



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

DIPARTIMENTO DI FISICA

PROT. 1017

DATA 23 DIC. 2008

30 DIC. 2008

2473

PROT. N. _____

Protocollo di intesa tra il il Prof. Salvatore Magazù, professore ordinario afferente al Dipartimento di Fisica dell'Università di Messina ed ESA per la realizzazione di un progetto di ricerca volto al censimento delle aziende agricole ubicate nella provincia di Messina e finalizzato allo studio delle applicazioni di bioprotettori naturali in ambito agricolo per contrastare i processi di desertificazione.

Premesso che ESA e il Prof. S. Magazù desiderano collaborare per eseguire il progetto di ricerca sul tema sopraindicato, convengono qui di seguito i termini e le condizioni secondo i quali sarà regolata tale collaborazione. L'oggetto della Ricerca è dettagliato e contenuto nel programma concordato con ESA di cui è parte integrante. Il Responsabile Scientifico della Ricerca è il Prof. Salvatore Magazù. Il corrispettivo è complessivamente pattuito in € 50.000,00 (Euro cinquantamila/00).

Programma delle attività

Progetto di ricerca volto al censimento delle aziende agricole ubicate nella provincia di Messina e finalizzato allo studio delle applicazioni di bioprotettori naturali in ambito agricolo per contrastare i processi di desertificazione

Base scientifica di partenza

La base di partenza scientifica della presente proposta di ricerca comprende in primo luogo gli studi volti al riconoscimento, in atto, di un processo di intensificazione dell'effetto serra e soprattutto delle conseguenze che tale processo comporta sul ciclo idrologico a scala globale. La modifica del bilancio radiativo globale della Terra, indotta dall'aumento di concentrazione dei cosiddetti gas serra, col conseguente incremento della temperatura media globale, induce infatti modificazioni su tutte le componenti del ciclo idrologico. Un'area particolarmente vulnerabile è quella mediterranea, nella quale i modelli più recenti, che danno conto dell'interazione globale tra contributo marino e contributo atmosferico, pur nei differenti scenari ipotizzati, prevedono una riduzione delle precipitazioni a latitudini inferiori a 40°N e un piccolo aumento a latitudini immediatamente superiori; sicché l'incremento di temperatura (che oscilla, a seconda del modello e dello scenario ipotizzato da un minimo di 2°C a un massimo di 5°C), per i conseguenti maggiori consumi per evaporazione a esso collegati, sembra destinato a creare dovunque nell'area in esame, se pure con differente intensità, una riduzione del volume d'acqua complessivamente disponibile ai vari usi, e, in particolare una riduzione di quella destinata ai consumi agricoli. Una riduzione di disponibilità che interviene ad aggravare una condizione generalizzata di carenza idrica, e che quindi è limitativa nei riguardi dello sviluppo dell'agricoltura soprattutto nelle regioni meridionali ed insulari italiane.

La definizione e l'analisi delle condizioni di carenza idrica, in parte già presenti, in parte future, richiede, oltre allo studio dei processi di scambio idrico tra suolo, vegetazione ed atmosfera, anche l'indagine di strategie e protocolli innovativi per la accrescere la resistenza allo stress ambientale delle specie vegetali particolarmente sensibili.

La siccità, diversamente da altri fenomeni idrologici estremi, quali le piene, è un fenomeno le cui conseguenze sono avvertite generalmente con notevole ritardo rispetto all'inizio dell'evento ed è, inoltre, caratterizzata da un perdurare degli impatti negativi ben oltre la sua conclusione. Proprio in virtù di tali aspetti, è possibile attuare un'azione di mitigazione delle siccità potenzialmente più efficace di quella relativa ad altri disastri naturali purché, oltre a ricorrere a efficienti sistemi di monitoraggio in grado di segnalare tempestivamente la possibile insorgenza del fenomeno

siccitoso e di seguirne la sua evoluzione nel tempo e nello spazio, si ricorra alla messa a punto di nuove strategie che rendano le colture in grado di resistere meglio a condizioni climatiche avverse, come, ad esempio, siccità e variazioni di temperatura, e allo stesso tempo di migliorare il proprio rendimento.

