

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITA' DI BOLOGNA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

Corso di laurea specialistica in
SCIENZE PER L'AMBIENTE E IL TERRITORIO

Tesi di laurea in BIOLOGIA VEGETALE

**RISPOSTE MORFOFUNZIONALI ALLO
STRESS SALINO IN ACCESSIONI
CILENE DI QUINOA
(*Chenopodium quinoa* Willd)**

Relatore

Prof.ssa Rossella Pistocchi

Presentata da

Mattia Accorsi

Correlatori

Prof.ssa Stefania Biondi

Dott. Francesco Orsini

(II sessione)

Anno Accademico 2009/2010

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Il problema della salinità	1
1.2 L'agricoltura e la salinità	2
1.3 Stress salino nelle piante: aspetti morfo-funzionali	3
1.3.1 Tolleranza agli stress osmotici	4
1.3.2 I meccanismi d'esclusione	9
1.3.3 Detossificazione all'accumulo di sale	11
1.4 La quinoa	12
1.4.1 La quinoa: un'aloftita facoltativa	14
1.4.2 Caratteristiche nutrizionali	14
1.4.3 Proprietà nutraceutiche della quinoa	17
1.4.4 Adattamenti climatici e risposta agli stress abiotici	18
1.4.5 Storia e ruolo nella cultura andina	19
1.5 Le ghiandole del sale	20
1.6 Le saponine	23
2. SCOPO DELLA TESI	24
3. MATERIALI E METODI	25
3.1. Materiale vegetale	25
3.2. Primo esperimento – BO78 in sabbia	25
3.2.1. Condizioni di crescita	26
3.2.2 Trattamenti con NaCl	26
3.2.3 Misure morfologiche	28
➤ Altezza e tasso di crescita	28
➤ Peso fresco e secco	29
➤ Area fogliare	29
➤ Dimensione e densità stomatica	29
➤ Densità delle ghiandole del sale	30
3.2.4 Determinazioni biochimiche	30
➤ Contenuto di prolina	30
3.2.5 Analisi del contenuto di cationi ed anioni	31

➤ Raccolta e preparazione dei campioni	31
➤ Separazione ioni esterni	32
➤ Separazione ioni interni	32
➤ Elettroforesi capillare	32
➤ Preparazione dei carrier	35
3.3 Secondo esperimento – confronto tra accessioni diverse di quinoa	36
3.3.1 Condizioni di crescita	36
3.3.2 Trattamenti con NaCl	36
3.3.3 Misure morfologiche	38
➤ Analisi della crescita	38
➤ Peso fresco e secco	38
➤ Misura dell'area e densità stomatica	38
➤ Misura della densità delle ghiandole del sale	38
➤ Misura dell'area fogliare	38
3.3.4 Determinazioni biochimiche	39
➤ Contenuto di prolina	39
3.4 Analisi statistica	39
4. RISULTATI	40
Parte prima – accessione BO78	40
1. Analisi della crescita in altezza	40
➤ Velocità di crescita	42
2. Peso fresco e peso secco	44
➤ Rapporto biomassa radici/germoglio	47
3. Stomi	49
➤ Densità stomatica	50
➤ Area stomatica	51
4. Contenuto di cationi ed anioni	53
➤ Concentrazione degli ioni interni ed esterni alla foglia in funzione del trattamento salino	53
➤ Composizione ionica delle frazioni esterne ed interne della foglia in funzione della concentrazione salina	58
➤ Ripartizione dei principali ioni nella pianta in funzione del trattamento salino	59

➤ Neutralizzazione	64
5. Prolina	67
Parte seconda – confronto fra le accessioni	70
1. Crescita in altezza	70
➤ Tasso di crescita	71
2. Peso fresco e secco	73
➤ Pianta intera	73
➤ Singoli organi	76
➤ Rapporto peso secco/peso fresco	79
3. Area fogliare	79
➤ Variazione dell'area fogliare	81
➤ Variazione cromatica della superficie fogliare	83
4. Stomi	85
➤ Densità stomatica	90
➤ Area stomatica	92
5. Ghiandole del sale	95
➤ Densità delle ghiandole del sale	96
6. Prolina	101
5. CONCLUSIONI	104
6. BIBLIOGRAFIA	109

1. INTRODUZIONE

1.1 IL PROBLEMA DELLA SALINITA'

La salinità è una costante problematica che affligge i raccolti agricoli, essendo uno degli stress abiotici più critici nell'influenzare la resa e la qualità dei prodotti destinati all'alimentazione umana e animale. La salinizzazione dei suoli è un fenomeno naturale che si verifica in aree del mondo in cui l'evaporazione supera le precipitazioni.

In base a stime recenti, il costo della salinità sull'agricoltura è di circa 12 miliardi di dollari americani l'anno. Per tentare di risolvere la situazione, gli scienziati stanno affrontando sotto diversi aspetti la salinizzazione del suolo e le problematiche vegetali correlate. Alcuni tipi di piante hanno sviluppato sistemi biologici per resistere ai diversi stress ambientali compreso quello salino, infatti mentre molte piante coltivate non resistono neanche a basse concentrazioni saline, altre si possono trovare in terreni con sale a concentrazioni prossime a quelle dell'acqua di mare ($50-70 \text{ mS cm}^{-1}$ o 500 mM NaCl).

Molti sforzi negli ultimi decenni sono stati dedicati alla comprensione della biologia fondamentale della tolleranza di queste piante agli ambienti salini con l'obiettivo ultimo di identificare uno o più meccanismi di risposta allo stress abiotico che possano essere trasferiti attraverso il miglioramento genetico classico o le tecnologie transgeniche alle specie vegetali d'interesse per l'Uomo.

Anche se gran parte delle e attuali conoscenze sulle risposte delle piante alla salinità è stata ottenuta attraverso una caratterizzazione approfondita delle basi molecolari dell'adattamento allo stress di piante modello come *Arabidopsis thaliana*, il trasferimento delle conoscenze acquisite dal piano teorico a quello pratico per migliorare la tolleranza alla salinità delle specie vegetali d'interesse è stata finora insufficiente. Una spiegazione può essere la mancanza di una completa corrispondenza tra i meccanismi di tolleranza in piante modello e quelli che si trovano nelle specie coltivate. Inoltre lo studio della fisiologia fondamentale della tolleranza al sale condotta utilizzando soltanto sistemi modello ha rivelato diverse sfaccettature all'interno di uno scenario complesso, che non è sempre controllato dai soli componenti genetici.

1.2 L'AGRICOLTURA E LA SALINITÀ

Oggigiorno circa un terzo delle terre emerse del mondo sono da considerarsi aride o semiaride, e ciò fa della siccità uno dei principali vincoli a livello mondiale per l'agricoltura (Flowers et al., 1986).

La gravità del problema è in aumento, forse anche a causa del riscaldamento climatico. Ciò ha già portato a episodi di grave siccità di durata insolitamente lunga nel nord del Kenya, Etiopia, Afghanistan, e parti del Pakistan e India.

Anche in Europa e in Italia la situazione è in fase d'allarme: l'elevato consumo idrico dettato dall'agricoltura sta accentuando il fenomeno del cuneo salino, specialmente in regioni pianeggianti come l'Emilia Romagna. Il problema è legato alla dinamica degli acquiferi: fino a qualche tempo fa le acque dolci, provenienti per infiltrazione dall'entroterra, si stratificavano sopra a quelle salate, più dense, provenienti dal mare. La mancanza di piogge nell'entroterra, l'aumento del livello dei mari e la depressione della falda causata da eccessivo prelievo, specie in zone meta di turismo di massa, stanno modificando questo equilibrio, riducendo la quantità di acque dolci disponibili. In pratica, significa che dai pozzi costieri invece che acqua dolce si sta cominciando a prelevare, anche per l'irrigazione, acqua salata stressando le piantagioni e facendo diminuire di conseguenza la produttività delle coltivazioni limitrofe.

Per questo progetto internazionale è stata scelta la quinoa, pianta originaria delle Ande, poiché considerata una delle poche specie naturalmente adattate alle condizioni estreme, geografiche e climatiche, dell'altopiano andino. La quinoa può crescere anche a livello del mare, vicino alle coste, in presenza di un'elevata salinità e di scarse precipitazioni. Inoltre, la quinoa è caratterizzata da un'alta biodiversità derivante dall'essersi sviluppata in un sub-continente tanto eterogeneo. Questa regione del mondo è, infatti, ideale per la massima diversificazione possibile di una specie vegetale, giacché è caratterizzata da zone costiere, dove, affiancati ai terreni salini si trovano altopiani pietrosi che superano i 3000 metri, nonché aree subpolari, temperate, tropicali ed equatoriali. Al contempo, anche il Cile è soggetto a una crescente desertificazione, come evidenziato dal notevole calo della precipitazione annua a La Serena nel corso di un secolo (Fig. 1).

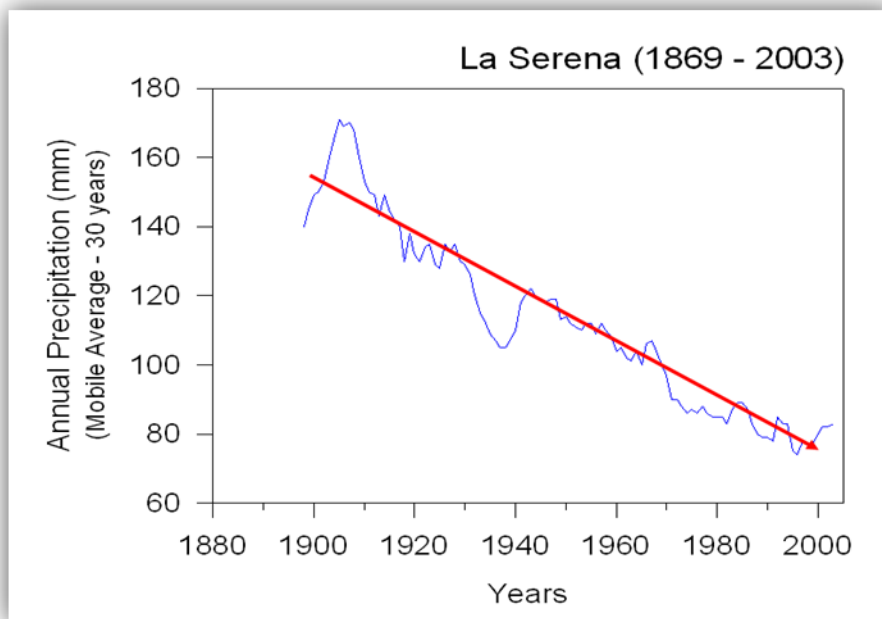


Figura 1: Stato delle precipitazioni a La Serena (Cile) nella fine del secolo scorso.

1.3 STRESS SALINO NELLE PIANTE: ASPETTI MORFO-FUNZIONALI

I meccanismi fisiologici, morfologici e molecolari attuati dalle piante in risposta allo stress salino, sono molto simili e ricorrenti.

Infatti, come riportato da Zhu (2001), i meccanismi di tolleranza al sale nelle alofite, sono sostanzialmente identici a quelli esistenti nelle glicofite, ma sottili differenze nella loro regolazione causano grandi variazioni nella tolleranza o sensibilità.

Un'alta concentrazione salina, determina un forte stress osmotico e ionico, sia a livello cellulare che sistemico.

Le piante rispondono allo stress salino in due fasi:

1. una fase rapida, osmotica, che inibisce la crescita dei germogli fogliari;
2. una fase lenta, ionica, che accelera la senescenza nelle foglie mature.

Le piante, per tollerare la presenza di sale, utilizzano diverse strategie tra di loro interconnesse (Zhu, 2001; Munns, 2008):

1. **tolleranza allo stress osmotico** (omeostasi);

2. **meccanismi d'esclusione dai tessuti** degli ioni Na^+ e Cl^- ;
3. **detossificazione** all'accumulo di Na^+ e Cl^- cellulare.

La variabilità genetica permette alle piante di rispondere diversamente all'aumento dello stress salino. Comunque, prolungate esposizioni, determinano inibizioni alla crescita e danni molecolari, che, a seconda della sensibilità al sale, porteranno irrimediabilmente a danni cellulari ed infine alla morte.

1.3.1 TOLLERANZA AGLI STRESS OSMOTICI

Il potenziale idrico è l'energia potenziale dell'acqua per unità di volume, rispetto ad acqua pura in condizioni di riferimento. Quantifica la tendenza dell'acqua di spostarsi da una zona all'altra, verso la matrice con il potenziale osmotico più negativo.

L'equazione del potenziale idrico afferma che il potenziale idrico totale (ψ_w) è dato dalla somma dei contributi del potenziale di pressione (ψ_p), del potenziale di soluto (ψ_s), del potenziale gravitazionale (ψ_g) e del potenziale di matrice (ψ_m).

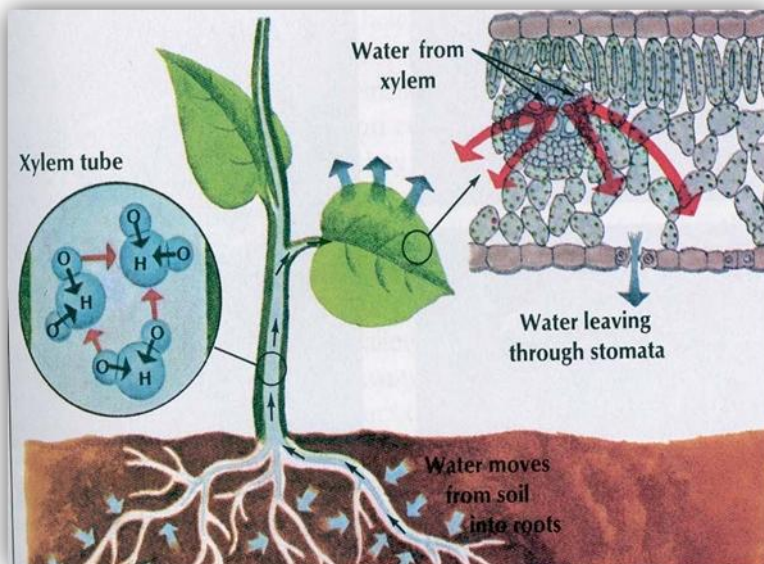


Figura 2: Immagine che rappresenta il continuum radice-foglia nel movimento dell'acqua.

Il **potenziale osmotico** o **potenziale di soluto** è generato dalla tensione osmotica, forza con cui un soluto lega l'acqua. L'acqua nel terreno non è mai allo stato puro, bensì è una soluzione in cui le molecole e gli ioni disciolti esercitano forze di attrazione elettrostatica sulle molecole d'acqua riducendone l'attività. La tensione osmotica è sempre negativa.

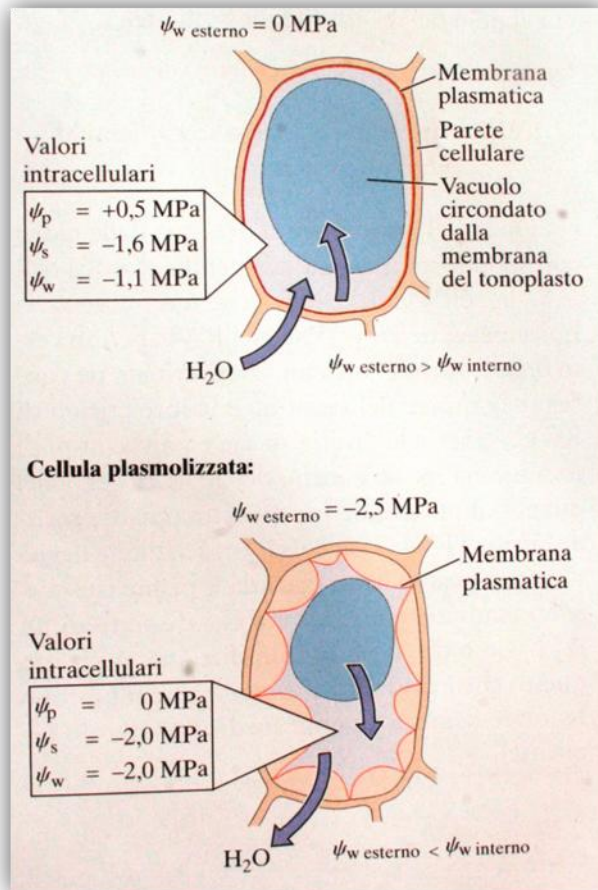


Figura 3: il movimento dell'acqua dentro e fuori dalla cellula dipende dal gradiente di potenziale idrico attraverso la membrana plasmatica. Il potenziale idrico esterno alla cellula deve essere maggiore di quello all'interno affinché l'acqua possa entrare.

In condizioni standard, il potenziale idrico che si forma nel *continuum radice – foglia*, richiama l'acqua dal suolo all'interno delle radici, poi attraverso i tessuti conduttori si muove verso le foglie dove fuoriesce sottoforma gassosa.

Lo stress osmotico indotto dal sale, agisce prontamente sulla pianta quando la concentrazione ionica all'esterno delle radici supera quella interna.

Lo stress osmotico può determinare veloci modifiche all'espansione dell'apice radicale, alla crescita e all'espansione di nuove foglie, all'apertura, all'area e alla densità stomatica, allo scambio gassoso negli stomi e all'attività fotosintetica

(Munns et al.,2008). Questi fattori sono interconnessi in relazioni di causa-effetto difficili da districare.

L'aumento della salinità nel terreno determina una un abbassamento del potenziale idrico che spingerà l'acqua fuori dalle radici verso il medium ipertonico.

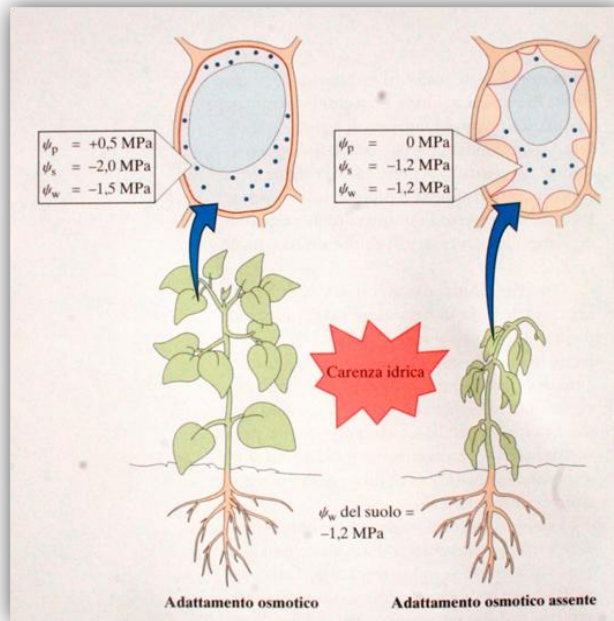


Figura 4: Nelle cellule che non sono in grado di adattarsi osmoticamente, viene perso il turgore.

La perdita di turgore che ne risulterà è provvisoria. Infatti la pianta può ripristinare il turgore aumentando la produzione di soluti osmoprotettori nell'apoplasto.

Gli osmoprotettori sono composti implicati nell'osmoregolazione durante gli stress salini (Chen et al., 2007). Questi soluti mitigano gli effetti del sale in molti modi. Quando gli ioni raggiungono alte concentrazioni, gli osmoprotettori possono controbilanciare lo sbilancio osmotico che viene a formarsi nello spazio intracellulare.

Alla concentrazione ionica presente nell'apoplasto si aggiunge il sale escluso dall'interno della cellula. Questo accumulo negli spazi intracellulari, crea a sua volta un potenziale osmotico attraverso la parete e la membrana cellulare.

I soluti compatibili, vengono così accumulati nel citoplasma in risposta all'alta concentrazione apoplastica, per prevenire la disidratazione cellulare (Yancey, 1994, Orcutt and Nilsen, 2000).

Oltre alla loro funzione di aggiustamento osmotico, molte solute compatibili, tra cui il mannitolo, il trialosio, la prolina e la glicinbetaina, hanno dimostrato di avere una funzione di eliminazione delle ROS (Reactive oxygen species) (Shen et al. 1997).

In alcune piante, la prolina, si accumula in presenza di suolo salino (Ashraf 2007). Inan et al. (2004) per esempio hanno scoperto che la prolina si accumula in grandi quantità (150 moli/ grammo di peso secco), per riequilibrare il bilancio osmotico. Quindi è stata identificata come il principale soluto compatibile responsabile nell'osmoprotezione, mentre altri metaboliti si accumulano in quantità troppo inferiori per avere un impatto tanto significativo

Regolazione dell'area fogliare

La regolazione dell'area fogliare, è una risposta importante per ridurre la superficie traspirante e quindi per mantenere il turgore nel mesofillo fogliare e impedire la risalita dalle radici di elevate concentrazioni ioniche.

I meccanismi che portano alla riduzione dell'espansione fogliare e della crescita della pianta sono diversi. La riduzione della crescita fogliare deve essere regolata da segnali a lunga distanza, che partono dalle radici, sotto forma di ormoni o loro precursori.

L'acido abscissico (ABA) gioca un ruolo centrale nella regolazione *root-shoot* e probabilmente anche nella modifica della crescita e conduttanza stomatica (Davies et al., 2005).

La ridotta crescita fogliare probabilmente è determinata dall'aumento di soluti citoplasmatici, che vengono accumulati per mantenere un equilibrio osmotico in un ambiente ipersalino.

Una ridotta risposta allo stress osmotico, potrebbe determinare una maggiore espansione fogliare e conduttanza stomatica. Però questo risulterebbe benefico solo nelle piante con sufficiente disponibilità idrica, come nelle colture agricole, destinate all'alimentazione umana (Abebe T, et al., 2003).

Inibizione alla crescita

Lo stress salino, come molti altri stress abiotici, inibisce lo sviluppo. Negli ecosistemi naturali, la quantità di sale o di tolleranza alla siccità sembra spesso essere inversamente proporzionale al tasso di crescita (Munns, 2002). Una crescita

ridotta potrebbe costituire un importante adattamento per la sopravvivenza delle piante in condizioni di stress, poiché ad una crescita rallentata è possibile la riparazione dei danni strutturali e il ripristino delle funzioni fisiologiche.

Infatti alcune piante eccessivamente sensibili, se sottoposte a lievi stress, arrestano quasi completamente la loro crescita. D'altra parte, se non rispondessero tempestivamente alle condizioni di stress, potrebbero non essere in grado di sopravvivere in quell'ambiente (Wilkinson e Davies, 2002; Farnsworth, 2004; Yang et al., 2005).

Tra le cause di riduzione del tasso di crescita sotto stress salino vi è una fotosintesi insufficiente a causa della chiusura degli stomi che di conseguenza limita l'assorbimento di anidride carbonica.

Controllo stomatico

I danni maggiori che si verificano a livello sistemico, in piante stressate dal sale, sono dovuti alla perdita d'acqua per la mancata chiusura stomatica. Il controllo del flusso di traspirazione attraverso la regolazione stomatica è una fase molto critica in un ambiente iperosmotico.

La risposta degli stomi, è indubbiamente indotta dall'effetto osmotico del sale esterno alle radici. Infatti il sale aumenta la produzione nelle radici dell'acido abissico (ABA) (Fricke et al. 2004), che trasportato alle foglie, riduce la traspirazione nel giro di poche ore (Fricke et al., 2006)

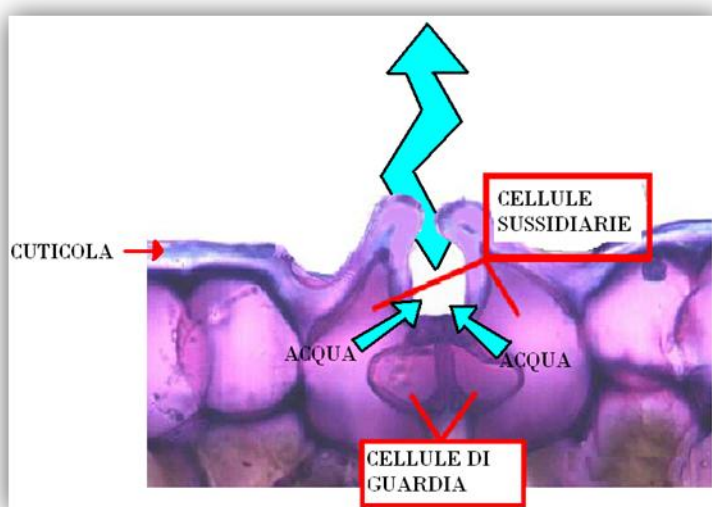


Figura 5: Perdita d'acqua da uno stoma.

Una minor perdita d'acqua è stata riscontrata in specie con una certa tolleranza al sale. Infatti le alofite generalmente mostrano una ridotta traspirazione rispetto alle glicofite (Lovelock and Ball, 2002). La diminuzione dell'apertura stomatica delle alofite, previene l'eccessiva perdita d'acqua, e ancora più importante riduce il movimento di ioni dalle radici al germoglio durante il periodo d'esposizione al sale (Lovelock and Ball, 2002).

Questo risultato è stato di seguito avvalorato dagli studi di Inan *et al.* (2004), i quali hanno documentato aggiustamenti morfologici tipici delle alofite, tra cui una riduzione della dimensione stomatica. Questo meccanismo porta di conseguenza ad un ridotto scambio gassoso nella foglia per ad una maggiore capacità di trattenere l'acqua.

Attività fotosintetica

A causa di questi scambi ridotti, i livelli di anidride carbonica all'interno della camera stomatica e quindi nelle cellule, diminuiscono, causando una riduzione nella fotosintesi. E' stato osservato un decremento nel tasso di fissazione di CO₂, associato con le ridotte aperture stomatiche (Inan et al., 2004).

Il tasso fotosintetico espresso per unità di area fogliare, in condizioni di stress salino, è spesso immutato, sebbene la conduttanza stomatica si riduca (James et al., 2002). Questo paradosso è spiegato dal cambiamento dell'anatomia cellulare, che porta ad avere foglie più sottili, più piccole e di conseguenza una maggiore densità di cloroplasti per unità di area (Munns, 2008).

1.3.2 I MECCANISMI D'ESCLUSIONE

I meccanismi che permettono l'esclusione di ioni ad elevate concentrazioni sono:

1. il sequestro di ioni sodio nel vacuolo. Questo riduce efficacemente la concentrazione citoplasmatica di Na⁺, consentendo alla pianta di continuare le sue funzioni metaboliche ed enzimatiche fino a quando il vacuolo non arriva alla saturazione.
2. l'esclusione di sale dal citoplasma. Durante lo stress salino la cellula attiva le pompe H⁺-ATPasi, che produrranno l'energia protonica necessaria ad attivare le pompe antiporto H⁺/Na⁺. Quindi questo processo permetterà il trasporto di Na⁺ al di fuori della cellula e il mantenimento di una bassa concentrazione di Na⁺ nella

cellula (Dupont, 1992). E' stato dimostrato che il gene SOS1 codifica per il trasportatore antiporto H^+ / Na^+ (Shi et al., 2002).

3. Lo sviluppo di ghiandole del sale, speciali tricomi epidermici, che sequestrano il sale dal tessuto metabolicamente attivo. Ne è un esempio il caso di *Crystallinum Mesembryanthemum* che incorpora il sale in queste ghiandole per sottrarlo dai tessuti (Agarie et al., 2007).

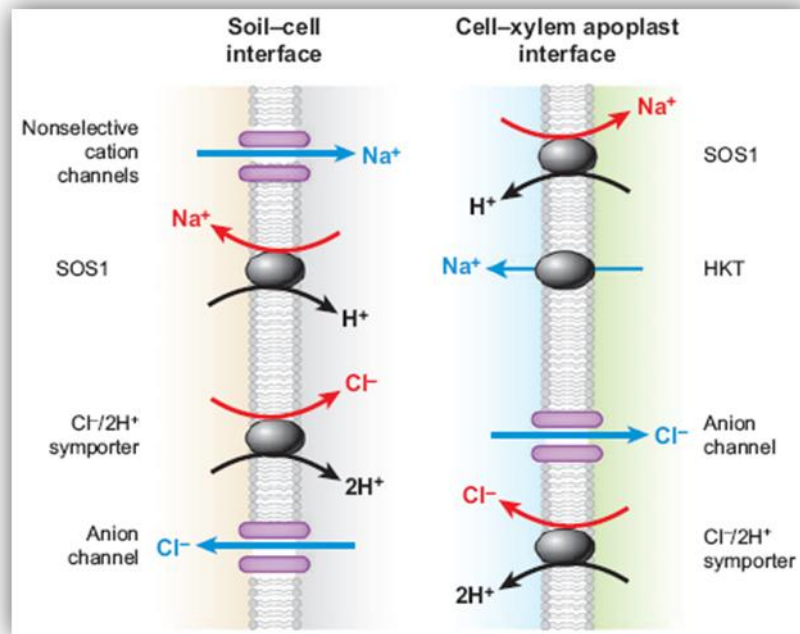


Figura 6: Sistemi di trasporto cellulare. La termodinamica del movimento ionico che avviene tra gli elementi simplastici ed apoplastici sono sinteticamente mostrati nella figura. Il trasporto attivo di ioni è indicato con la freccia rossa, quello passivo con la freccia blu. I meccanismi di trasporto passivi ed attivi di Na^+ e Cl^- sono mediati da canali ionici e carrier (uniporto e H^+ -antiporto/simporto). SOS1 = Salt Overly Sensitive 1, HKT = High-affinity K^+ Transporter. (Da Munns, 2008)

Un mancato o ridotto funzionamento dei meccanismi sopra citati, determinerebbe l'accumulo di alti livelli di Na^+ nel citoplasma. Questo porterebbe all'inibizione di diversi enzimi e quindi alle attività metaboliche cellulari. Quindi l'entrata di ioni sodio nella cellula deve essere sempre ridotta o evitata. Un importante obiettivo nello studio della tolleranza al sale è la determinazione di quali trasportatori sono implicati nell'ingresso dell' Na^+ all'interno della cellula.

Il gene principale implicato nel trasporto di Na^+ nelle piante è SOS1, che codifica per un antiporto Na^+/H^+ , localizzato sulla membrana plasmatica. (Shi *et al.*, 2000). Mutazioni di SOS1 rendono l'*Arabidopsis* estremamente sensibile allo

stress da Na⁺. La sovrespressione di SOS1 riduce la concentrazione di Na⁺ nel germoglio, aumentando la tolleranza in Arabidopsis (Zhu, 2001). Il gene SOS1 è stato clonato e caratterizzato anche nella quinoa (Maughan et al. 2009), ed ulteriori studi sono in corso per misurare i livelli di espressione sotto stress salino.

1.3.3 DETOSSIFICAZIONE ALL'ACCUMULO DI SALE

La tossicità ionica agisce nei tessuti più lentamente, rispetto all'insorgenza dei disturbi osmotici.

Nei tessuti, la tolleranza all'accumulo di Na⁺, o in alcuni casi del Cl⁻, dipende dalle attitudini genetiche nel rispondere all'aumento degli ioni intracellulari quando i meccanismi di compartimentazione perdono la loro efficacia.

Quando i meccanismi di estrusione e compartimentazione, vengono meno, i livelli intracellulari di Na⁺ e Cl⁻, arrivano ad elevate concentrazioni, specialmente nel mesofillo delle cellule fogliari. La tossicità aumenta gradualmente nel tempo, mostrando i propri effetti prima nelle foglie più vecchie e poi in quelle giovani.

Una elevata concentrazione salina determina danni alle strutture cellulari, provoca l'inibizione delle attività enzimatiche e disturba sia il prelievo di nutrienti che l'attività fotosintetica.

Molti di questi disturbi sono associati alla generazione di ROS, le quali possono segnalare e/o aumentare lo stress fisiologico.

Per proteggersi dagli effetti tossici determinati dagli ioni, le piante rispondono con la sintesi di proteine, acidi o basi organiche ed osmoliti (come la prolina) che possiedono, oltre alla protezione osmotica, determinano azioni detossificanti (Zhu *et al.*, 1997).

Le piante transgeniche con una sovrapproduzione di osmoliti, sono spesso dotate di una maggiore protezione, non solo all'ambiente salino, ma anche contro altri stress abiotici produttori di ROS ma non disturbi osmotici. Questa è una prova che gli osmoliti non conferiscono solo una osmoprotezione ma anche un detossificazione.

1.4 LA QUINOA



Figura 7: infiorescenza di quinoa.

La quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) è una pianta erbacea della famiglia delle Amaranthaceae (inc. Chenopodiaceae) coltivata soprattutto per i suoi semi commestibili di alta digeribilità, ma viene anche consumata come verdura a foglia. E' considerato uno pseudocereale piuttosto che un vero cereale, in quanto non è una graminacea.

Ha uno stelo che va dai 10-20 cm fino a circa un metro d'altezza. Ha un bel fiore a forma di pennacchio (Fig.7) e produce una spiga ricca di semi rotondi, simili a quelli del miglio. Gli steli della pianta di quinoa possono essere di diversi colori, così come i fiori e i semi che possono presentare varie tonalità di bianco, ma anche di marrone e grigio.

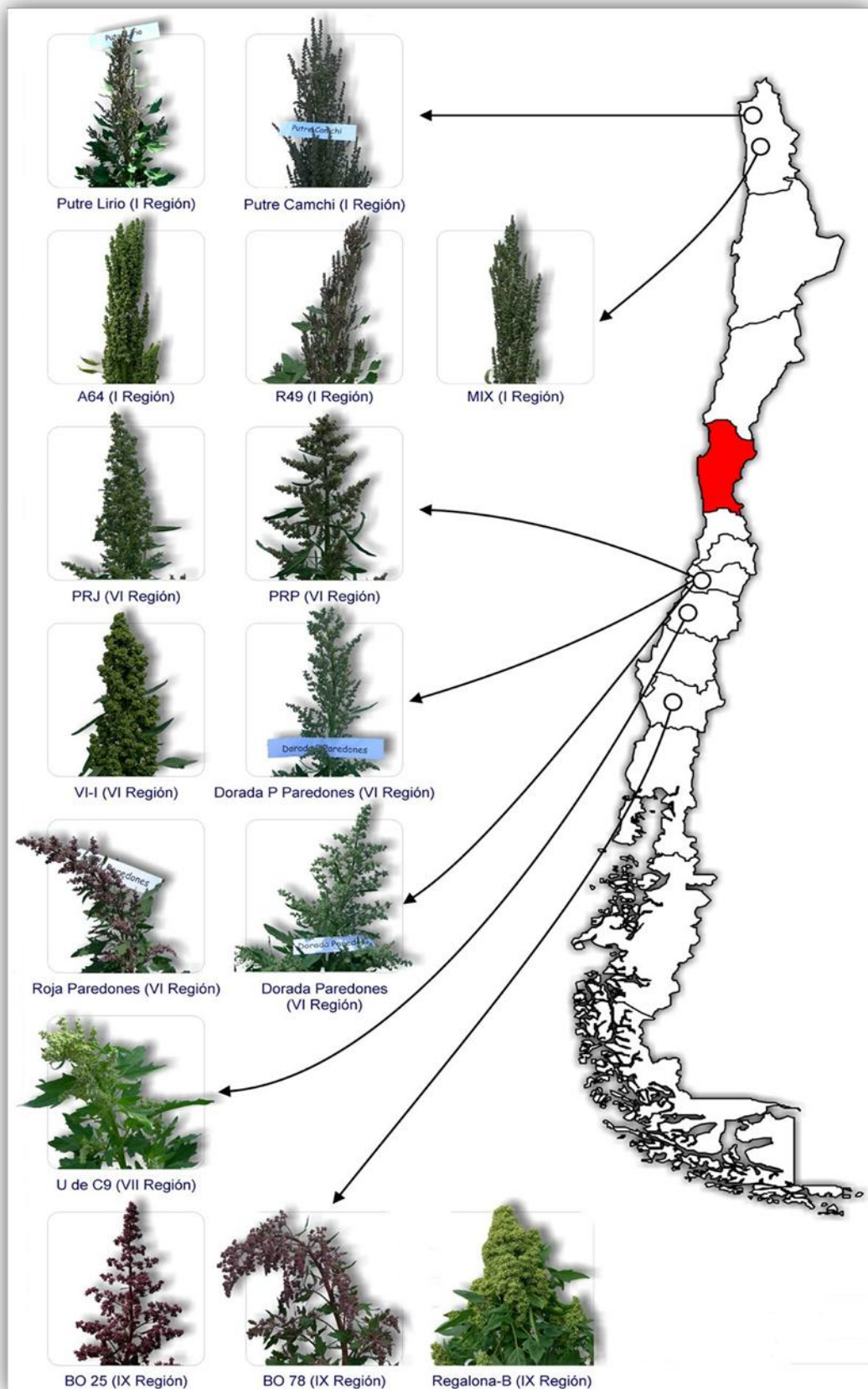


Figura 8: Mappa del Cile e distribuzione degli ecotipi di quinoa usati nella tesi.

1.4.1 LA QUINOA: UN'ALOFITA FACOLTATIVA

La quinoa si comporta come un'alofita facoltativa, avendo la possibilità di crescere sia in suoli normalmente idonei alla maggior parte delle colture ovvero con un basso tenore di sale, sia in suoli con elevate concentrazioni saline, arrivando ad accumulare grandi quantità di ioni dentro e fuori i suoi tessuti.

Le alofite o piante alofile sono vegetali dotati di adattamenti morfologici o fisiologici che ne permettono l'insediamento su terreni salini o alcalini. Concentrazioni di cloruro di sodio nel suolo superiori all'1% sono tossiche per la maggior parte delle piante. Le piante alofite, al contrario, per crescere ottimalmente richiedono una concentrazione dell'1-2%. Le proprietà generali di queste piante consistono nell'elevata resistenza alla siccità, nella capacità di assorbire l'acqua a potenziali molto bassi, di accumulare sali nei tessuti o di eliminarli con uno specifico apparato ghiandolare, di ridurre l'intensità della traspirazione e di resistere a cospicui assorbimenti di sodio. I principali meccanismi di adattamento delle piante alofite alla elevata salinità sono tre: lo sviluppo di resistenza all'entrata del cloruro di sodio nella cellula, l'accumulo del cloruro di sodio entro i vacuoli cellulari (tipico di molte specie di Amaranthaceae) e l'eliminazione del cloruro di sodio mediante cellule secernenti (bladders) presenti nel fusto e nelle foglie (utilizzato da varie specie di Limonium). Il loro habitat è rappresentato da suoli che per fenomeni di risalita capillare o per inondazioni periodiche o permanenti accumulano cloruro di sodio e altri sali neutri oppure sali basici del sodio. Si rinvengono perciò nei deserti, in particolare nei deserti salati, nelle zone umide costiere (stagni e paludi salate e lagune).

Questo meccanismo riporta a valori fisiologici corretti il potenziale idrico fogliare, permettendo alle piante di mantenere turgore cellulare e una traspirazione basale anche in condizioni saline. (Dodd IC et al. 2010)

1.4.2 CARATTERISTICHE NUTRIZIONALI

Le caratteristiche nutrizionali della quinoa ne fanno una fonte nutrizionale molto interessante.

Come i cereali, la quinoa è un'eccellente fonte di amido, ha un buon contenuto in proteine (12 – 18 %) ed è povera in grassi.

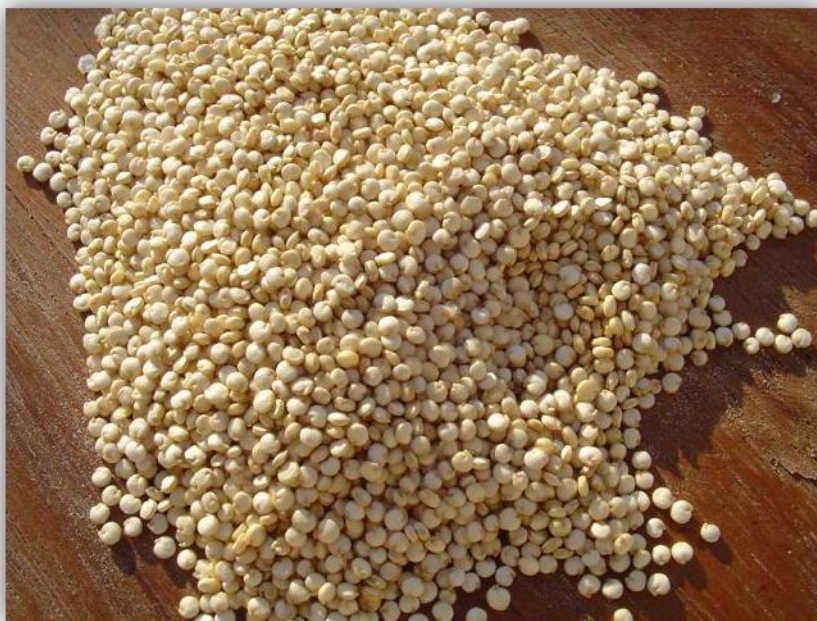


Figura 9: Semi di quinoa.

I semi di quinoa hanno un profilo eccezionalmente ben equilibrato di amminoacidi. Per esempio la Lisina, un aminoacido essenziale, carente in molte colture a grano, nella quinoa eccede rispetto alla RDA di aminoacidi nell'uomo. Inoltre, gli aminoacidi contenenti zolfo, cistina e metionina sono presenti in concentrazioni che sono insolitamente elevate rispetto ad altre piante.

Molti minerali sono presenti in concentrazioni superiori a quelli riportati per la maggior parte delle colture di grano, a condizione che siano trovati in forme biodisponibili, calcio, magnesio e potassio sono presenti in quantità sufficienti per una dieta equilibrata.

Anche la maggior parte degli altri minerali necessari per una dieta bilanciata si trovano in maggiori concentrazioni che in molte altre colture (Schlick G et al. 1993). A differenza dei cereali, la quinoa non contiene glutine, ed è pertanto un alimento idoneo nella dieta degli individui affetti dal morbo celiaco.

