Tuttavia, per elucidare completamente le reti cellulari dei ROS, è necessario determinare accuratamente i livelli di ROS nei diversi compartimenti utilizzando sensori ROS e redox geneticamente codificati, nonché studiare i flussi di ROS tra diversi compartimenti e organelli (Mittler et al., 2022). Solo ottenendo un ritratto completo del paesaggio di segnalazione ROS indotto da stress della cellula e collegandolo alle reti trascrizionali, metaboliche e proteomiche delle piante, sarà possibile comprendere appieno le funzioni dei ROS nelle piante in risposta allo stress.

## **2.4.2 Signaling dei ROS estrinseco**

Nelle piante, il signaling ROS esterno coinvolge il complesso apoplasto e parete cellulare, che contiene numerosi enzimi che eliminano o producono attivamente ROS, oltre a diversi antiossidanti non enzimatici (Mittler et al., 2022).

Tra questi, le NOX, AQP e perossidasi legate alla parete cellulare svolgono un ruolo fondamentale nel signaling ROS nell'apoplasto. Le RBOHs sono proteine transmembrana altamente regolate che utilizzano NADPH citosolico per generare  $O_2^-$  nell'apoplasto, convertito spontaneamente in  $H_2O_2$  o mediante superossido dismutasi (Mittler et al., 2022). Queste proteine sono pensate per risiedere nella membrana plasmatica in nanodomini insieme a diverse proteine ausiliarie coinvolte nella loro regolazione.

La produzione di ROS da parte delle RBOHs può essere regolata dal legame del  $Ca^{2+}$  ai domini EF-hand nella loro regione amino-terminale citosolica, dalla fosforilazione/de-fosforilazione dei loro terminali amino o carbossilici citosolici, dal legame di acido fosfatidico e/o dal legame di proteine piccole GTP leganti Rho delle piante (ROP) (Mittler et al., 2022).

Le perossidasi legate alla parete cellulare possono anche produrre o eliminare ROS in diverse condizioni e regolare i livelli di ROS apoplastici in risposta a diversi stimoli.

I ROS che si accumulano nell'apoplasto possono reagire direttamente o indirettamente con diversi recettori, ossidare diversi antiossidanti e/o regolare i canali di  $\text{Ca}^{2+}$  e/o  $\text{K}^+$  (Mittler et al., 2022). Tuttavia, per regolare direttamente le vie intracellulari, i ROS prodotti nell'apoplasto devono entrare nelle cellule attraverso le AQPs, canali dell'acqua che facilitano il trasporto di  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Il signaling ROS esterno è attivamente controllato in risposta a diversi stress poiché la produzione di ROS nell'apoplasto e l'ingresso nel citosol sono regolati tramite modificazioni post-traduzionali delle RBOHs e delle AQPs, rispettivamente. Inoltre, poiché l'accumulo di ROS nell'apoplasto può innescare reazioni di fosforilazione citosolica tramite recettori e alterare i flussi di  $\text{Ca}^{2+}$  attraverso i canali della membrana plasmatica, l'interfaccia apoplasto-citosol emerge come un importante centro per molti processi di trasduzione del segnale associati ai ROS durante lo stress (Mittler et al., 2022). Studi trascrittomici su mutanti carenti di hub regolatori come le RBOHs, le cascate MAPK, le HSF e diverse vie di segnalazione del  $\text{Ca}^{2+}$  hanno anche rivelato come questi hub integrino i segnali ROS con altre reti di trasduzione del segnale attivate durante lo stress (Mittler et al., 2022). Ad esempio, uno studio che ha esaminato la risposta trascrittomico del mutante *rbohD* allo stress luminoso ha rivelato che RBOHD è necessario per l'espressione di molti trascritti di risposta precoce, compreso il fattore di trascrizione MYB30, che è risultato importante nelle risposte delle piante allo stress ossidativo. Inoltre, MYB30 funziona a monte di molti altri fattori di trascrizione per regolare migliaia di trascritti in risposta allo stress luminoso (Mittler et al., 2022).

### 2.4.3 Signaling dei ROS intrinseco

Il segnalamento intrinseco dei ROS avviene principalmente nel citosol, dove sono presenti numerosi meccanismi per la rimozione dei ROS, così come alcuni enzimi che producono ROS (Mittler et al., 2022). Questi meccanismi regolano i segnali ROS generati nel citosol e quelli trasportati dall'apoplasto o dagli organelli al nucleo, attraverso il citosol. Il citosol ospita inoltre numerosi centri di segnalazione, come le cascate MAPK, le proteine chinasi dipendenti dal calcio, le proteine chinasi che interagiscono con la proteina calcineurin B-simile, le piccole GTPasi ROP/RAC e diverse fosfatasi (PP2A, PP2C e PTPs), nonché diverse reti di rilevamento del redox (ad esempio, PrxRs, GRXs e TRXs), che integrano diversi segnali ROS con altre molecole segnalatrici, come il  $Ca^{2+}$  e diversi ormoni (Mittler et al., 2022). Le AQP presenti nella membrana plasmatica e/o nelle membrane degli organelli facilitano il trasporto dell' $H_2O_2$  in entrambe le direzioni, consentendo ai livelli di  $H_2O_2$  citosolico di influenzare i livelli di  $H_2O_2$  stesso in altri compartimenti, e viceversa (Miller et al., 2022). Inoltre, i segnali retrogradi e anterogradi tra gli organelli e il nucleo vengono trasmessi attraverso il citosol. Manipolare la capacità del citosol di rimuovere i ROS può cambiare la segnalazione in risposta allo stress e alterare le risposte di acclimatazione e/o di difesa, confermando un ruolo chiave per il citosol nella regolazione del segnalamento ROS (Mittler et al., 2022). Rispetto alla regolazione dei ROS nel citosol, la regolazione dei livelli di ROS e redox nel nucleo è scarsamente compresa (Mittler et al., 2022). Il nucleo contiene diverse proteine che regolano ROS e redox, come GRXs, TRXs, PrxRs e GPXs, nonché GSH, che possono regolare le modifiche post-traduzionali ossidative di diversi fattori di trascrizione e attenuare i segnali ROS nel nucleo (Mittler et al., 2022). Tuttavia, è ancora poco chiaro come i diversi segnali ROS generati nei diversi compartimenti subcellulari durante diversi stress possano raggiungere il nucleo attraverso il citosol senza perdere la loro specificità (Mittler et al., 2022). Una possibilità proposta da studi recenti è l'inclusione di una rete di segnalazione ROS separata, quella degli organelli.

## 2.4.4 Integrazione tra percezione dello stress e signaling dei ROS

L'integrazione del rilevamento dello stress con il signaling ROS nelle piante coinvolge diversi sensori e recettori per i cambiamenti nella luce, nella temperatura e nella pressione osmotica (Mittler et al., 2022). Questi includono canali permeabili al  $\text{Ca}^{2+}$  come ridotta iperosmolarità, induzione di  $\text{Ca}^{2+}$  e canali meccanosensibili o small conductance-like (MSL10) che rilevano cambiamenti osmotici; canali permeabili al  $\text{Ca}^{2+}$  come i canali ciclici nucleotide-gated che rilevano lo stress termico; chinasi recettoriali e proteine ROP che rilevano cambiamenti osmotici.

La vicinanza fisica di alcuni di questi recettori alle RBOHs potrebbe facilitare la produzione di ROS durante le fasi iniziali del rilevamento dello stress e delle risposte (Mittler et al., 2022). Il rilevamento iniziale degli stress abiotici da parte delle piante attraverso diversi recettori e sensori che porta a rapidi cambiamenti nella segnalazione del  $\text{Ca}^{2+}$  e nelle reazioni di fosforilazione potrebbe quindi essere direttamente collegato alla produzione di ROS.

Uno dei risultati più intriganti degli ultimi anni è che in assenza di determinate RBOHs, lo stress luminoso non induce una rapida accumulazione di ROS nelle piante (Mittler et al., 2022). Questo risultato è sorprendente perché tradizionalmente si pensava che durante lo stress luminoso gli eccessivi ROS prodotti nei cloroplasti diffondessero nel citosol attraverso le AQPs, suggerendo che durante lo stress luminoso i cloroplasti siano capaci di gestire i loro livelli interni di ROS, e che l'accumulo di ROS nelle cellule sia principalmente il risultato della produzione di ROS per la segnalazione da parte delle RBOHs. Inoltre, è possibile che durante lo stress luminoso due diverse popolazioni di cloroplasti siano coinvolte nella segnalazione ROS: (1) cloroplasti associati al nucleo che mediano la segnalazione cloroplasto-nucleo e (2) cloroplasti associati alla membrana plasmatica che innescano segnali ROS guidati dalle RBOHs (Mittler et al., 2022).  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  o  $1\text{O}_2$  che si accumulano nei cloroplasti (anche a bassi livelli) durante lo stress luminoso potrebbero anche innescare diversi segnali retrogradi che attivano la produzione di ROS da parte delle RBOHs.

## 2.5 Interazioni tra ROS e Ca<sup>2+</sup> nella risposta a stress salino in Baldo e Vialone Nano

La tolleranza alla salinità rappresenta una sfida significativa per le piante, con variazioni notevoli sia tra che all'interno delle specie. *Oryza sativa*, con le migliaia di varietà coltivate in diversi ambienti in tutto il mondo, costituisce un bacino di diversità genetica che può essere sfruttata per individuare caratteri utili alla selezione di varietà più resilienti ai cambiamenti climatici. Ne è una dimostrazione il fatto che sia stato possibile individuare varietà tolleranti alla salinità, sebbene la specie sia altamente sensibile. In un recente lavoro condotto su riso italiano, due varietà con contrastante sensibilità allo stress salino sono state individuate e analizzate in studi comparativi per individuare i meccanismi molecolari alla base della tolleranza (Formentin et al., 2018a). Queste due varietà sono Vialone Nano (VN), sensibile alla salinità, e Baldo (B), tollerante.

Il confronto tra le due varietà è stato fatto a vari livelli. Sia in colture cellulari che in pianta. In entrambi i sistemi, differenze sono state osservate nelle dinamiche di produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> citosolica tra la varietà sensibile e quella tollerante.

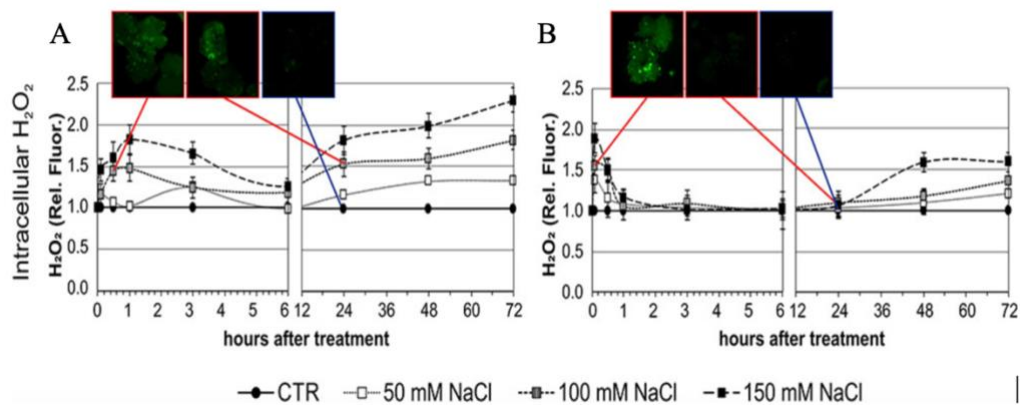
L'esposizione al cloruro di sodio (NaCl) ha dimostrato che sia le cellule che le piante di B sono in grado di attivare specifici meccanismi di tolleranza, mentre le cellule e piante di VN vanno incontro a morte cellulare e senescenza fogliare anticipata. La tolleranza di Baldo è legata ad una risposta molto veloce e specifica che si traduce in un'acclimatazione morfofisiologica con ripristino dell'omeostasi ionica (compromessa dall'accumulo dello ione tossico Na<sup>+</sup>), modificazione dell'architettura radicale, e recupero della crescita.

L'analisi delle espressioni geniche e delle attività enzimatiche coinvolte nei sistemi antiossidanti ha mostrato che, sotto stress salino, le cellule B inducono *SODCC2* (superoxide dismutase CC2), *APX1* e *APX2* (ascorbate peroxidase 1 and 2) in maniera più precoce o più intensa rispetto a VN. Questo suggerisce che la varietà tollerante sia in grado di modulare meglio l'espressione dei geni mirati al controllo dei livelli di ROS rispetto alla varietà sensibile. La presenza di un controllo redox migliore nelle cellule B è anche suggerita dai diversi livelli di

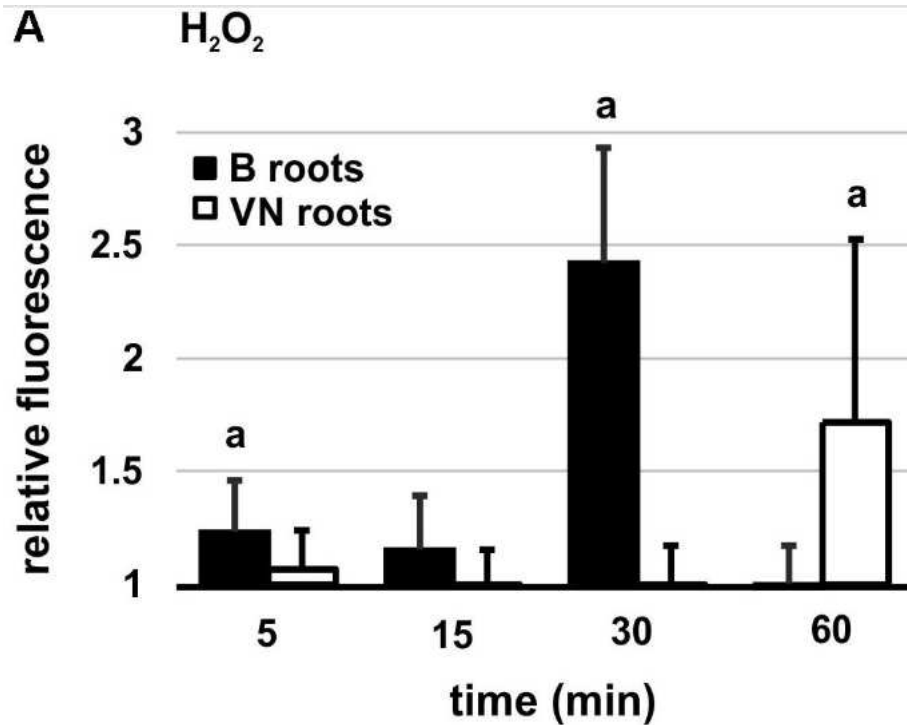


attività enzimatica coinvolte nella rimozione dei ROS riscontrati nella varietà tollerante rispetto a quella sensibile già in condizioni di controllo. Inoltre, quando il livello di glutazione è stato aumentato nelle cellule VN mediante l'aggiunta esogena in mezzo di coltura, la morte cellulare indotta dal sale è stata prevenuta, confermando ulteriormente che i livelli innati di difesa antiossidante sono cruciali per tollerare questo stress (Formentin et al., 2018b).

Recentemente si è capito che i ROS per le piante non sono solo sostanze tossiche ma anche secondi messaggeri con una funzione nella risposta agli stimoli ambientali. Il lavoro di Formentin e colleghi (2018a) ha mostrato per la prima volta che esistono dei transienti di  $H_2O_2$  citosolici che mediano la risposta di tolleranza alla salinità.



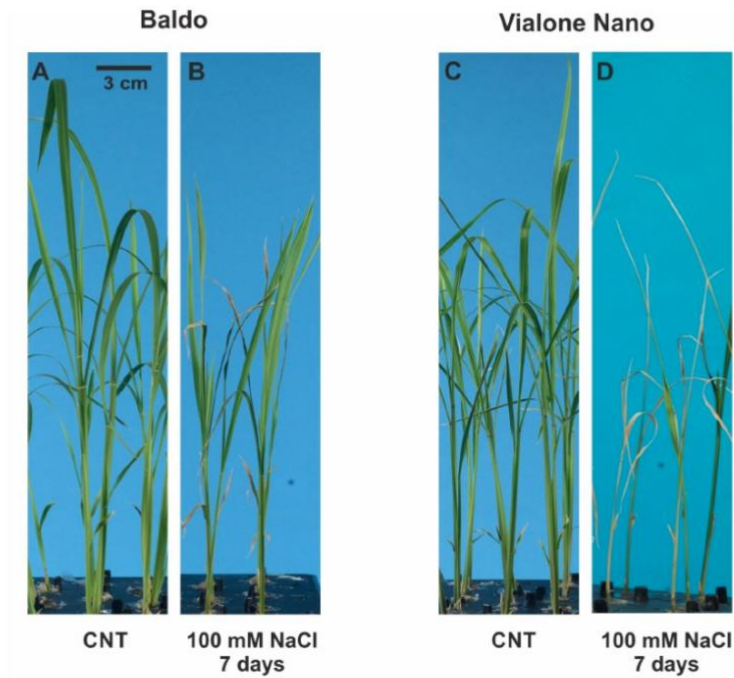
**Figura 1:**  $H_2O_2$  prodotta da colture cellulari in sospensione di riso di Vialone Nano (A) e Baldo (B) e misurata in diversi momenti dopo il trattamento con sale. Cerchi chiusi – linea retta, Controllo; quadrati aperti – linea tratteggiata, 50 mM NaCl; quadrati grigi - linea tratteggiata piccola, NaCl 100 mM; quadrati chiusi – linea tratteggiata, 150 mM NaCl. (A,B)  $H_2O_2$  intracellulare misurata utilizzando il metodo DHR-123; i valori sono stati normalizzati rispetto ai livelli delle cellule di controllo, a cui è stato assegnato un valore pari a 1 e quindi non hanno SD. Gli inserti sono immagini rappresentative di cellule colorate in diversi punti temporali. I valori rappresentano la media  $\pm$  SE di tre esperimenti indipendenti.



