



Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
Memorie di Scienze Fisiche e Naturali
119° (2001), Vol. XXV, pp. 433-445

MARIO MOTTO*

Strategie genetiche innovative per migliorare la tolleranza delle piante agli stress **

La costituzione di piante capaci di sottrarsi in tutto o in parte ai danni provocati dai parassiti animali e vegetali e dalle avversità ambientali è un tradizionale obiettivo per i genetisti. Una parte rilevante dei raccolti è persa annualmente a causa di malattie prodotte da funghi, batteri, virus, insetti, nematodi e, non ultimo, dall'incidenza di stress abiotici.

Un'efficace strategia per ridurre tali perdite è di impiegare varietà dotate di geni che conferiscono tolleranza o resistenza alle varie avversità biotiche e abiotiche. L'intervento sulle caratteristiche ereditabili delle piante al fine di fronteggiare le numerose avversità ambientali si qualifica infatti come uno dei più importanti fattori dell'evoluzione delle produzioni vegetali. Negli ultimi decenni sono stati conseguiti con tali interventi innumerevoli progressi che si sono concretati con lo sviluppo di nuove varietà vegetali dotate di maggior resistenza alle malattie ed alle condizioni ambientali avverse. Nella presentazione che segue sono riassunti e descritti alcuni aspetti relativi alla costituzione, mediante interventi genetici innovativi, di varietà più tolleranti alla competizione di erbe infestanti, all'attacco di patogeni ed insetti e alle condizioni micro e macroclimatiche avverse, quali siccità e temperature non ottimali.

RESISTENZA AGLI ERBICIDI

È uno dei settori nel quale sono già stati riscontrati i primi benefici delle biotecnologie applicate alle piante di interesse agrario: ciò dipende dal fatto che si

* Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Sezione di Bergamo.

** Relazione presentata al Primo Convegno Nazionale della U.N.A.S.A. su «Biotecnologie agroalimentari, industriali, ambientali: problemi e prospettive», Roma, 1-2 ottobre 2001.

conosce sia il meccanismo d'azione a livello molecolare di molti erbicidi sia le modalità di resistenza operanti in alcune specie (Dekker e Duke, 1995). In generale, piante resistenti agli erbicidi permettono di utilizzare più diffusamente erbicidi molto attivi, sufficienti a dosi molto basse, in fase di post-emergenza, con riduzione di costi e senza problemi di inquinamento della falda acquifera. Composti di questo tipo quali, ad esempio, il glifosato, le sulfoniluree, gli imidazolinoni, le fosfinotricine e il bromoxinil, sono molto attivi e praticamente innocui per uomo ed animali; sono, però, poco specifici ed esercitano effetti negativi anche sulle colture da diserbare.

La biotecnologia ha contribuito in più di un modo alla soluzione di questi problemi. Per esempio, gli oxinili sono erbicidi che controllano la crescita delle dicotiledoni. Nei cereali sono degradati ad acido benzoico da una nitrilasi. Il gene *oxy* che codifica per la nitrilasi è stato clonato da *Klebsiella ozanae*, un batterio isolato da terreno trattato con bromoxynil. Il gene trasferito alle dicotiledoni conferisce resistenza. Attualmente sono coltivate varietà transgeniche di cotone e soia resistenti all'erbicida.

L'erbicida glifosate inibisce l'enzima 5-enol-piruvilschichimato sintasi (EPSPS), enzima che regola un passaggio necessario per la sintesi degli aminoacidi aromatici. Il prodotto non è tossico ed è biodegradabile nel terreno. La pianta non lo degrada accumulandolo nei meristemi e negli organi di riserva. Il gene che codifica in *Salmonella typhimurim* per una EPSPS insensibile all'erbicida è stato ingegnerizzato prevedendo che il suo prodotto venisse trasferito al cloroplasto. Il gene rende la soia e la colza resistenti al glifosate. È stato anche isolato un gene da *Achromobacter* che codifica per una glifosate ossidoreduttasi che è in grado di degradare il composto ad acido aminoetilfosfonico, un prodotto non tossico per la pianta. L'uso dei precedenti geni è molto efficace nel proteggere la pianta. Varietà transgeniche di soia, cotone e mais resistenti a glifosate sono già in coltivazione.

Il glufosinate inibisce nella pianta la sintesi di glutamina avendo come bersaglio l'enzima glutamina sintasi. I geni *bar* e *pat* isolati da *Streptomyces hygroscopicus* e da *S. viridochromogens* codificano per una fosfinotricina acetil transferasi che è in grado di inattivare il glufosinate in un prodotto tollerato dalla pianta. I due geni inseriti nel corredo genico delle piante proteggono efficacemente mais, soia, canna, tabacco, riso, cotone, barbabietola, medica. Varietà transgeniche adatte per la coltivazione e resistenti al glufosinate sono disponibili per mais, soia, colza e cicoria.

RESISTENZA AGLI INSETTI

L'ingegnerizzazione di piante in grado di produrre autonomamente il proprio insetticida si propone come una strategia efficace e sicura dal punto di vista ecologico per controllare la diffusione degli insetti.