Amminoacidi	Quinoa in idroponica		Quinoa in campo	Grano	Soia	Latte scremato
	foglie	semi				
Isoleucina	3.2	3.9	5.2	3.8	4.9	6.3

Leucina	5.6	6.4	6.7	6.8	7.6	9.7
Fenilalanina	3.9	4.1	3.8	4.5	4.9	4.9
Arginina	4.0	9.4	7.9	4.8	7.2	3.7
Istidina	1.2	3.0	2.7	2.2	2.5	2.6
Alanina	3.9	4.0	4.4	3.8	4.3	4.0
acido aspartico	8.0	9.0	8.1	5.3	12.0	8.3
acido glutammico	14.0	15.0	14.0	27.0	18.0	23.0
Glicina	4.3	5.3	5.7	4.0	4.2	2.2
Prolina	3.6	3.5	4.0	10.0	5.5	11.0
Serina	3.6	4.4	4.6	5.0	5.6	6.0
Tirosina	2.6	3.2	3.1	3.1	3.5	5.0
Fenilalanina + Tirosina	6.5	7.3	6.9	7.6	8.4	9.9
Cisteina	0.6	1.0	1.4	2.3	1.5	0.9
Metionina	0.8	1.0	1.4	1.7	1.4	2.5
Treonina	3.5	3.5	4.1	3.1	4.2	4.6
Triptofano	1.6	1.1	1.2	1.1	1.3	1.4
Valina	4.0	4.5	4.6	4.7	5.0	6.9
Cisteina	1.4	2.0	2.8	4.0	2.9	3.4

Tabella 1: composizione amminoacidica della quinoa rispetto al frumento, soia, latte scremato.

	Contenuto (mg/100g)				
Raccolto	Calcio	Fosforo	ferro	Sodio	Potassio
Quinoa seme	160	270	19	4	2170
Grano	38	341	3	8	381
Soia	201	550	7	5	1800
Quinoa foglie	2920	370	29	16	1181
Spinaci	126	55	4	65	633
Cavolo	35	30	1	4	266

Tabella 2: Comparazione del contenuto minerale di semi e foglie di quinoa con altri ortaggi a foglia o a seme (Schlick et al., 1996).

1.4.3 PROPRIETA' NUTRACEUTICHE DELLA QUINOA

Il termine nutraceutico, che unisce le parole nutrizione e farmaceutica, sta ad indicare che si tratta di un alimento dalle caratteristiche mediche e sanitarie, compresa la prevenzione e il trattamento delle malattie (Stephen L ed al.).

Al giorno d'oggi non c'è una regolamentazione che definisca le caratteristiche che i prodotti devono avere per potersi avvalere di tale definizione. Per questo motivo, il termine viene spesso usato per prodotti con diversi usi ed efficacia.

Grazie alle recenti scoperte nel campo biomolecolare, ricercatori e medici stanno cooperando allo sviluppo di modelli per integrare le informazioni provenienti dalla moderna pratica medica con quelle riguardanti le scoperte nel campo biologico-botanico (Asrhad M. Safi, 2003).

La quinoa è una pianta dalle accertate proprietà nutraceutiche (James 2009), in quanto ricca di tocoferoli o vitamina E: molecole anfipatiche la cui principale azione è quella di limitare la presenza di radicali liberi nelle cellule.

La principale fonte di tocoferoli per animali e umani sono gli oli vegetali, prodotti dalle piante oleaginose, contenenti acidi grassi polinsaturi; questi ultimi sono protetti contro i danni ossidativi da antiossidanti, come per l'appunto i tocoferoli. Le principali fonti di tocoferoli sono il frumento *Triticum aestivum* (da cui si ricava l'olio di germe di grano), la colza *Brassica napus*, la palma *Elaeis guinnensis* (da cui si ricava l'omonimo olio e il palmitio), l'olivo *Olea europea*

(da cui si ricava l'olio d'oliva), il girasole *Helianthus annuus*, la soia *Glicine max*, e più in generale tutte le piante fonti di matrici oleaginose. Questi oli contengono alfa-, beta-, delta- e gamma-tocoferoli in diversa concentrazione, con predominanza di gamma-tocoferolo rispetto all'alfa-tocoferolo.

Da molti anni è nota la fondamentale importanza della vitamina E nella dieta, infatti la quantità di tocoferoli assunta attraverso la dieta è inversamente proporzionale all'apparire delle malattie cardiovascolari.

Nell'Uomo la carenza di tocoferoli è piuttosto rara e in genere si manifesta solo in Paesi con una povertà diffusa.

1.4.4 ADATTAMENTI CLIMATICI E RISPOSTA AGLI STRESS ABIOTICI

La quinoa è una pianta resistente che non richiede particolari adattamenti per la sua crescita. La sua alta biodiversità, risultante dall'essersi sviluppata in un continente tanto eterogeneo la rende una specie naturalmente adattata alle condizioni estreme dell'altopiano andino ma al contempo alle condizioni di aridità e salinità degli ambienti costieri. La quinoa è considerata resistente ad alcuni dei fattori abiotici che limitano la produzione vegetale compresa la siccità, il gelo e la salinità (Paul E. 2005; Araus et al, 2002; Boyer, 1982).

Questi fattori abiotici sono accumulati dal fatto che limitano la disponibilità d'acqua per la pianta e la crescita cellulare. Questa diminuzione della disponibilità idrica è determinata dalla diminuzione del potenziale idrico.

La quinoa è una pianta capace di resistere in condizioni di basso potenziale idrico, modificando l'assorbimento d'acqua, l'accumulo di soluti e modificando le proprietà delle pareti cellulari per evitare la disidratazione indotta dall'abbassamento di potenziale.

Inoltre la quinoa sintetizza una grande varietà e quantità di proteine con funzione osmo-protettiva per tollerare la ridotta assimilazione d'acqua e prevenire così danni alle cellule (Verslues, 2006).

1.4.5 STORIA E RUOLO NELLA CULTURA ANDINA

L'uomo vanta una storia al fianco della quinoa di circa 10 mila anni. I discendenti dei Quechua e Aymara raccontano che grazie al Grano de Oro non c'era la fame negli altopiani ma piuttosto, uomini forti legati alla coltivazione e al consumo della quinoa.



Figura 10: Madre e bambina dell'etnia Quechua.

Gli anni bui della quinoa iniziarono con la conquista spagnola e con i pregiudizi originari verso i cibi locali come appunto la quinoa, l'amaranto e il Maca che hanno portato al loro graduale disuso. Oggi sono stati in gran parte soppiantate dalle coltivazioni cerealicole sviluppate in Europa come il grano e l'orzo.

Tuttavia gli agricoltori andini hanno conservato i semi di quinoa e ne hanno continuato la coltivazione in piccoli appezzamenti, conoscendone l'enorme ricchezza che racchiude. Così è stato fino a quasi la fine del XX secolo, quando, riscoperto il valore del Grano de Oro, è stato promosso il suo studio, il miglioramento di alcune varietà e l'espansione delle colture e del consumo, che oggi vede un crescente interessamento del mondo scientifico.

Le culture pre-ispaniche ci dimostrano tutt'ora che la quinoa è una coltura molto importante per i suoi residenti. In questo momento può essere considerata come strategica per la politica di sicurezza alimentare nelle zone andine, ma anche in tutte quelle aree in cui solo con eccessive lavorazioni e apporti irrigui la terra diventa coltivabile e fertile. Le popolazioni andine utilizzano la quinoa carpendone totalmente la sua vasta gamma di sapori ed una completa utilità dal gambo al frutto. Infatti oltre alle già descritte proprietà per l'alimentazione umana, queste popolazioni utilizzano gli steli in quanto ricchi di fibre come le sementi, producendo foraggi per il guadagno di peso degli animali e per la produzione più latte. Inoltre dalle foglie della pianta vengono preparate zuppe e insalate, mentre il tegumento dei semi si cuoce per ottenere "la pasa" utilizzata per masticare la coca. Le mutevoli varietà di colore della quinoa sono utilizzate dai quechua e dagli aymara, per interpretare il futuro dell'attività agricola e della famiglia. La prognosi dell'attività agricola per l'anno seguente si chiama Giaffa, come viene chiamato "urqu urqu" e si svolge in coincidenza con la festa del Corpus Domini.

In questo periodo le famiglie producono biscotti, o k'ispiñas, con figure di animali. Il capofamiglia lancia biscotti sul tetto: se il mattino sono bagnati di rugiada, è il preavviso che l'anno sarà buono. Se non se ne rompe alcuno allora significa che non ci saranno malattie mortali o disgrazie tra dei parenti.

Il grano viene anche utilizzato per l'uso medicinale: infatti, ha una varietà di impiego nella lotta contro la malattia epatica, angina e cistite. Si tratta anche di un analgesico dentale e ha la peculiarità di essere anti-infiammatori e di guarigione. È quindi possibile applicare impacchi di quinoa nera, combinata con altre piante, per curare ossa rotte.

1.5 LE GHIANDOLE DEL SALE

Vi sono ambienti, come le zone costiere marine o alcuni deserti, nei quali la vita delle piante è fortemente limitata dall'eccessiva presenza di sali nel terreno. Un'elevata concentrazione di sali nel terreno impedisce, infatti, l'assorbimento dell'acqua da parte delle radici, in quanto la pianta perderebbe acqua, per osmosi, piuttosto che assorbirla.

Alcune specie di piante, dette alofite, hanno sviluppato degli adattamenti per vivere in ambienti salini. Alcune specie mantengono al loro interno una concentrazione di sali ancora più elevata di quella del suolo in modo tale che l'acqua possa entrare nelle cellule; altre invece riescono ad assorbire l'acqua ricca di soluti ed eliminano poi i sali in eccesso attraverso delle ghiandole – dette *ghiandole del sale* – presenti sulle foglie.

La quinoa, come molte altre alofite o alofite facoltative, sono dotate di questi sistemi di compartimentazione esterna (estrusione) del sale. Si tratta di speciali cellule epidermiche che permettono di aumentare la tolleranza allo stress salino.

I meccanismi di estrusione costituiscono un metodo particolarmente efficace, ma dall'elevato dispendio energetico, per la secrezione dei sali in eccesso contenuti nel simplasso, al fine di aumentare sinergicamente l'effetto di bilancio ionico omeostatico, offerto dagli altri meccanismi di tolleranza citoplasmatici.

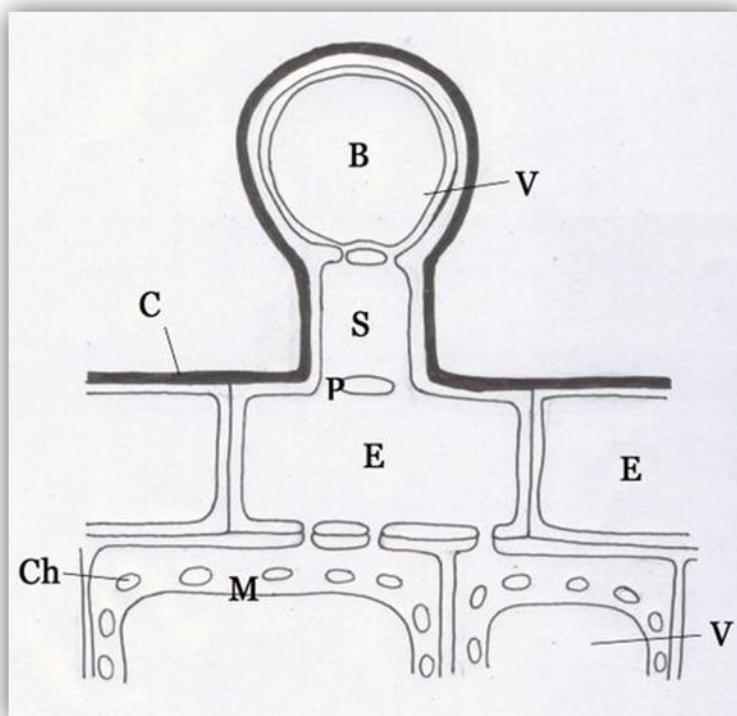


Figura 11: disegno schematico di una ghiandola del sale:

B = vescicola

C = cuticola della foglia,

Ch = cloroplasto,

E = cellule epidermiche,

M = cellule del mesofillo,

P = plasmodesmi,

S = cellule meristematiche

V = vacuolo

Le ghiandole del sale sono particolari tipi di peli dell'epidermide particolarmente comuni nelle Amaranthaceae. Si tratta di tricomi presenti sulla superficie fogliare, in cui gli ioni sono attivamente trasportati, come nel più comune sistema *source - sink*. I tricomi accumulando ioni, muoiono ed essiccandosi permettono la rimozione dei sali dalla pianta tramite dilavamento.

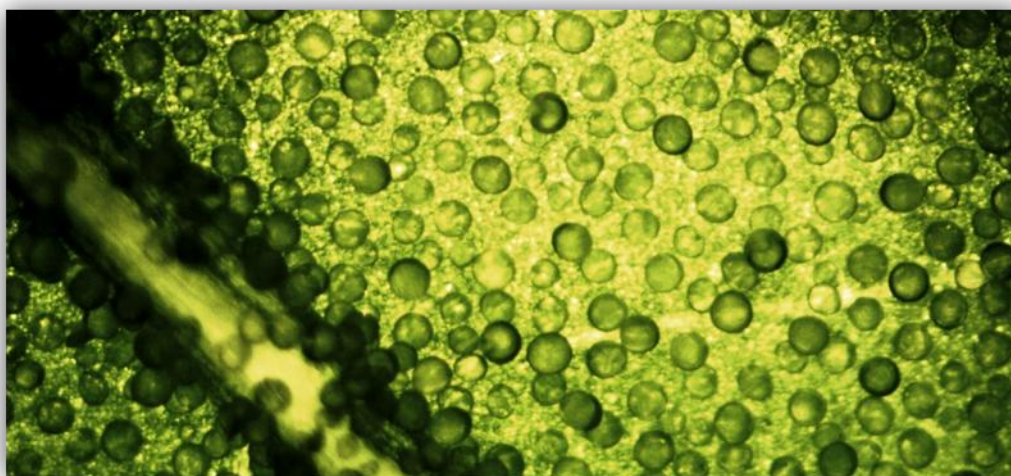


Figura 112: Foto della pagina inferiore dei BO78. Si vedono i bladders scuri e sullo sfondo gli stomi.

La ghiandola del sale è di solito grande il doppio delle altre cellule. E' costituita quasi completamente da una cellula modificata, la vescicola, in cui si trova un grande vacuolo che accumula gli ioni estrusi dal mesofillo. Cellule meristematiche collegano la vescicola, con i suoi numerosi plasmodesmi, alla cellula epidermica fogliare. Questa cellula epidermica occupa una posizione fisiologicamente e strategicamente molto importante, infatti, utilizzando ATP, i sali disciolti sono trasportati attraverso le cellule nel vacuolo della vescicola e li accumulati. Raggiunta la saturazione da ioni, la ghiandola di sale si secca ed esplosa. Quindi il pelo epidermico, ora contenente il cristallo di sale, viene rimosso dall'umidità mattutina o dalle precipitazioni.

1.6 LE SAPONINE

I semi della quinoa contengono le saponine, una protezione naturale per rendere il seme indigesto ad eventuali predatori e proteggersi contro alcuni patogeni. Infatti le saponine sono dei glicosidi terpenici che vengono utilizzate dalle piante come sistemi difensivi contro organismi patogeni, in particolare funghi. In alcuni casi esse sono già presenti; altre volte vengono sintetizzate da dei precursori nel caso in cui la pianta abbia subito un danno.

È stato accertato che l'azione fungicida è dovuta alla reazione delle saponine con steroli presenti nelle membrane delle ife dei funghi, alla rottura della membrana ed alla conseguente morte del fungo (U.S.Environmental Protection Agency).

Gli agricoltori tradizionali, per rendere la quinoa adatta al consumo umano, rimuovono le saponine dai semi immergendoli in acqua e sciacquando fino a quando non viene più prodotta schiuma. Infine, i semi vengono essiccati tramite "secadores" solari. Negli ultimi anni invece si è cercato di selezionare delle accessioni di quinoa più dolci, con un minor contenuto di saponine per renderle più appetibili anche senza la rimozione delle saponine.

Questo però ha portato ad una resa inferiore alle previsioni, soprattutto per via degli uccelli che hanno consumato interi raccolti, senza considerare una maggiore incidenza di muffe e funghi.

2. SCOPO DELLA TESI

Il lavoro è stato suddiviso in due fasi:

1) Una prima fase in cui si è impiegata l'accessione BO78 (considerata, secondo precedenti studi, l'accessione meno resistente allo stress salino) per individuare risposte significative, da un punto di vista morfo-fisiologico, determinate dalle crescenti concentrazioni di cloruro di sodio.

2) Una seconda fase in cui, scelte tre concentrazioni di NaCl (150, 300, 600 mM) sulla base dei risultati della prima fase, si è proceduto trattando tutte e cinque le accessioni di quinoa (UDE9, PRP, PRJ, BO78 e VI-1) e studiando alcuni parametri morfo-fisiologici per un periodo prolungato dall'inizio della somministrazione del sale.

L'obiettivo a lungo termine di questa tesi è di definire un nuovo livello di complessità nello studio della tolleranza allo stress salino in questa specie, un aspetto spesso disatteso quando si passa dall'utilizzo di modelli (ad es. *Arabidopsis*) alle piante coltivate, e di individuare alcuni meccanismi alla base della tolleranza allo stress abiotico in modo da orientare le ricerche nel campo del miglioramento genetico, sia classico sia basato sulla biologia molecolare come, ad esempio la "selezione assistita da marcatori" o *Marker-Assisted Selection*.

3. MATERIALI E METODI

3.1 MATERIALE VEGETALE

Il materiale vegetale su cui sono state fatte le prove era rappresentato da semi di quinoa provenienti dal Cile (gentilmente forniti dal CEAZA). Sono stati presi in esame i seguenti ecotipi già oggetto di uno studio sulla diversità genetica (Fuentes et al., 2009): PRJ, PRP, VI-1, UDEC9, BO78

Ecotipo	Località	Area geografica	Posizione
R49	Lat. 19.7°, long. 68.88°	Tarapacá	Altopiano (3800 m a.s.l.)
PRJ (Javi)	Lat. 34.5°; long. 72.01°	Bernardo O'Higgins	Costa
PRP	Lat. 34.6°; long. 71.36°	Bernardo O'Higgins	Costa
VI-1 (Peña Blanca)	Lat. 34.5°; long. 72.01°	Bernardo O'Higgins	Costa
UDEC 9	Lat. 35.73°; long. 72.53°	Maule	Costa
BO78	Lat. 39.1 °; long. 72.68°	Araucanía	Costa

Tabella 3: Ecotipi di quinoa del presente studio e i loro siti di origine.

3.2 PRIMO ESPERIMENTO – BO78 in SABBIA

Lo scopo era di stabilire a quali concentrazioni di salinità le piante di questa accessione di quinoa mostravano le più importanti alterazioni morfologiche, biochimiche e fisiologiche, e di valutare le concentrazioni dei principali cationi e anioni nei diversi organi e, per quanto riguarda la foglia, gli ioni interni ed estrusi

3.2.1 CONDIZIONI DI CRESCITA

Durante questa prima fase di studio è stata usata l'accessione BO78 di *Chenopodium quinoa* Willd..

I semi sono stati piantati in pannelli alveolari , con vasetti dal diametro di 4 cm, riempiti di sabbia.

Le piante sono state collocate in una camera di crescita con una PAR (Photosintetically Active Radiation) pari a $250 \text{ mM m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ottenuta con l'impiego di lampadine fluorescenti Cool-White e con un fotoperiodo di 16 ore di luce/8 ore di buio e . con temperature fissate rispettivamente a 22°C e 19°C.. Le piante sono state irrigate con una soluzione nutritiva di Hoagland a metà concentrazione una volta alla settimana.

Componenti	g / 1 L (di soluzione)	mL / 1 L (di soluzione)
2M KNO ₃	202g/L	2.5
2M Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	236g/0.5L	2.5
Ferro chelato	15g/L	1.5
2M MgSO ₄ x 7H ₂ O	493g/L	1
1M NH ₄ NO ₃	80g/L	1
Componenti minori:		
H ₃ BO ₃	2.86g/L	1
MnCl ₂ x 4H ₂ O	1.81g/L	1
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0.22g/L	1
CuSO ₄	0.051g/L	1
H ₃ MoO ₄ x H ₂ O	0.09g/L	1
1M KH ₂ PO ₄	136g/L	0.5

Tabella 4: Composizione della soluzione di Hoagland.

3.2.2 TRATTAMENTI CON NaCl

A partire dallo stadio di sviluppo in cui le piante avevano il quarto paio di foglie (esclusi i cotiledoni), vale a dire circa 34 giorni dopo la semina (Days After

Sowing, DAS), si è cominciato ad irrigare le piante (tranne i controlli) con dosi crescenti di NaCl partendo da 150 mM e con incrementi di 150 mM alla volta. I trattamenti salini venivano fatti 2-3 volte alla settimana, per un massimo di 12 giorni, fino a raggiungere le concentrazioni finali di 150, 300, 450, 600, e 750 mM NaCl alle quali le diverse tesi di BO78 dovranno crescere. Le piante di controllo (0 mM NaCl) sono state irrigate soltanto con acqua nei rispettivi giorni. Per le diverse tesi, le piante di BO78 sono state annaffiate quindi 3 volte a settimana, di cui 2-3 con la relativa concentrazione di NaCl e, se necessario, 1 a metà settimana con anche la soluzione di Hoagland a metà concentrazione, al fine di mantenere i livelli di salinità nel terreno il più vicino possibile a quelli della soluzione somministrata (Verslues_Plant J 2006).

	Azioni	150	300	450	600	750
04-nov	foto	-	-	-	-	-
02-dic	foto	-	-	-	-	-
04-dic	tratt-foto	150	150	150	150	150
07-dic	tratt-foto	150	150	150	150	150
10-dic	tratt-foto- hoagland	150	300	300	300	300
11-dic						
14-dic	tratt-foto	150- 7 DAT	300	450	450	450
15-dic						
17-dic	tratt-foto		7 DAT		600	
18-dic						
21-dic	tratt-foto- hoagland	14 DAT		7 DAT		750
22-dic						
24-dic	tratt-foto		14 DAT		7 DAT	
28-dic	tratt-foto- hoagland	21 DAT		14 DAT		7 DAT
30-dic	tratt-foto	--	21 DAT		14 DAT	
04-gen	tratt-foto	28 DAT	--	21 DAT		14 DAT

07-gen	tratt-foto- hoagland	--	28 DAT	--	21 DAT	
11-gen	tratt-foto	35 DAT	--	28 DAT	--	21 DAT
14-gen	tratt-foto- hoagland	38 DAT	35 DAT		28 DAT	
18-gen	tratt-foto		38 DAT	35 DAT		28 DAT
21-gen	tratt-foto			38 DAT	35 DAT	
25-gen	tratt-foto- hoagland				38 DAT	35 DAT
28-gen	foto					38 DAT

Tabella 5: Data dei trattamenti e campionamenti effettuati sull'accessione BO78.

Una volta raggiunta la concentrazione finale, le piante sono state mantenute nelle medesime condizioni di salinità per un periodo di altri 35 giorni (vedi Tabella sopra). A 35 giorni dopo il trattamento (Days After Treatment, DAT) è stata determinata la letalità dei trattamenti (LD50). Le piante sono poi state raccolte per le misurazioni di peso fresco e secco (di foglie, fusto e radici separatamente), altezza della pianta, nonché la superficie fogliare, e la densità ed area stomatica utilizzando, per queste ultime 3 analisi, il software Image J® (Abramoff et al., 2004). Sono state anche effettuate osservazioni (e fotografie) delle ghiandole del sale presenti sulla superficie fogliare.

Per ogni tesi (0, 150, 300, 450, 600, 750 mM) al raggiungimento del 35 DAT si avevano un totale di 25 piante di BO78. I dati ottenuti per le diverse misurazioni sono stati normalizzati per confronto con il controllo (0 mM NaCl).

3.2.3 MISURE MORFOLOGICHE

➤ Altezza e tasso di crescita

L'analisi della crescita in altezza dell'accessione BO78 è stata misurata 3 volte a settimana, sulle le medesime 5 piante campione selezionate a tale scopo. Le

misure sono iniziate 2 settimane prima della somministrazione del trattamento salino e si sono concluse al 35° giorno del raggiungimento della concentrazione stabilita per ogni trattamento (35 DAT).

➤ **Peso fresco e secco**

La determinazione del peso fresco e del peso secco sono stati condotti sull'accessione BO78 al 35° giorno dal raggiungimento della concentrazione stabilita per ogni trattamento (35 DAT).

Nel processo di misurazione si sono prima rimosse le piante dalla sabbia, per poi pulire ed asciugare delicatamente e rapidamente (per evitare l'eccessiva perdita d'acqua), con carta assorbente morbida tutte le superfici.

Di ogni trattamento sono state raccolte 8 piante. Si è misurato il peso fresco delle radici, del fusto e delle foglie, utilizzando una bilancia da. In seguito i campioni sono stati messi in stufa a 40°C per 48 o 72 ore (secondo il tempo richiesto per l'essiccazione), per poi essere nuovamente pesati per la determinazione del peso secco.

➤ **Area fogliare**

La superficie fogliare è stata misurata acquisendo l'immagine con uno scanner. In seguito, utilizzando il software Image J[®] (Abramoff et al., 2004), è stata analizzata l'immagine da un punto di vista cromatico, ed è stata calcolata la superficie fogliare media per trattamento in mm².

➤ **Dimensione e densità stomatica**

La dimensione e la densità stomatica sono state misurate utilizzando un microscopio ottico in campo chiaro, modello MEIJI, dotato di una fase di contrasto in campo scuro e di un'apparato fotografico digitale. Per l'acquisizione ed elaborazione delle immagini si è usato il software AbsCAM[®].

Per ognuna delle 5 concentrazioni di NaCl con cui sono state trattate le piante di quinoa, più il controllo (0 mM NaCl), si è raccolta 1 foglia per pianta da 3 piante diverse per tesi. Le foglie sono state raccolte da una posizione intermedia lungo il fusto in modo da effettuare le analisi degli stomi su campioni di pari età. La raccolta dei campioni è avvenuta al 21 DAT di ciascun trattamento. Il cm² ritagliato da ciascuna foglia per l'analisi al microscopio è stato prelevato da una

posizione centrale della lamina fogliare, tra le nervature. Per via della natura idrofobica della superficie fogliare, data dalle numerose estroflessioni epidermiche di natura cerosa, prima di poter osservare la sezione fogliare al microscopio con goccia d'acqua e vetrino coprioggetti, è stato necessario rimuovere delicatamente le estroflessioni cerosi con un foglietto di carta assorbente. Fatto ciò, sono state scattate 3 foto dallo stesso campione di 1 cm² ad un ingrandimento 40X, per un totale di 9 foto di foglie per trattamento.

La dimensione stomatica è stata calcolata in μm^2 utilizzando il software Image J[®]. La densità stomatica è stata misurata contando manualmente sulla superficie adassiale ed abassiale (superiore/inferiore) della lamina il numero di stomi all'interno di un millimetro quadrato.

➤ **Densità delle ghiandole del sale**

La densità delle ghiandole del sale è stata misurata utilizzando un microscopio ottico in campo chiaro. Per tale analisi i campioni fogliari raccolti sono stati una foglia apicale, una intermedia ed una basale, ripetute per 4 repliche (quindi da 4 piante) per ciascuno dei 6 trattamenti (compreso il controllo), ottenendo così 4 campioni di foglie di 3 età differenti per trattamento. La raccolta dei campioni è avvenuta al 21 DAT di ciascun trattamento.

Il cm² ritagliato per l'analisi al microscopio è stato prelevato da una posizione centrale della lamina fogliare, tra le nervature. Molto importanza in questa fase è stata posta nell'operare solo con delle pinzette e mai con le mani per non danneggiare le ghiandole del sale prima che venissero osservate al microscopio.

3.2.4 DETERMINAZIONI BIOCHIMICHE

➤ **Contenuto di prolina**

Reagenti:

- Soluzione acquosa al 3% (p/v) di acido 5-solfosalicilico di-idrato.
- Reagente con ninidrina: 2,5 g di ninidrina in 100 ml di una soluzione contenente acido acetico glaciale, acqua distillata e acido ortofosforico 85% nel rapporto 6:3:1.

Il contenuto di prolina degli organi vegetali (foglie, fusto e radici separatamente) è stato determinato con un protocollo basato sui lavori di Claussen (2005) e Bates et al. (1973) modificati in parte da noi. Per l'analisi sono state raccolte 4 piante da ogni trattamento (al 21° DAT) e separate in foglie, fusto e radici. Le diverse porzioni sono poi state pesate, congelate in azoto liquido e conservate a -80°C .

Dopo aver polverizzato il materiale vegetale in azoto liquido con mortaio e pestello, si è pesato 50 mg di polvere congelata, e a questi aggiunti 1,2 mL della soluzione 3% acido 5-sulfosalicilico di-idrato. Dopo aver vortexato con cura per 30 secondi la polvere messa in soluzione acida, si centrifuga a 14000 g per 15 minuti a temperatura ambiente (22°C).

Dopo la centrifugazione si preleva 1 mL di sovrantante. A questo si aggiunge 1 mL di acido acetico glaciale e 1 mL di reagente con ninidrina. A questo punto occorre preparare in parallelo, al fine della costruzione della curva di taratura, campioni con concentrazioni note di prolina: abbiamo utilizzato a tal fine 1, 5, 10, 20 e 30 μL di prolina 10 mM. Questa quantità di prolina è stata portata ad 1 mL con la soluzione 3% acido 5-sulfosalicilico di-idrato a cui si aggiunge, come fatto in precedenza, 1 mL di acido acetico glaciale e 1 mL di reagente con ninidrina. Essendo la ninidrina fotosensibile, occorre operare in condizioni di semi-oscurità. A questo punto tutti i campioni e standard sono incubati per 1 ora a 90°C . Successivamente si fanno raffreddare in ghiaccio per 5 minuti sempre in condizioni di semi oscurità. Ad ogni campione e standard vengono aggiunti 2 mL di toluene (per separare il cromoforo), il tutto ben vortexato e, stabilizzata la fase superiore, questa si preleva e si legge allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 525 nm.

3.2.5 ANALISI DEL CONTENUTO DI CATIONI ED ANIONI

➤ Raccolta e preparazione dei campioni

Il contenuto di cationi ed anioni è stato analizzato nelle foglie apicali, foglie basali (quelle più in basso che erano ancora sane e non senescenti) e fusto dell'accessione di quinoa BO78 al fine di una determinazione quali-quantitativa della concentrazione e distribuzione degli ioni nei diversi organi vegetali e nella frazione interna ed esterna della foglie.

➤ **Separazione ioni esterni (estrusi):**

Alla fine dell'esperimento (35 DAT), è stato prelevato da tre piante per trattamento un campione (peso variabile da 0,2 a 1grammo di peso fresco) di foglie apicali, foglie intermedie e fusto.

Senza toccarle con le dita per non rimuovere il sale estruso in superficie, , sono state messe separatamente in tubi Falcon da 50 ml le porzioni di foglie apicali, intermedie e fusto, a cui è stata aggiunta un'aliquota d'acqua ultrapura, proporzionale al peso fresco, , (8 mL d'acqua ogni 0,2 grammi di peso fresco). Il materiale immerso nell'acqua ultrapura veniva spatolato delicatamente per rimuovere le ghiandole del sale senza rompere i tessuti,. Infine, i campioni venivano vortexati per 30 secondi per disciogliere gli ultimi granelli di sale estrusi rimasti adesi ai tessuti di rivestimento.

➤ **Separazione ioni interni**

Il materiale vegetale lavato e sfregato come descritto nel paragrafo precedente è stato prelevato dalle Falcon con pinzette ben lavate (per non contaminare l'acqua ultrapura con gli ioni disciolti), e poi congelato a -20°C. Il giorno dopo, i campioni venivano liofilizzati, e pesati. Dopo aver determinato il peso secco, sono stati prelevati 100 mg di materiale secco di ciascuna porzione della pianta, a cui sono stati aggiunti 10 mL di HNO₃ 0,1M per 30 minuti. Si è quindi filtrato, con un filtro di carta Whatman no.1, e centrifugato a 30000 giri / min. Il sovrinatante è stato raccolto e considerato la frazione di cationi interna dei tessuti.

Inoltre per ciascuna porzione della piante sono stati pesati 100 mg di tessuto secco ed aggiunti 10 mL di acqua ultrapura per 30 minuti. Il contenuto è stato filtrato con un filtro di carta Whatman no.1 e centrifugato a 30.000 giri / minuto. Il sovrinatante è stato considerato come la frazione di anioni interni dei tessuti. Per ogni trattamento salino (incluso il controllo), gli estratti delle tre piante sono stati uniti per le analisi.

➤ **Elettroforesi capillare**

Il sistema di elettroforesi capillare è stato utilizzato per la quantificazione dei principali anioni (Cl⁻, SO₄²⁻, NO₃⁻, NO₂⁻) e cationi (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, NH₄⁺) attuando il metodo esterno di calibratura standard con la regressione lineare in

funzione del metodo proposto da Dinelli et al. (1998) e Pieri et al. (2009). Sia gli anioni che i cationi sono stati analizzati ad una distanza di 50 cm (dal punto di iniezione al rivelatore) all'interno di un capillare di silice fusa (diametro interno di 75 μm), ad una temperatura costante di 25°C. La lunghezza d'onda di rivelazione indiretta è stata di 220 nm. La tensione applicata è stata di -20 e 20 kV, rispettivamente per la separazione di cationi e anioni. La concentrazione di ioni esterni ed interni / frazione di tessuto è stata espressa come ioni $\mu\text{equivalenti g}^{-1}$ di peso secco.

Per una corretta taratura dello strumento si è preceduto inizialmente con lunghi lavaggi dei capillari in acido e acqua ultrapura. Poi, prima di iniziare le iniezioni dei campioni, la qualità della misurazione è stata controllata utilizzando degli standard appositi. Questa operazione andrà ripetuta anche alla fine di ogni ciclo d'analisi per appurare il corretto funzionamento dello strumento.

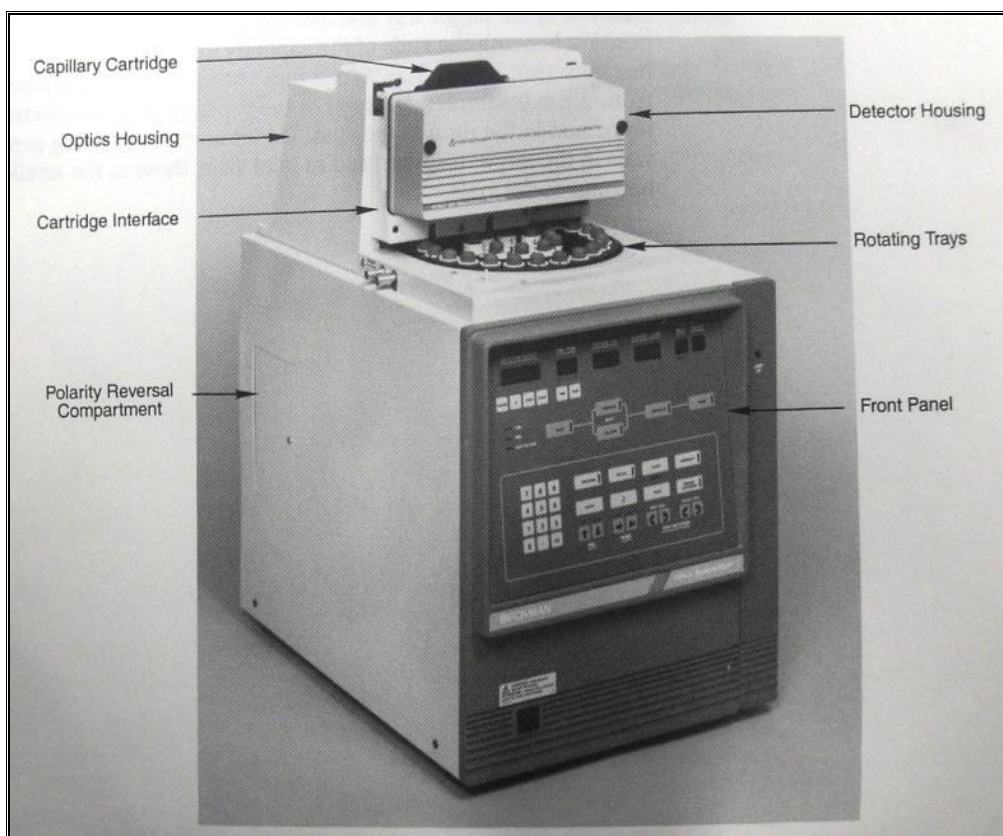


Figura 123: Immagine dello strumento per l'elettroforesi capillare e dei suoi componenti (complesso ottico, cartuccia e vassoio rotante).

Per la separazione degli ioni è stato usato uno strumento per l'elettroforesi capillare P/ACE System 5500 della Beckman (Figura 3), e per l'acquisizione dei dati al computer il software Pace Statyon®. Il P/ACE 5500 separa campioni utilizzando una metodica chiamata High Performance Capillary Electrophoresis (HPCE).

Nell'elettroforesi capillare i diversi componenti dei campioni iniettati, sotto l'influenza dell'alto voltaggio, migrano differemente lungo il capillare (Figura 2). I cationi del carrier sono attratti dalla parete del capillare formando un doppio strato elettrico. Quando viene applicato il voltaggio, vi è un movimento netto della soluzione conosciuto come flusso elettrosmotico.

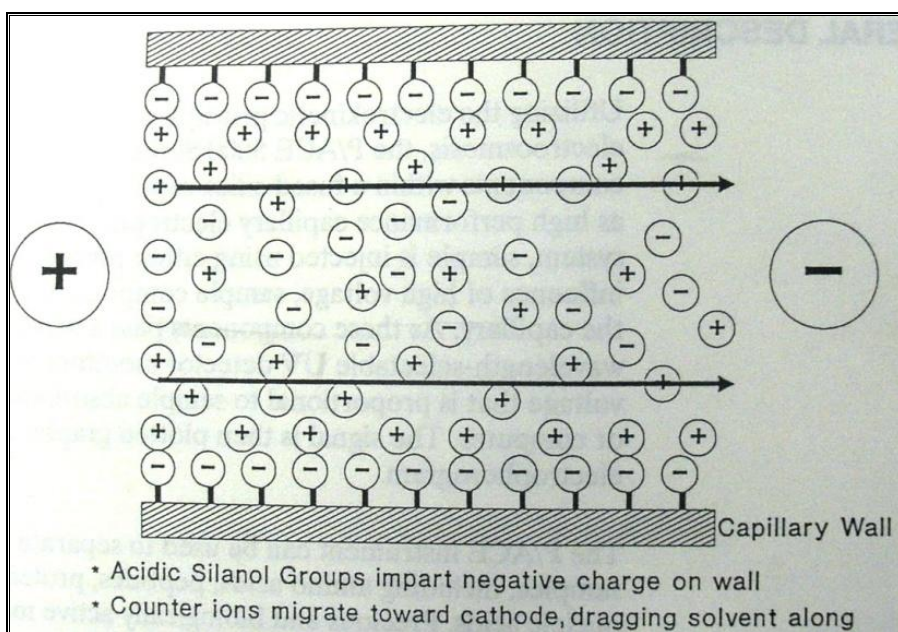


Figura 14: Flusso elettrico attraverso il capillare

Appena i componenti passano dalla finestra trasparente del capillare siliceo, un rivelatore a luce UV, impostato a una determinata lunghezza d'onda, elabora e trasmette un segnale, proporzionale all'assorbanza del componente, al computer.

Il software quindi rielabora il segnale, integrandolo e visualizzandolo graficamente sul monitor con qualche secondo di ritardo rispetto alla misurazione dell'UV detector.

Il complesso ottico (Figura 3) dispone di una lampada a luce UV, di 2 specchi per focalizzare la luce, di un filtro per selezionare la lunghezza d'onda tramite un disco rotante, e di un sistema di misurazione allineato con l'apertura del cartidge.

La lampada UV è una lampada deteriorabile con un range di lunghezza d'onda di 190 – 380 nm. A seconda che vengano analizzati i cationi o gli anioni dovrà essere regolata in maniera differente.

L'autocampionatore è il complesso per il campionamento automatico che, una volta caricato con i vials e collegato al computer, lavorerà in autonomia caricando in successione prima il carrier, poi i diversi campioni da analizzare.

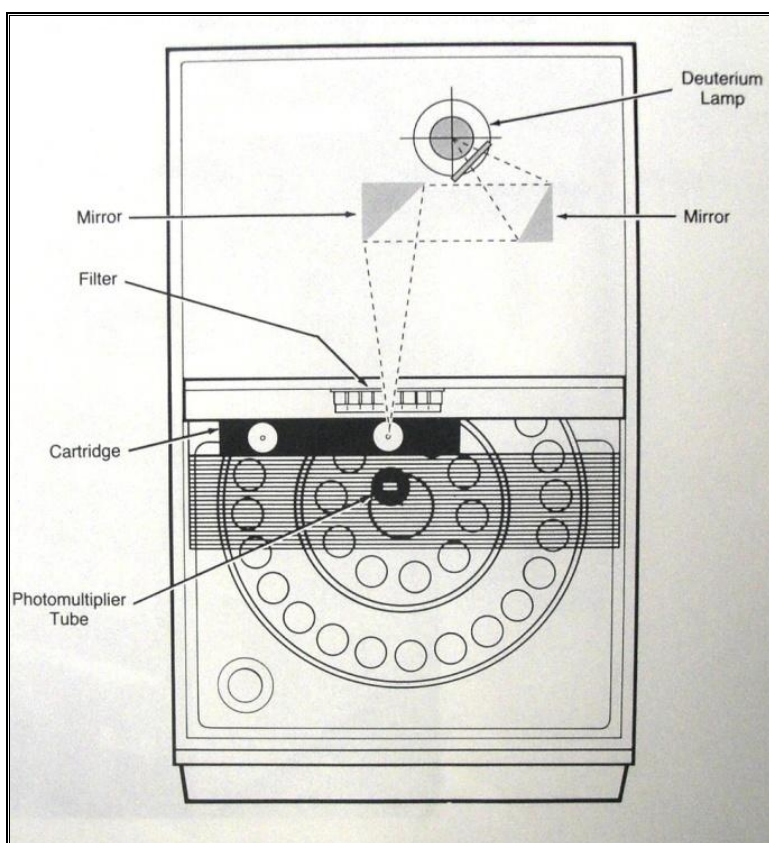


Figura 135: Complesso ottico e autocampionatore.

