



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea
Scienze Biologiche

“Salinità e produttività delle colture agricole: perché lo stress salino è dannoso e come si può agire per aumentarne la tolleranza nelle piante.”

“Salinity and productivity of agricultural crops: why salt stress is harmful and how we can act to increase its tolerance in plants.”

Tesi di Laurea di:
di:

Carlotta Soccio

Docente Referente
Chiar.mo Prof.

Alessandra Norici

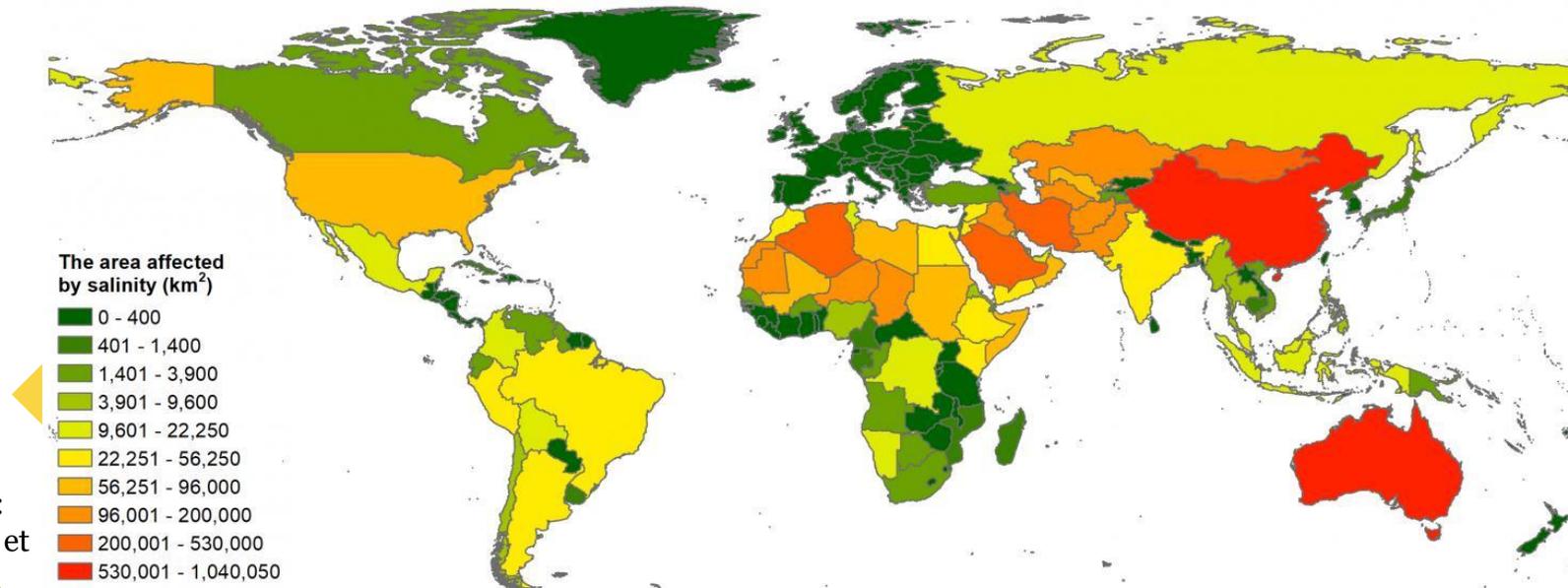
Sessione Luglio 2024

Anno Accademico 2023/2024

I cambiamenti climatici stanno influenzando vari aspetti dell'ambiente globale e uno degli effetti più preoccupanti è l'aumento della salinizzazione del suolo.

L'ultimo report dell'IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) affronta la salinizzazione del suolo come uno dei problemi emergenti legati ai cambiamenti climatici. Questo fattore è particolarmente rilevante per le regioni costiere e per quelle soggette a irrigazione intensiva dove l'innalzamento del livello del mare e l'uso eccessivo delle risorse idriche contribuiscono ad aumentare la concentrazione di Sali nel suolo. La salinità del suolo è un fattore importante che limita la resa delle colture agricole, mettendo a repentaglio la capacità dell'agricoltura di sostenere il crescente aumento della popolazione umana.

