



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie per l'Alimentazione

Tesi di Laurea

**Nitrato e ammonio regolano in modo differente il trascrittoma di
radici di mais (*Zea mays* L.)**

Relatore:

Dott.^{ssa} Silvia Quaggiotti

Correlatore:

Dott.^{ssa} Laura Ravazzolo

Laureando:

Emmanuele Moro

Matricola n. 1179583

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

Mi apro alla chiusura
J.K. Rowling

Sommario

| | |
|--|-----------|
| ABSTRACT | 5 |
| RIASSUNTO | 7 |
| 1 INTRODUZIONE | 9 |
| 1.1 Importanza dell'azoto per le piante coltivate | 9 |
| 1.2 Efficienza dell'uso dell'azoto..... | 11 |
| 1.3 Il Mais | 12 |
| 1.3.1 Il ciclo del mais | 13 |
| 1.4 L'azoto e le piante | 13 |
| 1.4.1 Assorbimento del nitrato | 13 |
| 1.4.2 Assimilazione del nitrato..... | 14 |
| 1.4.3 Le vie di segnalazione del nitrato | 16 |
| 1.4.4 L'assorbimento dell'ammonio | 18 |
| 1.4.5 L'assimilazione dell'ammonio..... | 20 |
| 1.4.6 Le vie di segnalazione dell'ammonio..... | 21 |
| 1.4.7 Risposta trascrittomica e fisiologica a nitrato e ammonio..... | 24 |
| 2 SCOPO DEL LAVORO..... | 27 |
| 3 MATERIALI E METODI..... | 29 |
| 3.1 Analisi fisiologiche e fenotipiche..... | 29 |
| 3.1.1 Condizioni di crescita del Mais | 29 |
| 3.1.2 Analisi pigmenti fogliari..... | 30 |
| 3.1.3 Campionamento, Peso Fresco, Scanning e Misura Aree..... | 32 |
| 3.1.4 Quantificazione degli Amminoacidi..... | 32 |
| 3.2 Analisi Bioinformatica | 34 |
| 3.2.1 Elaborazione delle letture di sequenziamento e analisi delle espressioni differenziali | 34 |
| 3.2.2 <i>Gene Ontology</i> , arricchimento e analisi funzionale..... | 35 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4 | RISULTATI | 37 |
| 4.1 | Lunghezza e area | 37 |
| 4.2 | Pesi | 38 |
| 4.3 | Analisi con DUALEX SCIENTIFIC™ | 39 |
| 4.4 | Amminoacidi | 41 |
| 4.5 | Analisi di espressione genica tramite RNA-seq | 45 |
| 4.6 | Annotazione e classificazione dei DEG raggruppati in categorie funzionali GO..... | 49 |
| 4.7 | Classificazione dei DEG in categorie funzionali di MapMan..... | 52 |
| 5 | DISCUSSIONE E CONCLUSIONE..... | 54 |
| 6 | BIBLIOGRAFIA | 59 |
| | SITI WEB CONSULTATI..... | 75 |
| | RINGRAZIAMENTI..... | 77 |

ABSTRACT

Nitrogen (N) is one of the fundamental nutrients for plant life and in general for life. It is an element that allows growth and development as the main component of DNA, RNA, amino acids and proteins. Unfortunately, the rapid increase in the human population, from 2.5 billion people in 1950 to over 7 billion in 2017, has required an increase in production by crops with an increase in the use of fertilizers to make best performing plants. The productivity of the main crops around the world, sugar cane, corn, wheat, soy, rice, like all other plants, are highly dependent on the use of fertilizers, since the only nitrogen in the soil is not enough to meet the demands given by the agricultural market. However, plants on average absorb only 50% of the nitrogen administered due to the low NUE (Nitrogen Use Efficiency) or the efficiency with which plant systems are able to absorb nitrogen. The remainder goes in the main waterways leading to dangerous phenomena of eutrophication and environmental pollution. The plant can absorb nitrogen mainly in two forms, nitrate (NO_3^-) or ammonium (NH_4^+), the first in addition to being a nutrient also acts as a signal molecule inside the plant. In this study we focused on understanding the differential effects that nitrate and ammonium can have in a plant of *Zea mays* B73, a pure line of maize. In addition to these two treatments, a third treatment was added in which the plants were in a situation of nitrogen deficiency (-N). The analyses carried out were of a physiological type, raising the plants in the three different treatments for a certain period of time and observing the type of phenotype they develop, transcriptomic by evaluating the type of transcripts, and bioinformatics analyzing through specific Gene Ontology software the transcribed products and trying to correctly interpret the resulting clusters. The results showed a positive effect of nitrate on growth, at least on a physiological level, in fact the length of the primary root, the area of the leaves and the total biomass of the seedlings were on average higher, even significantly compared to ammonium treatment and in -N. Regarding the analysis of transcripts and Gene Ontology an important effect related to nitrate is certainly the lowering of nitrate transport to the apoplast and a decrease in the nitrate response, as well as a negative regulation of ROS detoxification systems. Chlorophyll and flavonoid values analysed by DUALEX SCIENTIFIC™ report significantly higher levels for both nitrate and -N treatment than the ammonium situation, this may be a clear signal of

