



“Ruolo dei biostimolanti nel contrastare lo stress da alta temperatura”

Giacomo Cocetta Ph.D

Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università degli Studi di Milano

giacomo.cocetta@unimi.it



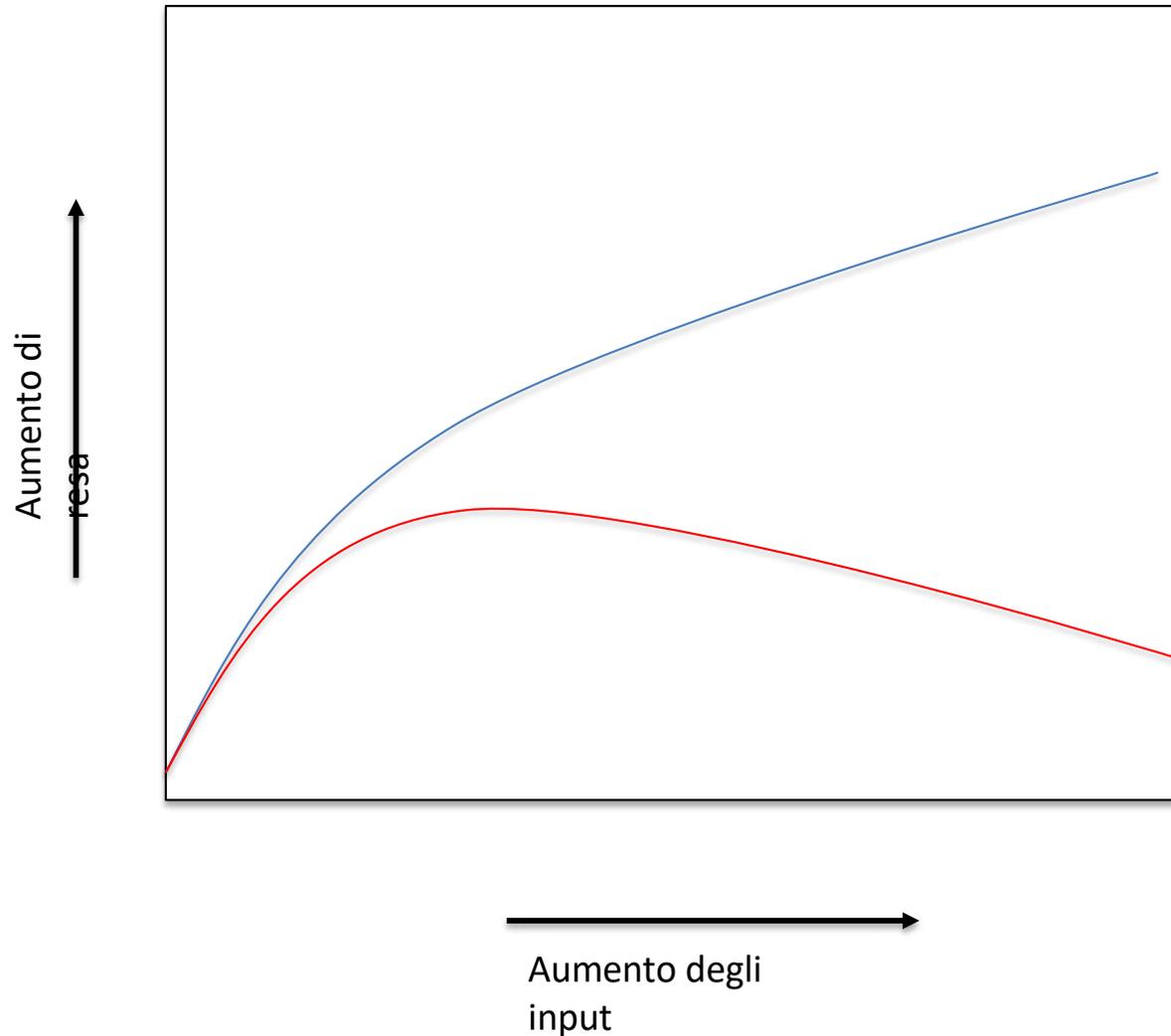
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE
E AMBIENTALI - PRODUZIONE,
TERRITORIO, AGROENERGIA

Stress abiotici

Condizioni ambientali che riducono la crescita e la resa delle colture al di sotto dei livelli ottimali (Cramer et al., 2011).