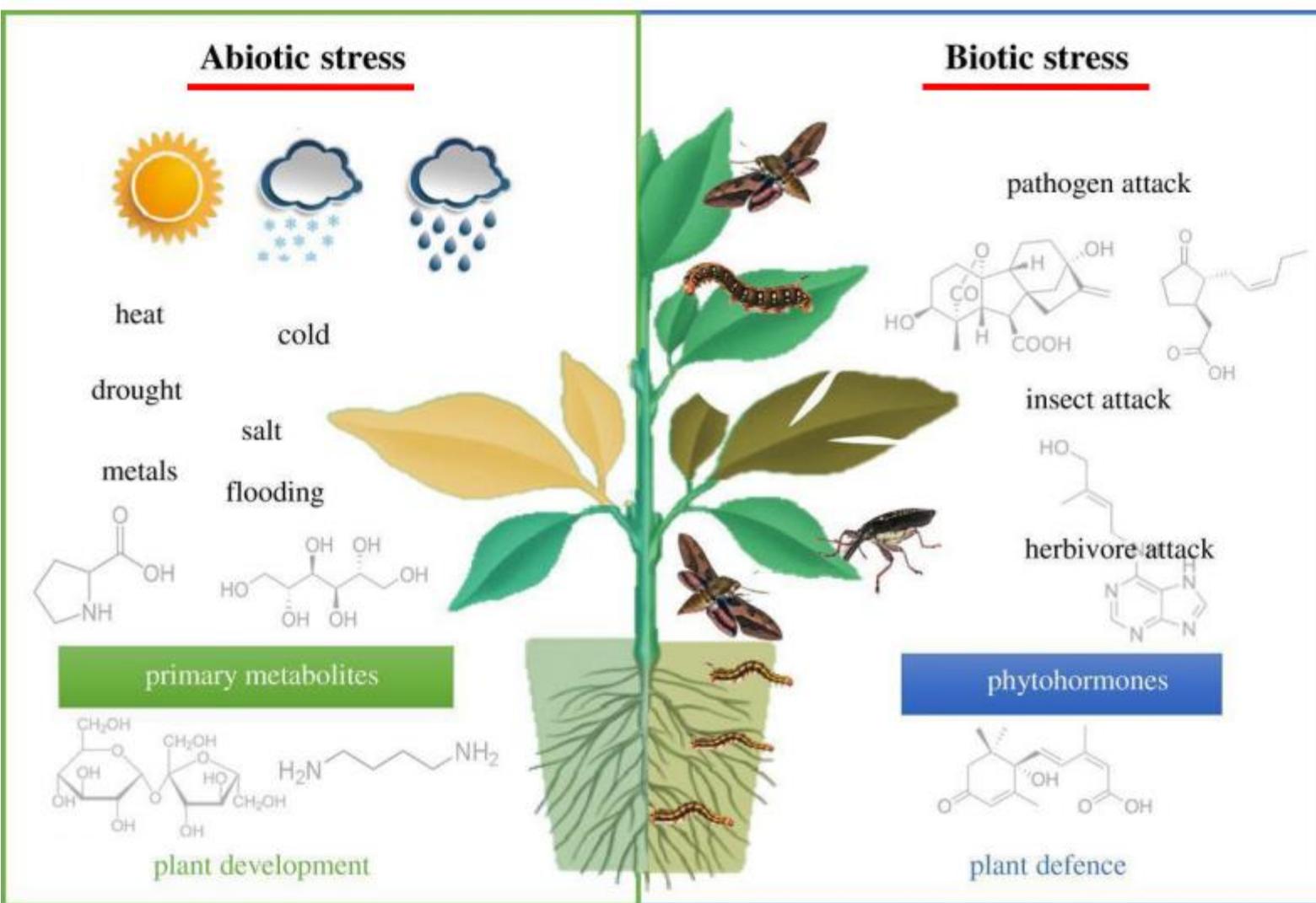
- Alte concentrazioni di sali nel terreno disturbano la capacità delle radici di estrarre l'acqua.
- Alte concentrazioni di sali all'interno della pianta stessa possono essere tossiche, con conseguente inibizione di molti processi fisiologici e biochimici come assorbimento e assimilazione dei nutrienti



Si stima che circa 932 milioni di ettari di terra nel mondo siano affetti da salinizzazione con concentrazione significativa in regione aride e semiaride.

(FAO, 2019)

FAO, "Organizzazione delle Nazioni unite per l'alimentazione e l'agricoltura"



65-75%

25-35%

Top abiotic stresses

		Citations	Data points
1	Salt stress	568	39068
2	Drought	394	26884
3	Cadmium stress	209	13831
4	Cold stress	182	11598
5	Heat stress	121	5591
6	Arsenic stress	54	3729
7	Lead stress	53	3553
8	Zinc stress	52	2663
9	Copper stress	43	2443
10	Nickel stress	36	2814



La maggior parte dello stress (65%-75%) che subisce una pianta è abiotico, ovvero causato da fenomeni ambientali come temperature troppo elevate o troppo basse, ma anche siccità, allagamento, eccessiva concentrazione di sale e metalli nel suolo. Solo il 25%-35% dello stress totale è invece biotico, ovvero che deriva da organismi terzi alla pianta come ad esempio parassiti.