**Figura 2:** Risposte precoci nelle radici delle piante. (A) Panoramica della produzione di  $H_2O_2$  nelle radici di piante esposte allo stress salino. I valori vengono calcolati rispetto al controllo in ogni momento. I dati sono la media  $\pm$  DS di 10 repliche biologiche e tre repliche tecniche.

Questi transienti si sono dimostrati differenti nelle cellule della varietà sensibile, con conseguente inabilità di attivare i geni di risposta corretti.

Complessivamente, questi risultati indicano che, una differenza nel tempo, nell'entità e nell'intensità della produzione intracellulare di  $H_2O_2$  in risposta allo stress salino, insieme a una diversa attività antiossidante intrinseca, potrebbero essere responsabili delle differenti risposte e dei differenti destini osservati nelle due varietà di riso.



**Figura 3:** Analisi fisiologiche di piante di riso Baldo e Vialone Nano in condizioni di controllo e di stress.

## 2.5.1 Transienti di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indotti dal sale e attivazione del fattore di trascrizione SERF1

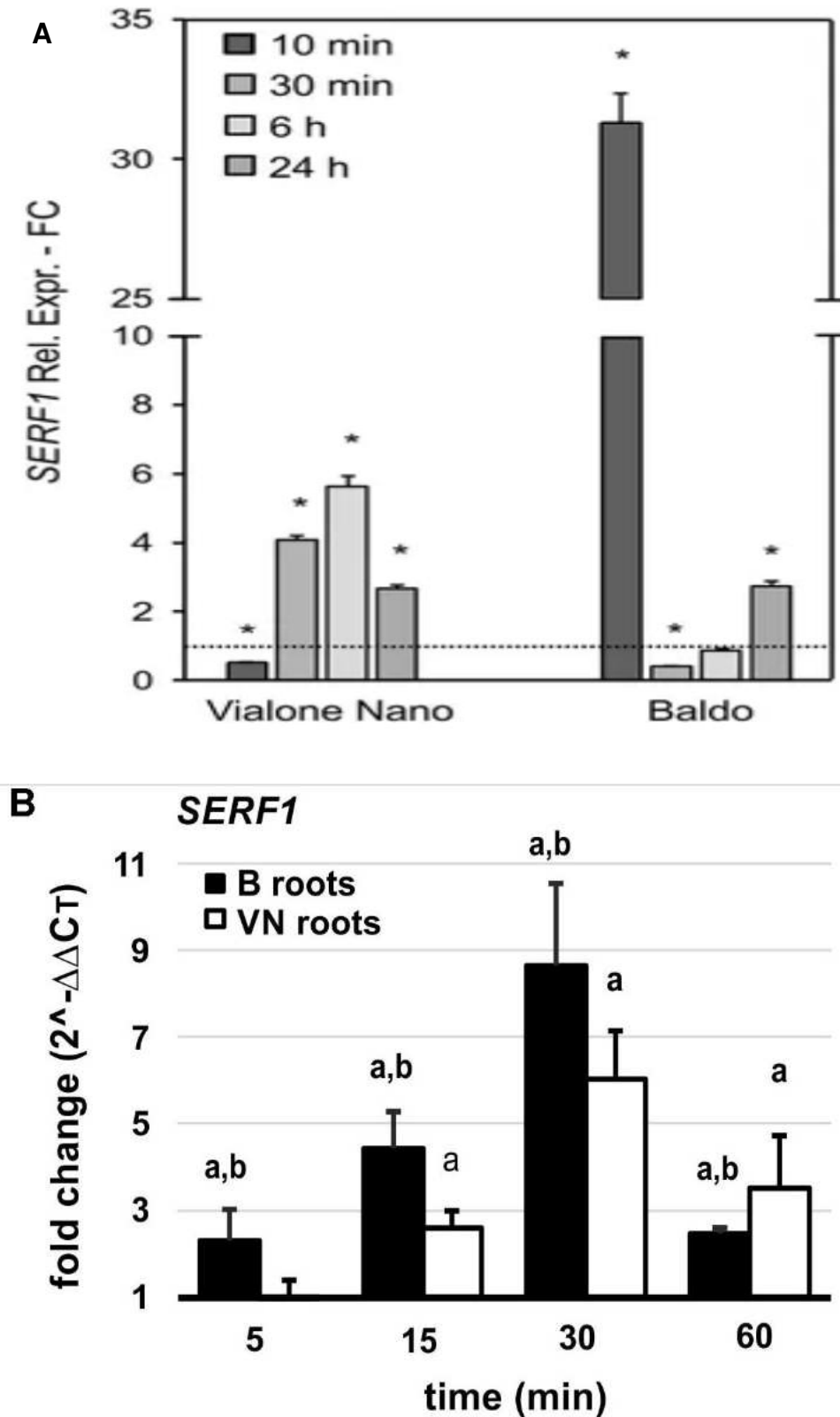
La risposta delle piante allo stress salino è un processo complesso influenzato da diversi fattori, tra cui la produzione di radicali liberi come l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e l'espressione di geni coinvolti nei percorsi di segnalazione dello stress. In riso, i transienti di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> citosolico giocano un ruolo cruciale nell'attivazione di geni responsabili della tolleranza allo stress salino, tra cui il fattore di trascrizione SERF1, espresso in radice e attivato sia da sale che da ROS (Schmidt et al., 2013).

La varietà Baldo, rispetto a Vialone Nano, presenta una risposta più rapida e intensa con un picco transitorio nell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> citosolico (Fig.1), che coincide con un rapido aumento nell'espressione del gene *SERF1*. Al contrario, Vialone Nano non

mostra transienti di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ben definiti e la sua risposta allo stress salino è più lenta e meno intensa, con un picco nell'espressione di *SERF1* che si verifica solo 6 ore dopo l'inizio dello stress.

L'analisi evidenzia che i transienti di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sono fondamentali per l'attivazione differenziale del gene *SERF1* nelle due varietà di riso. La rapida e intensa produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Baldo potrebbe essere associata alla sua maggiore tolleranza allo stress salino, mentre la risposta più tardiva e meno pronunciata di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Vialone Nano potrebbe contribuire alla sua maggiore sensibilità (Figura 4).

Comprendere le differenze nella risposta ai transienti di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tra le varietà di riso Baldo e Vialone Nano è fondamentale per lo sviluppo di strategie di miglioramento delle piante per aumentare la loro tolleranza allo stress ambientale. Questo studio sottolinea l'importanza dei transienti di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> come possibili target per la manipolazione genetica al fine di migliorare la resistenza delle piante allo stress salino.



**Figura 4:** Espressione relativa (fold change) del gene *SERF1* in diversi momenti temporali dopo il trattamento con 100 mM di NaCl in Vialone Nano e Baldo, sia

in coltura cellulare (A) che in radice (B). I valori rappresentano la media  $\pm$  SE di tre esperimenti indipendenti in duplicato. L'asterisco indica i valori che sono significativamente diversi rispetto a quelli non trattati secondo il test di Wilcoxon-Mann-Whitney ( $p < 0.01$ ).

L'analisi evidenzia che i transienti di  $H_2O_2$  sono fondamentali per l'attivazione differenziale del gene SERF1 nelle due varietà di riso. La rapida e intensa produzione di  $H_2O_2$  in Baldo potrebbe essere associata alla sua maggiore tolleranza allo stress salino, mentre la risposta più tardiva e meno pronunciata di  $H_2O_2$  in Vialone Nano potrebbe contribuire alla sua maggiore sensibilità.

Comprendere le differenze nella risposta ai transienti di  $H_2O_2$  tra le varietà di riso Baldo e Vialone Nano è fondamentale per lo sviluppo di strategie di miglioramento delle piante per aumentare la loro tolleranza allo stress ambientale. Questo studio sottolinea l'importanza dei transienti di  $H_2O_2$  come possibili target per la manipolazione genetica al fine di migliorare la resistenza delle piante allo stress salino.

## **2.5.2 Coinvolgimento delle NADPH ossidasi nella Risposta allo Stress Salino nelle Varietà di Riso Baldo e Vialone Nano**

L'analisi della risposta allo stress salino nelle piante, come il riso, rivela il coinvolgimento cruciale dei geni *NOX* (NADPH ossidasi), noti per la loro funzione nella produzione di radicali liberi e nell'adattamento delle piante a condizioni ambientali avverse. Questa analisi si concentra sulla comprensione del ruolo dei geni *NOX* nelle varie risposte delle varietà di riso Baldo e Vialone Nano allo stress salino.

L'esposizione delle varietà di riso Baldo e Vialone Nano allo stress salino induce

un aumento significativo della produzione di radicali liberi, inclusi l'anione superossido ( $O_2^-$ ), che è strettamente correlato all'attivazione dei geni *NOX*. Questo aumento dei radicali liberi, come evidenziato dal lavoro di Formentin et al. (2018), è uno degli eventi precoci osservati durante la risposta allo stress salino e può influenzare direttamente la tolleranza delle piante all'ambiente salino.

Le *NOX* agiscono come nodi centrali nella segnalazione intracellulare durante la risposta allo stress salino. L'attivazione delle proteine *NOX*, regolata da  $Ca^{2+}$ , porta alla produzione di  $O_2^-$ , che funge da segnale molecolare chiave per innescare una serie di risposte fisiologiche e biochimiche volte a mitigare gli effetti negativi dello stress salino sulle piante.

La produzione di  $O_2^-$  mediata dalle proteine *nox* è cruciale per la generazione del transiente di  $H_2O_2$  misurato nelle radici di riso, come dimostrato da Formentin et al. (2018a). Gli esperimenti con DPI, un inibitore della *nox* hanno dimostrato che il burst intracellulare di  $H_2O_2$  è generato a livello della membrana plasmatica.

L'inibizione del burst di  $H_2O_2$  nelle radici di Baldo ha significativamente influenzato l'espressione dei geni a valle, come *SERF1*, *DREB2A* e *NHX1*, risultando in una risposta simile a quella osservata nella varietà Vialone Nano.

In dettaglio, l'inibizione della NADPH ossidasi (*NOX*) mediante DPI ha abolito il picco di  $H_2O_2$  solitamente osservato dopo 30 minuti di trattamento e ha ridotto il livello di espressione di *SERF1* del 50,1%. Dopo un'ora di trattamento, l'espressione dei geni *OsDREB2A* e *NHX1*, normalmente over regolati in questa fase nella varietà tollerante, è diminuita rispettivamente del 31% e del 49,1% .

Questi risultati indicano che la perdita del picco precoce di  $H_2O_2$  nella varietà tollerante influenza la via di segnalazione mediata da *SERF1*, rendendola simile a quella osservata nelle radici di Vialone Nano. L'interazione delle proteine *NOX* con altri componenti del segnale di stress salino, come le mitogen-activated protein kinase (*MAPK*) e i fattori di trascrizione, è cruciale per coordinare una risposta efficace delle piante allo stress salino. Questa interazione permette una regolazione precisa dei processi di adattamento delle piante allo stress salino e potrebbe rappresentare un punto chiave per strategie di ingegneria genetica volte a migliorare la tolleranza delle piante al salino.

Il coinvolgimento delle proteine *NOX* nella risposta allo stress salino rivela la loro

importanza cruciale nell'adattamento delle piante alle condizioni ambientali avverse.

### **2.5.3 Ruolo delle Aquaporine**

Le aquaporine, proteine integrali di membrana, svolgono un ruolo fondamentale nel trasporto di  $H_2O_2$  nelle radici delle piante di riso sottoposte a stress salino. Queste proteine sono tradizionalmente note per il trasporto di molecole come acqua e glicerolo, ma recenti studi hanno rivelato che facilitano anche la diffusione di  $H_2O_2$  attraverso la membrana cellulare. Questo è particolarmente vero per le sottofamiglie PIP1 e PIP2, che mostrano un'alta permeabilità per  $H_2O_2$ , permettendo un rapido trasporto di questa molecola segnale attraverso la membrana cellulare (Wragg et al., 2020) (Hao et al., 2020).

Le aquaporine facilitano il movimento di  $H_2O_2$  mimando il movimento dell'acqua, mantenendo simili meccanismi di legame a idrogeno. Questo facilita il passaggio delle molecole di  $H_2O_2$  attraverso il poro della proteina senza alterare significativamente la struttura della membrana. Gli studi metadinamici e di campionamento delle traiettorie di transizione hanno fornito una visione dettagliata dei meccanismi di permeazione di  $H_2O_2$ , mostrando che questa molecola mantiene interazioni di legame a idrogeno con le molecole d'acqua circostanti durante il suo transito attraverso le aquaporine (Israel et al., 2022)

Durante lo stress salino, le piante di riso accumulano specie reattive dell'ossigeno (ROS) come  $H_2O_2$ , che agiscono come importanti molecole segnale nella risposta allo stress ossidativo. Le aquaporine sono cruciali per la regolazione dei livelli di  $H_2O_2$ , consentendo una distribuzione controllata di questa molecola attraverso i tessuti della pianta. Questo trasporto regolato è essenziale per attivare le risposte di difesa contro lo stress salino e per modulare la crescita e lo sviluppo delle radici (Wragg et al., 2020).

Esperimenti condotti su mutanti di *Arabidopsis* (Israel et al., 2022) di aquaporine PIP2 hanno mostrato differenze significative nella biomassa e nella crescita delle



radici sotto trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. I mutanti, come *pip2;4* e *pip2;4/pip 2;5*, presentano una riduzione significativa della biomassa totale rispetto ai wild type, indicando che le aquaporine sono cruciali per la gestione efficace dello stress ossidativo indotto da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Questi mutanti mostrano variazioni nel rapporto radice-fusto, suggerendo un cambiamento nell'allocazione delle risorse per far fronte allo stress (Israel et al., 2022).

### **3) Scopo della tesi**

Dai dati ottenuti in precedenza è chiaro che alla base della tolleranza alla salinità delle piante della varietà Baldo c'è il signaling di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel citosol delle due varietà è infatti diverso in risposta al sale e questo comporta una diversa risposta anche a livello di espressione genica.

L'utilizzo in passato di coloranti fluorescenti per i ROS ha permesso di individuare dei diversi picchi di produzione di ROS in Baldo e Vialone Nano in risposta allo stress salino. Ma il sistema non era nè specifico nè raziometrico. Il recente ottenimento nel laboratorio della prof.ssa Formentin di piante transgeniche esprimenti una sonda geneticamente codificata e raziometrica per la H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ha aperto nuovi orizzonti per lo studio dei segnali di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vivo*.

L'obiettivo della tesi è stato quindi quello di analizzare i transienti di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vivo* nelle radici delle due varietà e approfondire l'ipotesi che i meccanismi di tolleranza nel riso siano dettati da una diversa composizione di proteine di membrana tra Baldo e Vialone Nano. Il progetto comprendeva le seguenti attività:

1. L'osservazione dei transienti di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nelle radici delle varietà di riso Vialone Nano e Baldo, utilizzando sonde geneticamente codificate per rilevare in tempo reale e in situ le dinamiche di questi segnali.
2. L'analisi del ruolo delle proteine di membrana nella risposta allo stress salino, utilizzando inibitori diversi per testare l'effettivo coinvolgimento nell'induzione del transiente di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> citosolico.
3. Il confronto tra le risposte delle due varietà di riso per identificare differenze chiave che possano essere sfruttate per migliorare la tolleranza allo stress salino nelle colture.

Gli esperimenti messi a punto in questo lavoro di tesi sono pionieristici perché mai eseguiti prima in riso e hanno permesso la creazione di nuovi strumenti per lo studio del signaling intracellulare in una specie di interesse agrario.

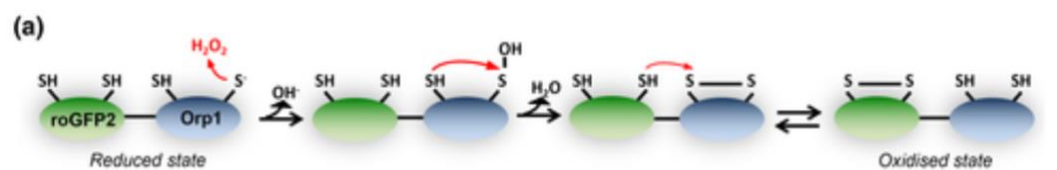
Attraverso questi studi, si mira ad ottenere la conferma del coinvolgimento della componente proteica di membrana nella risposta allo stress salino nel riso, che possa contribuire allo sviluppo di strategie di miglioramento genetico per colture più resistenti.

## 4) Materiali e metodi

### 4.1 Sonda roGFP2-ORP1

La sonda roGFP2-Orp1 è una proteina chimerica che combina il sensore redox roGFP2 con la perossiredoxina batterica Orp1. Il roGFP2 è una proteina fluorescente verde modificata che cambia la sua emissione fluorescente in risposta allo stato redox, mentre Orp1 è una perossiredoxina, un enzima che reagisce specificamente con il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ).

Il funzionamento della sonda si basa sulla capacità di Orp1 di ossidarsi rapidamente in presenza di  $H_2O_2$ . Quando Orp1 si ossida, induce un cambiamento conformazionale in roGFP2, alterando così le sue proprietà fluorescenti (Figura 5).



**Figura 5:** Un modello dei meccanismi biochimici attraverso i quali roGFP2-Orp1 risponde in modo reversibile ai cambiamenti di  $H_2O_2$ , includendo un relè redox basato sulla prossimità tra le cisteine di roGFP2 e Orp1 (Gutscher et al., 2009).

La roGFP2 ossidata emette fluorescenza a una lunghezza d'onda diversa rispetto alla sua forma ridotta, permettendo il monitoraggio dello stato redox attraverso misurazioni fluorescenti. Questa variazione del rapporto tra le emissioni fluorescenti della forma ossidata e ridotta di roGFP2 consente di quantificare i livelli intracellulari di  $H_2O_2$ . La misurazione è altamente sensibile e specifica, permettendo di seguire in tempo reale le fluttuazioni di  $H_2O_2$  nelle Grazie alla sua sensibilità e specificità, ha permesso di chiarire il ruolo dell' $H_2O_2$  come molecola di segnalazione nelle risposte di difesa di *Arabidopsis*, contribuendo a una

migliore comprensione dei meccanismi di risposta allo stress ossidativo nelle piante.