Una corretta pianificazione degli interventi di manutenzione ed ispezione dei sistemi di distribuzione, unitamente all'adozione di protocolli bioprotettivi sulle colture, può ridurre drasticamente le perdite di risorsa e le fallanze riducendo la vulnerabilità alle condizioni di scarsità.

Ricerca proposta

Negli ultimi anni le proprietà bioprotettive del trealosio, un disaccaride del glucosio, sono state oggetto di crescente attenzione non solo sotto il profilo della pura ricerca fisica, biologica e chimica, ma anche in vista del promettente "spin-off" applicativo in ambito agricolo.

E' ben noto come in questo ambito si stiano sviluppando sempre più nuove tecnologie basate sull'impiego di biomateriali protettori contro condizioni ambientali severe, quali per esemplificare siccità, processi di desertificazione, drastiche escursioni termiche sia diurne che annuali, grandine, neve, etc.... In questo ambito il trealosio può convenientemente essere utilizzato come eccipiente per la protezione, conservazione e la stabilizzazione di piante già dalle prime fasi colturali.

L' α,α -trealosio è sintetizzato in svariate condizioni di stress ambientale da diversi organismi, quali ad esempio i criptobionti (vedi Fig. 1), i quali, in condizioni ambientali critiche, entrano in stato criptobiotico (dal Greco: "vita nascosta") e possono coprire un arco di vita di un centinaio di anni, pur mantenendo uno stato "attivo" per complessivi sette mesi.

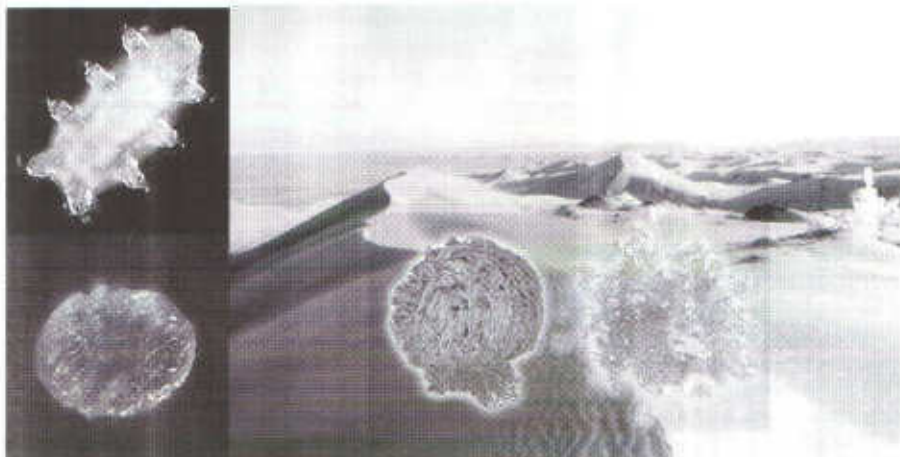


Fig. 1 Criptobionte, Pianta della Resurrezione

Il trealosio viene sintetizzato anche da alcune specie di licheni, di alghe, da alcune piante indicate genericamente con il nome di "Pianta della Resurrezione" (ad es. *Selaginella Lepidophylla* e *Myrothamnus flabellifolia*, Fig. 1), da alcune varietà di semi e di cellule vegetali, da spore di certi funghi (Hungarian Ergot), da macrocisti di *Dictyostelium*, e da alcuni batteri quali l'*Escherichia coli*, il *Bacillus thuringiensis*, il *Mycobacterium phlei* e il *Mycobacterium tuberculosis*. E' altresì rinvenuto negli embrioni dell'*Artemia salina* (Fig. 1 bis).