the plant's health status. In view of all these data, it can be hypothesized that nitrate treatment gives a hypertrophied effect on the plant, with consequent development and productivity benefits and an inhibitory effect of ammonium. The ammonium treatment, on the other hand, led to a phenotype with diffuse chlorosis and necrosis during physiological analysis, and generally with a total biomass of less than 70% compared to the same plants treated with nitrate. As already mentioned, the analyses with DUALEX SCIENTIFIC™ report lower levels of chlorophyll and flavonoids than the other two treatments, indicating that the plant is in a state of suffering, moreover the anthocyanins are statistically superior to the other two treatments. As for the analysis of amino acids in general ammonium stimulates a production of free amino acids especially in glutamate, proline, cysteine and tyrosine. Gene Ontology has led to the identification that many genes positively regulated by ammonium concern phytohormones generally associated with oxidative stress such as salicylic acid, abscisic acid, ethylene, and an expression of genes concerning biotic and abiotic attacks. Given all these data, it can be assumed that the nitrate treatment gives a hypertrophied effect on the plant, with consequent benefits of development and productivity. Treatment with ammonium on the contrary has a negative effect, the plants develop a phenotype and a transcriptomic profile comparable to a stressful situation or a physiological situation already well known in the literature and called "ammonium syndrome", which negatively affects the growth and life of the body.

RIASSUNTO

L'azoto (N) è uno dei nutrienti fondamentali per la vita delle piante e in generale degli esseri viventi. E' un elemento che consente la crescita e lo sviluppo in quanto componente principale di DNA, RNA, amminoacidi e proteine. Purtroppo, l'aumento sempre più repentino della popolazione umana, passata da 2.5 miliardi di persone del 1950 a oltre 7 miliardi nel 2017, ha richiesto un aumento della produzione da parte delle piante da reddito con un incremento dell'uso di fertilizzanti per rendere le piante più performanti. La produttività delle principali colture di tutto il mondo, ovvero canna da zucchero, mais, grano, soia, riso, come tutte le altre piante, è fortemente dipendente dall'uso di fertilizzanti azotati. Le piante tuttavia mediamente assorbono solo il 50% dell'azoto somministrato a causa della bassa NUE (*Nitrogen Use Efficiency*), ovvero l'efficienza con cui i sistemi vegetali riescono ad assorbire l'azoto. Il rimanente dilava e si riversa sui principali corsi d'acqua portando a pericolosi fenomeni di eutrofizzazione e inquinamento ambientale. La pianta può assorbire l'azoto prevalentemente in due forme, attraverso il nitrato (NO_3^-) oppure attraverso l'ammonio (NH_4^+), il primo oltre a essere un nutriente funge anche da molecola segnale all'interno della pianta. Questo studio si è concentrato sulla comprensione degli effetti comuni e specifici del nitrato e dell'ammonio su piantine di *Zea mays* B73. Oltre a questi due trattamenti è stato affiancato un terzo trattamento in cui le piante erano invece in una situazione di carenza di azoto (-N). Le analisi fatte sono state di tipo fisiologico, allevando le piante nei tre diversi trattamenti per un determinato periodo di tempo e osservando il tipo di fenotipo che sviluppavano, trascrittomico valutando il tipo di trascritti che le piante producevano durante gli allevamenti, e bioinformatico analizzando attraverso specifici software di *Gene Ontology* i trascritti prodotti, e cercando di interpretare in maniera corretta i cluster che ne sono risultati. I risultati ottenuti hanno evidenziato un effetto positivo del nitrato sulla crescita, almeno a livello fisiologico, infatti la lunghezza della radice primaria, l'area delle foglie e la biomassa totale delle piantine erano mediamente superiori, anche significativamente rispetto al trattamento in ammonio e in -N. Per quanto riguarda l'analisi dei trascritti e della *Gene Ontology* un importante effetto correlato al nitrato è sicuramente l'abbassamento del trasporto del nitrato stesso verso l'apoplasto e una diminuzione della risposta al nitrato, oltre a una regolazione negativa dei sistemi di detossificazione dalle ROS. I valori di clorofilla e flavonoidi analizzati tramite