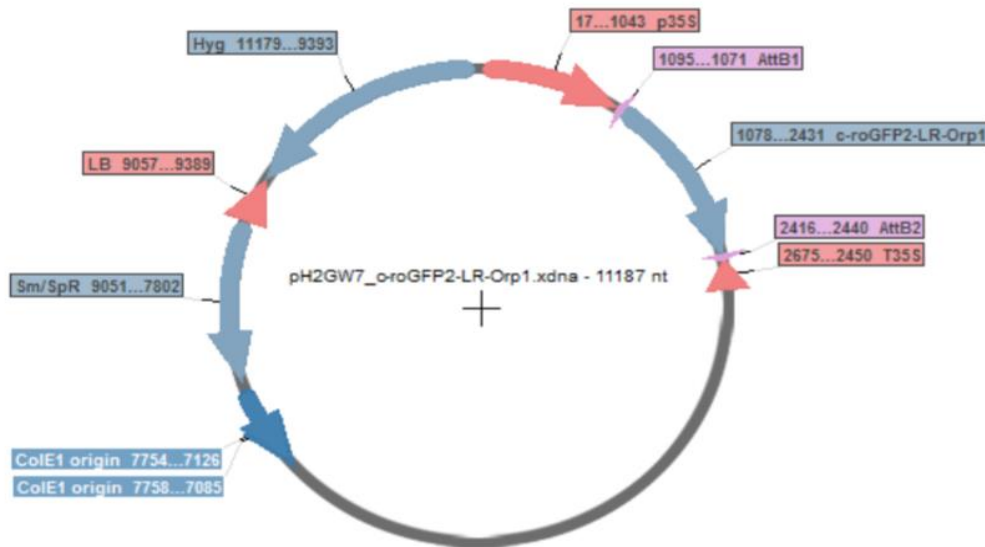


Figura 6: Vettore binario pH2GW7:c-roGFP2-Orp1

## 4.2 Setup degli esperimenti di imaging *in vivo*

### 4.2.1 Sterilizzazione

I semi transgenici T2 delle due varietà vengono inizialmente decorticati e in seguito sterilizzati secondo la procedura qui riportata.

1. Lavaggio con Etanolo 70% v/v (diluito con acqua Milli Q) → 1 minuto
2. Lavaggio con Acqua Milli Q sterile → 5 minuti
3. Lavaggio con Ipoclorito di Sodio 5% v/v (diluito con acqua Milli Q) con aggiunta dello 0,1% v/v di Tween 20 → 15 minuti
4. 5 lavaggi con Acqua Milli Q sterile → 10 minuti Il dosaggio dei solventi avviene in base al numero dei semi, fino a 150 semi 20 ml, 300 semi 50ml.

Ogni passaggio prevede l'agitazione meccanica su uno shaker. Il passaggio in

ipoclorito, in base alla varietà, può essere ripetuto diversamente: Vialone Nano necessita di 2 lavaggi, per Baldo invece 3.

## **4.2.2 Germinazione dei semi di riso**

I semi sterilizzati vengono fatti germinare in piastre Petri quadrate tramite il terreno agar MS ½. Per quanto riguarda la preparazione di un litro di medium MS ½ i componenti inseriti sono:

- 2,2 g Murashige and Skoog (MS) con vitamin (Micropoli)
- 15 g di saccarosio (Sigma)
- 8,0 g di plant agar (Micropoli)
- Portare a pH 5.7 con KOH

Le piastre sono riempite con 50 ml di medium e lasciate raffreddare all'interno della cappa sterile. Una volta solidificato, per ogni piastra vengono posti 10 semi di Vialone Nano o di Baldo. La distanza tra un seme e l'altro è di 1 cm e l'embrione viene sempre posto dalla stessa parte di modo tale da non creare antagonismo tra le radici.

## **4.2.3 Condizioni di crescita delle piante**

Una volta inseriti i semi, le piastre vengono sigillate con Parafilm® e poste all'interno di una camera di crescita per 120 ore: temperatura 26°C giorno/notte, umidità relativa tra 20-50% e 450 µE di intensità di luce, fotoperiodo di 16h/8h tra giorno/notte. Ogni step di sterilizzazione, semina e diffusione dei semi in piastra è stato condotto in condizioni sterili sotto cappa a flusso orizzontale.

## 4.2.4 Imaging Buffer (IB)

La combinazione di MES (acido 2-(N-morfolino)etansolfonico), CaCl<sub>2</sub> (cloruro di calcio) e KCl (cloruro di potassio) in un tampone di imaging serve a scopi specifici nella microscopia a fluorescenza, in particolare per l'imaging di cellule vive o altre applicazioni dove il controllo delle condizioni ambientali è fondamentale.

Per la produzione di 1 litro di Imaging buffer sono state utilizzate le seguenti quantità di reagenti:

- 21,3 mL MES (1 M) come agente tampone:
  - Il MES agisce come agente tampone per mantenere un livello di pH stabile nell'ambiente di imaging. Aiuta a resistere ai cambiamenti del pH che potrebbero altrimenti influenzare le prestazioni dei coloranti o degli indicatori fluorescenti. Questa stabilità è importante per misurazioni di fluorescenza accurate e riproducibili.
- 5 mL CaCl<sub>2</sub> (1M) per ioni calcio:
  - Il cloruro di calcio (CaCl<sub>2</sub>) viene spesso incluso per controllare la concentrazione degli ioni calcio nel tampone. Il calcio è una molecola di segnalazione cruciale in molti processi cellulari e la sua concentrazione può avere un impatto sulle attività cellulari. Includendo CaCl<sub>2</sub> nel buffer di imaging, è possibile imitare i livelli fisiologici di calcio, fornendo un ambiente biologicamente più rilevante per l'imaging di cellule vive.
- 1 mL KCl (1M) per forza ionica:
  - Il cloruro di potassio (KCl) è incluso per regolare la forza ionica della soluzione tampone. La forza ionica influenza l'integrità della

membrana cellulare e la stabilità delle interazioni molecolari. Il mantenimento della forza ionica appropriata aiuta a creare condizioni che assomigliano molto all'ambiente intracellulare.

- La soluzione viene portata a pH 5.8 utilizzando TRIS

In sintesi, la combinazione di MES, CaCl<sub>2</sub> e KCl in un tampone di imaging è una scelta ponderata per garantire condizioni ottimali per la microscopia a fluorescenza, con controllo preciso del pH, regolazione degli ioni calcio e forza ionica adeguata. Questa composizione tampone mira a creare un ambiente che supporti la salute e la funzionalità delle cellule vive durante gli esperimenti di imaging.

## **4.2.5 Protocollo ex-novo per l'analisi di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Riso tramite Microscopio a Fluorescenza Nikon**

Questo protocollo descrive il metodo per analizzare la dinamica dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nelle radici di riso utilizzando un microscopio a fluorescenza invertito Nikon Ti-E.

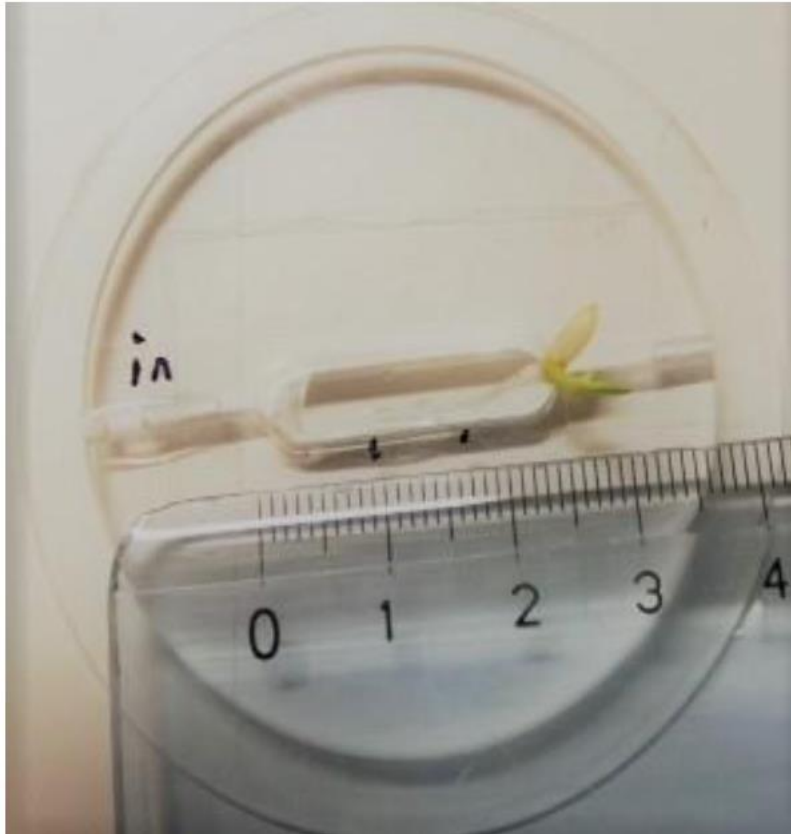
Il processo coinvolge la preparazione delle radici e delle colture cellulari, l'applicazione di trattamenti specifici e l'uso di tecniche di imaging avanzate per monitorare i cambiamenti nell'intensità della fluorescenza.

### **Preparazione del Campione**

Le radici, lunghe tra 1 cm e 2 cm, vengono inserite in una camera di perfusione personalizzata (Figura 7). La camera viene riempita con cotone idrofilo imbevuto



in buffer di imaging (IB).



**Figura 7:** Camera di perfusione per radici di riso.

### **Trattamenti Preliminari**

Nel caso di utilizzo di inibitori, usati per esplorare il coinvolgimento delle proteine di membrana nella formazione dei transienti di  $H_2O_2$ , i campioni vengono pre-trattati in una soluzione contenente l'inibitore disciolto in IB per tempi variabili in base all'inibitore utilizzato per l'esperimento.

### **Processo di Imaging**

Una pompa peristaltica viene utilizzata per far circolare il buffer di imaging all'interno delle camere di flusso, con una portata di 4 mL/min.

I campioni vengono inizialmente lavati per 5 minuti in IB per stabilizzare le condizioni di base.

Per indurre lo stress, viene aggiunto NaCl (400 mM) al sistema di perfusione. Dopo 2 minuti di esposizione allo stress, la soluzione di stimolo viene sostituita con IB per ripristinare le condizioni di base.

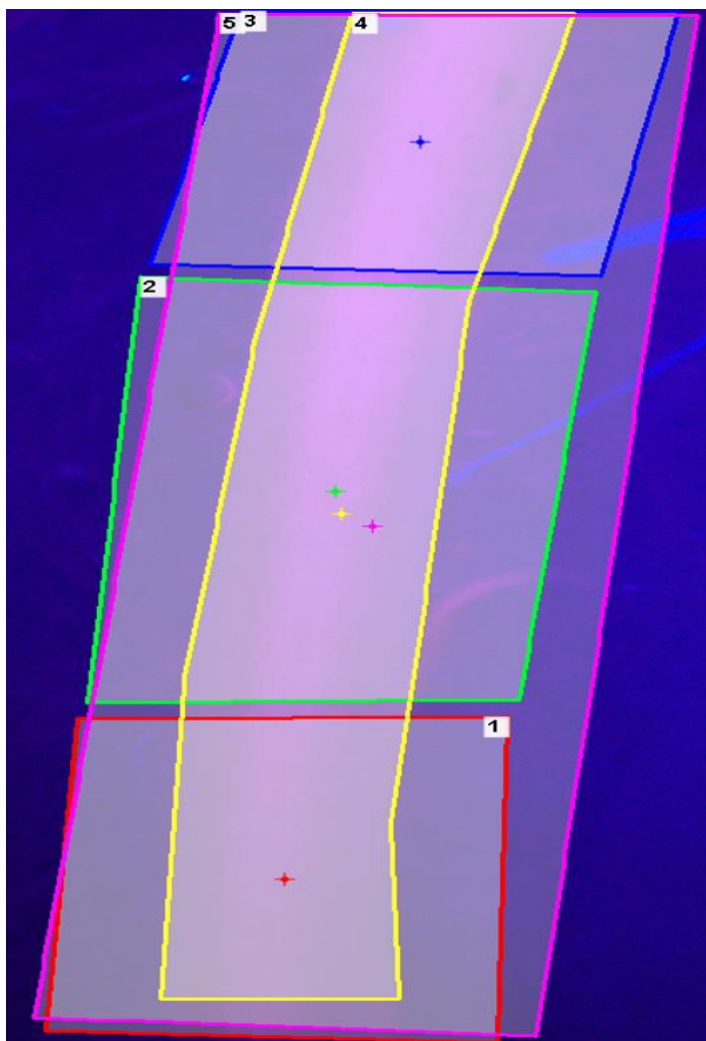
L'imaging viene eseguito utilizzando un microscopio a fluorescenza invertito Nikon Ti-E (Figura 8). I campioni vengono eccitati con una lampada fluorescente dotata di un filtro di eccitazione a 405 nm, e i segnali di emissione vengono filtrati a 475 nm per GFP. L'obiettivo utilizzato è un CFI 4 0.13 NA, con un tempo di esposizione variabile da 100 a 500 ms e un binning CCD  $4 \times 4$ .



**Figura 8:** Microscopio Nikon Ti-E

## 4.2.6 Analisi dei dati

Le immagini vengono raccolte ogni 5 secondi per monitorare i cambiamenti dinamici nell'intensità della fluorescenza. L'intensità della fluorescenza viene misurata su regioni di interesse (ROI, in particolare ROI 4, evidenziata in giallo Fig.9).



**Figura 9:** Regioni di interesse (ROI) selezionate per raccolta dati utilizzando microscopio a fluorescenza Nikon Ti-E.

Le analisi sono state condotte sulla regione di allungamento e differenziamento della radice. Questa regione è la più sensibile allo stress salino.

I dati vengono analizzati utilizzando il software Microsoft Excel.

Il rapporto 475/405 viene calcolato e normalizzato al rapporto iniziale ( $R_0$ ), rappresentando il valore di base prima dell'applicazione dello stimolo. I risultati vengono poi rappresentati come  $\Delta R/R_0$  nel tempo, quindi il valore ottenuto è raziometrico.

## 4.3 Inibitori utilizzati

### Reversina

#### Caratteristiche Chimiche:

- **Formula chimica:**  $C_{34}H_{45}N_7O_4$
- **Peso molecolare:** 615.77 g/mol
- **Concentrazione finale utilizzata:** 5 $\mu$ M in IB con DMSO 0,05%
- **Pre-trattamento:** 15 minuti

#### Potenziale coinvolgimento nell'inibizione di proteine di membrana:

La Reversina è un noto inibitore che ha dimostrato di svolgere un ruolo cruciale nell'attività del recettore di membrana FERONIA (Liu H., et al, 2023), che sono una classe di chinasi di tipo receptor-like cruciali per la regolazione di vari processi cellulari nelle piante. FERONIA è coinvolta nella risposta allo stress meccanico, nella crescita cellulare e nella regolazione dell'integrità della parete cellulare. L'inibizione di FERONIA tramite Reversina ha rivelato l'importanza di questa chinasi nella mediazione dei segnali extracellulari e nella modulazione delle interazioni cellula-cellula. Studi recenti suggeriscono che l'inibizione di FERONIA possa interferire con il corretto funzionamento del pathway di segnalazione che controlla la resistenza agli stress ambientali, evidenziando così il potenziale della Reversina come strumento di ricerca per decifrare le complesse reti di segnalazione nelle piante.

### DNQX (6,7-dinitrochinoxalina-2,3-dione)

#### Caratteristiche Chimiche:

- **Formula chimica:**  $C_8H_4N_2O_6$
- **Peso molecolare:** 224.13 g/mol
- **Concentrazione finale utilizzata:** 10  $\mu$ M in IB con DMSO 0,05%
- **Pre-trattamento:** 30 minuti

### **Potenziale coinvolgimento nell'inibizione di proteine di membrana:**

L'inibitore DNQX (6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-dione) gioca un ruolo significativo nell'attività dei canali cationici GLRs (Glutamate Receptor-Like) . Gli studi condotti utilizzando un sistema di imaging a base di luminescenza di aequorina hanno mostrato che DNQX, un noto antagonista dei GLR, inibisce efficacemente l'attività dei canali GLR nelle piante (Ni J., et al, 2016).

In particolare, l'applicazione di DNQX ha portato a una significativa riduzione dell'aumento dei livelli di calcio intracellulare ( $[Ca^{2+}]_i$ ) indotti dal glutammato nelle radici di riso. Questo suggerisce che i GLRs di riso, denominati OsGLRs, sono coinvolti nella mediazione dell'afflusso di calcio in risposta al glutammato e che l'inibizione di questi recettori da parte di DNQX può modulare questa risposta.

## **Cicloesimide**

### **Caratteristiche Chimiche:**

- **Formula chimica:**  $C_{15}H_{23}NO_4$
- **Peso molecolare:** 281.35 g/mol

- **Concentrazione finale utilizzata:** 250  $\mu$ M in IB
- **Pre-trattamento:** 30 minuti

### **Potenziale coinvolgimento nell'inibizione di proteine di membrana:**

La cicloesimide è un noto inibitore della sintesi proteica utilizzato per studiare i meccanismi di risposta delle piante agli stress abiotici, come lo stress salino. In uno studio su *Oryza sativa*, l'applicazione di cicloesimide ha permesso di osservare come la soppressione della sintesi proteica influenzi la resistenza della pianta al sale (Agarwal M., et al, 2011). È stato scoperto che la cicloesimide altera il profilo proteico delle piante, influenzando significativamente i meccanismi di risposta allo stress salino. Questo inibitore riduce la capacità della pianta di produrre nuove proteine necessarie per affrontare condizioni saline avverse, compromettendo così la sua capacità di adattamento. L'uso di cicloesimide ha mostrato che specifiche proteine indotte dal sale sono critiche per la tolleranza allo stress salino.