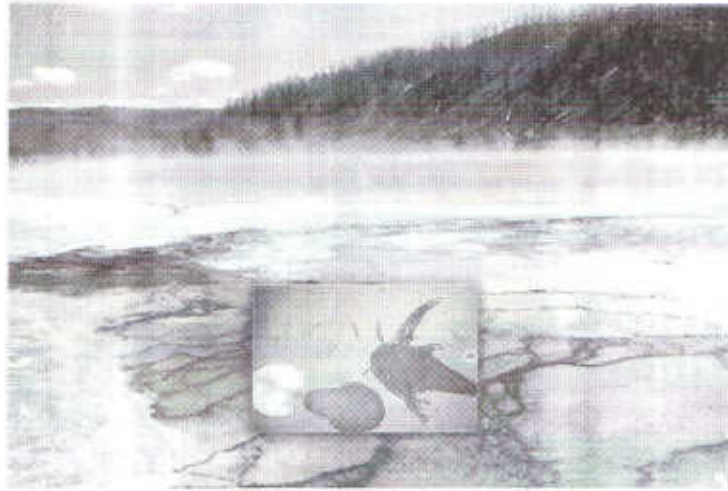


Fig. 1 Bis. Artemia salina

Viene altresì ampiamente usato in natura anche come crioprotettore. E' ben noto che la transizione di fase da acqua a ghiaccio, essendo connessa con il danneggiamento della microarchitettura cellulare, è sinonimo di morte. Diversi sono i meccanismi, non mutuamente esclusivi, che gli organismi possiedono per sopportare le basse temperature: la vetrificazione e l'accumulazione di zucchero sono, ad esempio, meccanismi in grado di proteggere le cellule contro squilibri osmotici. Studi preliminari hanno evidenziato una notevole efficacia del trealosio nella bioprotezione in condizioni di desertificazione.

Studi dell'efficacia bioprotettiva su base molecolare

Il trealosio presenta la stessa formula chimica del maltosio e del sucrosio ($C_{12}H_{22}O_{11}$, peso molecolare $M_w=342.3$), ma ha una differente struttura molecolare che ne determina le differenti proprietà (vedi Fig. 2).

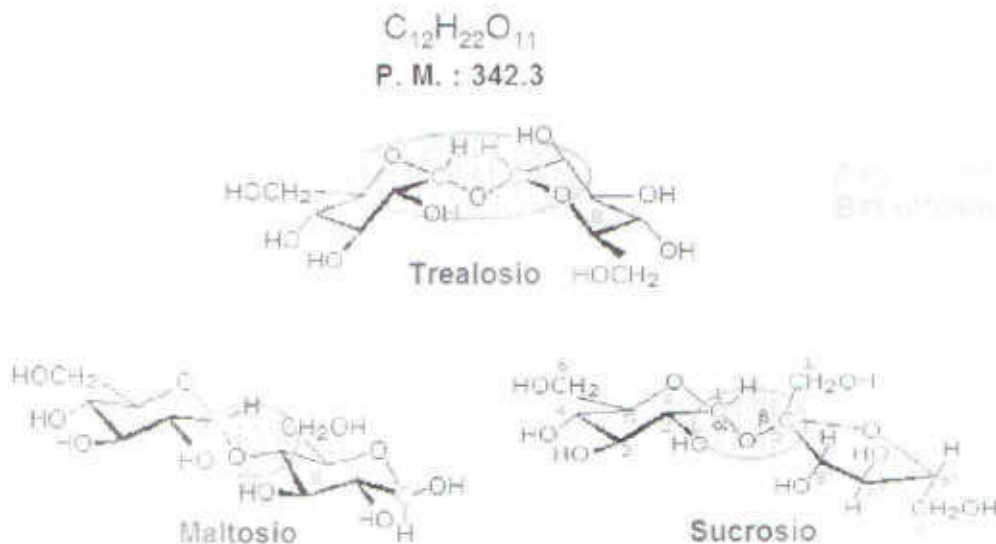


Fig. 2 Struttura di trealosio, maltosio e sucrosio

Più precisamente il trealosio (α -D-glucopyranosil α -D-glucopyranoside) è costituito da due anelli di glucosio in configurazione α , legati da un legame glicosidico tra gli atomi di carbonio chirali C1 dei due anelli. Il maltosio (4-O- α -D-glucopyranosil-D-glucose) è costituito sempre da due anelli di glucosio in configurazione α , ma il ponte di ossigeno lega i due atomi di carbonio C1 e C4 dei due anelli. Il sucrosio (α -D-glucopyranosil β -D-fructofuranoside), infine, è costituito da

un anello di glucosio in configurazione α e da un anello di fruttosio in configurazione β ; le strutture α e β differiscono soltanto nell'orientazione dei gruppi OH rispetto allo stesso atomo di carbonio nell'anello stesso (equilibrio di mutarotazione).

