

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI
ALIMENTI RISORSE NATURALI E AMBIENTE

Corso di studio di Scienze e tecnologie agrarie LM

**Analisi della risposta all'azoto in un mutante
di mais (*zmccd8*) che non produce
strigolattoni**

Relatore: Prof.ssa Quaggiotti Silvia

Correlatore: Dott.ssa Ravazzolo Laura

Laureando: Riccardo Banal

Matricola n. 2062636

ANNO ACCADEMICO 2023 / 2024

INDICE

Riassunto

Abstract

1. Introduzione

- 1.1. Ciclo dell'azoto e rischi per l'ambiente
- 1.2. Importanza dell'azoto in agricoltura
- 1.3. Azoto e pianta
 - 1.3.1. Assorbimento dell'azoto
 - 1.3.2. Assimilazione dell'azoto
 - 1.3.3. Ricollocamento delle fonti azotate all'interno della pianta
 - 1.3.4. Effetti del nitrato sulla morfologia dell'apparato radicale
 - 1.3.5. Importanza della NUE
- 1.4. *Zea mays* L.
 - 1.4.1. Classificazione botanica, origine, diffusione e morfologia della pianta
 - 1.4.2. Esigenze nutrizionali: sintomi di carenze di azoto *Zea mays* L.
- 1.5. Strigolattoni
 - 1.5.1. Biosintesi degli SLs
 - 1.5.2. Trasporto, essudazione e percezione del segnale degli SLs
 - 1.5.3. Funzione degli SLs nelle simbiosi tra piante e funghi micorrizici
 - 1.5.4. Funzione degli SLs nelle simbiosi tra piante Leguminose e batteri azotofissatori
- 1.6. Mais mutante *zmccd8*

2. Scopo del lavoro

3. Materiali e metodi

- 3.1. Condizioni di crescita della coltura studiata
- 3.2. Analisi sulle piante in campo e strumenti di lavoro
- 3.3. Analisi dell'espressione di *zmccd8*

4. Risultati

4.1. Analisi fogliari

4.1.1. DUALEX SCIENTIFICTM

4.1.2. Porometro

4.2. Misure di crescita

4.3. Misure raccolta

4.4. Verifica espressione genica di *CCD8* in foglia

5. Discussione

6. Conclusioni

7. Bibliografia

Riassunto

Nella gestione degli ecosistemi agricoli uno degli elementi più limitanti per poter ottenere elevate rese dalle colture, è la disponibilità di N.

Essendo un elemento poco disponibile nei terreni agrari, necessita di essere integrato tramite input di fertilizzanti chimici, come ad esempio l'urea; comportando delle ripercussioni negative sull'ambiente date dall'eccesso di N a livello delle acque in uscita dagli ecosistemi agricoli e dell'atmosfera; dato soprattutto da una sua bassa efficienza d'uso (NUE). Per ridurre questi aspetti negativi è necessario studiare in modo approfondito come le piante reagiscono alla carenza di N, ed i meccanismi che mettono in atto per migliorarne il loro approvvigionamento.

Questo studio è stato condotto utilizzando piante di *Zea mays* L., una delle colture più diffuse a livello mondiale, mettendo a confronto una linea pura, definita wild type ed un mutante (*zmccd8*), incapace di sintetizzare gli strigolattoni. Gli strigolattoni sono delle molecole derivate dai carotenoidi riconosciute come fitormoni, ed hanno ampie funzioni nella regolazione dello sviluppo della pianta, soprattutto per l'architettura dell'apparato radicale e nella ramificazione della parte aerea, oltre che nel controllo delle simbiosi tra piante e micorrize arbuscolari, in relazione alla disponibilità di nutrienti nel suolo, soprattutto per quanto riguarda il fosforo (P) e l'azoto (N). Sono inoltre importanti nella germinazione dei semi di alcune specie infestati, come Striga ed Orobanche.

In questo lavoro le piante appartenenti ad entrambi genotipi sono state coltivate sottoponendole in due diverse condizioni di nutrizione azotata, con lo scopo di valutare gli adattamenti della pianta alla disponibilità di N ed in base alla presenza o meno degli strigolattoni.

Le piante nel corso della coltivazione sono state analizzate da un punto di vista fenotipico misurando altezza e circonferenza del fusto e lunghezza della terza foglia; e da un punto di vista fisiologico, svolgendo delle misurazioni su tutte le foglie con gli strumenti DUALEX SCIENTIFIC⁺™ e Porometr LI – COR LI – 600P (Porometro), in diverse fasi della stagione. Si sono anche effettuate delle analisi trascrittomiche, con lo scopo di quantificare l'espressione del gene *CCD8*, in diversi time points. Dopo la raccolta delle pannocchie sono anche stati valutati il peso di tutolo e cariossidi, oltre che la lunghezza della pannocchia.

Abstract

In managing agricultural ecosystems, one of the most limiting elements in order to obtain high crop yields is the availability of nitrogen.

Since it is an element that is not much available in agricultural soils, it needs to be supplemented through chemical fertilizer inputs, such as urea; leading to negative environmental impacts given by the excess of N at the level on water leaving agricultural ecosystems and the atmosphere; because of its low use efficiency (NUE). To reduce these negative aspects, it is necessary to study how plants react to a N deficiency, and the mechanisms they use to improve their N supply.

This study was conducted using plants of *Zea mays* L., one of the world's most cultivated crops, comparing a pure line, called wild type and a mutant (*zmccd8*), which is unable to synthesize strigolactones. Strigolactones are molecules derived from carotenoids recognized as phytohormones, and they have large functions in the regulation of plant development, especially for root system architecture and shoot branching, and in the control of symbioses between plants and arbuscular mycorrhizae, in relation to nutrient availability in the soil, especially phosphorus (P) and nitrogen (N). They are also important in seed germination of some infested species, such as *Striga* and *Orobanche*.

In this work the plants of the two genotypes were grown by subjecting them to two different nitrogen nutrition conditions, with the aim of evaluating the plants adaptations to N availability and according to the presence or absence of strigolactones.

Plants in the course of cultivation were analyzed from a phenotypic point of view by measuring stem height and circumference and third leaf length; and from a physiological point of view by conducting measurements on all leaves with DUALEX SCIENTIFIC⁺™ and Porometr LI - COR LI - 600P instruments at different stages of the season. Transcriptomic analyses were also carried out, with the aim of quantifying *CCD8* gene expression, at different time points. After the harvest of the panicles were also evaluated the weight of the seeds and cob, and the total length of the panicle.

1. Introduzione:

1.1. Ciclo dell'azoto e rischi per l'ambiente:

L'elemento azoto (N) è un costituente di molte delle fondamentali componenti, alla base della vita, infatti lo si trova in amminoacidi, che poi consentono la costruzione di proteine, acidi nucleici (DNA e RNA), e molte altre molecole ed enzimi importanti, come la clorofilla, necessaria al processo di fotosintesi, e l'ATP.

Dopo carbonio, idrogeno e ossigeno, è l'elemento più abbondante all'interno della pianta, e molto spesso è anche il primo fattore di limitazione per la crescita, e proprio per questo motivo la sua importanza e valorizzazione è cruciale per poter sostenere dal punto di vista alimentare la popolazione globale in rapida crescita (Zeng et al., 2020).

Per quanto riguarda il settore agricolo, le forme di azoto maggiormente utilizzate dalle piante sono il nitrato (NO_3^-) e l'ammonio (NH_4^+), oltre che le forme organiche dell'N, come: amminoacidi liberi e proteine (Nacry et al. 2013).

L'azoto inteso come elemento semplice non manca sulla Terra, infatti il 78% dell'atmosfera è composta proprio da azoto; diventa invece un elemento limitante per via del fatto che buona parte di esso è disponibile come azoto molecolare N_2 , ovvero una forma non reattiva e non utilizzabile dalle piante; deve infatti prima essere convertito in altre forme reattive, attraverso il ciclo dell'azoto, il quale mette in connessione i diversi ecosistemi (Zeng et al., 2020).

La conversione dell' N_2 in forme attive avviene grazie al processo di fissazione, il quale consente di inserire azoto reattivo all'interno della biosfera.

In natura ci sono 2 modi in cui può essere fissato azoto, più uno artificiale:

- Fissazione biologica, svolta dai microbi del suolo che grazie all'azione dell'enzima nitrogenasi possono scindere il triplo legame dell' N_2 , organicando atomi di N in molecole organiche;
- Fissazione dell'N ad alta energia (fulmini, radiazione solare ed altre attività distruttive come eruzioni vulcaniche);
- Fissazione industriale attraverso il processo Haber – Bosch (Wang et al. 2020); processo attraverso il quale vengono prodotti i fertilizzanti azotati, e vede la combustione di idrocarburi con lo scopo di produrre idrogeno, che reagendo poi con N_2 ad alte temperature e pressioni, porta alla formazione di NH_3 .

Considerando il ciclo dell'azoto nel suo complesso gli apporti di azoto reattivo che si verificano nei sistemi colturali sono in primis imputabili alla fertilizzazione, poi alla fissazione biologica, ed infine alla deposizione atmosferica di azoto (Godfray et al. 2010). Gli input attraverso i fertilizzanti sono facilmente modulabili, dato che è sufficiente regolare la quantità di fertilizzante che viene applicato agli appezzamenti; mentre le altre 2 fonti di input non sono facilmente modificabili (Robertson and Vitousek., 2009).

L'azoto fissato biologicamente può ammontare ad una grande quantità, soprattutto nel caso di specie della famiglia delle Leguminose, le quali sono in grado di instaurare delle simbiosi con i microbi azoto fissatori, diventando praticamente autosufficienti dal punto di vista della nutrizione azotata (Roy et al. 2019),

L'azoto una volta che viene fissato può poi incorrere in diversi destini, dove può essere convertito in diverse forme, tra cui le principali sono: la mineralizzazione che porta l'azoto insolubile presente nella sostanza organica del terreno a forme solubili, inorganiche e utilizzabili dalla biosfera del suolo (es: ione NH_4^+); la nitrificazione, ovvero il processo che porta alla conversione dello ione ammonio (NH_4^+) in ione nitrato (NO_3^-), una forma ossidata e più mobile nel terreno (Li et al. 2023); l'azoto fissato può inoltre essere immobilizzato per assorbimento da parte di microbi e piante.

Altri destini in cui può incorrere l'N fissato sono la nitrificazione, ovvero la conversione dell'ammonio a nitrito (NO_2^-) e poi a nitrato (NO_3^-) (Wang et al. 2021).

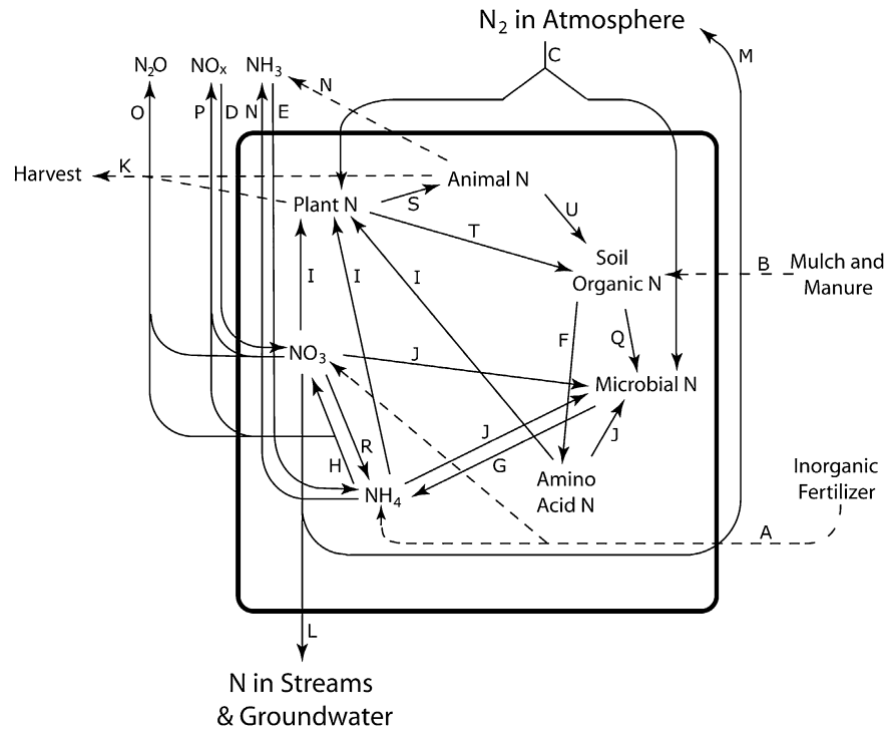


Figura 1.1: Rappresentazione schematica del ciclo dell'N tipico degli ecosistemi agricoli (linee tratteggiate) ed in tutti gli altri ecosistemi (linee continue). I movimenti più importanti di azoto rappresentati in figura sono: A → aggiunta di N da fertilizzanti azotati (azoto inorganico); B → aggiunta di N da fertilizzanti organici (es: letame); C → input di N derivante dalla fissazione biologica; D,E → deposizione di azoto atmosferico in forme ossidate e ammoniacale; F, G → azoto derivante dalla mineralizzazione della SO e dalla liberazione di ammonio dagli aminoacidi, grazie all'attività microbica; H → nitrificazione dell'ammonio a nitrito e poi a nitrato; I, J → assorbimento di N disponibile da parte delle piante e immobilizzazione microbica; K → output di N per via della biomassa raccolta; L → perdite di N per lisciviazione; M, N, O → perdite di N_2 , volatilizzazione di NH_3 , di N_2O e azoto ossidato durante la denitrificazione e la nitrificazione; Q → assorbimento microbico di N organico; R → riduzione dissimilativa del nitrato ad ammonio; S → asportazione di N vegetale da parte degli animali; T → ritorno di N al suolo grazie alla lettiera delle piante; U → apporti di N al suolo da parte delle deiezioni degli animali. (Robertson and Vitousek., 2009).

L'azoto che è entrato nella biosfera, attraverso tutti questi processi, può anche uscire dallo strato di terreno interessato dalle radici delle piante, dove le principali fonti di asportazione di N dai suoli sono l'azoto allontanato tramite il raccolto dei prodotti agricoli (Robertson and Vitousek., 2009), il processo di lisciviazione (soprattutto dello ione nitrato) tramite le acque di percolazione, questa è una delle maggiori perdite di azoto reattivo dai suoli agricoli (Nacry et al. 2013; Tesfamariam et al., 2014; Jean and Yang, 2019), nonché una delle principali problematiche ambientali riguardo agli eccessi di N negli ecosistemi; la denitrificazione, la volatilizzazione dell'ammoniaca, relativa soprattutto alle produzioni animali e da suoli dove è avvenuta una recente fertilizzazione, ed a maggior ragione quando la lavorazione è avvenuta in condizioni di umidità del suolo non idonee; infine si hanno i flussi atmosferici degli NO_x (Wang et al. 2021).

Gran parte dei vari passaggi del ciclo dell'azoto tra cui la fissazione microbica, la mineralizzazione, la nitrificazione e la denitrificazione, sono processi svolti dalla flora microbica del suolo, in quanto i microbi del suolo sono fondamentali al metabolismo dell'N organico, tra cui i batteri N – fissatori, nitrificanti e denitrificanti (Li et al., 2023). Diversi studi evidenziano che la comunità microbica del suolo peggiora quando viene applicato un fertilizzante azotato di sintesi, mentre migliora nel momento in cui si apportano fertilizzanti organici dato che il suolo si arricchisce di funghi, batteri e sostanza organica (Li et al., 2023).

E' necessario puntualizzare che negli ecosistemi agricoli, indipendentemente dal ciclo naturale dell'azoto, gli input di N di derivazione artificiale (fissazione tramite il processo Haber – Bosch) (Zeng et al., 2020), sono fondamentali, perché consentono lo svolgimento di un'attività agricola intensiva con alte rese che permettono di sostenere la richiesta di alimenti dell'attuale popolazione globale in crescita (Robertson and Vitousek., 2009); questo comporta grandi consumi di N che rappresentano un problema dal punto di vista ambientale, non tanto per la difficoltà dell'approvvigionamento dell'elemento che è pressoché illimitato, ma per le problematiche che derivano dall'eccesso di forme reattive di N nell'ambiente (Cassman et al., 2022).

I problemi si generano perché è complicato fornire una quantità precisa dell'elemento che consenta di massimizzare le produzioni, riducendo al minimo la quantità di nutriente perso nell'ambiente (Cassman et al., 2022). Questo si traduce in una grande quantità di azoto aggiunto dall'uomo ai sistemi agricoli, ma che solo una minima parte raggiunge il suo obiettivo finale, ovvero quello di finire nelle proteine della dieta umana (Cassman et al., 2002; Ladha et al., 2005).

In particolare, eccessi di ione nitrato (NO_3^-) comportano un peggioramento della qualità delle acque ed in generale dell'idrosfera; mentre le perdite di ammoniaca, N_2O e NO_x peggiorano la qualità dell'aria e contribuiscono al cambiamento climatico (Cassman et al., 2022).

Per quanto riguarda gli eccessi di azoto reattivo (come ione nitrato, ammonio e ammoniaca) nelle acque, questi comportano assieme alla concentrazione di P, il fenomeno dell'eutrofizzazione (Vidal et al. 2020), nel quale alti livelli di nutrienti nelle acque favoriscono lo sviluppo delle alghe, le quali una volta terminato il loro ciclo biologico, muoiono e la loro decomposizione microbica comporta un largo consumo di

ossigeno presente nell'acqua, fino all'instaurarsi di fenomeni di ipossia che non consentono la vita degli animali acquatici (Robertson and Vitousek., 2009; Zeng et al., 2020).

Le zone soggette ad eutrofizzazione si generano soprattutto dallo spostamento di forme reattive dell'azoto dal contesto agricolo a quello dei corsi d'acqua, fino al livello del mare. Gli ioni nitrato e nitrito presenti all'interno delle acque, possono finire all'interno delle falde acquifere, dalle quali si attinge acqua potabile (Trevisan et al., 2015), questo è un problema dal punto di vista della salute umana perché il nitrito può ossidare gli ioni ferrosi dell'emoglobina del sangue in ioni ferrici, impedendo il successivo trasporto dell'ossigeno dei globuli rossi; comportando poi cianosi e anossie, e persino la morte. Tale patologia, denominata metaemoglobinemia, colpisce soprattutto i neonati (Zeng et al., 2020).

Inoltre, nel processo di denitrificazione, i microbi riducono il nitrito e il nitrato, portando alla formazione di protossido di N (N_2O) e N_2 (Klimasmith et al., 2022). Durante il processo di denitrificazione, che come termine ultimo porta alla formazione di N_2 , una consistente parte di N_2O può uscire dal pathway e immettersi nell'atmosfera in forma gassosa. Poi l' N_2O una volta in atmosfera viene convertito ad NO, un gas con importante effetto serra che contribuisce alla rottura dello strato di ozono (Zeng et al. 2020). Il NO comporta un effetto di riscaldamento globale circa 300 volte maggiore rispetto alla CO_2 e del metano, ed esercita questo effetto anche per più di 100 anni (Zeng et al., 2020).

Prendendo in esame i rischi ambientali che si verificano per via della presenza eccessiva delle forme di N reattive, si hanno principalmente il fenomeno dell'eutrofizzazione che deriva dallo spostamento di azoto dagli ambienti agrari verso quelli acquatici, attraverso il corso dei fiumi (Wang et al 2021; Townsend et al. 2003; Ravishankara et al. 2009); una parte di questo azoto viene trasformata in forme organiche o volatili, le quali a loro volta possono comportare altri problemi ambientali, o altre ancora possono diventare forme benigne, come l' N_2 (Robertson and Vitousek., 2009).

Tra l'azoto che viene perso nello spostamento gli ecosistemi agrari a quelli marini, si hanno diverse forme volatili, che vanno dall'appena citato N_2 , ai più pericolosi gas NO_x (tra cui N_2O e NO), i quali assieme all'ammoniaca (NH_3), contribuiscono al cambiamento climatico, all'inquinamento dell'aria ed alle piogge acide (Wang et al. 2021; Erisman et al., 2011; Fowler et al., 2013; Schlesinger, 2009; Umar et al., 2020).

Nell'atmosfera la concentrazione di N_2O è in costante aumento, questo è un problema dal punto di vista climatico, dato che questo gas assorbe la quota infrarossa della radiazione solare, con un effetto di gas serra maggiore di 300 volte rispetto alla CO_2 (Wang et al. 2021; Forster et al., 2007).

L'aumento della concentrazione di N_2O è imputabile alle attività umane, e circa l'80 % di questo incremento deriva dal largo uso di fertilizzanti azotati in agricoltura (Robertson and Vitousek., 2009).

Concludendo, lo spostamento di forme reattive di N dagli ecosistemi agricoli, può alterare le caratteristiche ed il funzionamento della biosfera degli ecosistemi riceventi, in particolare la deposizione di NH_4^+ comporta acidificazione dei suoli, dato che l'assorbimento per antiporto di questo ione avviene assieme all'espulsione di protoni H^+ da parte della pianta (Wang et al., 1993), i quali poi nel terreno comportano acidificazione ed una maggiore perdita di cationi, con l'impovertimento della fertilità dei suoli; inoltre anche il processo di nitrificazione libera altri protoni che contribuiscono ad acidificare i terreni (Wang et al. 2021).

È anche da considerare che l'arrivo di N mobile in terreni riceventi determina dei grandi cambiamenti nell'equilibrio vegetale, favorendo la crescita di alcune specie rispetto ad altre, comportando quindi una riduzione della biodiversità; è stato inoltre dimostrato che l'arricchimento di ecosistemi a valle di quelli agricoli con N mobile, comporta anche dei cambiamenti sostanziali nella flora fungina del terreno (Robertson and Vitousek., 2009).

1.2. Importanza dell'azoto in agricoltura

Nel corso dell'ultimo secolo la popolazione mondiale ha e sta conoscendo una rapida espansione; infatti, stiamo passando da una popolazione odierna di 7,5 miliardi di persone a 10 miliardi entro il 2050 (Wani et al. 2021); in tutto questo, l'agricoltura sta giocando un ruolo fondamentale.

Buona parte dei sistemi agricoli attuali riesce a garantire delle elevate rese, ma a fronte di un largo uso di fertilizzanti a base di azoto, e di una scarsa efficienza nell'uso di questa risorsa, gli eccessi di questo elemento si riflettono in modo negativo sull'ambiente (Cassman et al., 2022).

Nei sistemi produttivi agricoli l'azoto che viene rimosso attraverso il raccolto dei prodotti agricoli, e quello che viene perso non volutamente, deve essere reintegrato al suolo per

mantenerlo fertile (Zeng et al., 2020) ed assicurare una produzione elevata e costante negli anni, questa necessità e difficoltà deriva dal fatto che per l'N non esiste un pull minerale di questo elemento (Robertson and Vitousek., 2009), dato che non c'è azoto disponibile all'interno delle rocce da cui si formano poi i terreni e per questo l'azoto di cui necessitano le piante deve per forza di cose provenire da fonti esterne (Yang et al., 2017; Wang et al. 2021).

Negli ecosistemi naturali l'azoto che viene rilasciato dalla decomposizione della SO viene poi riassorbito dalle piante, per poi essere di nuovo rilasciato dalla decomposizione delle parti delle piante che lo hanno prima assorbito; questo porta alla formazione di un ciclo in cui gli input e gli output sono tra loro in equilibrio, evitando l'impoverimento del suolo e la sua perdita di fertilità (Ludemann et al. 2022; Robertson and Vitousek., 2009; West et al 2014).

Considerando invece gli agro – ecosistemi, la parte di N contenuta nel raccolto non viene reintegrata (esce dal ciclo) traducendosi in una minore quantità di azoto che nel tempo può essere riciclato dalle piante.

All'inizio del 1900 le rese di granella di mais (*Zea mays* L.) negli USA erano in media 16 q/ha, con un contenuto medio di N del 2,6 %. Si è poi calcolato che venivano esportati all'incirca 40 kg di N/anno dalle riserve del suolo (Haas et al. 1957; Paustian et al. 1995). In suoli con delle riserve di N pari a 3 – 15 T/ha, con questi livelli di asportazione, già nel giro di 30 – 40 anni le riserve azotate del suolo erano esaurite, considerando anche un tasso di perdita della risorsa azotata pari all'1 % annuo.

Prendendo in considerazione le attuali rese di granella in Italia (fino a 100 q/ha) (FAOSTAT), è facile intuire che la dipendenza della coltura dalle sole riserve del suolo sono non sostenibili, e questo rende obbligatorio l'impiego dei fertilizzanti sintetici (Klimasmith et al., 2022; Robertson and Vitousek., 2009).

In passato la gestione degli ecosistemi agricoli avveniva a turni, dove il terreno una volta aver esaurito la sua fertilità, questo veniva dedicato al pascolo o abbandonato, spostando poi la coltivazione su altre superfici (Nye et al. 1960); al giorno d'oggi questa pratica di gestione non è più efficiente e sostenibile dal punto di vista economico, si predilige invece la coltivazione continua, nella quale le rese sono elevate, ma è anche necessario ripristinare l'azoto asportato; il quale può essere aggiunto in 4 diversi modi:

- Inserendo nelle rotazioni colture N – fissatrici, come la soia (*Glycine max* L.), o seminando colture della famiglia delle Leguminose dopo il termine del primo raccolto e prima dell’inizio del raccolto successivo, definite anche cover e catch crops (Toniotto et al. 2006; Roper et al. 1995)
- Applicazione al terreno di inoculati microbici (biostimolanti) in grado di fissare l’azoto atmosferico (fissazione biologica dell’azoto), con lo scopo di sostenere o rimpiazzare l’applicazione dei fertilizzanti di sintesi (Kuypers et al. 2018). Questo metodo vede l’applicazione di 2 tipologie di microbi: microbi endosimbionitici; e microbi azoto fissatori a vita libera, che sono in grado di fissare azoto e renderlo disponibile per le piante anche senza instaurare una simbiosi mutualistica con la pianta stessa (Klimasmith et al., 2022).
- Uso di fertilizzanti organici di derivazione animale
- Uso di fertilizzanti sintetici (Erisman et al. 2008; Klimashmit et al. 2022)

Dei quattro diversi metodi l’utilizzo dei fertilizzanti azotati di sintesi è quello più gettonato dagli agricoltori, per motivi economici e gestionali (Wang et al. 2021; Robertson and Vitousek., 2009); infatti il loro utilizzo dagli anni 50, fino al 2010 è aumentato di 10 volte, e questo aspetto è stato ed è cruciale nell’incremento delle rese agricole, però con importanti implicazioni sull’ambiente (Erisman et al., 2011; Fowler et al., 2013; Schlesinger, 2009; Umar et al., 2020).

1.3. Azoto e pianta

1.3.1. Assorbimento dell’azoto

Nel terreno le disponibilità di azoto possono essere molto diversificate, anche entro brevi distanze, le piante hanno infatti evoluto dei sistemi di risposta a questi cambiamenti (Hermans et al. 2006; Krouk et al. 2010; Kant et al. 2011): regolazione dei sistemi di assorbimento dell’azoto da parte delle radici; plasticità fenotipica dell’apparato radicale e la modulazione della crescita dei germogli, per adattare il metabolismo del carbonio con quello dell’azoto (Nacry et al. 2013).