DUALEX SCIENTIFIC™ riportano livelli significativamente superiori sia per il trattamento in nitrato che in -N rispetto alla situazione in ammonio, questo può essere un chiaro segnale dello stato di salute della pianta. Il trattamento con ammonio invece, ha portato durante le analisi fisiologiche ad avere un fenotipo con diffuse clorosi e necrosi, e in genere con una biomassa totale minore del 70% rispetto alle stesse piante trattate con nitrato. Come già detto le analisi con DUALEX SCIENTIFIC™ riportano livelli inferiori di clorofilla e flavonoidi rispetto agli altri due trattamenti, indice che la pianta è in uno stato sofferenza, inoltre gli antociani sono statisticamente superiori alle altre due piante. Per quanto riguarda l'analisi degli amminoacidi, in generale l'ammonio stimola una produzione degli amminoacidi liberi specialmente in glutammato, prolina, cisteina e tirosina. La *Gene Ontology* ha portato a identificare che molti geni regolati positivamente dall'ammonio riguardano fitormoni generalmente associati allo stress biotico quali acido salicilico, acido abscissico ed etilene, oltre ad un'espressione di geni codificanti per fattori di trascrizione importanti per la risposta allo stress. La presenza di ammonio sembra dunque indurre un fenotipo e un profilo trascrittomico assimilabili a quelli che si manifestano in condizione di stress, determinando una situazione fisiologica già ben nota in letteratura e chiamata "*ammonium syndrome*".

1 INTRODUZIONE

1.1 Importanza dell'azoto per le piante coltivate

L'azoto è ritenuto uno degli elementi minerali più importanti per la crescita delle piante. Esso infatti è fondamentale per la costruzione di DNA e RNA, enzimi, proteine e altre parti indispensabili per il metabolismo di ogni pianta. Il ciclo dell'azoto è una parte essenziale della vita sulla terra. L'azoto si trova infatti in altissima percentuale in atmosfera, ben infatti il 78% di azoto bimolecolare (N_2) contro appena il 21% d'ossigeno e l'1% di altri gas. Tuttavia, questo azoto non è utilizzabile direttamente dalle piante, ma solo da batteri azotofissatori, microrganismi in grado di convertire l'azoto bimolecolare atmosferico in ammonio. Questi batteri possono essere liberi nel suolo o associati in mutualismo con piante (la pratica del sovescio è usata spesso con le leguminose ed è utile ad incrementare questo tipo di batteri). I batteri simbiotici rendono immediatamente disponibile l'azoto alla pianta, mentre i batteri liberi nel suolo producono l' NH_4 . Questo ammonio può essere trasformato in una forma più facilmente assorbibile dalla pianta attraverso l'intervento dei batteri nitrificatori (NO_2^-) e dei batteri nitratori (NO_3^-). La componente di ammonio tuttavia è anche aumentata dalla presenza dei degradatori (specie appartenenti al regno dei funghi e dei batteri), organismi in grado di decomporre molecole di natura organica in molecole più semplici quali l'ammonio. Il 10% dell'azoto fissato non ha provenienza biologica, infatti esso è prodotto da eventi meteorologici quali i fulmini, quest'ultimi sono in grado di ossidare l'azoto atmosferico che si trasforma in forme reattive dell'azoto (NO_x), le quali sono poi trasportate al suolo dalle piogge. La mancanza di azoto produce una serie di effetti negativi e che compromettono la vita della pianta stessa nonché la produzione delle piante da reddito. Una carenza d'azoto per la pianta, può comportare diversi effetti negativi quali clorosi, necrosi, appassimento, diminuzione della produttività, morte (Wen *et al.*, 2019). Per evitare i problemi di carenza, l'industria chimica ha sviluppato nei decenni passati, prodotti in grado di fornire alle piante tutto l'azoto a loro necessario. Purtroppo, ciò ha determinato un inquinamento significativo delle falde acquifere, questo perché oltre il 50% dell'azoto somministrato alle piante non viene assorbito. Questo azoto presente nel suolo dilava molto facilmente, penetra nelle falde acquifere e da qui arriva ai bacini idrici più rilevanti fino a sfociare nel mare. Le alghe marine riescono a sfruttare l'azoto non utilizzato,