Stress abiotici



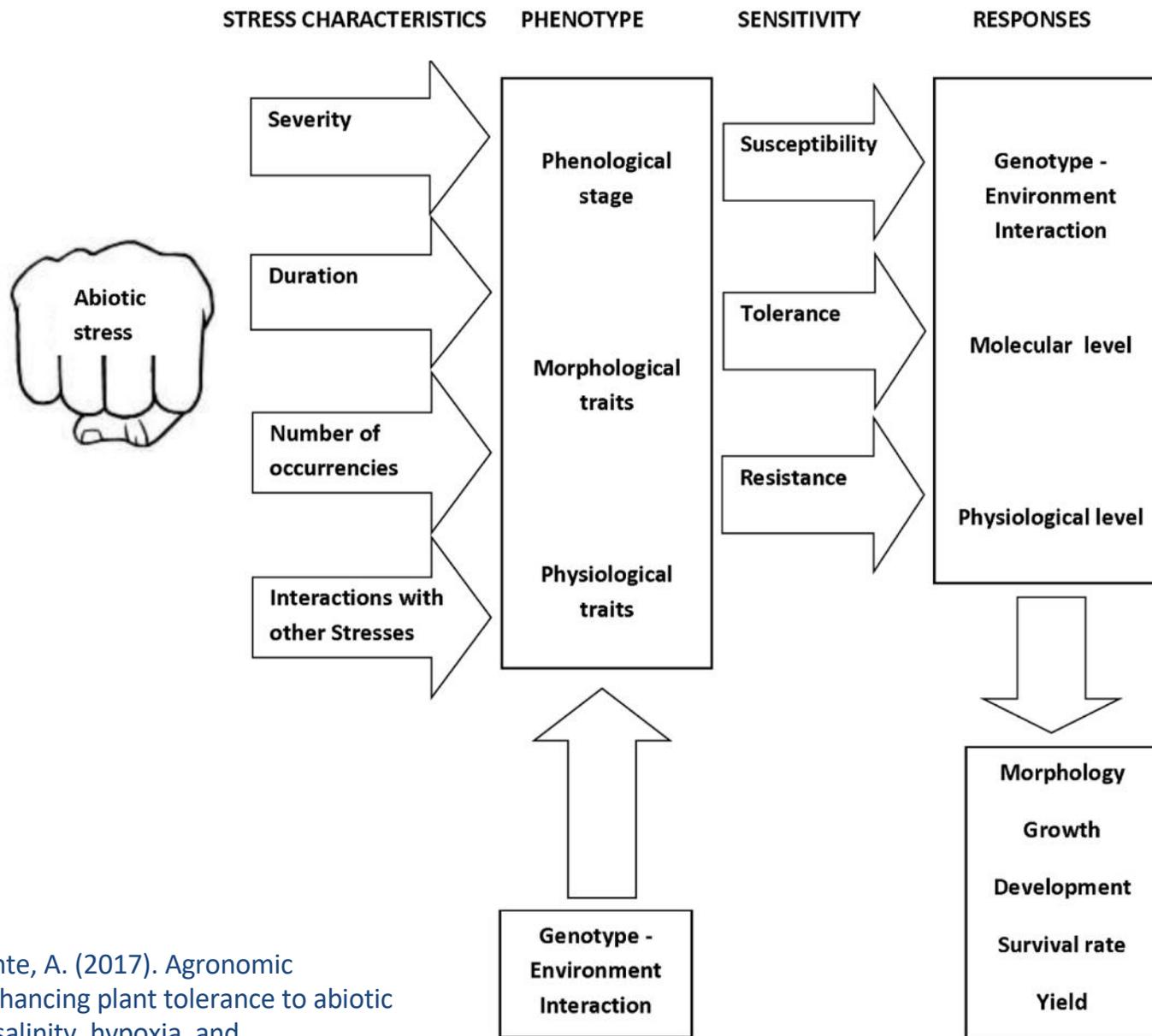
- Alta temperatura
- Stress salino
- Stress da freddo
- Deficit idrico
- Deficit nutrizionale
- Metalli pesanti
-



Gli stress abiotici possono limitare le produzioni agricole con riduzioni di resa fino al 70% (Boyer, 1982).

Un rapporto della FAO del 2007 ha affermato che solo il 3,5% della superficie terrestre mondiale non è influenzata da stress ambientali.



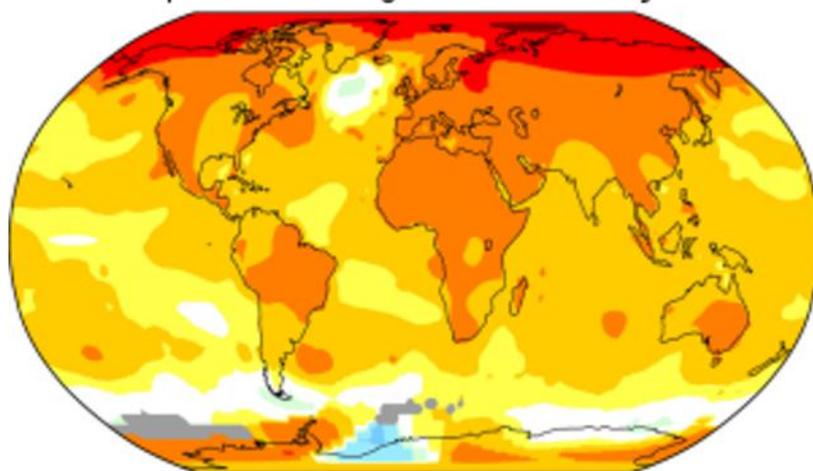


Mariani, L., & Ferrante, A. (2017). Agronomic management for enhancing plant tolerance to abiotic stresses—drought, salinity, hypoxia, and lodging. *Horticulturae*, 3(4), 52.