Piante resistenti all'attacco degli insetti determinerebbero una riduzione delle perdite produttive, una diminuzione delle spese per trattamenti insetticidi e un miglioramento della salubrità degli alimenti per la nutrizione animale e umana

(Estruch *et al.*, 1997). Sebbene l'obiettivo di ottenere piante più resistenti all'attacco degli insetti sia perseguibile con diverse strategie, quella oggi più usata consiste nel trasferire alle piante, mediante processi di ingegneria genetica, la capacità tipica di *Bacillus thuringiensis* di produrre una proteina tossica per diverse specie di insetti (de Maagd *et al.*, 1999). Sono stati individuati e sono quindi disponibili diversi geni *Bt* che specificano proteine in grado di controllare la crescita di lepidotteri, ditteri e coleotteri. Varietà transgeniche sono disponibili per mais, patata, cotone, colza, riso e pomodoro (Schuler *et al.*, 1998). In particolare, per il mais recenti prove, condotte nel nostro Paese con varietà ibride di mais dotate del gene *Bt*, confermano l'efficacia del composto *Bt* nel ridurre i danni provocati dalla piralide (Verderio *et al.*, 1998). È stato inoltre accertato che gli ibridi *Bt* hanno prodotto nelle diverse località di prova dal 2 al 28% in più dei corrispondenti normali: in aggiunta, tali ibridi hanno fornito un prodotto di maggior qualità ed hanno mostrato migliori caratteristiche per stay-green, resistenza alla premorienza e minore incidenza dei marciumi dello stocco e della granella. Ulteriori ricerche indicano che la granella prodotta da piante *Bt* ha una concentrazione inferiore di ergosterolo e fumonisine rispetto alle piante controllo non *Bt* (Masoero *et al.*, 1999).

Altri composti con attività insetticida sono stati studiati e valutati nei loro effetti (Schuler *et al.*, 1998). Chitinasi, lectina e inibitori dell' α -amilasi possono controllare, nella pianta, l'afide *Myzus persicae* (Gatehouse *et al.*, 1996). L'inibitore II delle proteasi è attivo contro gli insetti del riso (Duan *et al.*, 1996). L'inibitore dell' α -amilasi è attivo contro i coleotteri dei fagioli azuki (Ishimoto *et al.*, 1996) e contro quelli del pisello (Schroeder *et al.*, 1995). La cistatina di mais protegge il riso contro i coleotteri (Irie *et al.*, 1996). Gli inibitori della proteasi di *Manduca sexta* riducono in cotone il danno da *Bemisia tabaci* (Thomas *et al.*, 1995). L'elevata attività colesterolo ossidasi di alcuni transgeni di cotone può ridurre i danni da coleottero rosa in questa specie (Purcell *et al.*, 1993). L'avidina dell'albume dell'uovo, in concentrazioni superiori a 100 p.p.m. in piante di mais, ha attività insetticida verso gli insetti che danneggiano la granella nei centri di stoccaggio (Kramer *et al.*, 2000).

RESISTENZA ALLE MALATTIE

La maggior parte delle malattie delle piante sono provocate da batteri, funghi e virus. Appare evidente che la costituzione di piante in grado di autodifendersi potrebbe significativamente diminuire l'esigenza di agrotecniche basate su molecole di sintesi chimica che, sebbene proteggano le piante dalle fitopatie, possono risultare poco rispettose dell'ambiente e, in conclusione, inquinanti.

Resistenza a funghi e batteri

La resistenza delle piante a microrganismi patogeni dipende da svariati composti prodotti dalle piante e da una complessa rete di meccanismi di resistenza solo parzialmente noti. Infatti, numerose osservazioni indicano che le piante rispondono all'at-

tacco dei patogeni dispiegando diversi meccanismi attivi di difesa che comprendono la sintesi di composti antibiotici, quali le fitoalessine, specifiche, proteine antimicrobiche associate al processo infettivo (*Pathogens related proteins*), la stimolazione della sintesi di enzimi idrolitici e il potenziamento delle pareti cellulari atte ad ostacolare la replicazione e diffusione dell'agente patogeno (Hammond-Kosack e Jones, 2000).

Proteine antifungine e batteriche sono le chitinasi e le glucanasi: il grado di resistenza dei transgenici aumenta quando più di una di queste proteine viene contemporaneamente espressa. Altre proteine interessanti sono la proteina 1A (Alexander *et al.*, 1993) indotta dalla presenza del patogeno, l'osmotina (Liu *et al.*, 1994), la proteina 2 (Terras *et al.*, 1995) e la difensina (Gao *et al.*, 2000). Piante transgeniche che aumentano il livello di H₂O₂, attraverso l'espressione di un gene che specifica per una glucosio ossidasi, si dimostrano altresì resistenti a batteri e funghi (Wu *et al.*, 1995). L'elenco di proteine efficaci per combattere i patogeni, include anche il lisozima T4, la L-tionina dell'orzo e l'attacina E (Anzai *et al.*, 1989; Düring *et al.*, 1993; Norelli *et al.*, 1994).

Un'altra classe di proteine vegetali denominata RIP (Ribosome Inactivating Proteins) è dotata di attività antiparassitaria per virus e funghi. Nel seme di mais è stata recentemente identificata una proteina (b-32) ad attività RIP che appare inibire la crescita di funghi (Maddaloni *et al.*, 1991). Ulteriori ricerche indicano che piante di tabacco dotate del gene che specifica la proteina b-32 sono più resistenti a infezioni fungine di *Rhizoctonia solani* (Maddaloni *et al.*, 1997). È ipotizzabile che l'attitudine del gene *b-32* di proteggere le piante dagli attacchi dei funghi patogeni sia applicabile per contrastare la crescita di altri patogeni e per l'introduzione in altre piante di interesse agrario. La recente introduzione del gene *b-32* in piante di frumento e riso appare confermare l'ipotesi precedente (Lupotto, com. pers.).

