

ENRICO FRANCIA*, FULVIA RIZZA*, VALERIA TERZI*, ALESSANDRO TONDELLI*,
MICHELE STANCA*, NICOLA PECCHIONI*

Adattamento delle piante ai diversi ambienti di coltivazione: risposte fenotipiche e molecolari

BASI GENETICHE DELL'ADATTAMENTO A STRESS ABIOTICI

Le piante durante la loro evoluzione hanno sviluppato meccanismi di adattamento alle condizioni ambientali più avverse. La resistenza allo stress viene intesa come la capacità di sopravvivere, crescere e generare progenie in presenza del fattore sfavorevole. Essa può essere ottenuta mediante tre differenti strategie così definite:

- STRESS ESCAPE (evitare l'avversità). In realtà si è di fronte a una forma di falsa resistenza: la pianta ha un ciclo di sviluppo che la porta a non intercettare l'avversità o a intercettarla in fasi fenologiche non a rischio (ad esempio, le piante precoci sfuggono alla siccità estiva terminando il proprio ciclo vitale prima del sopraggiungere della stagione secca);
- STRESS AVOIDANCE (evitare lo stress). Caratteristico di quelle piante che possiedono barriere stabili morfologiche e/o funzionali che consentono di prevenire o ridurre lo stress prodotto dall'avversità. Ad esempio, le piante chiudono gli stomi per evitare una eccessiva traspirazione durante lo stress o in caso di stress anossico, alcuni meccanismi consentono il trasferimento dell'ossigeno dalle parti ben aerate della pianta verso quelle che ne hanno a disposizione in quantità sub-ottimale;
- STRESS TOLERANCE (tollerare lo stress). Le piante attivano meccanismi fisiologico-molecolari in grado di alleviare gli effetti dovuti allo stress e/o riparare i danni subiti. Dato l'elevato numero di caratteri fisiologici implicati nella tolleranza, è probabile che non esista un unico pattern di risposta ma, al contrario, specie diverse possono raggiungere simili livelli di tolleranza utilizzando differenti meccanismi.

* CRA GPG Fiorenzuola-UNIMORE

A livello cellulare le piante hanno un complesso sistema di percezione e risposta agli stress che può essere schematizzato in quattro fasi distinte:

- PERCEZIONE DEL SEGNALE. Il fatto che le piante attivino una serie di processi molecolari in risposta alle variazioni ambientali implica necessariamente l'esistenza di recettori, situati sulla membrana plasmatica delle cellule, che agiscono da sensori rilevando tali cambiamenti. Alcuni studi suggeriscono ad esempio un ruolo centrale della fluidità delle membrane nella percezione di alte e basse temperature;
- ATTIVAZIONE DI MESSAGGERI SECONDARI PER LA TRASDUZIONE DEL SEGNALE. Ormoni come l'acido abscissico (ABA), ioni come Ca^{2+} , proteine MAPK (Mitogen-activated protein Kinase) e altre molecole partecipano a una serie di eventi che, come una vera e propria cascata, trasportano il segnale di stress fino al nucleo, dove viene attivata la trascrizione di geni di risposta.
- ATTIVAZIONE DI PROTEINE REGOLATRICI DELLA TRASCRIZIONE. I fattori trascrizionali rappresentano l'ultimo anello della catena di trasduzione del segnale: essi inducono l'espressione dei geni effettori della risposta allo stress. L'analisi funzionale di questi fattori di trascrizione dovrebbe chiarire la complessa rete di regolazione dell'espressione di molti geni, responsabile dell'adattamento delle piante all'ambiente. Un nuovo interesse si sta spostando verso l'analisi delle modificazioni post-traduzionali, quali fosforilazione, glicosilazione, ubiquitinazione e sumoilazione a seguito di eventi di stress.

L'ubiquitinazione svolge un ruolo importante nel rimodellare il proteoma di una pianta in risposta a eventi di stress indirizzando verso la degradazione tutte le proteine che, a causa dello stress stesso, hanno subito un danno strutturale o che non sono più necessarie in quella determinata situazione. Il pathway di ubiquitinazione è articolato in tre passaggi principali che coinvolgono tre diversi enzimi: un enzima di attivazione E1, un enzima di coniugazione E2 e una ligasi E3. La E3 ligasi è la proteina che conferisce specificità e selettività al processo, in quanto riconosce specificamente proteine che recano una varietà di segnali di degradazione. Il genoma di *Arabidopsis* contiene almeno 1300 putative E3 ligasi, mentre possiede solamente 2 isoforme dell'enzima E1 e 37 enzimi E2; una tale distribuzione riflette l'importanza che le E3 ligasi rivestono nel conferire specificità alla reazione di ubiquitinazione delle proteine.

- SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) è una proteina simile alla ubiquitina che viene attaccata post-traduzionalmente a una varietà di proteine target tra cui spiccano prevalentemente fattori trascrizionali.

- ESPRESSIONE DI PROTEINE LEGATE ALLA RISPOSTA. Differenti tipologie di proteine possono essere sintetizzate, a seconda del tipo di stress cui la pianta è sottoposta. In risposta a condizioni di siccità, basse temperature o alte concentrazioni saline, fenomeni riconducibili alla disidratazione cellulare, si ha ad esempio l'espressione di geni che consentono l'accumulo, di proteine anticongelanti note come AFP (Antifreeze proteins), geni codificanti per proteine localizzate all'interno del cloroplasto (COR14B), di osmoliti compatibili quali prolina, poliammine, glicinbetaina, zuccheri e di ioni come il potassio, tutti utili per contrastare la perdita di acqua.

La risposta cellulare allo stress è inoltre caratterizzata anche da un meccanismo inducibile attivato da moderate condizioni di stress, che migliora sostanzialmente la capacità di tollerare gli effetti negativi delle condizioni ambientali sfavorevoli. Nel caso dello stress da freddo è noto che le piante di orzo se vengono esposte per un certo periodo a temperature basse non letali (0-5 C°), incrementano notevolmente la tolleranza verso le temperature molto inferiori allo zero: ACCLIMATAMENTO O HARDENING.

ANALISI GENETICA DELLA TOLLERANZA AGLI STRESS

Nell'ambito degli stress abiotici, siccità, salinità e basse temperature rappresentano condizioni che hanno un effetto severo sullo sviluppo e crescita dell'orzo e come ricaduta sulla produttività. Le piante si sono adattate a rispondere a questi stress a livello molecolare, cellulare, fisiologico e biochimico in modo da consentire la loro sopravvivenza. Gli studi di genetica classica hanno permesso di definire l'ereditarietà di tipo quantitativo dei diversi caratteri e con l'integrazione di test fisiologici per analizzare il fenotipo è stato possibile incrementare sostanzialmente la resistenza genetica.

Attualmente la disponibilità di strumenti molecolari sta rivoluzionando l'analisi dell'espressione di geni indotta da stress. Gli approcci di genomica in grado di monitorare in un singolo esperimento l'espressione dell'intero repertorio genico cellulare hanno messo in luce come diverse centinaia di geni siano modulati nella loro espressione (in positivo ovvero in negativo) dagli stress abiotici.

È anche stato dimostrato come la risposta molecolare agli stress messa in atto dalle piante le renda capaci di adattarsi e rispondere efficacemente

non solo ai singoli fattori ambientali ma anche alla combinazione di più stress contemporaneamente. Nel caso specifico degli stress abiotici è stato ad esempio osservato che più del 50% dei geni inducibili da siccità sono indotti anche da stress salino, indicando una sovrapposizione nella risposta ai due stress in termini di gruppi (o categorie) di geni implicati nella risposta. In contrasto, solo circa il 10% dei geni indotti da siccità sono anche indotti dallo stress da basse temperature, indicando quindi una divergenza nei due tipi di risposta molecolare. Questo indica come l'adattamento degli organismi vegetali all'ambiente sia riconducibile a semplici basi genetiche e molecolari e che queste determinino in ultima analisi la fitness e la plasticità genotipica e fenotipica delle piante.

Analizzando l'attivazione della trascrizione dei geni in termini di tempo trascorso dalla esposizione allo stress, è stato osservato che esistono almeno due gruppi distinti di sequenze codificanti che mostrano diversi profili di espressione:

1) un gruppo di geni nei quali l'attivazione trascrizionale in risposta a siccità, salinità e bassa temperatura è rapida e transiente; in questo caso l'accumulo di trascritti in risposta allo stress raggiunge un massimo alcune ore dopo l'evento stressante e poi decresce per ritornare ai livelli iniziali. La maggior parte di questi geni codifica per proteine che agiscono da fattori di regolazione/modulazione dell'espressione genica come fattori di trascrizione bHLH (basic helix-loop-helix), proteine zinc finger, proteine chinasi, fattori di trascrizione contenenti il dominio AP2 (APETALA2);