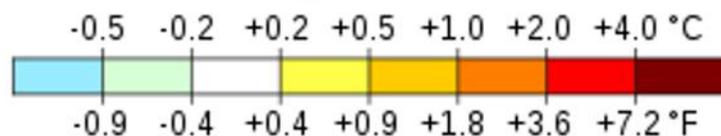


Stress da alta temperatura

Temperature change in the last 50 years



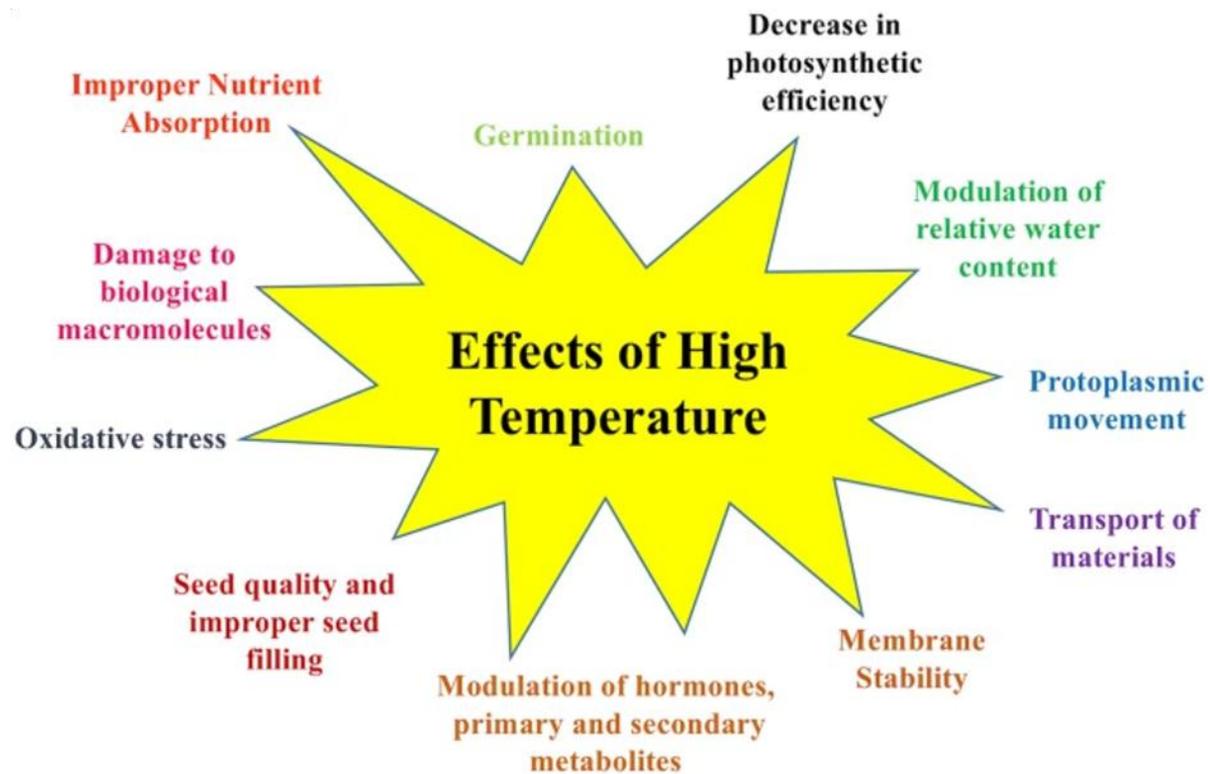
2011-2020 average vs 1951-1980 baseline



Si prevede che le temperature aumenteranno ulteriormente di 2-6 °C entro la fine di questo secolo a causa del rapido aumento delle concentrazioni di gas serra nell'atmosfera.

Yan, J., Yu, L., Xuan, J., Lu, Y., Lu, S., & Zhu, W. (2016). De novo transcriptome sequencing and gene expression profiling of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves under heat stress. *Scientific reports*, 6(1), 1-10.





Kumari, P., Rastogi, A., & Yadav, S. (2020). Effects of Heat stress and molecular mitigation approaches in orphan legume, Chickpea. *Molecular biology reports*, 47(6), 4659-4670.