Tutte queste tre risposte vengono controllate e modulate sulla base di stimoli endogeni ed esogeni alla pianta (Forde 2002; Gojon et al. 2009). Tra i segnali esogeni quelli più importanti si hanno le concentrazioni esterne di ione nitrato e ammonio, percepite dalle cellule delle radici (Tsay et al. 2011); per quanto riguarda i segnali interni, questi hanno

la funzione di informare l'apparato radicale sulla concentrazione di N all'interno della pianta, in modo che queste possano modularne l'uptake (Liu et al. 2009; Nacry et al. 2013).

Le piante possono utilizzare l'azoto in diverse forme, le principali sono ione nitrato (NO_3^-) e ione ammonio (NH_4^+); ma anche proteine, peptidi e amminoacidi (Schimel and Chapin 1996).

Le radici sono in grado di controllare l'uptake delle fonti azotate, questo è possibile grazie alla regolazione dei sistemi di assorbimento di nitrato e ammonio.

Sono presenti 2 tipologie di sistemi di trasporto, ognuno dei quali è poi specifico per nitrato e ammonio:

- HATS, sistema di trasporto ad alta affinità, che svolge la funzione di assorbimento, quando la concentrazione degli ioni è bassa. I sistemi HATS, possono poi essere divisi in cHATS (costitutivi) e iHAS (inducibili). I cHATS sono importanti come "sensori" della presenza nel terreno di nitrato (Filleur et al. 2001; Nacry et al. 2013).
- LATS, sono sistemi di trasporto a bassa affinità, ed entrano in funzione a concentrazioni più elevate, tipicamente maggiori di 1 mM, infatti la loro attività non è saturabile, ma aumenta in modo lineare all'aumentare della concentrazione di nutrienti nel suolo (Céline et al. 2010).

Normalmente nei terreni si trovano delle concentrazioni di ione ammonio minori di 1 mM, quindi per questo ione i sistemi HATS sono predominanti rispetto ai LATS; considerano invece il nitrato, che ha delle concentrazioni molto variabili, entrambi i sistemi sono fondamentali nell'approvvigionamento di questo ione (Nacry et al. 2013).

Prendendo in considerazione i trasportatori dello ione nitrato, si è finora scoperto che questi appartengono alle famiglie proteiche NRT1, NRT2, CLC, ALMT e SLAC1 (Sasaki et al. 2010; Barbier-Brygoo et al. 2011); ma solo NRT1 e NRT2 sono attivi a livello radicale, ed hanno sia alta che bassa affinità.

I trasportatori del nitrato a bassa affinità (LATS) appartengono tutti alla famiglia NRT/PTR (peptide transporter) (Nacry et al. 2013); ma è stato dimostrato che solo NRT1.1 e NRT1.2 sono coinvolti nell'assorbimento del nitrato a livello radicale. NRT1.1 è inoltre un trasportatore a doppia affinità (Liu et al. 1999), e svolge la funzione di

recettore della presenza di nitrato, sulla base della quale attiva diversi meccanismi fisiologici nella pianta.

Tra i segnali endogeni individuati si hanno: la concentrazione di malati, amminoacidi e l'attività delle citochinine (CK), che svolgono un ruolo prevalente nella comunicazione tra radici e germogli riguardo alla presenza del nitrato (Vidal et al).

Per quanto concerne invece i trasportatori dello ione ammonio, questi fanno parte di un ampio gruppo chiamato AMT/MEP/Rh (AmmoniumTransporter / Methylammonium Permease / Rhesus), ma per l'ammonio la famiglia AMT di trasportatori ad alta affinità è quella più rilevante (Wirén and Merrick 2004).

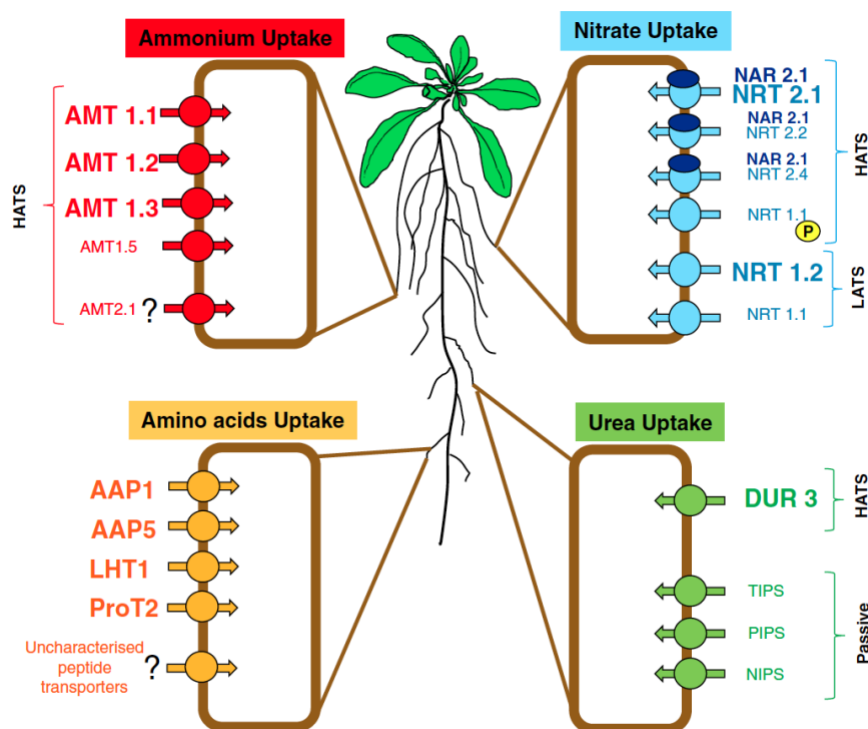


Figura 1.2.: Nell'immagine vengono raffigurati le diverse tipologie di trasportatori coinvolti nell'assorbimento di nitrato, ammonio, urea e amminoacidi, e la loro collocazione sull'apparato radicale in *A. thaliana* (Nacry et al 2013)

Dopo alcune analisi genetiche è emerso che i trasportatori AMT dell'ammonio lavorano per simporto e consentono l'entrata dell' NH_4^+ secondo il gradiente elettrochimico di potenziale (Ludewig et al., 2003). In *A. thaliana*, sono presenti 6 trasportatori AMT dell'ammonio, espressi principalmente a livello delle radici. In particolare AMT1.1 e AMT1.3 sono presenti nella membrana cellulare delle cellule dell'epidermide radicale, e svolgono attività HATS di assorbimento (Loqué et al. 2006), mentre AMT1.2 è un trasportatore LATS espresso nelle cellule dell'endoderma (Nacry et al. 2013).

Prendendo in considerazione le fonti di N organico nel suolo, queste sono di minore importanza rispetto a nitrato e ammonio, ma il loro interesse è in costante aumento, dato che in tutte le specie di piante coltivate si è rilevata la capacità di assorbimento di urea e amminoacidi (Nasholm et al. 2009); infatti in *A. thaliana* è stato scoperto un trasportatore di urea ad alta affinità, chiamato DUR3, dove la sua espressione risponde in modo diretto alla presenza di urea (Merigout et al. 2008); anche le acquaporine nel suo assorbimento (TIPs, PIPs, e NIPs): le proteine TIPs sono soprattutto coinvolte nello stoccaggio dell'urea nei vacuoli, mentre le NIPs, si occupano dell'assorbimento dell'urea dal terreno (Witte et al., 2011). Considerando invece gli amminoacidi si è ipotizzato che i sistemi di assorbimento sono soprattutto coinvolti nel loro recupero una volta fuoriusciti dalle cellule (Nacry et al 2013).

1.3.2. Assimilazione dell'azoto

Una volta terminati i processi di assorbimento delle fonti azotate da parte dei trasportatori di membrana, queste possono andare in contro a quattro diversi destini (Cèline et al. 2010):

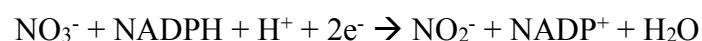
- 1) Espulsi all'esterno della cellula, nell'apoplasto attraverso processi di efflusso
- 2) Trasportati e accumulati nel vacuolo
- 3) Trasportati per via simplastica attraverso le cellule della radice, per poi essere caricati nello xilema e inviati nella parte superiore della pianta dove possono essere immagazzinati nei vacuoli cellulari e / o organicati
- 4) Riduzione del nitrato ad ammonio e successiva assimilazione dell'ammonio in amminoacidi

Lo ione nitrato per essere assimilato, deve essere prima ridotto ad ammonio, attraverso due reazioni

- Riduzione del nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-):

Questa reazione viene catalizzata dall'enzima nitrato riduttasi (NR), composto da 2 sub – unità uguali che catalizzano il trasferimento di due elettroni dal NADPH al nitrato, grazie all'azione di tre gruppi prostetici (FAD [flavin adeninedinucleotide], eme, ed il cofattore MoCo).

Reazione di riduzione del nitrato a nitrito, tramite la NR:



La reazione di riduzione del nitrato avviene sia a livello delle radici che a livello dei germogli, all'interno nel citoplasma. L'enzima nitrato riduttasi viene regolato attraverso tre diversi meccanismi: 1) viene indotta all'aumentare della concentrazione del suo substrato (NO_3^-); 2) viene regolata attraverso il processo di fotosintesi e dalla presenza di prodotti di assimilazione dell'azoto, come gli amminoacidi; 3) può essere indotta o repressa in seguito a rapidi e improvvisi cambiamenti delle condizioni ambientali.

Una volta terminato il processo di riduzione del nitrato in nitrito, questo deve essere nuovamente ridotto ad ammonio:

- Riduzione del nitrito (NO_2^-) in ammonio (NH_4^+):

Questa reazione di riduzione viene catalizzata dall'enzima nitrito riduttasi (NiR), la quale catalizza il passaggio di 6 elettroni dalla ferodossina ridotta al nitrito ed avviene all'interno dei cloroplasti.

Reazione di riduzione del nitrito ad ammonio:



Anche l'enzima NiR ha un sistema di regolazione basato sulla concentrazione del suo substrato (nitrito).

Dopo aver ottenuto lo ione ammonio, per diretto assorbimento o grazie al processo di riduzione del nitrato, questo dovrà poi essere assimilato dalla cellula attraverso la sua organicazione in amminoacidi; processo che avviene tramite il ciclo GS/GOGAT, il quale ha luogo principalmente nei plastidi e nel cloroplasto (Lea and Forde, 1994).

L'enzima GS (glutammina sintetasi) catalizza la reazione di amminazione del glutammato in glutammina, attraverso la sintesi di un composto intermezzo chiamato G – y - glutammil fosfato, ed in presenza di ATP. Successivamente entra in gioco l'enzima GOGAT (glutammato sintetasi), che si occupa di catalizzare il trasferimento di un gruppo amminico dalla glutammina al 2 – oxoglutarato, ottenendo alla fine due molecole di glutammato (Suzuki and Knaff 2005).

Oltre al ciclo GS/GOGAT ci sono anche altri enzimi in grado di assimilare l'ammonio in scheletri carboniosi (Cèline et al. 2010):

- Asparagina sintetasi citosolica (AS), che catalizza il trasferimento del gruppo amminico della glutammina ad una molecola di aspartato, portando alla formazione dell'amminoacido asparagina in presenza di ATP.

- GDH (glutammato deidrogenasi): questo enzima è in grado di incorporare l'ammonio direttamente nell'acido 2 – chetoglutarico in presenza di NADPH, formando acido glutammico. L'enzima GDH è utilizzato dalla pianta per catalizzare il processo di liberazione dell'ammonio dal glutammato, necessario per la ricollocazione e ridistribuzione dell'azoto all'interno della pianta.

(Cèline et al. 2010).

Come conclusione del ciclo GS/GOGAT, si ha l'ottenimento di 2 molecole di glutammato partendo da una singola molecola di glutammina, con il guadagno netto di una molecola di glutammato in termini di ammonio organicato. Una molecola di glutammato entra nuovamente nel ciclo GS/GOGAT, mentre la rimanente può andare in contro a reazioni di transaminazione portando all'ottenimento di molti altri diversi amminoacidi (Cèline et al. 2010).

1.3.3. Ricollocamento delle fonti azotate all'interno della pianta

Nella definizione dell'NUE i processi di rimobilizzazione delle riserve di N all'interno della pianta sono fondamentali. Si è infatti scoperto che molte delle proteine, soprattutto quelle legate al processo di fotosintesi nei plastidi vengono degradate una volta che la foglia raggiunge la sua fase senescente, rendendo nuovamente disponibile l'azoto per altri organi della pianta (Cèline et al. 2010).

È stato dimostrato in *Arabidopsis thaliana*, che l'N viene rimobilizzato dalle foglie senescenti verso quelle in fase vegetativa ed attiva espansione, o accumulato nei semi (Diaz et al., 2008).

È inoltre stato dimostrato che il tasso di rimobilizzazione dell'azoto varia molto a seconda che la pianta si trovi in fase vegetativa o riproduttiva; infatti nei cereali la fase di inizio riempimento della granella è la fase più critica per l'approvvigionamento dell'N (Salon et al., 2001); dato che i processi di assorbimento, assimilazione e fissazione di N₂ tendono a diminuire e sono insufficienti a sostenere l'accumulo di riserve nella granella (Masclaux et al., 2001); in queste fasi la rimobilizzazione dell'N è quindi fondamentale (Cèline et al. 2010).

In mais è stato dimostrato che il contenuto di N dei chicchi è direttamente correlato dalla senescenza della foglia a bandiera la quale ha un ruolo determinante nella disponibilità di N per la granella; una precoce senescenza della foglia a bandiera in fase di riempimento

dei semi può stimolare la rimobilizzazione dell'N, questo aiuta e velocizza lo spostamento delle forme azotate dalla pianta alle cariossidi (Martin et al., 2005; Uauy et al., 2006).

Prendendo in considerazione le fonti di N che la pianta utilizza per la rimobilizzazione dell'N, come accennato in fase di senescenza fogliare vengono degradate molte delle proteine legate ai processi fotosintetici, infatti i cloroplasti rappresentano la fonte di N principale, ed in particolare l'enzima Rubisco (Rbp: Ribuloso-1,5 bisfosfato carbossilasi/ossidasi) (Sage et al., 1987). I cloroplasti sono i principali organelli che vengono degradati per la rimobilizzazione dell'N (Cèline et al. 2010).

La degradazione dei cloroplasti è favorita da un loro elevato contenuto di proteasi (Martinez et al., 2008), e molti dei geni che codificano per questi enzimi vengono sovraespressi nella fase di senescenza.

Il processo di smantellamento dei cloroplasti viene avviato dagli effetti deleteri dei radicali ROS, le cui concentrazioni sono maggiori in fase di senescenza, per il fatto che in questo momento mancano molti degli enzimi antiossidativi che ne riducono il loro effetto dannoso (Zimmermann and Zentgraf, 2005).

Successivamente al processo di degradazione per ottenere fonti azotate, come gli amminoacidi (es: asparagina, glutammato e glutammina), questi devono poi essere traslocati verso le sources attraverso il floema, il quale viene caricato con dei specifici carriers di ammoniacidi (Cèline et al. 2010).

E' stato poi dimostrato che il tasso di rimobilizzazione dell'N viene promosso in seguito a stress biotici e abiotici, che stimolano l'espressione dei geni GLN1(codifica per la glutammina sintetasi), GDH e ASN (codifica per l'asparagina sintetasi) (Garcia et al., 1998).

Gli stress biotici come le infezioni fungine e batteriche stimolano la mobilitazione dell'azoto, si ipotizza che sia una strategia di difesa della pianta che ha lo scopo di ridurre la quantità di nutrienti a disposizione del patogeno (Cèline et al. 2010).

1.3.4 Effetti del nitrato sulla morfologia dell'apparato radicale

Il nitrato per la pianta è una molecola segnale (Wang et al, 2012), ed in relazione alla sua presenza e concentrazione stimola diversi cambiamenti a livello di espressione genica, quindi sullo sviluppo dell'apparato radicale e sulla fisiologia della pianta (Trevisan et al 2015).

Le piante percepiscono la presenza e la concentrazione del nitrato grazie ad alcuni dei suoi trasportatori di membrana, che vengono definiti transrecettori (Vidal et al 2020). Il trasportatore più importante nella percezione del nitrato nel suolo è l'NRT1.1 (Munos et al. 2004), il quale è in grado di trasportare l'ormone auxina in modo dipendente dalla concentrazione di nitrato in prossimità degli apici delle radici laterali (Krouk et al. 2010; Mounier et al. 2014) regolandone così lo sviluppo. Questo è stato dimostrato in *Arabidopsis thaliana*; mentre in *Zea mays* L. è stato dimostrato che un blocco dello sviluppo radicale in condizioni di elevato contenuto di nitrato, corrisponde ad una riduzione dell'auxina nell'apice radicale (Tian et al. 2008); fornendo però NAA lo sviluppo dell'apice radicale riprende anche senza variare la concentrazione di nitrato. È stato però dimostrato che l'effetto dei nitrati sulla modulazione dell'apparato radicale dipende da molti altri fattori, portando una risposta alla concentrazione di nitrato variabile (Andrews et al. 2013); infatti in *Arabidopsis thaliana* lo sviluppo della radice primaria può essere sia insensibile che indotto da una moderata concentrazione di nitrati, ma può anche essere repressa da una concentrazione elevata (Ravazzolo et al., 2021).

Nonostante la difficoltà e la grande variabilità delle risposte e degli adattamenti della morfologia dell'apparato radicale in relazione alla presenza di nutrienti nel suolo, sembrano esserci due aspetti della risposta alla presenza di N nel terreno comuni a molte specie di piante: 1) repressione sistemica dell'accrescimento delle radici laterali in caso di elevato stato di N nella pianta; 2) stimolazione locale della crescita radicale delle LR in seguito ad un apporto esogeno di ione nitrato ed ammonio (Nacry et al. 2013).

1.3.5 Importanza della NUE

Negli ultimi anni si sta sempre più prendendo in considerazione il concetto dell'efficienza dell'uso dell'azoto (NUE) la quale deve essere migliorata per ridurre gli sprechi di questo nutriente ed i suoi effetti deleteri sull'ecosistema (Vidal et al 2020).

Allo stato attuale l'NUE complessiva del comparto agricolo si assesta ad un valore molto basso, tra il 30 ed il 50% (Cassman et al., 2022); ciò significa che in media più della metà dell'azoto che viene fornito alle colture, non viene poi direttamente utilizzato.

Per misurare l'NUE possono esserci moltissimi modi diversi, in relazione ai parametri che si prendono in considerazione (Cèline et al. 2010); generalmente per la misura della NUE si utilizza il rapporto:

$$NUE = (Y_f - Y_0) / N_{rate}$$

Dove Y_f corrisponde alla resa delle aree fertilizzate, mentre Y_0 rappresenta la resa in particelle non fertilizzate; invece N_{rate} consiste nel tasso di aggiunta del fertilizzante azotato (Ahrens et al. 2009).

Considerando invece il bilancio dell'N sono due i metodi principali per il calcolo della NUE:

- 1) Nel primo caso vengono seguite le tracce di N15 (isotopo stabile dell'N), dove la quantità di N15 rilevata nei raccolti viene contrapposto alla quantità di N15 applicato con il fertilizzante; in questo caso il calcolo della NUE sarà: N15 rilevato nel raccolto / N15 del fertilizzante.

Il vantaggio di questo metodo sta nel fatto che aiuta a comprendere i processi di riciclo dell'N negli agroecosistemi, differenziando l'N aggiunto dagli imprenditori agricoli con quello presente nel terreno (Robertson and Vitousek., 2009).

- 2) Il secondo metodo fa uso di un bilancio di massa per confrontare la quantità di N che viene rimossa dai campi con il raccolto, con la quantità di N aggiunta dagli agricoltori; il calcolo della NUE in questo caso vede il rapporto: quantità totale di N nel raccolto / quantità totale di N fornita (Robertson and Vitousek., 2009).

Perché il calcolo della NUE sia preciso è necessario che la quantità di N aggiunto con i fertilizzanti sia la principale fonte di uptake per le piante, lasciando intatta la quota di N organico del terreno.

Un altro aspetto di importanza è il fatto che le misurazioni annuali della NUE sono dipendenti dalle condizioni di crescita nell'anno in cui si svolgono le misure e dalle condizioni di crescita delle colture, e dalle coltivazioni svolte negli anni precedenti (Cherry et al. 2008).

Generalmente nell'agricoltura dei paesi sviluppati il bilancio dell'N nei sistemi agricoli è sempre positivo, infatti le aggiunte superano le asportazioni della coltura, con inevitabili sprechi e danni all'ambiente (Li et al. 2012); questo è dato dal fatto che molte delle colture annuali assorbono N solo per un breve periodo del ciclo colturale, quindi di tutto l'N disponibile solo una parte viene assorbito dalla coltura, il resto può essere preso nell'ambiente (Robertson GP et al. 1997).

Per il miglioramento della NUE vengono riassunti quattro dei principali metodi:

A) Impiego di adeguate rotazioni colturali:

Per ridurre gli sprechi di N è importante introdurre nella rotazione anche delle colture di copertura, come il Loietto (*Lolium Multiflorum*), che essendo seminato in autunno o dopo il raccolto della coltura principale, sviluppandosi cattura una parte dei residui di N lasciati nel terreno (Rasse et al. 2000; Strock et al. 2004). Nella primavera successiva la catch crop viene fatta terminare, e la successiva decomposizione e mineralizzazione dei suoi residui libera l'N catturato dalla biomassa nell'autunno precedente (Robertson and Vitousek., 2009). Così facendo con questo metodo si limitano le perdite di N, durante il periodo autunno – invernale, ancora presente nel terreno dopo il ciclo della coltura estiva. Se nella rotazione si inseriscono colture della famiglia delle Fabacee, il vantaggio è ancora maggiore, data la loro capacità di fissare N₂, accumulandolo nel suolo, oltre che a produrre biomassa con alto contenuto di N, che sarà poi mineralizzato per la coltura estiva (Corak et al. 2001; Crandall et al. 2005; Roy et al. 2020).

B) Analisi del suolo prima di pianificare la fertilizzazione e gestione dell'irrigazione:

Molto spesso la fertilizzazione viene programmata sulla base della resa prevista della coltura, dove ne viene quantificato il contenuto di N, che corrisponderà poi alla quantità di fertilizzante da applicare (Stanford et al. 1973). Analizzando però anche il contenuto di N del terreno, è possibile adattare questo calcolo rendendolo molto più preciso, soprattutto quando in rotazione si hanno anche delle Leguminose, potendo ridurre gli input anche di 90 – 100 kg di N / ha / anno (Andraski et al. 2002; Magdoff et al. 1984; Robertson and Vitousek., 2009).

Inoltre, anche la corretta gestione degli interventi irrigui aiuta a ridurre le perdite di N, per esempio applicando dei volumi irrigui adatti a soddisfare le esigenze della coltura, ed evitare la lisciviazione di N negli strati più profondi del terreno (Gehl et al. 2005).

C) Momento, modalità di applicazione e formulazione dei fertilizzanti:

La principale causa delle perdite di N sta nella non sincronia tra la disponibilità di N nel terreno e le esigenze della coltura (Robertson and Vitousek., 2009). Per avere una buona efficienza i fertilizzanti andrebbero applicati spesso ed in piccole dosi (Wang et al. 2017; Ciampitti et al. 2012); ma questo non accade per via delle tempistiche, della disponibilità di manodopera e attrezzature; per questo nella normalità dei casi si ricorre a due

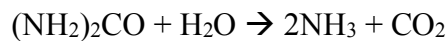
frazionamenti: un trattamento di copertura prima della semina, ed uno con coltura in atto quando è in fase di rapido accrescimento; questi accorgimenti contribuiscono a ridurre la lisciviazione di NO_3^- e le perdite di N_2O (Deng et al. 2023).

Oltre al momento devono anche essere presi in considerazione la posizione ed il metodo di applicazione, dato che le condizioni del terreno ed il suo contenuto di nutriente può essere molto variabile all'interno dello stesso appezzamento, in questo viene in aiuto l'agricoltura di precisione, infatti utilizzando degli spandiconcime a dosaggio variabile, si possono adeguare gli input alle condizioni della coltura e del terreno sulla base di mappe di prescrizione (Linn et al. 1984; Klemedtsson et al. 1987).

Già solo applicando il fertilizzante in bande sulla fila, contribuisce a migliorare l'NUE rispetto ad una applicazione tra le file (Malhi et al. 1995).

Un ruolo importante lo giocano anche i diversi dosaggi ed il tipo di fertilizzante (Robertson and Vitousek., 2009).

Il concime sintetico più utilizzato è l'urea granulare, che una volta applicata al terreno si converte velocemente in azoto disponibile:



L'ammoniaca prodotta viene rapidamente idrolizzata a ione ammonio (NH_4^+), il quale viene poi trattenuto dalla soluzione circolante. L'ammonio però nei terreni agricoli è facilmente convertito a nitrato, la forma di azoto più lisciviabile nel suolo (Wang et al. 2021). Per ridurre il processo di nitrificazione e mantenere l'N in forme meno lisciviabili è possibile impiegare dei formulati di fertilizzanti a lento rilascio del nutriente, dove le particelle di concime sono rivestite con dei coating che ne riducono la solubilità, come l'urea rivestita con S; o aggiungendo dei composti al terreno che inibiscono la nitrificazione microbica, come l'olio di neem e la diciandiamide; queste metodologie anche se efficaci vengono applicate solo su coltivazioni ad alto valore, come ornamentali e tappeti erbosi (Cassman et al., 2022; Meisinger et al. 1980).

D) Strategie per ridurre l'efflusso di azoto:

Sono degli accorgimenti per trattenere il più possibile l'azoto all'interno degli ecosistemi agricoli, o di individuare e guidare le perdite verso percorsi meno dannosi per l'ambiente (Robertson GP et al. 2007).

Per esempio il ripristino delle zone umide e dei bacini idrografici agricoli contribuiscono a ridurre le perdite di N dai campi verso gli oceani (Mitsch et al. 2001), soprattutto quando a queste zone si aggiunge della vegetazione autoctona ai bordi così che parte dell'N presente nell'acqua sia immobilizzato nella biomassa, ed i terreni siano maggiormente protetti dall'erosione (Lowrance et al. 1998).

1.4. *Zea mays* L.

1.4.1. Classificazione botanica, origine, diffusione e morfologia della pianta

La pianta di *Zea mays* L. è uno dei tre cereali più importanti al mondo, dove se ne coltivano 205.870.016 ha con una produzione di 12.102.235.135 tonnellate di granella (FAO).