Image credit: biostimulants.online

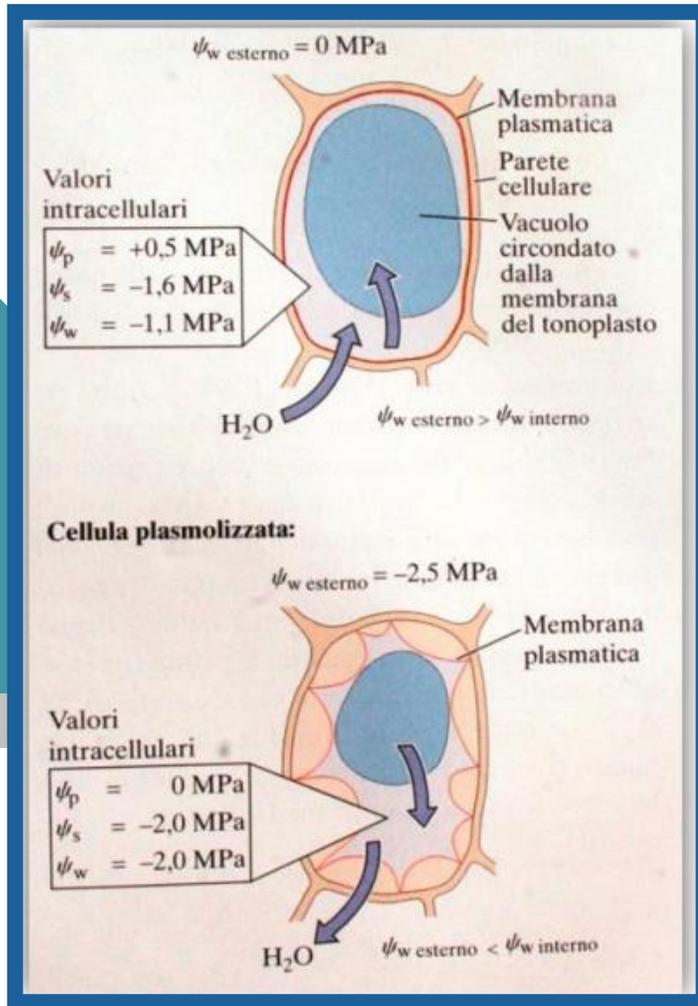
Lo stress salino ha effetti primari e secondari:

Effetti primari

- **Effetto Osmotico**, può impedire o ridurre l'assorbimento di acqua da parte delle radici e portare alla perdita di turgore della pianta.
- **Tossicità ionica e squilibri nutrizionali**, l'assorbimento in eccesso di ioni sodio Na^+ e ioni cloruro Cl^- provoca tossicità ionica e interferisce con l'assorbimento di alcuni nutrienti vegetali essenziali portando a uno squilibrio nutrizionale.

Effetti secondari:

- **Rallentamento della fotosintesi**, lo stress salino può inibire l'attività degli enzimi fotosintetici come la Rubisco.
- **Stress ossidativo**, i ROS (specie reattive dell'ossigeno) si accumulano in modo significativo in condizioni di stress salino, causando danni ossidativi e portando in fine alla morte cellulare.



Il potenziale idrico esterno alla cellula deve essere maggiore di quello all'interno affinché l'acqua possa entrare.

Poche sono le colture agricole attuali in grado di tollerare una alta concentrazione di NaCl → necessità di nuove varietà di colture o di nuove colture per sostenere l'agricoltura in molte regioni del mondo.

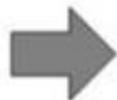
Negli ultimi anni nuove e più robuste piattaforme di sequenziamento del DNA hanno rivoluzionato la ricerca biotecnologica vegetale.

Diversi tratti agronomici sono diventati possibili obiettivi di miglioramento, inizialmente utilizzando la **selezione vegetale assistita da marcatori molecolari** e successivamente mediante **l'ingegneria genetica basata su approcci transgenici.**