si riproducono e si accrescono molto più velocemente di quello che farebbero in condizioni normali, causando pericolosi fenomeni di eutrofizzazione. Il problema eutrofico non è dato tanto dalla velocità di riproduzione di queste alghe, ma dalla decomposizione del materiale organico morto. Questo infatti comporta un superlavoro da parte dei batteri decompositori, i quali consumano molto più ossigeno del normale lasciando l'acqua in uno stato ipossico o nel peggiore dei casi anossico. Gli altri organismi perciò cominciano a morire a causa della mancanza d'ossigeno causando gravi danni ambientali ed economici (Misra *et al.*, 2016). Uno dei metodi artificiali più utilizzati per produrre concimi ricchi in azoto è il processo di Haber-Bosch. Estremamente dispendioso a livello energetico, esso utilizza alte pressioni e alte temperature, nell'ordine di 150-300 atm e 350-550 °C per ottenere ammoniaca a partire da azoto e idrogeno atmosferico.

L'azoto non assorbito dipende, tra il resto, anche dalla NUE (*Nitrogen Use Efficiency*), l'efficienza d'uso dell'azoto, che rapporta l'azoto somministrato totale a quello effettivamente assorbito o utilizzato dalle piante.

L'apparato radicale riesce ad assorbire in maniera efficiente sia forme inorganiche che organiche di azoto. Inoltre questo tipo di molecole hanno la funzione di molecole segnale all'interno della pianta (Fredes *et al.*, 2019). Recenti studi hanno portato ad ipotizzare che la zona di transizione dell'apice della radice primaria di mais, situata tra il meristema apicale e la zona di allungamento, possa giocare un ruolo importante nella percezione del nitrato (Manoli *et al.*, 2014, Trevisan *et al.*, 2015),.

1.2 Efficienza dell'uso dell'azoto

L'efficienza dell'uso dell'azoto o NUE (*Nitrogen Use Efficiency*), è un parametro complesso che consente di definire la biomassa totale o la resa in granella prodotta per unità di fertilizzante applicato N (Xu *et al.*, 2012).

Si tratta di un parametro molto difficile da definire, in quanto dipende da molteplici fattori genetici e ambientali che interagiscono e contribuiscono a regolare la NUE in ogni fase del metabolismo dell'N, ma anche dal tipo e dalla gestione del suolo, dalle interazioni con i microrganismi, dalla natura della fonte N, dal clima (Moll *et al.*, 1982) e dall'assorbimento, traslocazione e assimilazione di N (Hirel *et al.*, 2007).

L'efficienza complessiva di utilizzo di N delle piante comprende sia l'efficienza di assorbimento (assorbimento di N / N disponibile dal suolo) sia l'utilizzazione (sostanza secca o resa proteica / assorbimento di N) e può essere calcolata come:

$$UpE \times UtE = Nt / Ns \times Gw / Nt = Gw / Ns$$

Dove: UpE = efficienza N di assorbimento; UtE = efficienza N di utilizzo; Nt = N totale trasportato ai semi; Ns = N totale fornito all'impianto; Gw = peso totale dei semi di grano (Mcallister *et al.*, 2012).

Sono stati proposti vari metodi per aumentare la NUE, l'idea migliore è coltivare cultivar molto efficienti nell'uso dei nutrienti e applicare pratiche di gestione ottimali. Nel caso specifico del mais, si è visto che anche in carenza di azoto comunque esso mantiene una buona NUE (Machado e Fernees, 2001), ma in ogni caso una bassa disponibilità di azoto dà come effetto principale una scarsa resa produttiva (Presterl *et al.*, 2003).