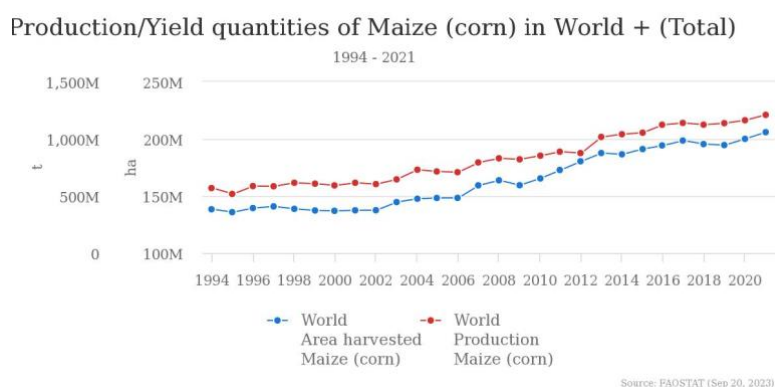


Figura 1.3.: Andamento della produzione e dell'investimento della coltivazione di mais a livello mondiale dal 1994 al 2021 (FAOSTAT).

Grazie alla sua elevata produttività contribuisce in modo marcato al soddisfacimento delle esigenze alimentari di tutta la popolazione mondiale (Chandler e Brendel, 2002), anche grazie alla sua grande adattabilità a diverse condizioni climatiche, ma soprattutto all'utilizzo di varietà ibride e per il miglioramento delle tecniche colturali.

Il mais fa parte della famiglia delle Graminacee, sottofamiglia delle Panicoidee, e classe delle dicotiledoni ed è una pianta erbacea con ciclo biologico annuale (Hochholdinger et al. 2004).

Il mais moderno deriva da una sua specie selvatica che è stata addomesticata circa 9000 anni fa, in una regione del sud – ovest del Messico (Matsuoka et al., 2002; Piperno et al.,

2009). Il progenitore del mais si chiama Teosinte (nome che racchiude i taxa selvatici di cinque specie del genere *Zea*) (Iltis and Doebley, 1980), il quale ha subito diverse modifiche in seguito al suo addomesticamento, come quelle relative alla pannocchia, molto più produttiva nel mais moderno, ma non adatta ad una specie selvatica, per via del fatto che i semi non si staccano più facilmente dal tutolo una volta arrivati a maturazione (Stitzer et al. 2018).

La principale novità evolutiva del mais rispetto al teosinte sta quindi nella morfologia della spiga, prendendo invece in considerazione le caratteristiche morfologiche principali, la due piante non si differenziano in maniera così marcata (Stitzer et al. 2018).

Le principali differenze nella spiga tra mais e teosinte sono principalmente quattro:

- In mais ogni nodo della pannocchia (infiorescenza femminile) contiene due spighette che matureranno in un seme ognuna, così si avrà la formazione di un numero doppio di semi rispetto al teosinte, dove solo una spighetta formerà il seme (Doebley et al., 1995; Stitzer et al. 2018)
- Il mais ha minimo quattro ranghi nella pannocchia (polistico), a differenza del teosinte che ha solo due ranghi (distico) (Stitzer et al. 2018); questa differenza è solo relativa alla spiga, mentre la fillosi fogliare è distica e alterna per entrambe le piante (Jackson and Hake, 1999).
- Il mais ha un rachide nel quale a maturità non si formano gli strati di abscissione che consentono la dispersione delle cariossidi; nel teosinte invece gli strati di abscissione si formano all'interno della spiga, dividendola in singole infiorescenze che a maturità possono disperdersi (Chavez et al., 2012).
- Il mais ha glume (foglie alla base di ogni fiore) piccole e morbide, a differenza del teosinte dove le glume racchiudono ogni cariosside ed a maturità si induriscono, impedendo la predazione dei chicchi (Wilkes, 1967). Nel mais a maturità le cariossidi sono molto più esposte (Stitzer et al. 2018).

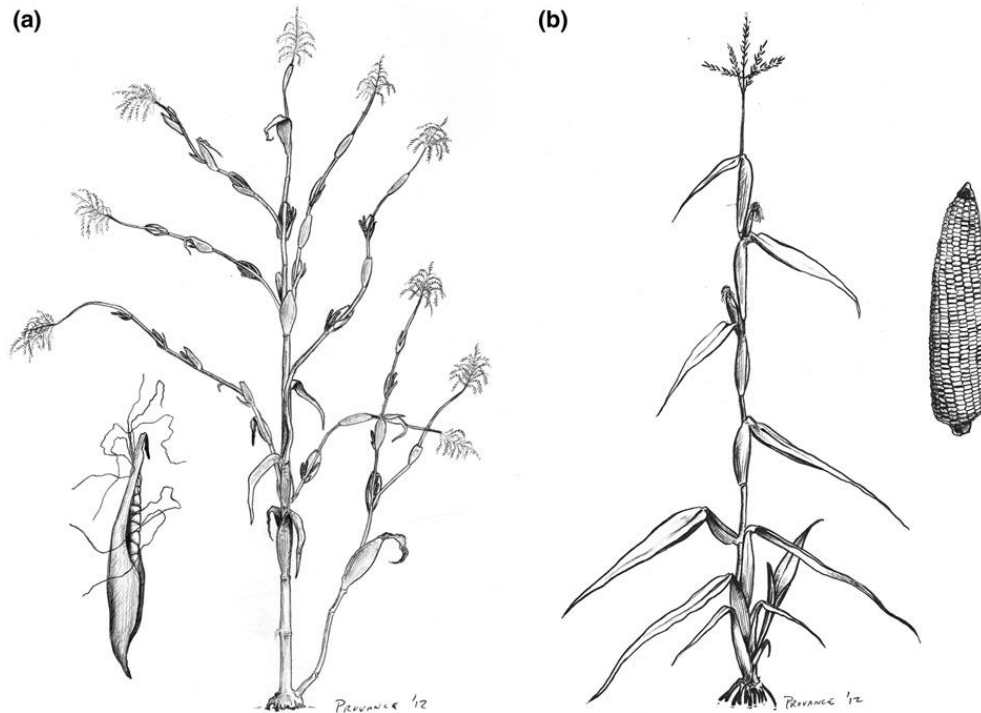


Figura 1.4.: differenze fenotipiche nell'architettura della pianta che sono avvenute nel teosinte (sx) ed hanno portato alla formazione del mais moderno (dx). Il teosinte ha architettura ramificata con molte spighe distribuite sulla pianta, mentre il mais ha portamento eretto (Stitzer et al. 2018).

Un'altra differenza fenotipica che contraddistingue queste due piante è il fatto che in mais il branching ascellare è molto ridotto rispetto al teosinte, dove i rami laterali superiori sono allungati, mentre i rami laterali inferiori sono allungati in filamenti (Doebley et al., 1997). Il fatto che in mais i rami laterali siano poco sviluppati ed in numero minore, fa sì che si riduca l'input fotosintetico alla pianta, stimolando la concentrazione della capacità riproduttiva e produttiva della pianta in un numero minore di punti (Stitzer et al. 2018). Prendendo invece in considerazione l'apparato radicale della pianta di mais, questo può essere suddiviso come:

- 1) apparato radicale embrionale, composto da un'unica radice primaria (PR) e da un numero variabile di radici seminali (Abbe and Stein, 1954)
- 2) apparato radicale post – embrionale, formato da radici emesse da germogli. Di questa categoria fanno parte anche tutte le radici laterali (Hochholdinger et al. 2004).

Le radici che si formano a partire dalle gemme presenti nei nodi sotterranei prendono il nome di radici della corona, mentre quelle che si sviluppano dai nodi nella parte epigea della pianta sono dette radici a tutore (Hochholdinger et al. 2004).

Per quanto riguarda le radici embrionali, di cui fa parte anche la radice primaria, nel mais questa si sviluppa all'interno dell'embrione, caratteristica che si trova solo nella famiglia delle Graminacee (Yamashita and Ueno, 1992); si hanno poi anche le radici seminali che si sviluppano endogenamente in un numero da 0 a 13 a seconda delle caratteristiche genetiche della pianta (Feldman et al. 1994; Hochholdinger et al. 2004).

In mais le radici primarie e seminali possono rimanere vitali e attive anche per l'intero ciclo biologico (Kozinka et al. 1977; McCully and Canny, 1985).

Considerando invece le radici post – embrionali, queste possono avere sviluppo:

- **Precoce:** interessano le prime due settimane di sviluppo dopo la comparsa delle radici embrionali primarie e seminali, e vedono lo sviluppo di altri 2 tipi di radici, che sono le radici laterali (fondamentali nell'assorbimento di acqua e nutrienti) e le radici del germoglio, sviluppate dal nodo del coleoptile (Hochholdinger et al. 2004).

Le radici laterali hanno grande capacità di ramificazione, portando alla formazione di nuove radici di secondo, terzo e più ordine; la loro formazione avviene dallo sdifferenziamento di cellule nel periciclo che riacquisiscono attività meristemica (Esau et al. 1965).

- **Tardivo:** di questa categoria fanno parte le radici a corona e le radici a tutore (Hochholdinger et al. 2004).

Le radici a corona sono importanti per evitare lo sradicamento della pianta, si sviluppano al di sotto della zona del colletto svolgono inoltre importante attività di assorbimento grazie alle loro ramificazioni (McCully and Canny, 1988). Le radici a tutore invece si sviluppano al di sopra del colletto, svolgono funzione di ancoraggio ed assorbimento, soprattutto le loro ramificazioni (Feldman et al. 1994).

Oltre alle radici che si sviluppano sulla base del background genetico della pianta, *Zea mays* L. è in grado di emettere radici anche da ferite, applicazioni di ormoni o altri stimoli esogeni. Le radici che si formano sulla base di questi stimoli prendono il nome di radici avventizie (Hochholdinger et al. 2004).

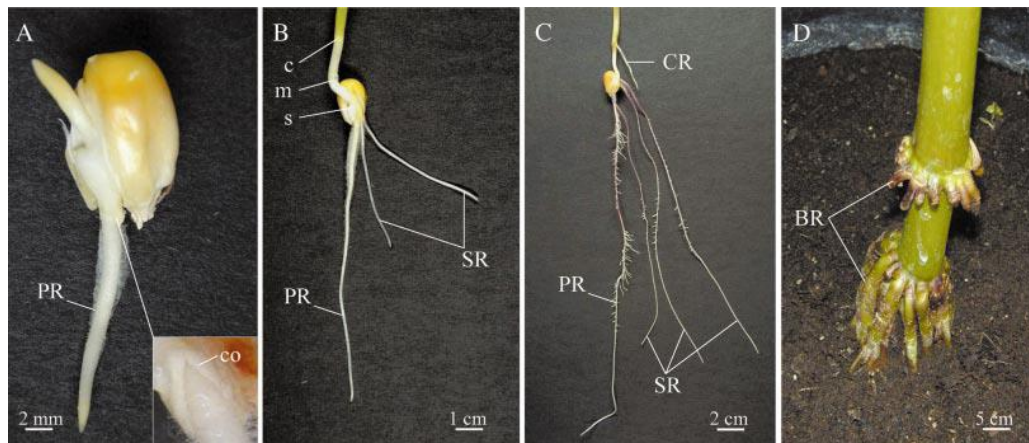


Figura 1.5.: Nell'immagine viene illustrato lo sviluppo consecutivo delle quattro tipologie di radici di *Zea mays* L. negli stadi A (3 giorni dopo la germinazione dag), B (5 dag), C (10 dag) e D (6 settimane dopo la germinazione). Si possono notare: radici primarie (PR), radici seminali (SR); radici della corona (CR) e radici a tutore (BR). Figura A. (Hochholdinger et al. 2004)

1.4.2. Esigenze nutrizionali: sintomi di carenza di azoto in *Zea mays* L.

Nella coltivazione del mais, dopo l'introduzione delle varietà ibride, le rese sono aumentate di molto, questo ha fatto sì che sia necessario fornire fertilizzante esogeno al terreno per soddisfare i fabbisogni di questo cereale, il quale ha il maggiore potenziale di rendimento (Wani et al 2021).

Una nutrizione equilibrata è essenziale per assicurare una buona produttività e qualità della granella (Wani et al. 2021), dove gli elementi carbonio, l'idrogeno e azoto, sono i principali componenti della sostanza secca (Humtsoe et al. 2018), dei tre l'N è un elemento fondamentale perché lo si trova nella struttura di proteine, come la zeina e la globulina contenute nell'embrione e nell'endosperma delle cariossidi, ed anche negli acidi nucleici, strutture importanti per assicurare la crescita e lo sviluppo della coltura (Wani et al. 2021; Wang et al. 2017).

Le piante di mais assorbono azoto dal suolo in modo continuo dalla nascita fino alla fioritura, dopo la quale il tasso di assorbimento si riduce (Naeem et al. 2018; Qi et al. 2019; Fernandez et al. 2020). Il fattore più correlato alla resa ed alla disponibilità di N nel terreno è il numero di cicchi per pianta, il quale diminuisce molto in casi di coltivazioni in carenza di N (Moose and Below. 2009). È inoltre stato osservato che una dose adeguata di N permette alle piante di estendere in modo più efficace la superficie fogliare, raggiungendo quella massima potenziale, oltre che ritardandone la senescenza e facilitando lo sviluppo di spighe e pennacchio (Wani et al. 2021).

Nel caso di carenza di azoto, i primi sintomi sono visibili a partire dalle foglie più vecchie, quindi quelle nella parte bassa della pianta, dove la nervatura centrale della foglia si colora di giallo ed il resto della lamina assume una colorazione verde chiaro; se la carenza persiste sulla foglia si formeranno anche delle zone necrotiche (Ding et al. 2005; Clay et al. 2006). Oltre ai sintomi sull'apparato fogliare, anche l'intera pianta risente della carenza di N, manifestandosi con un vigore ridotto rispetto a piante in condizioni ottimali. Le piante in stress da carenza di azoto presentano una ridotta attività fotosintetica per via della degradazione della clorofilla; questo impatta sulla resa in quanto le piante avranno un minore numero di semi, ed un minore peso medio della cariosside (Uhart e Andrade 1995); in condizioni nutrizionali ottimali le cariossidi avranno invece un peso maggiore per via di un maggiore tasso di riempimento in fase di crescita e sviluppo del seme (Wani et al. 2021).

Considerando invece nello specifico i tratti fogliari, è stato dimostrato che piante in stato di deficit di azoto mostrano delle alterazioni nella quantità di area fogliare (LA), nella velocità di senescenza delle foglie, nell'area fogliare specifica; che a loro volta condizionano la crescita e la resa della coltura (Panpan et al. 2022; Riha et al. 2013).

Le piante possono rispondere ad una ridotta disponibilità di N mantenendo la stessa area fogliare (LA), ma riducendo il contenuto di N per unità di superficie nelle foglie (SLN), con un mantenimento della quantità di luce intercettata, ma a fronte di una diminuzione dell'efficienza fotosintetica (Drouet and Bonhomme 2004; Panpan et al. 2022), data la correlazione positiva tra contenuto di N per unità di superficie e fotosintesi; questa è la strategia adottata dalle piante di mais in condizioni di ridotta disponibilità di N nella sua fase vegetativa (Massignam et al. 2011); invece per quanto riguarda la fase riproduttiva in carenza di N, la pianta di mais tende a ridurre sia LA che SLN ugualmente, suggerendo che parte dell'N stoccato negli organi vegetativi viene rimobilitato per la fase di riempimento delle cariossidi (Bertheloot et al. 2008; Li et al. 2022; Panpan et al. 2022). Per quanto riguarda la senescenza delle foglie è stato osservato che in condizioni di ridotta quantità di N sono le foglie basali al di sotto della pannocchia che entrano per prime in fase di senescenza, permettendo così alla pianta di riutilizzare le risorse presenti in queste foglie per la produzione di foglie più giovani e nello sviluppo degli organi riproduttivi della pianta (Massignam et al. 2011).

È inoltre stato osservato che sia l'area fogliare, che il contenuto di N per unità di superficie nelle foglie diminuiscono con il procedere del ciclo colturale, a causa della senescenza delle foglie (Panpan et al. 2022).

1.5. Strigolattoni

Gli strigolattoni dal 2008 vengono identificati come una nuova categoria di ormoni vegetali (Gomez – Roldan et al. 2008) che derivano dai carotenoidi, e svolgono la funzione di segnalazione sia endogena che esogena a stimoli di tipo ambientale biotici e abiotici. Chimicamente hanno tutti una struttura simile, composta da un anello tricyclico (ABC) connesso ad un butirilattone (anello D), attraverso un ponte enol – eterico. Il ponte enol – eterico è il componente più importante della molecola, perché è quello che ne definisce l'attività biologica.

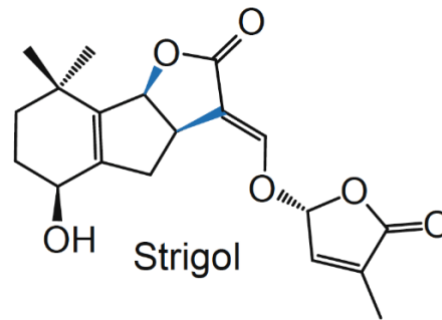


Figura 1.6.: Nella figura viene rappresentata la struttura chimica dello Strigolo, uno strigolattone canonico, dove vengono rappresentati il lattone tricyclico (anello ABC), connesso al butirilattone (anello D) attraverso il ponte enol – eterico (Koltai H. Prandi C., Strigolactones – Biology and Application. ©Springer Nature).

È stato visto che sono anche importanti nella germinazione di semi di diverse piante parassite, come Striga ed Orobanche, le quali hanno semi molto piccoli che contengono poche riserve, quindi sulla base della presenza o meno degli SLs che rilevano sono in grado di determinare la loro vicinanza alla pianta da parassitizzare, inducendo o reprimendo quindi la germinazione (sulla base di questa attività nel 1966 è stato poi scoperto il primo strigolattone, isolato dalla rizosfera di piante di cotone, lo Strigolo, che induce la germinazione di piante di Striga); ma sono anche i responsabili della regolazione delle simbiosi che le piante instaurano con le micorrize arbuscolari (Akyama et al. 2005); oltre che alla regolazione dello sviluppo della pianta, sia a livello dell'apparato radicale, soprattutto in relazione alle carenze nutrizionali; che a livello del germoglio, come dimostrato da Brewer et al. (2013) (Ravazzolo et al. 2019).

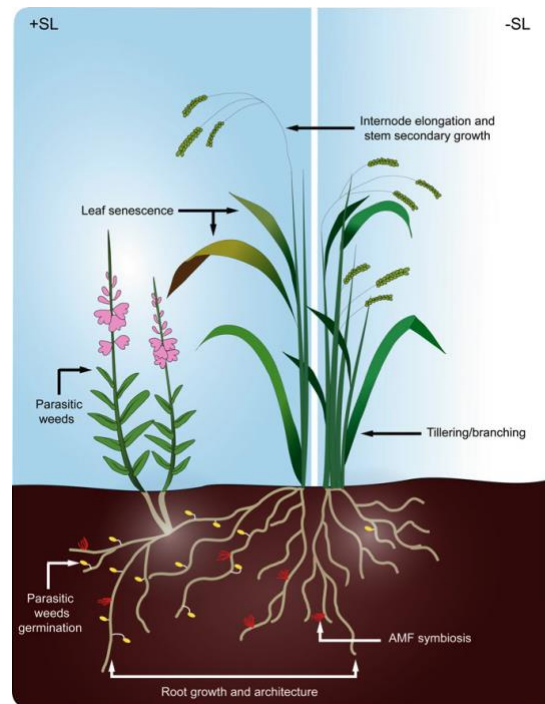


Figura 1.7.: Nell'immagine vengono rappresentate le principali funzioni degli SL: tra cui la regolazione della dominanza apicale, quindi la presenza più o meno marcata di rami laterali; regolano inoltre lo sviluppo dell'apparato radicale in relazione alla presenza / assenza di nutrienti. Inoltre la loro presenza nella rizosfera ha effetti sulla germinazione di piante parassite e sulle simbiosi tra piante e funghi AM (Koltai H. Prandi C., Strigolactones – Biology and Application. ©Springer Nature).

1.5.1. Biosintesi degli SLs

Prendendo in considerazione la via biosintetica degli SL, dopo la loro scoperta negli anni 60, si è ipotizzato che fossero dei composti lattoni sesquiterpenici (Yokota et al. 1998); poi per via della somiglianza dell'anello A degli SL con gli anelli tipici dei carotenoidi, si è scoperto che derivano dai carotenoidi (Bouwmeester et al. 2003). I carotenoidi fanno parte della classe di composti degli isoprenoidi, i quali derivano dal composto C15 isopentilil difosfato (IPP). È stato poi osservato che le piante fanno uso di due vie biosintetiche che portano alla sintesi dell'IPP: 1) pathway del melavonato, dalla quale si ottengono sesquiterpeni, triterpeni, steroli e politerpeni; 2) pathway del 2-metil-D-entriolo-4-fosfato (MEP) che porta all'ottenimento di monoterpeni, diterpeni, carotenoidi e plastoquinone – 9.

Studi successivi condotti da Matusova et al. (2005), tramite l'impiego di piante mutanti, hanno portato alla conclusione che gli SLs derivano da composti come carotenoidi o apocarotenoidi.

Gli enzimi prodotti dai geni *CCD7* e *CCD8* catalizzano la scissione dell'All-trans- β -carotene in diversi apocarotenoidi, tra cui ABA e SLs.

Le molecole dei carotenoidi sono sensibili alla scissione ossidativa determinata dalle diossigenasi di scissione dei carotenoidi (CCD), ma questa reazione può avvenire anche grazie all'azione di specie reattive dell'ossigeno.

Alder et al. (2012) hanno determinato che l'enzima prodotto da *CCD8*, consiste in una CCD che sintetizza carlattone partendo da un substrato cis.

La via biosintetica prende avvio dalla molecola di All-trans- β -carotene, il quale viene poi isomerizzato dall'enzima D27, che ne modifica la conformazione stereoscopica, formando il 9-cis- β -carotene, che viene a sua volta convertito in 9-cis- β -apo-10''-carotenale da parte dell'enzima codificato dal gene *CCD7*.

Il 9-cis- β -apo-10''-carotenale viene poi convertito in carlattone dall'enzima prodotto dal gene *CCD8*.

Una volta ottenuto il carlattone, grazie all'azione degli enzimi P450 e LBO, questo viene convertito nei diversi SLs (Seto et al. 2014).

Il carlattone è una molecola che mostra caratteristiche comuni con gli strigolattoni, infatti ha l'anello D (butirlattone) identico a quello degli strigolattoni, ha lo stesso numero di atomi di carbonio (C19) e le sue due componenti (anelli ABC e anello D) unite tramite un ponte enol – eterico, come quello che si trova negli SLs.

Seto et al. (2014) hanno inoltre osservato che applicando carlattone a piante mutanti *ccd8* di *Oryza sativa*, è stato possibile ottenere lo stesso fenotipo delle piante wild – type, inducendo anche la germinazione di semi di Striga; suggerendo che il carlattone è un intermezzo della via biosintetica degli SL, che deriva dall'enzima codificato dal gene *CCD8*, e successive reazioni di ossigenazione.

È inoltre stato osservato che l'enzima derivante dal *CCD8* catalizza diverse reazioni, a seconda della configurazione stechiometrica del composto.

Nella conversione del carlattone in strigolattoni canonici e non canonici, è necessaria la presenza dell'enzima P450 (CYP del clade 711), che consiste in una monoossigenasi.

Werck – Reichhart e Feyereisen (2000) lavorando con piante di *Arabidopsis thaliana* mutanti per *max1* (gene *MAX1* silenziato che codificherebbe per una CYP711A1), hanno osservato che queste piante manifestavano un fenotipo molto ramificato; inoltre attraverso successive analisi genetiche sono stati in grado di determinare che l'enzima codificato dal gene *MAX1*, catalizza le reazioni nella via biosintetica degli SLs a valle rispetto ai geni *MAX3* (*CCD7* per *Arabidopsis*) e *MAX4* (*CCD8* per *Arabidopsis*).

Il gene MAX1 è direttamente connesso alla conversione del carlattone in SLs, questo è stato possibile definirlo sulla base di analisi di piante max1 di Arabidopsis, nelle quali Seto et al. (2014) hanno rilevato delle concentrazioni di carlattone circa 700 volte maggiori, e l'assenza di strigolattoni; rispetto alle stesse piante normali.

Queste analisi hanno portato alla conclusione che l'enzima prodotto dal gene MAX1 (P450) consente la conversione del carlattone (CL) in acido carlattonico (CLA), dal quale poi, attraverso altre reazioni, si otterranno gli SLs.

Successive analisi hanno dimostrato che oltre alla P450, nel pathway biosintetico degli SLs, è necessaria anche l'attività di un altro enzima, ovvero il LATERAL BRANCHING OXIDOREDUCTASI (LBO), un enzima della famiglia della diossigenasi 2 – ossoglutarato, che viene coespresso con MAX3 (CCD7). Infatti, piante mutanti lbo presentano un fenotipo ramificato (Brewer et al. 2016).

In sintesi, l'acido carlattonico è una molecola di passaggio della biosintesi degli SLs, ma Iseki et al. (2008) hanno dimostrato che questo non accade nelle piante di *Zea mays* L., dove il carlattone viene direttamente convertito in zealactone e successivamente in zeapyranolactone, uno strigolattone non canonico.

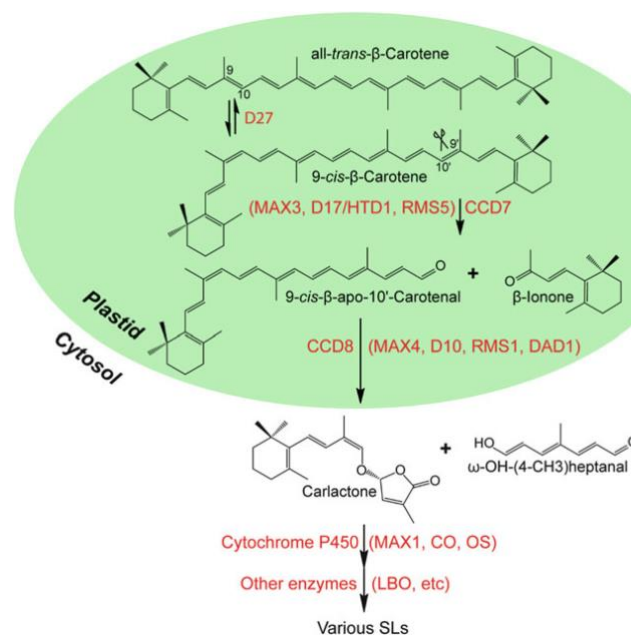


Figura 1.8.: Nell'immagine viene rappresentata l'intera via di biosintesi degli SLs. L'isomerasi D27 catalizza la conversione dell'all-trans-β-carotene in 9-cis-β-carotene, il quale viene poi scisso dalla CCD7 in 9-cis-β-apo-10'-carotenale (C27) e β-ionone. Poi il 9-cis-β-apo-10'-carotenale viene convertito in carlattone dall'enzima CCD8, e rilasciando come prodotto di scarto il ω-OH-(4-CH3)heptanale. Il carlattone poi tramite l'enzima P450 viene convertito in acido carlattonico (CLA) e SLs canonici; si hanno poi altri enzimi come la il LATERAL BRANCHING OXIDOREDUCTASI (LBO), che sono utilizzati dalle piante in fasi successive della biosintesi per l'ottenimento di SLs diversi da quelli canonici. Gli enzimi D27, CCD7 e CCD8 sono tutti collocati all'interno dei plastidi delle cellule vegetali, mentre i successivi P450 e LBO si trovano a livello del citoplasma. (Koltai H. Prandi C., Strigolactones – Biology and Application. ©Springer Nature).