Selezione Assistita da Marcatori



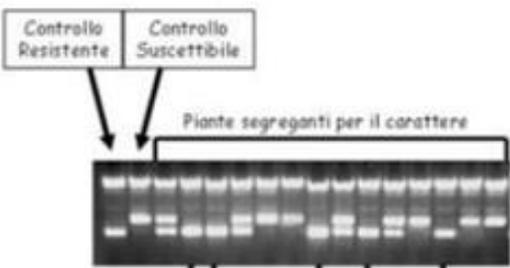
1. Prelievo dei campioni



2. Estrazione del DNA dal tessuto



3. Reazione PCR con i marcatori molecolari associati al carattere d'interesse



4. Selezione delle piante desiderate in base al profilo del DNA



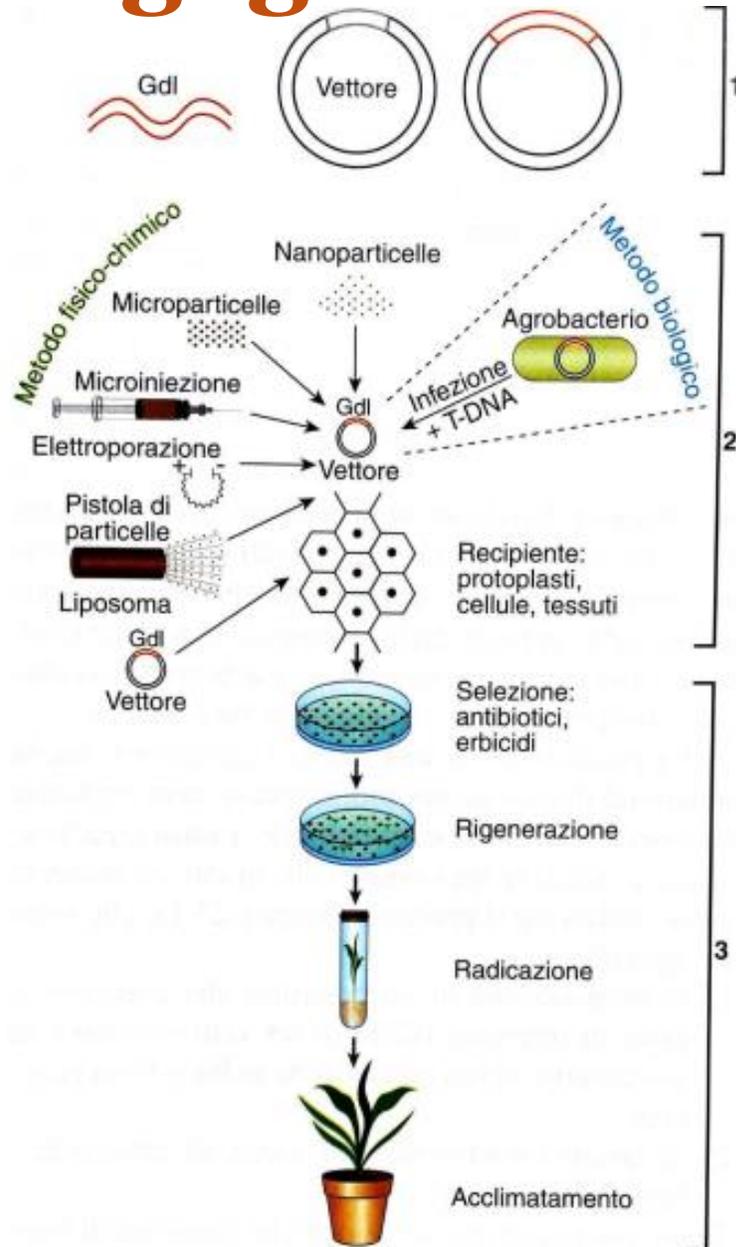
5. Esecuzione di nuovi incroci "mirati"

MAS, Marker Assisted Selection:

Tecnica che individua in una pianta la sequenza genica associata al carattere desiderato ed effettua incroci mirati finché il gene non si stabilizza nelle nuove varietà.

Un marcatore molecolare è un frammento di DNA, rilevabile con sonde o inneschi specifici, che contraddistingue il segmento cromosomico con il quale si identifica e le regioni che lo circondano.