Un'altra opportunità per migliorare la NUE potrebbe derivare dalla sovraespressione di geni coinvolti nell'assimilazione e assorbimento dell'azoto, tuttavia anche questo approccio ha avuto risultati non soddisfacenti (Good *et al.*, 2004).

Resta chiaro il fatto che migliorare la NUE sembra essere una strada molto promettente per contrastare il fenomeno crescente d'inquinamento delle acque e allo stesso tempo mantenere stabile la produzione agricola. Tuttavia, i meccanismi genetici che regolano l'assimilazione d'azoto rimangono ancora oggi poco noti o sconosciuti, e saranno necessari ulteriori studi di approfondimento su questo complesso argomento.

1.3 Il Mais

Zea mays è un cereale che è stato addomesticato per la prima volta dalle popolazioni indigene dei territori messicani nel 5000 a.C. (Ranum *et al.*, 2014).

Si stima che nei prossimi anni la popolazione umana arriverà a toccare i 9.5 miliardi di persone entro il 2050 (Kochian, 2016), al di là dell'insostenibilità di questo aumento demografico il mais sicuramente avrà un ruolo importante nella nutrizione umana nei prossimi decenni, come già lo ha oggi (Hirel *et al.*, 2007). Il mais contribuisce all'industria alimentare con la produzione di una gran quantità di prodotti, quali dolcificanti, olio, bevande, colla, alcol industriale e alimenti per il bestiame (Chapple *et al.*, 2015). Inoltre possiamo trovarlo come etanolo combustibile (Ranum *et al.*, 2014) o addirittura come

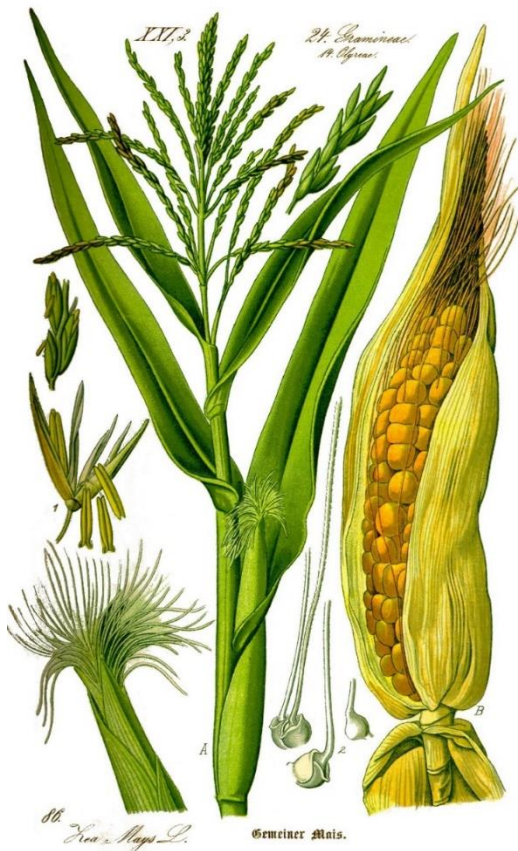


Figura 1.1: Illustrazione di mais. Si possono notare molto bene i fiori maschili (pennacchio) e quelli femminili (pannocchia). (Thomè *et al.*, 1886)

plastica biodegradabile (Sagnelli *et al.*, 2017).

Negli ultimi 55 anni, dal 1961 al 2016, la produzione mondiale di cereali è aumentata del 325%, passando da 876 Mt a 2848 Mt per anno. Il mais ha subito invece un incremento del 500%, passando da 205 Mt a 1060 Mt, esso rappresenta dunque il 37% di tutti i cereali prodotti nel mondo con un'area complessiva di coltivazione di ben 186 milioni di ettari, un'area grande quasi quanto il Messico (FAO, 2018).

1.3.1 Il ciclo del mais

Il seme del mais germina formando un apparato radicale che resta in funzione per tutto il ciclo della pianta. Le temperature minime per la germinazione sono di 12° C, sotto queste non si ha germinazione. Le radici arrivano fino a 2 metri di profondità se il terreno è soffice (Wang *et al.*, 2017), la levata inizia circa 1 mese dopo la semina, circa 2 mesi dopo la semina inizia la fioritura.