1.5.2. Trasporto, essudazione e percezione del segnale degli SLs

Per quanto concerne il trasporto degli SLs Kohlen et al. (2010) hanno dimostrato che queste molecole vengono sintetizzate a livello delle radici, e poi trasportate verso la parte epigea della pianta attraverso i fasci xilematici; questo è stato dimostrato innestando un mutante di *Arabidopsis thaliana* carente di strigolattone su un suo portainnesto wild – type, osservando poi che il fenotipo della pianta innestata non mostrava fenotipo ad elevata ramificazione; lo stesso gruppo di ricerca ha però poi dimostrato che la biosintesi degli SLs coinvolge anche la parte alta della pianta.

Booker et al. (2005) lavorando con innesti di piante mutanti di *Arabidopsis*, hanno osservato che innestando germogli max3 e max4 su portainnesti max1, è stato possibile ottenere piante con fenotipo simile al wild type, concludendo che il carlattone e gli strigolattone vengono sintetizzati principalmente a livello dell'apparato radicale, e poi trasportati verso la parte alta della pianta. Questo avviene perché l'apparato radicale max1 è in grado di biosintetizzare carlattone, che, venendo poi trasferito ai germogli max3 e max4, può comunque essere convertito in strigolattone attivi (**Figura 1.8.**) che inibiscono lo sviluppo di rami laterali.

Si è poi scoperto che gli strigolattone sono anche essudati dall'apparato radicale, attraverso degli specifici trasportatori, che sono poi stati identificati in *Petunia*, come trasportatori PDR1 (pleiotropic drug resistance 1). Il trasportatore PDR1 fa parte della famiglia dei trasportatori ATP-binding cassette (ABC), ed hanno il compito di essudare strigolattone nella rizosfera (Kretschmar et al. 2012).

I trasportatori PDR1 sono collocati soprattutto a livello del plasmalemma di cellule dell'epidermide radicale di radici laterali, le quali sono poi i punti di ingresso per le micorrize.

Prendendo in considerazione la percezione e la trasduzione del segnale degli SLs, questa si è visto avvenire attraverso l'ubiquitinazione del proteosoma 26S (UPS) (Hershko and Ciechanover 1998).

Il sistema UPS necessita di una sequenza di 3 ligasi (E1, E2 ed E3), le quali marcano i substrati proteici per la degradazione da parte del proteosoma 26S.

La percezione degli SLs coinvolge il recettore DWARF14 (D14), una α/β idrolasi che lega e catalizza l'idrolisi degli SLs, un passaggio necessario per la loro trasduzione del

segnale (Yao et al. 2016); successivamente all'idrolisi l'anello D dello strigolattone si lega a D14, formando una nuova molecola detta CLIM.

Nelle piante di *Arabidopsis* gli omologhi di D53 per *Oryza sativa*, sono rappresentati da SMXL6, SMXL7 e SMXL8, le quali sono proteine contenenti un dominio ATPasi, che ne permette l'interazione con il corepressore TPL/TPR (Ke et al. 2015; Pauwels et al. 2010; Soundappan et al. 2015; Zhou et al. 2013).

Successivi studi su *Oryza sativa* hanno permesso di indentificare i repressori trascrizionali nelle molecole SMXLs/D53 e TPL/TPR, i quali interagiscono con SPL, un componente del promotore del gene che deve essere espresso (Kolthai and Prandi 2019). In caso di presenza di strigolattoni, si verifica la formazione della molecola CLIM la quale interagendo con i repressori SMXLs/D53 e TPL/TPR, forma un complesso che verrà poi portato a degradazione da parte del proteosoma 26S, lasciando così libero il promotore del gene per l'espressione.

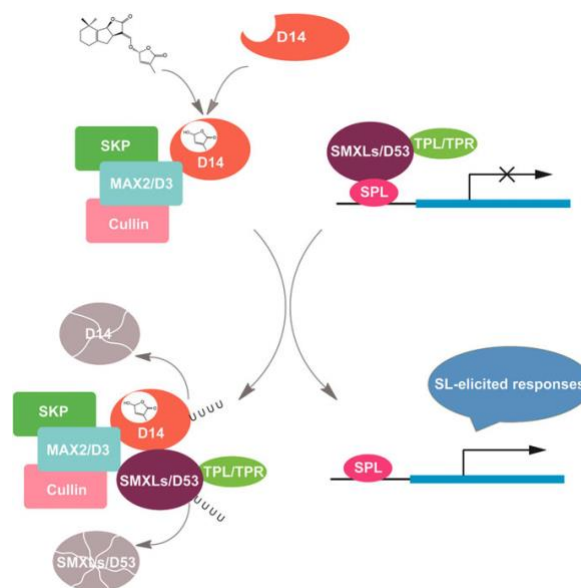


Figura 1.9.: Nell'immagine viene rappresentata la via di percezione e segnalazione degli SLs (Koltai H. Prandi C., Strigolactones – Biology and Application. ©Springer Nature).

1.5.3. Funzione degli SLs nelle simbiosi tra piante e funghi micorrizici

Nel mondo vegetale le piante per sopravvivere e garantirsi un approvvigionamento adeguato di sostanze nutritive si sono evolute svolgendo delle simbiosi con funghi micorrizici, soprattutto quelli appartenenti al subphylum Glomeromycotina (Koltai H. Prandi C. 2019).

L'ifa fungina colonizza la cellula del pelo radicale, poi il micelio si espande all'esterno per esplorare il suolo; mentre all'interno della cellula del pelo radicale il fungo sviluppa una struttura detta arbuscolo, la quale viene dedicata allo scambio di nutrienti vero e proprio. Il fungo grazie allo sviluppo delle ife è in grado di esplorare il terreno in modo più capillare rispetto all'apparato radicale della pianta, oltre che ad assorbire acqua e nutrienti con una maggiore efficienza, soprattutto nel caso dei fosfati (Smith et al. 2011), ricevendo in cambio dalla pianta carbonio organico in forma di zuccheri e lipidi (Roth e Paszkowski 2017; Keymer e Gutjahr 2018).

Il fungo deve essere in grado di riconoscere la pianta ospite, questo processo avviene principalmente grazie all'essudazione di strigolattoni da parte della pianta nella rizosfera, che innescano una serie di risposte e adattamenti per l'instaurazione della simbiosi (Buée et al. 2000).

Analizzando poi gli essudati radicali delle piante Akiyama et al. (2005) hanno identificato lo strigolattone 5 – deossistrigolo come la molecola responsabile del riconoscimento e della maggiore ramificazione dei funghi AM.

Oltre ad una maggiore ramificazione, la presenza degli SLs, stimola anche la germinazione delle spore fungine, la divisione mitotica delle ife, oltre che ad un aumento del tasso di respirazione (Besserer et al. 2008).

Inoltre gli SLs inducono le cellule del fungo a rilasciare nella rizosfera oligosaccaridi di chitina, un composto segnale e necessario per il riconoscimento del fungo da parte della pianta ospite (Genre et al. 2013).

Gli strigolattoni vengono percepiti dai funghi anche in concentrazioni molto basse, nell'ordine di 10^{-13} (M) (Besserer et al. 2006), questo indica la presenza nelle cellule del fungo di un meccanismo di percezione molto sensibile, nonostante i recettori non siano ancora stati identificati.

Servendosi di piante mutanti carenti di SLs è stato possibile dimostrare che una loro assenza, in generale, corrisponde ad una riduzione della colonizzazione delle radici, mentre rimangono inalterate le strutture degli arbuscoli all'interno delle cellule vegetali (Gomez-Roldan et al. 2008; Kohlen et al. 2012; Kretzschmar et al. 2012; Yoshida et al. 2012; Kobae et al. 2018), ipotizzando anche che il minore tasso di colonizzazione nelle piante mutanti è imputabile ad un effetto residuo di altri SLs non rilevabili, oltre che ad altri composti attivi presenti negli essudati radicali.

Gli SLs sono soggetti ad una fine regolazione della loro biosintesi e trasporto; l'essudazione di queste molecole infatti deve essere correlata allo stato nutrizionale della pianta, dato che in relazione alla loro quantità dipende il tasso di micorrizzazione; Carbonnel and Gutjahr (2014) hanno infatti dimostrato che la biosintesi degli SLs aumenta molto in condizioni di carenza di P, e solo in alcune specie anche in carenza di N (Balzergue et al. 2010; Breuillin et al. 2010).

López-Ráez et al. (2010) hanno osservato che all'aumentare del tasso di colonizzazione la biosintesi ed essudazione degli SL diminuisce, questo è stato ipotizzato avvenga per via di una maggiore disponibilità di fosforo, o per il controllo del livello di colonizzazione del fungo, evitando tassi di micorrizzazione eccessivi.

Per quanto concerne l'essudazione degli SLs nella rizosfera, anche questo passaggio è fondamentale nella regolazione del tasso di colonizzazione, infatti è stato osservato che in mutanti con trasportatore PDR1 non funzionale, i tassi di colonizzazione sono risultati minori, ma senza compromettere lo sviluppo dei pochi arbuscoli che hanno potuto instaurare la simbiosi (Kretschmar et al. 2012; Sasse et al. 2015).

1.5.4. Funzione degli SLs nelle simbiosi tra piante Leguminose e batteri azotofissatori

Gli strigolattoni hanno anche funzioni nella regolazione delle simbiosi tra piante della famiglia delle Leguminose e batteri azotofissatori.

Questi batteri si collocano nella pianta all'interno di particolari strutture detti noduli radicali, all'interno dei quali ci sono le condizioni ottimali per la fissazione dell' N_2 da parte del microbo, che verrà poi ceduto alla pianta in cambio di carbonio organico (Oldroyd e Downie 2008; Oldroyd et al. 2011).

Nel momento in cui le piante appartenenti alla famiglia delle Leguminose si trovano in condizioni di carenza di N, promuovono l'essudazione radicale di una miscela di metaboliti secondari, soprattutto flavonoidi e isoflavonoidi; i quali comportano il rilascio di fattori Nod nella rizosfera (Broughton et al. 2000). Una volta che la pianta percepisce la presenza dei fattori Nod inizia a sviluppare il nodulo per la colonizzazione (Gough e Cullimore 2011). Questo tipo di simbiosi è altamente specifico, tanto che alcune specie di piante Leguminose possono svolgere la simbiosi solo con specifiche specie di batteri azotofissatori (Radutoiu et al. 2007; Fliegmann e Bono 2015; Liu e Murray 2016).

Lo sviluppo dei noduli radicali dipende anche in questo caso dalla presenza di SLs, ed altri fitormoni, come dimostrato da (Ferguson e Mathesius 2014); infatti applicando rac-GR24, si è osservato un aumento del numero di noduli per diverse specie Leguminose.

Analizzando invece piante mutanti con geni della biosintesi degli SLs silenziati, si è osservata una minore nodulazione, portando alla conclusione che gli strigolattoni promuovono questo effetto, ma anche in questo caso si sono riscontrati risultati variabili tra diverse specie vegetali (Soto et al. 2010; Foo e Davies 2011; Rehman et al. 2018).

In *Medicago truncatula* è stato osservato che i trattamenti con rac-GR24 hanno influenzato il numero di noduli in modo dipendente dalla concentrazione, con un effetto di stimolazione a basse concentrazioni, ed un effetto di repressione a concentrazioni più elevate (De Cuyper et al. 2015).

Diversi studi hanno dimostrato che gli strigolattoni influenzano lo sviluppo del filo di infezione, con effetti variabili anche a fronte di minime modifiche nella loro concentrazione (Breakspear et al. 2014; De Cuyper et al. 2015).

È inoltre stato ipotizzato che diverse specie di Leguminose abbiano una diversa sensibilità agli SLs, ed inoltre i siti di biosintesi e azione degli SLs possono essere diversi.

Sono quindi necessarie ulteriori ricerche per comprendere il ruolo degli SLs nella nodulazione (Koltai and Prandi., 2019).

1.6. Mais mutante *zmccd8*

Il gene *CCD8* di *Zea mays* L., si è dimostrato essere fondamentale nella via biosintetica degli strigolattoni, infatti *CCD8* codifica per una carotenoid cleavage dioxygenase (CCD), che catalizza la conversione del 9-cis- β -apo-10''-carotenale in carlattone, producendo come prodotto secondario il ω -OH-(4-CH₃)-eptanale (Alder et al., 2012; Guan et al., 2012).

Attraverso diversi studi genetici è stato poi possibile verificare che il gene *CCD8* di *Zea mays* L. ha dei suoi geni omologhi in altre specie, che vengono identificati come: (MAX4) in *Arabidopsis Thaliana*, (RMS1) in Pisello, (DAD1) in Petunia e (D10 e D10-like) in *Oryza sativa* (Jia et al. 2018).

Per identificare il gene *CCD8* in mais, omologo dei già noti D10 e D10-like in riso, Guan et al. (2012) hanno effettuato delle ricerche sul genoma completo B73 di mais, trovando un omologo a singola copia di questi geni, definito come *ZmCCD8*.

Il gene *CCD8* di *Zea mays* L. è composto da quattro esoni, i quali comprendono una sequenza ORF (open reading frame) di 1719 paia di basi e condivide l'84,9 % degli amminoacidi con la proteina D10 di *Oryza sativa*, ed il 58,9 % degli amminoacidi con la proteina MAX4 di *Arabidopsis thaliana* (Guan et al. 2012).

Auldridge et al. hanno poi dimostrato che l'espressione del gene *CCD8* è localizzata all'interno dei plastidi delle cellule (Guan et al. 2012).

Introducendo poi, tramite transgenesi, il gene *ZmCCD8* nel genoma di piante di *Arabidopsis*, con geni *max4* e *max6* silenziati e non funzionali, è stato possibile osservare in queste piante dei fenotipi paragonabili a quelli di *Arabidopsis* wild type, confermando che il gene *ZmCCD8* è omologo per MAX4 (Guan et al. 2012).

Per studiare la funzione degli strigolattoni nella regolazione del branching del mais, Guan et al. hanno ottenuto un mutante knock – out *zmccd8*, inserendo in modo preciso un trasposone Ds che ha reso l'espressione di questo gene non più funzionale. Le piante così ottenute presentano la via biosintetica degli SLs non funzionale (Guan et al. 2012).

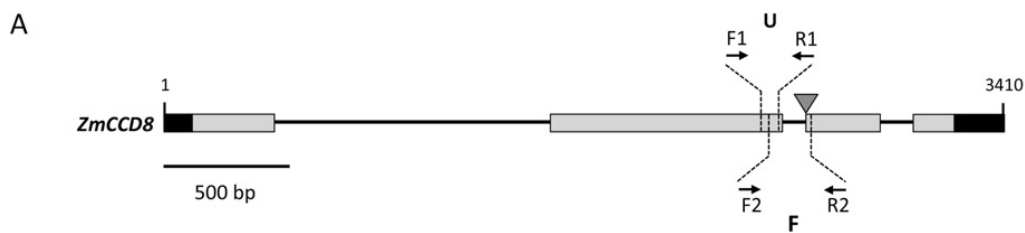


Figura 1.10.: Struttura ed espressione del mutante *zmccd8*. Nell'immagine viene rappresentata la struttura del gene *ZmCCD8* composto da 4 esoni (rettangoli) e 3 introni (linee orizzontali); mentre i rettangoli in nero indicano le regioni del gene che non vengono tradotte. Il triangolo capovolto sta ad indicare la zona di inserzione del trasposone Ds6-like all'interno dell'allele mutante di *zmccd8::Ds*. Le linee tratteggiate indicano la posizione dei primer per l'RT-PCR quantitativa. Tratto F di *ZmCCD8* viene amplificato dalla coppia di primer F2/R2, mentre il tratto U di *ZmCCD8* consiste in una sequenza a monte dell'inserzione del trasposone Ds, e viene amplificata dalla coppia di primer F1/R1. (Guan et al. 2012).

Nell'analisi del ruolo degli SLs nella regolazione e repressione della crescita dei germogli laterali del mais, si è osservato il fenotipo del mutante *zmccd8* in diverse fasi di crescita. Nelle piante del mutante di 14 giorni, erano già visibili le gemme ascellari, le quali presentavano anche una lunghezza circa 2,5 volte maggiore rispetto alle piante wild – type (Guan et al. 2012).

Sulla base di queste osservazioni è stato possibile affermare che gli SLs reprimono lo sviluppo dei rami laterali in piante di mais, a riprova del fatto, trattando piante mutanti *zmccd8* con rac-GR24, è stato possibile inibire la crescita delle gemme ascellari a livello

della seconda foglia, stabilendo quindi che il fenotipo ramificato di *zmccd8* è causato da una carenza di strigolattoni.

Analizzando poi l'allungamento dei rami laterali delle piante mutanti *zmccd8*, si è visto che era minore rispetto al fusto principale, ed il numero di rami laterali dei mutanti era circa il doppio rispetto alle piante wild – type; inoltre sulle piante mutanti non sono stati rilevati rami secondari e terziari; questi risultati derivano dal fatto che l'allele Ds è una mutazione knockout completa e con perdita di funzione (Guan et al. 2012)

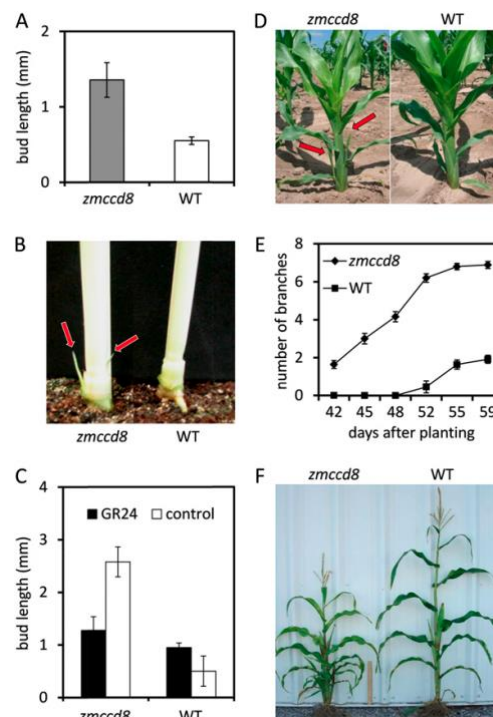


Figura 1.11.: Nel grafico (A) viene rappresentata la differenza di lunghezza delle gemme ascellari tra piante mutanti *zmccd8* e wild – type a 14 giorni dopo la germinazione, in cui si nota che le gemme ascellari del mutante sono molto più lunghe rispetto al wild – type. Nell'immagine (B) è possibile notare la differenza di crescita delle prime gemme laterali tra piante mutanti e wild – type a 21 giorni dalla germinazione. Nel grafico (C) viene indicato l'effetto del trattamento con rac – GR24 nella soppressione dello sviluppo delle gemme ascellari delle piante *zmccd8*, le quali hanno presentato delle misure significativamente minori rispetto al controllo non trattato. Nella foto (D) si vuole indicare lo sviluppo delle gemme ascellari a livello della terza e quarta foglia dal basso in piante *zmccd8* di sei settimane. Nel grafico (E) si indica l'andamento temporale della crescita visibile dei rami laterali di piante mutanti *zmccd8*, le cui piante mostrano un numero di questi rami molto più elevato rispetto alle piante wild – type. Nella foto (F) si possono apprezzare i fenotipi maturi di una pianta *zmccd8* (SX) ed una pianta di *Zae mays* wild – type (DX), a 21 giorni dopo l'impollinazione. (Guan et al. 2012).

Oltre alla maggiore ramificazione, le piante *zmccd8* mostrano anche un'altezza e un diametro del fusto minore oltre che a spighe di dimensioni minori.

Come mostrato in figura 1.11. (F) le piante del mutante hanno un'altezza in media minore del 10% rispetto al tipo selvatico, differenza rilevata già dopo 10 giorni dalla germinazione (Guan et al. 2012).

Analizzando questo aspetto è emerso che la mancanza di SLs nei mutanti *zmccd8* comporta una riduzione del tasso di crescita del 45 % nella fase tra 42 e 59 giorni dopo la semina (Guan et al. 2012). Gli SLs comportano anche un effetto di riduzione dello sviluppo degli organi riproduttivi, come mostrato in figura 1.12. (B) si nota che la lunghezza ed il diametro delle spighe del mais mutante sono minori del 28 % e del 18 % rispettivamente rispetto a quelle di piante wild – type; questi effetti sono coerenti con gli alti tassi di espressione di *ZmCCD8* a livello delle spighe; per contro invece è stato rilevato che i pennacchi (infiorescenze maschili) delle piante mutanti hanno una maggiore lunghezza rispetto al tipo selvatico, oltre che a presentare una curvatura del pennacchio stesso, data dal fatto che gli internodi di questa struttura sono più lunghi e sottili nella piante mutanti rispetto a *ZmCCD8* (Guan et al. 2012).

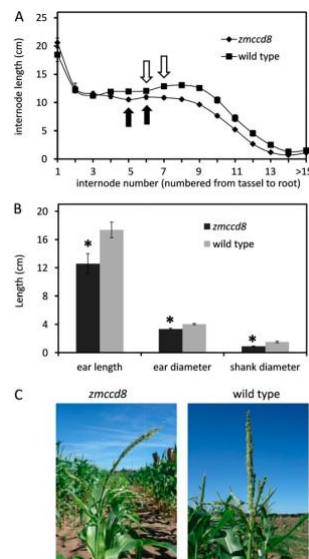


Figura 1.12.: Nell'immagine (A) si notano le differenze nella lunghezza degli internodi tra il mutante *zmccd8* ed il tipo selvatico: in *zmccd8* gli internodi tra il nodo 5 ed il nodo 14 sono risultati significativamente più corti (le frecce stanno ad indicare gli internodi al di sopra della spiga). Grafico (B) raffigura le differenze relative a lunghezza e diametro della spiga ed il peduncolo della spiga. Nella foto (C) si rappresenta il portamento pendulo del pennacchio del mais mutante rispetto a quello del wild – type. (Guan et al. 2012).

Prendendo in considerazione l'architettura dell'apparato radicale è stato dimostrato che il mutante *zmccd8* presenta una radice di dimensioni ridotte rispetto a quella del tipo selvatico, questo è dato dalla presenza di difetti nel suo sviluppo (Guan et al. 2012).

Le differenze sono relative al numero di radici nodali, che nel mutante dopo 14 giorni dalla germinazione misurano in media 2,3 cm contro i 13,25 cm delle piante *ZmCCD8*. Inoltre dopo 10 giorni dalla germinazione le piante wild – type presentano almeno due radici nodali, a differenza delle piante mutanti che non presentano radici ai nodi, questo

ha portato alla conclusione che nel mutante *zmccd8* lo sviluppo del sistema radiale nodale è ritardato (Guan et al. 2012).



Figura 1.13.: Nell'immagine viene rappresentata la differenza nelle dimensioni dell'apparato radicale tra piante mutanti *zmccd8* (SX) e piante di mais wild – type (DX). (Guan et al. 2012).

2. Scopo del lavoro

Le modalità con cui le piante gestiscono, anche a livello molecolare, le carenze nutrizionali, ed in particolare quelle relative all'azoto sono un aspetto fondamentale per poter migliorare l'efficienza d'uso di questo macroelemento (NUE), che viene largamente utilizzato nella coltivazione di molte specie, tra cui *Zea mays* L, una tra le colture più diffuse a livello mondiale, per via della sua elevata produttività.

In questo contesto gli strigolattoni sembrano esercitare un ruolo importante, regolando la risposta alla carenza azotata.

Questo studio consiste in un confronto tra un mutante *zmccd8* (mut), con via della biosintesi degli strigolattoni non funzionale; e la linea pura B73 di mais (WT). Lo scopo è stato quello di confrontare le diverse risposte messe in atto dai due tipi di piante sottoposte a due diversi regimi di fertilizzazione, analizzandone le risposte fenotipiche e fisiologiche.

Questo studio è stato condotto facendo germinare le piante in fuoriusuolo, e trasferendole poi in pieno campo dove sono state divise per genotipo e trattamento; tutte le piante hanno ricevuto una fertilizzazione di fondo con un concime minerale composto, mentre successivamente solo metà delle piante è stata trattata con urea, ottenendo così quattro tesi differenti: WT+, WT-, mut+ e mut-.

Poi nel corso della stagione sulle piante sono state condotte analisi fogliari tramite gli strumenti DUALEX SCIENTIFIC⁺™ (Forca A, Orsay Francia) che ha permesso di valutare i contenuti fogliari di clorofilla (Chl), flavonoidi (Flav), antociani (Anth), oltre che all'indice Nitrogen Balance Index (NBI, nonché il rapporto tra clorofilla e flavonoidi); ed il Porometr LI – COR LI – 600P, che ha permesso di valutare i parametri GSW (conduttanza stomatica al vapor d'acqua), E apparente (traspirazione fogliare) e PhiPSII (efficienza del fotosistema II), sono stati inoltre effettuati dei campionamenti fogliari, dai quali è stato estratto l'RNA per valutare la trascrizione del gene *CCD8*.

Le misurazioni sono state condotte su tutte le foglie di tutte le piante a: 31 DAT (giorni dopo il trapianto) (solo SPAD), 38 (DAT), 45 (DAT), 53 (DAT), 60 (DAT), 68 (DAT), 81 (DAT) e 89 (DAT), in seguito alle misurazioni strumentali sono anche state valutate le misure fenotipiche di altezza del fusto, circonferenza del fusto e lunghezza della terza foglia dall'alto. Infine, alla raccolta, sono stati valutati anche il peso delle cariossidi, peso

del tutolo, lunghezza della pannocchia ed il rapporto tra peso delle cariossidi e peso del tutolo.

Il confronto delle risposte osservate nei due genotipi, ha permesso di evidenziare il ruolo degli strigolattoni in generale ed in risposta all'azoto.

3. Materiali e metodi

3.1. Condizioni di crescita della coltura studiata

Per lo svolgimento di questo studio sono state utilizzate due linee di piante di *Zea mays* L.: una linea pura B73, definita wild type (WT) ed una linea mutante di B73 nella quale è stato inserito un trasposone che ha permesso di silenziare il gene *CCD8* e bloccare quindi la via della biosintesi degli strigolattoni (linea *zmccd8*, definita da ora in avanti mut).

Il giorno 5 aprile 2023 i semi delle due linee sono stati seminati in vasi riempiti di torba (un vasetto = un seme) per il fuori-suolo e lasciati all'interno di una serra, permettendo la germinazione e lo sviluppo delle plantule. Durante questa fase i vasi sono stati irrigati periodicamente.

Sono stati seminati 50 vasi con semi di piante WT e 50 vasi con semi di mais mut.



Figura 3.1.: Rappresentazione della fase di semina e successiva germinazione delle cariossidi di *Zea mays* L. wild type e mutante *zmccd8* nel giorno 5 aprile 2023.