➤ Preparazione dei carrier

Le fasi elettrolitiche per la separazione degli ioni sono differenti a seconda della carica elettronica dei componenti che si vogliono analizzare. Per la separazione dei cationi il carrier è composto da imidazolo 23 mM e acido citrico 30 mM in acqua ultrapura. Nella separazione degli anioni invece si utilizza un carrier composto da potassio dicromato ($K_2Cr_2O_7$ 18mM), acido borico (H_3BO_3 – 34 mM), dietilentriammina-DETA ($C_4H_{13}N_3$ – 1 mM) e sodio borato ($Na_2B_4O_7$ – 14 mM). Particolare attenzione in questa fase è stata rivolta nell'operare con il $K_2Cr_2O_7$ in quanto cancerogeno per inalazione.

3.3 SECONDO ESPERIMENTO - CONFRONTO TRA ACCESSIONI DIVERSE DI QUINOA

Il secondo esperimento ha riguardato tutte e cinque le accessioni di quinoa a nostra disposizione (UDEC9, BO78, PRJ, PRP e VI-1) messe a confronto in un unico esperimento. Lo scopo era quello di individuare, somministrando alcune concentrazioni di NaCl selezionate sulla base dei risultati del primo esperimento (150, 300 e 600 mM), le principali alterazioni morfologiche, fisiologiche e biochimiche delle 5 accessioni confrontate fra di loro e con il rispettivo controllo non trattato.

3.3.1 CONDIZIONI DI CRESCITA

Le 5 accessioni di *Chenopodium quinoa* BO78, UDEC9, PRP, PRJ e VI-1 sono state seminate e fatte crescere in terreni costituiti da sabbia e terriccio commerciale in rapporto 1:1, in vasi dal diametro di 6 cm. Le condizioni di luce e temperatura delle celle climatiche erano le stesse usate nel precedente esperimento. Quando non veniva fatto il trattamento con NaCl, le piante venivano irrigate con acqua.

3.3.2 TRATTAMENTI CON NaCl

A partire dal quarto paio di foglie vere, in questo caso 21 giorni dopo la semina (DAS), si è cominciato ad irrigare le piante con dosi crescenti di NaCl, partendo da 50 mM e con aumenti di 50 mM per volta. Dopo tre annaffiature, e raggiunta la concentrazione di 150 mM, raddoppiando la concentrazione è stata raggiunta la concentrazione finale per il trattamento a 300 mM. Infine, aumentando ancora la concentrazione nei due trattamenti successivi di 150 mM per volta, si è raggiunto l'ultimo dosaggio previsto di 600 mM.

Le 5 accessioni di quinoa sono state quindi mantenute in condizioni di salinità per un periodo di altri 21 giorni come indica la seguente tabella.

Data	Azioni	150	300	600
24-mar	tratt-foto	50	50	50
26-mar	tratt-foto	100	100	100
29-mar	tratt-foto-	150	150	150

31-mar	tratt-foto	150	300	300
02-apr	tratt-foto	150	300	450
05-apr	tratt-foto-	150- 7DAT	150	600
07-apr	tratt-foto	150	150-7DAT	600
09-apr	tratt-foto	150	150	600
12-apr	tratt-foto-	150- 14DAT	150	600-7DAT
14-apr	tratt-foto	150	150-14DAT	600
16-apr	tratt-foto	150	150	600
19-apr	tratt-foto-	150-21- DAT	150	600-14DAT
21-apr	tratt-foto		150-21DAT	600
23-apr	tratt-foto			600
26-apr	tratt-foto-			600-21DAT

Tabella 6: Calendario dei trattamenti del secondo esperimento.

Le piante sono state annaffiate 3 volte a settimana, somministrando in ogni tesi la relativa concentrazione di NaCl. In questo esperimento non è stata somministrata la soluzione di Hoagland per via della presenza del terriccio come fonte di elementi nutrienti .

L'esperimento è stato terminato al 21° giorno dal raggiungimento della concentrazione salina prestabilita.

Al raggiungimento del 21° DAT, vi erano 25 piante per ogni tesi (NaCl 0, 150, 300, 600 mM) sulle quali effettuare le misurazioni morfo-funzionali. I dati ottenuti per le diverse misurazioni sono stati normalizzati per confronto con il controllo (0 mM NaCl).

3.3.3 MISURE MORFOLOGICHE

➤ **Analisi della crescita**

L'analisi della crescita in altezza nelle accessioni BO78, UDEC9, PRP, PRJ e VI-1 sono state condotte 3 volte a settimana, sulle le medesime 5 piante campione selezionate a tale scopo.

Le misure sono iniziate 2 settimane prima della somministrazione del trattamento salino e si sono concluse al 21° giorno del raggiungimento della concentrazione stabilita per ogni trattamento (21 DAT).

➤ **Peso fresco e secco**

La determinazione del peso fresco e del peso secco è stata condotta sulle 5 accessioni di quinoa al raggiungimento del 21° giorno di trattamento (21 DAT) nella maniera descritta per l'esperimento precedente (I esperimento). Di ogni trattamento sono state raccolte 8 piante.

➤ **Misura dell'area e densità stomatica**

Le dimensioni e la densità degli stomi sono state misurate come descritto precedentemente.

Per ognuna delle 4 concentrazioni di sale con cui sono state trattate le 5 accessioni di quinoa, compreso il controllo (0 mM NaCl), si è raccolta 1 foglia per pianta da 4 piante diverse. Le foglie sono state raccolte da una posizione intermedia in modo da effettuare le analisi su campioni di pari età. La raccolta dei campioni è avvenuta a 21 DAT di ciascun trattamento.

➤ **Misura della densità delle ghiandole del sale**

La raccolta dei campioni fogliari è avvenuta a 21 DAT di ciascun trattamento. Le ghiandole del sale sono state osservate al microscopio come descritto precedentemente.

➤ **Misura dell'area fogliare**

Al raggiungimento del 21° giorno del trattamento, sono state scannerizzate su foglio bianco le foglie dei diversi trattamenti per ognuna delle 5 accessioni analizzate. La misura è stata condotta prendendo da 4 diverse piante per

trattamento, una foglia apicale, una intermedia ed una basale. In seguito, utilizzando il software Image-J[®] è stata calcolata la superficie fogliare media per trattamento in mm².

3.3.4 DETERMINAZIONI BIOCHIMICHE

➤ Contenuto di prolina

La determinazione del contenuto di prolina è stata condotta come descritto nel primo esperimento.

3.4 ANALISI STATISTICA

I dati raccolti in questa tesi sono stati inizialmente elaborati con diversi strumenti statistici. Per ogni gruppo di dati è stata calcolata la media, la varianza, e la deviazione standard. Successivamente è stato applicato lo strumento statistico ANOVA (ANalysis Of VAriance) ad una via. L'ANOVA è uno strumento che permette di effettuare la comparazione fra le misure della media e della varianza riscontrate fra due o più popolazioni (insiemi di dati) che abbiano la stessa variabile indipendente.. Si tratta di una estensione del t-test per i dati di cui si vuole confrontare le medie, sotto la stessa ipotesi nulla e con lo stesso livello di significatività.

Il programma in uscita restituisce 3 valori:

1. La varianza tra le variabili (varianza vera);
2. La varianza all'interno delle variabili (errore di varianza);
3. Il rapporto tra la varianza vera e l'errore di varianza.

Pertanto questo test è stato utilizzato, accettando una percentuale di falsi positivi del 5%, per determinare se le variabili analizzate fossero o no significativamente differenti tra loro. Le variabili senza differenza significativa sono state indicate con la medesima lettera, mentre le variabili significativamente differenti sono state indicate con lettere diverse.

4. RISULTATI

PARTE PRIMA - ACCESSIONE BO78

1. ANALISI DELLA CRESCITA IN ALTEZZA

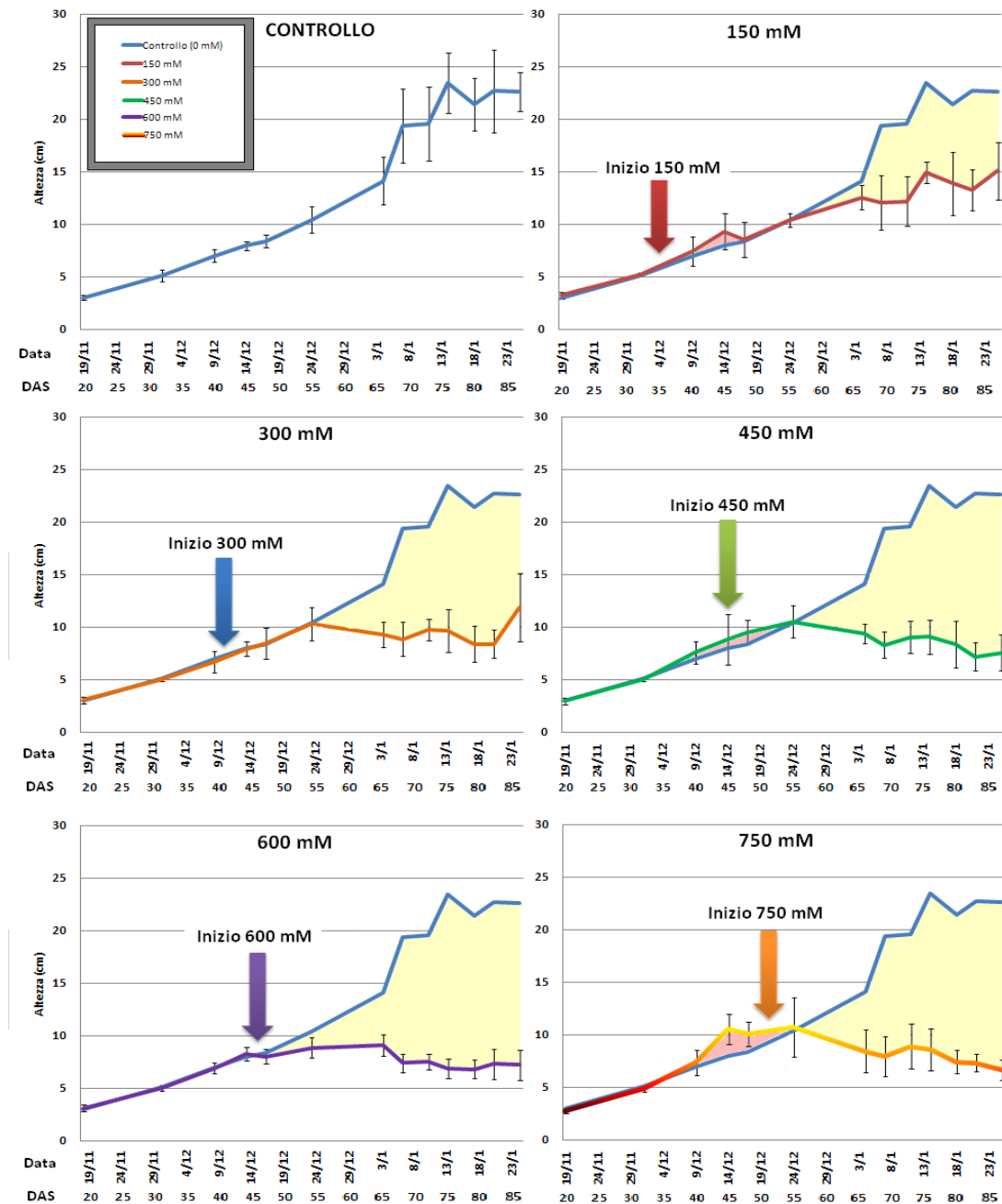


Figura 146: Crescita in altezza assoluta (cm) dell'accessione di quinoa BO78, trattata con diverse concentrazioni di NaCl. Nel grafico le due ascisse riportano

rispettivamente, la data di misurazione e il giorno dalla semina (DAS). La freccia indica il giorno in cui è stata raggiunta la concentrazione stabilita per ogni trattamento.

La crescita delle piante innaffiate con diverse concentrazioni saline (NaCl 150, 300, 450, 600, 750 mM e controllo 0 mM) è stata calcolata anche come differenza in altezza rispetto al relativo controllo, durante il periodo di trattamento durato 35 giorni (Figura 17).

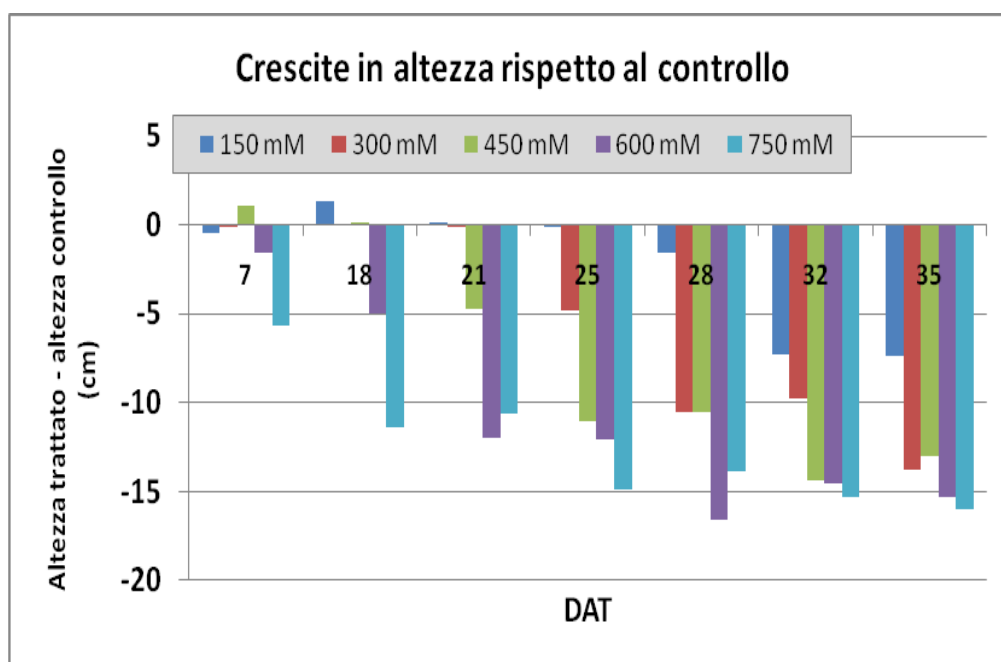


Figura 157: Differenza in altezza del trattato rispetto al controllo durante i 35 giorni di trattamento salino (35 DAT).

Come mostrato nella figura, fino a 18 DAT la crescita è rallentata rispetto al controllo soltanto alle concentrazioni più elevate di sale (600 e 750 mM); la concentrazione più bassa inizia ad avere effetto a 28 DAT. La differenza in altezza tra piante trattate e controlli aumenta nel tempo. A fine esperimento si osserva che le piante trattate con 150 mM NaCl sono più basse dei controlli, anche se la riduzione è molto inferiore a quella osservata con le concentrazioni più alte di sale.

➤ Velocità di crescita

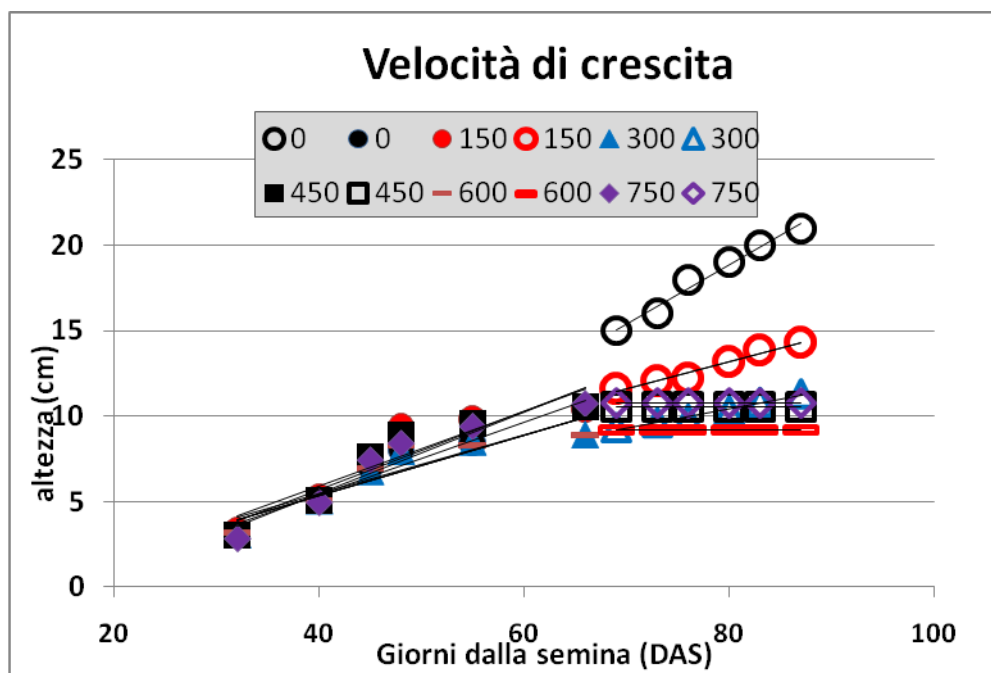


Figura 18: Velocità di crescita in altezza (cm) delle piante prima e dopo il trattamento con le diverse concentrazioni di NaCl. Inizio trattamenti: 34 DAS e concentrazione finale massima (750 mM) raggiunta dopo 17 giorni. Le rette sono state divise in due fasi: quelle in cui l'effetto non è ancora evidente ("PRE") e quelle in cui l'effetto diventa evidente ("POST").

Si osserva un sostanziale rallentamento della crescita in altezza, espressa in funzione dei giorni dalla semina (DAS), che permette d'individuare una fase "pre" e una "post" (Figura 18). Il grafico mostra che per un periodo piuttosto lungo dopo l'inizio del trattamento salino, e anche dopo il raggiungimento della concentrazione di NaCl stabilita, tutte le piante hanno la stessa crescita in altezza, dato confermato dalla similitudine dei coefficienti angolari delle relative rette d'interpolazione (vedi tabella sottostante). Invece, a partire da circa 65 DAS, che corrisponde a circa 30 giorni dall'inizio del trattamento salino, si osserva una sostanziale diminuzione dell'accrescimento all'aumentare della concentrazione. Le piante cresciute per 21 giorni alle dosi più alte (450, 600 e 750 mM) hanno evidenziato una crescita prossima ai 0 cm/giorno (Figura 16).

I coefficienti angolari delle rette d'interpolazione, come di seguito riportato, indicano la velocità di crescita espressa in cm al giorno. Sono state costruite due rette interpolanti per ognuna delle due fasi. E' evidente l'effetto inibente del sale sulla crescita.

FASE	0	150 mM	300 mM	450 mM	600 mM	750 mM
"PRE"	0,214	0,219	0,175	0,228	0,171	0,237
"POST"	0,345	0,160	0,113	-3E-15	0	0

Tabella 7: Coefficienti angolare "PRE" e "POST" effetto sulla crescita.

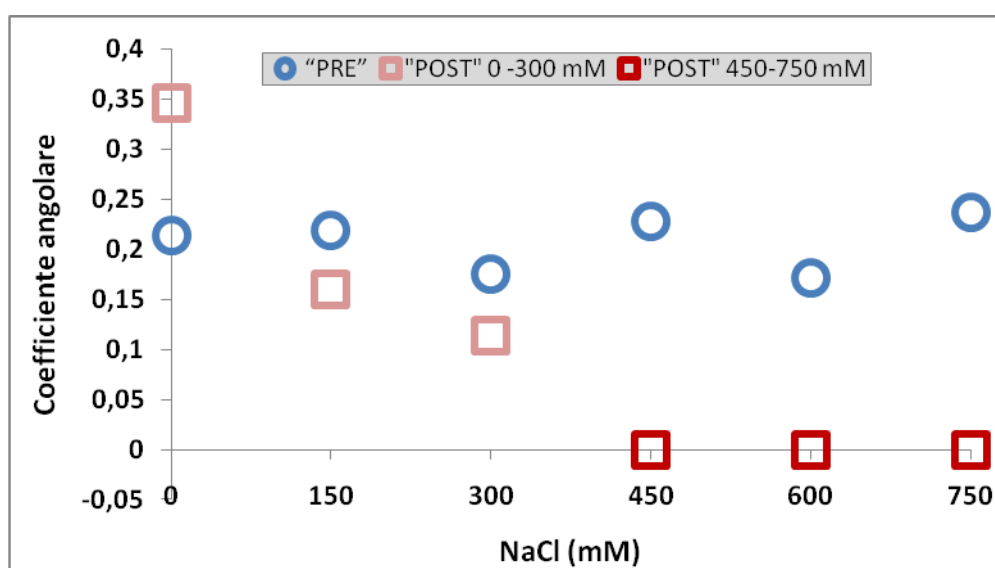


Figura 19: Grafico che rappresenta i coefficienti angolari delle rette d'interpolazione della crescita nel tempo dell'accesione di quinoa BO78. Ad ogni concentrazione salina è indicata in blu la velocità di crescita media prima che il sale abbia influito sulla crescita, ed in rosso la velocità di crescita media rallentata dallo stress salino.

Questi risultati indicano che la quinoa, pur essendo tollerante a dosi elevate di sale come evidenziato dalla bassissima mortalità (dati non riportati), risponde con una forte riduzione della crescita in altezza allo stress salino.

2. PESO FRESCO E PESO SECCO

La misura è consistita nel prelievo e pesatura delle radici, del fusto e di tutte le foglie di ogni pianta. A tal scopo sono state pesate 10 piante per ognuno dei 7 trattamenti, compreso il controllo. Nelle figure sono riportate la media e la deviazione standard del peso fresco e secco di ogni pianta. Lettere diverse indicano differenze statisticamente diverse.

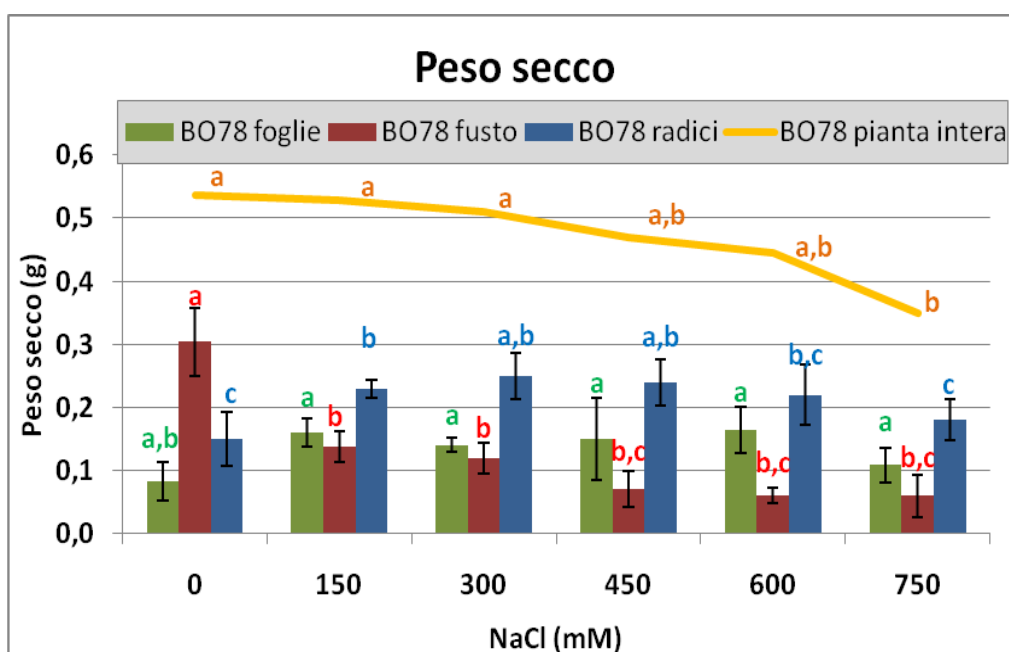
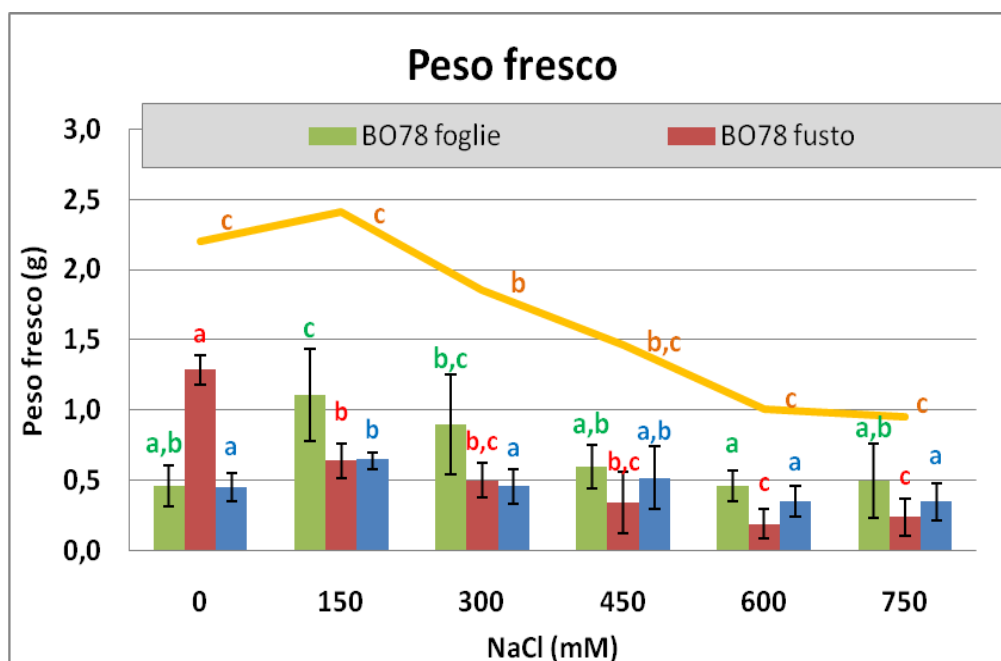


Figura 2016: Andamento del peso fresco e peso secco della pianta intera (somma dei singoli organi) e di foglie, fusti e radici separatamente durante i 35 giorni dall'inizio del trattamento con NaCl. I pesi si riferiscono alla media \pm deviazione standard (n=10) per singola piante.

I risultati relativi alla biomassa (Figura 20) mostrano un andamento caratteristico delle alofite. Infatti, per quanto riguarda il peso medio di una pianta, alla concentrazione di 150 mM di NaCl si ha una produzione di biomassa per pianta leggermente superiore a ciò che si è ottenuto nei terreni senza NaCl. Inoltre all'incremento della concentrazione da 150 a 600 mM, le piante di quinoa hanno risposto con una diminuzione di peso inversamente proporzionale al trattamento salino. Il peso medio delle piante a 600 – 750 mM di NaCl è molto simile, probabilmente indice del fatto che alla concentrazione 600 mM tutte le attività metaboliche erano già cessate, e che le piante stavano andando verso la morte.

Per quanto riguarda il peso dei singoli organi vegetali, c'è da notare che le foglie trattate presentavano un peso, sia fresco che secco, sempre maggiore del controllo, con l'incremento maggiore a 450 mM NaCl. Invece il fusto ha mostrato un decremento costante del peso fresco e secco all'aumentare della concentrazione salina. Infine le radici hanno mostrato un calo di peso fresco, ma non secco (dove invece i valori sono sempre uguali o superiori al controllo). Ciò dimostra che la radice risponde diversamente allo stress salino, e che il calo di peso fresco era principalmente dovuto alla perdita d'acqua, come confermato dal calcolo del rapporto peso secco/peso fresco che aumenta dal 32% nel controllo al 50% nei trattati con 750 mM NaCl (Figura 23). Nel caso delle foglie è interessante notare una tendenza all'aumento del rapporto peso secco/fresco alle concentrazioni di 450-600 mM, indice di un minor contenuto d'acqua dei tessuti fogliari e, perciò, di un possibile stress idrico che accompagna l'accumulo di sale. Anche nelle radici l'aumento di peso secco potrebbe essere dovuto all'accumulo di sale.

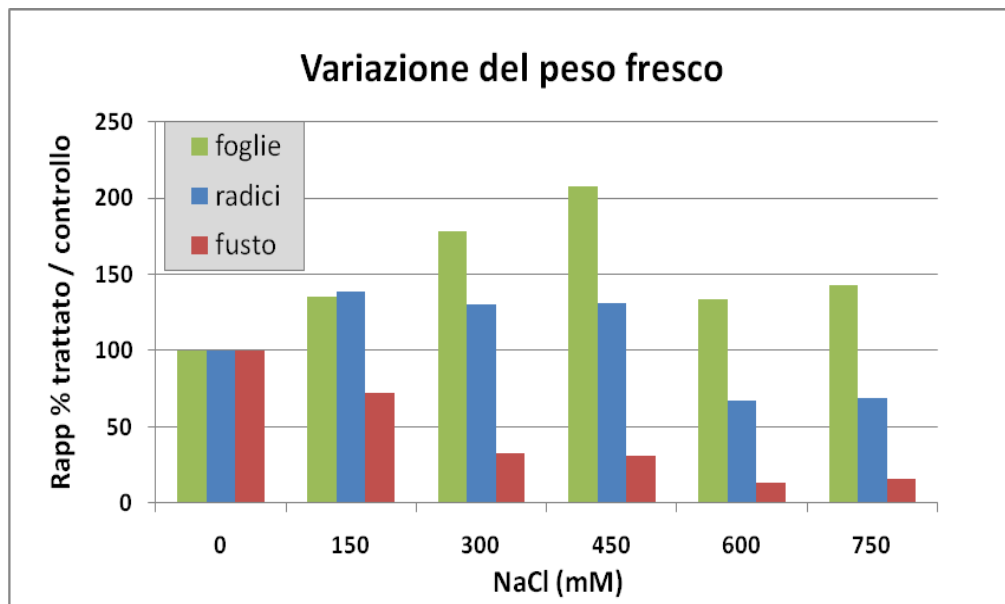


Figura 21: Variazione in termini percentuali del peso fresco medio dei diversi organi vegetali delle piante trattate sul peso fresco medio del controllo.

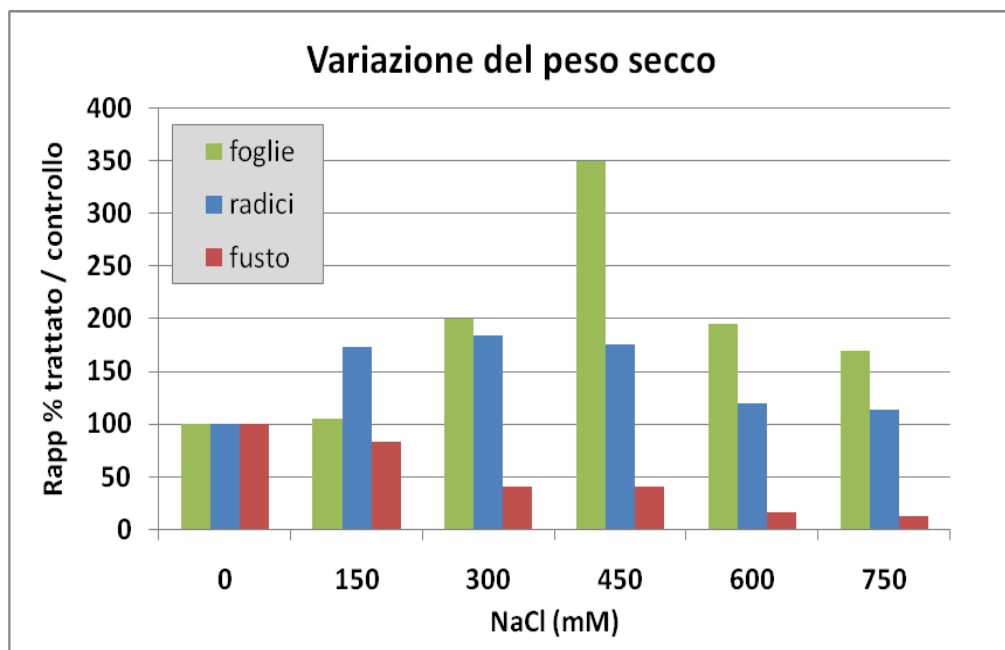


Figura 22: Variazione in termini percentuali del peso secco medio dei diversi organi vegetali delle piante trattate sul peso secco medio del controllo.

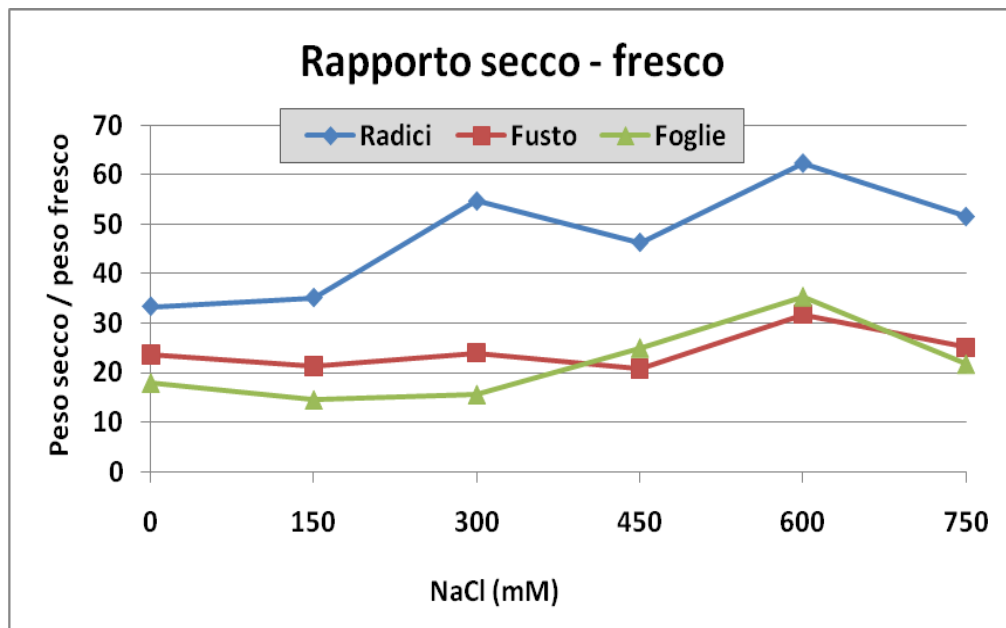


Figura 17: Rapporto percentuale del peso secco sul peso fresco dei diversi organi vegetali dell'accessione BO78, all'aumentare del trattamento salino.

➤ Rapporto biomassa radici / germoglio

Il rapporto tra la biomassa dei tessuti che hanno funzione di sostegno ed assorbimento (radici) e quelli che hanno funzioni nella crescita è importante nel valutare lo stato di salute della pianta. Piante con una maggiore percentuale di radici saranno in grado di competere in modo più efficace nell'importare nutrienti dal suolo, mentre quelle con una maggiore percentuale di parte aerea saranno in grado di captare più energia luminosa e CO₂, incrementando così l'attività fotosintetica. In caso di piante stressate, dovrebbe diminuire l'attività vegetativa e quindi il rapporto dovrebbe aumentare a favore delle radici.

Il rapporto radice-germoglio del controllo ci fornisce il valore in condizioni di terreno non salinizzato. Le variazioni dal livello del controllo possono fornire un indizio di un cambiamento nella salute generale delle piante.

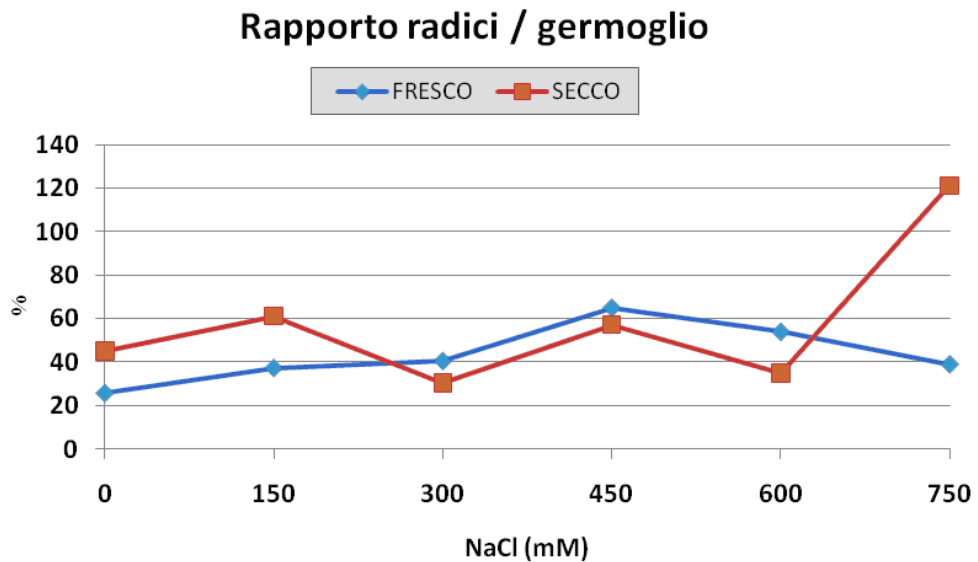
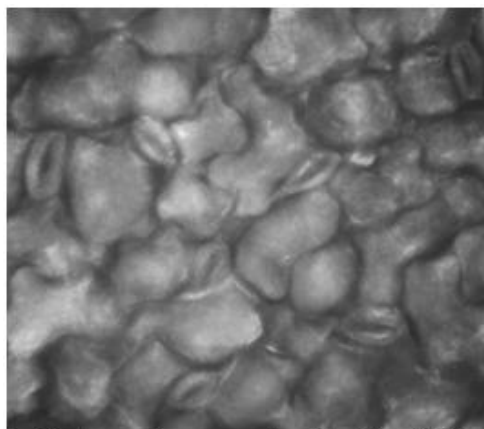


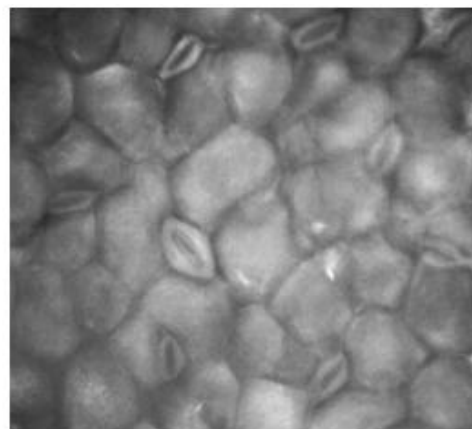
Figura 2418: Rapporto del peso fresco e secco tra radici e germoglio (foglie + fusto).

La Figura 24 ci mostra che la maggiore variazione (aumento) nel rapporto radice-germoglio si verifica alla concentrazione più alta di NaCl somministrata, e soltanto per quanto riguarda il peso secco. Rispetto al peso fresco, non si notano variazioni rilevanti, il che suggerisce che le piante non sono particolarmente sofferenti, anche se il ridotto peso fresco di fusto e radici alle concentrazioni più alte di NaCl non può essere ignorato.

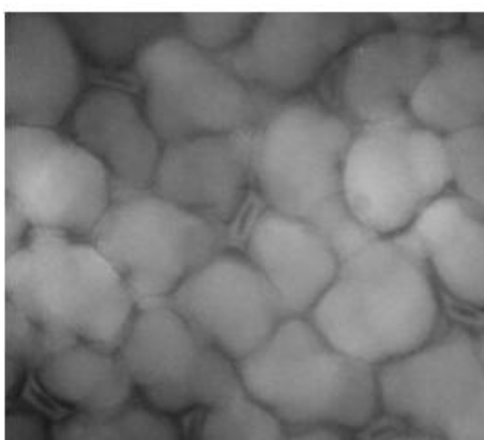
3. STOMI



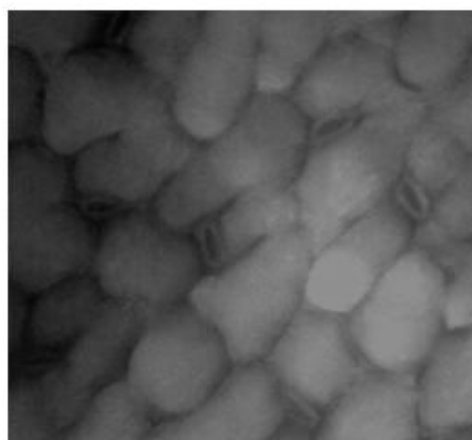
I riquadro: controllo (0 mM)



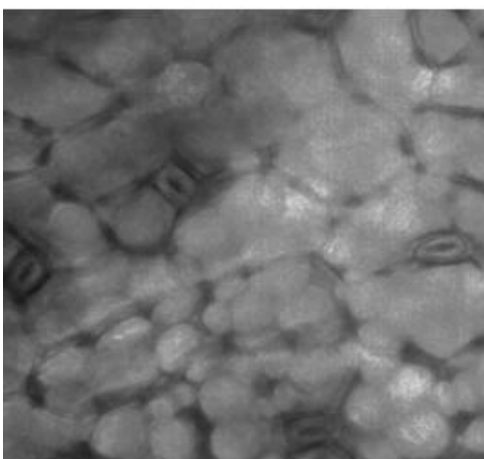
II riquadro: 150 mM



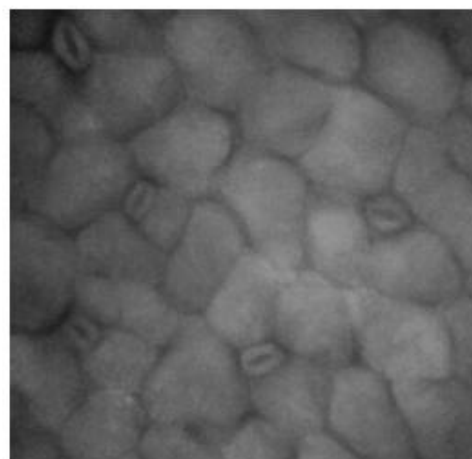
III riquadro: 300 mM



IV riquadro: 450 mM



V riquadro: 600 mM



VI riquadro: 750 mM

Figura 195: Foto degli stomi dell'accessioni BO78. I riquadri rappresentano una sezione della foto scattata al microscopio ottico della superficie fogliare ad un ingrandimento di 40 x.