Diverse ipotesi sono state formulate per spiegare l'efficacia bioprotettiva del trealosio. Crowe ed Angell ascrivono la maggiore efficacia alla più alta temperatura di transizione vetrosa del trealosio. Tale ipotesi, da sola, non è tuttavia sufficiente in quanto non spiega perché il destrosio, ancorché abbia una temperatura di transizione vetrosa significativamente più alta del trealosio, sia molto meno efficace. Un secondo assunto, conosciuto come "ipotesi di sostituzione dell'acqua", dovuto a Crowe, postula l'esistenza di un legame diretto tra i disaccaridi e i gruppi della testa polare dei lipidi che costituiscono le biomembrane. Quando i sistemi sono disidratati o congelati, tali interazioni sostituiscono quelle dell'acqua d'idratazione all'interfaccia membrana-fluido. In tal modo si previene la transizione di fase e la conseguente fuoriuscita di liquido.

La caratterizzazione dei meccanismi molecolari che determinano le molteplici funzioni del trealosio è di fondamentale importanza per la comprensione e lo sfruttamento delle potenzialità del disaccaride.

È stata recentemente effettuata una serie di studi sperimentali, focalizzando l'attenzione sull'aspetto molecolare. I risultati evidenziano che l'efficacia bioprotettiva dei disaccaridi riflette un complesso insieme di interazioni a livello strutturale, fisiologico e molecolare che derivano dagli specifici meccanismi di interazione con le molecole d'acqua.

Le proprietà di trasporto mostrano una maggiore resistenza del sistema trealosio-acqua a cambiamenti di concentrazione e temperatura. Al fine di ottenere informazioni sulla forza di interazione soluto-solvente, sono state effettuate misure di velocità di ultrasuono su soluzioni acquose di trealosio, maltosio e saccarosio in funzione della concentrazione e della temperatura. Ciò che emerge è che, rispetto agli altri disaccaridi, il sistema trealosio-acqua è caratterizzato, in tutto il range di concentrazioni investigato, dal più alto valore della forza di interazione e del numero di idratazione n_H . Per esempio, a $T=25^\circ\text{C}$ si ha $n_H=15.2$ per il trealosio, $n_H=14.7$ per il maltosio e $n_H=14.1$ per il saccarosio. I valori ottenuti per n_H sono in buon accordo con quelli calcolati, a temperatura ambiente, mediante simulazione di dinamica molecolare. Occorre osservare anche che, aumentando la temperatura, con la rottura di un certo numero di legami idrogeno in acqua, il numero di molecole d'acqua disponibile per il legame con il trealosio aumenta. Pertanto, tali risultati indicano che il trealosio lega fortemente un numero maggiore di molecole d'acqua rispetto agli altri disaccaridi.