In seguito alla germinazione sono state ottenute 47 piante di mais WT e 47 piante di mais mutante.

Il trapianto, definito 0 DAT (giorni dopo il trapianto), delle plantule in pieno campo è stato effettuato il giorno 21 aprile 2023 su un terreno precedentemente lavorato situato presso l'azienda agraria sperimentale Lucio Toniolo dell'Università di Padova (Legnaro, PD). Una settimana prima del trapianto, sul terreno era anche stata svolta una

concimazione di fondo con un concime minerale NPK del tipo 8-24-24, oltre che un trattamento con del geodisinfestante contro eventuali nematodi. Le piante sono state posizionate a 25 cm l'una dall'altra secondo due file distanziate di 1,5 m, in modo da separare il WT dal mutante; poi all'interno di ogni fila, le piante sono state ulteriormente divise come 24 piante in condizioni di fertilizzazione con urea (WT+ e mut+) e 23 piante in condizioni di carenza di azoto (WT- e mut-). Il trattamento con urea per le piante WT+ e mut+ è stato effettuato il giorno 19 giugno 2023, cioè 58 giorni dopo il trapianto.

In questo modo si sono ottenute quattro diverse tesi: WT+, mut+, WT- e mut-.

Per la corretta coltivazione delle piante sono poi state disposte le ali gocciolanti, una rete antigrandine ed inoltre la parcella è stata recintata per proteggere la coltura da animali selvatici.

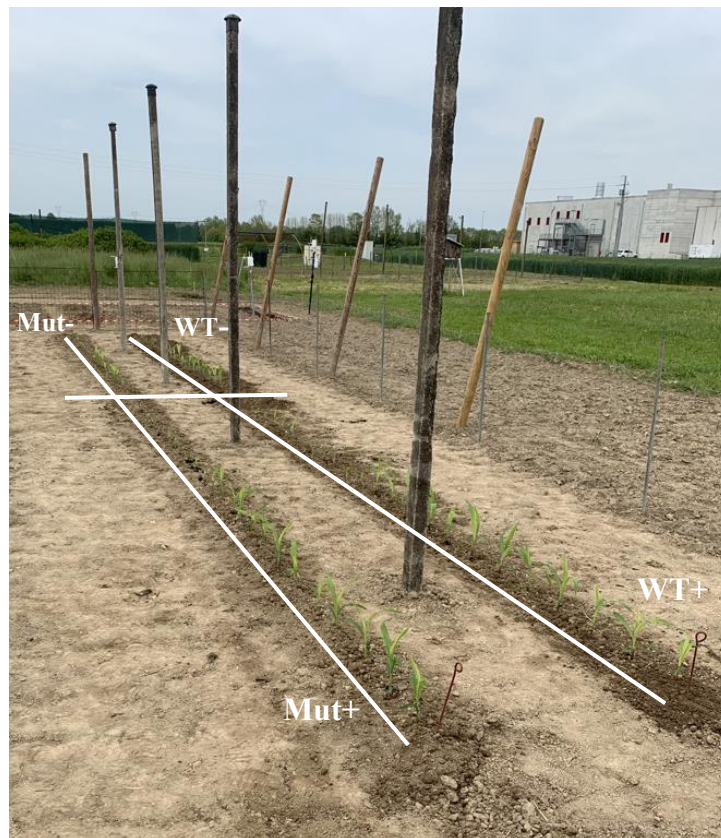


Figura 3.2.: Disposizione delle piante in pieno campo dopo la fase di trapianto nel giorno 21 aprile 2023, nella quale si possono notare le due file di piante, una per linea wild type (WT, a destra) ed una per la linea mutante *zmccd8* (Mut, a sinistra).

La coltivazione è poi continuata nel corso di tutta la stagione estiva 2023. Si sono inoltre resi necessari due trattamenti insetticidi contro la piralide del mais svolti nei giorni 22 e 30 giugno 2023, quindi rispettivamente 61 DAT e 69 DAT (**Tabella 3.1.**). Nel corso della

stagione il terreno ai lati delle file dove si trovano le piante è stato periodicamente lavorato in modo da ridurre il compattamento ed il rischio di problematiche relative a ristagni idrici.

DATA	DAT	ANALISI / LAVORAZIONE	CAMPIONAMENTI	CONSIDERAZIONI VISIVE
05/04/2023	/	Semina delle piante in serra		
21/04/2023	0	TRAPIANTO DEL MAIS IN CAMPO		
28/04/2023	7	Prime misure fenotipiche		Piante WT più alte e con fusto rossastro; mut meno sviluppato e con foglie clorotiche
22/05/2023	31	Analisi con SPAD + misure fenotipiche		
30/05/2023	38	Analisi con SPAD e Porometro + misure fenotipiche		Piante mut più rossastre rispetto a WT
06/06/2023	45	Analisi con SPAD e Porometro + misure fenotipiche		
14/06/2023	53	Analisi con SPAD e Porometro + misure fenotipiche		Grande differenza tra WT e mut, che appare clorotico e con evidenti rami laterali
19/06/2023	58	TRATTAMENTO CON UREA PER PIANTE N+		
21/06/2023	60	Analisi con SPAD e Porometro + misure fenotipiche		Presenza di danni da Piralide su piante
22/06/2023	61	1° Trattamento contro Piralide		
29/06/2023	68	Analisi con SPAD e Porometro + misure fenotipiche	1° campionamento per prove molecolari (10 giorni con urea)	Sviluppo dei primi pennacchi, coperti poi con sacchetti di carta
30/06/2023	69	2° Trattamento contro Piralide		
12/07/2023	81	Analisi con SPAD e Porometro + misure fenotipiche	2° campionamento per prove molecolari (23 giorni con urea)	Impollinazione artificiale delle piante quasi terminata
21/07/2023	89	Analisi con SPAD e Porometro + misure fenotipiche	3° campionamento per prove molecolari (32 giorni con urea)	Impollinazioni terminate, tranne che per una pianta mut+ ed una mut-. Alcune piante sono molto rossastre sia in WT che mut. Inizio di fase senescente in generale
02/08/2023	101	Analisi con SPAD e Porometro su foglie e bandiera	4° campionamento per prove molecolari (44 giorni con urea)	Piante in piena fase di senescenza

Tabella 3.1.: Tabella di elenco delle principali lavorazioni e misurazioni effettuate sulle piante oggetto di studio in varie fasi della stagione. DAT: giorni dopo il trapianto

3.2. Analisi sulle piante in campo e strumenti di lavoro

Le piante oggetto di studio allevate in pieno campo sono state analizzate da un punto di vista fenotipico, svolgendo delle misurazioni metriche di altezza del fusto, circonferenza del fusto e lunghezza della terza foglia, oltre che da un punto di vista fisiologico per

valutare lo stato dalle varie piante in relazione al genotipo (WT o mut) ed anche in base al trattamento azotato (+urea o -N).

Le analisi fisiologiche sono state effettuate mediante gli strumenti DUALEX SCIENTIFIC⁺™ (Force A, Orsay, Francia) ed il LI-COR LI-600P (Porometro) (**Figura 3.3.**); gli strumenti sono stati utilizzati su tutte le foglie di tutte le piante a diversi time points (**Tabella 3.1.**), avendo cura di seguire sempre lo stesso ordine per singola pianta e tra tutte le piante, in modo da poter seguire l'andamento dei vari parametri, foglia per foglia, nel corso della stagione.

Tramite lo strumento DUALEX SCIENTIFIC⁺™ è stato possibile misurare il contenuto di clorofilla della foglia (Chl), un parametro direttamente connesso allo stato nutrizionale azotato della pianta, il contenuto di flavonoidi (Flav) e antociani (Anth), oltre che al rapporto NBI (Nitrogen Balance Index), un'indice ottenuto dal rapporto tra clorofilla e flavonoidi.

Per quanto riguarda invece lo strumento LI-COR LI-600P, i parametri considerati sono stati la conduttanza stomatica del vapor d'acqua (Gsw), il tasso di traspirazione fogliare (E apparente), l'efficienza del fotosistema II (PhiPSII), la temperatura della foglia e l'intensità della radiazione solare al momento della misura; gli ultimi due parametri non hanno rilevanza per quanto riguarda lo stato fisiologico della pianta, ma sono comunque importanti come controllo, riferimento e per la corretta interpretazione dei parametri precedenti.



Figura 3.3.: Immagini degli strumenti DUALEX SCIENTIFIC⁺™ (SX) e LI-COR LI-600P (DX)

La fase di misurazione prendeva avvio sempre nello stesso momento della giornata (mattino), e l'ordine di esecuzione delle misure sulle piante seguiva sempre lo stesso schema, e lo stesso ordine nella pianta, iniziando prima dalle foglie basali e spostandosi verso quelle apicali. Si è cominciato analizzando le prime tre piante della tesi WT+, poi

le prime tre piante della tesi mut+, proseguendo poi alle altre tesi, ed a tutte le altre piante; questo è stato necessario per ridurre l'effetto di variabilità tra le tesi dato dalle diverse condizioni ambientali tra le prime misurazione e le ultime.

Nel corso della stagione estiva 2023 le piante di *Zea mays* L. oggetto di studio sono state tutte autofecondate, in modo da evitare una ricombinazione tra linea pura B73 ed il mutante *zmccd8*. Si è proceduto prima coprendo tutti i pennacchi con un sacchetto di carta, con lo scopo di evitare la dispersione del polline e raccogliarlo all'interno del sacchetto stesso. Una volta che i vari stili (detti sete) dell'infiorescenza femminile a pannocchia sono diventati pronti per accogliere il polline, i sacchetti sono stati staccati dal pennacchio e trasferiti sulla spiga della stessa pianta.

Al termine della stagione è stata effettuata poi la raccolta delle varie pannocchie il giorno 7 settembre 2023, avendo cura di dividere le varie spighe per singola tesi.

Come ultima analisi di questo studio sono anche state prese in considerazione le varie produzioni delle quattro diverse tesi, è stata quindi svolta una raccolta manuale delle pannocchie (**Figura 3.4.**); le quali sono poi state sottoposte ad un conteggio una successiva pesatura di cariossidi e tutolo e misurazione della lunghezza con calibro, calcolando anche il rapporto tra il peso delle cariossidi e il peso del tutolo.

Ogni analisi effettuata è poi stata valutata tramite analisi statistica con ANOVA e test di confronto multiplo LSD (Least Significant Difference) utilizzando R-Studio (Posit team, 2023).



Figura 3.4.: Nell'immagine vengono raffigurate una pannocchia in fase di raccolta di mais WT+ (SX), tutte le pannocchie raccolte di *zmccd8* + (A), *zmccd8*- (B), WT+ (C) e WT- (D).

3.3. Analisi dell'espressione di *ZmCCD8*

Attraverso le analisi qPCR sui quattro diversi campioni fogliari raccolti in quattro diversi time points (**Tabella 3.1.**), è stato possibile quantificare l'espressione del gene *CCD8*, fondamentale nella biosintesi degli strigolattoni.

Per prima cosa si sono pesati 100 mg di campione per ognuno dei time points, sottoponendoli poi a pestellatura svolta con mortaio in modo da liberare l'RNA dalle cellule dei campioni; in questa fase è necessario l'impiego di azoto liquido per mantenere la catena del freddo ed evitare la degradazione dei filamenti. L'RNA è stato poi estratto e quantificato, verificandone anche l'integrità e la purezza.

L'RNA è poi stato sottoposto ad una elettroforesi su gel di agarosio.

Partendo poi dal template dell'elettroforesi, attraverso una retro – trascrizione, sono stati costruiti i filamenti di DNA complementari (cDNA) all'RNA precedentemente estratto, e utilizzati poi per la quantificazione dell'espressione genica attraverso la tecnica della RT-PCR quantitativa.

La procedura della real – time PCR prevede la preparazione di una soluzione definita “mix” contenente i primers *forward* 5' → 3' e *reverse* 3' → 5' fiancheggiando il segmento da amplificare (il gene *CCD8*) per poterne valutare l'espressione. La piastra real – time si compone di 96 pozzetti, dove in ognuno è stato messo il cDNA (2.5 µL) del campione per tutte le tesi e la soluzione “mix” (7.5 µL). Per ogni campione sono state analizzate 3 repliche biologiche.

L'espressione relativa al gene target *CCD8* è stata determinata secondo il metodo Livak e Schmittgen (2001),

La lista dei geni analizzati e delle sequenze dei primers (*forward* e *reverse*) utilizzate sono riportate nella **Tabella 3.2.**

Gene ID	Mais GDB Accessione ID	Forward (5' → 3')	Reverse (3' → 5')
<i>CCD8</i>	Zm00001eb153000	AGAAAGGTGTCTCTGCTGCT	CTATGGGCTCGCTCACATGA
<i>MPE</i>	Zm00001eb257640	TGTACTCGGCAATGCTCTTG	TTTGATGCTCCAGGCTTACC

Tabella 3.2.: Lista dei primers impiegati per la qRT - PCR

4. Risultati

4.1. Analisi fogliari

4.1.1. DUALEX SCIENTIFIC^{+TM}

Tramite lo strumento DUALEX SCIENTIFIC^{+TM} sono state effettuate le analisi dei pigmenti fogliari, in particolare sono stati presi in esame il contenuto di clorofilla (Chl), di flavonoidi (Flav) e di antociani (Anth), oltre all'indice NBI (Nitrogen Balance Index). Le analisi sono state effettuate in diversi giorni in seguito al trapianto delle piante in campo (DAT): 31, 38, 45, 53, 60, 68, 81 e 89 DAT, come mostrato nelle figure 4.. Si mostra tramite una linea tratteggiata il momento in cui è stata effettuata la fertilizzazione con urea sulle piante N+ (58 DAT). Le misurazioni sono state effettuate foglia per foglia partendo dalla parte basale della pianta (quindi la foglia 1 era la più vicina al terreno, foglia 2 subito sopra, ecc.), poi i dati sono stati elaborati da un punto di vista statistico, raggruppando le varie foglie delle singole piante in classi omogenee: (1-2; 3-4-5; 6-7-8; 9-10-11 e 12-13).

CLOROFILLA (unità DUALEX)

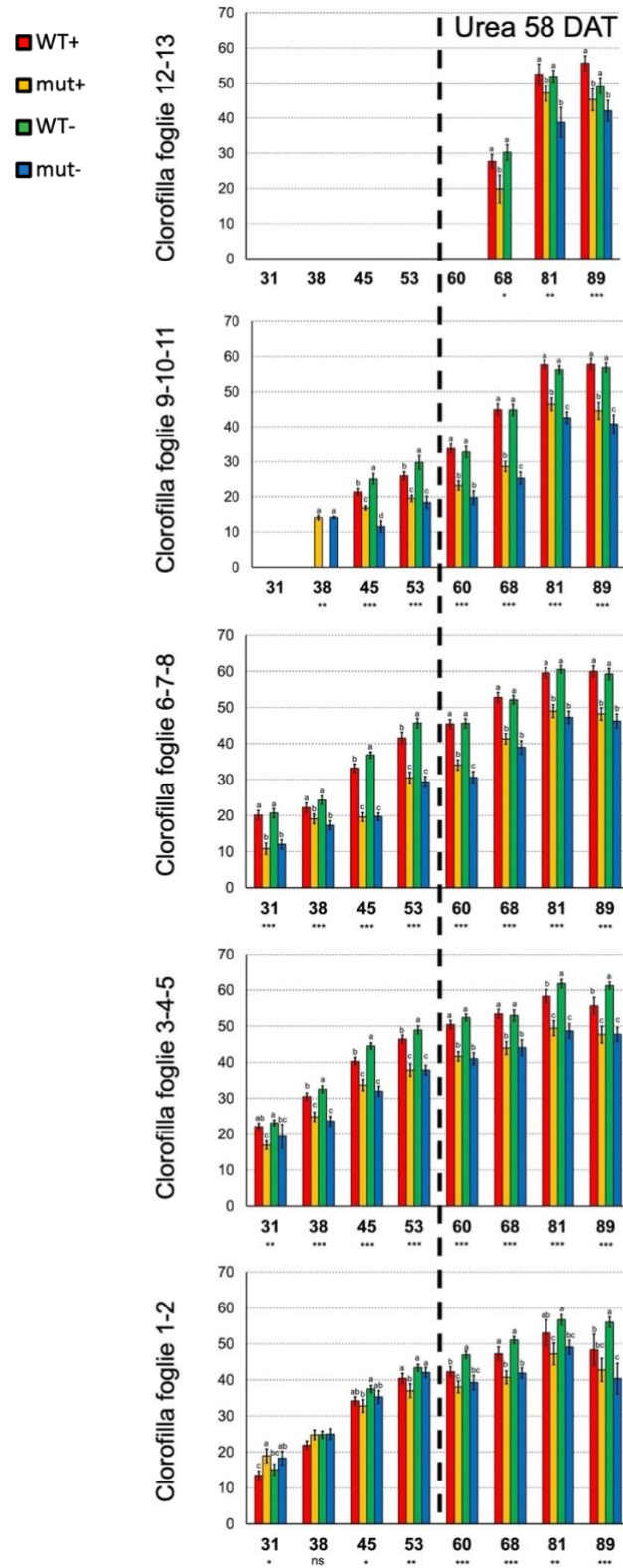


Figura 4.1.: Contenuto medio di clorofilla (espresso come unità DUALEX) in ogni gruppo di foglie (asse Y), rispetto al numero di giorni dopo il trapianto (DAT, asse X). L'analisi statistica ANOVA ($p < 0.05$) ha permesso di identificare i DAT al cui interno i trattamenti risultavano statisticamente diversi: $p < 0.001$ '***'; $p < 0.01$ '**'; $p < 0.05$ '*'; $p > 0.05$ 'ns' non significativo. Lettere uguali sopra le barre indicano trattamenti statisticamente uguali.

Nella figura 4.1. sono mostrati i livelli di clorofilla analizzati e separati per classi omogenee di foglie all'interno della stessa pianta.

Prendendo in considerazione la prima classe (foglie 1-2) si osserva un andamento crescente del contenuto di clorofilla per tutte e quattro le tesi, a partire dal giorno 31 DAT fino all'81 DAT. Al time point successivo (89 DAT) è stata riscontrata una diminuzione del contenuto di Chl per tutte le tesi, ad eccezione di WT- nella quale è rimasta costante. È possibile poi notare un differente andamento della concentrazione di clorofilla a partire da 31 DAT, dove i valori maggiori sono stati riscontrati nelle tesi mut, rispetto a 45 DAT, dove il contenuto di Chl è risultato significativamente maggiore per le tesi WT, e così è stato per tutto il resto del periodo di coltivazione. Le differenze nel contenuto di clorofilla tra le tesi WT e mut sono diventate altamente evidenti e significative a partire dai 60 DAT. Considerando la variabile del trattamento con urea, dai dati emerge che per WT, la tesi N- manifesta un maggiore contenuto di Chl per questa classe di foglie da 60 a 89 DAT; lo stesso vale anche per mut tranne che nel time point 89 DAT dove la tesi mut+ presenta un contenuto maggiore di Chl rispetto a mut-.

Considerando la seconda classe fogliare (foglie 3-4-5) si osserva un costante incremento della Chl da 31 DAT fino a 81 DAT, mentre a 89 DAT i valori erano uguali a quelli in 81 DAT. Nel caso di questo gruppo di foglie sono state riscontrate differenze significative tra le tesi +urea e N- nei time points 38, 45, 53 e 81 DAT per WT, nei quali si osserva che le foglie delle piante WT contengono più clorofilla rispetto al mutante. Analizzando invece il mutante, il contenuto di Chl tra le tesi +urea e -N è risultato significativamente uguale in ogni time-point.

Anche nella terza classe di foglie (foglie 6-7-8) la tendenza osservata è quella di un costante incremento della Chl da 31 a 81 DAT, con un mantenimento stabile della concentrazione a 89 DAT. In questo caso però si sono osservate delle maggiori differenze tra i due genotipi di piante. Considerando il WT, in prossimità dei time points 45 e 53 DAT si sono riscontrate delle differenze significative tra le tesi +urea e -N, mentre il mutante ha mostrato differenze significative in risposta al trattamento azotato solo a 60 DAT.

Nella quarta classe di foglie (9-10-11) già a partire da 45 DAT, momento in cui erano presenti queste foglie per tutte le tesi, è stata riscontrata la solita tendenza di incremento della Chl fino a 81 DAT; ed anche in questo caso sono le tesi WT ad avere il maggiore

contenuto di Chl rispetto a mut. Si segnala anche che a partire da 60 DAT, quindi successivamente al trattamento con urea per le tesi +urea, si sono osservate delle differenze significative nel mutante, cosa che non è invece stata riscontrata nel WT.

Analizzando la quinta classe fogliare (12-13) si osserva un elevato aumento nel contenuto di Chl tra il time point 68 e 81 DAT. Sia per 81 che per 89 DAT il WT ha manifestato un contenuto di Chl statisticamente maggiore rispetto ad entrambe le tesi mut, senza però un effetto significativo dovuto al trattamento con urea.

FLAVONOIDI (unità DUALEX)

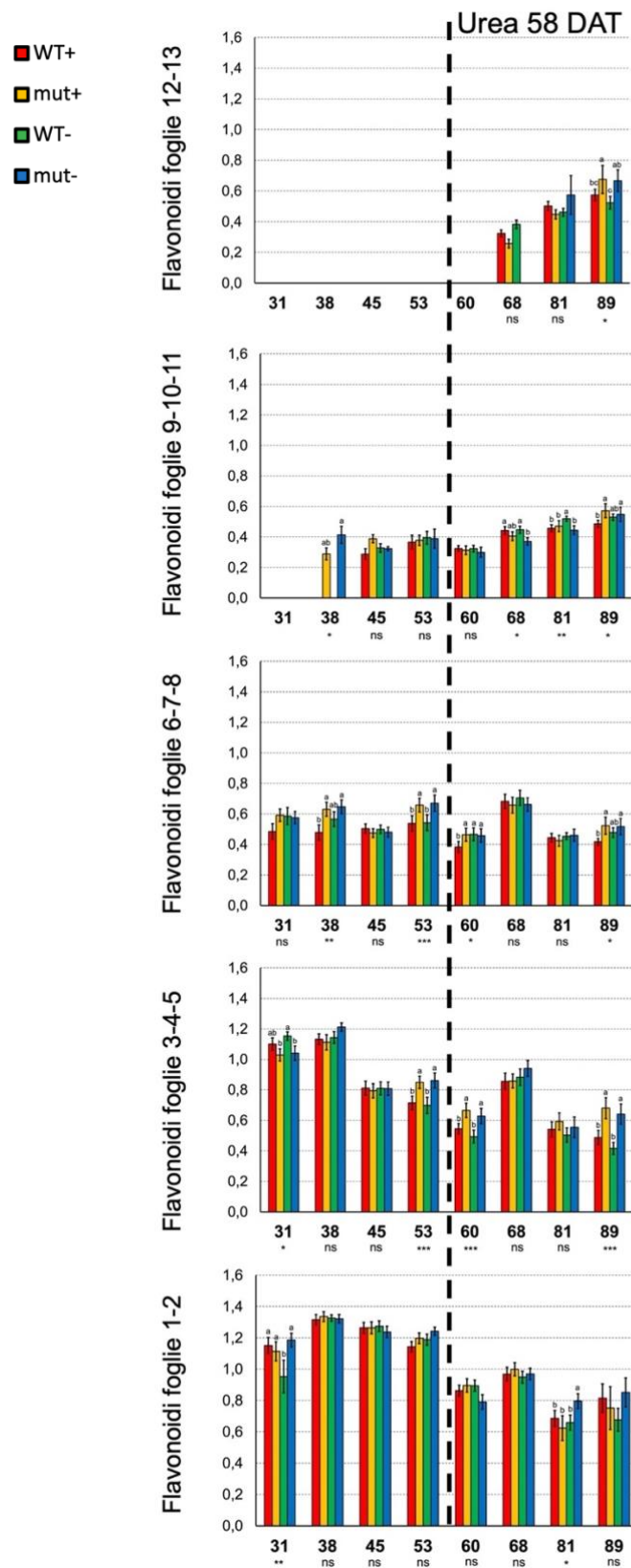


Figura 4.2.: Contenuto medio di flavonoidi (espresso come unità DUALEX) in ogni gruppo di foglie (asse Y), rispetto al numero di giorni dopo il trapianto (DAT, asse X). L'analisi statistica ANOVA ($p < 0.05$) ha permesso di identificare i DAT al cui interno i trattamenti risultavano statisticamente diversi: $p < 0.001$ '***'; $p < 0.01$ '**'; $p < 0.05$ '*'; $p > 0.05$ 'ns' non significativo. Lettere uguali sopra le barre indicano trattamenti statisticamente uguali.

Nella figura 4.2. sono raffigurati i valori di flavonoidi (Flav) misurati come unità DUALEX, separati per classi omogenee di foglie all'interno della stessa pianta.

Prendendo in esame la prima classe (foglie 1-2) è possibile notare una tendente diminuzione dei valori di flavonoidi tra il time point 31 DAT e 89 DAT. Sono poi state riscontrate differenze significative solo a livello dei time points 31 e 81 DAT, dove la tesi mut- è quella che ha manifestato il contenuto maggiore di questo pigmento.

Osservando poi la seconda classe di foglie (3-4-5) si può notare anche in questo caso una progressiva diminuzione dei flavonoidi, tranne nel caso del time point 68 DAT dove è stata riscontrata una crescita non significativa di questo polifenolo rispetto al time point precedente. Nei time points 53, 60 e 89 DAT sono state riscontrate delle differenze significative tra le i due genotipi, in cui le piante mut presentano un maggiore contenuto di flavonoidi, ma non tra le tesi +urea e -N; a differenza del time point 31 DAT dove sono le piante WT ad avere il maggiore contenuto di questo fenolo.

Per quanto riguarda la terza classe di foglie (6-7-8) è possibile osservare che i valori hanno mantenuto una tendenza costante tra l'inizio e la fine della stagione, con delle contenute oscillazioni tra un time point e l'altro. Anche in questo caso, le differenze significative riscontrate a 38, 53 e 89 DAT mostrano i livelli di flavonoidi maggiori nelle piante di mutante; mentre invece a 60 DAT la tesi WT- ha presentato livelli di flavonoidi simili alle piante delle tesi mut.

Nel gruppo di foglie (9-10-11) si è invece osservata una tendenza di aumento dei flavonoidi, anche se lieve. Le differenze diventano significate a partire da 68 DAT, quando si osserva che le tesi WT+ e WT- hanno un contenuto rispettivamente maggiore di flavonoidi. Al contrario, nel time point 89 DAT le tesi mut presentano valori statisticamente maggiori di flavonoidi. Non si osserva un effetto dovuto alla fertilizzazione azotata.

Nel caso del quinto gruppo fogliare (12-13) l'incremento di flavonoidi osservato è maggiore rispetto alle altre classi. Solo nel time point 89 DAT sono state riscontrate differenze significative tra le tesi, osservando che mut+ e mut- contengono più flavonoidi rispetto alla linea pura WT B73.