➤ Densità stomatica

La densità (numero per unità d'area fogliare) degli stomi, e le loro dimensioni, riveste una grande importanza nell'assicurare un corretto controllo degli scambi gassosi e dei flussi di traspirazione in un ambiente iperosmotico. Con le fotografie scattate al microscopio ottico è stata calcolata la densità stomatica della pagina inferiore e superiore delle piante di BO78, espressa come numeri di stomi per millimetro quadrato di foglia.

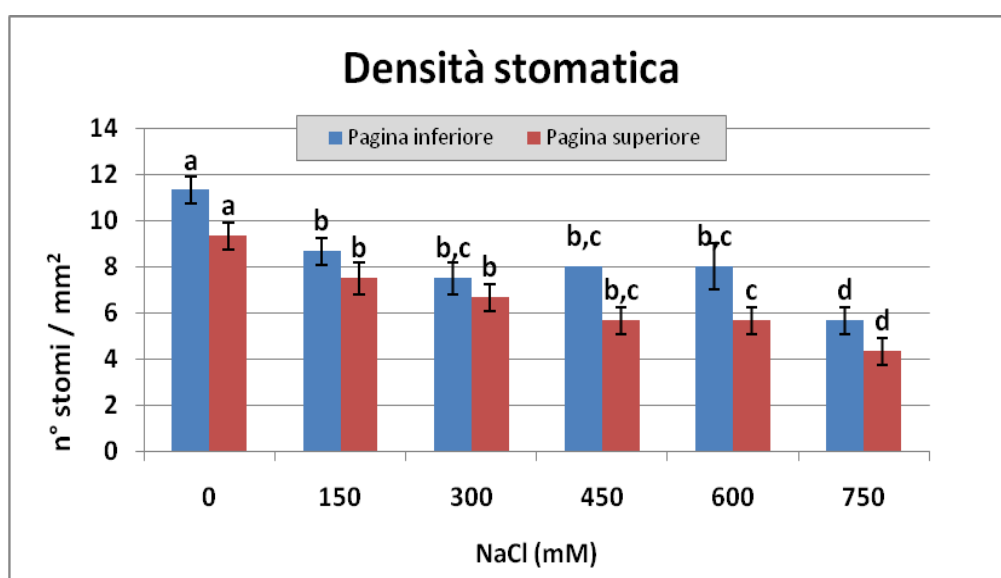


Figura 26: Densità stomatica (n° stomi / mm²) media (\pm dev. standard, n = 9) della pagina inferiore e superiore delle foglie di BO78. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative.

La figura 26 mostra che già a 150 mM NaCl vi è una diminuzione della densità stomatica su entrambe le superfici fogliari rispetto al controllo non trattato. Il valore cala ulteriormente soltanto alla concentrazione di 600 mM (pagina superiore) e su entrambi le superfici a 750 mM.

Il tasso di variazione della densità stomatica riscontrata nelle piante trattate può essere rapportato con il controllo. Questo restituisce una variazione percentuale del numero di stomi nelle foglie trattate rispetto al controllo (Figura 27).

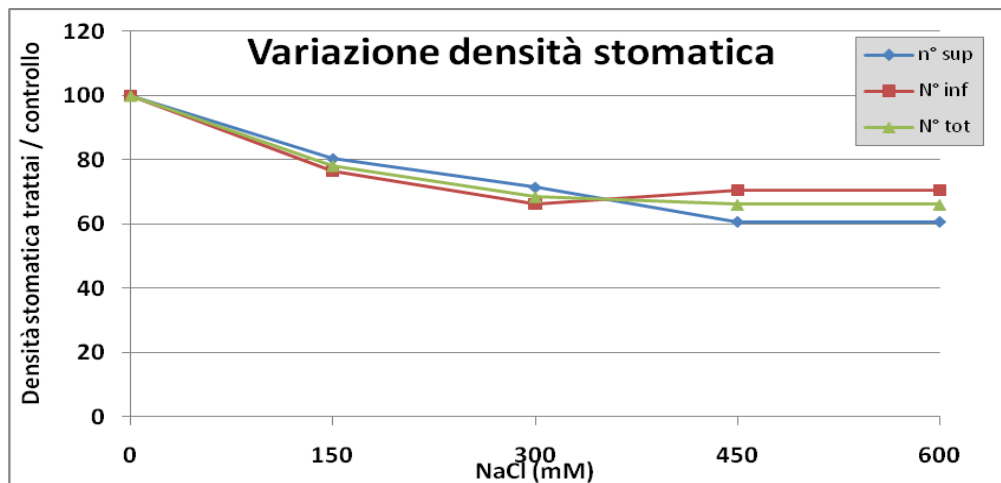


Figura 207 : Variazione percentuale della densità stomatica (pagina superiore, pagina inferiore, totale) nei trattati con sale rispetto ai controlli (controllo = 100%).

Nell'insieme, si osserva una diminuzione del numero di stomi, sia per la pagina superiore che quella inferiore (e quindi totale), nelle foglie esposte al trattamento salino, già a partire dalla concentrazione più bassa (150 mM), con un ulteriore leggero calo (fino a raggiungere circa il 70% del controllo) a 300 mM e successivamente senza variazioni di rilievo. Tale risposta è coerente con quanto ci si aspetta per una pianta esposta a stress salino, essendo un adattamento morfologico mirato a ridurre l'eccessiva perdita d'acqua attraverso l'evapotraspirazione stomatica. E' interessante notare che la risposta avviene già a una concentrazione piuttosto bassa di sale, concentrazione alla quale la pianta mostra di poter crescere, perlomeno in termini di biomassa (ma non in altezza), tanto quanto il controllo.

➤ Area stomatica

Utilizzando il software Image J[®], è stata calcolata l'area totale degli stomi presenti in un millimetro quadrato della pagina superiore ed inferiore. Dividendo questo valore per il numero medio della densità stomatica si è ottenuta l'area media di uno stoma.

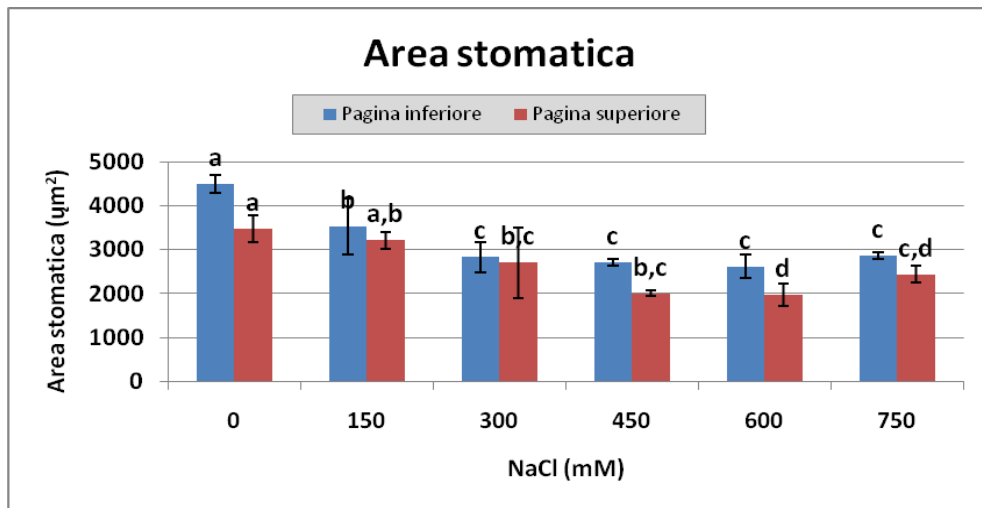


Figura 218: Area stomatica media (\pm dev. standard, n = 9).

L'area stomatica media maggiore si riscontra per il controllo non trattato con il sale, e cala nelle piante trattate con 150 mM NaCl. L'area diminuisce ulteriormente con 300 mM NaCl soprattutto nella pagina inferiore. Tra i trattamenti 300 mM e 750 mM il valore sembra stabilizzarsi per la pagina inferiore, mentre diminuisce ancora nella pagina superiore.

Per studiare accuratamente il trend di variazione dell'area stomatica media all'aumentare della concentrazione salina è stata quindi calcolata la percentuale di diminuzione dell'area dei trattati rispetto al controllo.

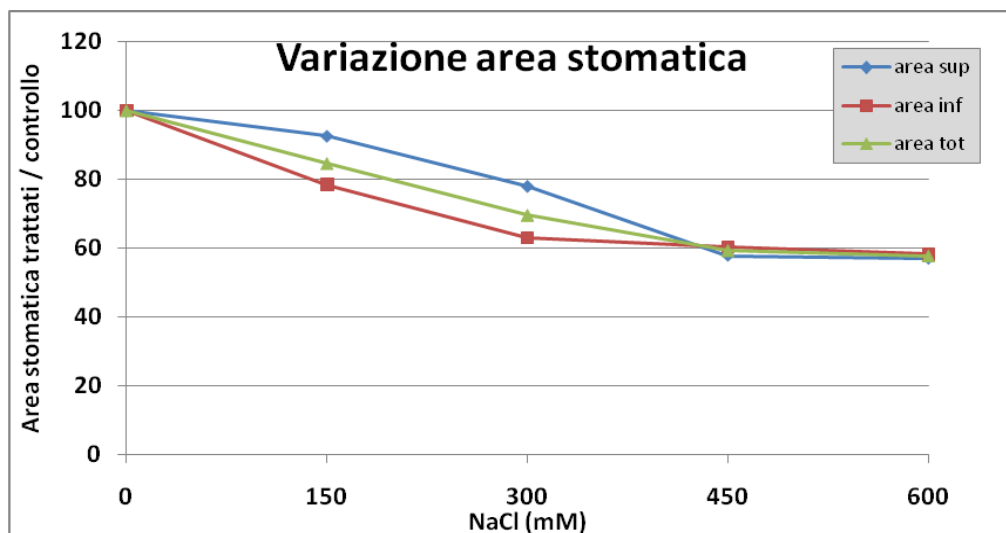


Figura 229: Variazione percentuale dell'area media stomatica nei trattati con sale rispetto al controllo.

L'area stomatica media della pagina inferiore diminuisce, all'aumentare del trattamento salino, con una variazione media del 7% (coefficiente angolare -0,068). L'area stomatica media della pagina superiore, all'aumentare del trattamento salino, diminuisce con un tasso del 6% (coefficiente angolare -0,06), mentre il valore dell'area stomatica totale, ovvero l'area media stomatica della pagina superiore sommata a quella della pagina inferiore, diminuisce con un tasso del 7% (coefficiente angolare -0,065). Alla concentrazione di 450 mM NaCl l'area media si è ridotta al 60% del controllo.

4. CONTENUTO DI CATIONI ED ANIONI

➤ **Concentrazione degli ioni interni ed esterni alla foglia in funzione del trattamento salino.**

Nei grafici, ciascuna barra rappresenta il contenuto totale dello ione. La sezione in blu indica la concentrazione nei tessuti delle piante (ioni interni), la parte in rosso indica la concentrazione nelle ghiandole del sale (ioni esterni), mentre il numero sugli istogrammi, indica la percentuale di ioni misurati nella frazione esterna rispetto al totale.

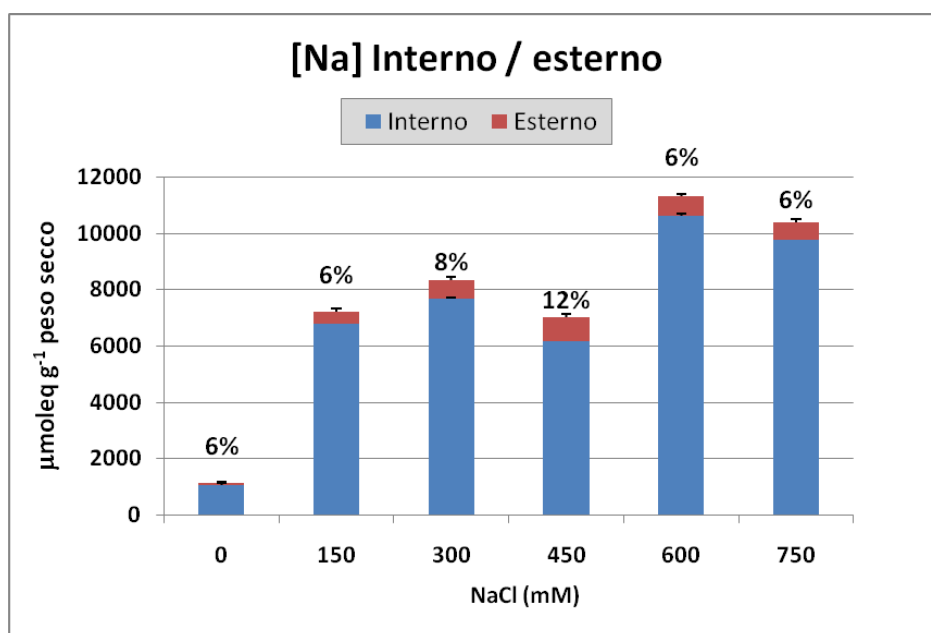


Figura 30: Concentrazione interna (nei tessuti) ed esterna (nelle ghiandole del sale) di sodio.

Lo ione più abbondante è il Na^+ : dal trattamento 150 mM al 450 mM la sua concentrazione aumenta da 6 a 7 volte, mentre da 600 mM a 750 mM aumenta di 9 – 10 volte rispetto al controllo. L'ammontare del catione nella frazione esterna alla foglia, quindi presumibilmente immagazzinato nelle ghiandole, si aggira tra il 6 e 12% della concentrazione totale.

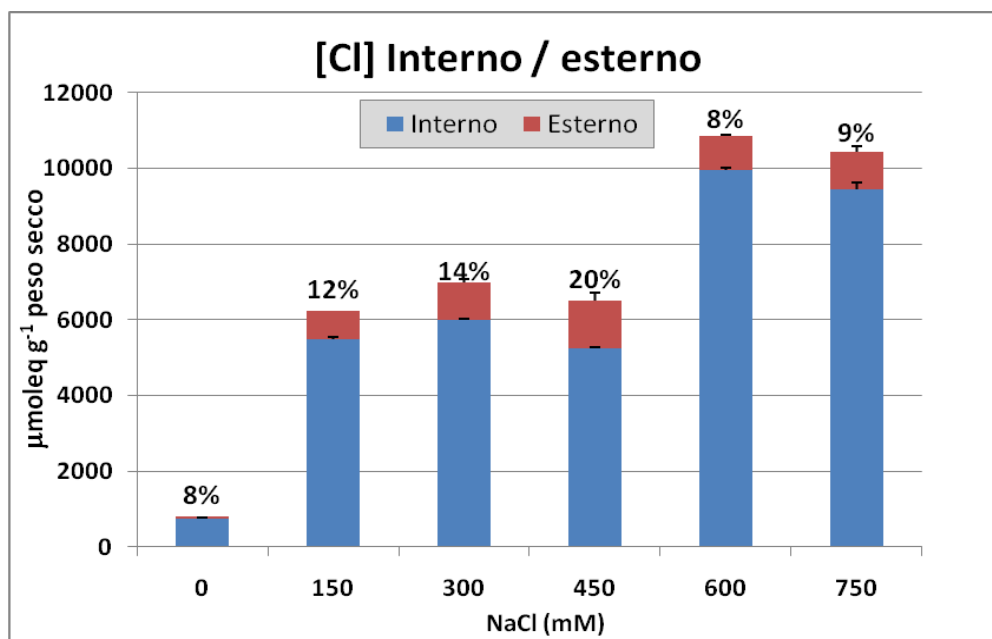


Figura 3123: Concentrazione interna ed esterna di cloro.

L'anione più abbondante è il Cl^- : la sua concentrazione, in funzione della concentrazione di NaCl somministrata, ha un andamento simile a ciò che si è osservato per il Na^+ . L'ammontare del Cl^- estromesso nelle vescicole del sale si aggira tra l'8 e il 20% rispetto al totale della concentrazione.

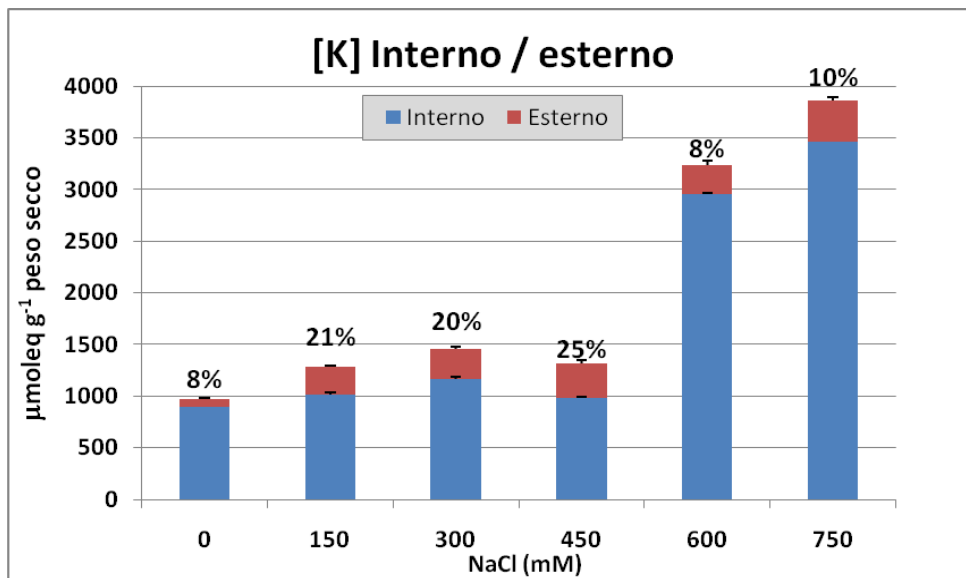


Figura 32: Concentrazione interna ed esterna di potassio.

Il K^+ è il secondo ione più abbondante: la concentrazione totale rimane simile tra i trattamenti 0 e 450 mM, mentre ha un significativo incremento tra il 600 e il 750 mM. L'ammontare del K^+ estruso nelle ghiandole del sale si aggira tra l'8 e il 21% rispetto alla concentrazione totale.

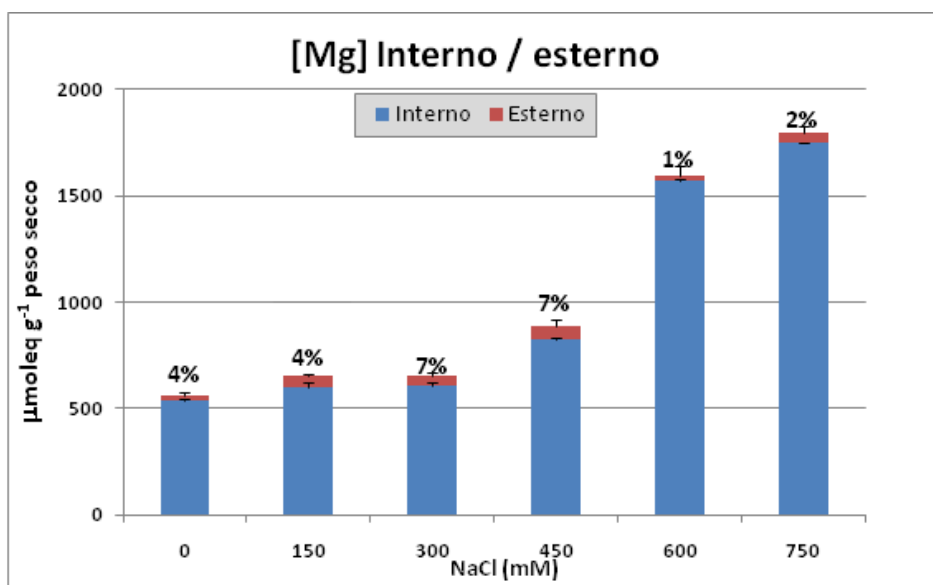


Figura 33: Concentrazione interna ed esterna di magnesio.

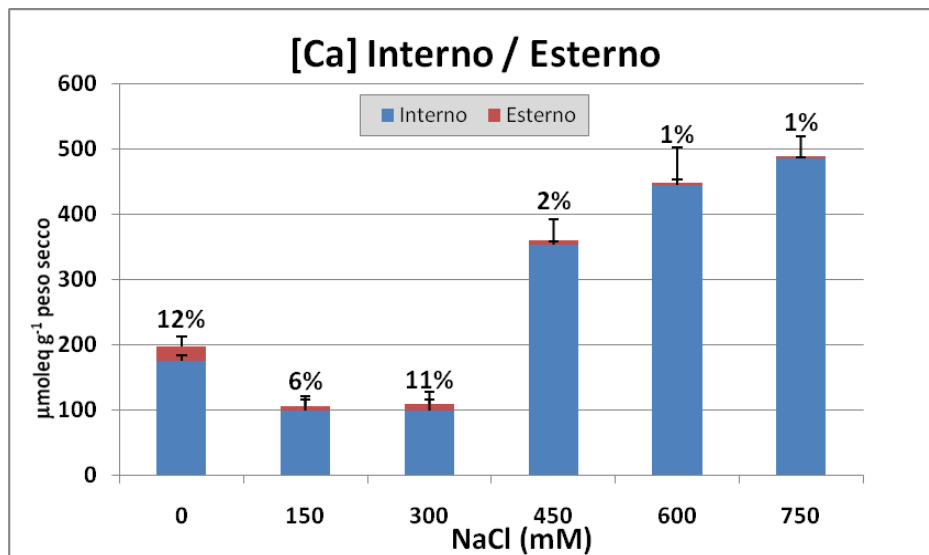


Figura 34: Concentrazione interna ed esterna di calcio.

A 600 e 750 mM sia il Mg^{+2} che il Ca^{+2} aumentano fino a oltre 3 volte rispetto al controllo. Alle basse concentrazioni di sale il Ca^{+} invece diminuisce di circa la metà, per poi subire un'impennata a 450 mM NaCl. La quasi totalità di questi cationi si ritrovano nella frazione tissutale e non esterna.

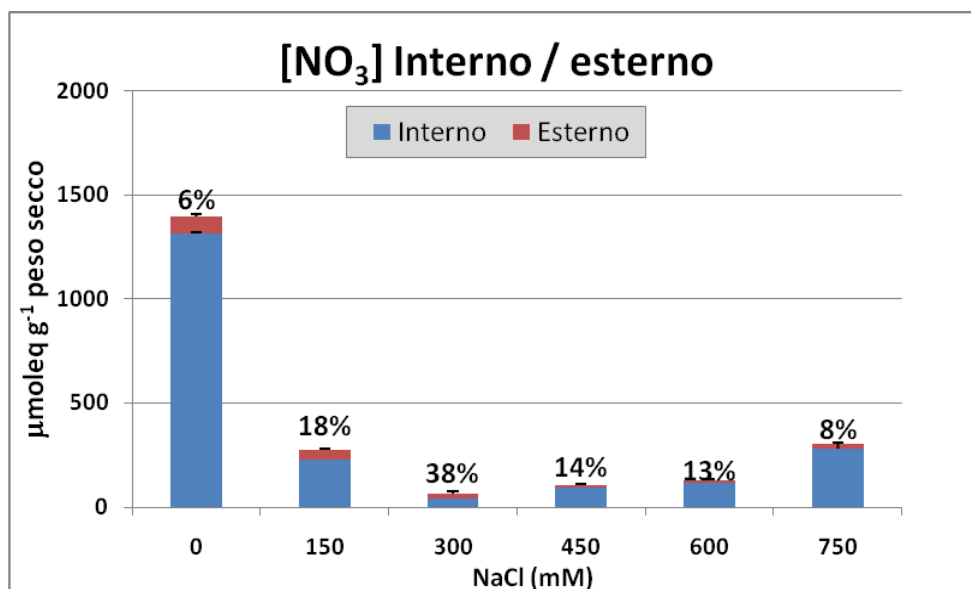


Figura 35: Concentrazione interna ed esterna dell'anione nitrato.

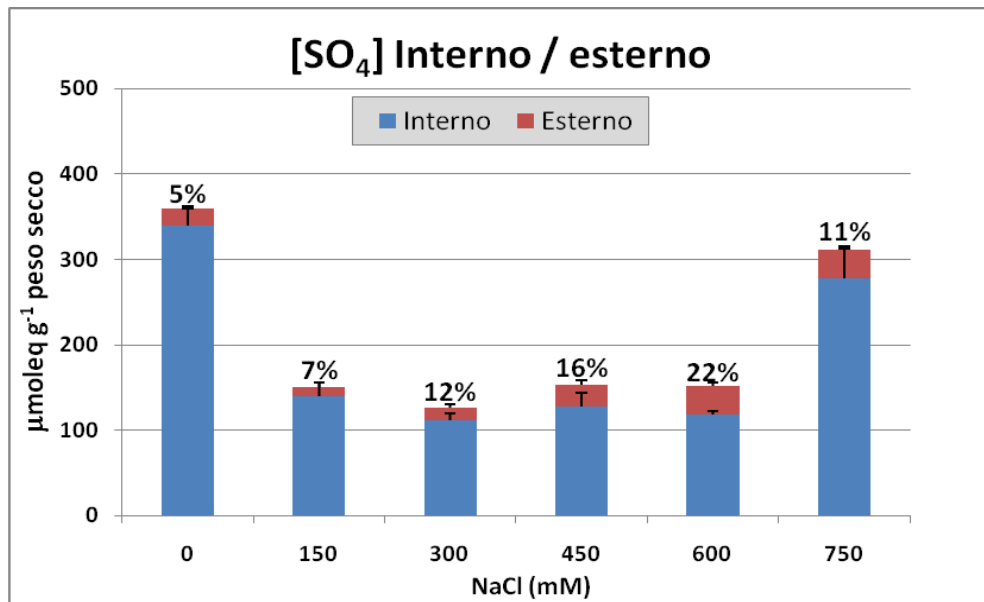


Figura 36: Concentrazione interna ed esterna dell'anione solfato.

Sia il nitrato che il solfato si riducono fortemente nelle foglie delle piante trattate con sale. Questo andamento suggerisce una probabile riduzione nella capacità di assorbimento dei nutrienti da parte delle radici sotto stress salino. Inoltre la sintesi *ex novo* di proteine specifiche, enzimatiche e non, in condizioni di stress, in questo caso l'elevata salinità, può contribuire a ridurre il contenuto citosolico dei nitrati liberi e del solfato (quest'ultimo per la biosintesi di amminoacidi contenenti zolfo).

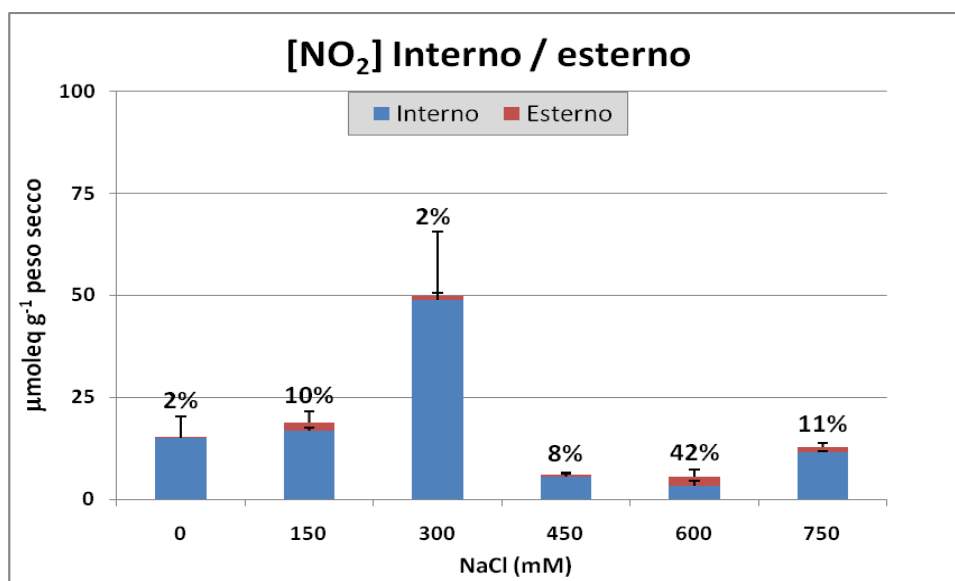


Figura 37: Concentrazione interna ed esterna dell'anione nitrito.

Questo ione è stato determinato con l'obiettivo di accertare la qualità del campione: la concentrazione inferiore a 50 meq g^{-1} PS indica l'assenza di processi riduttivi durante la loro preparazione e conservazione. Il nitrito è uno ione minore, non rilevante nel processo di neutralizzazione sia nei tessuti vegetali, sia all'interno delle vescicole del sale.

➤ **Composizione ionica delle frazioni esterne ed interne della foglia in funzione della concentrazione salina**

La percentuale di ciascuno ione rispetto al totale degli ioni misurati è mostrata nelle figure sottostanti sia per la frazione interna (Fig. 38) sia per quella esterna (Fig. 39).

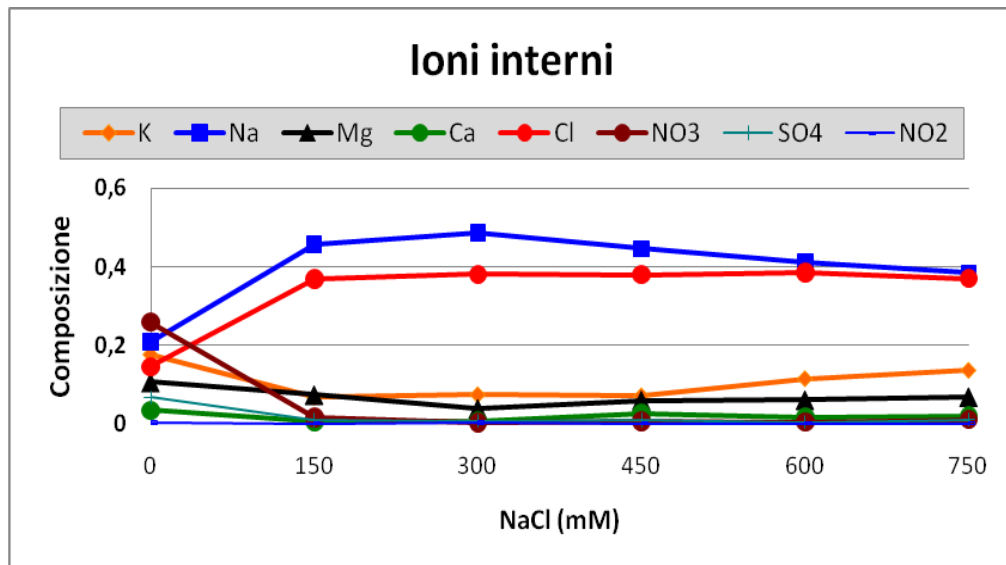


Figura 38: Composizione in percentuale degli ioni misurati nei tessuti fogliari in funzione della concentrazione salina.

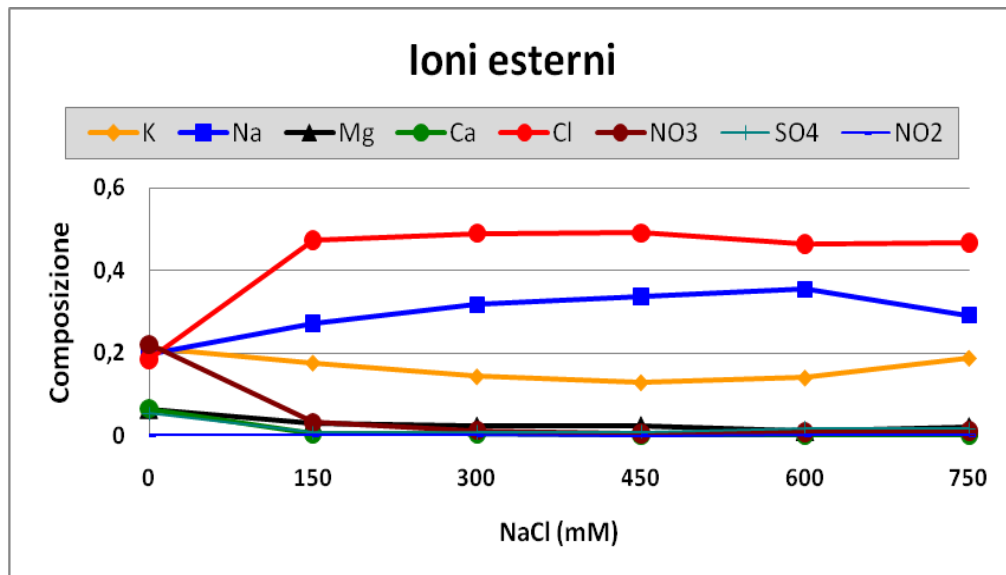


Figura 39: Composizione in percentuale degli ioni misurati nelle ghiandole del sale (frazione esterna ai tessuti fogliari) in funzione della concentrazione salina.

I tessuti fogliari del controllo (0 mM) mostrano una composizione ionica equilibrata, mentre sotto trattamento salino il contenuto ionico delle foglie varia fortemente: sono prevalenti i due ioni forniti esogenamente, Na^+ e Cl^- , che costituiscono complessivamente il 75-85% della concentrazione ionica totale, mentre la concentrazione relativa degli altri ioni (tranne Ca^{+2} e Mg^{+2}) diminuisce considerevolmente. Alcuni ioni (es. K^+) calano poi risalgono leggermente alle alte concentrazioni di NaCl.

Come osservato per i tessuti interni, sotto trattamento salino il contenuto ionico delle vescicole del sale è dominato da Na^+ e Cl^- con l'anione che risulta essere più abbondante del catione. Rappresentano assieme circa il 70-80% della concentrazione ionica totale. Il contributo relativo di tutti gli altri ioni, eccetto il Mg^{+2} , diminuisce nei trattati con NaCl già alla concentrazione di 150 mM. Anche il K^+ tende a diminuire fino a 600 mM, poi risale ai livelli del controllo.

➤ **Ripartizione dei principali ioni nella pianta in funzione del trattamento salino**

La concentrazione dei principali cationi ed anioni è stata misurata separatamente nelle foglie prossime all'apice caulinare (AL), nelle foglie basali (BL), e nel fusto (ST).

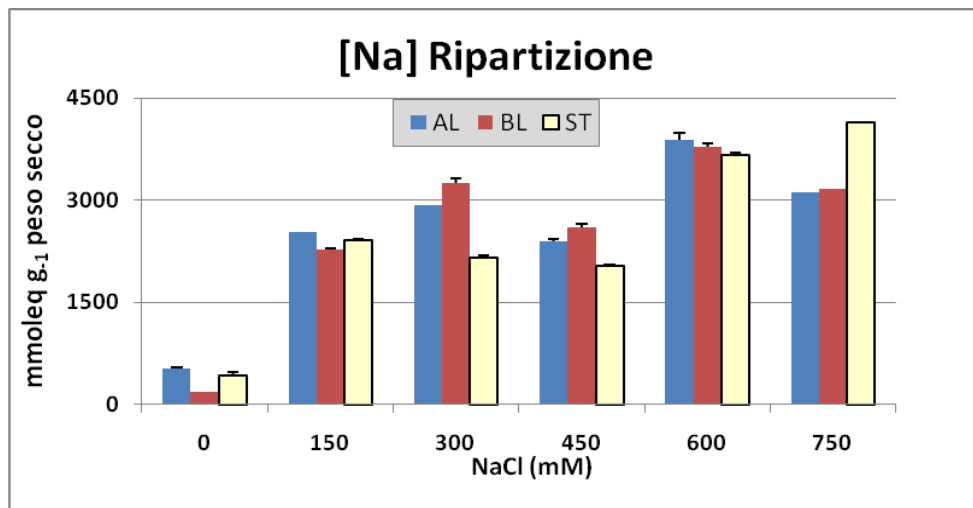


Figura 40: Ripartizione del catione Na^+ nei diversi organi all'aumentare della concentrazione salina.

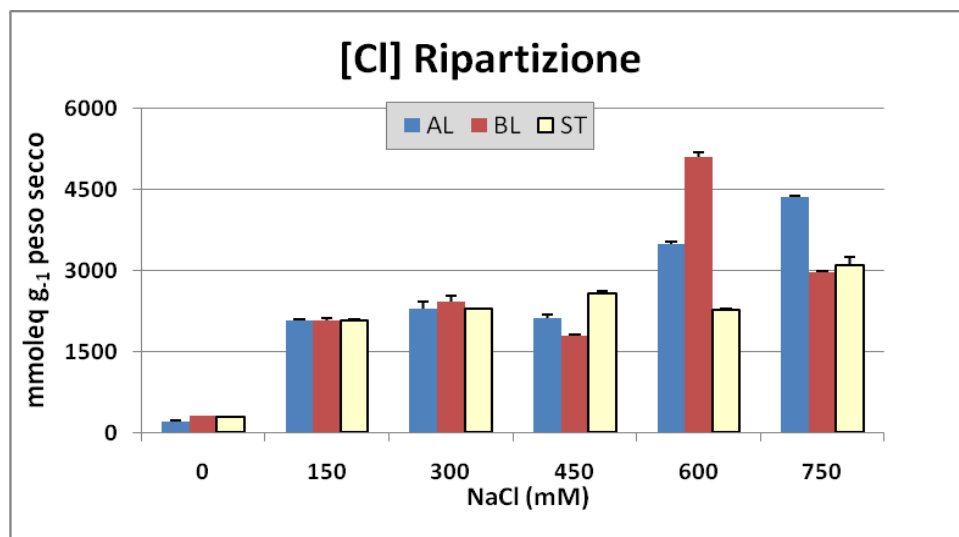


Figura 41: Ripartizione dell'anione Cl^- nei diversi organi all'aumentare della concentrazione salina.

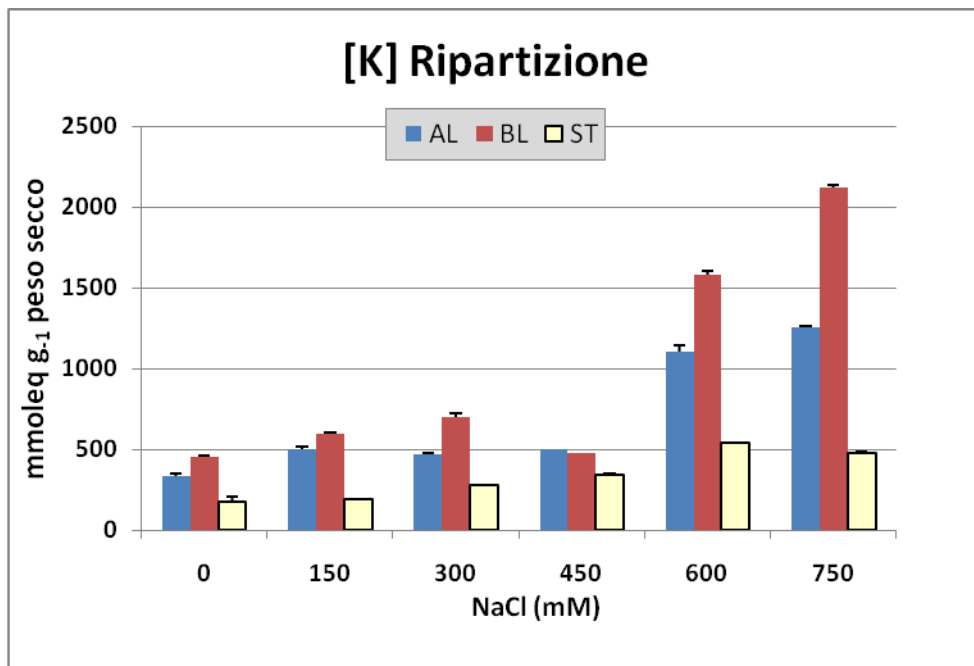


Figura 42: Ripartizione del catione K^+ nei diversi organi all'aumentare della concentrazione salina.