Inoltre, lo studio ha evidenziato che la cicloesimide può alterare il bilancio ionico nelle cellule di riso, riducendo l'accumulo di sodio e migliorando la capacità della pianta di mantenere un equilibrio ionico favorevole sotto stress salino.

La cicloesimide è stata utilizzata per esaminare il ruolo della sintesi proteica nel trasporto idrico delle radici e nelle relazioni idriche delle piante in Aspen (*Populus tremuloides Michx.*). Entro 30 minuti dall'applicazione della cicloesimide alle radici, è stato osservato un drastico calo della portata idrica delle radici, con una riduzione dell'85% della conduttività idraulica dopo un'ora rispetto alle radici di controllo (Voicu M., et al 2004). Questo effetto è stato accompagnato da un aumento di quasi tre volte nel flusso d'acqua apoplastico, suggerendo una diminuzione nell'espressione delle aquaporine di membrana, come evidenziato dalla riduzione dell'intensità dell'immunoreazione di una proteina microsomiale di 32 kDa. Questi risultati indicano che la sintesi proteica è cruciale per il trasporto idrico delle radici e che l'inibizione della sintesi proteica mediante cicloesimide può portare a rapide modifiche nella conduttività idraulica, permettendo alle piante di rispondere rapidamente ai cambiamenti

ambientali, come lo stress salino. La rapida risposta suggerisce che le piante utilizzano la regolazione trascrizionale o traslazionale delle aquaporine delle radici come meccanismo principale per l'aggiustamento rapido della conduttività idraulica

Questi risultati suggeriscono che la sintesi proteica è essenziale per la regolazione delle risposte allo stress salino e che l'inibizione di questo processo può compromettere la resistenza della pianta, fornendo così una comprensione più profonda dei meccanismi molecolari coinvolti nella tolleranza allo stress salino

Ognuna di queste molecole ha un diverso meccanismo di azione e un diverso grado di specificità per le proteine di membrana coinvolte nel trasporto di  $H_2O_2$ . Reversina inibisce specifiche proteine chinasi (FERONIA), DNQX è un antagonista dei recettori GLRs, mentre la Cicloesimmide agisce a livello della sintesi proteica, influenzando indirettamente la produzione di proteine di trasporto.

## **4.4 Statistica**

Nella sezione “Risultati”, ogni grafico si compone del confronto tra i transienti di  $H_2O_2$  e il rispettivo T-test per determinare la presenza di una differenza significativa tra i transienti.

Il risultato del T-Test è indicato sia per il primo picco (Picco IN, in presenza dello stimolo) che per il secondo picco (Picco OUT, dopo la rimozione dello stimolo) attraverso l'utilizzo della classificazione con asterischi:

- \* : p-value < 0.05
- \*\* : p-value < 0.01
- \*\*\* : p-value < 0.001

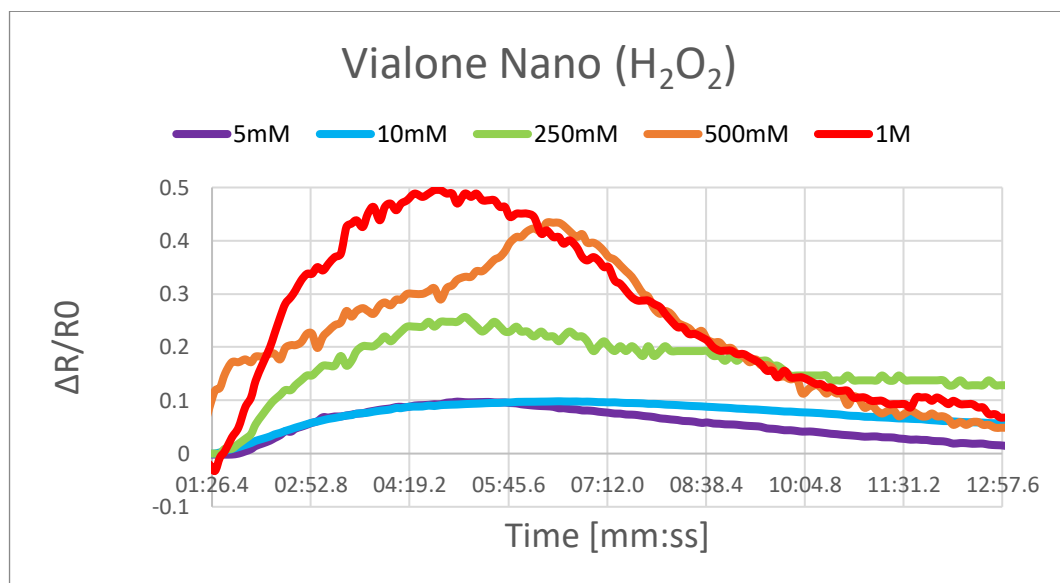
## 5) Risultati

Nei seguenti grafici sono riportate le medie di tutti i transienti ottenuti tramite l'analisi con Microscopio a fluorescenza Nikon Ti-E. I confronti sono fatti tra gruppi che hanno subito il medesimo pre-trattamento e il trattamento utilizzando solo NaCl 400 mM. Inoltre saranno confrontati i transienti di Baldo e Vialone Nano che hanno subito lo stesso pre-trattamento.

### 5.1 Determinazione del range dinamico della sonda

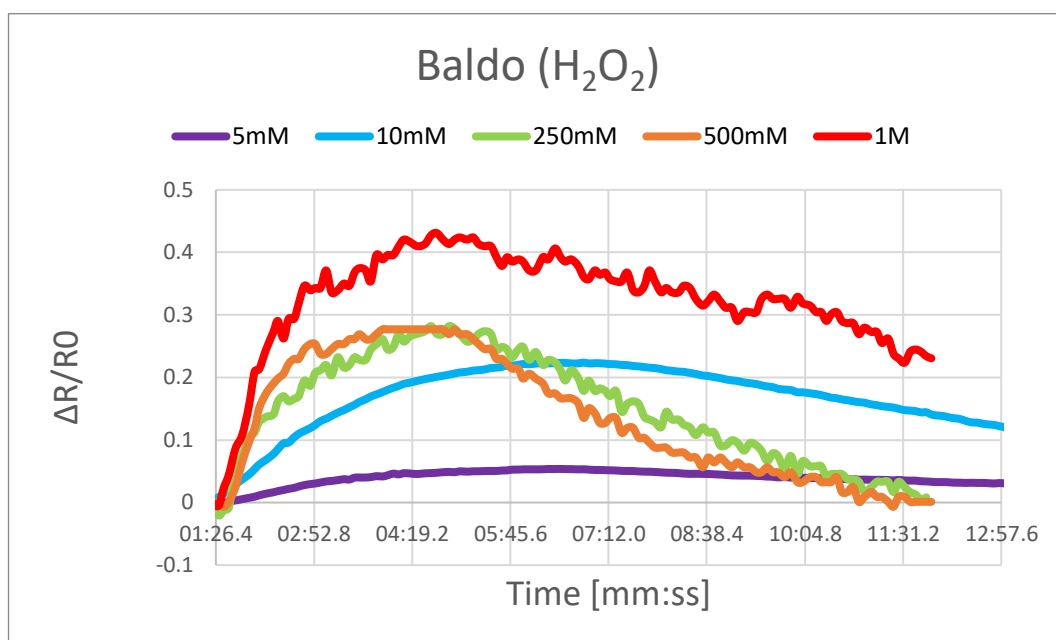
I primi test per verificare il funzionamento della sonda e determinarne il range dinamico sono stati eseguiti con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diverse concentrazioni, da 5 mM a 1 M. In questo esperimento si è osservato che la sonda è espressa e risponde in entrambe le varietà.

Si osserva da Figg. 10 e 11 come i valori di  $\Delta R/R_0$  aumentino con l'aumentare della concentrazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fornita, ma anche come, sebbene non si osservino differenze significative di  $\Delta R/R_0$  ad elevate concentrazioni, a concentrazioni inferiori si osserva una risposta differente. Questo dato suggerisce una differente capacità di trasporto di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a livello della membrana plasmatica tra le due varietà



**Figura 10:** Transienti di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Vialone Nano in risposta a stress da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a concentrazioni variabili da 5mM a 1M.



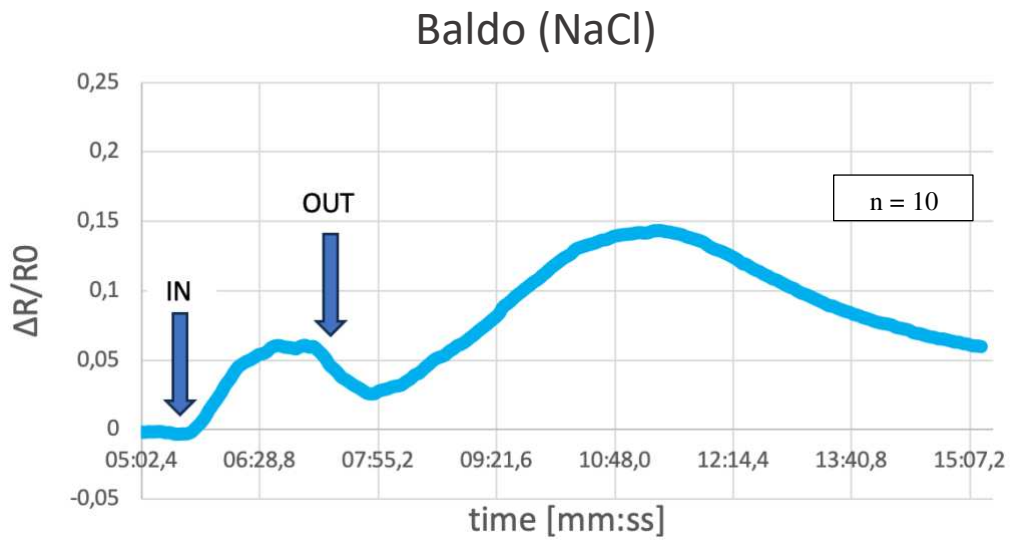


**Figura 11:** Transienti di  $H_2O_2$  in Baldo in risposta a stress da  $H_2O_2$  a concentrazioni variabili da 5mM a 1M.

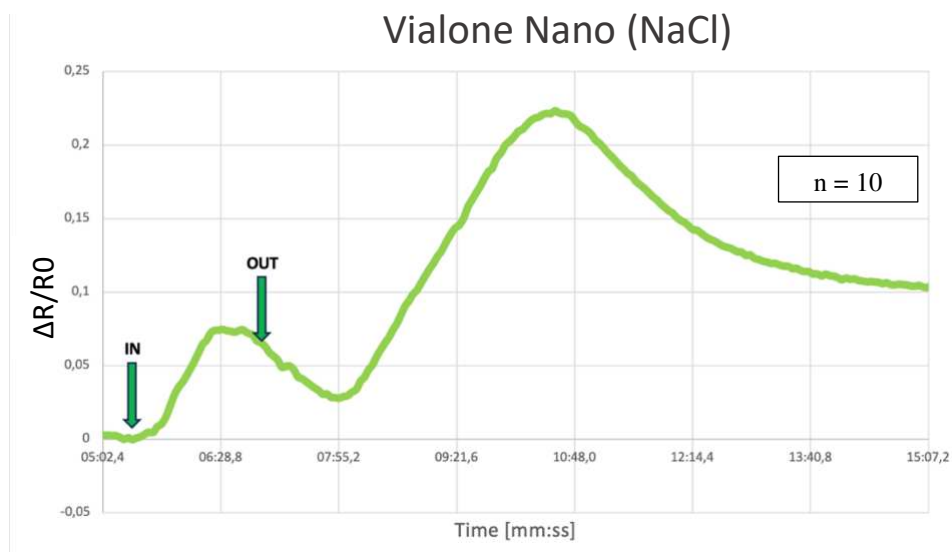
## 5.2 Determinazione dei transienti di $H_2O_2$ citosolica indotti da sale

Dopo aver testato il funzionamento della sonda, il primo esperimento condotto ha previsto l'utilizzo di NaCl, con l'obiettivo di caratterizzare le dinamiche di  $H_2O_2$  sia in Baldo che in Vialone Nano. Questo dato di base servirà come punto di confronto per i successivi esperimenti che includeranno l'uso di vari inibitori. Il trattamento con 400mM di NaCl induce un transiente bifasico in entrambe le varietà, caratterizzato da un doppio picco: il primo durante lo stress, il secondo dopo la rimozione del sale (Figg. 12 e 13).

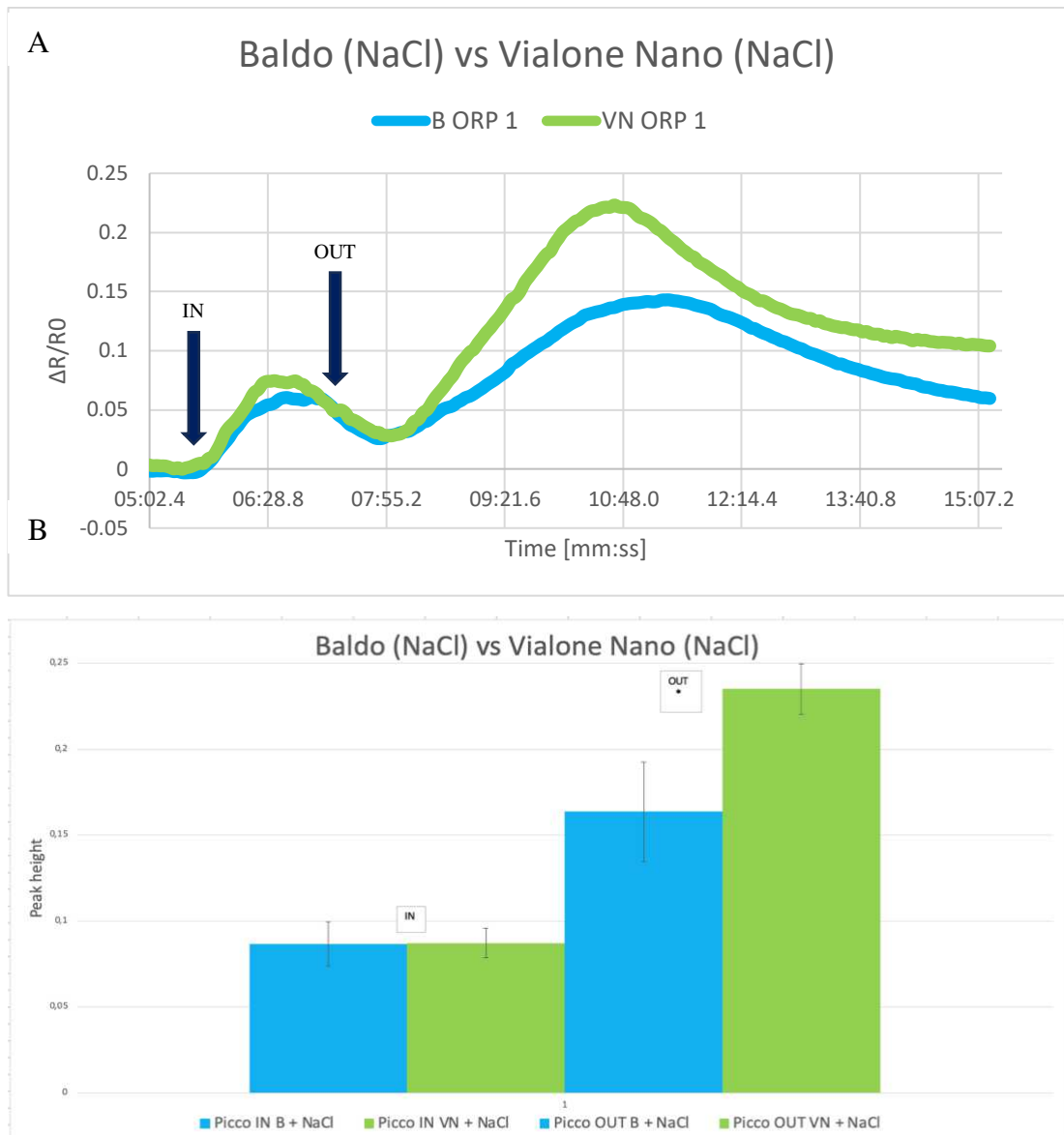
Il confronto tra i transienti di Baldo e Vialone Nano mostra una differenza significativa nell'ampiezza del secondo picco (Fig. 14B). Mentre non si osservano differenze sulla cinetica.



**Figura 12:** Transiente di  $H_2O_2$  in Baldo in risposta a stress da NaCl 400 mM, le frecce IN e OUT indicano rispettivamente il momento di ingresso e di uscita del sale dal sistema.  $n = 10$ .



**Figura 13:** Transiente di  $H_2O_2$  in Vialone Nano in risposta a stress da NaCl 400 mM, le frecce IN e OUT indicano rispettivamente il momento di ingresso e di uscita del sale dal sistema.  $n = 10$ .