Ulteriori ricerche hanno permesso di conseguire progressi sui complessi meccanismi di percezione e trasduzione del segnale che conducono all'attivazione di diverse reazioni dispiegate dalle piante in risposta all'invasione del patogeno; tali meccanismi comprendono proteine G, NADPH-ossidasi, H₂O₂, acido ossido nitrico, acido salicilico, etilene, acido jasmonico, MAPK chinasi e fattori trascrizionali appartenenti alle famiglie WRKY e Myb che provocano reazioni di ipersensibilità e di resistenza sistemica (Yang *et al.*, 1997; Eulgem *et al.*, 2000; Klessing *et al.*, 2000).

Sono stati inoltre caratterizzati geni per la resistenza alle malattie che specificano serina/trionina chinasi e proteine ricche in leucina (LRR; Hammond-Kosack e Jones, 2000). Quest'ultima proteina partecipa alle interazioni pianta-parassita come recettore di molecole elicitrici prodotte dal parassita (Martin *et al.*, 1993; Boyes *et al.*, 1996). Risultati disponibili indicano che il gene LRR-N clonato dal tabacco induce resistenza nel pomodoro transgenico al TMV (Whitham *et al.*, 1996), così come il gene *Pto* del pomodoro espresso in *Nicotiana benthamiana* induce una completa resistenza contro ceppi di *P. syringae* pv. *tabaci* che hanno i corrispondenti geni per la virulenza (Shah *et al.*, 1995). Una maggiore conoscenza dei meccanismi di aggressione correlati a quelli di resistenza permetterà di predisporre nuove strategie miranti a controllare la diffusione dei patogeni.

Resistenza ai virus

Numerose virosi colpiscono le piante causando, in alcune circostanze, danni rilevanti alle colture. Le strategie più comuni per creare con interventi biotecnologici piante resistenti alle virosi prevedono diversi meccanismi d'azione (Shah *et al.*, 1995). Per esempio, piante transgeniche resistenti ai virus si possono ottenere esprimendo nella pianta geni virali che codificano proteine del capsido, replicasi, proteina di trasporto, e sequenze virali di RNA-satelliti. Il primo esperimento che ha dimostrato la praticabilità di questa strategia ha riguardato l'espressione *in planta* della proteina del capsido del virus TMV del tabacco. Casi di resistenza ottenuta esprimendo proteine del capsido virale sono oggi noti per almeno 20 diversi virus (Kavanagh e Spillace, 1993). Varietà resistenti a virus di patata, pomodoro e zucca sono già coltivate. Nel caso della patata, la nuova tecnologia permette di risolvere importanti problemi di riproduzione del seme in condizioni di elevato inoculo virale, quali paesi a clima tropicale e subtropicale. Piante di tabacco che esprimono una versione mutata della proteina di trasporto del TMV resistono a questo virus (Lapidot *et al.*, 1993). Una strategia simile è stata seguita per ottenere resistenza a PLRV, PVY e PVX della patata (Tacke *et al.*, 1996). I problemi relativi alle infezioni virali sono particolarmente importanti nelle piante perenni che si riproducono vegetativamente. Le stesse soluzioni proposte per le piante erbacee sono state praticate con qualche successo, preliminare, anche per queste colture.

È stata riscontrata una riduzione dei sintomi causati dalla presenza dei virus in piante che esprimono geni che codificano per anticorpi attivi contro le proteine dei capsidi virali, ribozimi e inibitori di proteinasi di tipo cisteina (cistatina; Gutierrez-Campos *et al.*, 1999).

TOLLERANZA A STRESS ABIOTICI

Nonostante i continui tentativi per migliorare le tecniche di coltivazione, le piante sono continuamente soggetto a numerose avversità ambientali, quali ad esempio freddo, alta temperatura, siccità, carenza di elementi nutritivi, che si verificano nel corso della stagione colturale anche nelle zone più produttive. Queste avversità incidono sulla crescita e sullo sviluppo della pianta e, quindi, sulla produzione delle colture.

Una notevole mole di indagini indica che la risposta delle piante alle varie avversità dipende da numerosi fattori genetici e da modificazioni biochimiche e fisiologiche che conferiscono un vantaggio dal punto di vista della tolleranza (Bray *et al.*, 2000). Durante stress termici, o nutrizionali, ad esempio, si ha accumulo di ioni superossido, di radicali liberi e incremento della concentrazione interna di metalli pesanti; compaiono metaboliti secondari o composti chimici particolari come acido abscisico e zuccheri rari, aumenta la concentrazione di zuccheri comuni e di altre sostanze osmoprotettive. Indagini molecolari e biochimiche hanno altresì suggerito che le piante rispondono agli stress ambientali con una complessa rete di

meccanismi di percezione e trasduzione del segnale, alcuni dei quali sono comuni per i diversi tipi di stress; tali meccanismi coinvolgono modificazioni covalenti di fosforilazioni, alterazione del potenziale elettrico di membrana, stato del citosol (pH, Ca⁺), chinasi mitogeno attivate, attivazione di regolatori trascrizionali, espressione di geni «stress regolati», modificazioni post-traduzionali e di adattatori che mediano le interazioni proteina-proteina (Xiong e Zhu, 2001). In quest'ambito appaiono utili, per scomporre l'articolata rete dei meccanismi di recepimento e di trasmissione del segnale presenti nelle piante per fronteggiare situazioni stressanti, interventi diretti alla costituzione di piante transgeniche, l'impiego di tecniche di silenziamento genico, l'uso di informazioni derivate dal sequenziamento dei genomi, l'impiego di sistemi di knock-out genico e di tecniche di cDNA microarray. Una conferma in tal senso è stata recentemente riportata da Seki *et al.* (2001). Gli autori citati hanno analizzato i profili di espressione genica, con l'impiego di quest'ultima tecnologia, in piante di *Arabidopsis* allevate in condizioni sfavorevoli; ciò ha permesso di identificare geni indotti da carenza idrica e da freddo e diversi geni bersaglio del fattore trascrizionale DREB1/CBF3 che controlla l'espressione di geni indotti da stress.