Il fiore maschile si chiama pennacchio e si trova in cima alla pianta, è una spiga dove i fiori sono portati da spighette. La parte femminile è una spiga ascellare ed è chiamata pannocchia, quella che è identificata anche nel linguaggio comune. La fecondazione è incrociata solo nell'1% dei casi in natura, la maturazione avviene dopo circa 40 giorni dalla fecondazione. La prima maturazione lattea si manifesta con un valore di acqua del 40%, proseguendo abbiamo la maturazione cerosa.

Il processo produttivo inizia con la cariosside che pesa circa 0.3 g, e finisce 150 giorni dopo con la stessa cariosside che pesa 500 g. Questa pianta è uno degli organismi viventi con il più elevato tasso di sviluppo di accrescimento, la produzione ad ettaro è data da circa 20 - 25 tonnellate di sostanza secca.

La massima efficienza produttiva si ha con forte radiazione solare e alte temperature comunque non superiori ai 30°C. (Boone *et al.*, 2016)

1.4 **L'azoto e le piante**

1.4.1 Assorbimento del nitrato

L'assorbimento del nitrato è dato dal flusso generato dalla differenza di potenziale idrico tra suolo e atmosfera, è assorbito successivamente dalle cellule del sistema radicale attraverso un trasporto di tipo attivo. L'energia per l'*uptake* è fornita dalla pompa H⁺ - ATPasi la quale permette l'approvvigionamento di nitrato anche a condizioni esterne/interne molto differenti e contro gradiente. È stato ipotizzato un meccanismo di simporto in contemporanea alla pompa H⁺ - ATPasi in cui assieme al nitrato entrano nella cellula anche due ioni H⁺ (Crawford e Glass, 1998), con un aumento della carica complessiva positiva del citosol.

Sono stati identificati almeno tre sistemi attivi di assorbimento del nitrato: cHATS, iHATS e LATS. cHATS è un sistema di trasporto attivo che funziona a basse concentrazioni

esterne di nitrato, è il primo che viene attivato in seguito ad esposizione di NO_3^- . iHATS è indotto in seguito a cHATS ed ha sempre un'alta affinità per NO_3^- ma anche per NO_2^- mentre LATS è un sistema di trasporto a bassa attività, si presume che quest'ultimo sia uno dei più diffusi nei terreni delle *crop* in quanto questi sono saturati artificialmente da azoto proveniente dai fertilizzanti (Cerezo *et al.*, 2007).

I trasportatori del nitrato appartengono a quattro principali famiglie geniche che sono state studiate in *Arabidopsis* (Léran *et al.*, 2014; Noguero e Lacombe, 2016; O'Brien *et al.*, 2016):

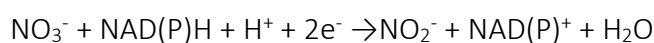
- Nitrate Transporter 1 / Peptide Transporter (NPF)
- Nitrate Transporter 2 (NRT2)
- Chloride Channel (CLC)
- Slow Anion Associated Channel Homolog (SLC/SLAH)

In *Arabidopsis* numerosi sono i trasportatori della famiglia NPF che codificano per le proteine LATS e NRT2 e allo stesso tempo codificano per le proteine HATS, coinvolte nell'assorbimento dei nitrati dal terreno (Kant, 2018). La famiglia CLC codifica per i due trasportatori H^+/NO_3^- ed è composta da CLCa e CLCb. Il primo ha una maggiore selettività per il nitrato, mentre il secondo invece ha una maggiore affinità per il cloruro. La famiglia SLAC1/SLAH codifica per due canali anionici che sono responsabili dell'efflusso del nitrato nelle cellule di guardia della pianta, e quindi condiziona l'apertura e la chiusura degli stomi (Wang *et al.*, 2012). La famiglia NPF è caratterizzata da 53 geni noti e 139 geni nelle piante superiori divisi in otto sottofamiglie (Chiasson *et al.*, 2014; Noguero e Lacombe, 2016).