ANTOCIANI (unità DUALEX)

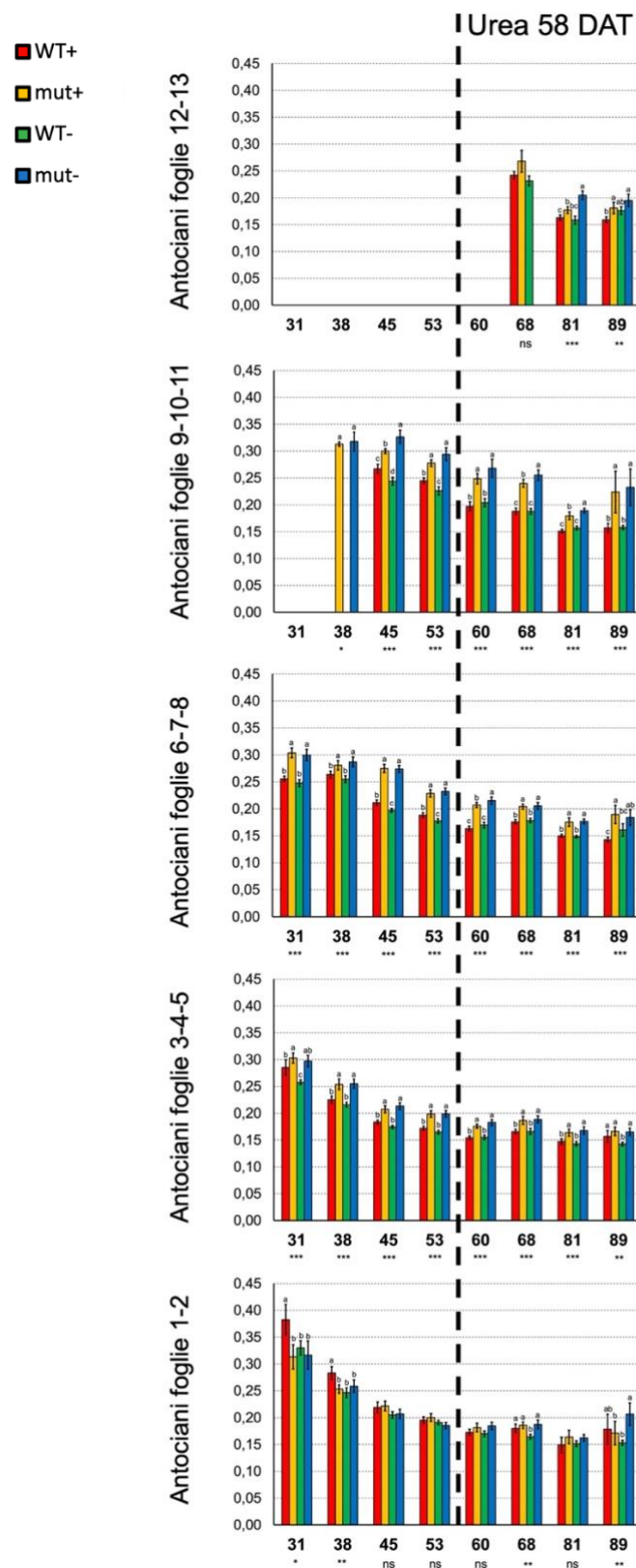


Figura 4.3.: Contenuto medio di antociani (espresso come unità DUALEX) in ogni gruppo di foglie (asse Y), rispetto al numero di giorni dopo il trapianto (DAT, asse X). L'analisi statistica ANOVA ($p < 0.05$) ha permesso di identificare i DAT al cui interno i trattamenti risultavano statisticamente diversi: $p < 0.001$ '***'; $p < 0.01$ '**'; $p < 0.05$ '*'; $p > 0.05$ 'ns' non significativo. Lettere uguali sopra le barre indicano trattamenti statisticamente uguali.

Nella figura 4.3. sono rappresentate le concentrazioni di antociani (Anth) misurate, separate per classi omogenee di foglie all'interno della stessa pianta.

Considerando il primo gruppo fogliare (1-2) si può notare una diminuzione del contenuto di questo pigmento da 31 fino a 53 DAT, da qui in poi i valori risultano essere più stabili. Tra le tesi sono state riscontrate differenze significative a 31, 38, 68 e 89 DAT. Nei time points 31 e 38 DAT la tesi WT ha mostrato il maggiore contenuto di antociani; invece al time point 89 DAT il valore maggiore di antocianine è stato riscontrato in mut-.

Nel secondo gruppo (foglie 3-4-5) sono state misurate differenze significative tra i due genotipi in tutti i time points, nei quali le tesi mut hanno mostrato livelli di antocianine quasi sempre maggiori a WT. Anche nel caso di questa classe fogliare è stata osservata una diminuzione generale del pigmento oggetto di analisi, soprattutto tra 31 e 53 DAT. Non si sono osservati effetti dovuti alla fertilizzazione azotata.

Anche il terzo gruppo (foglie 6-7-8) è caratterizzato da una costante riduzione del contenuto di antocianine dal primo all'ultimo time point, ma in questo caso le differenze tra i due genotipi sono state significative per tutti i time points, e si sono riscontrate differenze tra le tesi +urea e -N solo nel time point 89 DAT.

Nella quarta classe (foglie 9-10-11) si osserva un calo del livello di antociani da 38 a 81 DAT. Contrariamente alle classi percenti, per le tesi mut si osserva un incremento di questo pigmento, mentre per quanto riguarda il WT il livello di antociani è rimasto costante tra 81 e 89 DAT. In tutti i time points si possono osservare differenze sempre significative tra i genotipi, con valori più alti sempre nella tesi mut-. Non si è osservato effetto dovuto alla fertilizzazione azotata.

Per quanto concerne la quinta classe fogliare (12-13), anche in questo caso si osserva una riduzione degli antociani tra 68 e 81 DAT, poi i valori rimangono pressoché costanti con valori maggiori nei mutanti.

NBI (Nitrogen Balance Index) (unità DUALEX)

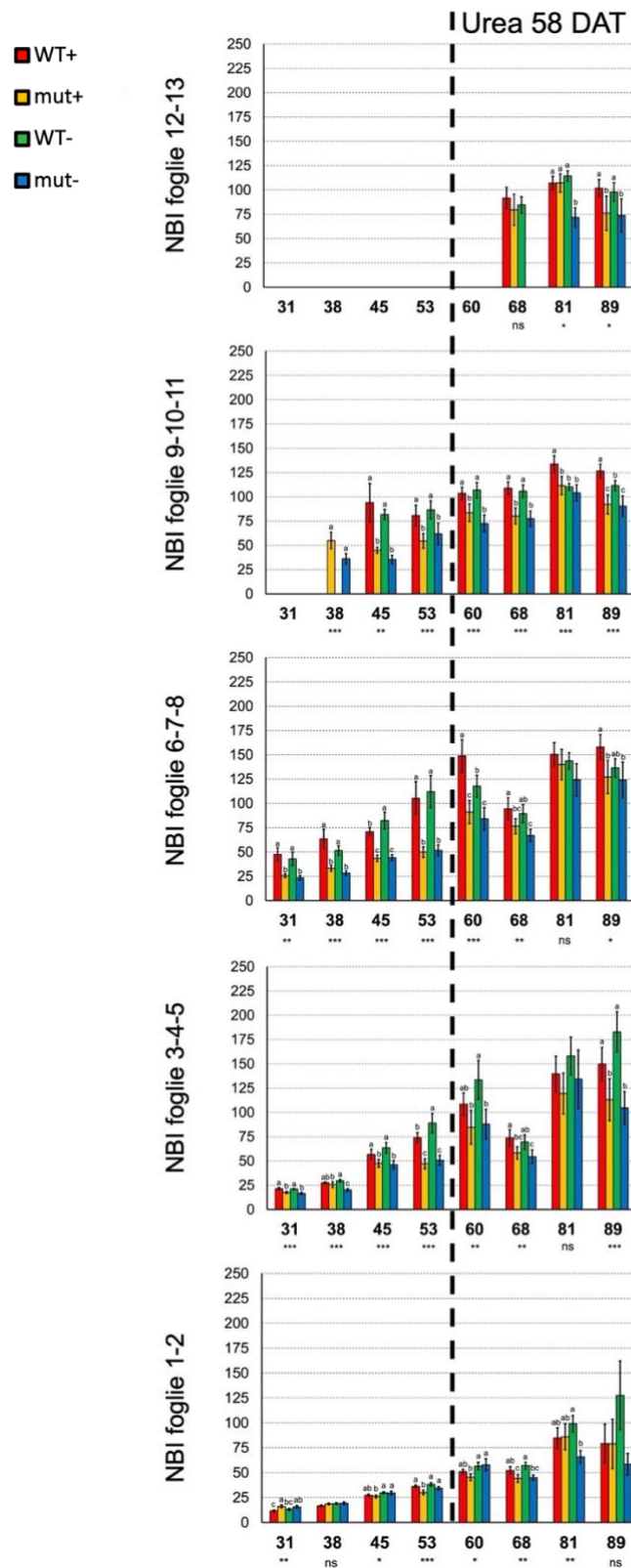


Figura 4.4.: Andamento medio del NBI (Nitrogen Balance Index, espresso come unità DUALEX) in ogni gruppo di foglie (asse Y), rispetto al numero di giorni dopo il trapianto (DAT, asse X). L'analisi statistica ANOVA ($p < 0.05$) ha permesso di identificare i DAT al cui interno i trattamenti risultavano statisticamente diversi: $p < 0.001$ '***'; $p < 0.01$ '**'; $p < 0.05$ '*'; $p > 0.05$ 'ns' non significativo. Lettere uguali sopra le barre indicano trattamenti statisticamente uguali.

Nella figura 4.4. viene rappresentato l'andamento dell'indice NBI (Nitrogen Balance Index), dato dal rapporto tra il contenuto di clorofilla ed il contenuto di flavonoidi.

Nel caso del primo gruppo (foglie 1-2) si osserva un progressivo aumento dell'indice NBI tra 31 e 89 DAT, anche se con delle fasi di stasi tra 60 e 68 DAT e 81 e 89 DAT. Le maggiori e più significative differenze che sono state riscontrate sono relative a 53 e 81 DAT, dove la tesi WT- ha mostrato i valori maggiori di NBI.

Considerando la seconda classe di foglie (3-4-5), anche in questo caso si osserva una tendenza all'incremento dell'indice NBI, tranne che tra il time point 60 e 68 DAT, dove è stato registrato un calo sostanziale. In tutti i time points si sono osservate delle differenze significative tra le tesi, tranne che nell'81 DAT. Anche per questa classe fogliare le tesi WT sono quelle che hanno presentato i valori maggiori di NBI, in particolare WT- è stato quasi sempre il più elevato.

Nella terza classe (6-7-8) si osserva un andamento molto simile a quello della classe precedente, con un calo dell'NBI tra 60 e 68 DAT, ma rispetto a prima le differenze tra le varie tesi, ed in particolare tra i due genotipi, sono ancora maggiori, infatti le differenze tra WT e mut sono significative tranne che per il time point 81 DAT. Considerando il WT si riscontrano differenze significative tra tesi +urea e -N a 45, 60, 68 e 89 DAT, dove WT+ presenta indici sempre maggiori rispetto a WT-. Mentre considerando le tesi mut, queste risultano essere quasi sempre paragonabili.

Prendendo in esame il quarto gruppo di foglie (9-10-11) si osserva anche in questo caso una crescita progressiva di NBI tra i vari time points, nonostante una maggiore costanza dei dati. Non si riscontra il calo dell'indice a 68 DAT, dove i dati sono solo rimasti costanti rispetto al time point precedente. In tutti i time points si riscontrano differenze significative tra le tesi, dove il genotipo WT presenta degli indici maggiori, tranne che ad 81 DAT, dove spicca solo WT+.

Nel caso della classe numero 5 (12-13) si osservano differenze statisticamente significative nei time point 81 e 89 DAT, dove solo in prossimità di 89 DAT si nota che le tesi WT sono maggiori delle tesi mut; per quanto riguarda il time point 81 DAT, le tesi WT e mut+ risultano simili e significativamente maggiori rispetto a mut-.

4.1.2. Porometro

Attraverso le analisi con lo strumento LI-COR LI-600P sono state valutate la conduttanza stomatica al vapor d'acqua (G_{sw}), il tasso di traspirazione fogliare (E apparente) e l'efficienza del fotosistema II (Φ_{PSII}) nelle foglie. Anche nel caso di questo strumento le misurazioni sono state condotte con lo stesso metodo adottato per il DUALEX SCIENTIFICTM, cominciando quindi dalla parte basale della pianta e svolgendo la misurazione su tutte le foglie fino alla parte apicale, seguendo sempre il medesimo schema di analisi in modo da ridurre la variabilità delle misurazioni tra le tesi date della variazione delle condizioni ambientali tra le prime e le ultime misurazioni.

GSW ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

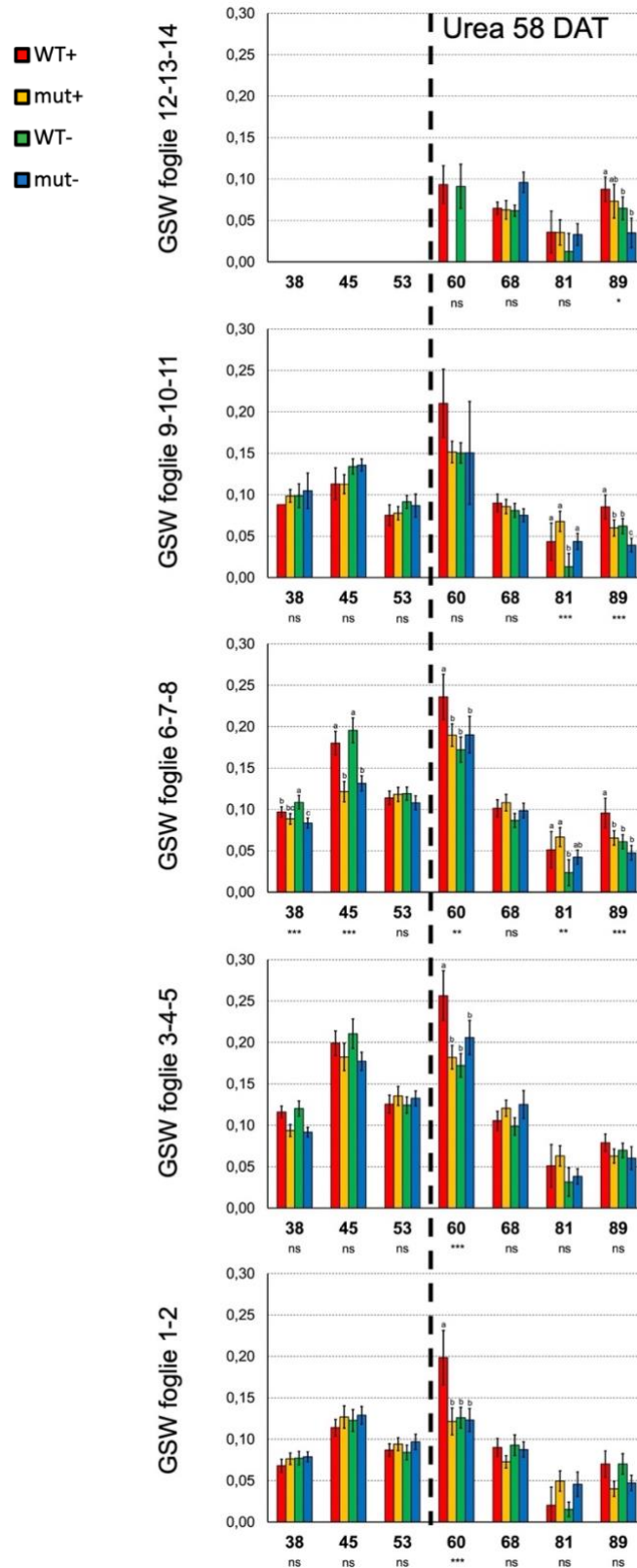


Figura 4.5.: Andamento medio della conduttanza stomatica al vapor d'acqua (GSW, espresso come $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in ogni gruppo di foglie (asse Y), rispetto al numero di giorni dopo il trapianto (DAT, asse X). L'analisi statistica ANOVA ($p < 0.05$) ha permesso di identificare i DAT al cui interno i trattamenti risultavano statisticamente diversi: $p < 0.001$ '***'; $p < 0.01$ '**'; $p < 0.05$ '*'; $p > 0.05$ 'ns' non significativo. Lettere uguali sopra le barre indicano trattamenti statisticamente uguali.

In figura 4.5. viene rappresentato l'andamento della GSW, ovvero della conduttanza stomatica al vapore acqueo delle foglie.

Prendendo in considerazione la classe di foglie più basali (1-2) non viene registrato un andamento regolare della GSW nel corso della stagione. Solo nel time point 60 DAT si osserva una differenza significativa, dove la tesi WT+ presenta una GSW molto maggiore rispetto alle altre, che sono invece simili. Negli altri time points invece le differenze tra le varie tesi sono minime e non significative.

Nel caso del secondo gruppo (foglie 3-4-5) è possibile osservare, come nel precedente, un andamento della GSW non costante, con un picco in prossimità del time point 60 DAT, il quale è anche l'unico a presentare differenze significative tra le tesi, dove ancora una volta il WT+ è il valore registrato maggiore. In tutti gli altri time points non si osservano delle differenze significative tra le tesi.

Analizzando invece la terza classe (foglie 6-7-8), si nota un andamento oscillatorio della GSW da 38 a 60 DAT, successivamente i valori di questo parametro tendono a diminuire, con un leggero aumento a 89 DAT. Anche in questo caso in prossimità dei 60 DAT si verifica un picco della GSW, mentre le differenze sono significative in tutti i time points tranne che per 53 e 81 DAT. In generale la GSW maggiore viene raggiunta dal genotipo WT, tranne a 81 DAT dove il livello più alto viene raggiunto da mut+ e dove si osservano differenze significative tra WT+ e WT-.

Per quanto concerne il quarto gruppo fogliare (9-10-11) si osserva come nelle classi precedenti un picco di GSW in prossimità di 60 DAT, mentre gli altri time points hanno dei valori paragonabili tra loro, tranne che per 81 e 89 DAT che risultano avere delle GSW minori, inoltre solo in questi time points sono state rilevate delle differenze significative tra le tesi: ad 81 DAT la tesi WT- è significativamente minore rispetto alle altre, mentre ad 89 DAT la GSW più alta è quella di WT+. Si osserva un effetto in risposta alla fertilizzazione azotata solo per WT a 81 DAT, e per entrambi i genotipi a 89 DAT.

Nel caso della quinta classe (foglie 12-13-14) si osservano differenze significative solo al time point 89 DAT, dove la GSW maggiore è quella di WT+, e quella minore è relativa a mut-. Tra 68 e 81 DAT si osserva un calo della GSW. Si osserva un effetto in risposta alla fertilizzazione azotata solo per WT a 89 DAT.

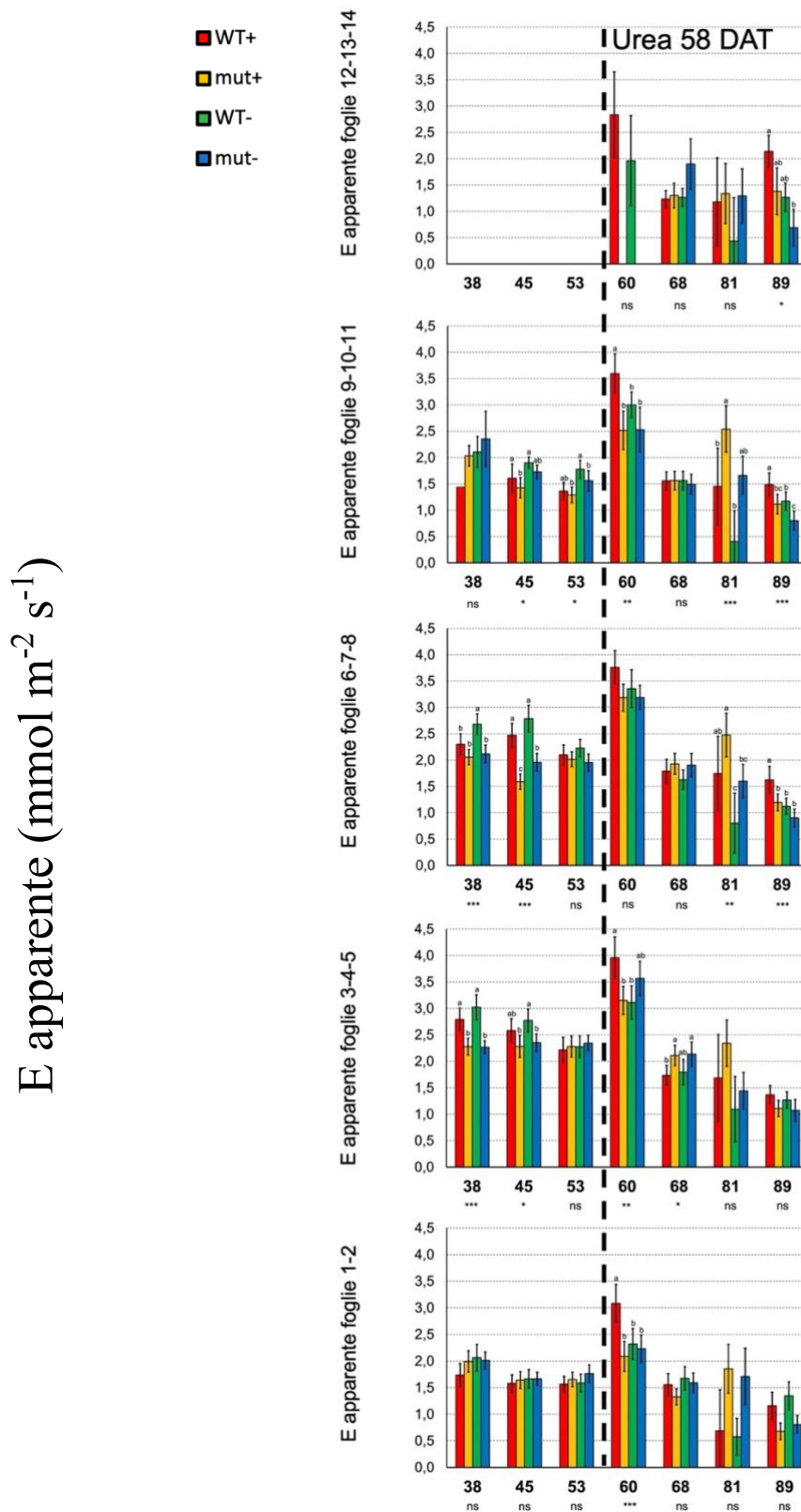


Figura 4.6.: Andamento medio del tasso di traspirazione fogliare (E apparente, espresso come $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in ogni gruppo di foglie (asse Y), rispetto al numero di giorni dopo il trapianto (DAT, asse X). L'analisi statistica ANOVA ($p < 0.05$) ha permesso di identificare i DAT al cui interno i trattamenti risultavano statisticamente diversi: $p < 0.001$ '***'; $p < 0.01$ '**'; $p < 0.05$ '*'; $p > 0.05$ 'ns' non significativo. Lettere uguali sopra le barre indicano trattamenti statisticamente uguali.

In figura 4.6. si rappresenta l'andamento del tasso di traspirazione fogliare (E apparente) tra le diverse cinque classi fogliari.

Per quanto riguarda la prima classe fogliare (1-2) l'andamento della E apparente risulta simile a quello della GSW, ma con una minore oscillazione dei dati tra un time point e l'altro. Anche in questo caso si osserva un picco di questo parametro a 60 DAT, dove si hanno anche differenze statisticamente significative tra le tesi, in particolare si osservano differenze significative tra WT+ e WT-, con il valore maggiore registrato in WT+ (come nella GSW).

Nel caso del secondo gruppo di foglie (3-4-5) si nota un andamento costante della E apparente nei time points 38, 45 e 53 DAT, quindi un importante aumento a 60 DAT, infine una tendenza alla diminuzione di questo parametro da 68 a 89 DAT. Nel caso dei time points 38 e 45 DAT si hanno differenze significative tra i genotipi, dove il genotipo WT presenta valori maggiori rispetto a mut. Nel time point 60 DAT si osserva un picco di E apparente in WT+, mentre il valore per WT- resta statisticamente inferiore e ai livelli del mutante che risulta non condizionato dal trattamento azotato. A 68 DAT le tesi mut presentano valori maggiori di E apparente rispetto a WT, senza però una differenza significativa tra di loro.

Considerando la terza classe (foglie 6-7-8) si osserva un andamento simile alla classe numero due, anche se con dei valori più bassi. In prossimità di 60 DAT viene raggiunto il picco più alto dei valori per questo parametro, anche se senza differenze significative tra le tesi. Tra i time points 81 e 89 DAT si osserva un calo della E apparente. Nei time points 38 e 45 DAT si notano differenze significative tra le tesi, dove in entrambi i momenti la tesi WT- ha il valore maggiore. Nel time point 81 DAT si osserva un picco nella tesi mut+, mentre WT- ha il valore minore, e differenze significative dovute alla fertilizzazione sia per WT che mutante. A 89 DAT infine solo la tesi WT+ è significativamente maggiore rispetto a tutte le altre.

Prendendo in esame il quarto gruppo fogliare (9-10-11) si nota che anche in questo caso a 60 DAT si verifica un picco di E apparente, in particolare per WT+, mentre il valore per WT- resta statisticamente inferiore ai livelli del mutante che risulta non condizionato dal trattamento azotato. Negli altri time points si osservano differenze significative tra le tesi, tranne che a livello dei 38 e 68 DAT. In prossimità del time point 81 DAT si hanno

delle grandi differenze di E apparente tra le tesi, con un picco per mut+, mentre il WT non ha mostrato risultati significativamente differenti tra i due trattamenti con azoto.

Analizzando il quinto gruppo di foglie (12-13-14) si osserva un andamento in media costante dei dati, con differenze significative solo a livello del time point 89 DAT, mostrando un picco per WT+, tesi che raggiunge il valore maggiore di E apparente a 60 DAT, come nel caso di tutti gli altri gruppi.