Temperature subottimali

Nella pianta, come in altri organismi, sono state identificate proteine sintetizzate in grande quantità quando la pianta è posta in situazioni ambientali al limite della sopravvivenza. Alcune di queste proteine, dette «da shock» (heat e cold), si dimostrano apparentemente collegate a processi di protezione di alcune componenti cellulari per cui la pianta, se stimolata a sintetizzarle attraverso un graduale aumento o riduzione della temperatura, diviene capace di sopportare, almeno transitoriamente, le temperature non ottimali (Bray *et al.*, 2000).

Altre indagini hanno permesso di identificare diversi fattori di trascrizione che controllano l'espressione di proteine heat shock (HSFs) (Czarnecka-Verner *et al.*, 2000) e attivatori trascrizionali CBF/DRER che sostengono l'espressione di geni COR (cold-regulated; Thomashow, 1999). Per esempio, per quest'ultima classe di attivatori, il gene *CBF1* è stato modificato *in vitro* per assicurare una sovrappresione costante del fattore di trascrizione stesso e conseguentemente di tutti i geni provvisti della sequenza regolativa da esso riconosciuta. Piante transgeniche di *Arabidopsis* così ottenute si sono dimostrate, più tolleranti alle basse temperature, in assenza di acclimatazione, rispetto a piante normali. In particolare, le membrane delle cellule delle foglie di piante transgeniche, dopo congelamento e scongelamento, appaiono in grado di regolare il flusso di ioni altrettanto bene delle piante precedentemente acclimate al freddo (Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998). È stato inoltre osservato che le basse temperature favoriscono l'attivazione di vie biosintetiche dei fenilpropanoidi e antociani; tuttavia ulteriori ricerche sono necessarie per chiarire queste relazioni (Christie *et al.*, 1994).

Stress idrico

La maggior parte degli stress ambientali, ad eccezione della sommersione, produce nelle cellule perdita di acqua con conseguente disidratazione; ciò influisce pesantemente sulla crescita delle piante e sulle rese produttive delle colture. Il livello del danno subito dalla pianta dipende dall'ampiezza dello stress idrico, dallo stadio di crescita della pianta stessa e dal genotipo. I tentativi di selezione per un adattamento ambientale hanno sempre riscosso un ruolo rilevante nel miglioramento genetico delle piante; essi hanno, tuttavia, fornito risultati limitati perché i meccanismi di adattamento ai fattori di stress sono tuttora largamente sconosciuti.

La descrizione di azioni geniche differenziali in situazioni di stress contrastanti tra specie resistenti e sensibili a carenze idriche appare una strategia utile per comprendere le basi molecolari e biochimiche dei meccanismi di tolleranza ai fattori di stress (Bray *et al.*, 2000). In particolare, questi studi hanno mostrato che alcuni geni espressi durante lo stress idrico promuovono la tolleranza alla disidratazione, attivando meccanismi protettivi nel citoplasma che comprendono alterazione del potenziale idrico delle cellule, controllo dell'accumulo di ioni e ulteriore regolazione di geni associati. In quest'ambito sono stati identificati e isolati geni che specificano proteine strettamente correlate ai processi di disidratazione cellulare, quali ad esempio deidrine e acquaporine. Si ipotizza che le deidrine fungano da agenti stabilizzatori delle membrane cellulari e agiscano come elementi di protezione della funzionalità di altre proteine (Close, 1996). Le acquaporine appaiono attive nel favorire il trasporto di acqua e ioni attraverso le membrane cellulari permettendo di regolare l'equilibrio del potenziale osmotico della cellula (Chaumont *et al.*, 2001).

Benché sia evidente che oggi si incontrano notevoli difficoltà operative per disegnare strategie molecolari al fine di costituire piante più tolleranti a stress idrici, è comunque possibile, utilizzando metodi di genetica molecolare e piante transgeniche, proporre soluzioni che modifichino la risposta allo stress idrico (riassunto in Holmberg e Bülow, 1998). In quest'ambito, una favorevole strategia impiegata dalle piante per fronteggiare gli stress ambientali, riguarda i meccanismi di adattamento a stress idrico prodotto da sostanze derivate dal metabolismo osmoprotettivo (per esempio, amino acidi, zuccheri o polialcoli). Il gene *betA* di *E.coli* ed il gene *codA* di *Arthrobacter globiformis*, introdotti nel corredo genetico di piante di tabacco, riso e patata, favoriscono la sintesi di glicina-betaina (Lilius *et al.*, 1996) ed un potenziamento della tolleranza a diverse avversità ambientali quali elevata concentrazione di sale, siccità e freddo (Hayashi *et al.*, 1997; Sakamoto e Murata, 1998; Huang *et al.*, 2000). Analogamente la sovraespressione degli enzimi Δ '-pirollina-5-carbossilato sintetasi e mannitolo-1-fosfato deidrogenasi, rispettivamente in piante transgeniche di tabacco e *Arabidopsis* dotate del gene *p5cs* di *Vigna aconitifolia* e del gene batterico *mld*, favorisce rispettivamente la sintesi di prolina e di mannitolo associata ad un'elevata resistenza delle piante stesse ad alte concentrazioni di NaCl (Kav Kishor *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1995; Tarzynski e Bohnert, 1993). Nelle piante di tabacco si possono accumulare anche trealosio, e fruttani esprimendo il gene *TPS1* di lievito