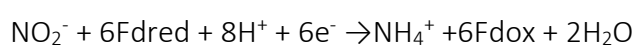
1.4.2 Assimilazione del nitrato

Una volta assorbito dalla pianta, il nitrato deve essere assimilato in amminoacidi attraverso una serie di reazioni coadiuvate da diverse tipologie di enzimi, il nitrato può anche essere stipato temporaneamente all'interno dei vacuoli prima dell'assimilazione (Kant, 2018). L'assimilazione dei nitrati può avvenire nelle radici o nei germogli, questo dipende dalle singole specie vegetali, solitamente con elevata disponibilità di nitrati vengono utilizzati preferibilmente i germogli in quanto hanno una migliore efficienza energetica (Krapp *et al.*, 2011). L'assimilazione del nitrato NO_3^- comporta inizialmente una

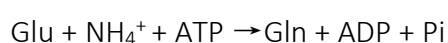
riduzione del nitrito NO_2^- da parte dell'enzima citosolico nitrato reduttasi (Fischer *et al.*, 2005), con consumo di energia sottoforma di NAD(P)H:



Il nitrito NO_2^- è molto tossico per le cellule vegetali e viene ridotto in ammonio (NH_4^+) dalla nitrito reduttasi plastidica (Mifflin, 1974), usando ferrodossina ridotta (Fd) questo enzima catalizza il trasferimento di sei elettroni in NO_2^- (Sakakibara *et al.*, 2012).



L'ammonio prodotto dalla pianta attraverso la riduzione dei nitriti, derivante dalla fotorespirazione o assorbito direttamente dal suolo come descritto nel paragrafo precedente viene poi assimilato principalmente attraverso l'azione combinata della glutammina sintetasi (GS) e del glutammato sintetasi (GOGAT)(Cren e Hirel, 1999; Ben J Mifflin e Habash, 2002). In particolare, l'ammonio viene inizialmente combinato con glutammato per formare glutammina, attraverso una reazione ATP-dipendente catalizzata da GS. In alternativa può essere catalizzato da carbamoilfosfato sintetasi (CPSase) e immagazzinato sotto forma di arginina (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010)



Successivamente grazie all'attività della GOGAT, vengono prodotte due molecole di glutammato (Suzuki e Knaff, 2005):



Dal glutammato, l'azoto può essere trasformato in qualsiasi altro amminoacido a seconda dello stato della pianta in quel determinato momento (Trucillo *et al.*, 2017). L'N assimilato è trasportato all'interno della linfa sottoforma di glutammina e glutammato, ma anche di asparagina e aspartato (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Per la conversione della

glutammina in asparagina e del glutammato in aspartato sono richiesti due enzimi aminotransferasi: asparagina sintetasi (AS) e aspartato aminotransferasi (AspAT) (Lam *et al.*, 1996).