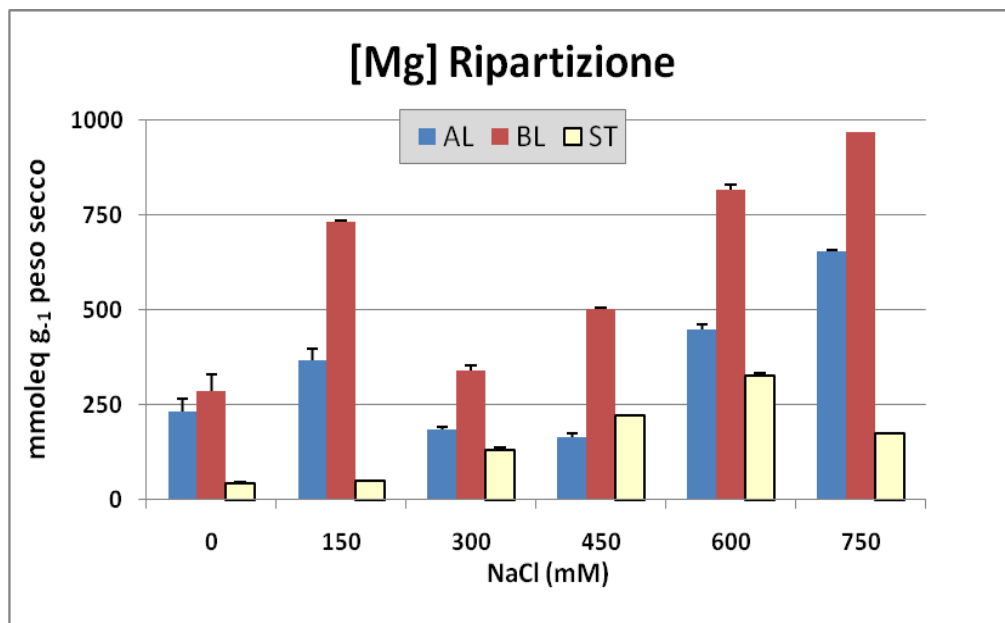


Figura 43: Ripartizione del catione Mg^{+2} nei diversi organi all'aumentare della concentrazione salina.

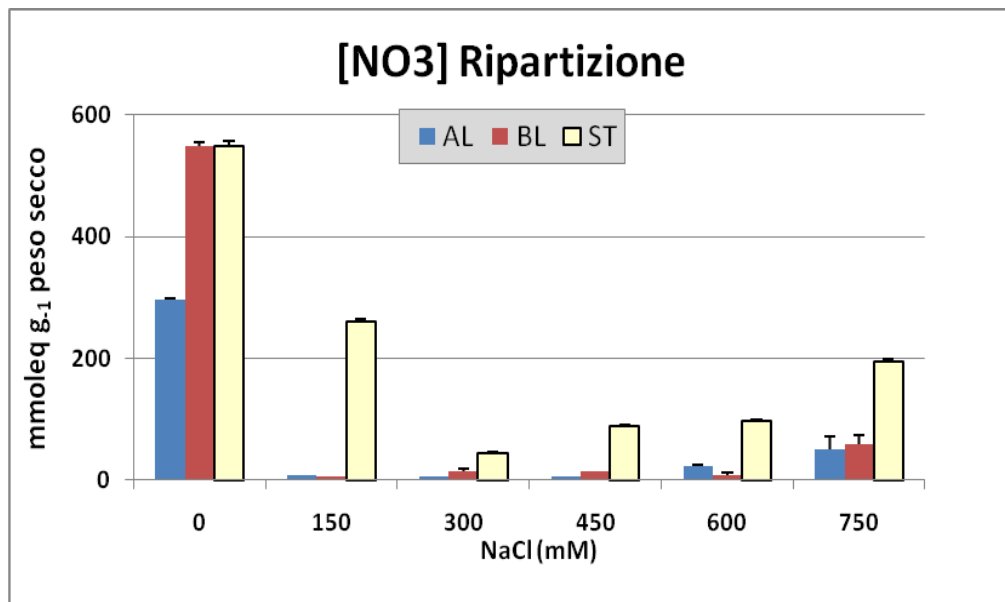


Figura 44: Ripartizione del nitrato nei diversi organi all'aumentare della concentrazione salina.

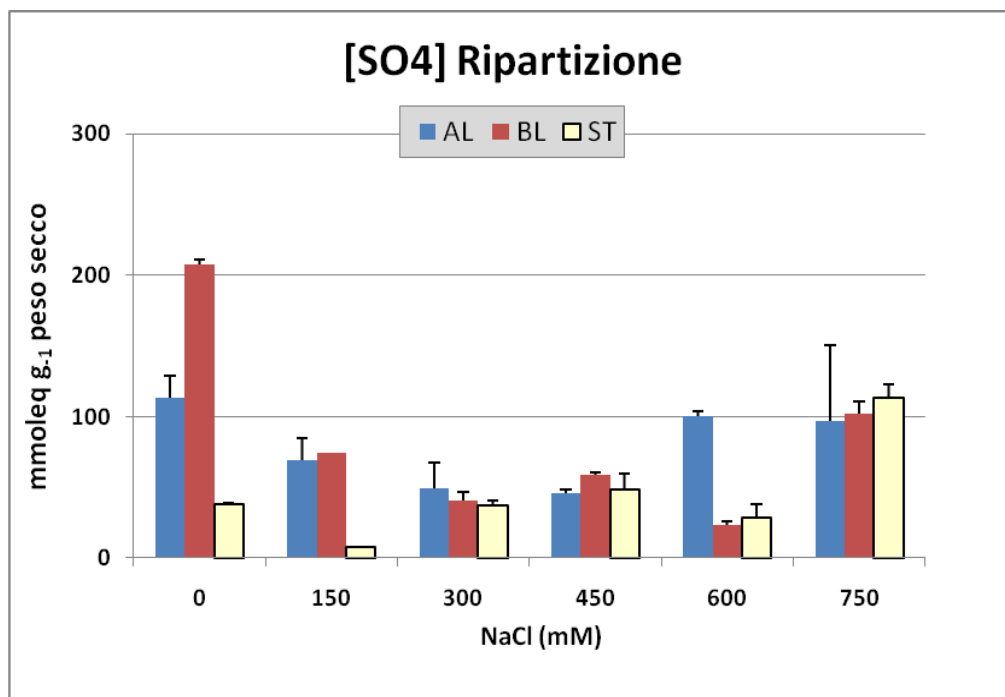


Figura 45: Ripartizione del solfato nei diversi organi all'aumentare della concentrazione salina.

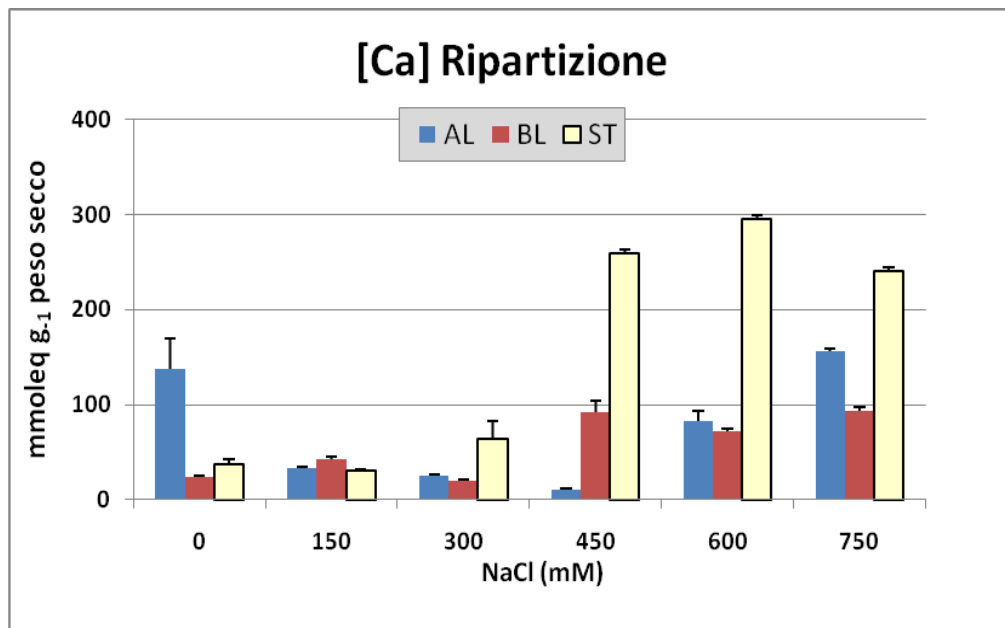


Figura 46: Ripartizione del catione Ca^{+2} nei diversi organi all'aumentare della concentrazione salina.

La concentrazione dei due ioni forniti esogenamente aumenta notevolmente già alla dose di 150 mM NaCl in tutte le porzioni (foglie apicali e basali, e fusto), e poi resta pressoché costante. In tutti i trattamenti, la quantità di Na^+ e Cl^- è simile nelle tre porzioni esaminate. Al contrario, il K^+ si accumula di più nelle foglie che nel fusto, e maggiormente in quelle basali; la sua concentrazione non si discosta da quella del controllo fino a 450 mM di NaCl, per poi aumentare fortemente (fino a 4 volte nelle foglie basali di piante trattate con 750 mM NaCl). Anche il Mg^{+2} è molto più abbondante nelle foglie che nel fusto e mostra una tendenza ad aumentare con l'aumentare della concentrazione di NaCl. Il calcio mostra una risposta complessa: alle alte concentrazioni di NaCl è molto più abbondante nel fusto che nelle foglie; nelle foglie apicali lo ione inizialmente diminuisce con l'aumentare delle dose di sale per poi tornare ai livelli del controllo (a 750 mM), mentre aumenta nelle foglie basali e, in maniera quasi esponenziale nel fusto, a partire dal trattamento con 450 mM NaCl.

Il nitrato è molto abbondante nelle foglie apicali ma ancor più nelle foglie basali e nel fusto del controllo. Il contenuto di NO_3^- crolla bruscamente nei trattamenti salini 150 e 300 mM NaCl, per poi ritornare a crescere leggermente aumentando la concentrazione del trattamento. Il contenuto di nitrato nel fusto è sempre molto maggiore rispetto alle foglie in tutti i trattamenti somministrati.

Il contenuto di solfato diminuisce progressivamente all'aumentare del trattamento salino, fino alle concentrazioni di 300 - 450 mM NaCl, per poi mostrare un nuovo incremento nei trattamenti 600 - 750 mM NaCl.

Neutralizzazione

In qualsiasi campione idrico l'ammontare totale degli anioni (espressi come equivalenti) deve essere uguale all'ammontare totale dei cationi (espressi in equivalenti). Il rapporto $[\text{anioni}]/[\text{cationi}]$ deve essere uguale a 1.

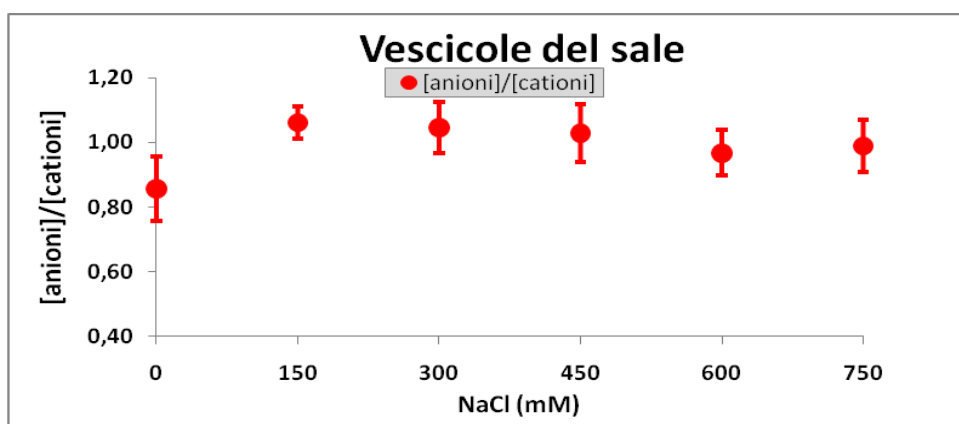


Figura 47: Bilancio ionico nelle vescicole del sale (frazione esterna della foglia).

Considerando l'insieme dei dati relativi alle vescicole del sale, il rapporto $[\text{anioni}]/[\text{cationi}]$ è compreso tra 0,86 e 1,07. Il rapporto medio è risultato essere $1,01 \pm 0,07$. Questi dati suggeriscono che le specie ioniche principali sono state rilevate nelle analisi delle vescicole del sale.

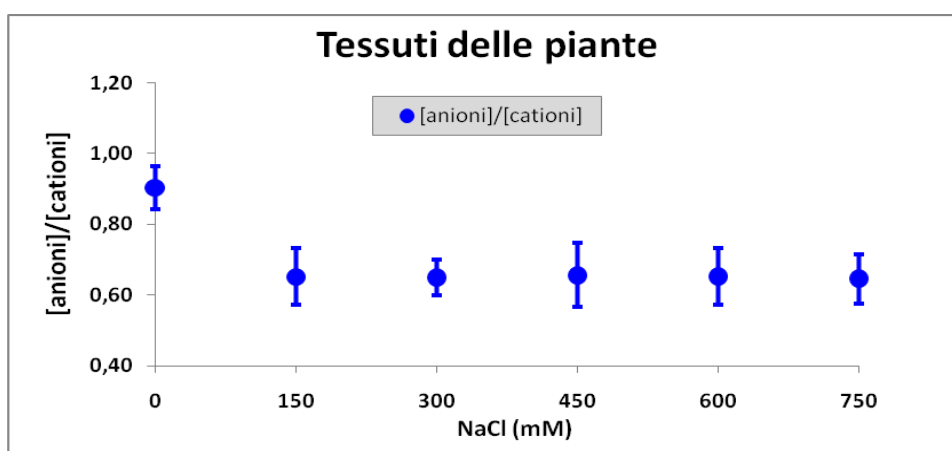


Figura 48: Bilancio ionico nella frazione interna (tessuti fogliari).

Il rapporto di ioni per il controllo (0 mM) è stato $0,90 \pm 0,07$, mentre per le piante trattate con NaCl è stato di circa 0,65. Questi dati suggeriscono che tutte le specie ioniche principali non sono state rilevate nelle analisi delle piante.

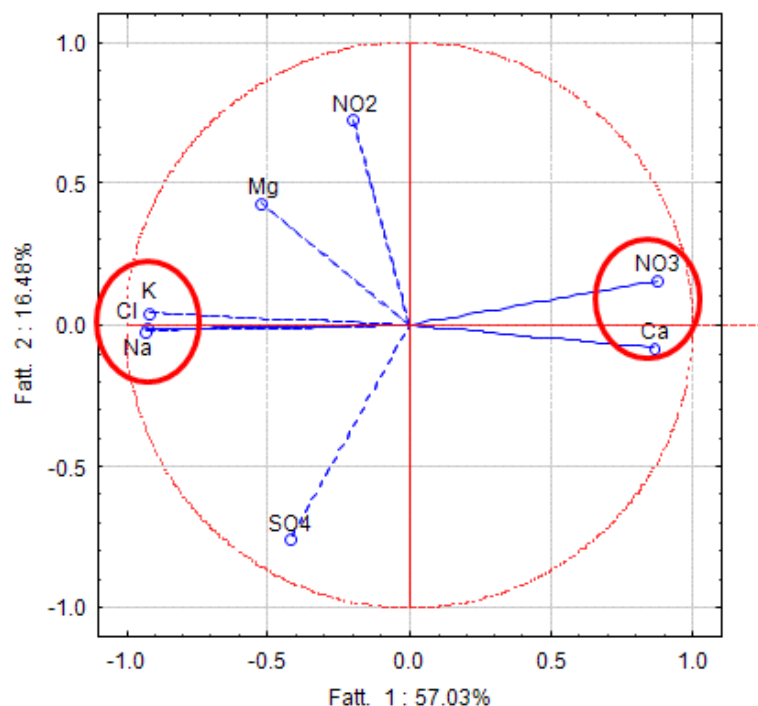


Figura 49: Neutralizzazione all'interno delle ghiandole del sale presenti sulla superficie fogliare. Rappresentazione tramite una PCA (Analisi dei Componenti Principali).

L'analisi delle componenti principali (Principal Component Analysis - PCA) all'interno delle ghiandole del sale sulla base del set di dati relativi alla frazione estrusa ha evidenziato una chiara associazione tra Cl, K e Na. Una simile associazione è stata osservata anche per Ca e NO_3 .

Combinando la PCA con una analisi di correlazione, le principali forme neutralizzate risultano essere: NaCl, KCl, MgCl_2 , e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Per quanto riguarda il solfato, le principali neutralizzazioni riguardano Na_2SO_4 e K_2SO_4 .

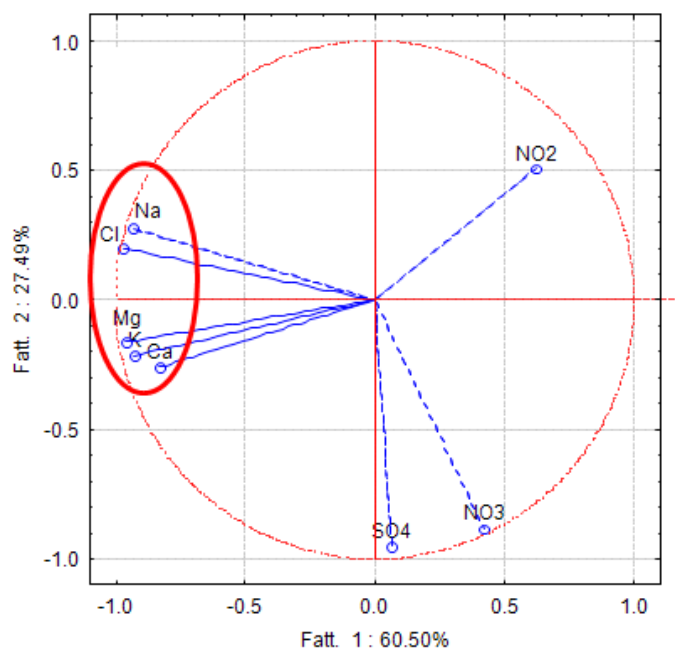


Figura 50: Neutralizzazione delle cariche all'interno dei tessuti fogliari. Rappresentazione tramite PCA.

Sulla base della PCA e dell'analisi di correlazione, il Cl^- è implicato nella neutralizzazione dei maggiori cationi come: NaCl , KCl , MgCl_2 , CaCl_2 .

	Cl	NO2	NO3	SO4	K	Na	Mg	Ca
Cl	1.00	-0.49	-0.57	-0.24	0.87	0.99	0.90	0.70
NO2	-0.49	1.00	-0.19	-0.31	-0.50	-0.47	-0.66	-0.58
NO3	-0.57	-0.19	1.00	0.85	-0.19	-0.61	-0.26	-0.17
SO4	-0.24	-0.31	0.85	1.00	0.20	-0.31	0.11	0.18
K	0.87	-0.50	-0.19	0.20	1.00	0.80	0.93	0.84
Na	0.99	-0.47	-0.61	-0.31	0.80	1.00	0.85	0.61
Mg	0.90	-0.66	-0.26	0.11	0.93	0.85	1.00	0.78
Ca	0.70	-0.58	-0.17	0.18	0.84	0.61	0.78	1.00

Benché la quinoa sia considerata un'alofita, poco si conosce a proposito dei meccanismi fisiologici associati alla sua tolleranza al sale. Jacobsen et al. (2003) hanno riferito che, fra questi, vi è l'accumulo di ioni salini nei tessuti della pianta in presenza di stress salino come mezzo di controllo della pressione di turgore e della traspirazione. Questo aspetto è fondamentale poiché impedisce la perdita d'acqua che potrebbe portare alla morte della pianta. I risultati qui riportati confermano questa ipotesi.

Tuttavia, il contributo relativo degli osmoliti organici (ad es. prolina) rispetto a quelli inorganici (ioni) nella tolleranza allo stress idrico e/o salino resta ancora oggetto di dibattito (Hariadi et al., 2010). In questo esperimento con BO78, l'eccesso osservato in cationi (o la carenza di anioni neutralizzanti) è

probabilmente bilanciato da amminoacidi , acidi organici o altre specie con carica negativa sintetizzate sotto stress salino.

5. PROLINA

Durante la messa a punto del metodo per la determinazione della prolina è stato fatto lo spettro di assorbimento della prolina standard per individuare la lunghezza d'onda di massimo assorbimento che è risultata essere 525 nm (e non 520 nm come generalmente riportato in letteratura).

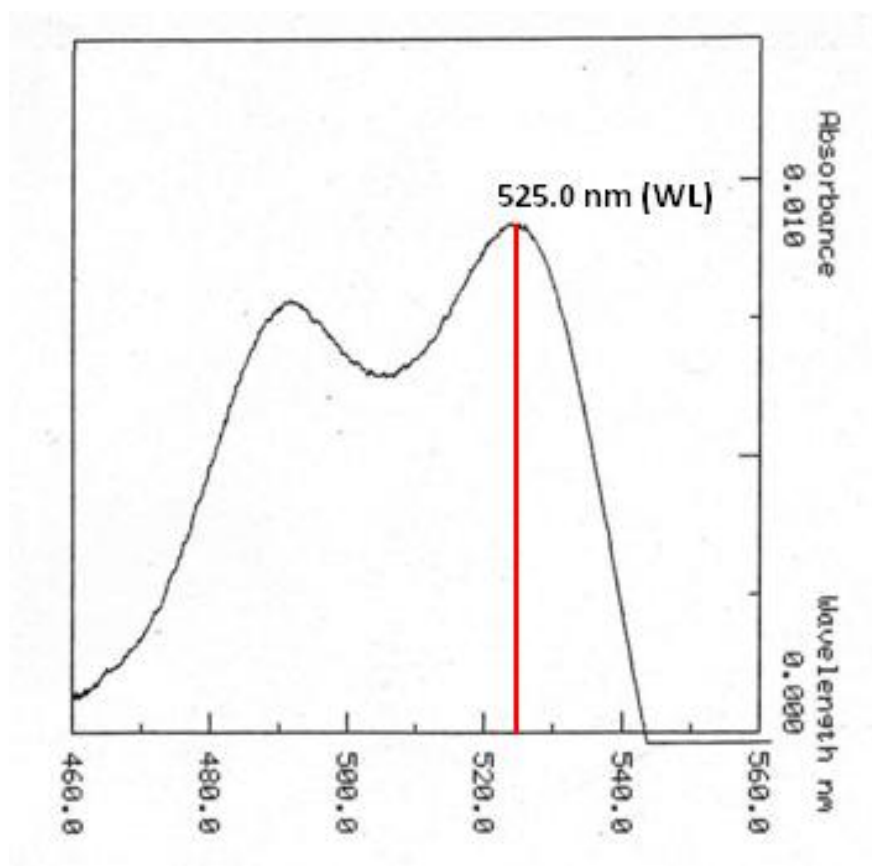


Figura 51: Spettro d'assorbimento della prolina

Standard	μL di sol. madre	nmoli	A_{525}
1a°	0	0	-0,014
1b°	0	0	-0,016
2a°	2,5	25	0,164
2b°	2,5	25	0,149
3a°	5,0	50	0,286
3b°	5,0	50	0,351
4a°	10,0	100	0,526
4b°	10,0	100	0,573
5a°	20,0	200	1,118
5b°	20,0	200	1,130
6a°	30,0	300	1,581
6b°	30,0	300	1,630

Tabella 8: Tabella per la costruzione della curva di taratura della prolina da 0 a 300 nmoli. E' stata utilizzata una soluzione madre 10 mM e ogni misura fatta in doppio.

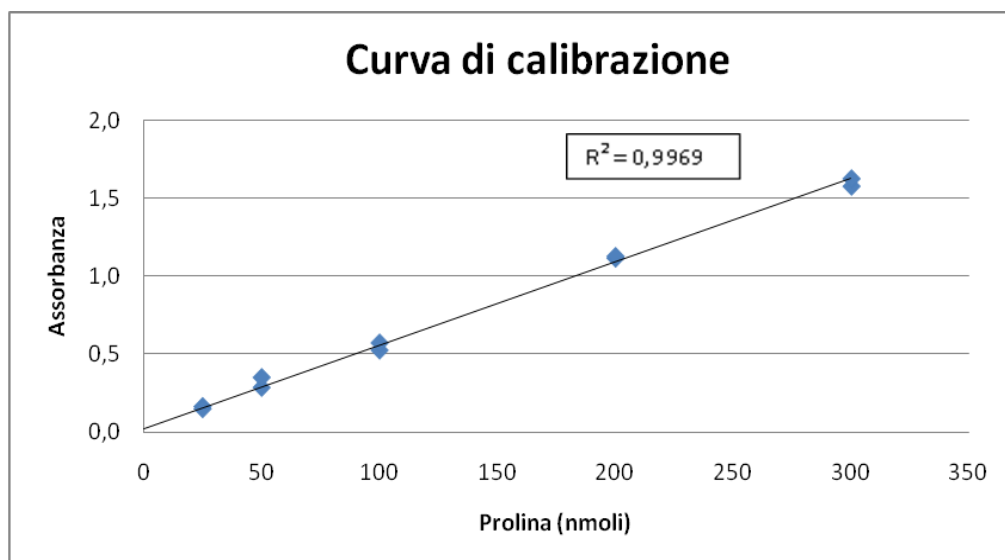


Figura 52: Curva di calibrazione della prolina. In ascissa le nmoli di prolina utilizzate ed in ordinata i valori di assorbanza determinati con lo spettrofotometro.

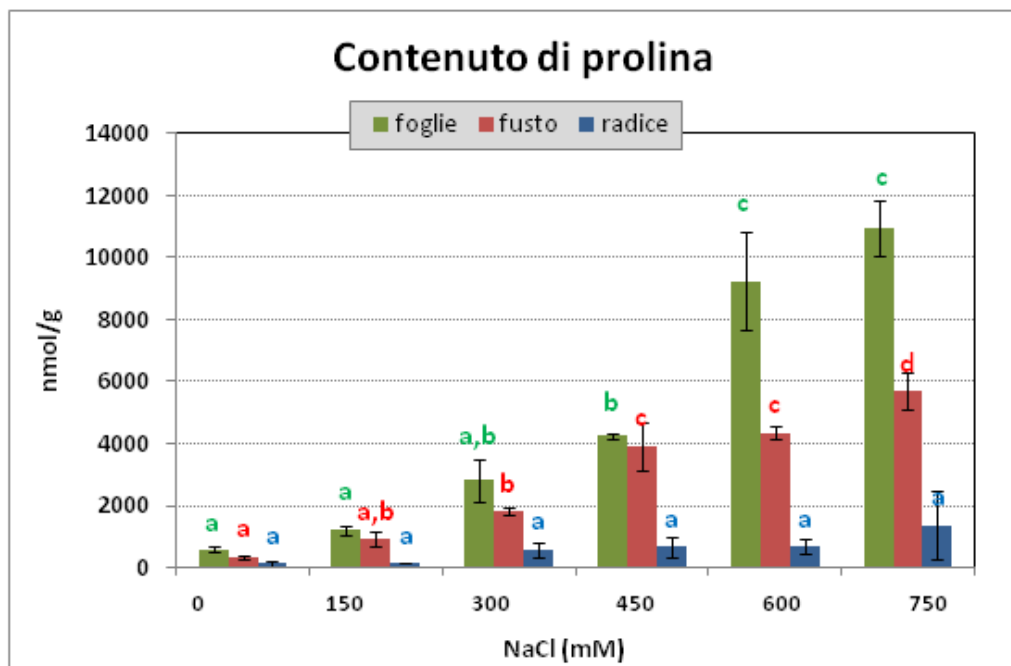


Figura 53: Concentrazione di prolina (nmoli/g PF) nei diversi organi delle piante di BO78 trattate e non (controllo) con NaCl. I valori sono le medie \pm dev.standard (n = 4).

Dai risultati ottenuti si vede che il contenuto di prolina nei diversi organi vegetali di BO78 aumenta, in funzione della concentrazione di NaCl somministrato. La prolina si accumula prevalentemente nelle foglie, come confermano i presenti dati. Raramente il composto viene misurato in altri organi. Qui dimostriamo che anche le radici, seppur in misura molto inferiore, sono in grado di accumulare prolina. Il notevole aumento di concentrazione è, da un lato, indice del forte stress cui sono state sottoposte le piante di quinoa durante i 21 giorni di trattamento, ma anche della capacità che ha questa pianta di resistere alle avversità abiotiche, in questo caso l'elevata salinità del terreno, utilizzando anche questo osmolita organico come fattore di protezione.

PARTE SECONDA - CONFRONTO FRA LE ACCESSIONI

1. CRESCITA IN ALTEZZA

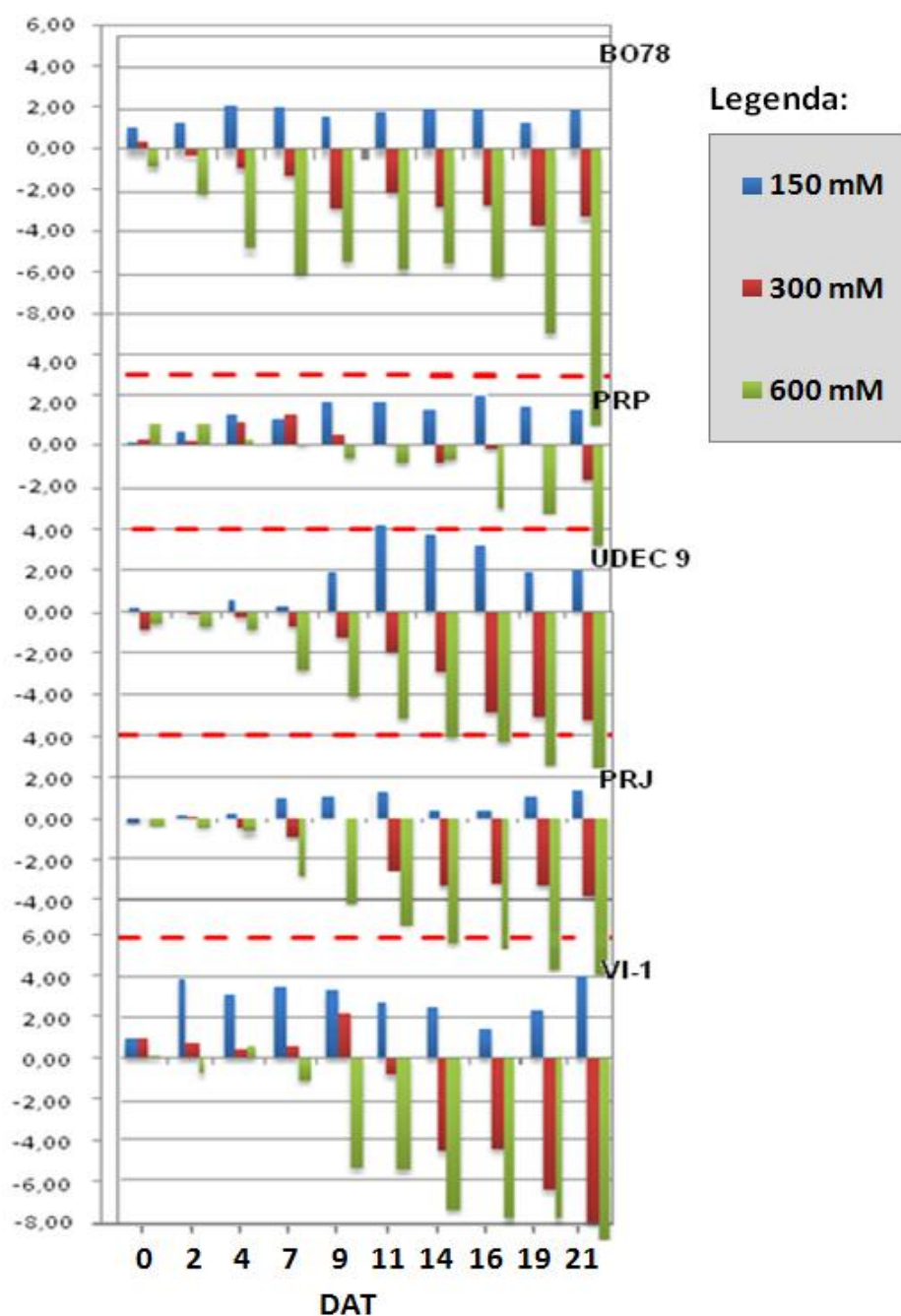


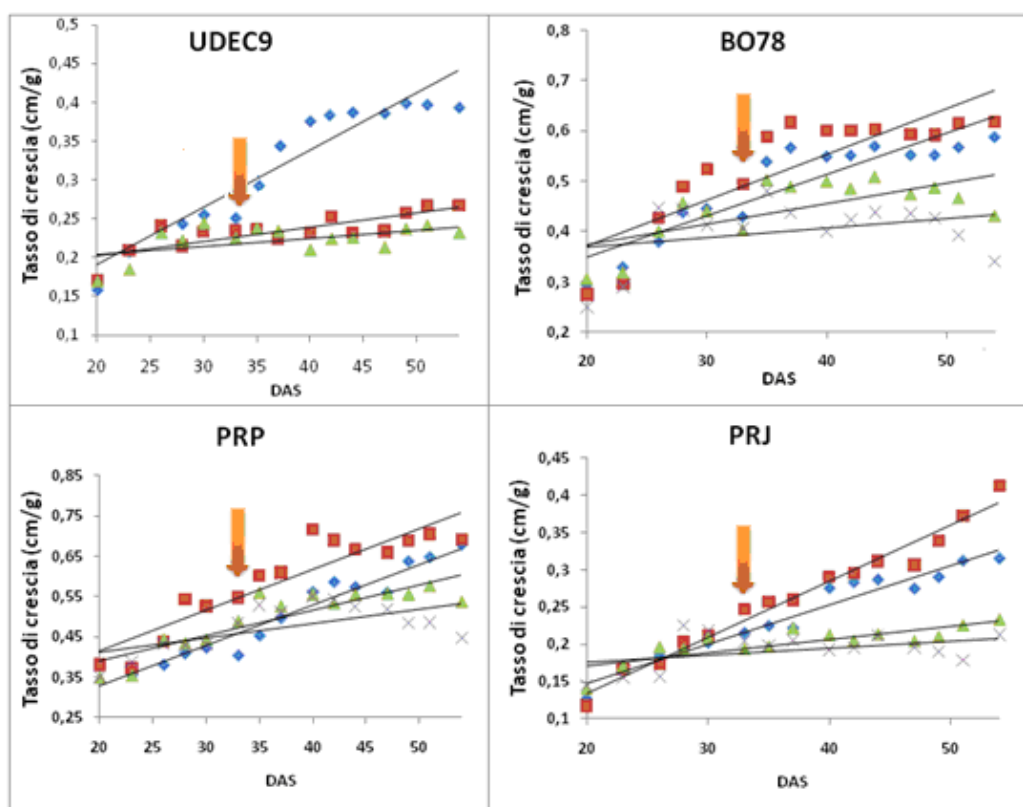
Figura 54: Altezza relativa delle piante trattate con sale, calcolata come differenza tra l'altezza della pianta trattata e l'altezza del controllo, a diversi

giorni dopo il trattamento. Barra blu = 150 mM, barra rossa = 300 mM; barra verde = 600 mM.

Come si può notare, per tutte le accessioni il trattamento con 150 mM di sale determina un aumento dell'altezza delle piante rispetto al controllo. Il trattamento con 300 mM provoca un aumento dell'altezza fino a 9 DAT nelle accessioni PRP e VI-1, mentre diventa poi inibitorio per tempi più prolungati di trattamento. Dopo 21 DAT, con un trattamento a 600 mM, l'effetto inibitorio sulla crescita delle piante si osserva maggiormente nelle accessioni BO78, VI-1 e PRJ.

➤ Tasso di crescita

Il tasso di crescita, espresso come cm/giorno, è stato calcolato per vedere come lo stress salino, ha influito sulla velocità di sviluppo delle piante.



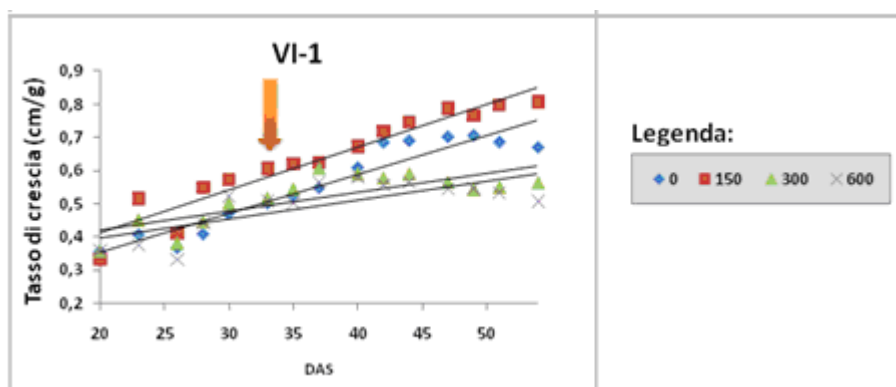


Figura 55: Tasso di crescita espresso in cm/giorno per le 5 accessioni di quinoa trattate a concentrazioni crescenti di NaCl. La freccia d’inizio dei trattamenti.

Dai grafici del tasso di crescita delle 5 accessioni di quinoa, si è estrapolato il valore del coefficiente angolare della retta che è riportato nella seguente tabella.

	Tattamento (mM NaCl)	Coefficiente angolare
UDEC9	0	0,0062
	150	0,0074
	300	0,0018
	600	0,0011
BO78	0	0,0082
	150	0,0092
	300	0,004
	600	0,0018
PRJ	0	0,0052
	150	0,0075
	300	0,0018
	600	0,001
PRP	0	0,0102
	150	0,01
	300	0,0063
	600	0,0035
VI-1	0	0,0129
	150	0,0118
	300	0,0057
	600	0,0057

Tabella 9: Coefficienti angolari delle rette d'interpolazione delle curve di crescita.

Il grafico (Figura 56) riassume i dati riportati nella tabella precedente, ovvero mostra la diminuzione del valore di coefficiente angolare della retta d'interpolazione del tasso di crescita, a seconda nel trattamento salino (NaCl).

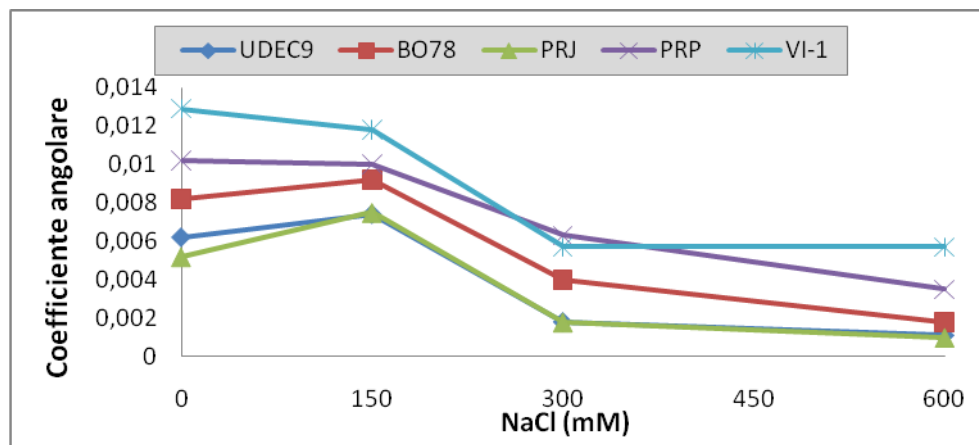


Figura 56: Grafico dei coefficienti angolari del tasso di crescita.

2. PESO FRESCO E SECCO

➤ Pianta intera

Il peso fresco e il peso secco delle piante intere delle 5 accessioni di quinoa sono stati determinati alla fine dei 21 DAT di ogni trattamento. Procedendo in tal modo si è voluto determinare quale variazione di produzione di biomassa fosse determinata da concentrazioni saline crescenti in un periodo di somministrazione di 3 settimane.

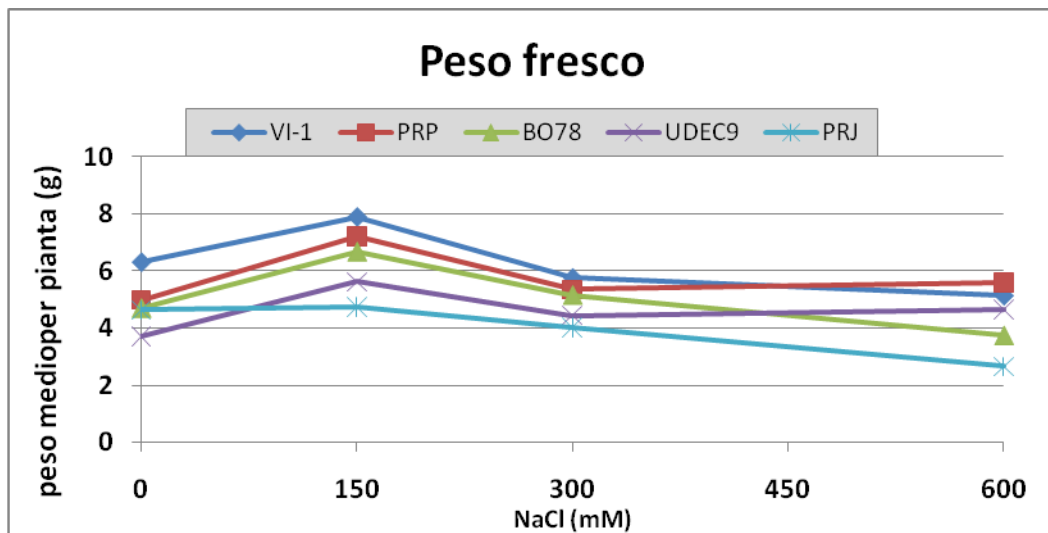


Figura 57: Andamento del peso fresco medio totale per pianta (in grammi) all'aumentare della concentrazione salina somministrata alla fine dei 21 giorni di trattamento.