(Holmström *et al.*, 1996), ed il gene *sacB* di *Bacillus subtilis* (Pilon-Smits *et al.*, 1995), che specificano enzimi correlati nella biosintesi degli zuccheri. L'accumulo degli zuccheri sopra citati migliora la ritenzione idrica dei tessuti vegetali e, pertanto, potenzia la tolleranza delle piante stesse alla siccità.

La flessibilità delle membrane cellulari, suscettibile di modificazione per via molecolare, è un'altra importante componente che conferisce un vantaggio dal punto di vista della tolleranza al deficit idrico indotto da freddo. Piante transgeniche di tabacco per il gene *Fad7* di *Arabidopsis* e il gene *Des9* di *Anacystis nidulans* che codificano, rispettivamente, per gli enzimi ω -3 desaturasi e Δ 9-desaturasi, sono più tolleranti al freddo (Kodana *et al.*, 1994; Ishizati-Nishizawa *et al.*, 1996).

L'introduzione del gene *HVA1* che specifica una proteina indotta da stress, del tipo 3LEA di orzo in piante di riso accresce la tolleranza allo stress osmotico (Hightower *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1996). La similarità strutturale delle proteine di tipo 3LEA con le proteine anticongelanti (AFPs), riscontrate in alcuni pesci che vivono a latitudine artiche, è stata utilizzata per costituire piante transgeniche di tabacco che esprimono questa proteina (Kenward *et al.*, 1993). Recenti indagini mostrano altresì che l'espressione di una specifica binding-protein (Bip) di mais in piante transgeniche potenzia la tolleranza alla siccità del tabacco (Alvim *et al.*, 2001). Altre strategie per controllare lo stress idrico delle cellule vegetali prevedono interventi sulle proteine G che mediano la regolazione dei flussi ionici delle cellule di guardia (Wang *et al.*, 2001), modificazioni dell'attività delle pompe protoniche (Gaxiola *et al.*, 2001) e delle proteine antiporto Na^+/K^+ presenti nelle membrane vacuolari (Zhang e Blumwald, 2001).

L'accumulo di cere è un altro aspetto variato dello stress idrico. Le superfici delle foglie e di altri organi aerei delle piante sono ricoperte da uno strato di materiale ceroso che conferisce alla pianta caratteristiche e proprietà particolari. Tra queste, una funzione sicuramente rilevante consiste nel mantenimento del bilancio idrico della pianta attraverso la riduzione della traspirazione cuticolare, contribuendo a prevenire l'essiccamento dei tessuti. I meccanismi che controllano la composizione delle cere sono ancora scarsamente conosciuti. Nel mais sono disponibili diverse mutazioni denominate *glossy* che alterano la sintesi di tali cere. Una intensa attività per isolare tali geni è in corso presso l'Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura di Bergamo. Recentemente, sono stati isolati i geni *Gl1* e *Gl2* che codificano per enzimi implicati nella sintesi delle cere (Velasco *et al.*, 2001).

STRESS OSSIDATIVI

Una diretta conseguenza di situazioni ambientali sfavorevoli è l'insorgenza a livello cellulare di stress ossidativi. È stato riscontrato che le condizioni ambientali avverse alterano il metabolismo cellulare, e in particolare i processi fotosintetici, causando la formazione di complessi reattivi e radicali liberi che danneggiano il funzionamento di componenti della cellula (Allen, 1995). Probabilmente, a livello

più generale per l'economia della pianta, la capacità della stessa di neutralizzare i radicali liberi rappresenta una caratteristica di primaria importanza di cui sono dotati i genotipi più resistenti. È interessante segnalare che sistemi enzimatici, quali superossidismutasi (SOD), ascorbato e guaiacolo-perossidasi e catalasi, e molecole antiossidanti, quali acido ascorbico, glutatione ridotto, α -tocoferoli, e carotenoidi (Bray *et al.*, 2000; Kocsy *et al.*, 2001), rappresentano meccanismi di protezione cellulare impiegati dalla pianta per ridurre i danni da stress ossidativi. Per esempio, piante di medica e cotone transgeniche per la sovrapproduzione di MnSOD sono state saggiate per la resistenza alle basse temperature; nelle prime la sovrapproduzione di MnSOD è associata a un rafforzamento della crescita dopo stress (McKersie *et al.*, 1993), mentre nelle seconde appare associata ad un incremento della tolleranza al freddo (Allen, 1995). Effetti positivi, inoltre, sono stati registrati in linee transgeniche di patata per la sovrapproduzione di Cu/ZnSOD nel citosol e nel cloroplasto a causa di una maggiore tolleranza al paraquat, usato come induttore di stress ossidativo (Perl *et al.*, 1993). Lo stesso fenomeno è stato osservato in tabacco transgenico per il gene MnSOD di *E. coli* (Foyer *et al.*, 1994). Infine, la resistenza a danni ossidativi causati da esposizione alla luce a basse temperature è stata registrata in tabacco transgenico per Cu/ZnSOD del cloroplasto.