Ingegneria Genetica



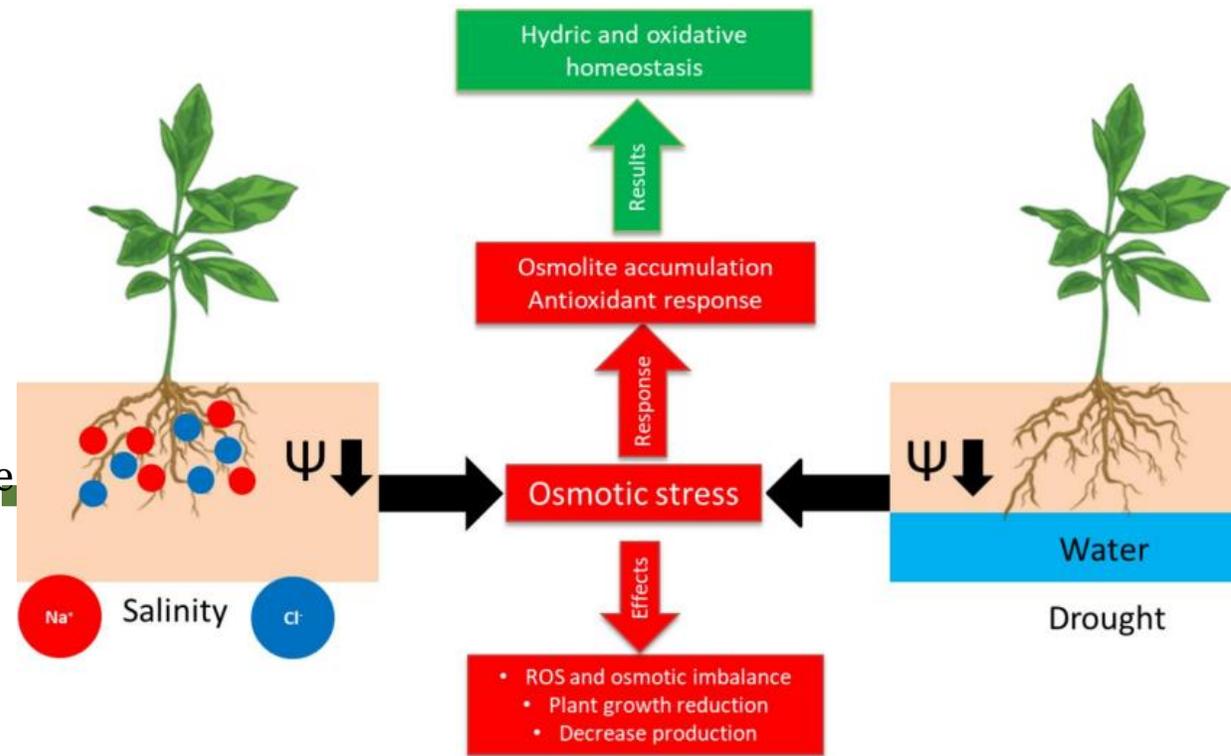
- Passaggi necessari per ottenere una pianta geneticamente modificata
1. Preparazione di un costrutto contenente il gene d'interesse (GdI) in un vettore
 2. Un sistema per introdurre il DNA all'interno della cellula vegetale;
 3. Un sistema di rigenerazione che consenta di ottenere una pianta GM (geneticamente modificata) dalla cellula trasformata.

L'ingegneria genetica ha fornito uno strumento complementare, consentendo l'introduzione orizzontale di geni desiderabili per tratti di interesse per le piante coltivate.

Tolleranza al sale

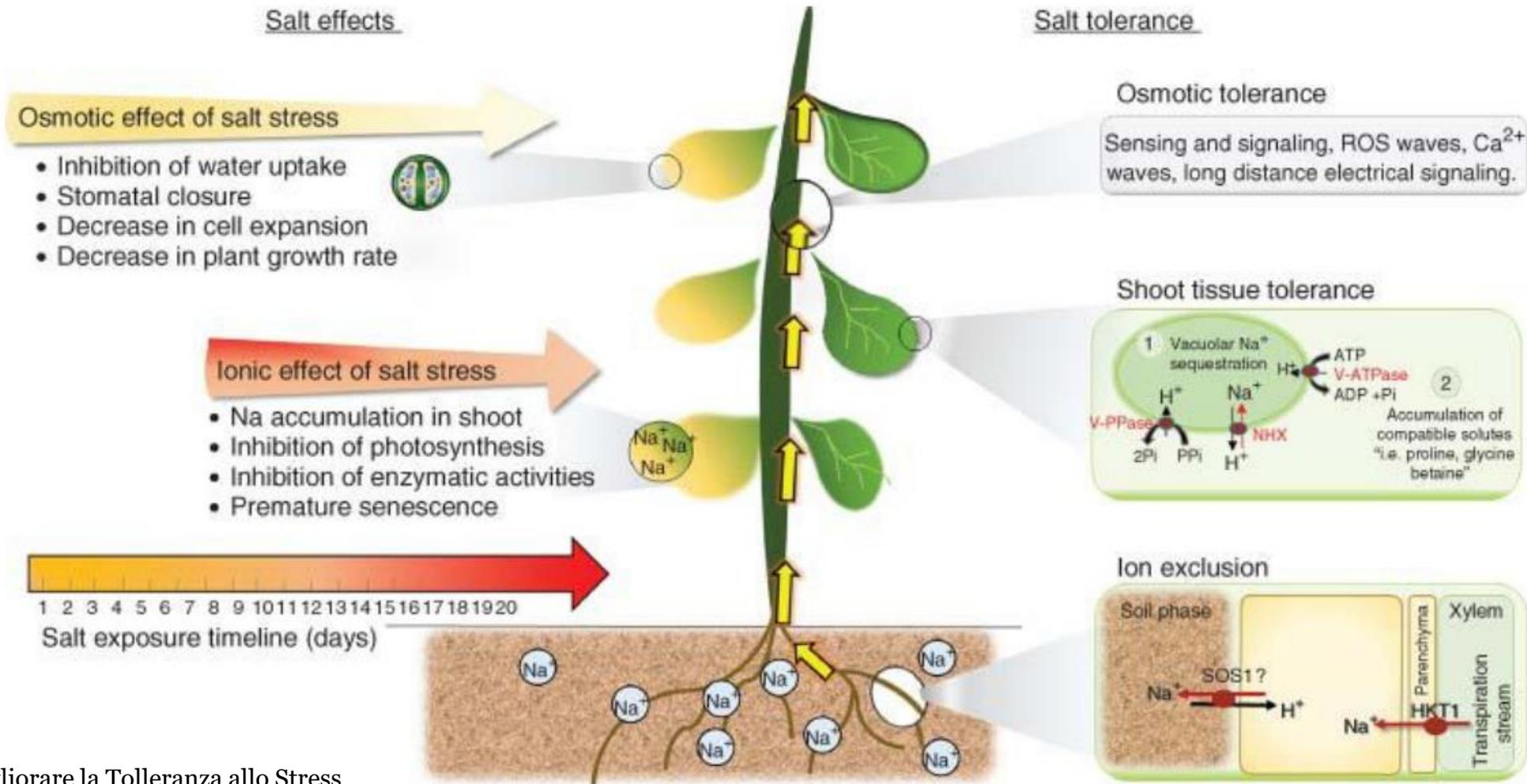
Le piante, per tollerare la presenza di sale, utilizzano diverse strategie tra di loro interconnesse:

- La **perdita di turgore** viene combattuta: aumentando la produzione di soluti osmoprotettori nell'apoplasto, attraverso la regolazione dell'area fogliare e la chiusura stomatica
- **Inibizione della crescita**, poiché ad una crescita rallentata è possibile la riparazione dei danni strutturali e il ripristino delle funzioni fisiologiche
- **Produzione di antiossidanti per neutralizzare i ROS**, come superossido dismutasi, catalasi e ascorbato perossidasi
- **Meccanismi di esclusione dai tessuti degli ioni Na^+ e Cl^-** , compartimentazione degli ioni sodio nel vacuolo, partizione tissutale, sviluppo delle ghiandole del sale, esclusione del sale dal citoplasma
- **Detossificazione all'accumulo di ioni Na^+ e Cl^- cellulare**, sintesi di proteine, acidi o basi organiche ed osmoliti che oltre alla protezione osmotica, determinano azioni detossificanti.



Plants | Free Full-Text | A Beginner's Guide to Osmoprotection by Biostimulants (mdpi.com)

In figura sono schematizzati i principali effetti che si presentano con il passare dei giorni nel momento in cui una pianta è esposta ad eccessive concentrazioni di sale nel terreno: da un effetto osmotico primario a uno ionico secondario. E alcuni dei meccanismi che le piante mettono in atto per combattere questa condizione (tolleranza osmotica, compartimentazione ionica, accumulo di soluti compatibili ed esclusione ionica)



Esclusione ioni Na^+ e approcci transgenici

Piante transgeniche che sovraesprimono una delle proteine chiave per l'esclusione degli ioni Na^+ dalla cellula: H^+ -ATPasi di membrana.

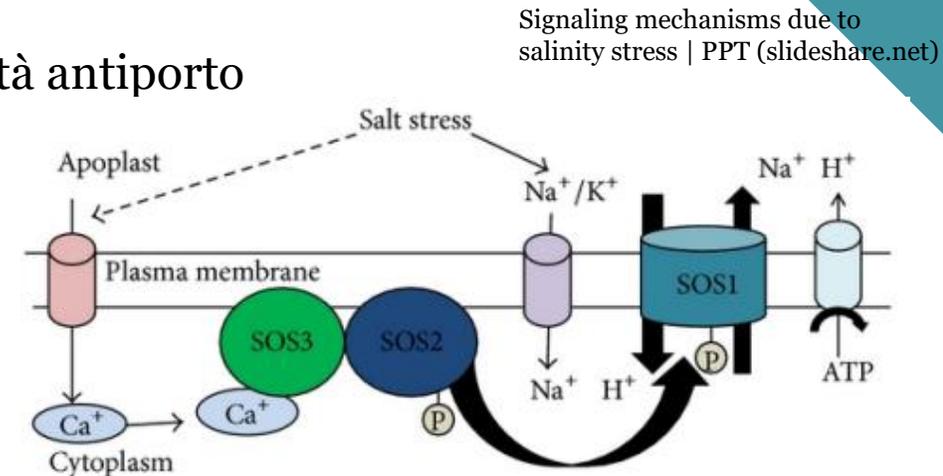
Nelle piante il pompaggio di ioni idrogeno avviene attraverso la membrana plasmatica grazie alle pompe H^+ -ATPasi che stabiliscono una differenza elettrochimica di ioni idrogeno che fornisce una forza trainante per l'attività antiporto di H^+/Na^+ attraverso SOS1, uno scambiatore Na^+/H^+ .