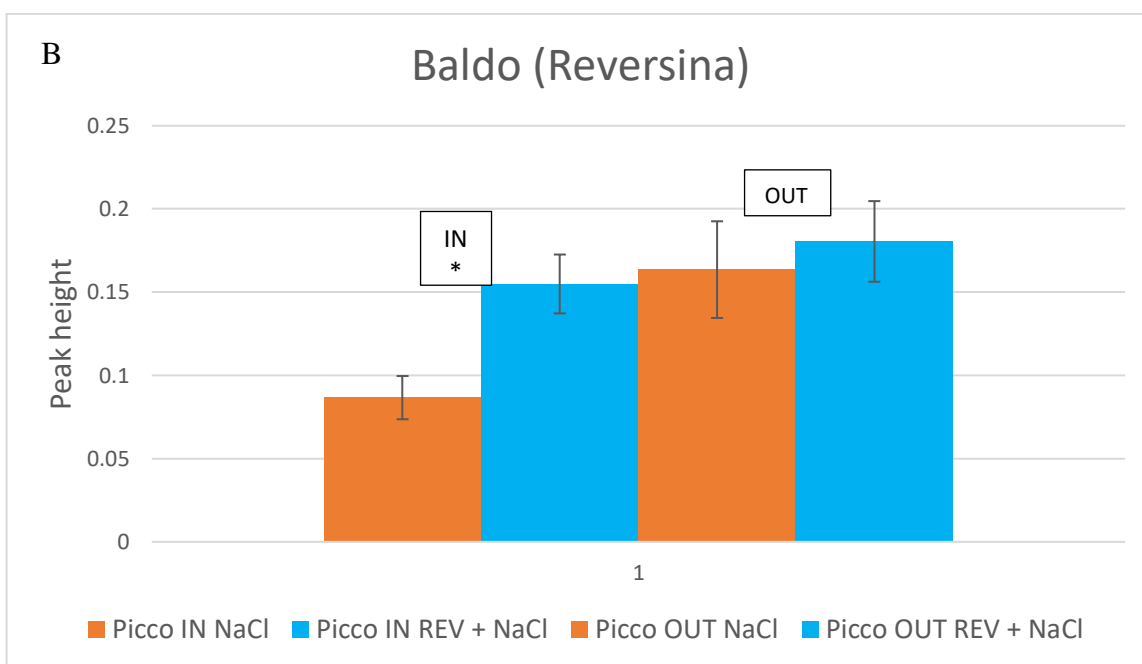
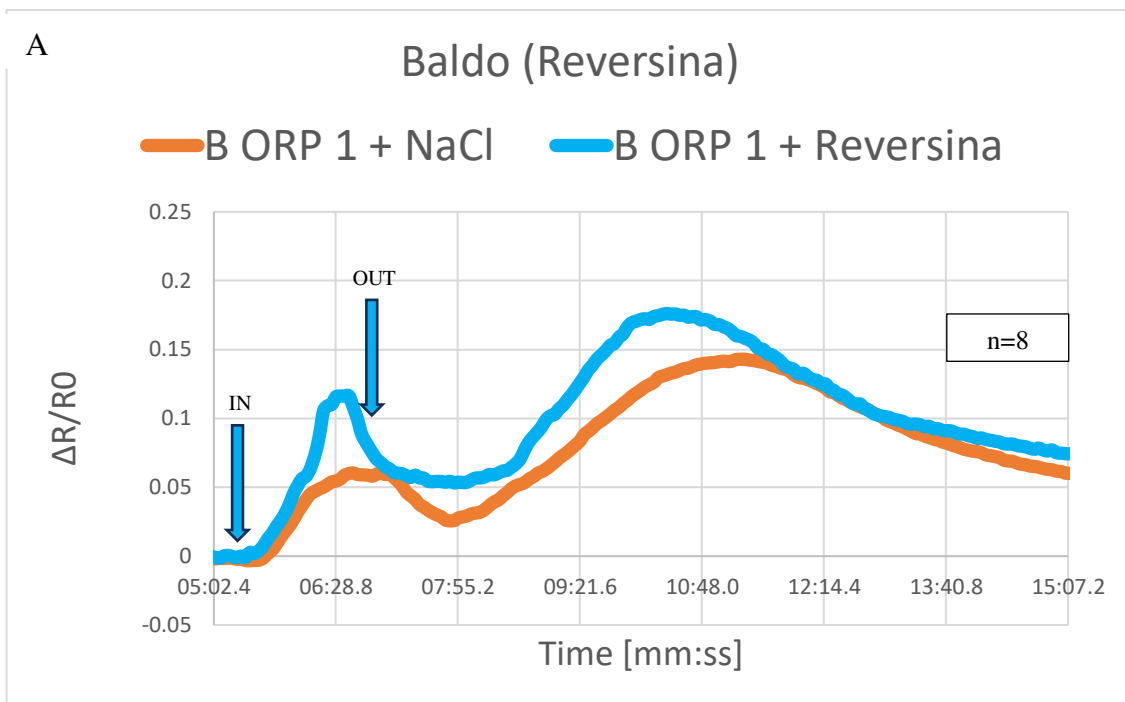
**Figura 14:** Confronto del transiente di  $H_2O_2$  tra Baldo e Vialone Nano in risposta a stress da NaCl 400 mM. A) Cinetiche dei transienti di  $H_2O_2$  nel citosol delle due varietà. n=10. B) Analisi dei picchi massimi durante lo stress (IN) e dopo la rimozione del sale (OUT). \*  $p < 0.01$  Test t di Student.

## **5.3 Effetto della reversina sui transienti di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indotti da sale**

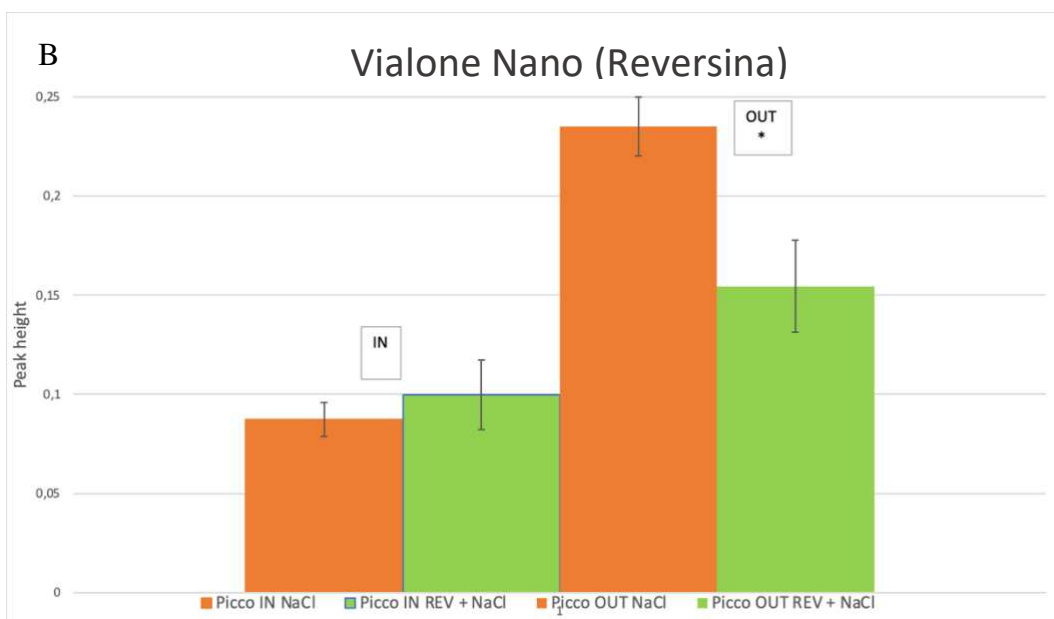
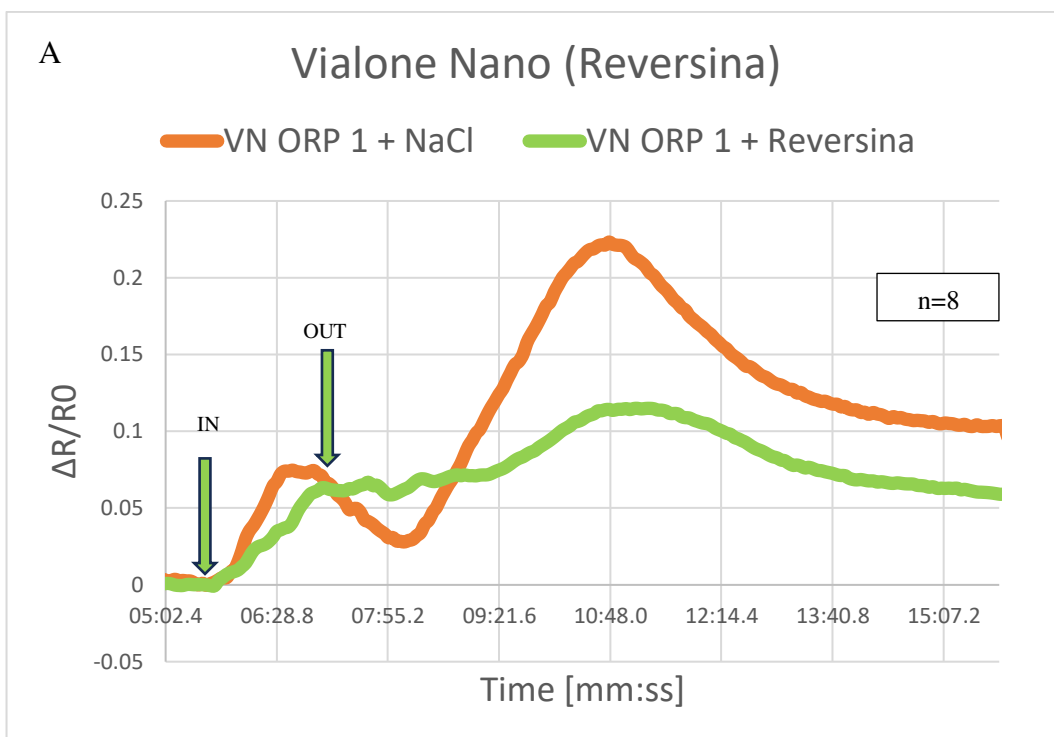
L'esperimento con Reversina 5  $\mu$ M ha previsto un pre-trattamento di 15 minuti in una soluzione contenente Imaging Buffer e Reversina, seguito poi dal processo standard con NaCl 400 mM. Per evitare di indurre segnali dovuti allo spostamento o tocco del campione, le radici sono state fatte acclimatare per 5 minuti nella camera di imaging, sottoposte a pre trattamento con l'inibitore a pompa ferma e poi sottoposte a trattamento con sale in perfusione.

Il transiente della varietà Baldo risulta significativamente differente (Fig.15B) dal rispettivo transiente generato dall'esperimento senza inibitore nel primo picco, Vialone Nano, invece, presenta una differenza di significativa sul secondo picco (Fig. 16B).

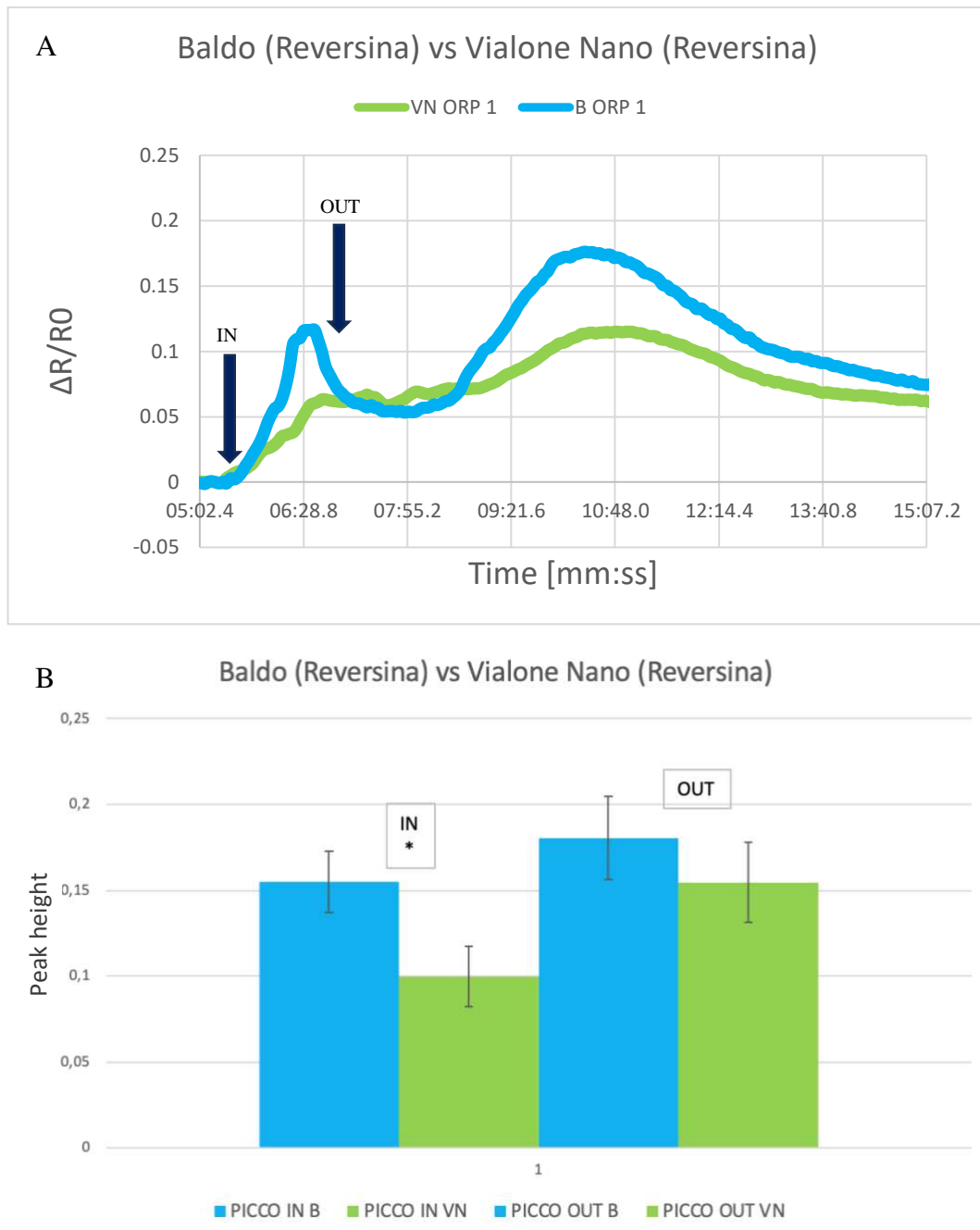
Il confronto tra i transienti di Baldo e Vialone Nano mostra una differenza significativa nell'ampiezza del primo picco (Fig. 17B). Mentre non si osservano differenze sulla cinetica.



**Figura 15:** Transiente di  $H_2O_2$  in Baldo in risposta a stress da NaCl 400 mM con pre-trattamento 15' Reversina (Blu) vs transiente di  $H_2O_2$  in Baldo in risposta a stress da NaCl 400 mM (Arancione). n = 8.



**Figura 16:** Transiente di  $H_2O_2$  in Vialone Nano in risposta a stress da NaCl 400 mM con pre-trattamento 15' Reversina (Blu) vs transiente di  $H_2O_2$  in Baldo in risposta a stress da NaCl 400 mM (Arancione). n = 8.



**Figura 17:** Confronto del transiente di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tra Baldo e Vialone Nano in risposta a stress da NaCl 400 mM con pre-trattamento Reversina 15'. A) Cinetiche dei transienti di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel citosol delle due varietà. B) Analisi dei picchi massimi durante lo stress (IN) e dopo la rimozione del sale (OUT). \* p<0.01 Test t di Student.

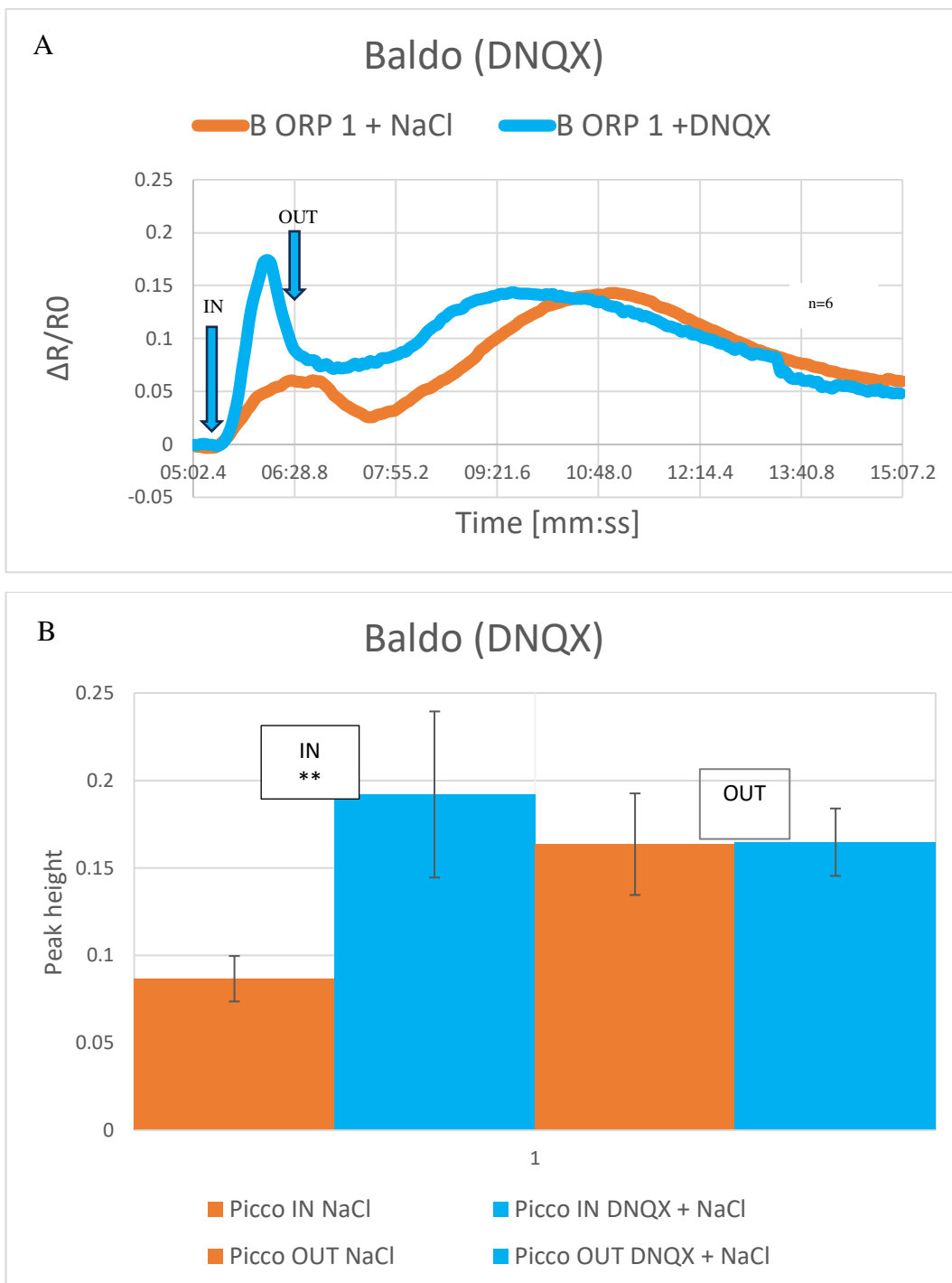
## **5.4 Effetto di DNQX sui transienti di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indotti da sale**

L'esperimento con DNQX 10  $\mu$ M ha previsto un pre-trattamento di 30 minuti in una soluzione contenente Imaging Buffer e DNQX, seguito poi dal processo standard con NaCl 400 mM. Per evitare di indurre segnali dovuti allo spostamento o tocco del campione, le radici sono state fatte acclimatare per 5 minuti nella camera di imaging, sottoposte a pre trattamento con l'inibitore a pompa ferma e poi sottoposte a trattamento con sale in perfusione.