Studi sull'effetto della sovrapproduzione di enzimi sono stati condotti utilizzando anche altri sistemi enzimatici antiossidanti (riassunto in Kocsy *et al.*, 2001). La sovrapproduzione di glutatione riduttasi in tabacco transgenico conferisce tolleranza ad alcuni ossidanti associata ad una superiore tolleranza da stress a bassa temperatura e da sale (Aono *et al.*, 1993; Roxas *et al.*, 1997). È difficile, tuttavia, correlare i livelli di H_2O_2 nella cellula con la tolleranza o resistenza ad alcuni fattori di stress. Tale difficoltà è dovuta al fatto che H_2O_2 ha anche funzioni di difesa da stress biotici partecipando all'attivazione delle barriere strutturali contro i patogeni invasori o alla risposta ai patogeni stessi. H_2O_2 , inoltre, potrebbe funzionare come segnale per stress abiotici: in mais, l'adattamento al freddo è ottenuto non solo mediante hardening, ma anche tramite pretrattamento con H_2O_2 (Prasad *et al.*, 1994).

CONCLUSIONI

Le informazioni qui riportate indicano che le strategie genetiche innovative per il miglioramento della tolleranza delle piante a diverse condizioni ambientali sfavorevoli forniscono una tecnologia già in grado di apportare, in alcuni casi, un significativo contributo alla produzione agricola riducendo i danni provocati dalla avversità ambientali. Progressi più veloci sono altresì attesi, nel momento in cui saranno maggiormente compresi i meccanismi di base che permettono alle piante di adattarsi e tollerare determinati stress. La scoperta di specifiche sostanze e la comprensione delle funzioni dei geni ad esse correlate sono pertanto i presupposti per modificare in maniera programmata e con precisione non possibile in precedenza, il patrimonio genetico delle piante per lo sviluppo di varietà molto produttive, dotate di una elevata resistenza ai fattori di stress.

BIBLIOGRAFIA

- Alexander D., Goodman R.M., Gut-Rella M., Glascock C., Weymann K., Friedrich L., Maddox D., Ahl-Goy P., Luntz T., *et al.* (1993). Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *90*, 7327-7331.
- Allen R.D. (1995). Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol.*, *107*, 1049-1054.
- Alvim C.F., Carolino S.M.B., Cascardo J.C.M., Nunes C.C., Martinez C.A., Otoni W.C. & Fontes E.P.B. (2001). Enhanced accumulation of Bip in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiol.*, *126*, 1042-1054.
- Anzai H., Yoneyama K. & Yamaguchi I. (1989). Transgenic tobacco resistant to a bacterial disease by detoxification of a pathogenic toxin. *Mol. Gene. Genet.*, *219*, 492-494.
- Aono M., Kubo A., Saji H., Tanaka K. & Kondo N. (1993). Enhanced tolerance to photooxidative stress of transgenic *Nicotiana tabacum* with chloroplastic glutathione reductase activity. *Plant Cell Physiol.*, *34*, 129-135.
- Boyes D.C., McDowell J.M. & Dangl J.L. (1996). Plant pathology: Many roads lead to resistance. *Current Biology*, *6*, 634-637.
- Bray E.A., Bailey-Serres J. & Weretilnyk E. (2000). Responses to abiotic stresses. In: B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones (Eds.), *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists.
- Chaumont F., Barrieu F., Wojcik E., Chrispeels M.J. & Jung R. (2001). Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol.*, *125*, 1206-1215.
- Christie P.J., Alfinito M.R. & Walbot V. (1994). Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta*, *194*, 541-549.
- Close T.J. (1996). Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol. Plant.*, *97*, 795-803.
- Czarnecka-Verner E., Pan S., Yuan C.X. & Gurley W.B. (2000). Functional specialization of plant class A and B HSFs. 3-28. In: J.H. Cherry *et al.* (Eds.), *Plant Tolerance to Abiotic Stresses in Agriculture: Role of Genetic Engineering*. Kluwer Academic Publishers, Printed in the Netherlands.
- De Maagd R.A., Bosch D. & Stiekema W. (1999). *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends Plant Sci.*, *4*, 9-13.
- Dekker J. & Duke S.O. (1995). Herbicide-resistant field crops. *Ad. Agr.*, *54*, 69-116.
- Duan X., Li X., Xue Q., Abo-El-Saad M., Xu D. & Wu R. (1996). Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Bio/Technology*, *14*, 494-498.
- Düring K., Porsch P., Fladung M. & Lörz H. (1993). Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. *Plant J.*, *3*, 587-598.
- Estruch J.J., Carozzi N.B., Desai N., Duck N.B., Warren G.W. & Koziel M.G. (1997). Transgenic plants: an emerging approach to pest control. *Nature Biotech.*, *15*, 137-141.
- Eulgem T., Rushton P.J., Robatzek S. & Somssich I.E. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.*, *5*, 199-206.
- Foyer C.H., Descourvières P. & Kunert K.J. (1994). Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.*, *17*, 507-523.
- Gao A.G., Hakimi S.M., Mittanck C.A., Wu Y., Woerner B.M., Stark D.M., Shah D.M., Liang J. & Rommens C.M.T. (2000). Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nature Biotech.*, *18*, 1307-1310.