Esperimenti realizzati mediante scattering di luce hanno mostrato un marcato effetto destrutturante indotto dalla presenza del disaccaride sul network tetraedrico delle molecole di acqua, che comporta l'inibizione dei processi di cristallizzazione. L'esistenza del punto isobastico nello spettro isotropo dell'acqua pura, interpretato in termini di due classi competitive di oscillatori OH con un'opposta dipendenza dalla temperatura, ha suggerito la decomposizione dello spettro in un contributo "open" e uno "closed". Il primo contributo è attribuito a vibrazioni O-H all'interno della struttura tetraedrica delle molecole di acqua, che originano zone a bassa densità, mentre il secondo corrisponde alle vibrazioni O-H delle molecole coinvolte in legami incompleti o cosiddetti distorti. I risultati ottenuti studiando soluzioni acquose di disaccaridi sono consistenti con l'ipotesi di un effetto destrutturante indotto dalla presenza dei disaccaridi sulla struttura tetraedrica dell'acqua. Infatti per una stessa concentrazione l'area integrale del contributo "open" assume valori decrescenti secondo la sequenza saccarosio, maltosio, trealosio, evidenziando di fatto un più marcato effetto destrutturante del trealosio rispetto agli altri disaccaridi. Alla luce dei risultati fin qui ottenuti, si può ipotizzare che il ruolo dei disaccaridi sia quello di fornire alle molecole di acqua una struttura che consenta ai gruppi OH dei disaccaridi di sistemarsi in disposizioni spaziali non compatibili con quelli del ghiaccio. Di conseguenza, la percentuale di acqua che potrebbe congelare diminuisce, ostacolando di fatto il processo di cristallizzazione. Significativi risultati sono stati altresì ottenuti mediante scattering elastico di neutroni su soluzioni acquose di disaccaridi (trealosio, maltosio e saccarosio) in funzione della temperatura e della concentrazione. La diminuzione nell'intensità elastica, per temperature superiori alla temperatura di transizione dinamica, che può essere attribuita all'eccitazione di nuovi gradi di libertà, risulta

molto meno pronunciata nel caso della miscela trealosio/acqua rispetto alle altre miscele investigate. Dai risultati risulta evidente che la soluzione trealosio/H₂O mostra una più marcata resistenza strutturale ai cambiamenti di temperatura rispetto alle soluzioni maltosio/H₂O e saccarosio/H₂O.

Lo scattering inelastico di neutroni prova che il trealosio, oltre a modificare significativamente le proprietà strutturali e dinamiche dell'acqua, forma con essa un'unica entità avente un carattere più rigido in grado di proteggere maggiormente le strutture biologiche.

Le proprietà diffusive dei disaccaridi e dell'acqua in soluzioni acquose di trealosio, maltosio e saccarosio sono state investigate mediante scattering quasi elastico di neutroni. I risultati evidenziano che la dinamica dell'acqua in presenza dei disaccaridi risulta fortemente rallentata e che tale effetto risulta più marcato per il trealosio. Tale evidenza sperimentale conferma il maggiore carattere cosmotropo del trealosio, ovvero il disaccaride interagisce più fortemente con l'acqua modificandone significativamente le proprietà strutturali e dinamiche.

Impiego dei disaccaridi nel settore agricolo

La resistenza allo stress ambientale delle specie vegetali è un carattere complesso con implicazioni a diversi livelli di organizzazione.

Molteplici, infatti, sono i meccanismi messi in atto dalla pianta per proteggere i componenti sensibili dagli effetti dannosi di condizioni climatiche avverse. Tali meccanismi possono riguardare le capacità di filtro della membrana plasmatica (pompate ioni fuori dalla membrana o dentro il vacuolo) e la capacità di singole foglie di costituire una riserva di ioni tossici, mentre le regioni meristematiche del germoglio ed i frutti in accrescimento sono i più protetti dall'accumulo di ioni tossici. Molti altri caratteri come la conduttanza stomatica, la struttura del mesofillo, le cere epicuticolari, la colorazione e la forma fogliare possono giocare un ruolo determinante nel conferire resistenza.

La siccità è uno dei problemi più gravi in questo settore. Nelle prime fasi colturali l'aridità dei terreni può ridurre l'emergenza delle piantine e compromettere il regolare sviluppo dell'apparato radicale. Nella fase di spigatura/fioritura gli stress idrici regolano la formazione delle cariossidi; in quella di maturazione, la disponibilità di acqua è importante per la traslocazione degli assimilati e per far fronte al fenomeno della stretta, che determina uno squilibrio tra la traspirazione e l'assorbimento dell'acqua responsabile dell'interruzione della migrazione delle sostanze elaborate con conseguente formazione di cariossidi malnutrite, che arrivano ad essere anche vuote.