SOS sta per "salt overly sensitive" → il percorso SOS richiede l'attività combinata di tre proteine:

- SOS3, una proteina che lega il calcio,
- SOS2 una proteina chinasi serina/ treonina
- SOS1 uno scambiatore Na^+/H^+

I cambiamenti indotti dalla salinità nel livello di calcio libero citosolico sono rilevati da SOS3 che si lega e attiva la chinasi SOS2 e il complesso SOS2-SOS3 fosforila e attiva SOS1 per espellere il sodio dalla cellula, prevenire l'accumulo di sodio e promuovere la tolleranza al sale.

Di conseguenza, si è tentato di potenziare l'attività dell' H^+ -ATPasi per favorire l'efflusso di Na^+ in condizioni saline.



In tabella la crescita ottenuta in seguito a sovraespressione del gene codificante per una ATPasi della membrana plasmatica in piante transgeniche di varie specie.

TABLE 1 Influence on growth and tissue ion concentrations (when available) of overexpression of a plasma membrane ATPase gene in transgenic plants of various species

Gene transformed	Donor species	Recipient species	Experimental conditions	Growth response in control conditions (% of wild type)	Growth response in saline conditions (% of wild type)	Tissue [Na ⁺] (% of wild type)	Tissue [K ⁺] (% of wild type)	Reference
ENA1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Pots of soil:perlite:vermiculite (2:1:1; vol:vol:vol), glasshouse; 0, 100, 150 and 200 mM NaCl for 16 days (data here are for the 200 mM NaCl treatment)	Fresh weight Whole plant: n.s. Dry weight Whole plant: n.s.	Fresh weight Whole plant: 130% Dry weight Whole plant: 128%	Shoot: 87% Root: 88%	Shoot: n.s. Root: n.s.	Kong et al. (2008)
PpENA1	<i>Physcomitrella patens</i>	<i>Oryza sativa</i>	Nutrient solution, growth room; 0 and 50 mM NaCl for 12 days	n.d.	Fresh weight Whole plant: 153–203%	Leaf: n.s.	Leaf: n.s.	Jacobs, Ford, Kretschmer, and Tester (2011)
PyKPA1	<i>Porphyra yezoensis</i>	<i>Oryza sativa</i>	MS medium; 50 mM NaCl for 12 days	Fresh weight Whole plant: n.s.	Fresh weight Whole plant: 140%	n.d.	n.d.	Kishimoto et al. (2013)
SpAHA1	<i>Sesuvium portulacastrum</i> (halophyte)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Pots of organic soil: Sand (3:1; vol:vol), glasshouse; 0 and 200 mM NaCl for 10 days	Fresh weight Whole plant: n.s.	Fresh weight Whole plant: 151%	Shoot: 80%	Shoot: 148%	Fan et al. (2018)

Note: This table only includes experiments in which plants were transpiring and the experiment included a non-saline control and provides quantitative data on plant growth/yield. Note that not all studies used adequate vector controls.

Abbreviations: n.d., not determined; n.s., non-significant.

RISULTATI

- E' stata dimostrata una maggiore tolleranza alla salinità in *Arabidopsis thaliana* che esprime la Na⁺-ATPasi di *Saccharomyces cerevisiae*. Le piante di *Arabidopsis thaliana* transgenica avevano concentrazioni di Na⁺ più basse nei germogli (87%) e nelle radici (88%), e i pesi delle piante fresche (130%) e secche (128%) erano più alti rispetto alle piante *wild type*.
- Allo stesso modo, una migliore tolleranza al sale e una riduzione di Na⁺ ma anche un aumento delle concentrazioni di K⁺ nei germogli sono state osservate in *Arabidopsis thaliana* che sovraesprime la PM H⁺ATPasi dell'alofita *Sesuvium portulacastrum*. Inoltre vi è stato riscontrato un aumento del tasso di efflusso di H⁺ (2100%) e Na⁺ (410%) rispetto alle piante non trasformate.
- Una maggiore produzione di biomassa in condizioni saline è stata osservata anche nel riso (*Oryza sativa*) che esprime la Na⁺ ATPasi del muschio *Physcomitrella patens* o la Na⁺/K⁺ ATPasi dall'alga rossa *Porphyra yezoensis*.
- Oltre a questi esperimenti con piante transgeniche è stata dimostrata una maggiore tolleranza al sale in *Nicotiana tabacum* con H⁺ ATPasi costitutivamente attivata.

Conclusioni

Nel complesso, la sovraespressione dell'H⁺ATPasi della membrana plasmatica può aumentare la crescita sia di una specie monocotiledone come *O. sativa* che di una specie dicotiledone come *A. thaliana*, in condizioni saline. Ancora solo queste due specie sono state testate e non sono riportati test sul campo per le specie coltivate.