- Gatehouse A.M.R., Down R.E., Powell K.S., Sauvion N., Rahbe Y. & Newell C.A. (1996). Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *Entomol. Experim. Appl.*, 79, 295-307.
- Gaxiola R.A., Li J., Undurraga S., Dang L.M., Allen G.J., Alper S.L. & Fink G.R. (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 11444-11449.
- Gutierrez-Campos R., Torres-Acosta J.A., Saucedo-Arias L.J. & Gomez-Lim M.A. (1999). The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. *Nature Biotech.*, 17, 1223-1227.
- Hammond-Kosack K. & Jones D.G. (2000). Responses to plant pathogens. In: B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones (Eds.), *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists.
- Hayashi H. *et al.* (1997). Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase: accumulation of glycine-betaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant J.*, 12, 133-142.
- Hightower R. *et al.* (1991). Expression of antifreeze proteins in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.*, 17, 1013-1021.
- Holmberg N. & Bülow L. (1998). Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Trends Plant Sci.*, 3, 61-66.
- Holmström K.O. *et al.* (1996). Drought tolerance in tobacco. *Science*, 379, 683-684.
- Huang J., Hirji R., Adam L., Rozwadowski K.L., Hammerlindl J.K., Keller W.A. & Selvaraj G. (2000). Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant Physiol.*, 122, 747-756.
- Irie K., Hosoyama H., Takeuchi T., Iwabuchi K., Watanabe H., Abe M., Abe K. & Arai S. (1996). Transgenic rice established to express cor cystatin exhibits strong inhibitory activity against insect gut proteinases. *Plant Mol. Biol.*, 30, 149-157.
- Ishimoto M., Sato T., Chrispeels M.J. & Kitamura K. (1996). Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed alpha-amylase inhibitor of common bean. *Entomol. Experim. Appl.*, 79, 309-315.
- Ishizaki-Nishizawa O. *et al.* (1996). Low-temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase. *Nat. Biotechnol.*, 14, 1003-1006.
- Jaglo-Ottosen K.R., Gilmour S.J., Zarka D.G., Schabenberger O. & Thomashow M.F. (1998). *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science*, 280, 104-106.
- Kavanagh T.A. & Spillane C. (1995). Strategies for engineering virus resistance in transgenic plants. *Euphytica*, 85, 149-158.
- Kavi Khishor P.B. *et al.* (1995). Overexpression of Δ^1 -pyrroline 5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.*, 108, 1387-1394.
- Kenward K.D. *et al.* (1993). Accumulation of type 1 fish antifreeze protein in transgenic tobacco cold specific. *Plant Mol. Biol.*, 23, 377-385.
- Klessig D.F., Durner J., Noad R., Navarre D.A., Wendehenne D., Kumar D., Zhou J.M., Shah J., Zhang S., Kachroo P., Trifa Y., Pontier D., Lam E. & Silva H. (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 8849-8855.
- Kocsy G., Galiba G. & Brunold C. (2001). Role of glutathione in adaptation and signalling during chilling and cold acclimation in plants. *Physiol. Plant.*, 113, 158-164.
- Kodama H. *et al.* (1994). Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast ω -3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco. *Plant Physiol.*, 105, 601-605.
- Kramer K.J., Morgan T.D., Throne J.E., Dowell F.E., Bailey M. & Howard J.A. (2000). Transgenic avidin maize is resistant to storage insect pests. *Nature Biotech.*, 18, 670-674.