La salinità è una delle principali cause di stress limitanti la crescita e la produttività delle piante coltivate. Circa il 23% della superficie mondiale coltivata è considerata salina, un altro 37% sodica. È stato inoltre stimato che una metà delle superfici irrigue è seriamente interessata da salinità e/o da alcalinità secondaria e che 10 milioni di ettari di terreno coltivato vengono abbandonati annualmente a causa degli effetti avversi della salinizzazione e dell'alcalinizzazione secondaria dovute all'irrigazione. A livello fisiologico le piante subiscono tre tipi di danni da salinità: osmotico, nutrizionale e tossico. A questi si aggiungono quelli derivanti da asfissia radicale causata dalla riduzione della permeabilità dei terreni, quando nell'acqua d'irrigazione il contenuto di sodio rispetto a quello del calcio e del magnesio è elevato.

Sebbene molti passi avanti siano stati fatti per classificare le diverse specie vegetali in base al loro livello di tolleranza, quest'ultimo risulta altamente variabile in relazione al genotipo, all'ambiente pedoclimatico ed alle tecniche agronomiche utilizzate. In particolare l'adozione di idonee strategie agronomiche, in associazione con un'oculata scelta della specie, consentirebbe di minimizzare le riduzioni di resa.

È ben noto che il periodo di germinazione dei semi sia un periodo critico, a causa del fatto che i germogli sono molto sensibili alle variazioni di temperatura ed ai livelli di umidità. Allo stesso tempo questa fase è cruciale per la successiva crescita delle piante. Studi preliminari indicano che il trattamento dei semi con idrogels polimerici saturati con soluzioni acquose di trealosio aumenta la tolleranza ad avverse condizioni esterne grazie alla creazione di un microclima nell'intorno di ogni seme. In particolare, tale trattamento è in grado di accelerare la

germinazione dei semi e la crescita delle piante, e di aumentare la resistenza alla siccità e la capacità di raccolto.

La valutazione degli esiti del trattamento è basata su tre parametri: il tempo necessario per la germinazione dei semi, il numero totale di semi germinati e il sincronismo della crescita delle piante. Nella tabella seguente sono riportati i risultati relativi al numero di semi germinati. I migliori risultati si osservano per i semi trattati con idrogels contenenti una soluzione acquosa di trealosio allo 0,5%.

Tabella. Numero di semi germinati (20 semi per coltura) in funzione del trattamento

Coltura		Giorni dopo semina				
		2	3	5	7	10
1.	Acqua (campione di riferimento)	-	5	12	15	16
2.	Soluzione acquosa di trealosio (0,5 %)	3	10	15	18	18
3.	Soluzione acquosa di trealosio (1 %)	5	13	16	18	18
4.	Soluzione acquosa di trealosio (5 %)	-	10	15	17	17
5.	Idrogels saturati con acqua	-	10	12	18	18
6.	Idrogels saturati con soluzione acquosa di trealosio (0,5 %)	8	15	19	19	19
7.	Idrogels saturati con soluzione acquosa di trealosio (1 %)	6	15	17	18	18
8.	Idrogels saturati con soluzione acquosa di trealosio (5 %)	3	10	12	17	18

La perdita d'acqua provoca la morte della maggior parte delle piante dopo due settimane. I semi trattati con il trealosio mostrano chiaramente una maggiore resistenza a condizioni ambientali avverse.

L'obiettivo dello studio di idrogel biocompatibili in presenza di trealosio per la conservazione di piante e semi è quello di valutare la possibilità di adottare tecniche e/o tecnologie mirate ad un miglioramento della sopravvivenza, unitamente alla possibilità di prolungare i tempi utili di raccolta e semina.

L'impiego di idrogel polimerici/trealosio consentirà il mantenimento di un ambiente costitutivamente simile a quello compatibile con la vita, che possieda una certa consistenza e resistenza utili al miglioramento della sopravvivenza durante periodi in cui le condizioni climatiche divengono avverse.

Attività proposta

Inizialmente l'attenzione sarà essenzialmente rivolta al censimento delle aziende agricole ubicate nella provincia di Messina interessate ad interventi mirati a contrastare i processi di desertificazione.