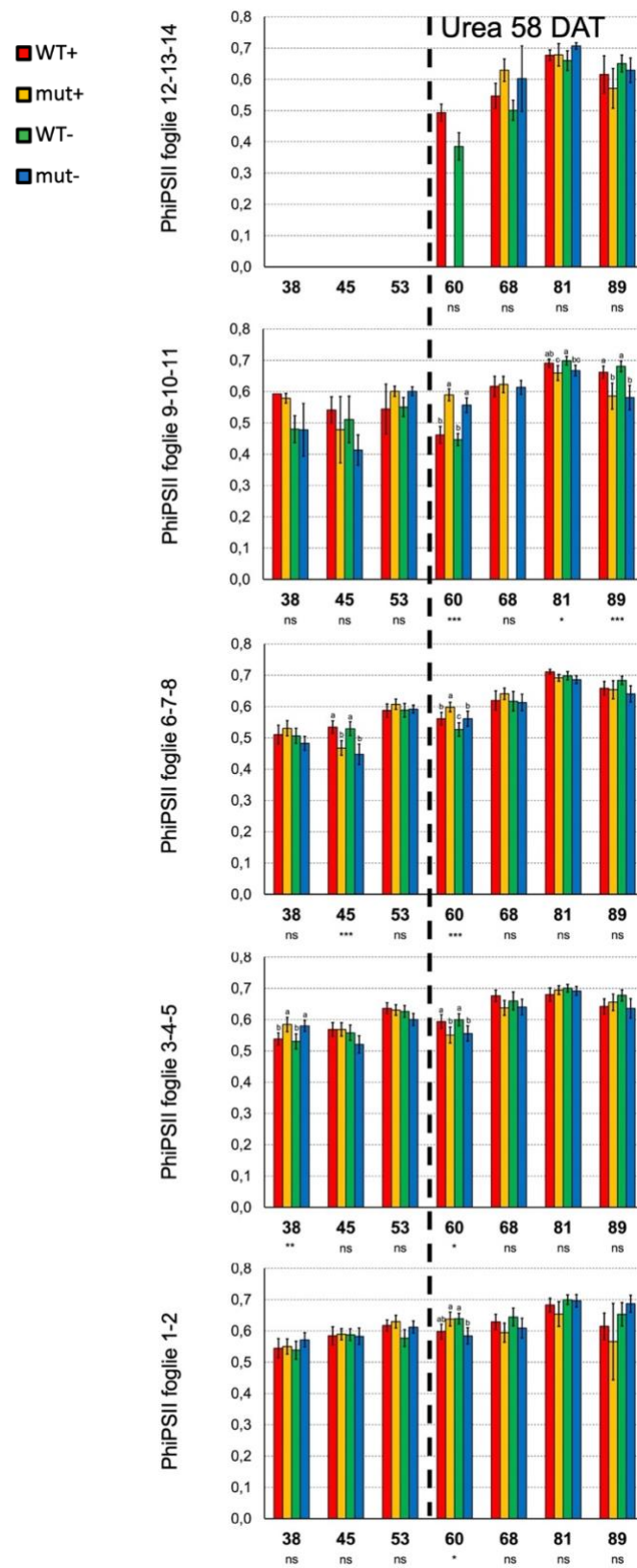


Figura 4.7.: Andamento medio dell'efficienza del fotosistema II (PhiPSII) in ogni gruppo di foglie (asse Y), rispetto al numero di giorni dopo il trapianto (DAT, asse X). L'analisi statistica ANOVA ($p < 0.05$) ha permesso di identificare i DAT al cui interno i trattamenti risultavano statisticamente diversi: $p < 0.001$ '***'; $p < 0.01$ '**'; $p < 0.05$ '*'; $p > 0.05$ 'ns' non significativo. Lettere uguali sopra le barre indicano trattamenti statisticamente uguali.

In Figura 4.7. vengono rappresentati i valori del parametro dell'efficienza del fotosistema II (PhiPSII) nelle diverse classi fogliari.

Prendendo in considerazione la classe fogliare numero uno (1-2) si nota un andamento leggermente crescente di PhiPSII, fino al time point 81 DAT, infatti, in prossimità di 89 DAT i valori scendono lievemente. Solo a livello del time point 60 DAT si sono riscontrate delle differenze significative tra le tesi, dove si osserva che mut+ e WT- risultano statisticamente uguali, e maggiori delle tesi WT+ e mut-.

Osservando il secondo gruppo fogliare (3-4-5) si nota che solo i valori a 38 e 60 DAT mostrano delle differenze significative tra le medie. A 38 DAT l'efficienza del fotosistema II è maggiore nelle tesi mut, mentre a 60 DAT si ha una situazione opposta in cui le piante WT hanno valori di PhiPSII maggiori. Non si osservano effetti dovuti alla fertilizzazione azota.

Nel caso della terza classe di foglie (6-7-8) si osserva un incremento dei valori di PhiPSII da 45 a 53 DAT, seguiti poi da una diminuzione e successivamente da un nuovo incremento da 68 a 81 DAT, per poi ridursi nuovamente. Solo in prossimità di 45 e 60 DAT si osservano delle differenze significative tra le tesi, osservando che a 45 DAT le tesi WT presentano dei valori di PhiPSII maggiori di mut, mentre a 60 DAT la tesi mut+ è statisticamente maggiore rispetto alle altre. E' interessante notare come a 60 DAT si osservi un effetto dovuto alla fertilizzazione con urea, in quanto sono presenti differenze significative sia tra WT+ e WT- che tra mut+ e mut-.

Per quanto riguarda il quarto gruppo (foglie 9-10-11) si può osservare che a 60, 81 e 89 DAT ci sono differenze significative tra le tesi, osservando che a 60 DAT i valori per mut sono decisamente maggiori rispetto a WT, mentre a 81 e 89 DAT sono le tesi WT che presentano l'efficienza del fotosistema II più elevata rispetto a mut. In prossimità di 68 DAT il valore di PhiPSII per WT- è stato cancellato per via della presenza di un valore fuori scala. In nessun time-points si sono osservati effetti dovuti alla fertilizzazione azota. Analizzando la quinta classe fogliare (12-13-14) si osserva un incremento dei valori di PhiPSII da 60 ad 81 DAT, poi da 81 a 89 DAT i valori diminuiscono, ma non sono state rilevate delle differenze significative ad alcun time points.

4.2. Misure di crescita

Le piante oggetto di studio sono anche state valutate da un punto di vista fenotipico, andando a misurare la lunghezza del fusto, la circonferenza del fusto, la lunghezza della terza foglia, la lunghezza degli internodi ed il numero di foglie. Le misurazioni sono state condotte su tutte le piante di tutte le tesi, negli stessi time points nei quali sono state effettuate le misure con DUALEX SCIENTIFIC^{+TM} e Porometro.

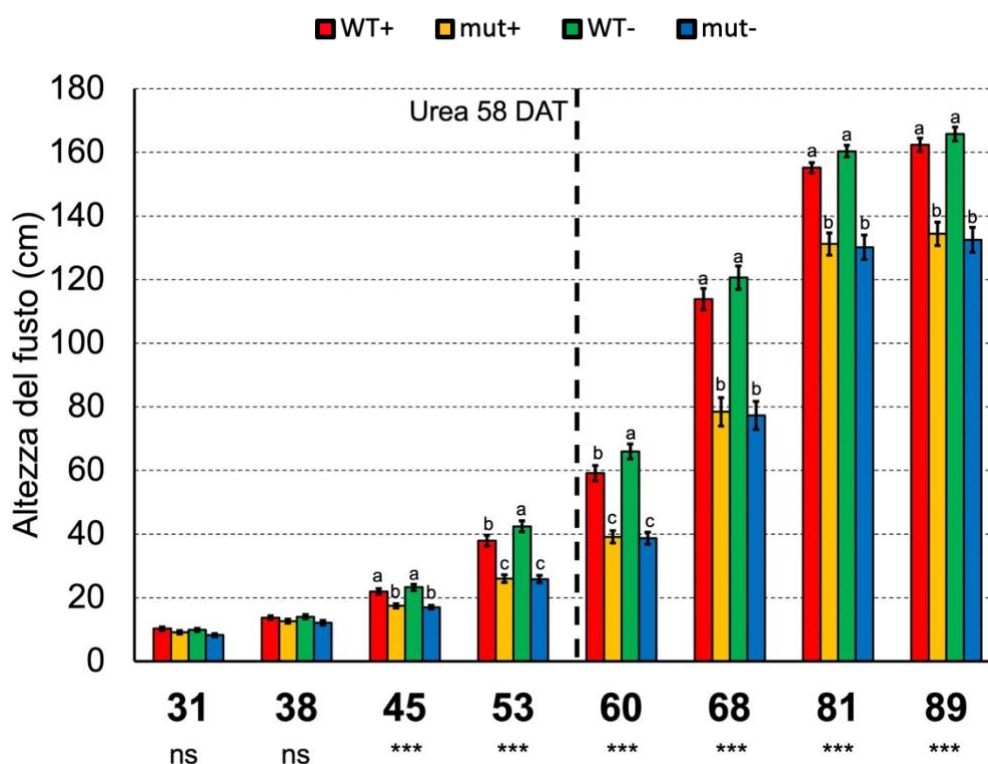


Figura 4.8.: Altezza media delle piante WT di mais fornite di urea 58 giorni dopo il trapianto (WT+, rosso) o senza azoto (WT-, verde), e delle piante di mais mutanti per il gene *CCD8* fornite di urea 58 giorni dopo il trapianto (mut+, giallo) o lasciate senza fonte azotata (mut-, azzurro). Nell'asse X vengono riportati i DAT (giorni dopo il trapianto) in cui sono state condotte le analisi. La linea verticale tratteggiata rappresenta il giorno in cui si è fornita urea come fonte azotata per relativi genotipi. La significatività all'ANOVA è evidenziata dagli asterischi riportati sotto i DAT: $p < 0.001$ '***'; $p < 0.01$ '**'; $p < 0.05$ '*'; $p > 0.05$ 'ns' non significativo. Lettere diverse tra loro sopra le barre indicano trattamenti statisticamente diversi tra loro.

In figura 4.8. si rappresenta l'andamento della misura di altezza del fusto nel corso della coltivazione delle piante oggetto di studio. Dal grafico si nota che le piante hanno subito una crescita esponenziale in altezza dal time point 53 DAT fino a 81 DAT, oltre il quale le misure sono rimaste le stesse le piante mut e leggermente aumentate per WT. È poi possibile osservare che ai primi due time points non si hanno differenze significative tra i genotipi; mentre invece a partire da 45 DAT l'altezza del fusto delle piante WT diventa significativamente maggiore rispetto a mut per tutto il resto della stagione, con una netta

superiorità di WT, soprattutto a livello del time point 68 DAT. Non sono invece state rilevate differenze relative ai trattamenti (+urea e -N) entro lo stesso genotipo.

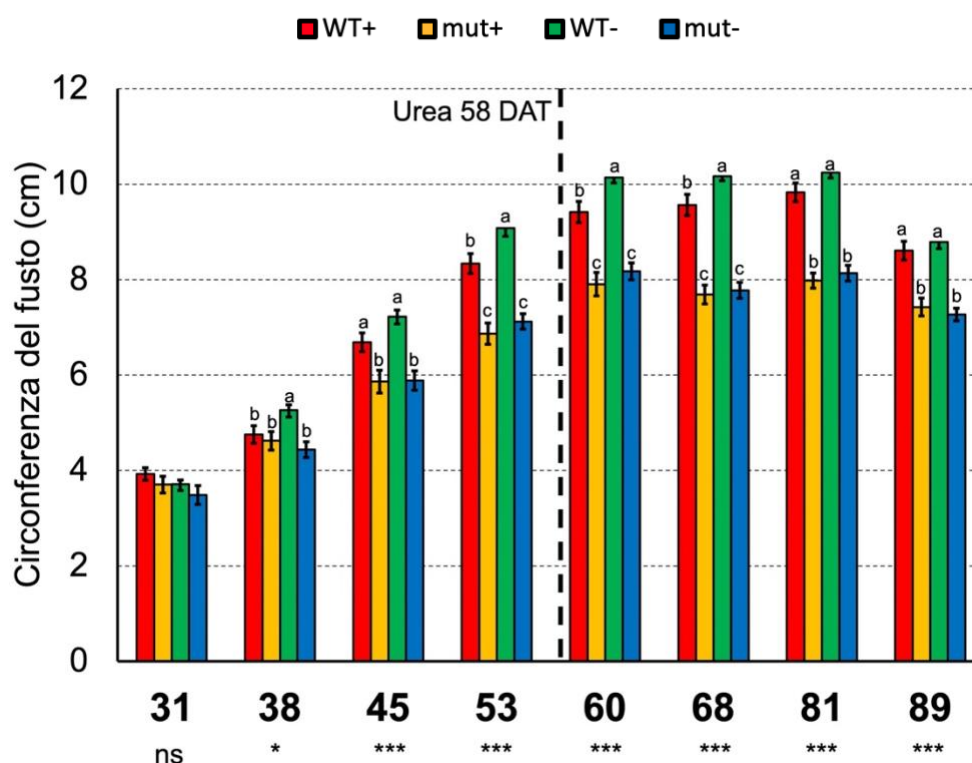


Figura 4.9.: Circonferenza media del fusto delle piante WT di mais fornite di urea 58 giorni dopo il trapianto (WT+, rosso) o senza azoto (WT-, verde), e delle piante di mais mutanti per il gene *CCD8* fornite di urea 58 giorni dopo il trapianto (mut+, giallo) o lasciate senza fonte azotata (mut-, azzurro). Nell'asse X vengono riportati i DAT (giorni dopo il trapianto) in cui sono state condotte le analisi. La linea verticale tratteggiata rappresenta il giorno in cui si è fornita urea come fonte azotata per relativi genotipi. La significatività all'ANOVA è evidenziata dagli asterischi riportati sotto i DAT: $p < 0.001$ '***'; $p < 0.01$ '**'; $p < 0.05$ '*'; $p > 0.05$ 'ns' non significativo. Lettere diverse tra loro sopra le barre indicano trattamenti statisticamente diversi tra loro.

In figura 4.9. si può osservare l'evoluzione delle misure di circonferenza del fusto.

Nel caso di questo parametro fenotipico si osserva un andamento di crescita lineare da 31 fino a 60 DAT, una successiva fase di stasi fino ad 81 DAT, oltre il quale i valori poi subiscono un calo. Anche in questo caso è stata rilevata differenza significativa tra le misure di WT e mut con una superiorità di WT rispetto al mutante. In particolare nei time points 38, 53, 60 e 68 DAT si è osservato il valore più alto di circonferenza del fusto per la tesi WT-. In prossimità del time point 31 DAT non sono invece state rilevate differenze significative tra le varie tesi. Sono state rilevate differenze relative ai trattamenti (+urea e -N) entro il genotipo WT sia a 60 che 68 DAT, mentre lo stesso non si è visto per il mutante.

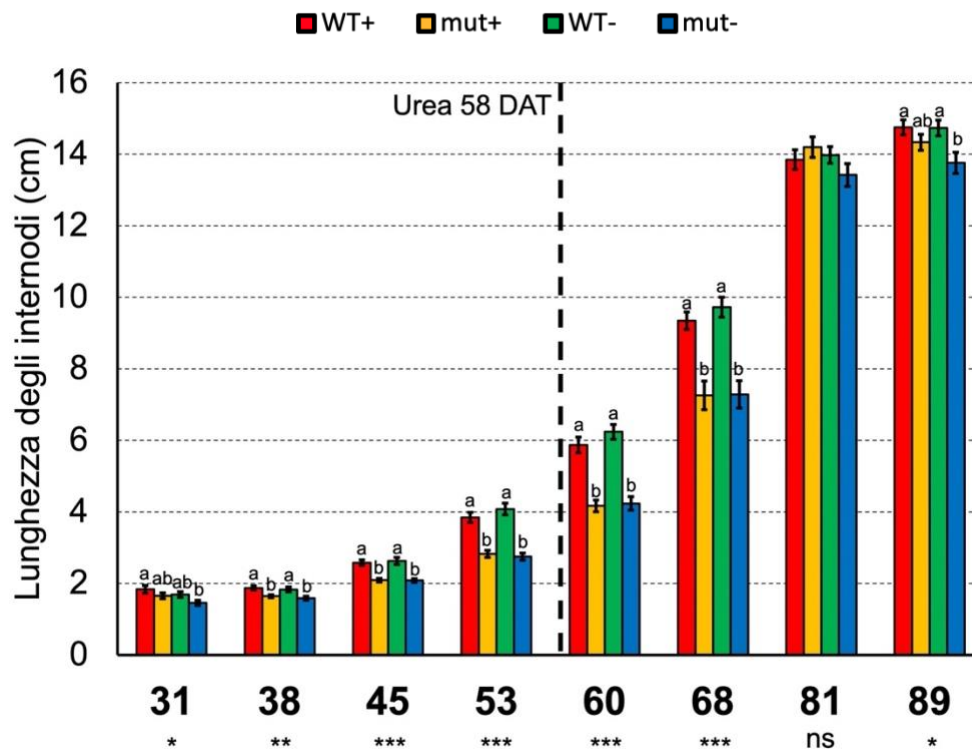


Figura 4.10.: Lunghezza media degli internodi delle piante WT di mais fornite di urea 58 giorni dopo il trapianto (WT+, rosso) o senza azoto (WT-, verde), e delle piante di mais mutanti per il gene *CCD8* fornite di urea 58 giorni dopo il trapianto (mut+, giallo) o lasciate senza fonte azotata (mut-, azzurro). Nell'asse X vengono riportati i DAT (giorni dopo il trapianto) in cui sono state condotte le analisi. La linea verticale tratteggiata rappresenta il giorno in cui si è fornita urea come fonte azotata per relativi genotipi. La significatività all'ANOVA è evidenziata dagli asterischi riportati sotto i DAT: p<0.001 '***'; p<0.01 '**'; p<0.05 '*'; p> 0.05 'ns' non significativo. Lettere diverse tra loro sopra le barre indicano trattamenti statisticamente diversi tra loro.

In figura 4.10. viene raffigurato l'andamento della lunghezza degli internodi, parametro che è stato ottenuto dal rapporto tra la lunghezza del fusto ed il numero di foglie. Anche in questo caso è possibile osservare un costante incremento della lunghezza internodale tra le fasi iniziali della coltivazione (38 DAT) e quelle finali per tutte e quattro le tesi, fino al time point 81 DAT, dove i valori di questo parametro si stabilizzano per via del raggiungimento della fase di maturità da parte della pianta. Si possono invece osservare delle differenze significative tra i due genotipi di piante a partire dal time point 38 DAT, fino a 68 DAT, dove le piante di wild type si presentano con degli internodi di dimensioni maggiori rispetto al mutante.

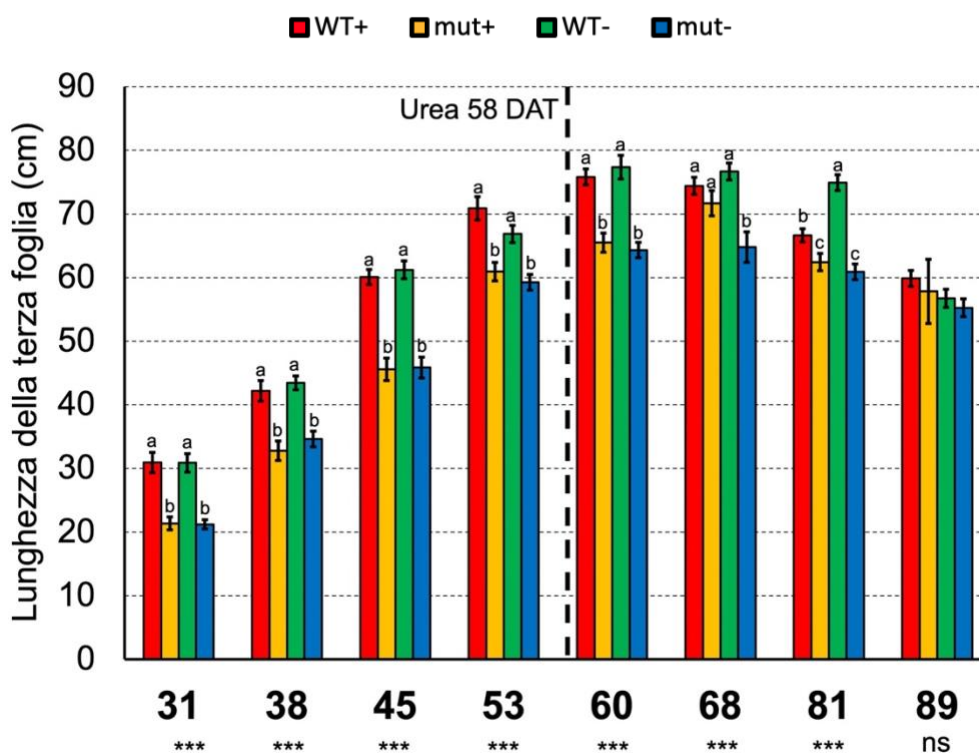


Figura 4.11.: Lunghezza media della terza foglia dall'alto delle piante WT di mais fornite di urea 58 giorni dopo il trapianto (WT+, rosso) o senza azoto (WT-, verde), e delle piante di mais mutanti per il gene *CCD8* fornite di urea 58 giorni dopo il trapianto (mut+, giallo) o lasciate senza fonte azotata (mut-, azzurro). Nell'asse X vengono riportati i DAT (giorni dopo il trapianto) in cui sono state condotte le analisi. La linea verticale tratteggiata rappresenta il giorno in cui si è fornita urea come fonte azotata per relativi genotipi. La significatività all'ANOVA è evidenziata dagli asterischi riportati sotto i DAT: $p < 0.001$ '***'; $p < 0.01$ '**'; $p < 0.05$ '*'; $p > 0.05$ 'ns' non significativo. Lettere diverse tra loro sopra le barre indicano trattamenti statisticamente diversi tra loro.

In figura 4.11. si osserva la rappresentazione delle misure della lunghezza della terza foglia dall'alto. Anche per questo parametro si osserva un andamento crescente da 31 fino a 60 DAT, successivamente le misure subiscono una riduzione. Da 31 fino a 60 DAT sono le piante WT che presentano i valori maggiori, senza differenze significative date dal trattamento. In prossimità del time point 68 DAT le piante mut- presentano valori significativamente minori rispetto a tutte le altre tesi, con un effetto visibile dovuto alla fertilizzazione solo per il mutante. A livello degli 81 DAT le tesi WT risultano maggiori rispetto al mutante e dipendenti dal trattamento con urea, con un picco per il trattamento WT-. Infine nel time point 89 DAT non si sono rilevate differenze significative tra le tesi.

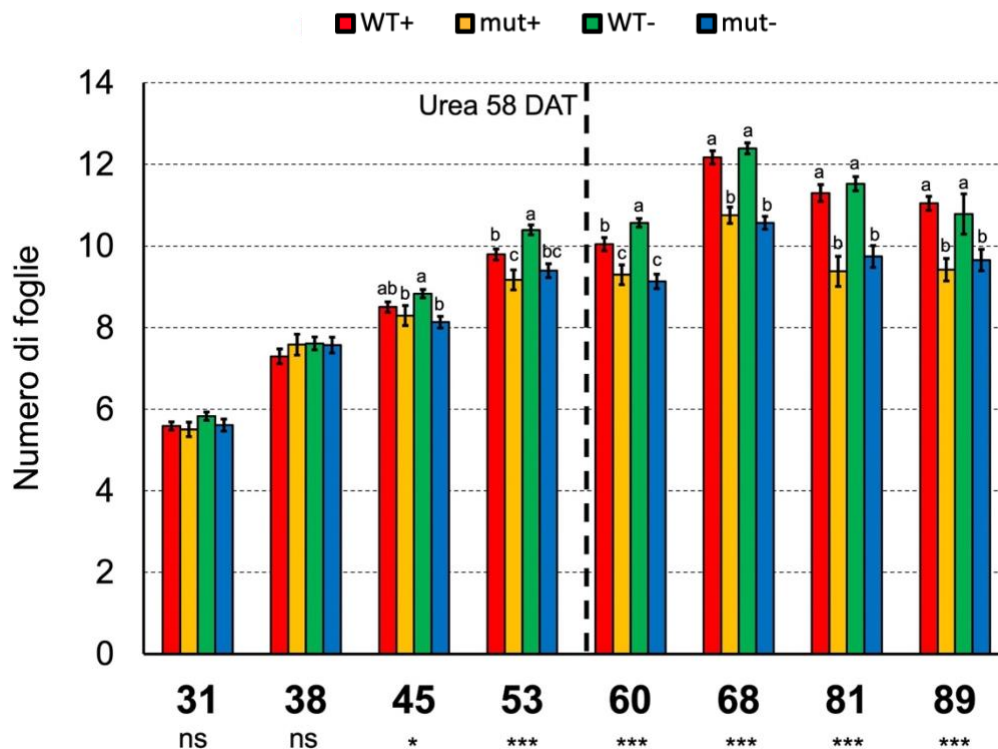


Figura 4.12.: Numero medio di foglie per pianta di WT di mais fornito di urea 58 giorni dopo il trapianto (WT+, rosso) o senza azoto (WT-, verde), e delle piante di mais mutanti per il gene *CCD8* fornite di urea 58 giorni dopo il trapianto (mut+, giallo) o lasciate senza fonte azotata (mut-, azzurro). Nell'asse X vengono riportati i DAT (giorni dopo il trapianto) in cui sono state condotte le analisi. La linea verticale tratteggiata rappresenta il giorno in cui si è fornita urea come fonte azotata per relativi genotipi. La significatività all'ANOVA è evidenziata dagli asterischi riportati sotto i DAT: $p < 0.001$ '***'; $p < 0.01$ '**'; $p < 0.05$ '*'; $p > 0.05$ 'ns' non significativo. Lettere diverse tra loro sopra le barre indicano trattamenti statisticamente diversi tra loro.

In figura 4.12. si può osservare la dinamica del numero di foglie rilevate durante la coltivazione delle piante.

Per la valutazione di questo parametro è importante specificare che sono stati valutati il numero di foglie solo nel fusto principale, aspetto importante soprattutto per le piante delle tesi mut, le quali erano contraddistinte da un elevato numero di rami laterali, che non caratterizzavano invece la linea wild type.

Prendendo in esame questo parametro si osserva che il numero di foglie aumenta progressivamente dal time point 31 DAT, con una fase di stasi tra il time point 53 e 60 DAT e una riduzione della numerosità fogliare nelle fasi finali data dalla senescenza delle prime foglie basali. È inoltre possibile notare che a partire dal time point 53 DAT le piante della linea pura B73 presentano un numero di foglie significativamente maggiore rispetto alle piante del mutante; mentre solo a 60 DAT si osservano differenze significative date dal trattamento nelle tesi WT, dove WT- presenta più foglie di WT+.

4.3. Misure di raccolta

Sulle piante oggetto di studio è poi stata effettuata anche la raccolta delle pannocchie, delle quali si sono misurate: la lunghezza con calibro, il peso delle cariossidi e del tutolo, ed infine è stato calcolato il rapporto tra il peso delle cariossidi ed il peso del tutolo.

Le pannocchie raccolte non presentavano problematiche dal punto di vista fitosanitario né per wild type né per mutante. Inoltre le pannocchie di wild type manifestavano una buona percentuale di impollinazione, con un consistente numero di cariossidi per spiga.