Tanti sono i tentativi di aumentare la tolleranza al sale e sebbene i dati delle serre e in laboratorio siano promettenti, sono necessari studi sul campo per valutare la tolleranza alla salinità della coltura ma tali studi sono ancora molto rari.

La traduzione delle scoperte di laboratorio in applicazioni pratiche presenta diverse sfide (es. condizioni variabili ambientali, costi e logistica, regolamentazioni e accettazione pubblica).

Principali problemi e prospettive future

Il tempo per il processo di sviluppo di una nuova cultivar con un carattere bersaglio ereditato stabilmente mediante:

- **Selezione vegetale assistita da marcatori, va da 8 a 15 anni**
- **Ingegneria genetica, va da 10 a 15 anni**

Un approccio transgenico consente l'introduzione diretta dei tratti desiderati nelle piante, accelerando il processo di sviluppo di nuovi cultivar rispetto alla selezione assistita da marcatori. Tuttavia, i costi elevati e i lunghi tempi necessari per il rilascio di nuove colture transgeniche dovuti alle fasi complesse e regolamentari coinvolte rappresentano i principali ostacoli a questo approccio.

Sicuramente però l'adozione crescente di queste tecnologie insieme agli sviluppi scientifici e tecnologici porterà a una nuova era di miglioramento genetico delle piante con benefici per gli agricoltori, i consumatori e l'ambiente.



Riassunto esteso

I cambiamenti climatici stanno influenzando vari aspetti dell'ambiente globale e uno degli effetti più preoccupanti è l'aumento della salinizzazione del suolo. Lo stress salino ha effetti primari e secondari: effetto osmotico, tossicità ionica, squilibri nutrizionali, rallentamento della fotosintesi e stress ossidativo. Poche sono le colture agricole attuali a tollerare una alta concentrazione di NaCl: sono necessarie nuove varietà di colture o nuove colture per sostenere l'agricoltura in molte regioni del mondo. Diversi tratti agronomici sono diventati possibili obiettivi di miglioramento, inizialmente utilizzando la selezione vegetale assistita da marcatori molecolari e successivamente mediante l'ingegneria genetica basata su approcci transgenici. Le piante, per tollerare la presenza di sale, utilizzano diverse strategie tra di loro interconnesse: perdita di turgore viene combattuta aumentando la produzione di soluti osmoprotettori o attraverso la regolazione dell'area fogliare e la chiusura stomatica, inibizione della crescita, produzione di antiossidanti per neutralizzare i ROS, meccanismi di esclusione dai tessuti degli ioni Na⁺ e Cl⁻ e detossificazione all'accumulo di Na⁺ e Cl⁻ cellulare.

Si dettagliano gli esperimenti con piante transgeniche che sovraesprimono una delle proteine chiave per l'esclusione degli ioni Na⁺ dalla cellula: H⁺-ATPasi di membrana.

I risultati di laboratorio sono promettenti ma pochi studi sono sul campo, la traduzione delle scoperte di laboratorio in applicazioni pratiche presenta diverse sfide.

Però l'adozione crescente della selezione assistita da marcatori e dell'ingegneria genetica insieme agli sviluppi scientifici e tecnologici porterà a una nuova era di miglioramento genetico delle piante con benefici per gli agricoltori, i consumatori e l'ambiente.

Bibliografia

- I. Improving crop salt tolerance using transgenic approaches: An update and physiological analysis
Lukasz Kotula | Pedro Garcia Caparros | Christian Zörb | Timothy D. Colmer | Timothy J. Flowers.
 - II. Fan, Y., Wan, S., Jiang, Y., Xia, Y., Chen, X., Gao, M., ... Jiang, X. (2018). Over-expression of a plasma membrane H⁺-ATPase SpAHA1 conferred salt tolerance to transgenic Arabidopsis. *Protoplasma*, 255, 1827–1837.
 - III. Falhof, J., Pedersen, J. T., Fuglsang, A. T., & Palmgren, M. (2016). Plasma membrane H⁺-ATPase regulation in the center of plant physiology. *Molecular Plant*, 9, 323–337.
 - IV. FAO. (2011). The state of the world's land and water resources for food and agriculture (SOLAW)-managing systems at risk. Rome & London: The Food and Agriculture Organization of the United Nations and Earthscan.
 - V. IPCC. (2023). Climate Change 2023: Synthesis report AR6
 - VI. Insights Into Genetic and Molecular Elements for Transgenic Crop Development
 - VII. (Foto slide 7) Jiménez-Arias, et al., 2021. "A Beginner's Guide to Osmoprotection by Biostimulants" *Plants* 10, no. 2: 363. <https://doi.org/10.3390/plants10020363>
 - VIII. (Foto slide 6) La biodiversità: una risorsa essenziale della natura Bari, 18 febbraio 2011
-