2) un gruppo di geni la cui espressione incrementa gradualmente e lentamente entro 10 ore dall'inizio dello stress. La maggior parte di questi geni codifica per proteine ed enzimi con azione di effettori della di risposta allo stress come proteine LEA (Late Embryogenesis Abundant proteins, proteine con funzione di stabilizzazione dei componenti cellulari durante lo stress abiotico), enzimi detossificanti (enzimi implicati nella protezione da danni ossidativi come glutazione perossidasi, superossido dismutasi, ascorbato perossidasi e glutazione reduttasi), ed enzimi per la sintesi di osmoprotettori (come prolina, glicina-betaina, zuccheri solubili, trealosio).

È stato dimostrato che la sovra-espressione di geni che appartengono ai due gruppi sopra citati, come fattori di trascrizione per il primo gruppo o geni che codificano per proteine LEA, per biosintesi di osmoprotettori, enzimi detossificanti per il secondo gruppo di geni, producono piante transgeniche con un fenotipo tollerante allo stress. Questi risultati indicano quindi che i prodotti di questi geni inducibili da stress funzionano realmente incrementando la tolleranza allo stress.

Un altro importante fattore di tolleranza a stress abiotici è rappresentato dall'acido abscissico (ABA), un ormone vegetale. ABA è normalmente prodotto dalle cellule vegetali in condizioni di siccità e stress salino, mentre applicazioni esogene di ABA inducono una serie di geni di risposta a stress da disidratazione (siccità e salinità) e da basse temperature. Tuttavia il ruolo di ABA nella espressione di geni da risposta da bassa temperatura non è completamente chiarito. Diversi studi hanno inoltre dimostrato che alcuni geni indotti da stress abiotici dei due gruppi sopra citati sono indotti anche da applicazioni esogene di ABA, mentre altri non rispondono al trattamento con ABA o sono comunque indotti da stress da freddo o siccità in piante mutanti di *A. thaliana* incapaci di sintetizzare ABA (piante mutanti ABA-deficient o aba) e in piante mutanti insensibili a ABA (piante mutanti ABA-insensitive o abi). Questi risultati indicano quindi che nell'adattamento delle piante agli stress abiotici esistono vie di risposta ABA-dipendenti e vie di risposta ABA-indipendenti.

Questo significa che geni come RD29A possono essere attivati sia da meccanismi di risposta a stress abiotici ABA-dipendente che da quelli ABA-indipendenti, realizzando quindi una integrazione tra le due diverse classi di risposta a stress abiotici.

La conoscenza dei meccanismi che regolano l'architettura della pianta, molto spesso mediata da un controllo ormonale, sono fondamentali per i nuovi ideotipi di pianta per il futuro. In genere gli studi sono stati rivolti principalmente a fisiologia, metabolismo e genetica della parte aerea delle piante. Oggi tuttavia una maggiore attenzione viene rivolta alle radici, per migliorare l'efficienza d'uso dell'acqua (WUE), dell'azoto (NUE), del Fosforo (PUE), alla resistenza al freddo (cor genes), alle proprietà fisico-chimiche e biologiche del suolo e al loro impatto sulla resistenza alle malattie, in modo da disegnare un moderno sistema integrato (IPM: Integrated Pest Management) per mettere i nuovi genotipi di pianta nella migliore condizione di crescita. Sono in atto in "Open Field" i primi esperimenti di simulazione dell'incremento della CO₂ nell'atmosfera, che passerà dalle 380 ppm attuali a 600 ppm nel 2050 per verificare l'effetto sulla fotosintesi e qualità dei prodotti. Non trascurabile è anche il tema che vede il sistema produttivo agrario non più basato sul trinomio Pianta-Atmosfera-Suolo ma piuttosto sul quadriminomio Pianta-Atmosfera-Suolo-Microrganismi che vivono intorno o dentro le radici. Questa nuova visione ha stimolato la nascita di network per monitorare l'evoluzione del metagenoma al variare dei diversi sistemi colturali e degli ambienti, e come questo possa influenzare la vita delle specie agrarie e selvati-

che. Si ipotizza già che la performance di specie di piante e di genotipi entro specie dipenderà anche dagli inoculi microbici, specifici per l'esaltazione di determinati caratteri, che interagiscono con gli elementi fisico-biochimici del suolo e con il microbioma naturale in specifiche condizioni.