Stress da alta temperatura

La capacità di una pianta di tollerare temperature elevate, senza una fase di condizionamento, è definita **termo tolleranza basale**, mentre la capacità di una pianta di sopravvivere ad alte temperature letali dopo la pre-esposizione a temperature sub-letali è nota come **termo tolleranza acquisita**.





Strategie di acclimatazione e tolleranza allo stress termico

Heat shock proteins (HSPs)

Le piante producono HSP per mantenere la stabilità della membrana, le normali funzioni cellulari e per proteggere la funzionalità delle proteine.

Ormoni vegetali

Per aumentare la tolleranza al calore e ridurre lo stress ossidativo, le piante aumentano gli ormoni vegetali.

Enzimi antiossidanti

Essenziale per la detossificazione dalle ROS.



Accumulo di metaboliti primari

Le piante accumulano prolina, glicina, betaina e zuccheri solubili per regolare le attività osmotiche e proteggere le strutture cellulari dal calore.

Metaboliti secondari

Le piante accumulano composti fenolici per proteggersi dai danni ossidativi.

Altre molecole protettive

Late embryogenesis abundant (LEA) proteins, ruolo importante anche nella protezione dal calore.

• Source: Craita, E. B. and Tom, G. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in plant science*. Doi: 10.3389/fpls.2013.00273



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE
E AMBIENTALI - PRODUZIONE,
TERRITORIO, AGROENERGIA

Strategie per contrastare gli effetti negativi degli stress abiotici

Efficacia



Rapidità



Sostenibilità



BIOSTIMOLANT

|



Biostimolanti

I sistemi colturali si stanno muovendo sempre più verso la riduzione del consumo di acqua, nutrienti e fitofarmaci con l'obiettivo di migliorare la produzione e ridurre l'impatto ambientale.

I biostimolanti sono prodotti derivati da materiale organico che contengono aminoacidi, peptidi, vitamine, acidi umici, estratti di alghe, elementi minerali e tracce di ormoni (è vietata l'aggiunta di ormoni sintetici).

Questi prodotti inducono resistenza allo stress abiotico, aumentano l'efficienza dell'uso degli elementi minerali e stimolano le risposte ormonali.



Necessità di caratterizzare la **funzione** di un biostimolante e quindi di comprenderne i **meccanismi** e le **modalità** di azione.



Issues

Function defines the product.

All plant biostimulants need Single Market access.

Plant biostimulants contribute to climate-smart agriculture

<https://biostimulants.eu/>



CASO DI STUDIO

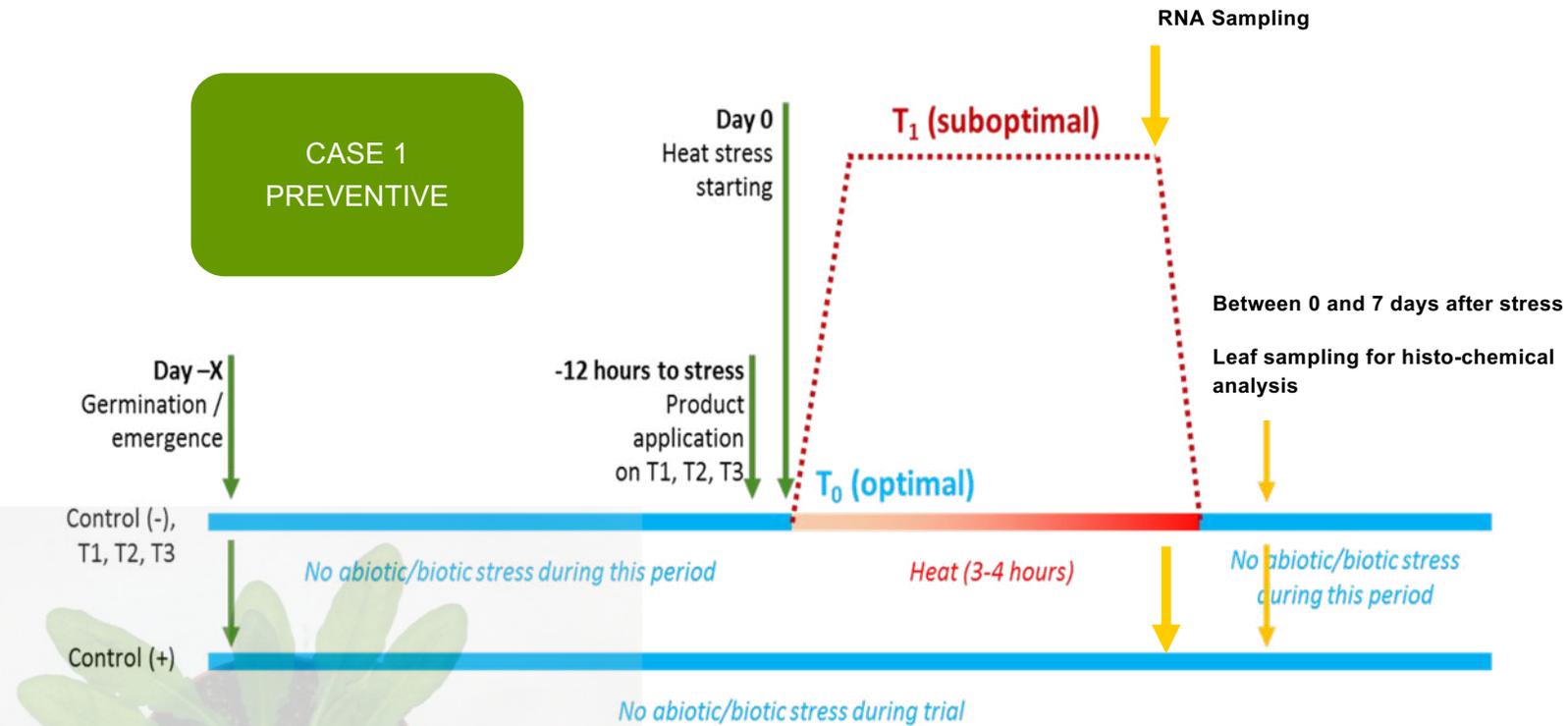
Applicazione di prodotti biostimolanti per
contrastare gli effetti dello stress termico