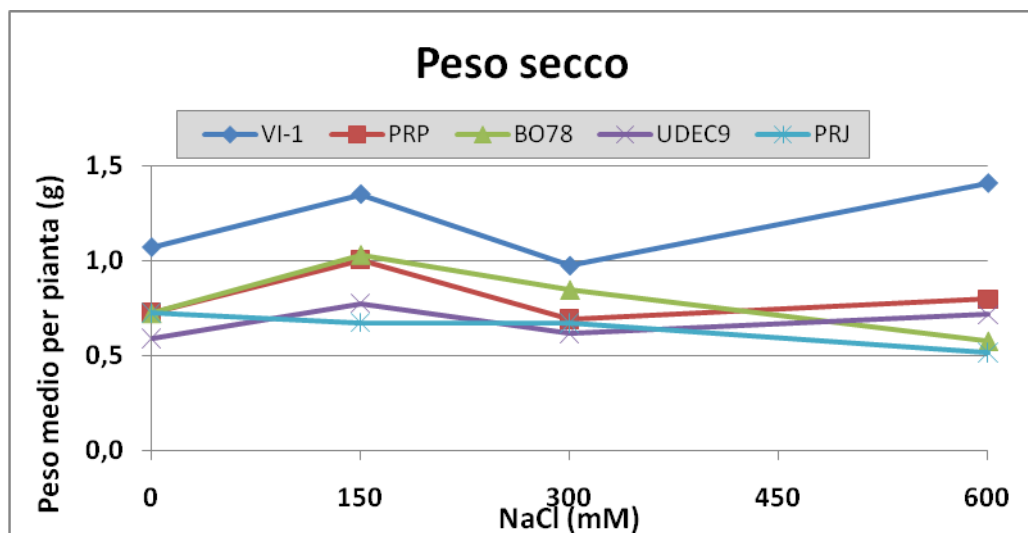


Figura 58: Andamento del peso secco medio totale per pianta (in grammi) all'aumentare della concentrazione salina somministrata alla fine dei 21 giorni di trattamento

La biomassa fresca (grammi per pianta), espressa come rapporto percentuale del trattato rispetto al controllo, in funzione della concentrazione di NaCl è riportata nel seguente grafico.

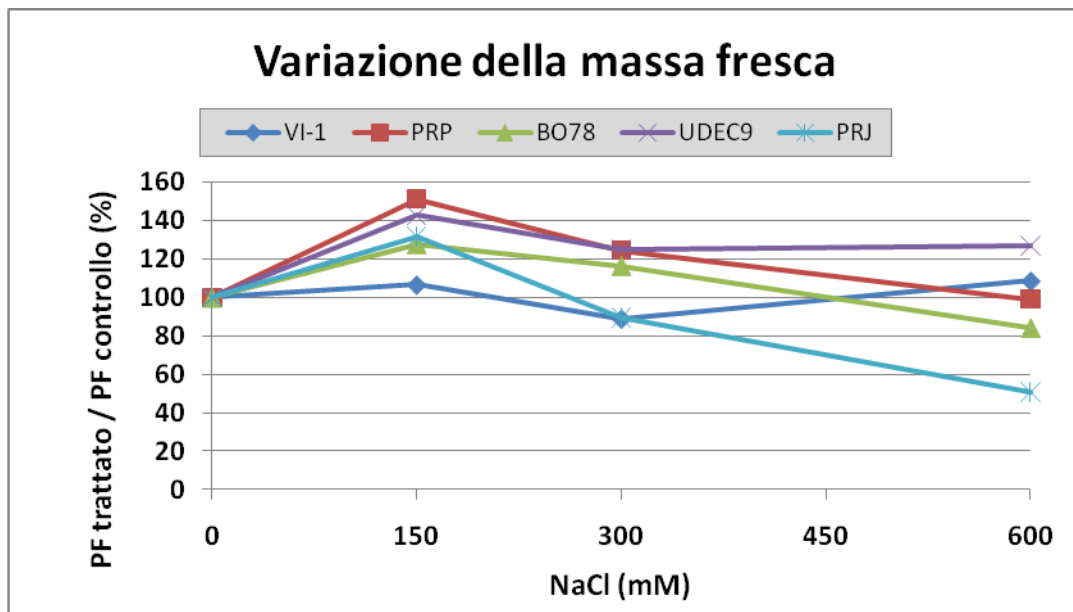


Figura 59: Variazione percentuale della massa fresca media per pianta trattata con NaCl rispetto al controllo.

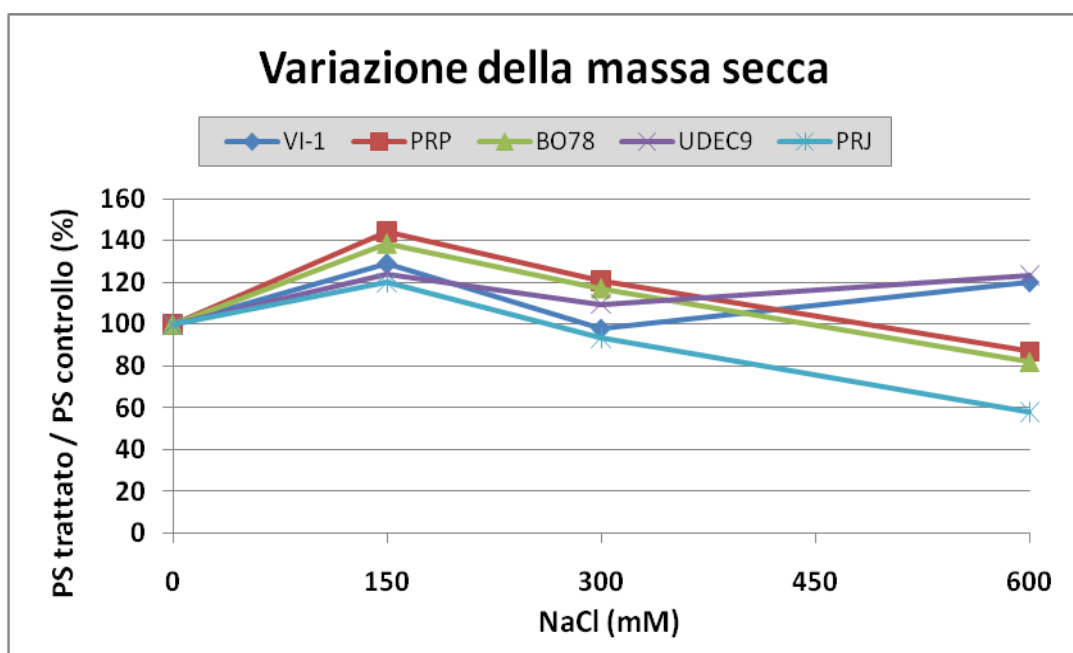


Figura 60. Variazione percentuale del peso secco per pianta trattata con NaCl rispetto al controllo.

➤ Singoli organi

Legenda: ■ radici ■ fusto ■ foglie

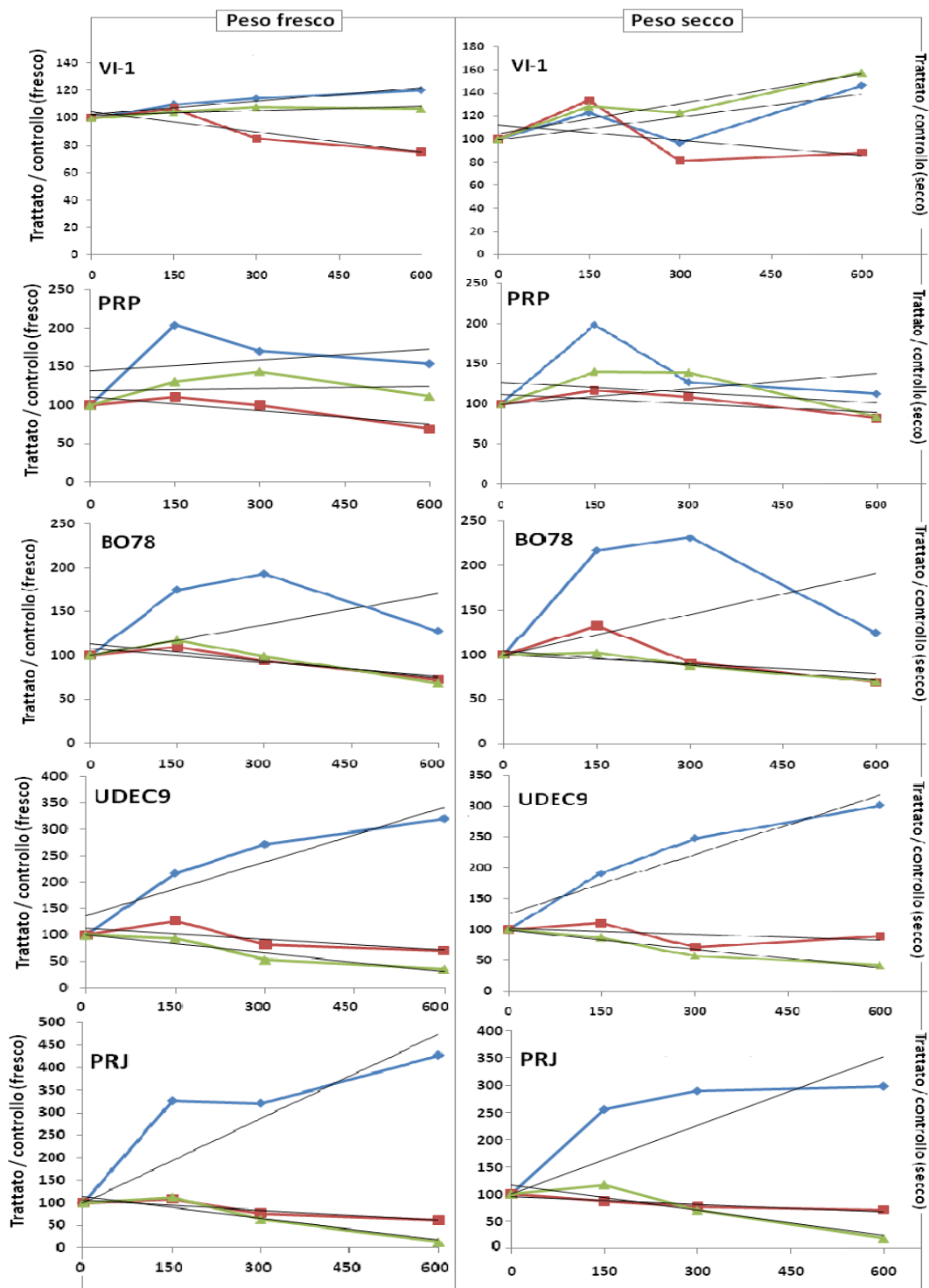


Figura 61: Variazione di peso fresco e secco degli organi vegetali in funzione dell'aumento della concentrazione salina nelle diverse accessioni.

Coefficienti angolari (peso fresco)

Coefficienti angolari (peso secco)

Accessioni	radici	fusto	foglie	Accessioni	radici	fusto	foglie
VI-1	0,0318	-0,0493	0,0106	VI-1	0,0662	-0,0431	0,0869
PRP	0,0471	-0,0591	0,0108	PRP	0,0639	-0,0382	-0,042
BO78	0,1181	-0,0536	-0,0644	BO78	0,1516	-0,0348	-0,0549
UDEC9	0,3417	-0,0704	-0,1144	UDEC9	0,3214	-0,03	-0,1005
PRJ	0,6265	-0,0753	-0,1627	PRJ	0,4215	-0,047	-0,1554

Tabella 10: Coefficienti angolari delle curve del peso fresco e secco.

Con i dati delle due tabelle si sono ottenuti i seguenti grafici dei coefficienti angolari del peso secco e fresco dei trattati sui controlli.

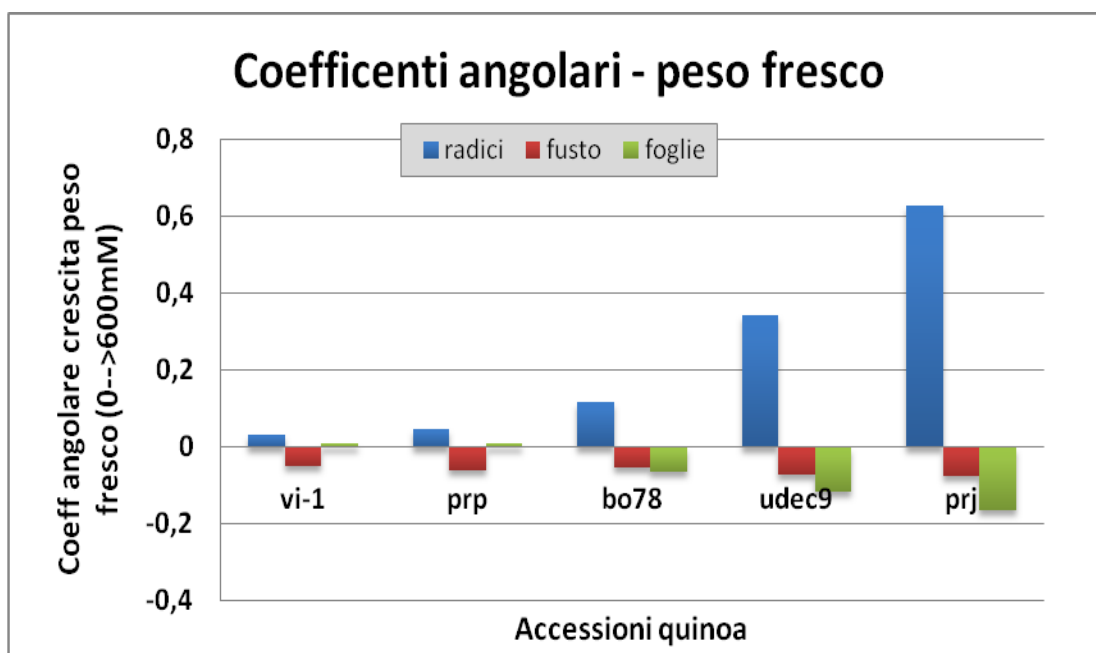


Figura 62. Confronto della risposta in peso fresco dei diversi organi allo stress salino nelle diverse accessioni.

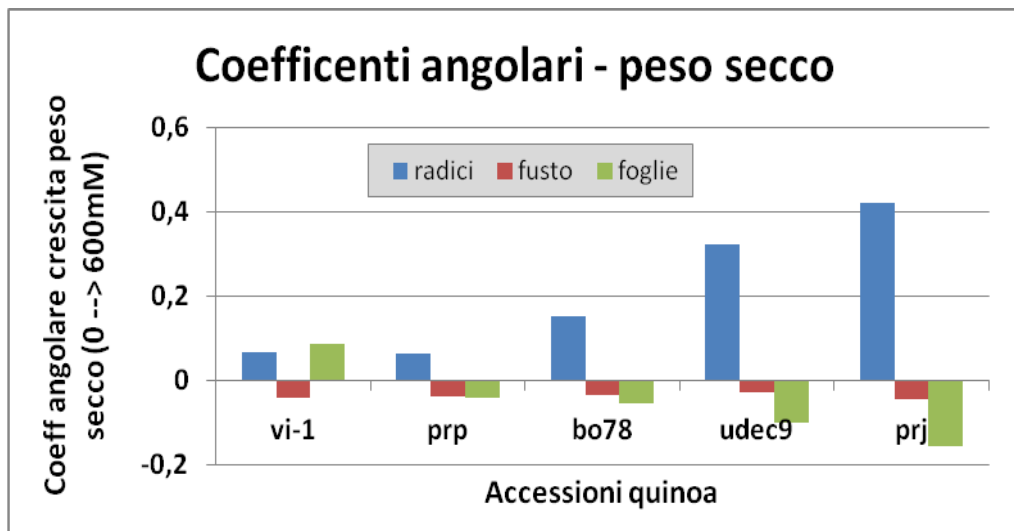


Figura 63: Confronto della risposta in peso secco dei diversi organi allo stress salino nelle diverse accessioni.

All'aumentare della concentrazione di NaCl, le radici dell'accessione di PRJ sono quelle che hanno evidenziato una risposta maggiore in crescita di peso rispetto a tutte le altre.

A seguire troviamo UDEC9, BO78 e i valori più bassi si hanno per PRP e VI-1.

La risposta della crescita in biomassa del fusto, come era già chiaro dai grafici del peso espresso in grammi e tasso di variazione rispetto al controllo, mantiene un trend negativo di crescita in tutte le accessioni.

Nelle accessioni che mostrano una scarsa risposta in termini di aumento di biomassa nella radice, si ha parallelamente una scarsa risposta nella riduzione di biomassa delle foglie (Fig. 62 e 63).

➤ Rapporto peso secco / peso fresco

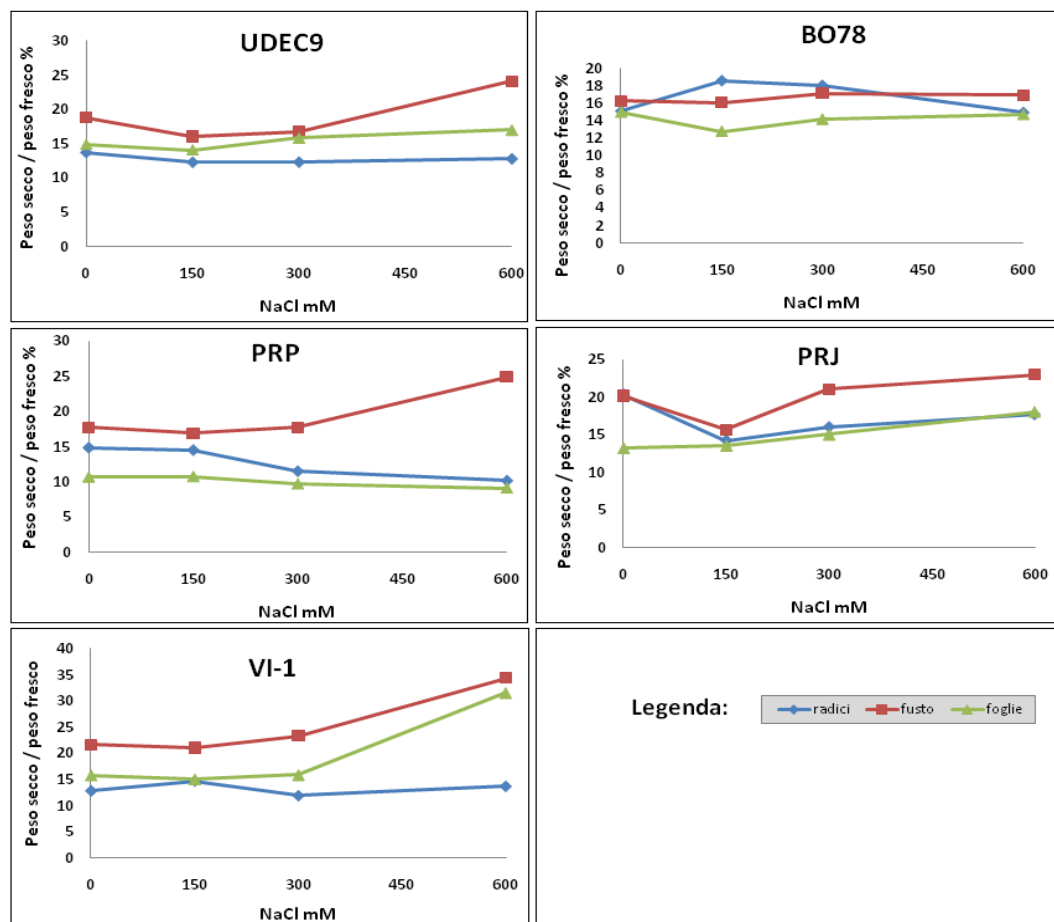
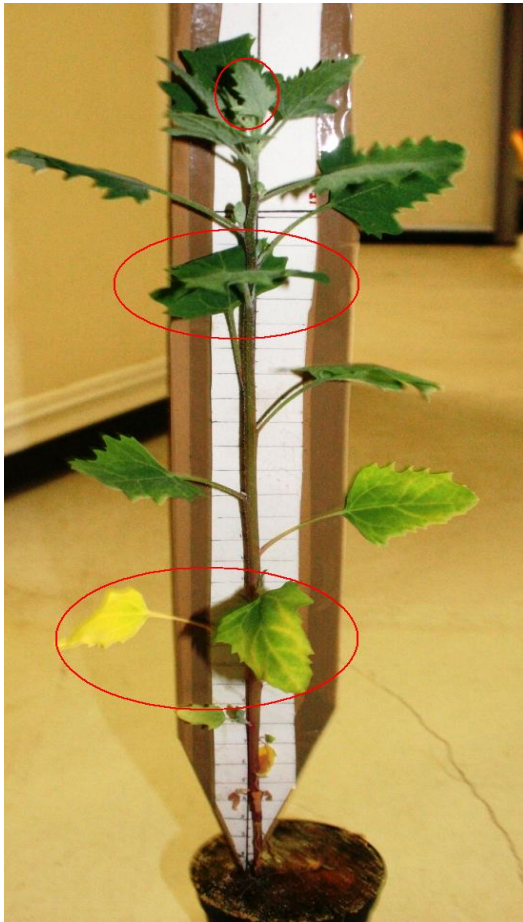


Figura 64: Rapporto percentuale tra il peso secco ed il peso fresco delle 5 accessioni trattate con le 4 concentrazioni crescenti di NaCl (più il controllo).

3. AREA FOGLIARE

E' stato studiato il tasso di espansione della foglia in base alla posizione sul fusto e alla concentrazione salina somministrata.

Si è proceduto comparando inizialmente la variazione dell'area fogliare per posizione sul fusto, poi verificando come cambia l'area nelle diverse accessioni in funzione di concentrazioni crescenti di NaCl.



Per foglie apicali sono state considerate le prime foglie dal vertice del fusto lunghe almeno 5 millimetri. Per foglie intermedie sono state considerate quelle localizzate tra l'apice del fusto e le foglie inferiori. Per foglie basali s'intendono quelle localizzate in posizione inferiore alle altre.



Figura 24: Due immagini di una pianta utilizzata per l'analisi fogliare. Nella prima foto le posizioni scelte per il campionamento delle foglie. Nella seconda immagine è mostrata la dimensione minima (5 mm) perché una foglia apicale fosse raccolta.

➤ Variazione dell'area fogliare

I tre grafici seguenti rappresentano in successione come è variata l'area delle foglie apicali (FA), intermedie (FI) e basali (FB) nelle 5 accessioni di quinoa in funzione della concentrazione di NaCl somministrata.

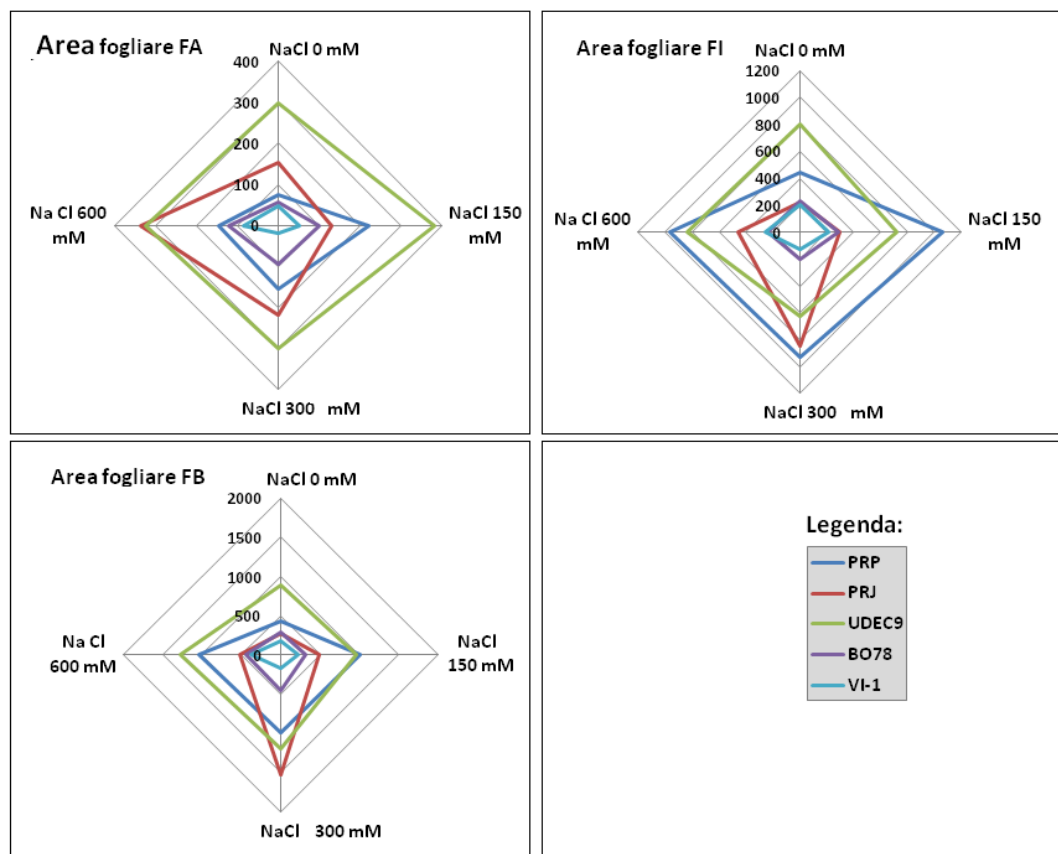


Figura 67: Area fogliare delle 5 accessioni di quinoa analizzata per posizione sul fusto. Per ogni posizione delle foglie è stata calcolata l'area superficiale media in mm² (indicata con i numeri lungo l'asse centrale).

Dal grafico dell'area delle foglie apicali le differenze maggiori si sono riscontrate nelle accessioni PRJ e UDEC9 (Fig. 67). Le altre accessioni mostrano tutte una forma ridotta ed omogena, probabilmente perché l'influenza del sale non è stata morfologicamente significativa sulle foglie giovani appena formatesi.

Dal grafico dell'area delle foglie intermedie si nota una tendenza delle accessioni PRP e PRJ ad aumentare la superficie fogliare in funzione delle crescenti concentrazioni saline. Non sembrano invece risentire dell'influenza del sale le

accessioni VI-1, UDEC9 e BO78 che mantengono dimensioni simili in tutti i quattro trattamenti.

Il grafico dell'area delle foglie basali mostra abbastanza chiaramente come all'aumentare della concentrazione salina ci sia, per tutte le accessioni tranne UDEC9, un aumento della superficie fogliare rispetto al controllo (NaCl 0 mM).

Tenendo conto che, come già appurato dai grafici precedenti, c'è una proporzionalità diretta tra la concentrazione salina somministrata e l'espansione fogliare, nei grafici seguenti sono indicate, dal centro alla periferia, le aree medie fogliari per concentrazioni crescenti di NaCl.

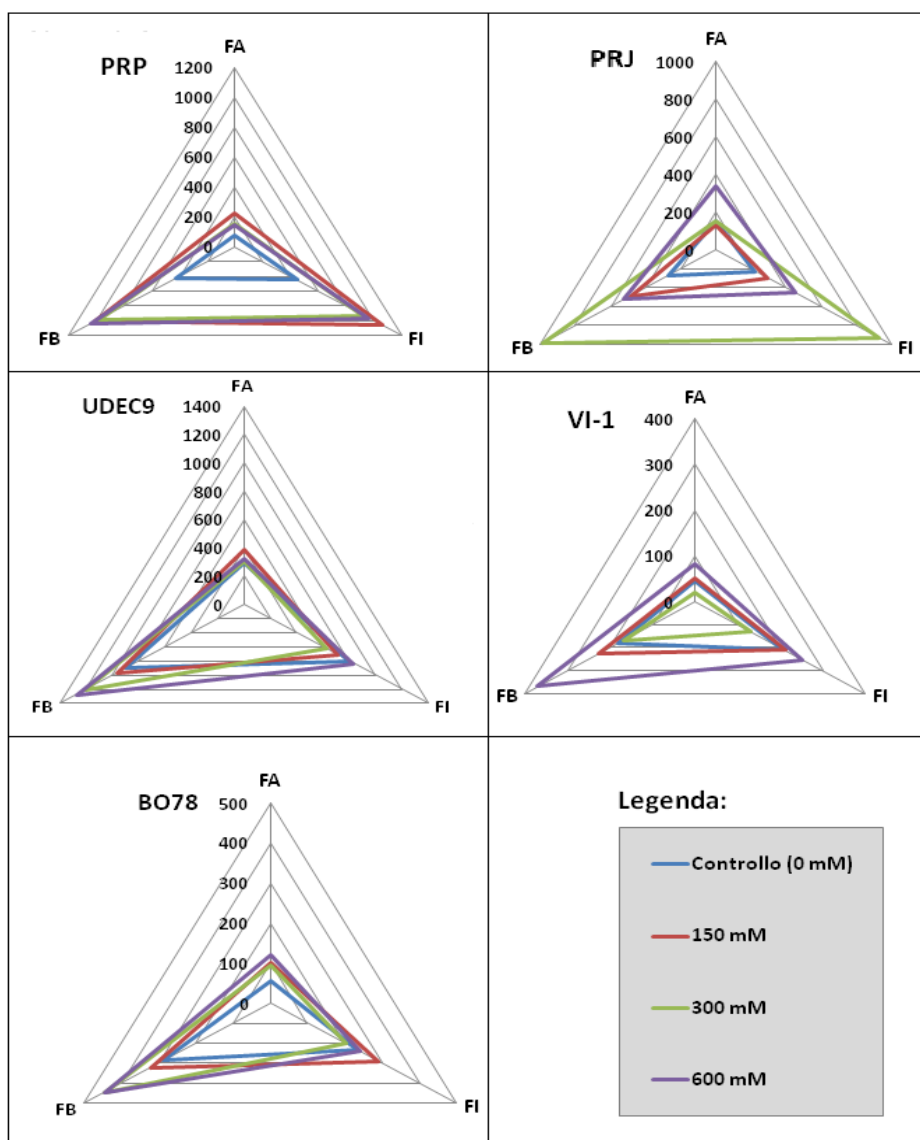


Figura 68: . Variazione dell'area fogliare (in mm²) in funzione della concentrazione salina secondo la posizione sul fusto per ogni singola accessione.

I grafici delle aree fogliari nelle diverse accessioni di quinoa, mostrano una proporzionalità mantenuta all'aumentare della concentrazione salina. Si nota un cospicuo aumento dell'area fogliare in funzione della concentrazione di NaCl in BO78, UDEC9, VI-1 e PRP. Solo nell'accessione PRJ il rapporto della dimensione delle foglie non è mantenuto. Inoltre solo in PRJ non c'è corrispondenza tra concentrazione salina e area fogliare, poiché le dimensioni maggiori si hanno per il trattamento NaCl 300 mM.

➤ **Variazione cromatica della superficie fogliare**

Dall'analisi visiva del colore, e quindi dello stato di salute, della foglia, è stata notata una progressiva variazione cromatica, in tutte le accessioni considerate, all'aumentare della concentrazione salina. Per tale analisi sono state considerate solo le foglie basali, che più delle altre risentono dell'accumulo degli ioni nel tessuto fogliare, prelevate alla fine dell'esperimento (21 DAT). Come mostrato nella figura sottostante, si osserva un progressivo ingiallimento, e quindi senescenza, della foglia in funzione della concentrazione di NaCl somministrata.

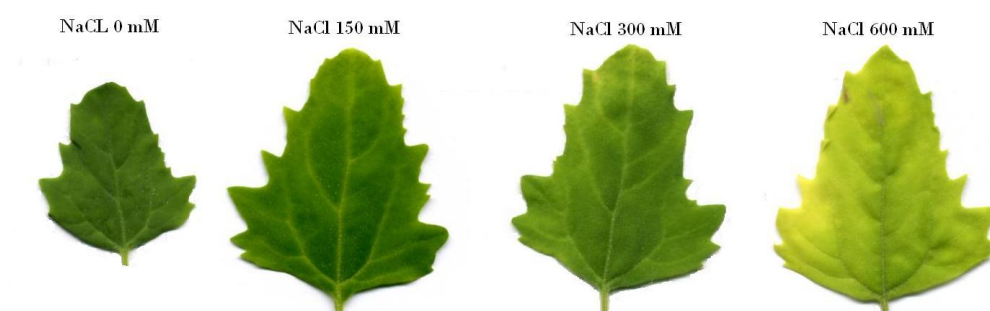


Figura 69: Foglie basali dell'accessione VI-1 di quinoa fotografate per mostrare la differenza cromatica all'aumentare della concentrazione salina somministrata (mM NaCl).

Il diverso grado di tolleranza delle 5 accessioni di quinoa al sale, è diventato evidente dopo pochi giorni dall'inizio dei trattamenti, quando probabilmente è venuta meno la capacità delle cellule fogliari di compartimentare e neutralizzare gli ioni in eccesso ad elevate concentrazioni (NaCl 300–600mM).

All'aumento di sale disciolto nel medium di crescita, s'innalza progressivamente anche la concentrazione di ioni nei tessuti fogliari, che porteranno ad una

progressiva intossicazione e senescenza fogliare. Generalmente, la sopravvivenza della pianta dipende da due importanti meccanismi:

La capacità di prevenire il raggiungimento di livelli salini tossici nelle foglie, tramite compartimentazione vacuolare ed esclusione a livello radicale;

Il tasso di generazione di nuove foglie apicali per continuare l'attività biosintetica (Munns, 2001)

A partire dalla prima settimana di trattamento, fino alla fine dei 21 DAT, le 5 accessioni di quinoa studiate (PRP, PRJ, UDEC9, VI-1 e BO78), hanno mostrato una variazione cromatica dal verde al giallo, delle foglie più mature (figura 3). Questo comportamento è dovuto ad una maggior incidenza della tossicità ionica nelle foglie mature rispetto a quelle giovani, poiché nelle prime gli ioni hanno avuto più tempo per accumularsi.

Attraverso la traspirazione, il sale si accumula nelle foglie dove raggiunge concentrazioni tossiche. Il tempo con cui questo processo si verifica dipende da numerosi fattori quali: il livello di salinità nel suolo, la temperatura, l'umidità relativa, la presenza di nutrienti nel terreno e le differenze genetiche nell'abilità delle radici nell'impedire l'accesso del sale nel flusso floematico (Munns, 2002).

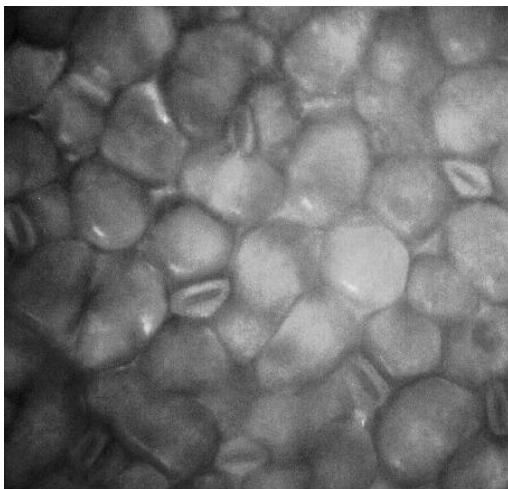
All'aumentare della concentrazione salina durante i 21DAT, contrariamente a quanto atteso, le foglie hanno mostrato un'espansione della superficie. Generalmente, specie nelle aloftie, alla presenza di sale nel terreno, dalle radici partono una serie di segnali metabolici che determinano una riduzione della superficie traspirante fogliare. Questa è una comune risposta sale-specifica allo stress osmotico. Una spiegazione a questo comportamento disatteso è data dal fatto che nelle celle climatiche di crescita l'umidità era prossima al 100% e, probabilmente, è venuta meno la necessità di ridurre la superficie traspirante per mantenere la pressione osmotica nel mesofillo fogliare. Questi risultati sono confermati dai dati del potenziale idrico.

Escludendo che la modifica dell'area fogliare sia stata determinata dallo stress osmotico sale-specifico, si può ipotizzare che gli effetti del sale sulle foglie sono di natura tossica-ionica, quindi determinati prevalentemente dalla concentrazione salina nelle cellule.

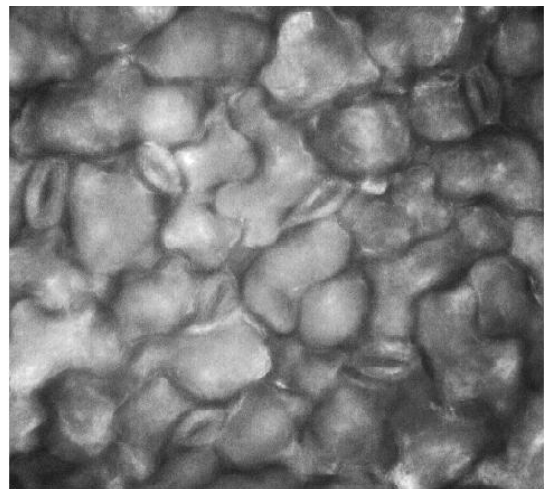
La tossicità ionica si è manifestata chiaramente nelle foglie intermedie e ancora più nelle basali. Infatti, all'aumentare della concentrazione salina, è seguita la perdita di pigmenti fotosintetici che ha determinato un progressivo ingiallimento

delle foglie. A questo si aggiunge un aumento della senescenza nelle foglie più mature, causata dall'alta concentrazione salina e quindi all'accumulo di ioni. Quest'ultimo è un comportamento tipico che le piante, specialmente quelle fisiologicamente adattate a terreni salini, adottano per escludere definitivamente i tessuti irrimediabilmente danneggiati.

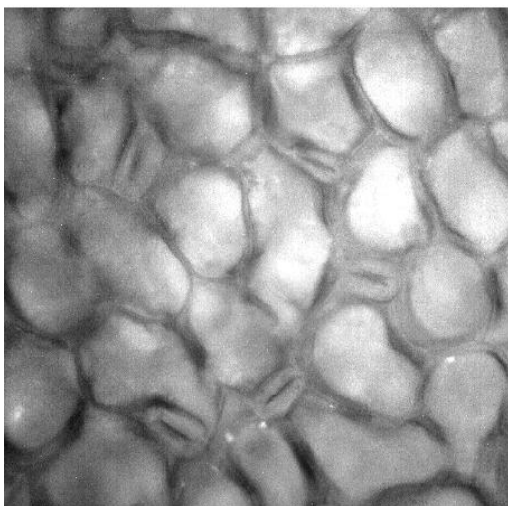
4 STOMI



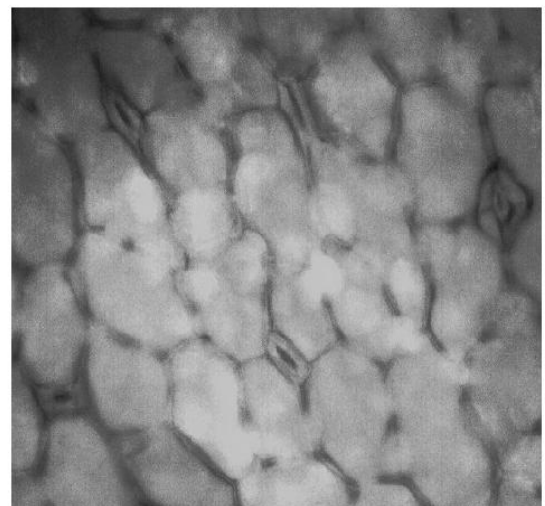
I riquadro: Controllo



II riquadro: 150 mM

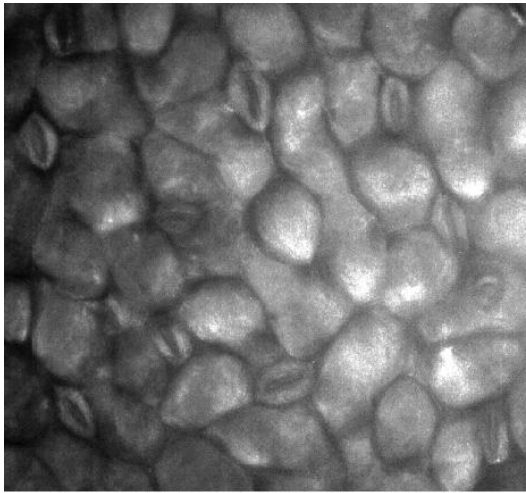


III riquadro: 300 mM

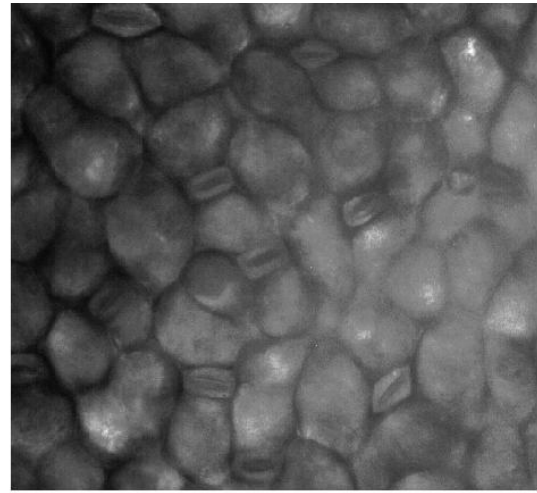


IV riquadro: 600 mM

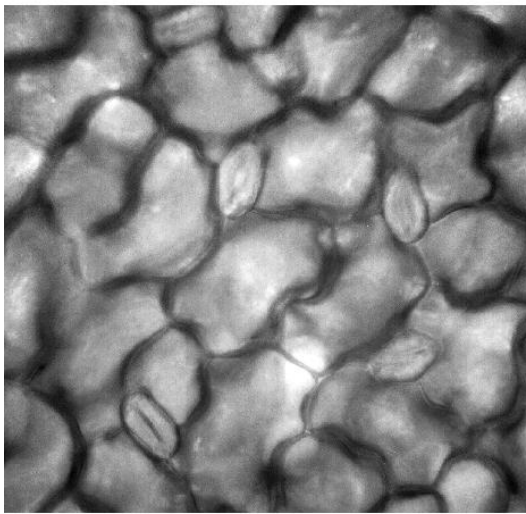
Figura 70: Accessione VI-1. Foto della pagina inferiore di foglie in posizione intermedia, per i 4 trattamenti salini somministrati. Foto scattate ad ingrandimento 40x.