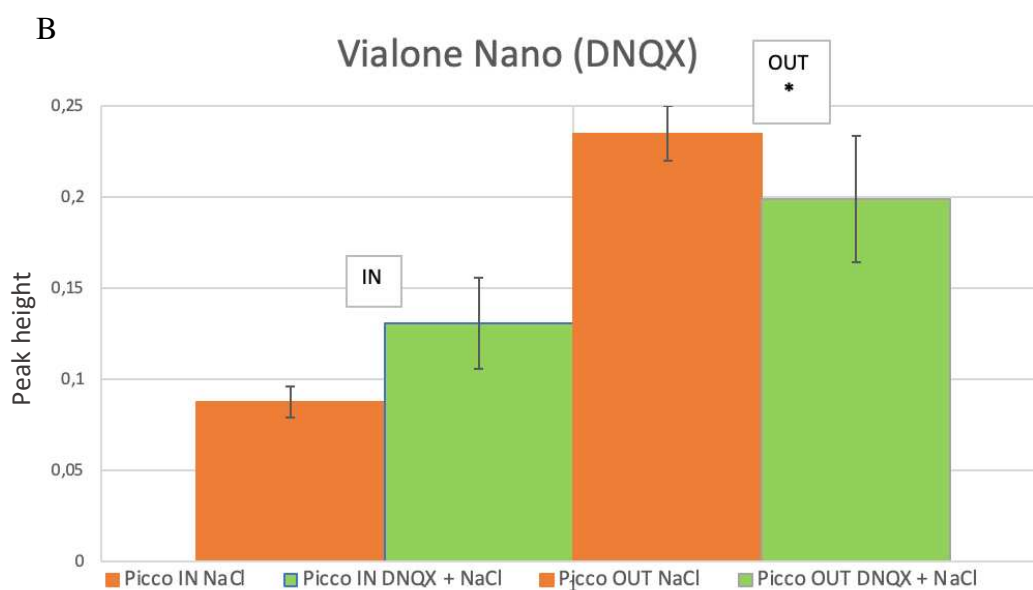
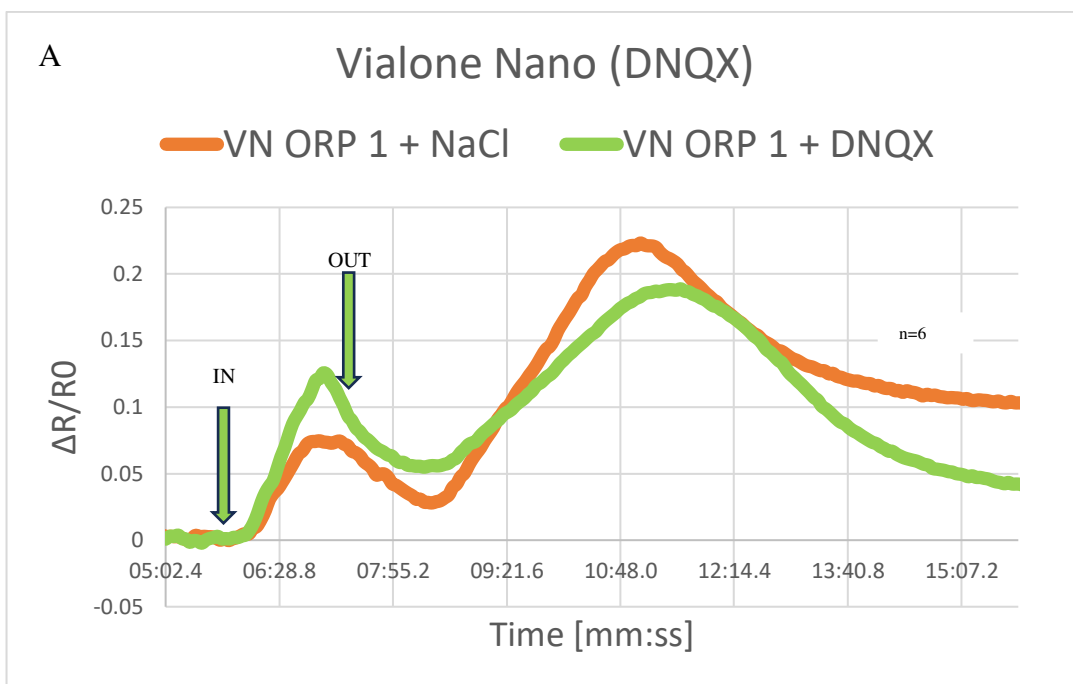
Il transiente della varietà Baldo risulta significativamente differente (Fig. 18B) dal rispettivo transiente generato dall'esperimento senza inibitore nel primo picco, Vialone Nano, invece, presenta una differenza di significativa sul secondo picco (Fig. 19B).

Il confronto tra i transienti di Baldo e Vialone Nano mostra una differenza significativa nell'ampiezza del primo picco (Fig. 20B). Mentre non si osservano differenze sulla cinetica.

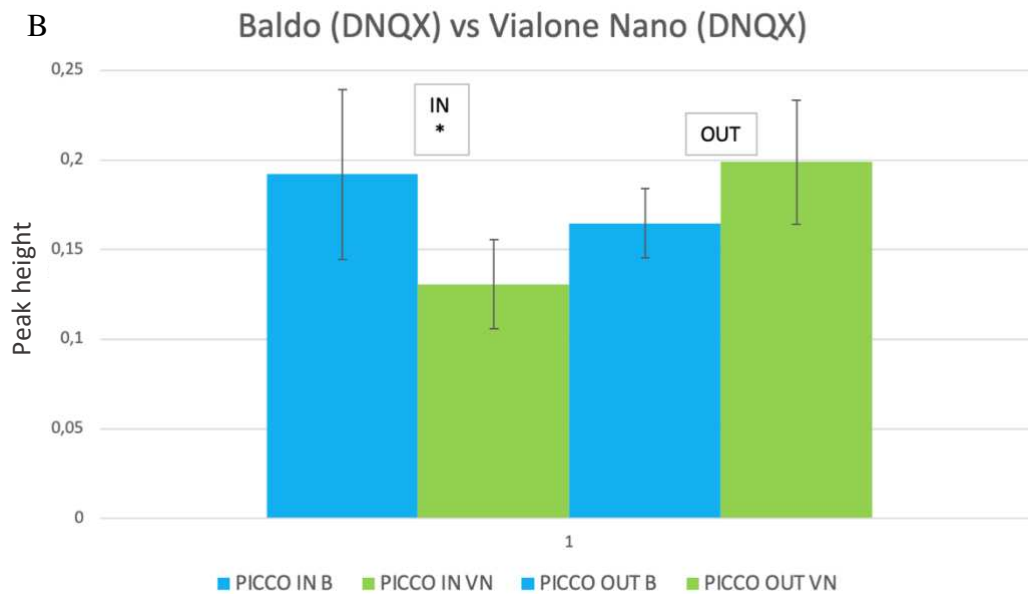
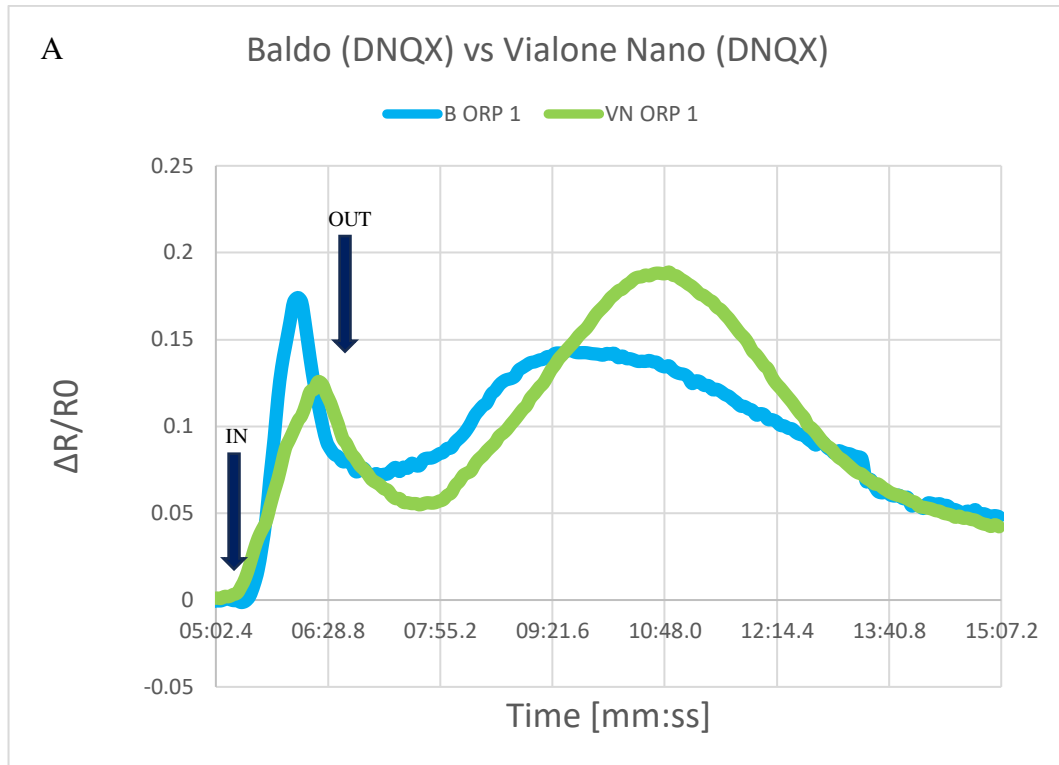




**Figura 18:** Transiente di  $H_2O_2$  in Baldo in risposta a stress da NaCl 400 mM con pre-trattamento 30' DNQX (Blu) vs transiente di  $H_2O_2$  in Baldo in risposta a stress da NaCl 400 mM (Arancione). n = 6.



**Figura 19:** Transiente di  $H_2O_2$  in Vialone Nano in risposta a stress da NaCl 400 mM con pre-trattamento 30' DNQX (Verde) vs transiente di  $H_2O_2$  in Vialone Nano in risposta a stress da NaCl 400 mM (Arancione). n = 6.



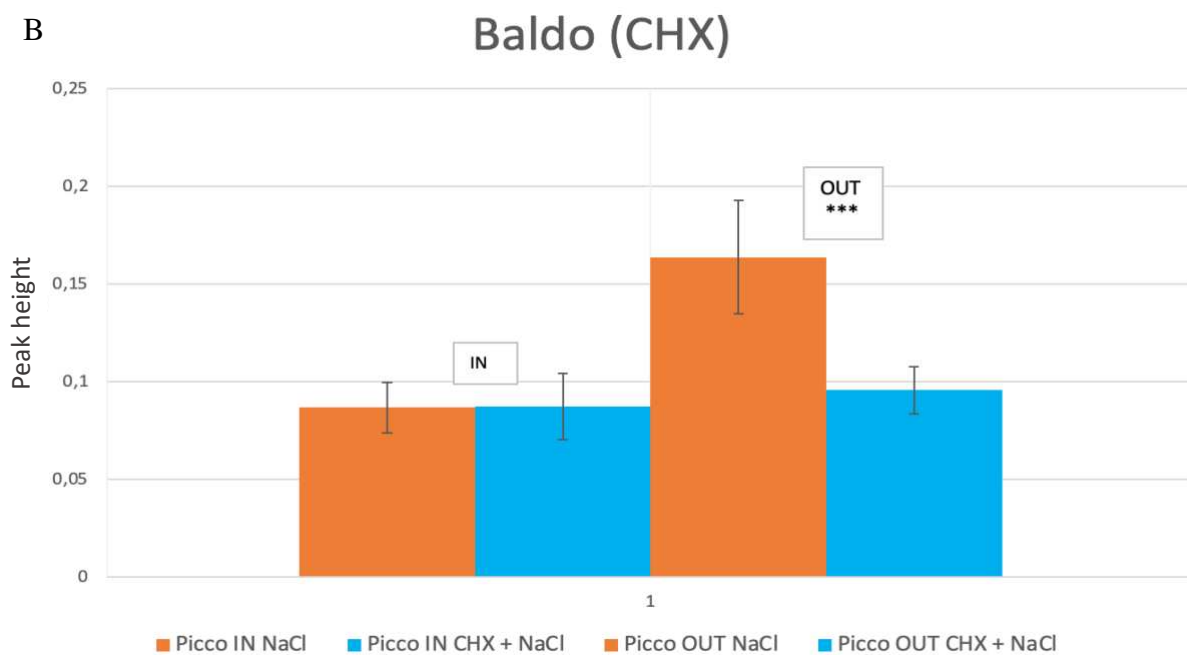
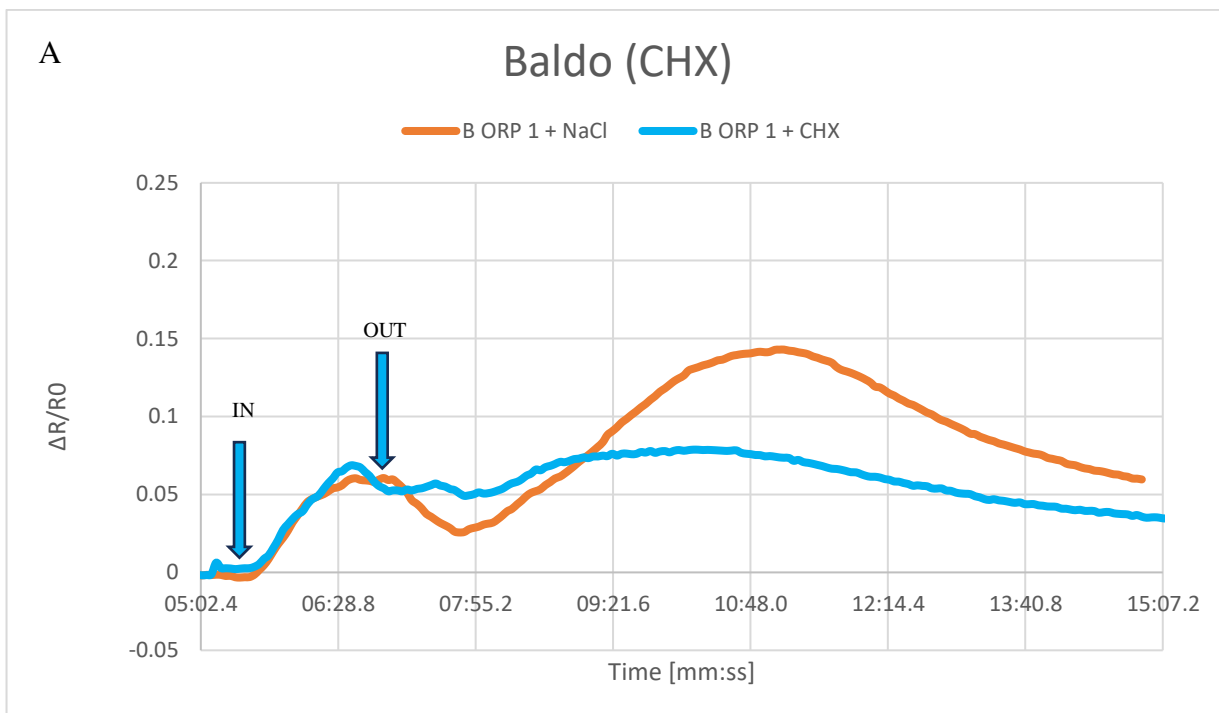
**Figura 20:** Confronto del transiente di  $H_2O_2$  tra Baldo e Vialone Nano in risposta a stress da NaCl 400 mM con pre-trattamento DNQX 30'. A) Cinetiche dei transienti di  $H_2O_2$  nel citosol delle due varietà. B) Analisi dei picchi massimi durante lo stress (IN) e dopo la rimozione del sale (OUT). \*  $p < 0.01$  Test t di Student.