APPROCCIO FISILOGICO / MOLECOLARE



Piano Sperimentale

CASE 1 PREVENTIVE



Plants were grown without stress until the rosette stage. Products were applied on plants and 12 hours later, temperature started to increase rapidly until 37° C. Plants remained at 37° for 4 hours; then leaves were sampled for RNA extraction



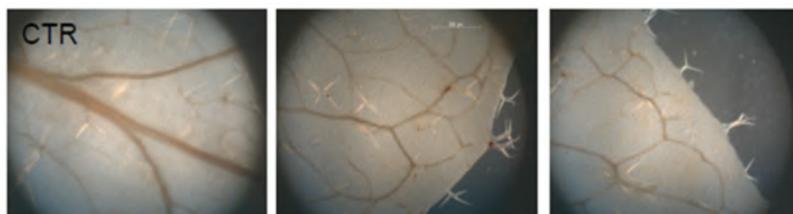
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE
E AMBIENTALI - PRODUZIONE,
TERRITORIO, AGROENERGIA



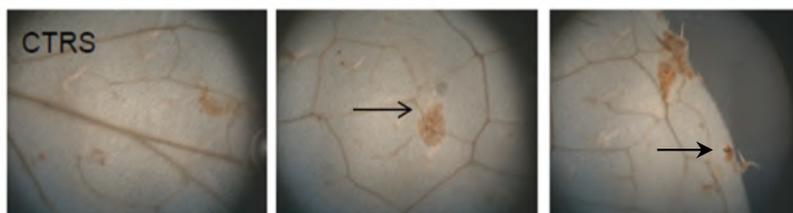
tradecorp
nutri-performance

Valutazione istochimica: DAB

Controllo
non stressato



Controllo
Stressato



Biostimolante
a base di
alghie (A)



Biostimolante a
base di AA (C)