Seguirà la caratterizzazione delle proprietà strutturali, dinamiche, termodinamiche e di trasporto dei sistemi binari bioprotettore/H₂O. Recenti studi, infatti, sembrano indicare che l'azione bioprotettiva sia da ricercare non già nell'interazione diretta biostruttura-bioprotettore, ma nell'interazione tra la matrice bioprotettore/acqua, entro cui le biostrutture sono confinate, e le strutture biologiche stesse. Da qui la necessità, ai fini della comprensione dei meccanismi che determinano l'efficacia bioprotettiva, di orientare in primis la ricerca sugli aspetti chimico-fisici del sistema binario.

La caratterizzazione di queste proprietà può essere realizzata solo attraverso l'uso integrato di tecniche complementari che consentano di investigare differenti scale spazio-temporali. A tal fine,

è previsto l'utilizzo di alcune tecniche disponibili presso i laboratori del Dipartimento di Fisica coinvolto nel progetto e presso alcune Facilities europee.

Uno degli obiettivi è l'integrazione del diagramma di fase del sistema trealosio acqua con misure di viscosimetria. Tale caratterizzazione assume particolare importanza in campo agricolo per ottimizzare i processi che assicurino la stabilizzazione di semi e colture a condizioni ambientali ostili, quali quelle presenti in terreni esposti a desertificazione, a scarsa irrigazione, o a forti escursioni termiche.

Ci si propone, inoltre, di valutare le potenzialità del trealosio studiandone la possibilità di un impiego come agente osmotico per la riduzione del contenuto d'acqua. Come modello sperimentale verranno utilizzate alcune colture in cui la disidratazione per via osmotica può rappresentare un'interessante soluzione tecnologica. La valutazione delle cinetiche di rimozione dell'acqua, in funzione della concentrazione di trealosio e della temperatura di processo, permetterà di individuare condizioni sperimentali compatibili sul piano tecnico-economico con un processo di interesse industriale.

Un altro obiettivo della ricerca è di individuare un nuovo trattamento dei semi con idrogel polimerici saturati con soluzioni acquose di trealosio al fine di aumentare la tolleranza ad avverse condizioni esterne grazie alla creazione di un microclima nell'intorno di ogni seme. Il risultato atteso è che tale trattamento sia in grado di accelerare la germinazione dei semi e la crescita delle piante, e di aumentare la resistenza alla siccità e la capacità di raccolto.

Generalmente la tolleranza a stress viene espressa con diversi criteri, a seconda dello stadio di crescita della pianta: infatti, mentre in fase di emergenza viene valutata la sopravvivenza della pianta, successivamente ci si basa sulla riduzione dell'accrescimento e, quindi, della produzione. Tale riduzione può essere valutata sia in termini assoluti che relativi. La valutazione in senso assoluto, pur consentendo la stima diretta del reddito in termini economici, è influenzata da diversi parametri produttivi e non consente di confrontare la risposta delle diverse specie allo stress, in quanto le produzioni sono di natura diversa e talvolta espresse anche con unità diverse. Si procede, allora, ad una valutazione in termini relativi, cioè come riduzione relativa (%) della produzione rispetto a condizioni normali.

Numerosi sono stati i tentativi volti alla determinazione della produzione relativa, ma il più accreditato è quello proposto da Maas e Hoffman, i quali hanno valutato il comportamento produttivo in funzione dello stress della maggior parte delle specie di interesse economico, fornendo una classifica del loro grado di tolleranza, da cui scaturiscono le possibili limitazioni d'uso di un'acqua irrigua.

L'esito atteso è la messa a punto di una nuova strategia che renda le colture in grado di resistere meglio a condizioni climatiche avverse, come, ad esempio, siccità e variazioni di temperatura, e allo stesso tempo di migliorare il proprio rendimento.

L'idea forza è di utilizzare sistemi composti da idrogel polimerici e trealosio per generare piante migliorate che garantiscano elevati rendimenti anche in condizioni di stress da siccità, forti escursioni termiche diurne e annuali, grandinate, o livelli elevati di salinità.