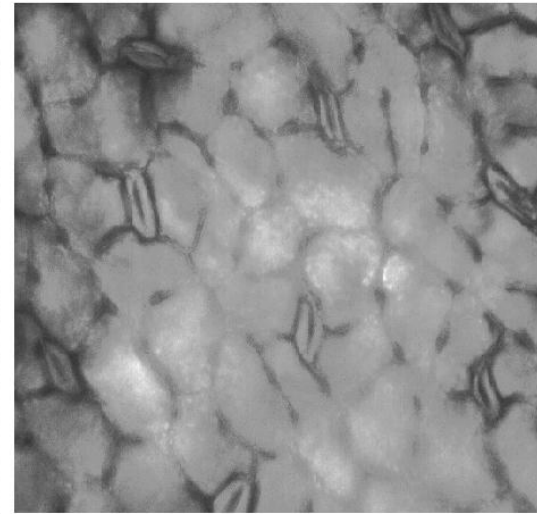
I riquadro: Controllo



II riquadro: 150 mM

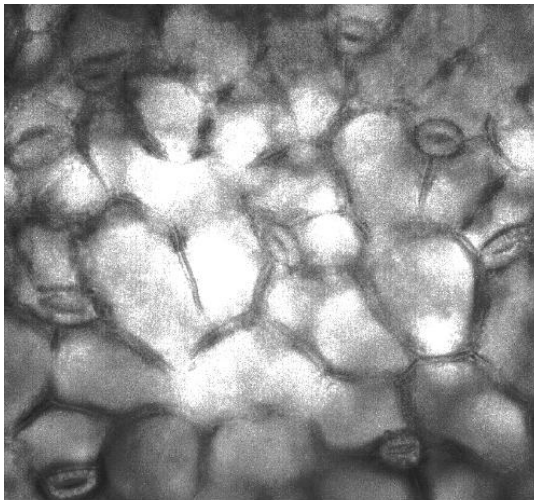


III riquadro: 300 mM

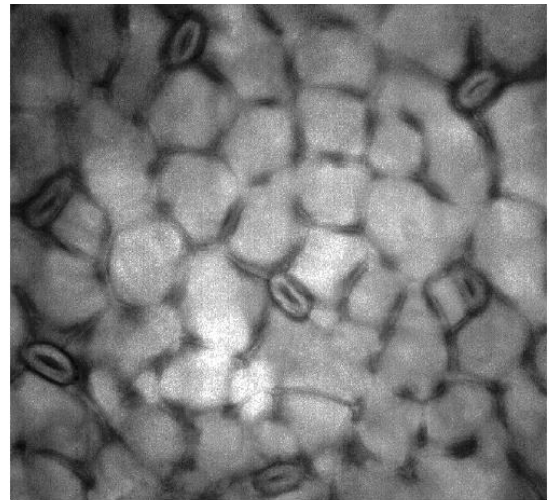


IV riquadro: 600 mM

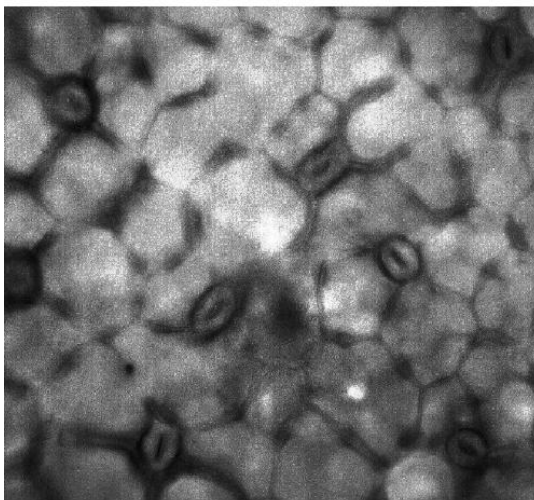
Figura 71: Accessione PRP. Foto della pagina inferiore di foglie in posizione intermedia, per i 4 trattamenti salini somministrati. Foto scattate ad ingrandimento 40x.



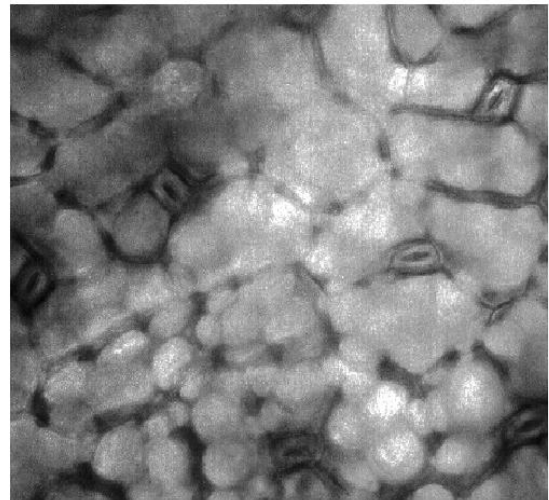
I riquadro: Controllo



II riquadro: 150 mM

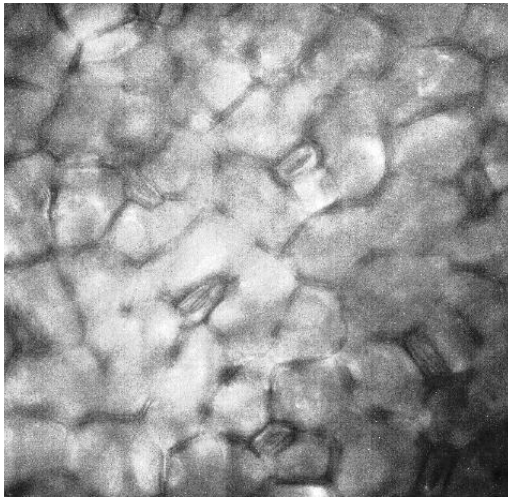


III riquadro: 300 mM

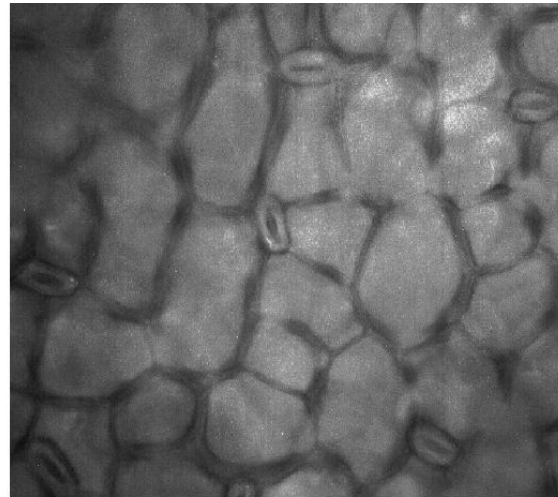


IV riquadro: 600 mM

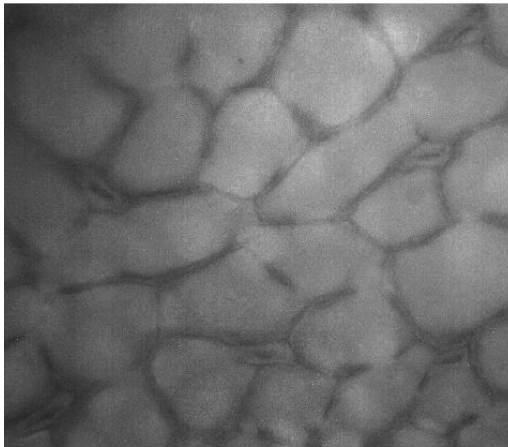
Figura 72: Accessione BO78. Foto della pagina inferiore di foglie in posizione intermedia, per i 4 trattamenti salini somministrati. Foto scattate ad ingrandimento 40x.



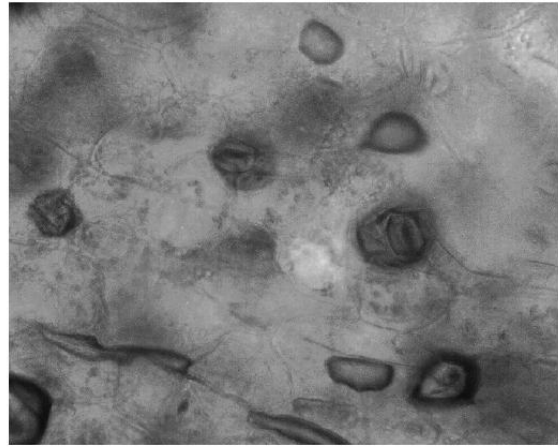
I riquadro: Controllo



II riquadro: 150 mM

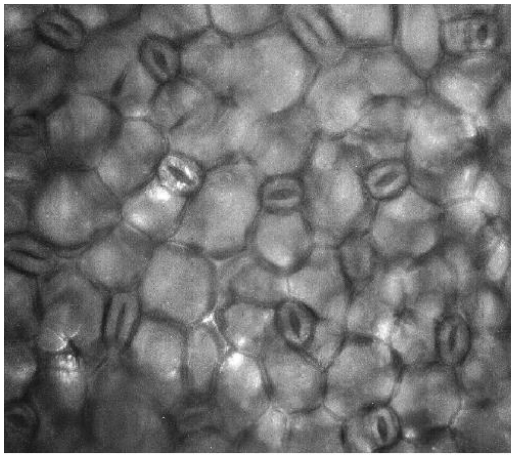


III riquadro: 300 mM

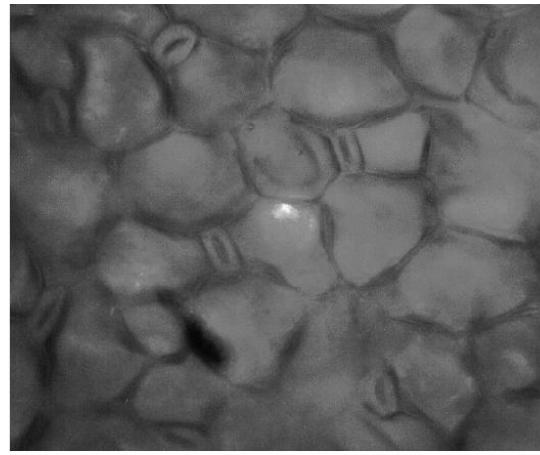


IV: riquadro: 600 mM

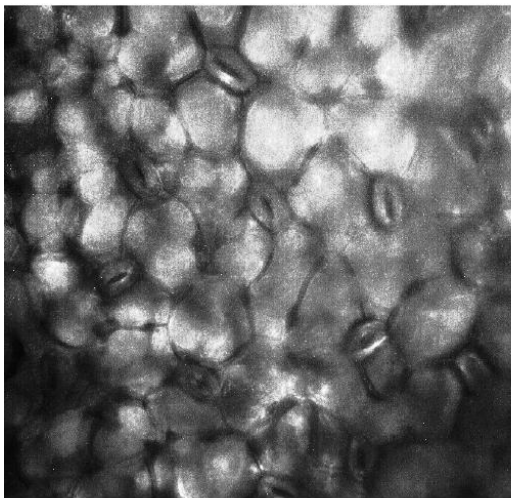
Figura 73: Accessione PRJ. Foto della pagina inferiore di foglie in posizione intermedia, per i 4 trattamenti salini somministrati. Foto scattate ad ingrandimento 40x.



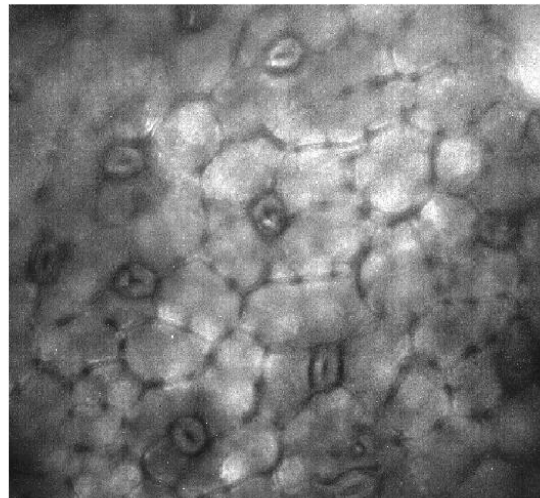
I riquadro: Controllo



II riquadro: 150 mM



III riquadro: 300 mM



IV riquadro: 600 mM

Figura 74: Accessione UDEC9. Foto della pagina inferiore di foglie in posizione intermedia, per i 4 trattamenti salini somministrati. Foto scattate ad ingrandimento 40x.

➤ **Densità stomatica**

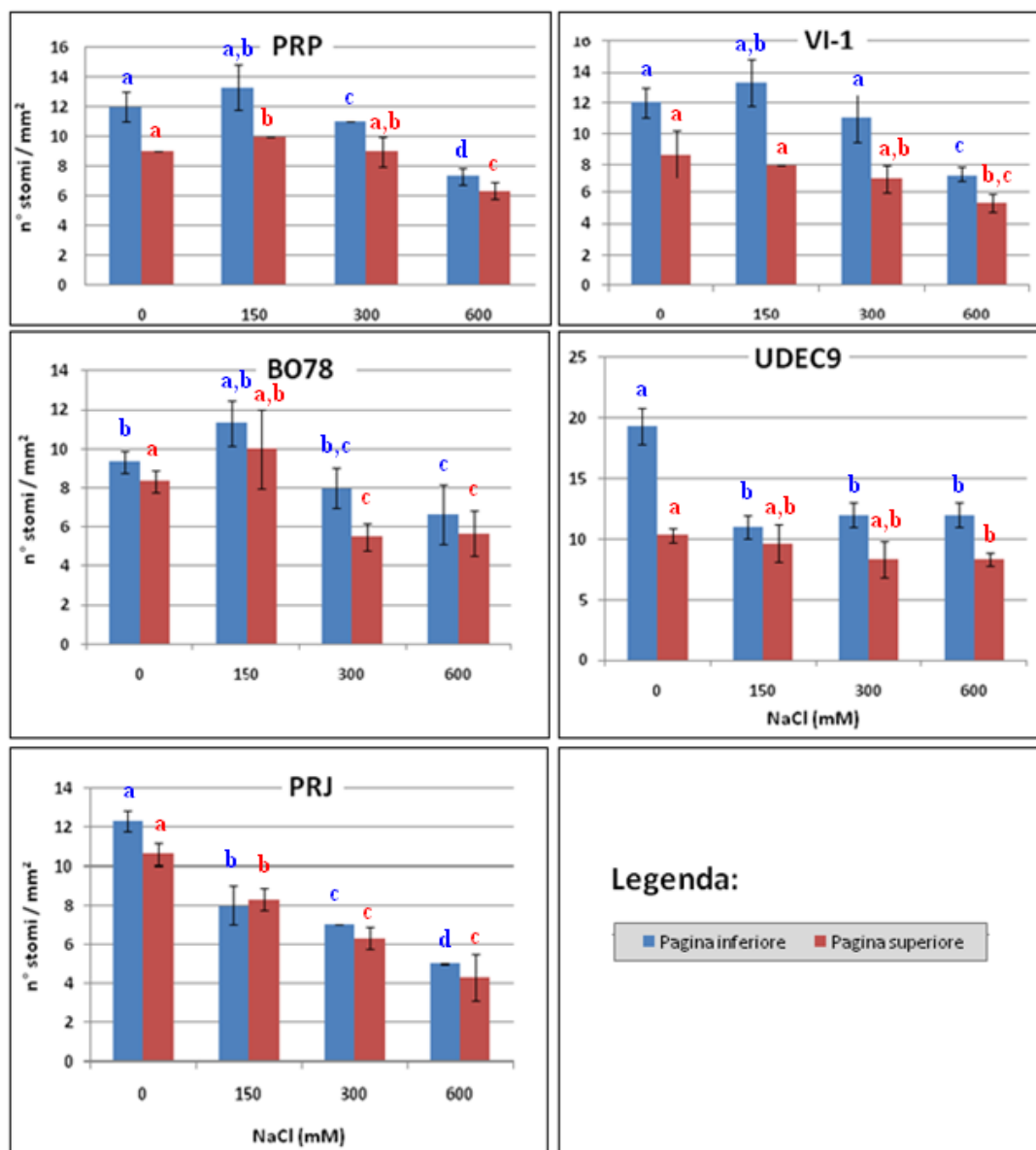


Figura 75: Densità stomatica (n° stomi / mm²) media (± dev. standard, n = 9) della pagina inferiore e superiore delle foglie delle 5 accessioni di quinoa.

In questa prova ci aspettavamo che le accessioni di quinoa mostrassero un andamento di numero di stomi per millimetro quadrato (ovvero densità stomatica), inversamente proporzionale alla concentrazione del sale somministrato. Nelle accessioni UDEC9 e PRJ la diminuzione della densità stomatica è significativa già a 150 mM, mentre in PRP, BO78 e VI-1 l'effetto diventa evidente a partire da 300 mM. Si nota, inoltre, che il numero di stomi della pagina superiore è sempre

minore di quello della pagina inferiore con un rapporto che varia tra il 70% – 80 % (Fig. 68).

Per una visione d'insieme dei risultati della densità stomatica delle 5 accessioni abbiamo sommato i valori precedenti, relativi alla pagina superiore e alla pagina inferiore, per confrontare le diverse risposte morfologiche.

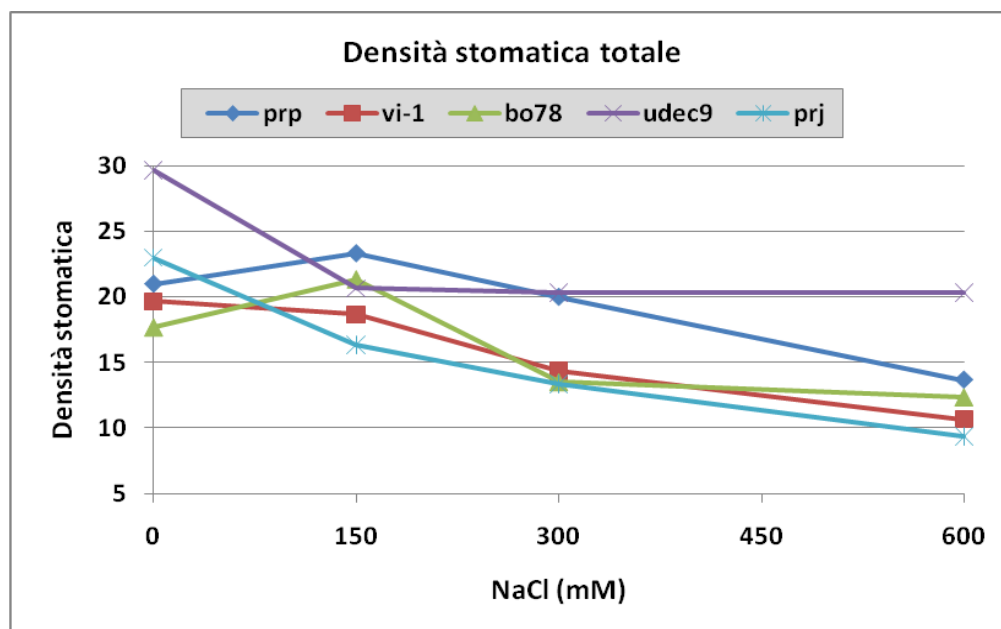


Figura 76: Densità stomatica totale (n° stomi pag inf + n° stomi pag sup) nelle 5 accessioni di quinoa trattate con crescenti concentrazioni di NaCl.

Come si vede le accessioni PRP, VI-1, BO78 e PRJ passano da una densità compresa tra 18 e 23 nel controllo ad una tra 9 e 14 stomi per mm^2 nei trattati con 600 mM NaCl. Le foglie di controllo (0 mM NaCl) di UDEC9 hanno una densità maggiore di stomi rispetto alle altre accessioni; il valore cala bruscamente nei trattati con 150 mM NaCl, tuttavia si mantiene più alto che nelle altre accessioni alle concentrazioni maggiori di sale (450 e 600 mM). Il tasso di variazione della densità stomatica riscontrata nelle piante trattate può essere rapportato con il controllo. Questo restituisce una variazione percentuale del numero di stomi nelle foglie trattate / controllo.

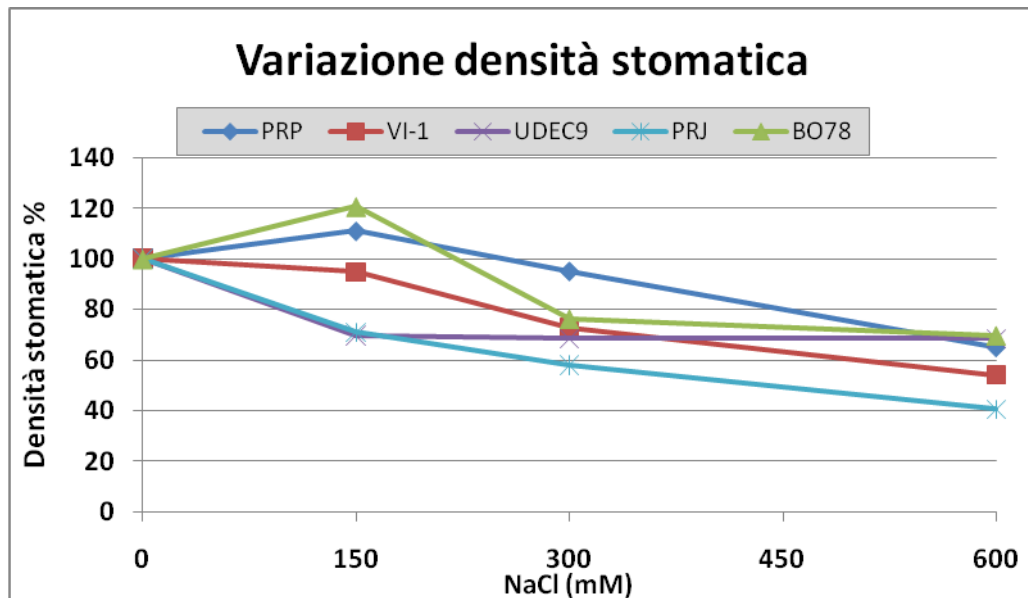


Figura 77: Variazione percentuale della densità stomatica totale dei trattati rispetto al controllo (controllo = 100%).

Questo grafico mostra che le differenze tra accessioni, per quanto riguarda la diminuzione della densità stomatica nei trattati rispetto al controllo in termini percentuali, si annullano alla concentrazione più alta di sale; rimangono, invece, differenze alla concentrazione più bassa dove si nota un aumento del 15-20% in PRP e BO78, un calo del 30 % in PRJ e UDEC9, e nessuna variazione in VI-1. A 450 mM, il valore è inferiore al controllo in tutte le accessioni, tranne PRP.

➤ Area stomatica

All'aumentare della concentrazione salina per ogni accessione si è anche misurata l'area media di uno stoma per la pagina superiore ed inferiore di tutti i trattamenti, compreso il controllo.

Tale analisi è stata eseguita prima scattando una foto al microscopio di un'area nota, e poi calibrando il software Image J[®] in modo che determinasse l'area degli stomi in un mm². L'area media di uno stoma è stata ottenuta dividendo l'area totale degli stomi per porzione di pagina fogliare per la relativa densità stomatica. Le misure sono state fatte tutte su foglie intermedie di pari età.

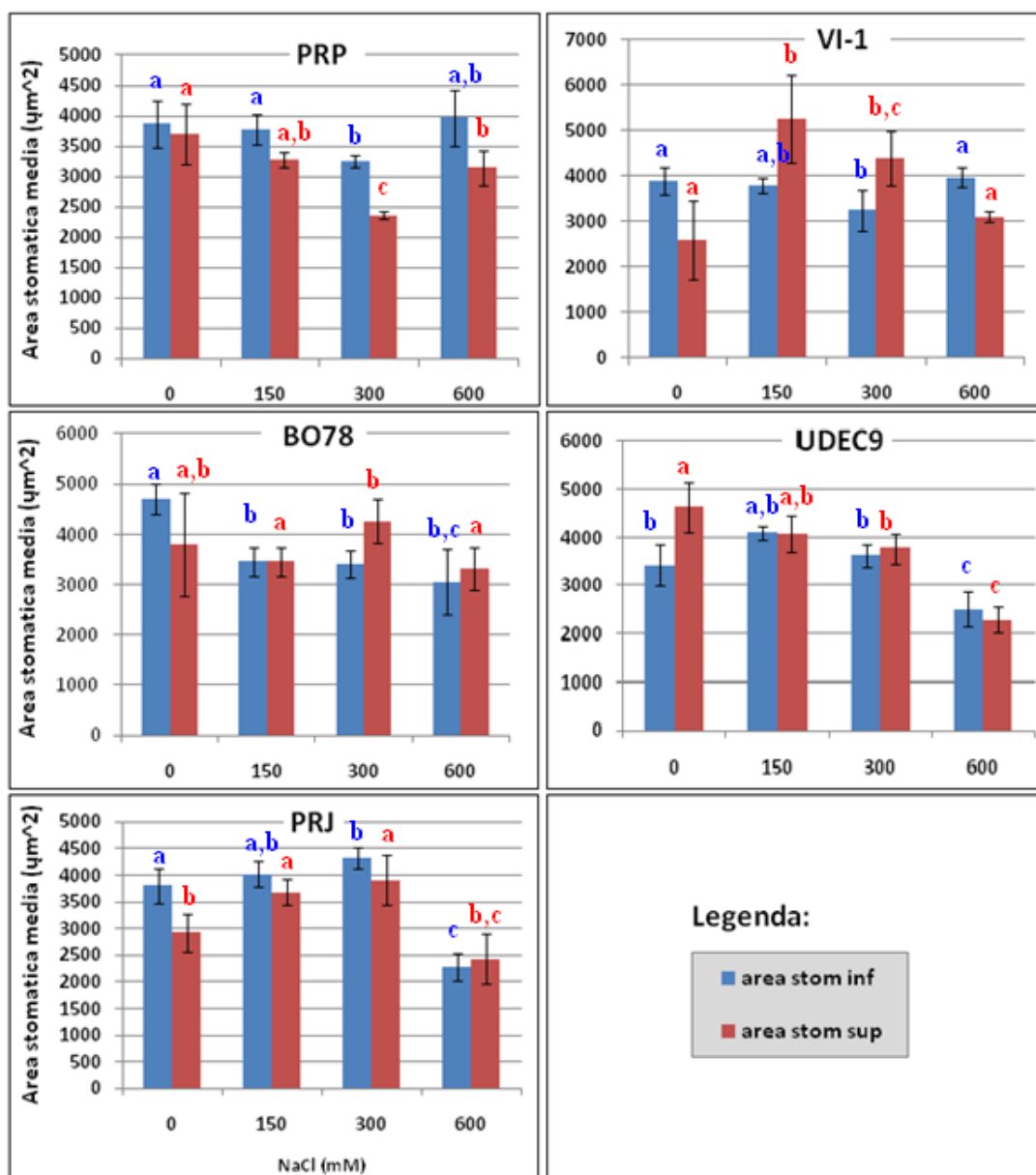


Figura 78: Area stomatica media (\pm dev. standard, $n = 9$) nella pagina superiore e inferiore.

Nelle foglie delle piante di controllo non vi sono grandi differenze di area stomatica media tra le diverse accessioni (3500-4500 μm^2). La risposta al trattamento salino varia nelle diverse accessioni. Ad esempio, UDEC9 e PRJ mostrano la maggiore diminuzione di area nei trattati con 600 mM NaCl.

Per visualizzare meglio la variazione dell'area stomatica media all'aumentare del trattamento salino è stato quindi calcolato il tasso di diminuzione dell'area stomatica media della foglia trattata rispetto al controllo. Per facilitare il confronto

tra le 5 accessioni, nel grafico è riportata la variazione dell'area stomatica totale (pagina superiore + pagina inferiore) sul controllo.

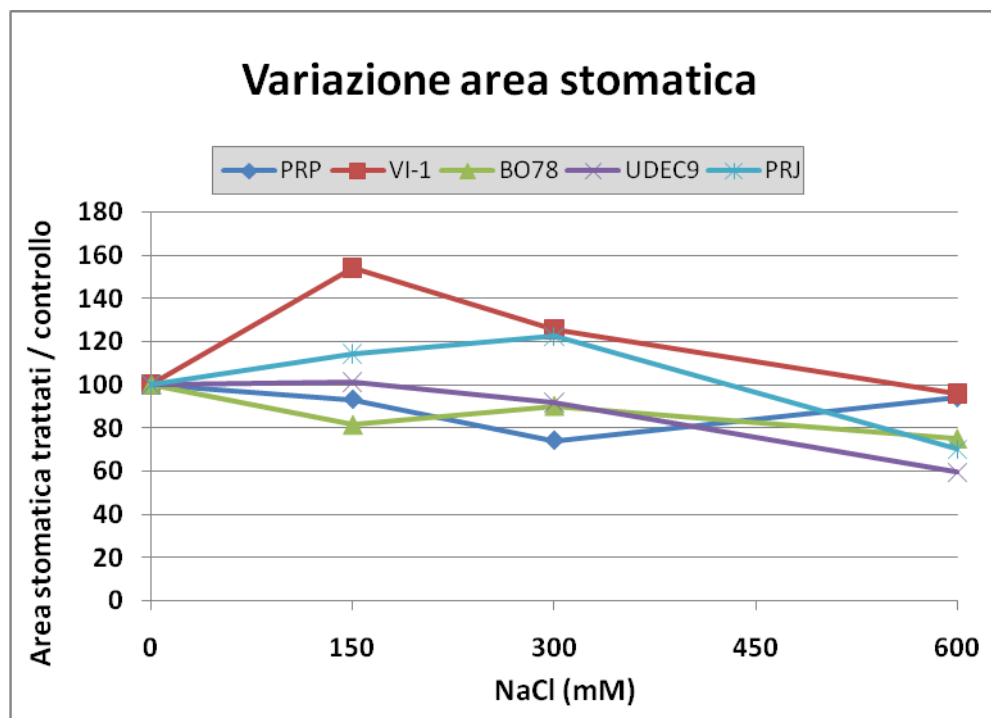


Figura 79: Variazione percentuale dell'area media stomatica nei trattati con sale rispetto al controllo, nelle 5 accessioni di quinoa (controllo = 100).

Alla concentrazione più bassa di sale, solo le accessioni PRJ (+15%) e, soprattutto VI-1 (+55%) mostrano un aumento dell'area stomatica rispetto al controllo; BO78 mostra la maggiore riduzione (-20%). A 300 mM NaCl, il comportamento delle 5 accessioni resta differenziato: +20% PRJ e VI-1, e -10/20% le altre; in PRJ l'area media cala poi bruscamente alle altre due concentrazioni di sale, mentre in PRP risale. A 600 mM NaCl, VI-1 e PRP hanno un'area media uguale al controllo, mentre nelle altre accessioni l'area è inferiore del 20-40 % (Fig. 79).

La risposta degli stomi è considerata essere un efficiente indicatore della crescita delle piante sotto condizioni di stress (Gutschick, 1999). Di solito, una bassa SLA (Area Fogliare Specifica), un'alta succulenza e una ridotta area stomatica sono indici di adattamento a condizioni di stress da siccità. Infatti è stato dimostrato che aumentano l'efficienza nell'utilizzo dell'acqua. L'aumento del numero di stomi per foglia, seguito da una ridotta dimensione dei componenti stomatici, indica una maggiore resistenza alla siccità.

5. GHIANDOLE DEL SALE

Al raggiungimento del 21° giorno (21 DAT) dall'inizio del trattamento, da 3 piante per accessione (BO78, UDEC9, PRJ, PRP e VI-1), sono state raccolte le foglie per condurre un'analisi al microscopio della morfologia e del numero delle vescicole del sale in funzione del trattamento salino e della posizione della foglia.

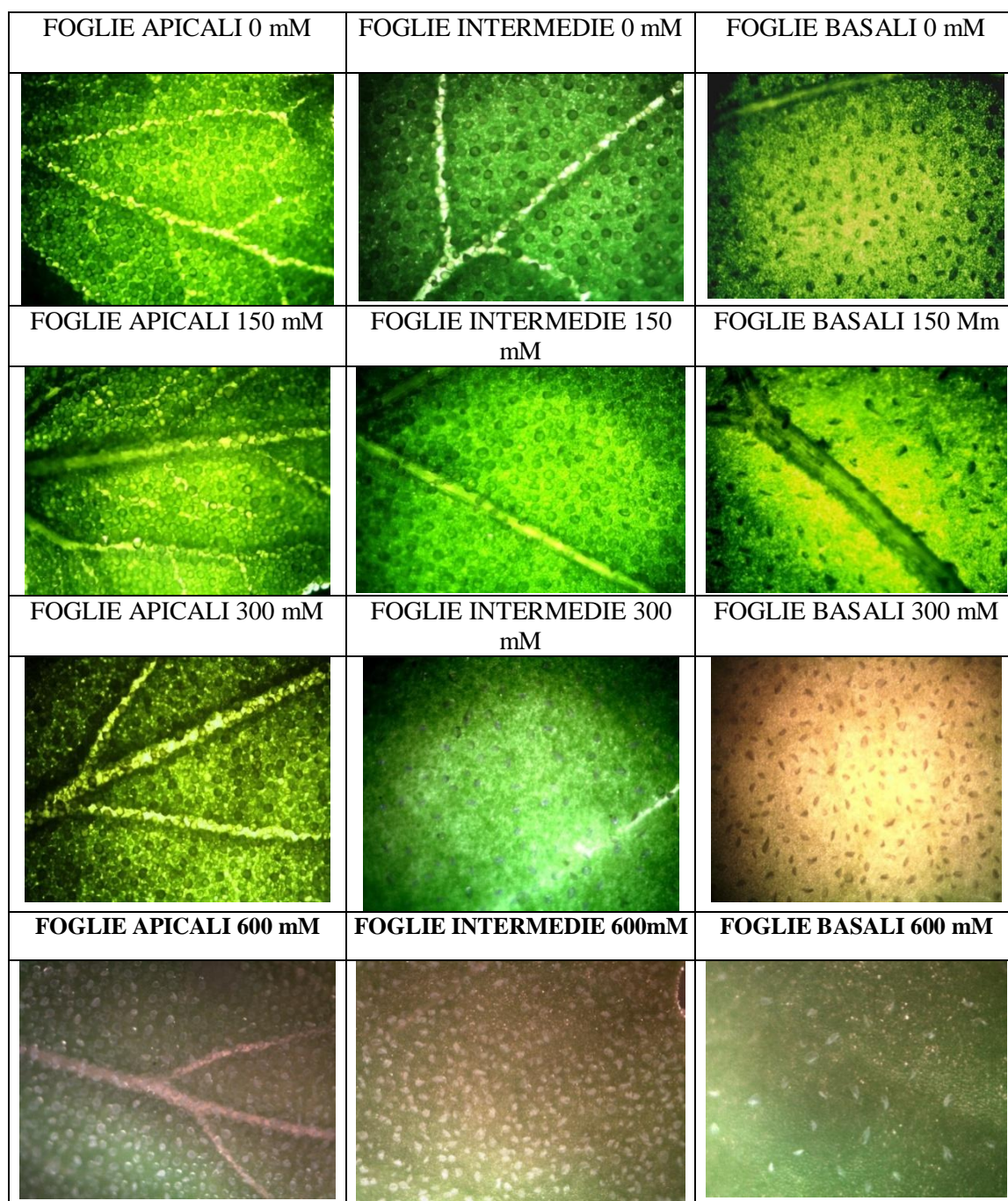


Figura 80: Foto delle foglie apicali, intermedie e basali delle 5 accessioni di quinoa. In verticale si legge l'incremento di trattamento salino somministrato (0, 150, 300 e 600 NaCl mM). In orizzontale si legge la posizione della foglia (apicale, intermedia e basale).

Lo studio delle ghiandole del sale ne ha mostrato una variazione nella densità e nella morfologia in funzione della distanza della foglia dall'apice del fusto e del trattamento salino somministrato. E' stata osservata la variazione della morfologia delle vescicole in funzione della posizione: in tutti i trattamenti (in parte anche con il 600 mM) le vescicole in posizione apicale avevano una forma perfettamente sferica. Nelle foglie intermedie ed ancora di più in quelle basali, la struttura delle vescicole era compromessa, mostrando la struttura cristallina del sale che accumulandosi, ha saturato la vescicola.

➤ **Densità delle ghiandole del sale**

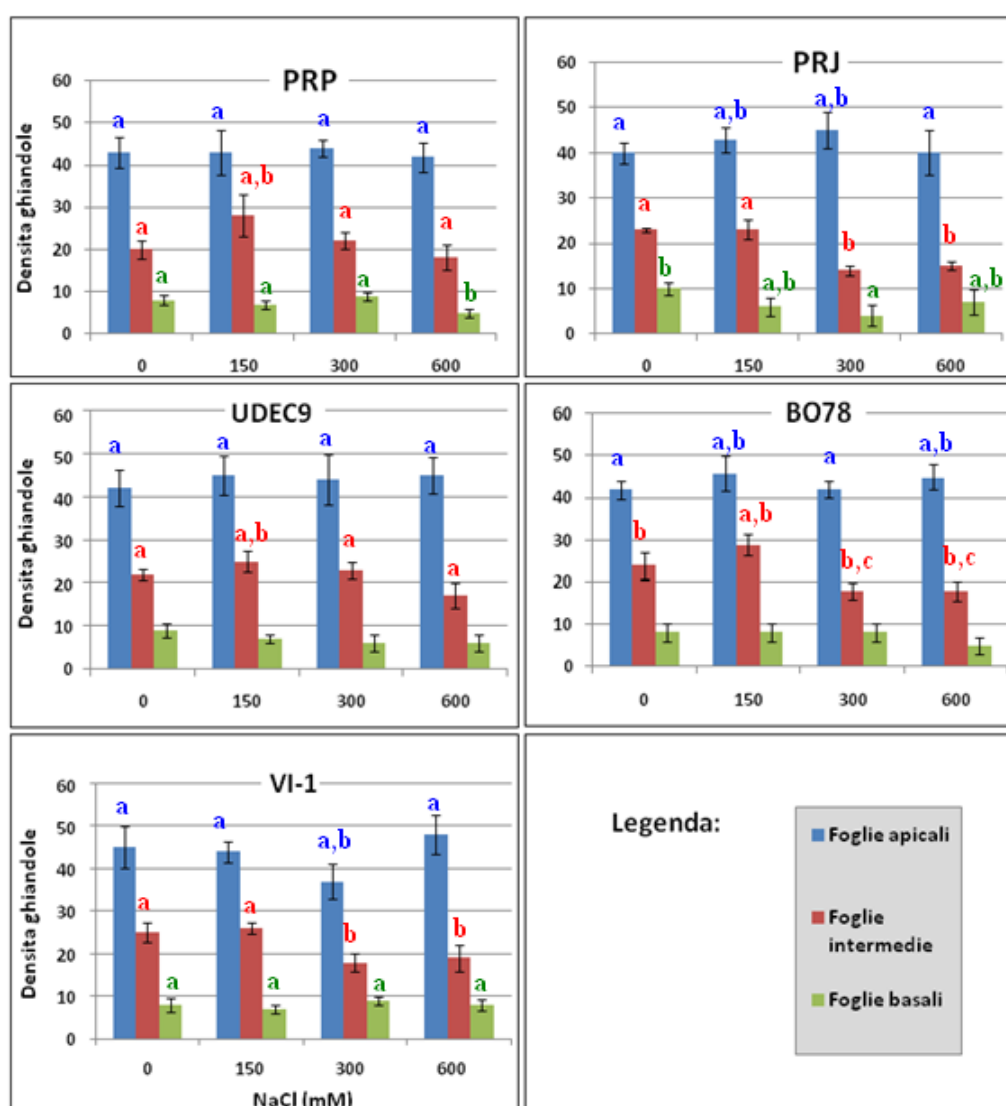


Figura 80: Densità (n° di vescicole / cm²) delle ghiandole del sale in funzione della concentrazione di sale somministrata, nelle diverse accessioni di quinoa.

In tutte le accessioni di quinoa, per ogni trattamento salino, c'è stata una progressiva diminuzione nel numero di vescicole del sale in funzione dell'età della foglia. L'aumento della concentrazione salina sembra non averne influenzato la densità. Nelle foglie apicali le vescicole del sale si sono sempre mostrate alla densità massima, con valori compresi tra 38 e 48 vescicole per cm². Spesso nelle foglie apicali, le vescicole erano sovrapposte una all'altra e perciò di difficile conteggio. Nelle foglie di posizione intermedia, le vescicole erano ben distinguibili, e distribuite uniformemente sulla superficie fogliare. Il loro numero variava tra 14 e 29 vescicole per cm². Sulle foglie basali il numero di vescicole è sempre stato molto inferiore rispetto alle precedenti, con un numero compreso tra 4 e 10 vescicole per cm² (Fig. 80).

Il grafico seguente riassume, per tutte le 5 le accessioni di quinoa, i valori di densità che sono stati ottenuti aumentando la concentrazione salina. Da questo grafico si evince come la variazione di densità delle vescicole non sia stata influenzata dal trattamento salino.

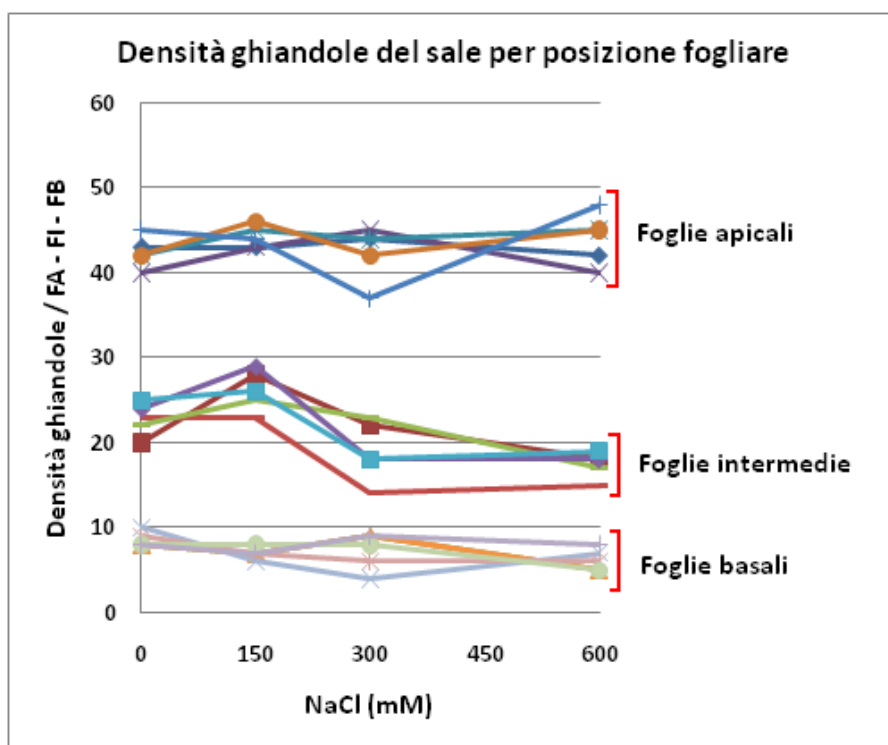


Figura 81: Densità delle vescicole del sale (n° / cm²) in funzione della concentrazione di sale somministrato per le tre diverse altezze di campionamento.