**DAB: 3,3'-Diaminobenzidine



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE
E AMBIENTALI - PRODUZIONE,
TERRITORIO, AGROENERGIA



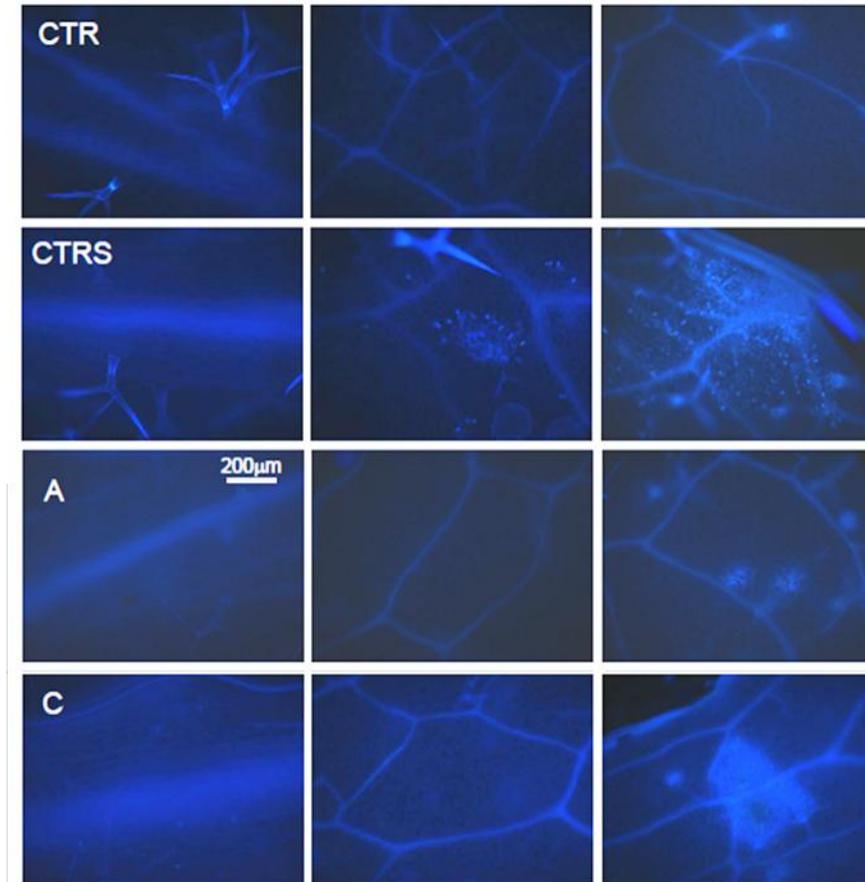
Valutazione istochimica: lignificazione

Controllo
non stressato

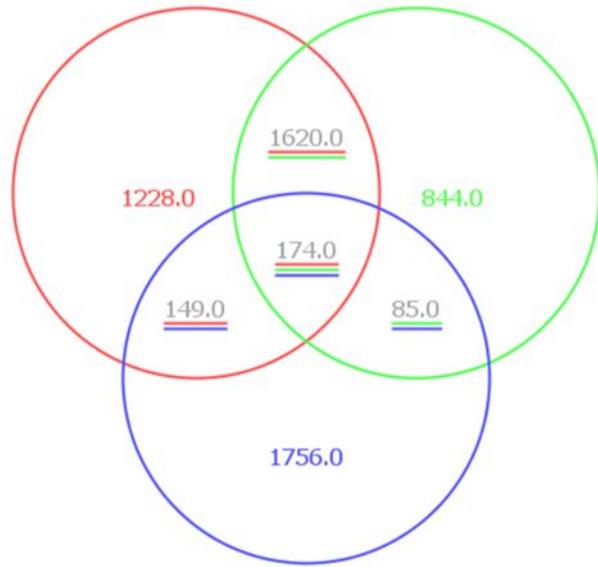
Controllo
Stressato

Biostimolante
a base di
alghe (A)

Biostimolante a
base di di AA (C)