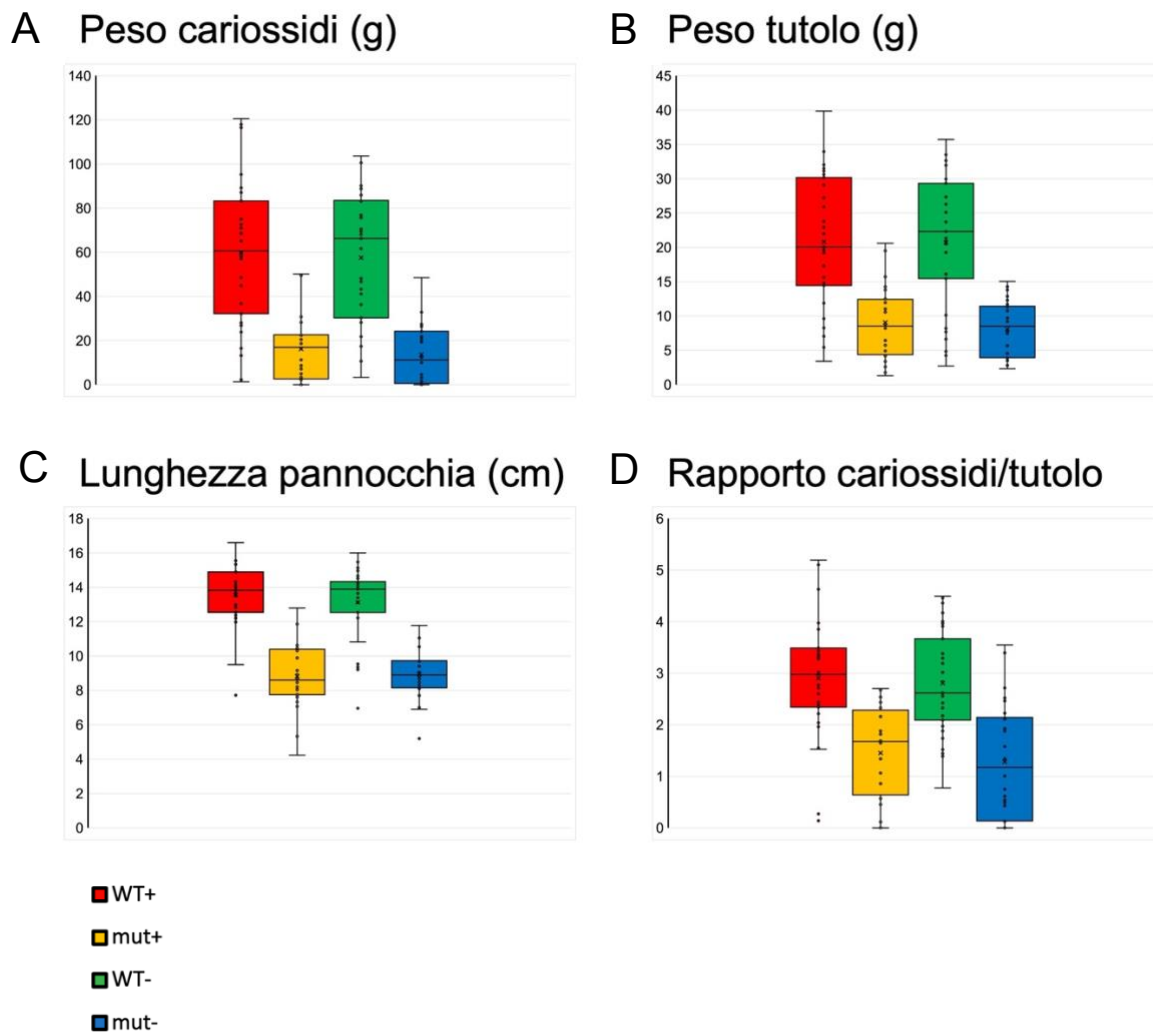


Figura 4.13.: Si rappresentano i grafici di elaborazione dei dati relativi ai parametri: peso delle cariossidi (g); peso del tutolo (g), lunghezza della pannocchia (cm) e rapporto tra peso delle cariossidi e peso del tutolo.

Dalla rappresentazione grafica dei dati (**Figura 4.13.**) emerge come le piante di wild type presentino una produttività significativamente maggiore rispetto al mutante, infatti il peso delle cariossidi risulta essere maggiore nelle piante WT rispetto alle pannocchie delle piante mut; non si riscontrano invece differenze relative alla tesi +urea e -N. L'andamento

è identico anche prendendo in esame il peso del tutolo, che risulta maggiore in WT, così come la lunghezza della pannocchia, anche se con un divario minore rispetto ai due parametri precedenti. Per quanto concerne il rapporto tra il peso delle cariossidi ed il peso del tutolo, si osserva che anche in questo caso i valori riscontrati sono maggiori nelle tesi WT, senza osservare particolari differenze date dal trattamento; questo per via di pannocchie di dimensioni maggiori, ma soprattutto a causa di una percentuale di impollinazione più elevata nelle spighe di wild type, come si osserva nella figura 3.4..

4.4. Verifica espressione genica di *CCD8* in foglia

In figura 4.14. vengono rappresentati i dati reattivi all'analisi trascrittomico di *CCD8*, svolta su campioni di foglia delle piante oggetto di studio. I campionamenti sono stati effettuati a 10, 23, 32 e 44 DAU (*Days After Urea*, giorni dopo il trattamento con urea). Dai dati emerge che per tutti i campionamenti nelle piante mut non è stata rilevata espressione relativa a questo gene, sia per le tesi +urea che per quelle -N. Contrariamente per le piante WT, sono stati osservati dei livelli di espressione diversi a seconda del trattamento e del momento in cui è stato raccolto il campione. A 10 DAU, si sono osservati dei livelli di espressione di *CCD8* simili nelle tesi WT, anche se leggermente maggiore per quella coltivata in condizioni di carenza d'azoto. Per quanto riguarda il time point 23 DAU, si è riscontrato un picco di espressione di *CCD8* nelle piante -N ed una ridottissima espressione del gene per le piante trattate con urea. A 32 DAU invece si ha una espressione elevata per i campioni carenti di azoto, ed un livello minore per i campioni WT+. Una situazione opposta è stata infine riscontrata con i campioni raccolti a 44 DAU, dove il maggiore tasso di espressione è stato quello dei campioni WT+.

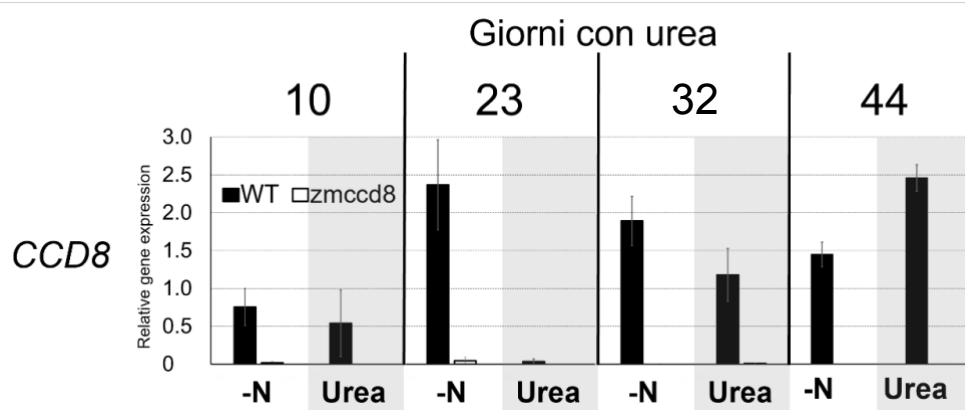


Figura 4.14.: analisi di espressione genica di *CCD8* in foglia di mais di linea wild-type (WT) e mut (*zmccd8*) in piante allevate sempre in carenza di azoto (-N) e piante allevate in carenza di azoto ma poi trattate con urea per 10, 23, 32 e 44 giorni.

5. Discussione

La condizione di carenza di azoto in *Zea mays* L. stimola la pianta ad attivare delle risposte di adattamento. In tutto questo gli strigolattoni svolgono diverse funzioni nella regolazione e nello sviluppo della pianta, soprattutto a livello dell'apparato radicale e della ramificazione dei germogli.

In questo studio sono state condotte delle analisi in campo fisiologiche e fenotipiche per comprendere il comportamento di piante di mais wild type e mutante *zmccd8* coltivate entrambe in condizioni di carenza, e stato ottimale di azoto, con lo scopo di evidenziare il ruolo degli strigolattoni nella gestione della carenza azotata tra questi due genotipi di mais.

Prendendo in considerazione le analisi dei pigmenti fogliari, è stato riscontrato che le piante wild type hanno presentato, sia prima che dopo il trattamento con urea (58 DAT) per i campioni +urea, dei livelli di Chl maggiori rispetto alle tesi mut, indicando che l'assenza degli strigolattoni nelle piante mutanti interferisce con la produzione e l'accumulo di questa molecola, ma più in generale con le risposte messe in atto dalla pianta per gestire la carenza. Il contenuto di clorofilla rilevato nelle piante WT risulta maggiore soprattutto riferendosi alla parte alta della pianta, mentre nella parte basale si osserva un decremento del contenuto di clorofilla tra il time point 81 e 89 DAT, dato probabilmente dall'inizio della fase di senescenza delle foglie, processo che viene regolato anche dagli strigolattoni oltre che all'etilene, come è stato osservato in alcuni studi su piante di *Arabidopsis thaliana* (Ueda e Kusaba 2015; Yamada et al. 2014). In diversi studi è inoltre stato riscontrato che le principali fonti che le piante utilizzano per il processo di rimobilizzazione delle fonti azotate sono i cloroplasti delle foglie senescenti (Mae et al., 1983; Sage et al., 1987).

Le basse concentrazioni di azoto fanno sì che la pianta sintetizzi una minore quantità di pigmenti fotosintetici, a fronte di una maggiore rimobilizzazione delle riserve, altro processo che viene regolato dagli strigolattoni. Nel mutante invece non viene osservata in modo chiaro questa diminuzione di clorofilla, per il fatto che gli SLs sono coinvolti anche nella regolazione della senescenza fogliare, e probabilmente per questo motivo in queste piante il processo risulta alterato (Ueda e Kusaba 2015; Yamada et al. 2014).

Oltre alla clorofilla sono state anche misurate le concentrazioni di flavonoidi e antociani, ma sono le antocianine che permettono di evidenziare al meglio le differenze tra i due

genotipi, dato che sono delle molecole antiossidanti ed hanno lo scopo di ridurre i danni da parte dei radicali ROS (Zhangy et al. 2015; Nakabayashi et al. 2014; Zhenhua et al. 2018). La loro concentrazione nei tessuti della pianta aumenta quanto questa si trova in condizioni di stress, come ad esempio una carenza di azoto. Sulla base dei dati si osserva che le piante mut presentano una maggiore concentrazione di antocianine nei tessuti fogliari, riferendosi soprattutto al secondo, terzo e quarto gruppo di foglie; portando alla conclusione che la mancanza di strigolattoni, unita anche alla carenza di azoto potrebbe stimolare la pianta ad accumulare un maggiore quantitativo di antociani. Tuttavia Ito et al. (2015), coltivando piante di *Arabidopsis thaliana* WT e mutanti per la via biosintetica degli SLs, hanno rilevato che i maggiori contenuti di antociani erano relativi alle tesi WT ed in condizioni di carenza di N; mentre nel caso di un'ottimale stato nutrizionale sono stati rilevati dei livelli molto bassi di antocianine; queste differenze potrebbero essere attribuite ad una differente gestione della carenza nutrizionale e della mancanza di SLs da parte delle piante mutanti di mais e *Arabidopsis*.

Per quanto riguarda i dati relativi alla produttività delle piante (**Figura 4.13.**) è possibile osservare una chiara distinzione tra le piante mut e quelle WT, senza particolari differenze relative al trattamento, è stato osservato che le piante WT presentano delle pannocchie di dimensioni molto maggiori e delle cariossidi più pesanti, rispetto al mutante; lo stesso è stato osservato in piante mutanti (*ccd8*) di pomodoro (Kohlen et al. 2012). Nonostante i geni della biosintesi degli strigolattoni siano intensamente espressi all'interno delle spighe di mais (Guan et al. 2012) il loro ruolo nello sviluppo degli organi riproduttivi non è ancora stato dimostrato (Koltai et al. 2019).

Considerando i dati relativi allo strumento LI-600P, non sono stati rilevati degli andamenti tipici per ogni genotipo, neppure tenendo in considerazione le differenze date dal trattamento con urea, quindi gli strigolattoni non sembrerebbero avere un ruolo centrale nella conduttanza stomatica e nella traspirazione fogliare delle piante di mais. Tuttavia, ci sono degli studi in cui viene dimostrato che piante di *Arabidopsis thaliana* mutanti *max2* che non producono strigolattoni, presentano delle aperture stomatiche maggiori e dei livelli di conduttanza stomatica al vapore acqueo più elevati (Liu et al. 2015; Piisila et al. 2015; Shou et al. 2017); questo potrebbe essere dato dalla variabilità delle condizioni ambientali, soprattutto in termini di temperatura e umidità relativa, in cui si trovavano le piante al momento delle misurazioni, aspetto che condiziona fortemente i

livelli di traspirazione e lo stato di apertura/chiusura degli stomi, oltre al fatto che nelle fasi iniziali della coltivazione delle piante oggetto di studio, si è verificato un periodo con intensi e prolungati fenomeni piovosi, che hanno probabilmente interferito con l'apertura degli stomi e la traspirazione delle foglie. Considerando invece il time point 60 DAT è stato rilevato un picco di GSW ed E apparente per WT+, che non è stato osservato invece per le altre tesi, questo potrebbe portare ad ipotizzare che la carenza di azoto, ma soprattutto degli strigolattoni limita molto la traspirazione e quindi anche il processo di fotosintesi.

Nelle analisi dell'espressione genica di *CCD8* nei campioni fogliari raccolti si osserva che nelle piante WT, sono stati rilevati dei livelli di espressione del gene maggiori nei campioni che non sono stati trattati con urea, tranne che nel caso del time point 44 DAU; questo porterebbe ad ipotizzare che la carenza di azoto nelle piante stimola l'espressione del gene *CCD8*, portando quindi ad un aumento del tasso di biosintesi degli strigolattoni. A sostegno di questo è stato dimostrato che le carenze di nitrato e ammonio stimolano la biosintesi e l'essudazione di strigolattoni (Ravazzolo et al. 2019), probabilmente per promuovere eventuali simbiosi micorriziche. Inoltre il picco di espressione di *CCD8* registrato a 44 DAU (101 DAT) per le piante WT+ potrebbe essere indotto dall'inizio della fase di senescenza della pianta, dato che gli SLs sono un fitormone coinvolto anche nel processo di senescenza (Ueda e Kusaba 2015; Yamada et al. 2014).

Riferendosi alle misure fenotipiche si nota una chiara distinzione tra WT e mutante, soprattutto prendendo in considerazione i dati relativi all'altezza e circonferenza del fusto, e meno quelli di lunghezza internodale e della terza foglia, queste tendenze sono da attribuire alla carenza degli strigolattoni, che nelle piante mut alterano e riducono sensibilmente il tasso di crescita (Guan et al. 2012). La ridotta statura delle piante senza SLs non è determinata da una loro maggiore ramificazione (De Saint Germain et al. 2013), ma è probabile che l'assenza degli strigolattoni abbia degli effetti anche sull'azione di altri fitormoni coinvolti nella regolazione della crescita della pianta, come le auxine e le gibberelline. In particolare gli strigolattoni sembrano essere in grado di regolare positivamente i trasportatori delle auxine (PIN) comportando un aumento dell'afflusso di auxine nei tessuti apicali che ne favorisce la crescita, questo nelle piante mutanti carenti di SLs non avviene. Questa potrebbe essere la ragione che porta le piante mutanti ad avere

dei fenotipi nani (Beveridge et al. 2000; Bennett et al. 2006, 2016; Crawford et al. 2010; Shinohara et al. 2013).

6. Conclusioni

Il settore dell'agricoltura è fondamentale nella sfida per poter garantire approvvigionamenti alimentari sufficienti alla popolazione globale in crescita, ma tenendo anche conto del largo impatto ambientale che lo caratterizza, soprattutto relativamente al grande spreco di fertilizzanti chimici azotati, che comportano poi ampi danni ambientali, quali l'eutrofizzazione delle acque ed il loro contributo al surriscaldamento globale. In questo giocano un ruolo importante la comprensione approfondita del ciclo dell'azoto che caratterizza gli agroecosistemi, oltre che ai meccanismi fisiologici vegetali nella gestione della nutrizione, con lo scopo di aumentare l'efficienza delle coltivazioni riducendo gli sprechi senza rinunciare al mantenimento delle elevate rese.

Attraverso questo lavoro è stato possibile comprendere che gli strigolattoni influenzano l'accrescimento e la produttività, con anche delle differenze relative alla condizione nutritiva in cui si trova la pianta. È stato visto che l'assenza degli strigolattoni penalizza in modo evidente le piante che ne sono carenti, soprattutto da un punto di vista fenotipico e produttivo, inoltre è stato osservato che la presenza di azoto condiziona fortemente l'espressione del gene *CCD8* direttamente coinvolto nella via biosintetica degli SLs.

In merito a questo è possibile affermare che gli strigolattoni giocano un ruolo importante nel miglioramento dell'efficienza delle coltivazioni, ma sono comunque necessari degli approfondimenti in merito all'interazione che hanno con gli altri fitormoni, soprattutto nella gestione della disponibilità di azoto nel terreno e nella regolazione dello sviluppo dell'architettura della pianta. Potrebbero essere condotti degli studi in ambiente controllato in modo da poter isolare l'effetto della presenza o assenza di questa biomolecola valutando i tassi di assorbimento dell'azoto e di micorrizzazione delle radici, in modo da poterne comprendere al meglio le funzioni.

7. Bibliografia

- Cassman, K. G., & Dobermann, A. (2022). “*Nitrogen and the future of agriculture: 20 years on : This article belongs to Ambio's 50th Anniversary Collection. Theme: Solutions-oriented research*”. *Ambio*, 51(1), 17–24.
<https://doi.org/10.1007/s13280-021-01526-w>
- Deng T., Wang J. H., Gao Z., Shen S., Liang X. G., Zhao X., Chen X. M., Wu G., Wang X., & Zhou S. L. (2023). “*Late Split-Application with Reduced Nitrogen Fertilizer Increases Yield by Mediating Source-Sink Relations during the Grain Filling Stage in Summer Maize*”. *Plants (Basel, Switzerland)*, 12(3), 625.
<https://doi.org/10.3390/plants12030625>
- Fan P., Ming B., Anten N. P. R., Evers J. B., Li Y., Li S., & Xie R. (2022). “*Plastic response of leaf traits to N deficiency in field-grown maize*”. *AoB PLANTS*, 14(6), plac053.
<https://doi.org/10.1093/aobpla/plac053>
- FAOSTAT (<https://www.fao.org/faostat/en/#home>)
- Guan J. C., Koch K. E., Suzuki M., Wu S., Latshaw S., Petruff T., Goulet C., Klee H. J., & McCarty D. R. (2012). “*Diverse roles of strigolactone signaling in maize architecture and the uncoupling of a branching-specific subnetwork*”. *Plant physiology*, 160(3), 1303–1317.
<https://doi.org/10.1104/pp.112.204503>
- Haas H. J., Evans C. E., Miles E. F. (1957). “*Nitrogen and Carbon Changes in Great Plains Soils as Influenced by Cropping and Soil Treatments*”. Washington DC, E. 1164 Technical bulletin (United States. Department of Agriculture).
- Hochholdinger F., Woll K., Sauer M., & Dembinsky D. (2004). “*Genetic dissection of root formation in maize (Zea mays) reveals root-type specific developmental programmes*”. *Annals of botany*, 93(4), 359–368.
<https://doi.org/10.1093/aob/mch056>

- Ito S., Nozoye T., Sasaki E., Imai M., Shiwa Y., Shibata-Hatta M., Ishige T., Fukui K., Ito K., Nakanishi H., Nishizawa N. K., Yajima S., & Asami T. (2015). “*Strigolactone regulates anthocyanin accumulation, acid phosphatases production and plant growth under low phosphate condition in Arabidopsis*”. *PLoS one*, 10(3), e0119724.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119724>
- Klimasmith I. M., & Kent A. D. (2022). “*Micromanaging the nitrogen cycle in agroecosystems*”. *Trends in microbiology*, 30(11), 1045–1055.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.04.006>
- Koltai, H., Prandi, C. Editors. (2019). “*Strigolactones - Biology and Applications*”. Springer Nature, Switzerland.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-12153-2_2
- Li C., Dong L., Durairaj J., Guan J. C., Yoshimura M., Quinodoz P., Horber R., Gaus K., Li J., Setotaw Y. B., Qi J., De Groot H., Wang Y., Thiombiano B., Floková K., Walmsley A., Charnikhova T. V., Chojnacka A., Correia de Lemos S., Ding Y., Bouwmeester H. J. (2023). “*Maize resistance to witchweed through changes in strigolactone biosynthesis*”. *Science (New York, N.Y.)*, 379(6627), 94–99.
<https://doi.org/10.1126/science.abq4775>
- Li Yanan, Wang C., Wu J., Zhang Y., Li Q., Liu S., Gao Y. (2023). “*The Effects of Localized Plant–Soil–Microbe Interactions on Soil Nitrogen Cycle in Maize Rhizosphere Soil under Long-Term Fertilizers*”. *Agronomy*, 13(8), 2114.
<https://doi.org/10.3390/agronomy13082114>
- Ludemann C. I., Gruere A., Heffer P., & Dobermann A. (2022). “*Global data on fertilizer use by crop and by country*”. *Scientific data*, 9(1), 501.
<https://doi.org/10.1038/s41597-022-01592-z>
- Lv S., Zhang Y., Li C., Liu Z., Yang N., Pan L., Wu J., Wang J., Yang J., Lv Y., Zhang Y., Jiang W., She X., & Wang G. (2018). “*Strigolactone-triggered stomatal closure requires hydrogen peroxide synthesis and nitric oxide production in an abscisic acid-independent manner*”. *The New phytologist*, 217(1), 290–304.
<https://doi.org/10.1111/nph.14813>

- Masclaux-Daubresse C., Daniel-Vedele F., Dechorgnat J., Chardon F., Gaufichon L., & Suzuki A. (2010). “*Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture*”. *Annals of botany*, 105(7), 1141–1157.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcq028>
- Nacry P., Bouguyon E., Gojon A. (2013). “*Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource*”. *Review of Plant Soil*, 370, 1–29.
<https://doi.org/10.1007/s11104-013-1645-9>
- Ogawa S., Cui S., White A. R. F., Nelson D. C., Yoshida S., & Shirasu K. (2022). “*Strigolactones are chemoattractants for host tropism in Orobanchaceae parasitic plants*”. *Nature communications*, 13(1), 4653.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-32314-z>
- Paustian K, Robertson GP, Elliott ET. (1995). “*Management impacts on carbon storage and gas fluxes (CO₂, CH₄) in mid-latitude cropland ecosystems. In Soil Management and the Greenhouse Effect*”. *Advances in Soil Science*, ed. R Lal, JM Kimble, E Levine, BA Stewart, 69–84. Boca Raton, FL: CRC Press
- (Porometro) <https://www.licor.com/env/products/LI-600/>
- Posit team (2023). *RStudio: Integrated development Environment for R*. Posit Software, PBC, Boston, MA.
<http://www.posit.co/>.
- Rani V., Sengar R. S., Garg S. K., Mishra P., & Shukla P. K. (2023). “*Physiological and Molecular Role of Strigolactones as Plant Growth Regulators: A Review*”. *Molecular biotechnology*, 10.1007/s12033-023-00694-2. Advance online publication.
<https://doi.org/10.1007/s12033-023-00694-2>
- Ravazzolo L., Trevisan S., Manoli A., Boutet-Mercey S. P., Perreau F. O., & Quaggiotti S. (2019). “*The Control of Zealactone Biosynthesis and Exudation is Involved in the Response to Nitrogen in Maize Root*”. *Plant & cell physiology*, 60(9), 2100–2112.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcz108>

- Ravazzolo L., Boutet-Mercey S., Perreau F., Forestan C., Varotto S., Ruperti B., & Quaggiotti S. (2021). “*Strigolactones and Auxin Cooperate to Regulate Maize Root Development and Response to Nitrate*”. *Plant & cell physiology*, 62(4), 610–623.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcab014>
- Robertson G. Philip, and Peter M. Vitousek. (2009). “*Nitrogen in Agriculture: Blancing the Cost of an Essential Resource*”. *Annual Review of Environment and Resources*, 34, 97–125.
<https://doi.org/10.1146/annurev.environ.032108.105046>
- Roy S., Liu W., Nandety R. S., Crook A., Mysore K. S., Pislariu C. I., Frugoli J., Dickstein R., & Udvardi M. K. (2020). “*Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation*”. *The Plant cell*, 32(1), 15–41.
<https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279>
- (SPAD) https://www.dynamax.com/images/uploads/papers/Dualex_Manual.pdf
- Stitzer M. C., & Ross-Ibarra J. (2018). “*Maize domestication and gene interaction*”. *The New phytologist*, 220(2), 395–408.
<https://doi.org/10.1111/nph.15350>
- Trevisan S., Manoli A., Ravazzolo L., Botton A., Pivato M., Masi A., & Quaggiotti S. (2015). “*Nitrate sensing by the maize root apex transition zone: a merged transcriptomic and proteomic survey*”. *Journal of experimental botany*, 66(13), 3699–3715.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erv165>
- Ueda H., & Kusaba M. (2015). “*Strigolactone Regulates Leaf Senescence in Concert with Ethylene in Arabidopsis*”. *Plant physiology*, 169(1), 138–147.
<https://doi.org/10.1104/pp.15.00325>
- Vidal E. A., Alvarez J. M., Araus V., Riveras E., Brooks M. D., Krouk G., Ruffel S., Lejay L., Crawford N. M., Coruzzi G. M., & Gutiérrez R. A. (2020). “*Nitrate in 2020: Thirty Years from Transport to Signaling Networks*”. *The Plant cell*, 32(7), 2094–2119.
<https://doi.org/10.1105/tpc.19.00748>

- Wang W., Hu B., Li A., & Chu C. (2020). “*NRT1.1s in plants: functions beyond nitrate transport*”. *Journal of experimental botany*, 71(15), 4373–4379.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erz554>
- Wang X., Bai J., Xie T., Wang W., Zhang G., Yin S., & Wang D. (2021). “*Effects of biological nitrification inhibitors on nitrogen use efficiency and greenhouse gas emissions in agricultural soils: A review*”. *Ecotoxicology and environmental safety*, 220, 112338.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112338>
- Wani S. H., Vijayan R., Choudhary M., Kumar A., Zaid A., Singh V., Kumar P., & Yasin J. K. (2021). “*Nitrogen use efficiency (NUE): elucidated mechanisms, mapped genes and gene networks in maize (Zea mays L.)*”. *Physiology and molecular biology of plants: an international journal of functional plant biology*, 27(12), 2875–2891.
<https://doi.org/10.1007/s12298-021-01113-z>
- Xu Z., & Rothstein S. J. (2018). “*ROS-Induced anthocyanin production provides feedback protection by scavenging ROS and maintaining photosynthetic capacity in Arabidopsis*”. *Plant signaling & behavior*, 13(3), e1451708.
<https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1451708>
- Zeng Y., Priest C., Wang G., Wu G.. (2020). “*Restoring the Nitrogen Cycle by Electrochemical Reduction of Nitrate: Progress and Prospects*”. *Small Methods*, 4(12), 2000672.
<https://doi.org/10.1002/smt.202000672>