All'aumentare della concentrazione salina (NaCl) somministrata, la densità di vescicole nelle foglie apicali, intermedie e basali, in tutte le 5 le accessioni, rimane

sostanzialmente costante (Fig. 81). Solo nelle foglie intermedie si nota una modesta diminuzione del numero di vescicole, passando dal trattamento 150 al 300 mM di NaCl. Questo ultimo dato si mantiene costante incrementando il trattamento da 300 mM a 600 mM di NaCl.

Successivamente, si è voluto determinare se il numero di ghiandole del sale per foglia si mantenesse costante o meno, secondo la posizione della foglia e del trattamento salino somministrato. Il numero di ghiandole per foglia è stato calcolato moltiplicando la densità media (n° di vescicole / cm²) per l'area fogliare media.

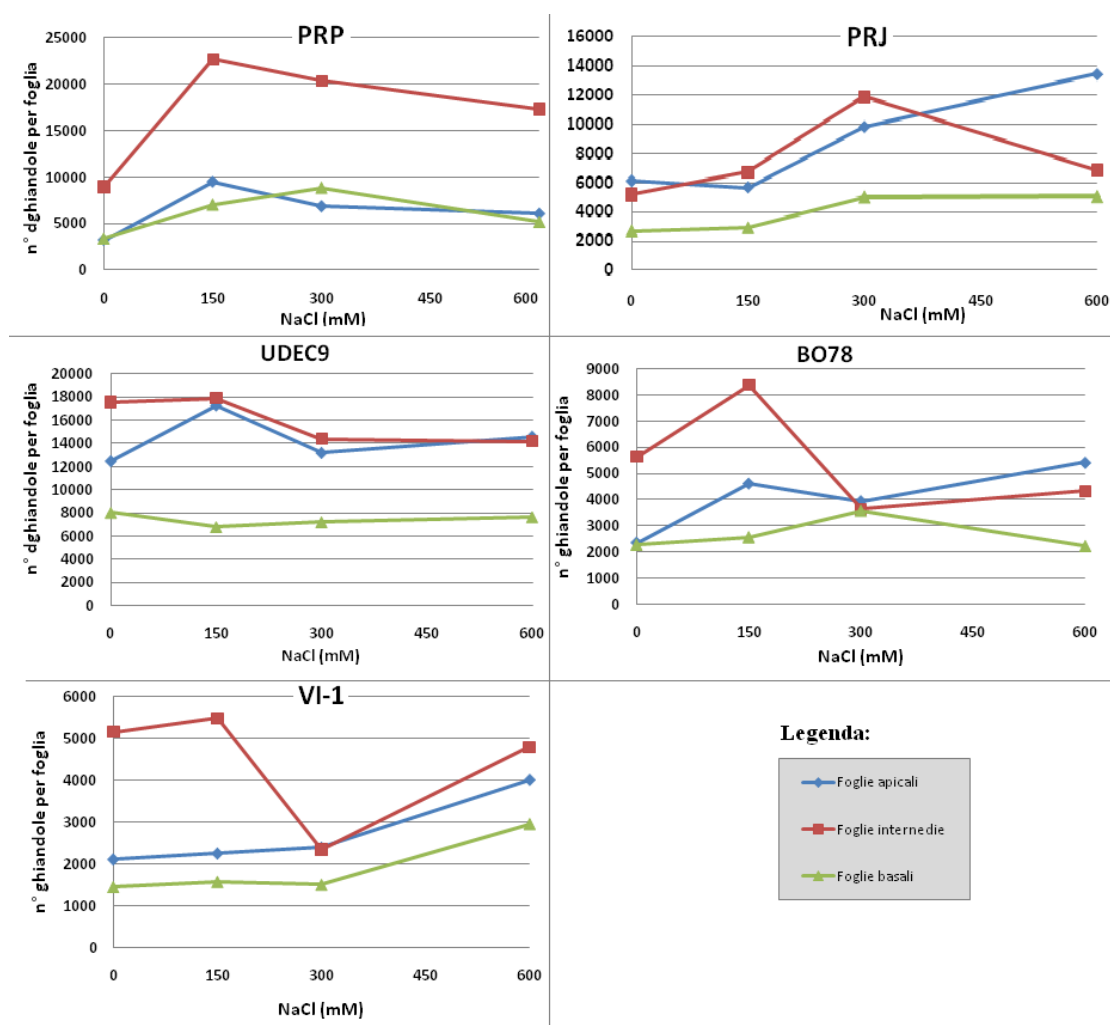


Figura 82: Numero di ghiandole del sale per foglia in funzione della posizione e del trattamento salino in ognuna delle accessioni.

Nei trattamenti NaCl 0 e 150 mM, il numero di vescicole del sale aumenta passando dalle foglie apicali a quelle intermedie, tranne nell'accessione PRJ, nella quale il numero si mantiene costante (Fig 82). Alla concentrazione di NaCl 300 mM il numero di vescicole diminuisce in tutte le accessioni tranne in PRJ. Passando al trattamento 600 mM, il numero di vescicole si mantiene pressoché costante al valore mostrato nel 300 mM, in tutte le accessioni.

Per mostrare come varia il numero di vescicole del sale, nelle 5 accessioni di quinoa è stato calcolato il rapporto tra il numero di vescicole dalle foglie apicali ad intermedie (Figura 83) ed ancora tra le apicali e le basali (Figura 84).

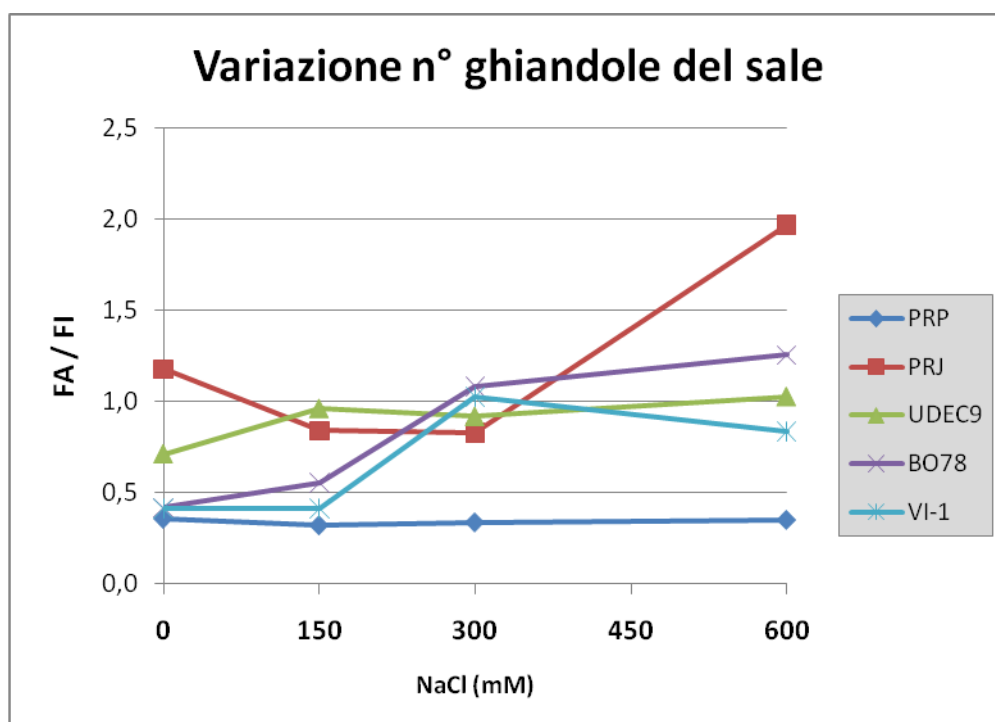


Figura 83: Numero delle ghiandole del sale sulla foglia apicale / numero delle ghiandole del sale delle foglie intermedie.

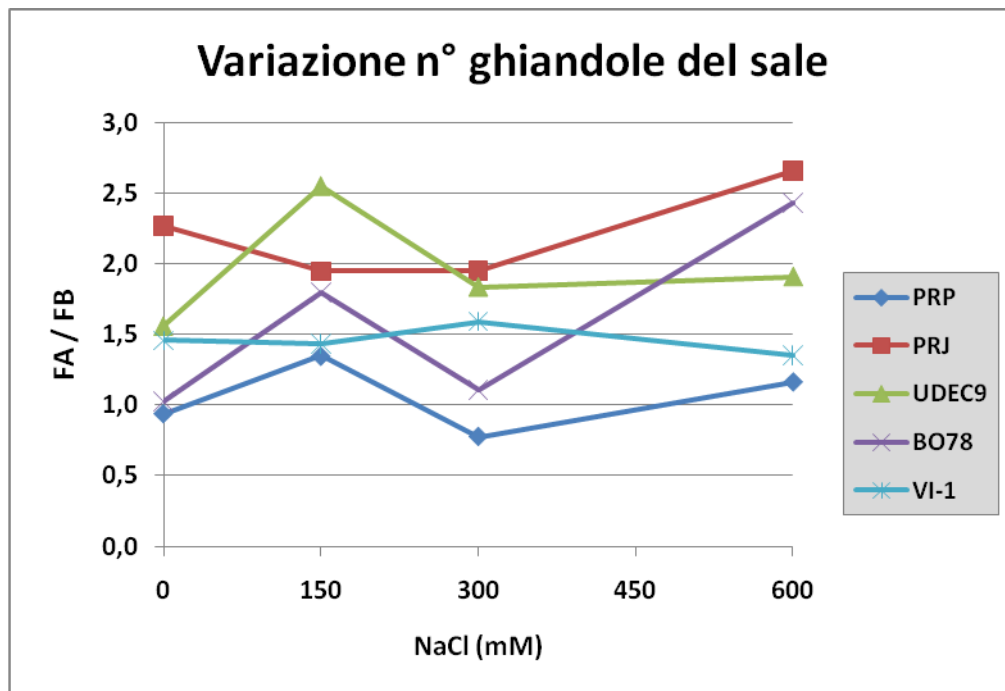


Figura 84: Numero delle ghiandole del sale sulla foglia apicale / numero delle ghiandole del sale delle foglie basali.

Il rapporto tra il numero di vescicole per foglie apicali ed intermedie mostra un valore nell'intorno dell'unità. Ciò comporterebbe che il numero di vescicole del sale si mantiene costante durante la crescita da foglie apicali ad intermedie nonostante le foglie si siano espanse.

Nell'accessione BO78, invece, il valore è prossimo allo 0.5, quindi il numero presente nelle foglie apicali è circa la metà di quello delle foglie intermedie. Questo significa che o sono state generate nuove vescicole durante l'espansione fogliare o che, data l'alta densità nelle foglie apicali, non siano state contate tutte e quindi il valore sia sottostimato.

Il rapporto del numero di vescicole del sale tra foglie apicali e basali è nell'intorno di 1,5. Quindi, mediamente, le foglie basali perdono una parte delle ghiandole .

Questo potrebbe significare che, oltre un certo punto, le vescicole non vengono più rigenerate per sostituire quelle che cadono per espellere il sale.

6. PROLINA

Per ogni accessione, qui di seguito si trovano le analisi di prolina dei diversi organi vegetali (foglie, fusto e radici) dei campioni trattati alle diverse concentrazioni saline per i 21 giorni di trattamento.

Come già detto nel relativo capitolo di materiali e metodi, i campioni analizzati sono stati raccolti da due piante dello stesso trattamento al 21 DAT, su ogni pianta sono stati condotti in parallelo due analisi per un totale di 4 campioni.

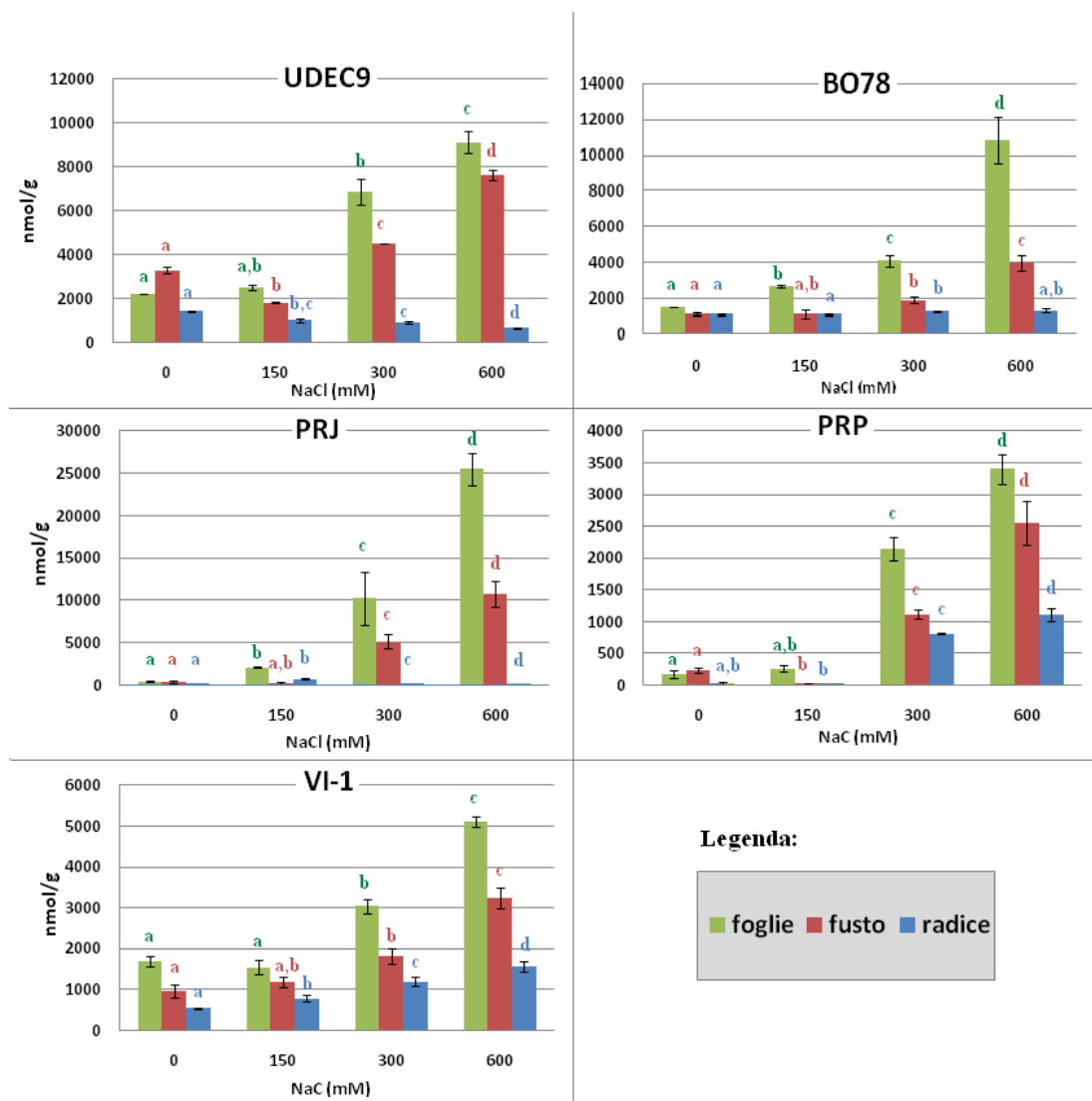


Figura 85: Concentrazione di prolina (nmoli/g PF) nei diversi organi delle diverse accessioni di quinoa trattate e non (controllo) con NaCl.

L'andamento del contenuto di prolina nelle diverse accessioni si presenta molto simile (Fig. 85). La concentrazione di prolina, espressa in nmoli su grammo di

peso fresco, aumenta all'aumentare della concentrazione salina, e l'accumulo è particolarmente evidente nelle foglie. L'accessione che presenta il maggior accumulo di prolina nelle foglie in risposta al trattamento è il PRJ, seguita da PRP, BO78, UDEC9 e VI-1. Analizzando il grafico della prolina totale si riesce a stabilire con più chiarezza il trend della prolina per pianta.

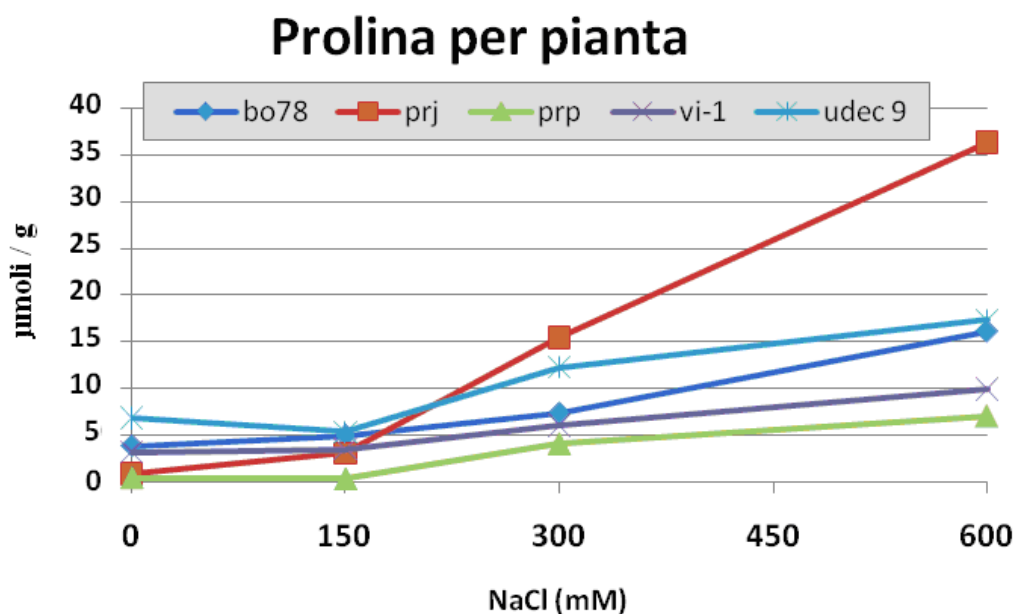


Figura 86: Contenuto totale (radici + fusto + foglie) medio di prolina per pianta nelle diverse accessioni di quinoa.

Considerando la prolina contenuta nei tre organi delle piante di quinoa, si potrebbero suddividere le 5 accessioni in 3 gruppi: da una parte PRP e VI-1 con un contenuto totale di prolina relativamente basso in tutti i trattamenti, dall'altra UDEC-9 e BO78 con un contenuto medio di prolina e infine l'accessione PRJ che fin dal passaggio da 150 a 300 mM NaCl ha un grande incremento della prolina fino ad arrivare al 600 mM con una concentrazione prolina circa il doppio delle altre accessioni (Fig. 86).

Da notare è la risposta piuttosto blanda, comune a tutte le accessioni, alla concentrazione 150 mM. Questo sta forse a testimonianza del fatto che la quinoa, essendo un'alofita facoltativa non risente in termini di stress di una tal concentrazione di sale.

Sebbene la concentrazione di 600 mM di NaCl sia mortale anche per la quinoa stessa somministrata per un lungo periodo (qualche settimana), tutte le accessioni

di quinoa continuano a produrre prolina per contrastare fino all'ultimo l'aumento degli ioni tossici interni alle cellule. Probabilmente si raggiungerà un plateau in corrispondenza della morte di tutte le cellule dei tessuti vegetali. Si nota infatti una leggera flessione per tutte cinque le accessioni dal passaggio da 300 mM a 600 mM di NaCl a testimonianza che il metabolismo della pianta potrebbe essere compromesso o irrimediabilmente danneggiato.

L'accumulo di prolina nelle cellule delle piante esposte a stress salino è un fenomeno diffuso che può essere utilizzato come marcatore biochimico per la selezione di varietà tolleranti al sale. (Martinez et al. 1996).

E' stato ipotizzato che l'esposizione ai "comuni" fattori di stress, cioè quelli ai quali le popolazioni sono regolarmente esposte nel loro ambiente naturale, non può riuscire ad influenzare la risposta fenotipica a causa di un adattamento genetico a questi fattori.

Al contrario, "insoliti" fattori di stress a cui la popolazione viene sottoposta per la prima volta possono causare variazioni fenotipiche (Hoffmann e Parsons, 1991).

La specializzazione in ambienti meno favorevoli può essere determinata da un decremento della plasticità (Lortie et al., 1996)

Quando una popolazione diventa adattata a fattori di stress, i sistemi tampone, in caso della presenza stress, possono determinare la stabilità del fenotipo bersaglio (che mostrerebbe una risposta in caso di sensibilità allo stress).

In conclusione, i nostri risultati mostrano che la variazione è notevole tra le popolazioni per diversi aspetti morfologici, e che è dovuto, in qualche misura, alla differenziazione genotipica.

Tuttavia, le popolazioni si sono mostrate capaci anche di produrre risposte morfologiche plastiche (almeno nelle condizioni di stress stabilite in questo studio). Il modello e l'intensità di questa risposta possono dipendere dalla storia vissuta dalle diverse accessioni di quinoa.

Sulla base di questa dichiarazione, è possibile che studi simili, utilizzando popolazioni diverse, possano produrre conclusioni diverse. In realtà, le reazioni sono determinate da una complessa correlazione di fattori tra genotipo ed ambiente che rendono difficile l'interpretazione e la modellizzazione degli eventi.

5. CONCLUSIONI

La quinoa è notoriamente molto resistente ai fattori di stress abiotico, compresa l'elevata salinità. Sono scarse, tuttavia, le conoscenze relative ai meccanismi che conferiscono a questa pianta tale capacità adattativa, e sono molte le domande che ancora attendono una risposta. Ci si chiede, per esempio, se la sua capacità di tollerare elevati livelli di sale nel terreno sia dovuta alla sua capacità di escludere (cioè di non assorbire) il Na^+ dal terreno, o se invece la pianta accumuli Na^+ nei tessuti e poi metta in atto uno o più meccanismi di tolleranza in grado di contrastarne la tossicità (ad es. sequestro nel vacuolo o estrusione). L'altra domanda importante è: il controllo osmotico in presenza di sale come viene attuato? La pianta investe risorse nella biosintesi di osmoliti organici, quali prolina/glicinbetaina, o utilizza più semplicemente gli ioni inorganici accumulati per svolgere tale funzione? In tal caso, come si protegge dalla citotossicità di specifici ioni (ad es. Na^+)? Quali altri meccanismi adotta per contrastare l'accumulo di sali e il rischio di stress idrico derivante da tale accumulo?

Le osservazioni fatte durante la mia tesi mostrano che, pur essendo una pianta tollerante (la mortalità è stata quasi nulla anche dopo la somministrazione di 750 mM NaCl), vi è stata, seppure tardivamente, una riduzione della crescita in altezza anche con la somministrazione della dose più bassa di sale (150 mM). Con l'aumentare della dose si è notata anche una riduzione di biomassa (fresca e secca), ma non nelle foglie che, al contrario, incrementavano o mantenevano il loro peso anche alla dose più alta di NaCl. Questo dato suggerisce che le foglie, organi importanti per l'assimilazione del carbonio e quindi per la sopravvivenza stessa della pianta, sono ben protette dallo stress salino imposto.

Come già riportato per altre specie (Gutschick, 1999), la risposta stomatica è un buon indicatore del grado di adattamento della pianta ad un ambiente ipersalino. In questa tesi si conferma il fatto che, anche nella quinoa, la salinità del terreno induce una riduzione della densità e dell'area stomatica, un meccanismo morfo-funzionale teso a diminuire l'evapotraspirazione e, quindi, a limitare lo stress idrico derivante dall'elevata concentrazione tissutale di sali. Al contrario, non si è

osservata una riduzione dell'area fogliare nelle piante trattate con sale rispetto ai controlli.

Il notevole accumulo nei tessuti fogliari e nel fusto di BO78 degli ioni forniti esogenamente, vale a dire Na^+ e Cl^- , dimostra che non vi è, in quinoa, un meccanismo d'esclusione, inteso come mancato assorbimento radicale del sale, e che, se esiste, è limitato. Ci si sarebbe aspettati, come forma di "compartimentazione" a livello della pianta intera (Munns, 2002), un maggior accumulo di Na^+ nelle foglie basali, più vecchie e quindi meno attive sul piano metabolico, ma così non è stato. E' possibile che i tessuti fogliari giovani siano comunque capaci di contrastare la tossicità dello ione accumulato. L'elevata concentrazione di ioni, assorbiti attraverso le radici e accumulati nei tessuti della parte aerea, suggerisce che, come riportato da Hariadi et al. (2010), in quinoa la tolleranza al sale si basi almeno in parte, sull'utilizzo di osmoliti inorganici.

E' stato spesso riportato che il mantenimento di un rapporto K^+/Na^+ citosolico ottimale sia importante per la tolleranza al sale (Shabala and Cuin, 2008). Accade, infatti, che piante, in generale glicofite, cresciute su terreno salino vadano incontro ad una carenza di K^+ , tali piante non sono quindi tolleranti. Nell'accessione BO78 di quinoa abbiamo invece osservato un accumulo di K^+ proporzionale al trattamento con NaCl . Ciò conferma il suo essere alofita, e quindi tollerante al sale, ed è probabile che anche questo ione contribuisca al mantenimento del turgore cellulare.

L'analisi degli ioni presenti nella frazione esterna della foglia ha dimostrato che una certa percentuale, variabile dal 6 al 20% circa, di ogni singolo ione viene estrusa. Questo rappresenta senz'altro un meccanismo d'esclusione – sia degli ioni forniti esogenamente (Na^+ , Cl^-) sia di altri ioni per bilanciare le cariche - anche se la sua portata è abbastanza contenuta. Pur essendo nota la presenza delle ghiandole del sale in quinoa, la loro densità in funzione della posizione della foglia e del trattamento salino sono riportate qui per la prima volta, e quindi non vi sono dati in letteratura al riguardo.

Pur restando valida l'interpretazione data sopra circa l'importante contributo degli ioni inorganici come osmoliti in grado di mantenere il turgore e la crescita per distensione delle cellule di quinoa in ambiente salino, i presenti dati mostrano che, in concomitanza, si ha l'accumulo di almeno un osmolita organico, vale a dire la prolina. La presenza di prolina, con aumenti quasi esponenziali, testimonia del fatto che è uno dei principali osmoprotettori in condizioni di siccità e stress salino. I soluti compatibili o osmoprotettori sono composti implicati nell'osmoregolazione durante lo stress salino ed è stato mostrato che sono coinvolti nella resistenza allo stress salino in molte piante (Chenet al., 2007). Gli osmoprotettori mitigano gli effetti del sale in diversi modi.

Nelle piante sottoposte a stress salino la prolina partecipa, infatti, agli aggiustamenti osmotici, alla protezione delle membrane, e alla regolazione del pH citoplasmatico. I soluti compatibili vengono accumulati nel citoplasma in risposta ad alte concentrazioni di sale, anche per prevenire la perdita d'acqua dalla cellula, bilanciando il potenziale osmotico. Attraverso l'accumulo fino ad elevate concentrazioni possono abbassare il potenziale idrico all'interno della pianta, portandolo a valori inferiori rispetto al substrato esterno. In questo modo viene ristabilito il movimento dell'acqua dal suolo alla pianta (Orcutt and Nilsen, 2000). Data la grande quantità di prolina prodotta, sembrerebbe logico assumere che la quinoa possiede svariate vie metaboliche da cui attingere per sintetizzare questo metabolita. Nei tessuti turgidi, cioè sani e senza perdita di potenziale idrico causato da elevate concentrazioni di NaCl nel terreno, la prolina è ossidata rapidamente, mentre in condizioni di stress salino o siccità, l'ossidazione viene inibita. Questo fenomeno porta la pianta ad accumulare prolina, mentre in condizioni di bassa salinità la prolina può essere demolita, probabilmente per favorire la sintesi proteica. L'accumulo di prolina è verosimilmente causato più da nuova sintesi che dal turnover di proteine esistenti (Parsons, 1991).

Il confronto tra le diverse accessioni ha permesso di mettere in evidenza alcune differenze di natura morfologica. La crescita in altezza è stata influenzata dall'aumento della concentrazione salina in tutte le accessioni, sebbene la velocità di crescita e l'altezza assoluta raggiunta alla fine del trattamento differisse leggermente. L'accessione che ha maggiormente risentito nel tasso di crescita (cm/g) dell'aumento della concentrazione salina è stato UDEC9, la quale

mostrava, valori più elevati nel controllo ma anche una inibizione più marcata in tutti gli altri trattamenti.

La variazione del peso fresco e secco degli organi vegetali in funzione dell'aumento della concentrazione salina, ha indicato un decremento omogeneo del fusto e delle foglie rispetto al controllo, mentre invece è aumentata la massa delle radici. Le accessioni VI-1 e PRP sono quelle che meno hanno risentito di questa differenza tra radici e parte aerea della pianta, mentre nelle accessioni BO78, UDEC9 e PRJ le radici sono arrivate a pesare più di 4 volte il peso del germoglio.

L'accumulo di prolina nelle piante esposte a stress salino è un fenomeno diffuso che può essere utilizzato come marcatore biochimico per la selezione di varietà tolleranti al sale (Martinez et al. 1996). I risultati di questa tesi hanno messo in evidenza differenze tra le accessioni, in particolare per quanto riguarda PRJ che accumula più del doppio di prolina rispetto alle altre a seguito del trattamento con NaCl 600 mM. Con l'aumentare della concentrazione esterna di NaCl, questo genotipo era più fortemente inibito nella crescita (peso fresco e secco) rispetto agli altri, pur mantenendo una biomassa radicale più cospicua. In futuro, saranno analizzati i contenuti di ioni in questa e altre accessioni per poter mettere in relazione tra di loro tutti questi dati.

Le differenze poco marcate tra le accessioni potrebbe dipendere dal fatto che tutte provengono da zone costiere del Cile centrale, e nessuna dall'altipiano.

E' stato ipotizzato, inoltre, che l'esposizione ai "comuni" fattori di stress, cioè quelli ai quali le popolazioni sono regolarmente esposte nel loro ambiente naturale, non può influenzare la risposta fenotipica a causa di un adattamento genetico a questi fattori. Al contrario, "insoliti" fattori di stress a cui la popolazione viene sottoposta per la prima volta possono causare variazioni fenotipiche. La specializzazione in ambienti meno favorevoli può quindi determinare un decremento della plasticità (Lortie et al., 1996) e quindi una maggiore stabilità del fenotipo. Tuttavia, le popolazioni si sono mostrate capaci anche di produrre risposte morfologiche plastiche (almeno nelle condizioni di stress stabilite in questo studio). Il modello e l'intensità di questa risposta può

dipendere dalla storia vissuta dalle diverse accessioni di quinoa. In realtà, differenti livelli d'interazione tra genotipo ed ambiente in popolazioni diverse possono determinare risposte diverse, che rendono difficile l'interpretazione e la modellizzazione degli eventi.

6. BIBLIOGRAFIA

Abebe T, Guenzi AC, Martin B, Cushman JC; (2003). Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiol.* 131: 1748–55.

Agarie S, Shimoda T, Shimizu Y, Baumann K, Sunagawa H, Kondo A, Ueno O, Nakahara T, Nose A, Cushman JC; (2007) Salt tolerance, salt accumulation, and ionic homeostasis in an epidermal bladder-cell-less mutant of the common ice plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *J. Exp. Bot.* 58: 1957-1967.

Araus, J.L., Slafer, G.A., Reynolds, M.P. and Royo, C; (2002). Plant breeding and drought in C-3 cereals: what should we breed for? *Ann. Bot.* 89, 925–940.

Arshad M Safi. MD, Cynthia A. Samala, RD, Richard A. Stein; (2003). Role of Nutraceutical Agents in Cardiovascular Diseases.

M. Ashraf, (1997). Changes in soluble carbohydrates and soluble proteins in three arid-zone grass species under salt stress. *Trop. Agric.* 74: 234–237.

Ben Hassine, A., Ghanem, M.E., Bouzid, S., and Lutts, S. (2009). Abscisic acid has contrasting effects on salt excretion and polyamine concentrations of an inland and a coastal population of the Mediterranean xero-halophyte species *Atriplex halimus*. *Ann Bot* 104: 925-936.

Boyer, J.S. (1982) Plant productivity and environment. *Science.* 218, 443–448.

Chen Z, Cui TA, Zhou M, Twomey A, Naidu BP, Shabala S (2007). Compatible solute accumulation and stress-mitigating effects in barley genotypes contrasting in their salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 58: 4245-4255.

Davies WJ, Kudoyarova G, Hartung W. 2005. Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought. *J. Plant Growth Regul.* 24: 285–95.

Della Penna D., (2005); Progress in the dissection and manipulation of vitamin E synthesis. *Trends in Plant Science* 10: 574-579.

Dodd IC, Egea G, Watts CW, Whalley WR; (2010), Root water potential integrates discrete soil physical properties to influence ABA signalling during partial rootzone drying. *Journal of Experimental Botany*. 61:3543-3551.

DuPont FM (1992) Salt-induced changes in ion transport: regulation of primary pumps and secondary transporters. Plenum Press. 91-100

Flowers T.J., Hajibagheri M.A. and Clipson N.J.W. (1986). Halophytes. *Quarterly Review of Biology*, 61: 313–337.

Fricke W, Akhiyarova G, Veselov D, Kudoyarova G. (2004). Rapid and tissue-specific changes in ABA and in growth rate response to salinity in barley leaves. *J. Exp. Bot.* 55:1115–23.

Fricke W, Akhiyarova G, Wei W, Alexandersson E, Miller A, et al. (2006). The short-term growth response to salt of the developing barley leaf. *J. Exp. Bot.* 57:1079–95.

Garnier, E., A. Laurent, A. Bellmann, S. Debain, P. Berthelie, C. Ducout, and M.L. Navas. (2001). Consistency of species ranking based on functional leaf traits. *New Phytol.* 152: 69-83.

Garnier E., B. Shipley, C. Roumet and G. Laurent. (2001) A standardized protocol for the determination of specific leaf area and leaf dry matter content. *Functional Ecology* 15: 688-695

Griffiths H, Robe W.E., Girnus J., Maxwell K, (2008). Leaf succulence determines the interplay between carboxylase systems and light use during Crassulacean acid metabolism in *Kalanchoë* species. *J Exp Bot* 59: 1851-1861.

Gutschick A, (1999). Biotic and abiotic consequences of differences in leaf structure. *New Phytologist* 143: 3-1.

Handley JF, Jennings H, (1977). The effect of ions on growth and leaf succulence of *atriplex hortensis* var. *Cupreata* *annals of botany* 41: 1109-1112.

Hariadi et al. - *J. Exp. Bot.* 2010 doi:10.1093/jxb/erq257.

Inan, G., Zhang, Q., Li, P., Wang, Z., Cao, Z., Zhang, H., Zhang, C., Quist, T.M., Goodwin, S.M., Zhu, J., Shi, H., Damsz, B., Charbaji, T., Gong, Q., Ma, S., Fredricksen, M., Galbraith, D.W., Jenks, M.A., Rhodes, D., Hasegawa, P.M., Bohnert, H.J., Joly, R.J., Bressan, R.A., and Zhu, J.K. (2004). Salt Cress. A Halophyte and Cryophyte *Arabidopsis* Relative Model System and Its Applicability to Molecular Genetic Analyses of Growth and Development of Extremophiles. *Plant physiology*, 135: 1718-1737.

James L.E.A; (2009). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): Composition, chemistry, nutritional, and functional properties. In : *Advances in Food and Nutrition Research*, 58: 1-31.

James RA, Rivelli AR, Munns R, von Caemmerer S ; (2002). Factors affecting CO₂ assimilation, leaf injury and growth in salt-stressed durum wheat. *Funct. Plant Biol.* 29:1393–403.

Lortie C., Aarssen LW; (1996). The specialization hypothesis for phenotypic plasticity in plants. *International Journal of Plant Science* 157: 484-487.

Lovelock C.E. and Ball M.C; (2002). Influence of salinity on photosynthesis of halophytes. In Lauchli, A. Luttge, U. eds, *Salinity: Environment-Plants-Molecules*. 315-339.

Martinez CA, Maestri M, Lani ERG; (1996). In vitro salt tolerance and proline accumulation in Andean potato (*Solanum* spp.) differing in frost resistance. *Plant Sci.*, 116: 177-184.

Maughan PJ, Turner TB, Coleman CE, Elzinga DB, Jellen EN, Morales JA, Udall JA, Fairbanks DJ, Bonifacio A; (2009). NRC Research Press. Characterization of Salt Overly Sensitive 1 (SOS1) gene homoeologs in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Genome*, 52: 647-657.

Munns R; (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment*, 25: 239–250.

Munns R, Mark Tester; *Annu. Rev. Plant Biol* (2008). Mechanism of Salinity Tolerance. 654: 1-21.

Orcutt DM, Nilsen ET; (2000). *The Physiology of Plants Under Stress*. John Wiley & Sons.

Osmond C.B., Luttge, U., West, K.R., Pallagry, C.K. and Shacherhill, B; (1969). Ion absorption in *Atriplex* leaf tissue. II. Secretion of ions to epidermal bladders. *Aust. Journal of Biol. Sci.* 22: 797-814.

Parsons, J.T., Richardson A., Schaefer, E. M. and Ma A., (2001). Serine phosphorylation of focal adhesion kinase in interphase and mitosis: a possible role in modulating binding. *Mol. Biol. Cell* 12: 1-12

Verslues P.E., Agarwal M., Katiyar-Agarwal S., Zhu J., Zhu J.K; (2005). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J.* 45: 523 -539.

Phillips RD, Jennings DH, (1976). Succulence, Cations and Organic Acids in Leaves of *Kalanchoe daigremontiana* Grown in Long and Short Days in Soil and Water Culture. 599-611.

Poorter, H. and R. de Jong; (1999). A comparison of specific leaf area, chemical composition and leaf construction costs of field plants from 15 habitats differing in productivity. *New Phytol.* 143: 163-176.

Progress in botany (1995); Salt Resistance in Herbaceous Halophytes and Mangroves., Volume 56, Springer Verlag, Berlin 1995. 416-429.

Schlick Greg and David L. Bubenheim (1993). "Quinoa: An Emerging "New" Crop with Potential for CELSS).

Schlick G, Bubenheim DL. (1996). Quinoa: Candidate crop for NASA's Controlled Ecological Life Support Systems. 632-640.

Shabala S, Cuin TA; (2008) Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum*. 133: 651–669.

Shen B, Jensen RG, Bohnert H. (1997). Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiol*.115: 527–32.

Shi H, Quintero FJ, Pardo JM, Zhu J-K (2002) The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁺ transport in plants. *Plant Cell* 14: 465–477.

Shipley B; (2002). Trade-offs between net assimilation rate and specific leaf area in determining relative growth rate: relationship with daily irradiance. *Funct. Ecol*. 16: 682-689.

Stephen L, DeFelice MD, (1976). The NutraCeutical Revolution: Fueling a Powerful, New International Market. FIM: The foundation for Innovation in Medicine.

Storey R., Pitman, M.G., Stelzer, R., and Carter, C. (1983). X-Ray Micro-Analysis of Cells and Cell Compartments of *Atriplex spongiosa*. *Journal of Experimental Botany*, 34: 778-794.

U.S.Environmental Protection Agency, Saponins of *Chenopodium quinoa*; Biopesticides Registration Action Document.

Yancey, P. H. (1994). Compatible and counteracting solutes. In K. Strange (ed.), Cellular and molecular physiology of cell volume regulation, 81–109.

Wilkinson S, Davies WJ, (2002). ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell and Environment* 25: 195–210.

Wilson P., K. Thompson, and J. Hodgson; (1999). Specific leaf area and leaf dry matter content as alternative predictors of plant strategies. *New Phytol.* 143: 155-162.

Zhu, J.K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, 6: 66-71.

RINGRAZIAMENTI

A pochi giorni dalla fine della mia carriera studentesca, vorrei dedicare le prossime righe a tutti coloro che mi hanno aiutato nel perseguimento di questo importante traguardo.

Il primo più sentito e caloroso ringraziamento va alla professoressa Stefania Biondi, che s'è sobbarcata un compito di certo non facile nel farmi da mentore dapprima nel tirocinio della triennale ed ora, come se non bastasse, nella tesi della magistrale.

Un ringraziamento particolare a Giovanni che con la sua simpatia e professionalità ha contribuito a rendere questo periodo indimenticabile.

Ringrazio Francesco, Sara, Ilaria, Raffaella, Valeria e Mohammad per i preziosi consigli ma soprattutto per il bel rapporto che si è instaurato.

Un ringraziamento ai miei genitori che mi hanno sempre sostenuto, a Laura, la persona più importante della mia vita e a Sandro e Ivana per l'operato.

Ringrazio Federico, carissimo amico e compagno di studi.

Ringrazio Elibert per la tranquillità, la saggezza, l'amore per la natura e le montagne che mi ha trasmesso e che ora abbiamo in comune.

Ringrazio anche tutti gli altri miei amici per i piacevoli momenti passati assieme.