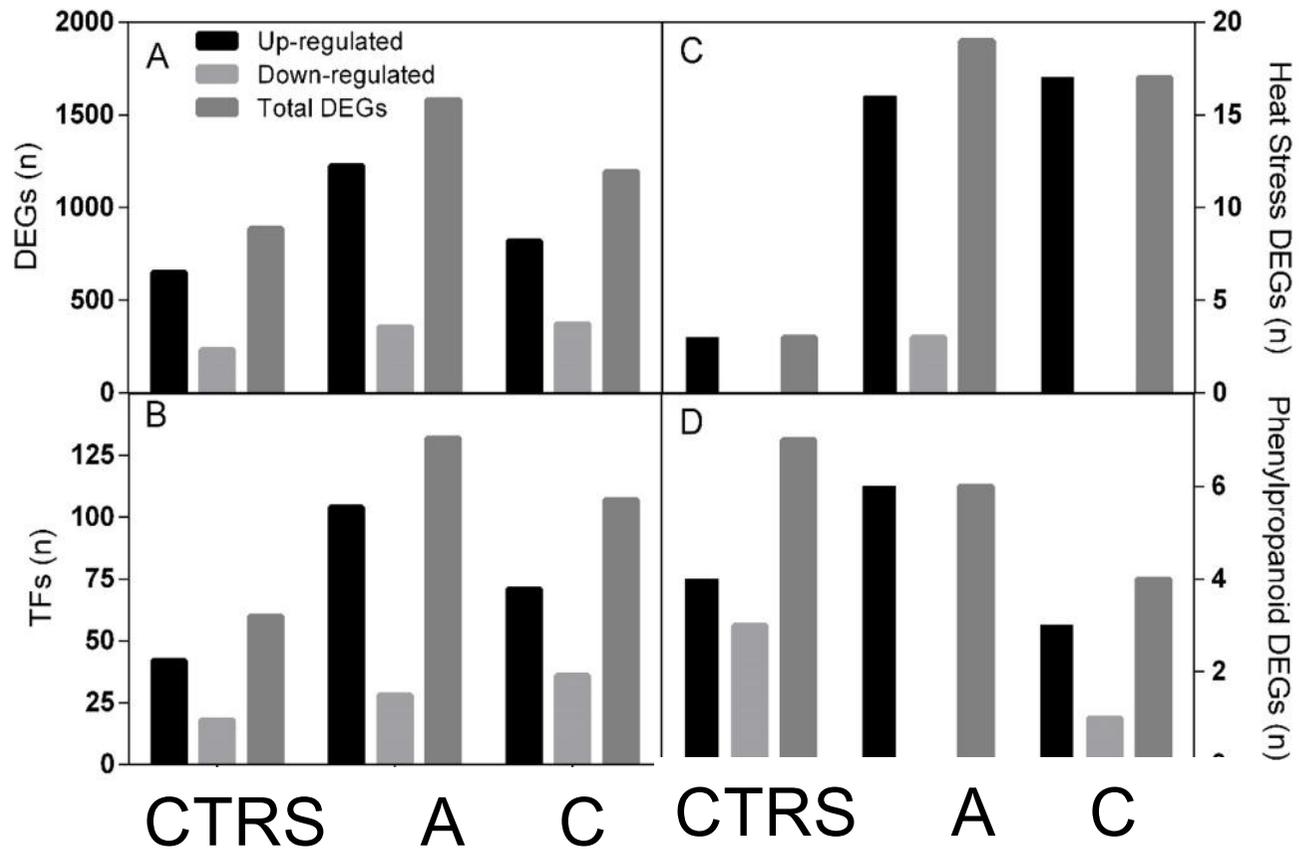
A



CTRS

C

Analisi del trascrittoma



Attivazione di geni HSP

Controllo
Stressato

Biostimolante
a base di
alghe (A)

Biostimolante a
base di AA (C)

UP-Regulated genes		
Accession n	Description - CTRS	Up-Reg
at5g12030	Arabidopsis thaliana Heat Shock Protein 17.6A	7
at1g71000	heat shock protein binding	2.807
at4g24190	SHD (SHEPHERD), HSP90.7	2.585
at3g46230	AtHSP17.4	6.778
at5g12020	AtHSP17.6II (17.6 KDA CLASS II HEAT SHOCK PROTEIN)	5.775
at5g12030	Arabidopsis thaliana Heat Shock Protein 17.6A	5.547
at2g29500	class I small heat shock protein (HSP17.6B-CI) 17.6 kDa	5.175
at1g07400	class I heat shock protein (HSP17.8-CI) 17.8 kDa	5.018
at2g21510	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	4.64
at1g72070	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	3.858
at5g51440	mitochondrial small heat shock protein (HSP23.5-M) 23.5 kDa	3.474
at5g59720	AtHSP18.2 (heat shock protein 18.2)	2.545
at5g47600	heat shock protein-related	2.459
at1g44160	DNAJ chaperone C-terminal domain-containing protein	2.459
at1g71000	heat shock protein binding	2.399
at3g12580	AtHSP70 (heat shock protein 70)	2.142
at5g52640	HSP81-1, ATHS83, HSP81.1, HSP83, ATHSP90.1	2.129
at1g28210	ATJ1; heat shock protein binding / nucleic acid binding / unfolded protein binding / zinc ion binding	2.079
at1g76770	heat shock protein-related	2
at3g46230	ATHSP17.4, HSP17.4	8.898
at5g12030	Arabidopsis thaliana Heat Shock Protein 17.6A	7.79
at5g12020	AtHSP17.6II (17.6 KDA CLASS II HEAT SHOCK PROTEIN)	7.562
at2g29500	class I small heat shock protein (HSP17.6B-CI) 17.6 kDa	6.98
at5g59720	AtHSP18.2 (heat shock protein 18.2)	6.523
at1g07400	class I heat shock protein (HSP17.8-CI) 17.8 kDa	5.938
at1g72070	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	4.585
at5g51440	mitochondrial small heat shock protein (HSP23.5-M) 23.5 kDa	4.281
at4g21320	HSA32 (HEAT-STRESS-ASSOCIATED 32);	4.138
at5g52640	HSP81-1, ATHS83, HSP81.1, HSP83, ATHSP90.1 ATHSP90.1 (HEAT SHOCK PROTEIN 90.1); ATP binding/unfolded protein binding	3.262
at3g12580	AtHSP70 (heat shock protein 70)	2.716
at2g32120	HSP70T-2 (HEAT-SHOCK PROTEIN 70T-2); ATP binding	2.413
at1g59860	17.6 kDa class I heat shock protein (HSP17.6A-CI)	2.409
at2g26150	AtHSFA2; DNA binding / transcription factor	2.369
at2g21510	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	2.259
at1g71000	heat shock protein binding	2.142
at1g28210	AtJ1; heat shock protein binding	2.036
Down-regulated genes		
at1g09080	AtBIP3; ATP binding	-2.518
at4g19590	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	-2
at2g03020	heat shock protein-related	-2



