



AISSA

**Associazione Italiana
Società Scientifiche Agrarie**



FACOLTA' DI AGRARIA

**Università degli Studi di
Modena e Reggio Emilia**

Atti del

**3° Convegno
AISSA**

**IL PIANETA ACQUA
NEL CONTINENTE
AGRICOLTURA**

Reggio Emilia, 6-7 Dicembre 2005

ISOLAMENTO ED ESPRESSIONE GENETICA DI ACQUAPORINE IN FAGIOLO DURANTE STRESS DA FREDDO

Ferrante Antonio¹, Aroca Ricardo², Vernieri Paolo³, Pardossi Alberto³

¹Dipartimento di Produzione Vegetale, Università di Milano, e-mail: antonio.ferrante@unimi.it.

²Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada, Spain.

³Dipartimento Biologia delle Piante Agrarie, Università di Pisa.

Introduzione

Le aquaporine sono proteine di membrana che appartengono alle *Major Intrinsic Protein* (MIP), tra le principali ricordiamo le *Plasma membrane Intrinsic Protein* (PIP) e le *Tonoplast Intrinsic Protein* (TIP). Le aquaporine sono proteine caratterizzate dalla presenza di una sequenza di tre amminoacidi NPA (Asn-Pro-Ala) che formano il canale attraverso cui passano le molecole di acqua (Park e Saier, 1996). È da sottolineare che questi canali sono trasportatori passivi, dove l'acqua si muove seguendo il gradiente di potenziale idrico interno alla pianta. Le proteine che costituiscono le aquaporine hanno un peso molecolare fra i 26 e 34 kDa. Dopo la scoperta di una TIP in *Arabidopsis* che aveva la funzione di aquaporina sono stati isolati diversi altri geni che codificano per i canali dell'acqua nei vegetali. Lo studio della loro funzionalità ha permesso di capire meglio l'interazione acqua pianta e le scoperte effettuate hanno permesso di rivedere le relazioni idriche nelle piante (Kjellbom *et al.* 1999; Maurel e Chrispeels 2001). Tuttavia, poche sono le informazioni disponibili sul ruolo di queste proteine durante lo stress da freddo, probabilmente l'attivazione del promotore di questa aquaporina potrebbe essere regolata dall'acido abscissico (Kaldenhoff *et al.*, 1996).

Materiale e metodi

Le piantine di fagiolo (*Phaseolus vulgaris* L.) sono state allevate in idroponica, dopo due settimane sono state sottoposte a stress termico (4°C). Per studiare il ruolo dei canali per l'acqua durante l'adattamento al freddo sono stati isolati, mediante primer degenerati, diversi frammenti di cDNA che codificano per le aquaporine. Il contenuto di ABA è stato misurato su circa 40-50 mg di foglia (mediante immunoassay) quando le piante erano sottoposte a stress da freddo (Vernieri *et al.*, 1991). La conduttanza stomatica è stata determinata con un misuratore di scambi gassosi (CMS 400, Heinz Walz, Effeltrich, Germania).

Risultati

Il fagiolo sottoposto a trattamento di stress termico causato da basse temperature (4°C) ha subito una perdita di acqua e ha mostrato sintomi di appassimento durante le prime 24 ore, per poi recuperare dopo 48 ore. Questo recupero è associato ad una riduzione della conduttanza stomatica e ad un contemporaneo aumento di ABA a livello fogliare. Durante le prime ore di stress termico la biosintesi dell'ABA è risultata essere rallentata (prime 20-30 ore), dopodiché si è assistito a un adattamento fisiologico alle condizioni ambientali avverse e le piante hanno risposto con aumento dell'ABA endogeno. Mediante RT-PCR usando primer degenerati sono stati isolati cDNA che codificano per le aquaporine. Il confronto con le sequenze di aquaporine già isolate e disponibili nelle banche dati (GenBank) ha evidenziato una elevata omologia con le Pip1 e Pip2 di *Arabidopsis*. Questi frammenti di cDNA sono stati utilizzati come sonda per effettuare un'analisi preliminare di espressione genica. I risultati ottenuti evidenziano che i trascritti della Pip1 e Pip2 sono aumentati dopo 24 ore nelle radici di fagiolo sottoposto a stress da freddo. L'aumento dell'espressione genica coincide con l'incremento dell'ABA endogeno. Pertanto, l'ABA potrebbe aver attivato l'espressione dell'aquaporine a livello radicale e recuperare lo stato idrico della pianta.

In conclusione, i risultati mostrano che la ripresa dello stato idrico è dipendente dal miglior flusso dell'acqua all'interno della pianta, che è correlato con l'aumento dell'espressione genica delle acquaporine, ma anche dal controllo stomatico, che si "riattiva" in seguito (o contemporaneamente) alla sintesi di ABA (dopo 30-40 ore di freddo).

Bibliografia

- Kaldenhoff R., Kolling A., Richter G., (1996) Regulation of the *Arabidopsis thaliana* aquaporin gene AtH2 (PIP1b), J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 36, 351-354.
- Kjellbom P., Larsson C., Johansson I., Karlsson M. & Johanson U. (1999) Aquaporins and water homeostasis in pianta. Trends in Plant Science 4,308-314.
- Maurel, C. e Chrispeels, M.J. (2001). Aquaporins: A molecular entry into plant water relations. Plant Physiol. 125, 135-138.
- Park J.H., Saier Jr M.H., (1996) Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins, J. Membr. Biol. 53 (3)
- Pardossi A., Vernieri P., Tognoni F. (1992). Involvement of abscisic acid in regulating water status in *Phaseolus vulgaris* L. during chilling. Plant Physiology, 100: 1243-1250.
- Vernieri P., Pardossi A., Tognoni F. 1991. Influence of chilling and drought on water relations and abscisic acid accumulation in bean. Australian Journal of Plant Physiology, 18: 25-35.

Tabella 1. Contenuto di ABA e conduttanza stomatica di fagiolo sottoposto a stress termico per 48 ore. I valori sono medie, i dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza. Lettere significa che le medie sono statisticamente diverse per $P \leq 0,05$.

Trattamento termico (h)	ABA fogliare (ng g ⁻¹ DW)	Conduttanza stomatica (mmol m ⁻¹ sec ⁻¹)
0	1.8 a	0.28 a
24	2.1 a	0.16 b
36	8.2 b	0.09 c
48	9.5 c	0.04 d

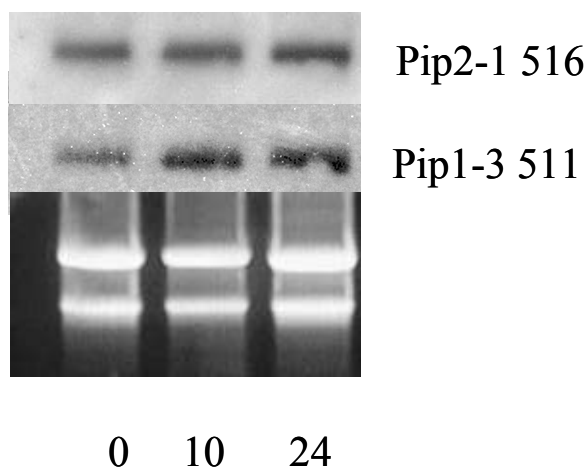


Figura 1. Espressione genica di una Pip2-1 e Pip1-3 nella radice di fagiolo sottoposta a stress termico (4°C) per 10 e 24 ore. In basso è riportato l'rRNA per conformare l'uniformità di caricamento. Per ogni campioni sono stati caricati 10 µg di RNA totale.