## **5.5 Effetto di CHX sui transienti di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indotti da sale**

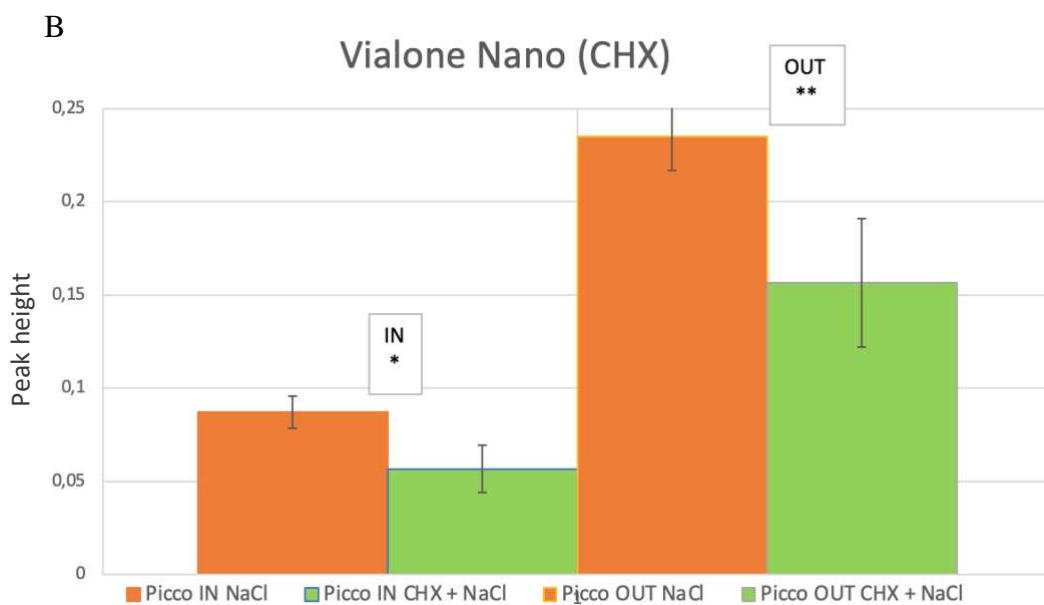
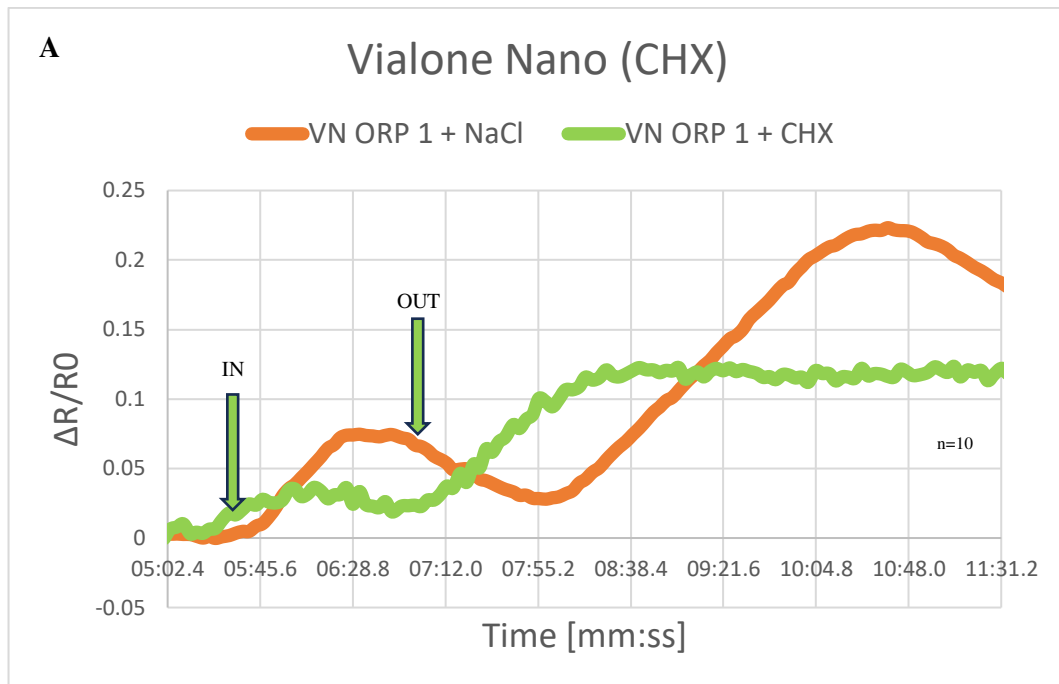
L'esperimento con CHX 10  $\mu$ M ha previsto un pre-trattamento di 30 minuti in una soluzione contenente Imaging Buffer e CHX, seguito poi dal processo standard con NaCl 400 mM. Per evitare di indurre segnali dovuti allo spostamento o tocco del campione, le radici sono state fatte acclimatare per 5 minuti nella camera di imaging, sottoposte a pre trattamento con l'inibitore a pompa ferma e poi sottoposte a trattamento con sale in perfusione.

Il transiente della varietà Baldo risulta significativamente differente (Fig. 21B) dal rispettivo transiente generato dall'esperimento senza inibitore nel secondo picco, Vialone Nano, invece, presenta una differenza di significativa su entrambi i picchi, oltre che una differenza sulla cinetica (Fig. 22B).

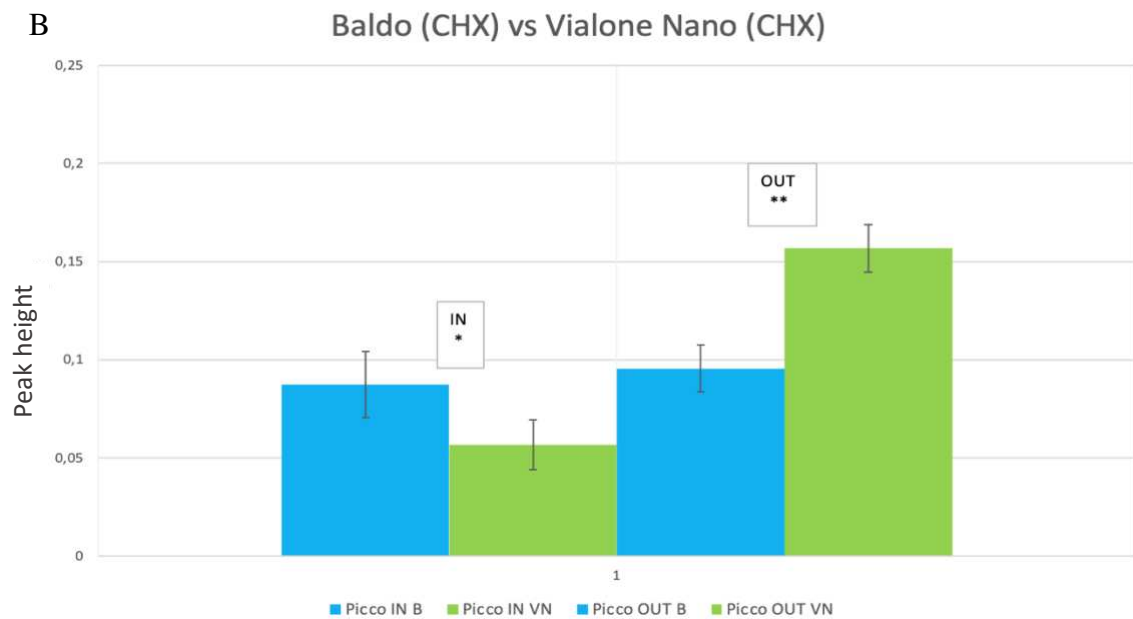
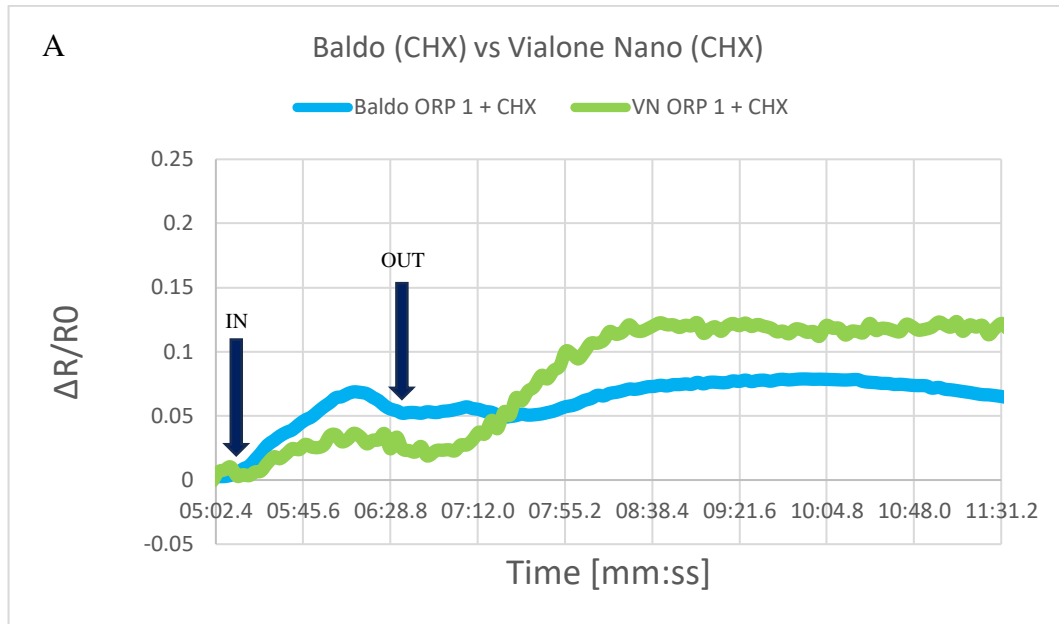
Il confronto tra i transienti di Baldo e Vialone Nano mostra una differenza significativa nell'ampiezza di entrambi i picchi, in maniera particolarmente significativa nel secondo (Fig. 23B). Mentre non si osservano differenze sulla cinetica.



**Figura 21:** Transiente di  $H_2O_2$  in Baldo in risposta a stress da NaCl 400 mM con pre-trattamento 30' CHX (Blu) vs transiente di  $H_2O_2$  in Baldo in risposta a stress da NaCl 400 mM (Arancione). n = 8.



**Figura 22:** Transiente di  $H_2O_2$  in Vialone Nano in risposta a stress da NaCl 400 mM con pre-trattamento 30' CHX (Verde) vs transiente di  $H_2O_2$  in Vialone Nano in risposta a stress da NaCl 400 mM (Arancione). “n” si riferisce al numero di copie utilizzate per calcolare la media del transiente utilizzando l’inibitore e T-test.



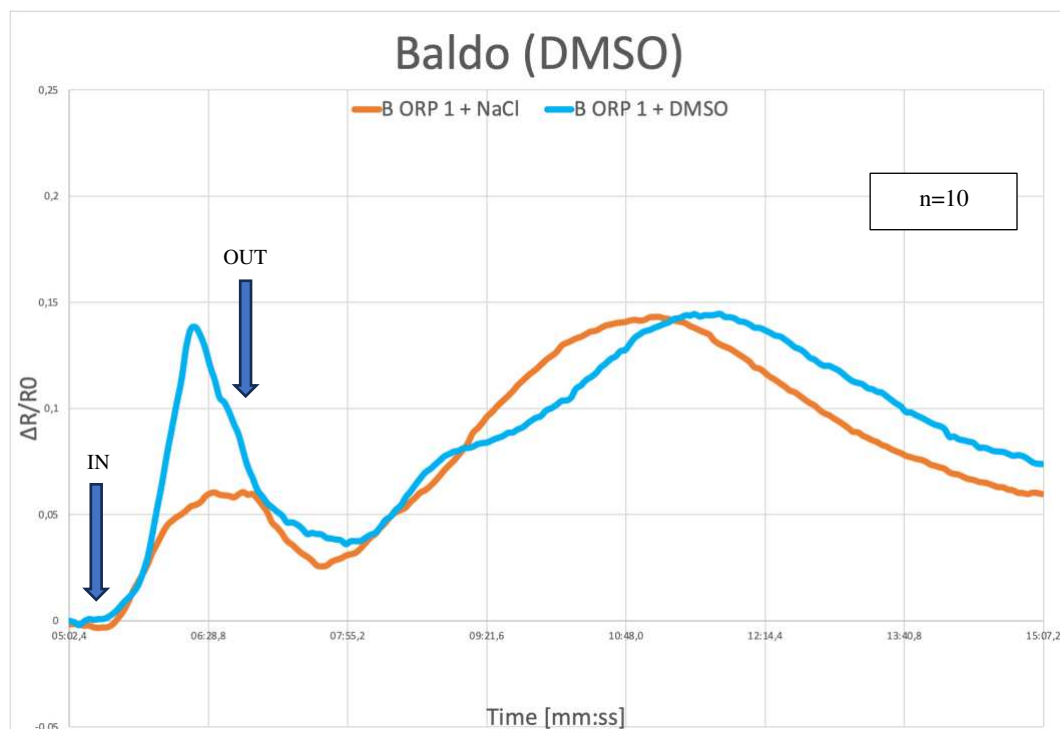
**Figura 23:** Confronto del transiente di  $H_2O_2$  tra Baldo e Vialone Nano in risposta a stress da NaCl 400 mM con pre-trattamento CHX 30'. A) Cinetiche dei transienti di  $H_2O_2$  nel citosol delle due varietà. B) Analisi dei picchi massimi durante lo stress (IN) e dopo la rimozione del sale (OUT). \*  $p < 0.01$  Test t di Student.

## 5.6 Effetto di DMSO sui transienti di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indotti da sale

L'esperimento con DMSO 0.05% ha previsto un pre-trattamento di 30 minuti in una soluzione contenente Imaging Buffer e DMSO, seguito poi dal processo standard con NaCl 400 mM. È stato inoltre effettuato in esperimento con DMSO 0.05% in perfusione.

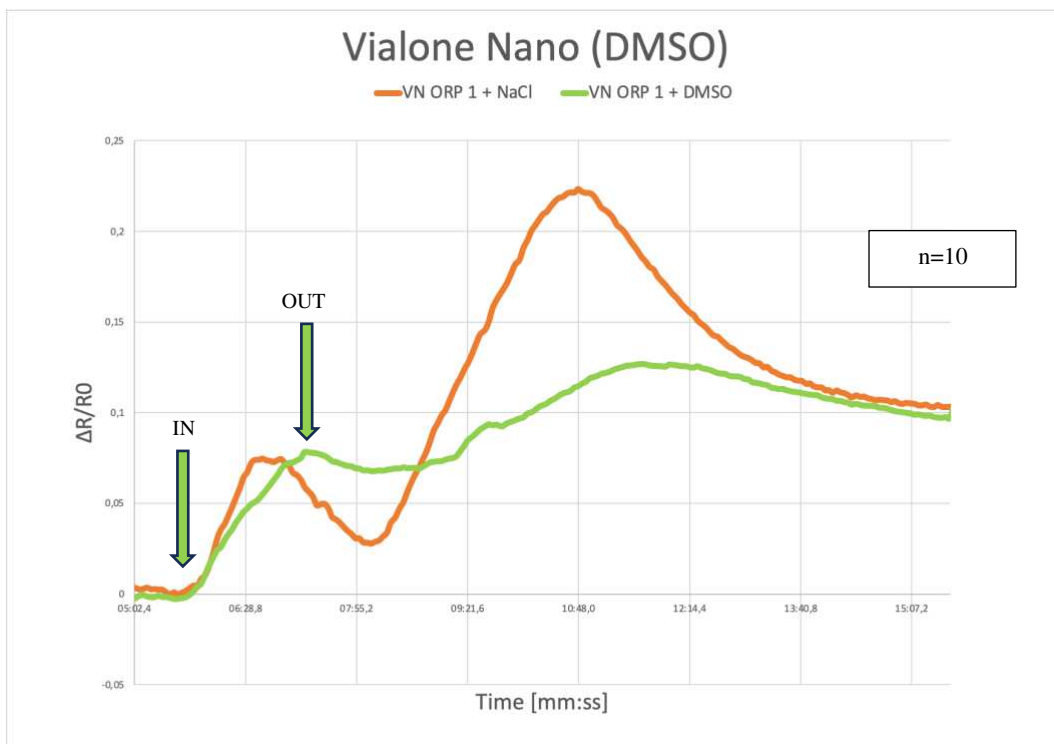
Gli esperimenti con DMSO sono stati effettuati per osservare il comportamento del transiente in presenza di una percentuale di DMSO (0.05%) che è presente anche in DNQX e Reversina a seguito degli step di diluizione.

L'esperimento più significativo a tal fine è stato quello effettuato con DMSO in perfusione (Fig.27A), dal quale si può notare come il DMSO non porti a differenze significative in nessuno dei due picchi (Fig. 27B)

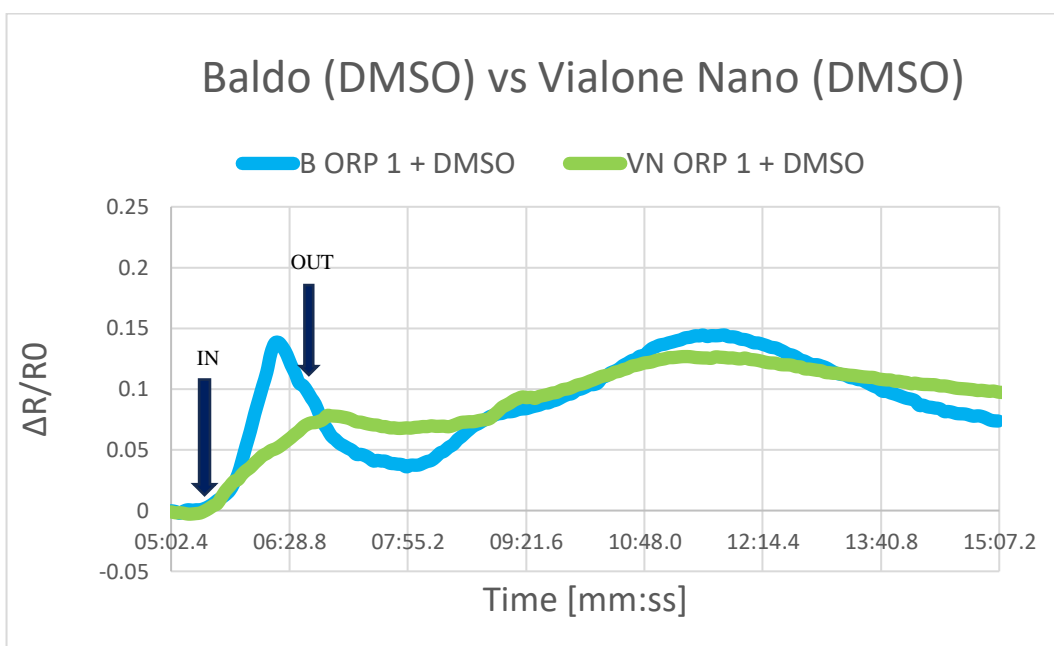


**Figura 24:** Transiente di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Baldo in risposta a stress da NaCl 400 mM con pre-trattamento 30' DMSO (Blu) vs transiente di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Baldo in risposta a stress da NaCl 400 mM (Arancione). n = 10.