Enrichment analysis

		CTRS			
Category	Terms	P	F	Bonferroni	FDR
INTERPRO	IPR003614:Knottin, scorpion toxin-like	3.1E+11	7.4E+14	2.2E+15	4.8E+16
INTERPRO	IPR002472:Palmitoyl protein thioesterase	6.3E+11	2.1E+15	4.0E+15	9.6E+15
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0016790~thiolester hydrolase activity	6.5E+11	2.1E+15	2.3E+16	9E+15
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0008474~palmitoyl-(protein) hydrolase activity	7.7E+11	1.1E+16	2.6E+15	1.1E+16
SMART	SM00505:Knot1	2.7E+12	9.9E+15	3.1E+15	3.0E+16
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0002084~protein depalmitoylation	6.1E+14	1.0E+16	9.8E+15	8.7E+15
UP_SEQ_FEATURE	active site:Proton acceptor	6.6E+15	1.7E+16	9.8E+15	9.3E+15
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005829~cytosol	7.0E+15	1.3E+16	7.4E+15	8.4E+15
INTERPRO	IPR008176:Gamma thionin	8.4E+15	9.3E+15	10+15	1.2E+16
KEGG_PATHWAY	ath00062:Fatty acid elongation	3.9E+16	5.6E+15	3.0E+15	4.2E+15
Category	Term	P	FE	Bonf.	FDR
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0009611~response to wounding	4.1E-19	5.2	2.7E-16	6.1E-16
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006952~defense response	6.53-19	3.0	4.2E-16	9.7E-16
UP_SEQ_FEATURE	DNA-binding region: AP2/ERF	1.2E-12	5.1	8.1E-10	1.8E-09
INTERPRO	IPR001471:AP2/ERF domain	1.5E-11	4.7	1.2E-08	2.3E-08
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0010200~response to chitin	2.2E-13	5.3	1.4E-10	3.3E-10
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0009753~response to jasmonic acid	4.7E-13	4.8	3.1E-10	7E-10
SMART	SM00380:AP2	3.6E-11	4.4	4.5E-09	4.1E-08
INTERPRO	IPR016177:DNA-binding, integrase-type	1.1E-10	4.3	8.5E-08	1.6E-07
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0043565~sequence-specific DNA binding	3.9E-09	2.3	1.7E-06	5.5E-06
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006355~regulation of transcription, DNA-templated	143	11.5	1.3E-08	1.6E-5
Category	Term	P	FE	Bonf.	FDR
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0003700 transcription factor activity, sequence-specific				
	DNA binding	1.7E+8	2.66E-16	2.66E-16	6.12E-16
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0042542 response to hydrogen peroxide	1.8E+9	4.24E-16	2.12E-16	9.74E-16
UP_SEQ_FEATURE	region of interest:Type E motif	1.2E+8	1.45E-10	4.83E-11	3.33E-10
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0009408 response to heat	2.0E+10	3.06E-10	7.64E-11	7.02E-10
UP_KEYWORDS	Pyrrolidone carboxylic acid	2.3E+12	8.16E-10	8.16E-10	1.80E-09
UP_SEQ_FEATURE	DNA-binding region:WRKY	5.9E+9	3.55E-09	3.55E-09	1.17E-08
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0044212 transcription regulatory region DNA binding	6.7E+9	1.21E-08	1.21E-08	2.31E-08
UP_SEQ_FEATURE	region of interest:Type E(+) motif	8.1E+9	4.52E-09	4.52E-09	4.13E-08
UP_KEYWORDS	Apoplast	1.1E+11	8.50E-08	4.25E-08	1.63E-07
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0009751 response to salicylic acid	2.0E+10	1.67E-06	8.33E-07	5.50E-06



Enrichment analysis

Controllo stressato

Attivazione di geni legati al metabolismo lipidico e degli acidi grassi

Biostimolante a base di AA (C)

Ha influenzato i geni coinvolti nelle risposte allo **stress abiotico** (calore e luce intensa), così come alcuni **fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia WRKY** (regolatori dei processi chiave della pianta, compreso il processo di risposta allo stress abiotico).



Biostimolante a base di alghe (A)

Ha fortemente attivato una **risposta a livello regolatorio**, con evidente attivazione di fattori di trascrizione e proteine leganti il DNA.

Il trattamento ha attivato il **metabolismo ormonale** (etilene e jasmonato).



Conclusion

i

Il prodotto a base di alghe ha avuto un effetto positivo sulla tolleranza delle piante allo stress termico, evidenziata dall'analisi istochimica

I geni che codificano per HSP sono stati attivati in risposta ai trattamenti e sono stati sovraregolati.

Entrambi i prodotti mostrano un effetto positivo e risposte specifiche a livello molecolare. La modalità di azione dei prodotti biostimolanti sembra essere correlata alla regolazione della famiglia genica HSP.



Prospettive future

Confermare i dati su colture di interesse agronomico

Ottimizzare lo studio delle modalità e dei tempi di applicazione





Antonio
Ferrante
Roberto Pilu
Elena Cassani



Daniele Villa
Giacomo
Scatolino



Camila Levy
Lydia Ugena
Marcos
Alajarín