- Lapidot M., Gafny R., Ding B., Lucas W.J. & Beachy R.N., (1993). A dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants. *Plant J.*, 4, 959-970.
- Lilius G., Holmberg N. & Bülow L. (1996). Enhanced NaCl stress tolerance in transgenic tobacco expressing bacterial choline dehydrogenase. *Biotechnology*, 14, 177-180.
- Liu D., Raghothama K.G., Hasegawa P.M. & Bressan R.A. (1994). Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1888-1892.
- Maddaloni M., Forlani F., Balmas V., Donini G., Stasse L., Corazza L. & Motto M. (1997). Tolerance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* AG4 of transgenic tobacco expressing the maize ribosome inactivating protein b-32. *Trans. Res.*, 6, 1-10.
- Maddaloni M., Barbieri L., Lohmer S., Salamini F. & Thompson R. (1991). Characterization of an endosperm-specific developmentally regulated protein synthesis inhibitor from maize seeds. *J. Genet. & Breed.*, 45, 377-380.
- Martin G.B., Brommomschenkel S.H., Chunwongse J., Frary A., Ganai M.W., Spivey R., Wu T., Earle E.D. & Tanksley S.D. (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, 262, 1432-1436.
- Masoero F., Moschini M., Rossi F., Prandini A. & Pietri A. (1999). Nutritive value, mycotoxin contamination and *in vitro* rumen fermentation of normal and genetically modified corn (CRY1A(B)) grown in northern Italy. *Maydica*, 44, 205-209.
- Mckersie B.D., Chen Y., Debeus M., Bowley S.R., Bowler C., Inzé D., D'Hallunin K. & Bottrman J. (1993). Superoxidase dismutase enhance tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant Physiol.*, 103, 1155-1163.
- Müllner H., Donn G. & Rasche E. (1997). Herbirdverträgliche Kulturpflanzen, ihre Bedeutung für Landwirtschaft und Umwelt. In: P. Brandt (Ed.), *Zukunft der Gentechnik*. Birkhäuser Verlag, Berlin.
- Murata N. *et al.* (1982). Composition and positional distribution of fatty acids in phospholipids from leaves of chilling sensitive and chilling resistant plants. *Plant Cell Physiol.*, 23, 1071-1079.
- Norelli J.L., Aldwinckle H.S., Destefano-Beltran L. & Jaynes J.M. (1994). Transgenic «Malling 26» apple expressing the attacin E gene has increased resistance to *Erwinia amylovora*. *Euphytica*, 77, 123-128.
- Perl A., Perl Trevers R., Galili S., Aviv D., Shalgi E., Malkin S. & Galun E. (1993). Enhanced oxidative-stress defence in transgenic potato expressing tomato Cu/Zn superoxide dismutases. *Theor. Appl. Genet.*, 85, 568-576.
- Pilon-Smits E.A.H. *et al.* (1995). Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol.*, 107, 125-130.
- Prasad T.K., Anderson M.D., Martin B.A. & Stewart C.R. (1994). Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedling and a regulatory role for hydrogen-peroxide. *Plant Cell*, 6, 65-74.
- Purcell J.P., Greenplate J.T., Jennings M.G., *et al.* (1993). Cholesterol oxidase: a potent insecticidal protein active against Boll weevil larvae. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 196, 1406-1413.
- Roxas V.P., Smith Jr. R.K., Allen E.R. & Allen R.D. (1997). Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nature Biotech.*, 15, 988-991.
- Sakamoto A., Murata A. & Murata N. (1998). Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold. *Plant Mol. Biol.*, 38, 1011-1019.
- Schroeder H.E., Gollasch S., Moore A., Tabe L.M., Craig D. & Higgins T.J.V. (1995). Bean alpha-amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil (*Bruchus pisorum*) in transgenic peas (*Pisum sativum*). *Plant Physiol.*, 107, 1233-1239.
- Schuler T.H., Poppy G.M., Kerry B.R. & Denholm I. (1998). Insect-resistant transgenic plants. *Trends Biotech.*, 16, 168-174.

- Seki M., Narusaka M., Abe H., Kasuga M., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Hayashizaki Y. & Shinozaki K. (2001). Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell*, 13, 61-72.
- Shah D.M., Rommens C.M.T. & Beachy R.N. (1995). Resistance to diseases and insects in transgenic plants: progress and applications to agriculture. *Trends Biotech.*, 13, 362-368.
- Tacke E., Salamini F. & Rohde W. (1996). Genetic engineering of potato for broad-spectrum protection against virus infection. *Nature Biotech.*, 14, 375-379.
- Tarczynski M. & Bonhert H. (1993). Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science*, 259, 508-510.
- Terras F.R.G., Eggermont K., Kovaleva V., et al. (1995). Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell*, 7, 573-588.
- Thomas J.C. et al. (1995). Enhancement of seed germination in high salinity by engineering mannitol expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.*, 18, 801-806.
- Thomas J.C., Adams D.G., Keppenne V.D., Wasmann C.C., Brown J.K., Kanost M.R. & Bohnert H.J. (1995). Protease inhibitors of *Manduca sexta* expressed in transgenic cotton. *Plant Cell Reports*, 14, 758-762.
- Thomashow M.F. (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 571-599.
- Velasco R., Korfhage C., Salamini A., Tacke E., Smithz J., Motto M., Salamini F. & Doring H.P. (2001). Expression of the *glossy-2* gene of maize during lant development. *Plant J.* (submitted).
- Velten J. & Oliver M.J. (200). Tr288, A rehydrin with a dehydrin twist. *Plant Mol. Biol.*, 45, 713-722.
- Verderio A., Bressan M., Bertolini M., Pino S., Mazzinelli G. & Sartori G. (1998). Risultati delle varietà transgeniche di mais resistenti a piralide o tolleranti a glufosinate-ammonio. *L'Informatore Agrario*, 54 (12), 61-70.
- Wang X.Q., Ullah H., Jones A.M. & Assmann S.M. (2001). G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in Arabidopsis guard cells. *Science*, 292, 2070-2072.
- Whitham S., McCormic S. & Baker B. (1996). The N gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 8776-8781.
- Willekens H., Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langebartels C., Van Montagu M., Inzè D. & Camp W.V., (1997). Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *EMBO J.*, 16, 4806-4816.
- Wu G., Shortt B.J., Lawrence E.B., Levine E.B., Fitzsimmons K.C. & Shah D.M. (1995). Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂ generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell*, 7, 1357-1368.
- Wu G., Shortt B.J., Lawrence E.B., Leon J., Fitzsimmons K.C., Levine E.B., Raskin I. & Shah D.M. (1997). Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants. *Plant Physiol.*, 115, 427-435.
- Xiong L. & Zhu J.K. (2001). Abiotic stress signal transduction in plants: molecular and genetic perspectives. *Physiol. Plant.*, 112, 152-166.
- Xu D. et al. (1996). Expression of a late embryogenesis abundant protein gene. *HVA 1*, from barley confers tolerance to water deficits and salt stress rice. *Plant Physiol.*, 110, 249-257.
- Xu D., Duan X., Wang B., Hong B., Ho T.H.D. & Wu. R. (1996). Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol.*, 110, 249-257.
- Yang Y., Shah J. & Klessig D.F. (1997). Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes & Devel.*, 11, 1621-1639.
- Zhang H.X. & Blumwald E. (2001). Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotech.*, 19, 765-768.