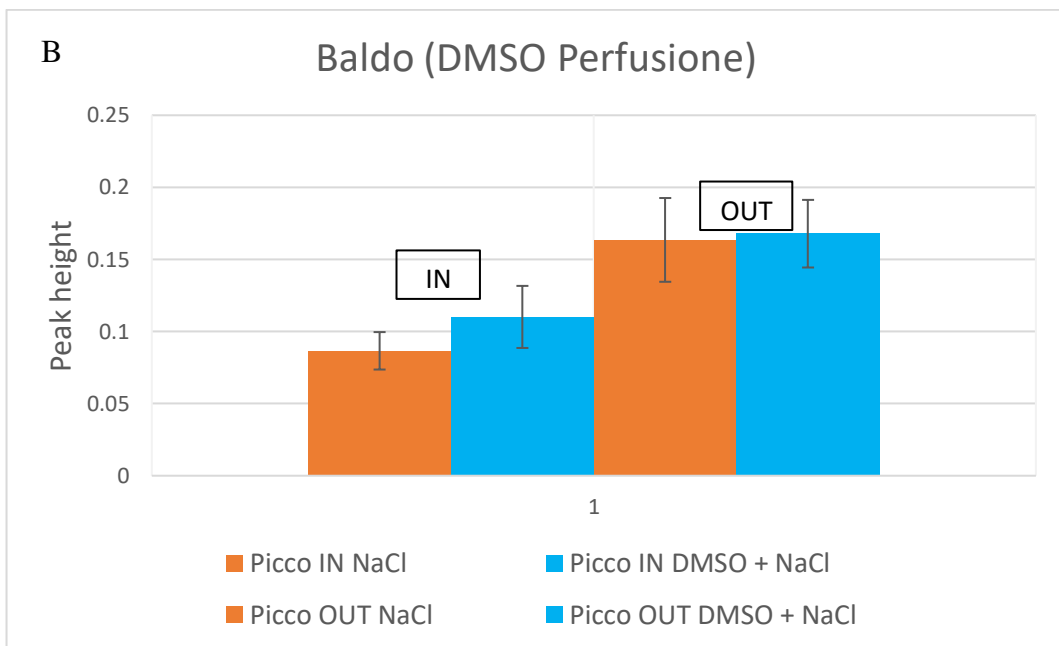
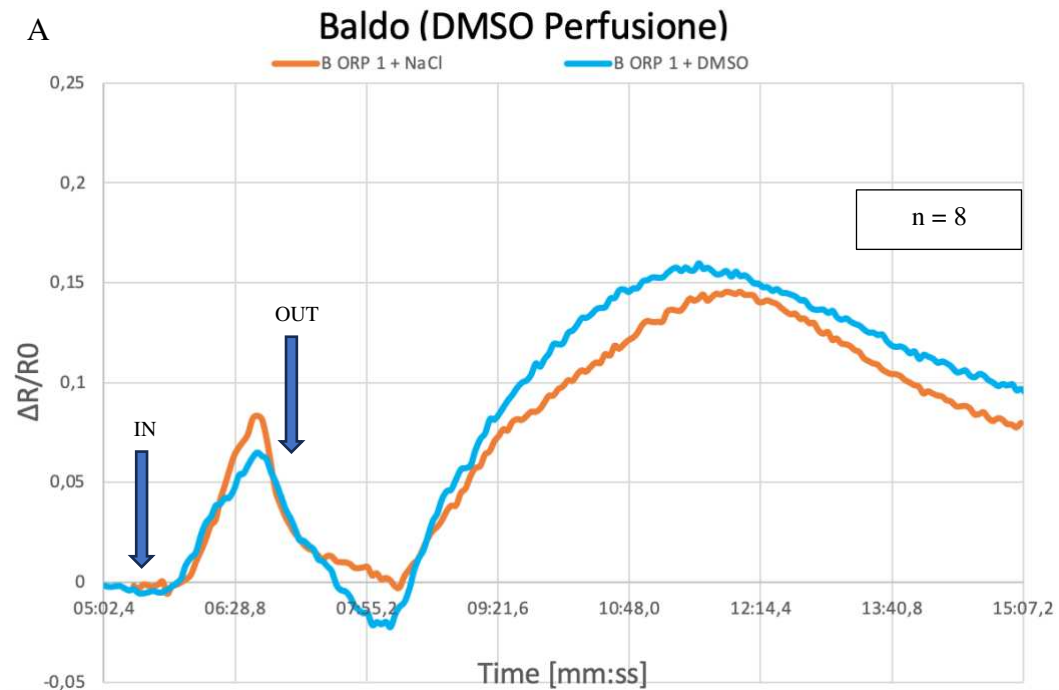




**Figura 25:** Transiente di  $H_2O_2$  in Vialone Nano in risposta a stress da NaCl 400 mM con pre-trattamento 30' DMSO (Verde) vs transiente di  $H_2O_2$  in Vialone Nano in risposta a stress da NaCl 400 mM (Arancione). n = 10.



**Figura 26:** Confronto del transiente di  $H_2O_2$  tra Baldo e Vialone Nano in risposta a stress da NaCl 400 mM con pre-trattamento DMSO 30'.



**Figura 27:** Transiente di  $H_2O_2$  in Baldo in risposta a stress da NaCl 400 mM con trattamento in perfusione di 2' utilizzando soluzione Imaging Buffer + DMSO 0,05% + NaCl 400mM vs transiente di  $H_2O_2$  in Baldo in risposta a stress da NaCl 400 mM (Arancione). n = 8.



## 6) Discussione e conclusioni

Il riso (*Oryza sativa*, L.) è una delle colture alimentari più importanti al mondo, nutrendo oltre la metà della popolazione globale. Tuttavia, la sua produzione è fortemente influenzata da fattori ambientali avversi, come lo stress salino, che possono ridurre drasticamente i rendimenti. La crescente salinità del suolo, causata sia da pratiche agricole intensive sia dal cambiamento climatico, rappresenta una minaccia significativa per la sicurezza alimentare globale. Comprendere i meccanismi di resistenza allo stress salino nel riso è quindi di cruciale importanza per sviluppare varietà più resistenti e sostenibili.

Per la prima volta, nel nostro studio sono stati identificati i transienti di  $H_2O_2$  nel riso, un risultato che rappresenta un passo significativo nella comprensione della risposta del riso allo stress salino. Questo lavoro permette di affinare le osservazioni riportate negli articoli di Formentin et al. (2018a e b), dove il colorante DHR123 è stato utilizzato per monitorare la produzione di ROS in risposta a vari stress. I transienti indotti da sale osservati nelle due varietà mostrano cinetiche simili, ma differenze significative nell'intensità del secondo picco, corrispondente alla rimozione dello stimolo, che risulta più ampio in Vialone Nano. Questo dato conferma che ci siano differenze nella produzione e/o rimozione dei ROS tra le due varietà. Dati preliminari ottenuti nel laboratorio della prof.ssa Formentin, dimostrano anche che sono presenti differenze nei transienti di  $Ca^{2+}$  citosolico tra le due varietà (Tesi di dottorato di Federica Massa). I due risultati insieme suggeriscono la possibilità che differenze siano anche presenti a livello della composizione delle proteine di membrana plasmatica coinvolte nella formazione di tali transienti (ad es., canali per il  $Ca^{2+}$ , aquaporine, NADPH ossidasi). In effetti, dall'analisi comparativa dei trascrittomi delle radici delle due varietà in condizioni di controllo, risulta che alcune delle suddette proteine siano differenzialmente espresse (Tesi di dottorato di Gabriele Pino). A ulteriore conferma del coinvolgimento ad esempio delle NADPH ossidasi di membrana (NOX), ci sono dati precedenti dove l'utilizzo del loro inibitore DPI ha portato alla dissipazione del picco di  $H_2O_2$  misurato in Baldo dopo la

somministrazione di sale, con conseguente riduzione della risposta genica susseguente (Formentin et al., 2018a).

Le analisi effettuate a varie concentrazioni di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hanno dimostrato come vi sia una differente risposta tra le due specie, suggerendo una diversa gestione dello stress ossidativo. Inoltre, le analisi di espressione genica hanno mostrato variazioni nell'espressione di geni codificanti per GLR e PIP, giustificando l'uso degli inibitori specifici. Questa osservazione ha portato alle analisi con trattamento preliminare di Cicloesimide, mirato ad agire sulle aquaporine, e dalle quali si può osservare come non solo vi siano differenze significative di risposta inter ed intra varietà a livello quantitativo, ma anche differenze sulle cinetiche dei transienti. Le aquaporine possono essere coinvolte nell'influsso di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, prodotto attraverso l'attività delle NOX e SOD dal lato apoplastico della membrana plasmatica. L'inibizione delle aquaporine con CHX potrebbe alterare la distribuzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, influenzando i transienti di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la risposta allo stress salino.

Per investigare il ruolo di alcune famiglie di proteine di membrana nella risposta allo stress salino, sono state utilizzati anche altri inibitori. Reversina per i recettori FERONIA e DNQX per i recettori del glutammato (GLRs).

Tutti gli inibitori utilizzati hanno mostrato effetti sui transienti di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, suggerendo un coinvolgimento delle rispettive proteine di membrana nella risposta allo stress salino. FERONIA appartiene alla famiglia dei recettori RLK, che gioca un ruolo cruciale nella regolazione della crescita cellulare e nella risposta agli stress ambientali. L'inibizione di FERONIA potrebbe interferire con il riconoscimento dello stress salino e la successiva trasduzione del segnale, alterando i transienti di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. I recettori del glutammato (GLRs) sono coinvolti nella regolazione del flusso di ioni calcio nelle cellule. Inibendo GLRs, DNQX potrebbe ridurre l'afflusso di calcio necessario per l'attivazione, ad esempio, delle NOX di membrana, modificando quindi i transienti di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

È noto dal lavoro di tesi della Dott.ssa Federica Massa che i ROS possono alterare i transienti di calcio citosolico in risposta allo stress salino. Per questo motivo

abbiamo utilizzato DNQX per bloccare i canali che trasportano il calcio in risposta a stimoli esterni, osservando un effetto sui transienti di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, specialmente per quanto riguarda il picco corrispondente all'inizio dello stress. Le differenze osservate con gli inibitori confermano l'importanza delle proteine di membrana nella modulazione della risposta al sale.

Tuttavia, un limite del nostro studio è rappresentato dall'uso del DMSO come solvente per gli inibitori, noto per avere effetti sulle membrane cellulari. DMSO è noto principalmente come solvente con elevate capacità di penetrazione nelle membrane cellulari. Non è specificamente un inibitore delle proteine di membrana, ma è spesso usato in esperimenti di laboratorio per facilitare la penetrazione di altre molecole nelle cellule. Potrebbe influenzare indirettamente il trasporto di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> modificando la fluidità della membrana o la conformazione delle proteine di membrana, ma questi effetti sono generalmente considerati aspecifici. L'analisi in perfusione utilizzando DMSO mostra come questo tipo di trattamento non porti alcuna differenza significativa nella risposta allo stress della pianta, rendendola quindi la scelta ottimale per esperimenti futuri. Nella lettura dei grafici di Reversina e DNQX, non fatti in perfusione, risulta quindi cruciale considerare questo aspetto durante l'interpretazione dei dati.

In conclusione, il nostro studio ha mostrato che gli inibitori delle proteine di membrana hanno effetti significativi sui transienti di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, suggerendo un loro potenziale ruolo nella risposta allo stress salino. Tuttavia, per approfondire questi risultati, sarà necessario utilizzare inibitori più specifici, come i composti al mercurio per le aquaporine. Inoltre, studi di trascrittomici e proteomici potrebbero offrire una visione più dettagliata dei cambiamenti molecolari e delle reti di segnalazione coinvolte. Un ulteriore passo avanti potrebbe essere la selezione di mutanti knockout (KO) per le proteine di interesse. Questi mutanti potrebbero fornire prove definitive del ruolo specifico di queste proteine nella resistenza allo stress salino, permettendo lo sviluppo di varietà di riso geneticamente migliorate e più resistenti.

Questo lavoro apre la strada a future ricerche che combinino approcci molecolari e genetici per comprendere e migliorare la resistenza del riso allo stress salino, contribuendo così alla sicurezza alimentare globale in un contesto di cambiamenti climatici e salinità crescente dei suoli.

## 7) Bibliografia

- Agarwal M., Singh A., Mittal D., Sahi C., et al (2011), Cycloheximide-mediated superinduction of genes involves both native and foreign transcripts in rice (*Oryza sativa* L.).
- Barkha R., Foyer C., Girdhar P. (2023). The integration of reactive oxygen species (ROS) and calcium signalling in abiotic stress responses.
- Formentin E, Sudiro C, Ronci MB, Locato V, Barizza E, Stevanato P, Ijaz B, Zottini M, De Gara L, Lo Schiavo F. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Signature and Innate Antioxidative Profile Make the Difference Between Sensitivity and Tolerance to Salt in Rice Cells. *Front Plant Sci.* 2018 Oct 23;9:1549. doi: 10.3389/fpls.2018.01549.a.
- Formentin E, Sudiro C, Perin G, Riccadonna S, Barizza E, Baldoni E, Lavezzo E, Stevanato P, Sacchi GA, Fontana P, Toppo S, Morosinotto T, Zottini M, Lo Schiavo F. Transcriptome and Cell Physiological Analyses in Different Rice Cultivars Provide New Insights Into Adaptive and Salinity Stress Responses. *Front Plant Sci.* 2018 Mar 5;9:204. doi: 10.3389/fpls.2018.00204.b.
- Gutscher M, Sobotta MC, Wabnitz GH, Ballikaya S, Meyer AJ, Samstag Y, Dick TP. Proximity-based protein thiol oxidation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-scavenging peroxidases. *J Biol Chem.* 2009 Nov 13;284(46):31532-40. doi: 10.1074/jbc.M109.059246.
- Hao Wang, Stefan Schoebel, Florian Schmitz, Hansong Dong, Kristina Hedfalk, Characterization of aquaporin-driven hydrogen peroxide transport, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Volume 1862, Issue 2, 2020.
- Howden, S. M., Soussana, J. F., Tubiello, F. N., Chhetri, N., Dunlop, M., & Meinke, H. (2007). Adapting agriculture to climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(50), 19691-19696.



- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). (2014). Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.
- Israel, D., Lee, S.H., Robson, T.M. *et al.* Plasma membrane aquaporins of the PIP1 and PIP2 subfamilies facilitate hydrogen peroxide diffusion into plant roots. *BMC Plant Biol* **22**, 566 (2022).
- Khush, G. S. (2005). What it will take to Feed 5.0 billion Rice consumers in 2030. *Plant Molecular Biology*, 59, 1-6.
- Liu H., Li X., Cai J., Jiang L., Zhang X. *Et al* (2023) A screening of inhibitors targeting the receptor kinase FERONIA reveals small molecules that enhance plant root immunity.
- Lobell, D. B., Burke, M. B., Tebaldi, C., Mastrandrea, M. D., Falcon, W. P., & Naylor, R. L. (2008). Prioritizing climate change adaptation needs for food security in 2030. *Science*, 319(5863), 607-610.
- Mittler R., Zandalinas S., Fichman Y. (2022) Reactive oxygen species signalling in plant stress responses.a.
- Mittler R, Jones DP. The redox code of plants. *Plant Cell Environ.* 2023 Dec 13. doi: 10.1111/pce.14787.b.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-681.
- Muthayya, S., Sugimoto, J. D., Montgomery, S., & Maberly, G. F. (2014). An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1324(1), 7-14.
- Ni J., Yu Z., Du G., Zhang Y., *et al* (2016), Heterologous Expression and Functional Analysis of Rice GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE Family Indicates its Role in Glutamate Triggered Calcium Flux in Rice Roots.
- Nietzel T, Elsässer M, Ruberti C, Steinbeck J, Ugalde JM, Fuchs P, Wagner S, Ostermann L, Moseler A, Lemke P, Fricker MD, Müller-Schüssele SJ, Moerschbacher BM, Costa A, Meyer AJ, Schwarzländer M. The fluorescent protein sensor roGFP2-Orp1 monitors in vivo H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> and thiol redox integration and elucidates intracellular H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> dynamics during

elicitor-induced oxidative burst in Arabidopsis. *New Phytol.* 2019 Feb;221(3):1649-1664. doi: 10.1111/nph.15550.

- Rosenzweig, C., Iglesias, A., Yang, X. B., Epstein, P. R., & Chivian, E. (2001). Climate change and extreme weather events; implications for food production, plant diseases, and pests. *Global Change & Human Health*, 2(2), 90-104.
- Voicu M., Zwiazek J. (2004), Cycloheximide inhibits root water flow and stomatal conductance in aspen (*Populus tremuloides*) seedlings.
- Wassmann, R., Jagadish, S. V. K., Heuer, S., Ismail, A., Redona, E., Serraj, R., ... & Howell, G. (2009). Climate change affecting rice production: The physiological and agronomic basis for possible adaptation strategies. *Advances in Agronomy*, 101, 59-122.
- Zhang, Q. (2007). Strategies for developing green super rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(42), 16402-16409.
- Zhu, J. K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, 6(2), 66-71.