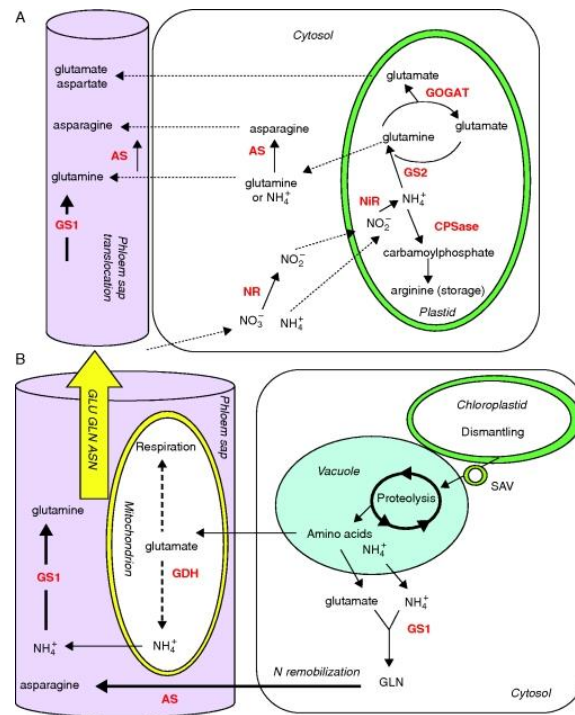


Figura 1.2: Presentazione schematica degli enzimi chiave coinvolti nella assimilazione dell'azoto nelle piante. Nitrato reductasi (NR) e asparagina sintetasi (AS) sono localizzati nel citosol mentre la nitrito reductasi (NiR), la glutammina sintetasi 2 isoenzima (GS2), la glutammato sintasi (GOGAT) e il carbamoilfosfato sintetasi (CPSase) all'interno dei plastidi delle cellule del mesofillo. L'isoenzima 1 della glutammina sintetasi (GS1) e l'AS si trovano nel citosol delle cellule compagne. Glutammato deidrogenasi (GDH), GS1 e AS sono i principali enzimi coinvolti nella sintesi di glutammina, glutammato e asparagina nel floema. (Masclaux-Daubress *et al.*, 2010).

1.4.3 Le vie di segnalazione del nitrato

La percezione precoce del nitrato nelle piante può essere mediata da specifici trasportatori di nitrati, in particolare il trasportatore $+\text{NO}_3^-$ a doppia affinità NRT1.1/CHL1 e il trasportatore $+\text{NO}_3^-$ a elevata affinità NRT2.1 (Gojon *et al.*, 2011). NPF6.3 è coinvolto invece nella modulazione dell'espressione di un altro trasportatore, l'NRT2.1, in caso di fornitura a breve termine di nitrato NPF6.3 può regolare positivamente NRT2.1, al contrario in condizione di nitrati elevati a lungo termine esso agisce come un feedback negativo su

NRT2.1 (E Bouguyon *et al.*, 2015; Muños *et al.*, 2004). I meccanismi attraverso i quali una proteina trasportatore genera un segnale all'interno della cellula che innesca risposte adattative ai cambiamenti nella disponibilità di nutrienti sono per lo più sconosciuti (Bouguyon *et al.*, 2012). Tuttavia, è stato proposto un modello per spiegare il ruolo di NRT1.1 nella regolazione della crescita delle radici laterali mediante $+NO_3^-$, grazie alla sua capacità di trasportare non solo $+NO_3^-$, ma anche l'auxina (Krouk *et al.*, 2010). Infatti, NRT1.1 è espresso nell'epidermide dell'apice del primordio della radice laterale e, a bassa concentrazione di $+NO_3^-$, è in grado di trasportare l'auxina, reprimendo la crescita della radice laterale promuovendo il trasporto di auxina basipetale alla radice primaria. Al contrario, un'alta concentrazione di $+NO_3^-$ inibisce questo trasporto di auxina NRT1.1 dipendente, favorendo così l'accumulo di ormoni nell'apice laterale e la conseguente crescita della radice laterale. Da un punto di vista molecolare, due geni sono stati identificati come fattori chiave di questa via di segnalazione: ANR1 e AFB3 (Bouguyon *et al.*, 2012). Un altro componente importante della segnalazione dei nitrati è AFB3 (Auxin signaling F-box protein 3) che appartiene ai gruppi di recettori F-box per auxina (Auxin signaling F-box protein). E' espresso principalmente nell'apice della radice e nel periciclo, si è scoperto che è l'unico gene recettore delle auxine rapidamente indotto da $+NO_3^-$ (Vidal *et al.*, 2010). Ciò suggerisce che, oltre a modulare il flusso di auxina grazie all'attività NRT1.1, il nitrato può anche aumentare la sensibilità all'auxina nelle radici attraverso la stimolazione dell'espressione di AFB3 (Bouguyon *et al.*, 2012).

Il nitrato inoltre, secondo una serie di studi, potrebbe regolare l'espressione di moltissimi geni:

- Geni responsabili del trasporto e assimilazione del nitrato, quali NR, NiR e molti altri trasportatori di nitrati (Bouguyon *et al.*, 2012; Krapp *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2000),
- Geni coinvolti nella regolazione dell'espansione delle foglie (Liu *et al.*, 2000),
- Geni che regolano la dormienza dei semi (Alboresi *et al.*, 2005),
- Geni coinvolti nella regolazione della fioritura (Taulemesse *et al.*, 2015),
- Geni che regolano la crescita, sviluppo e architettura del sistema radicale (Zhang *et al.*, 1999)

In *Arabidopsis thaliana* circa il 10% del genoma è direttamente influenzato dal nitrato (Bouguyon *et al.*, 2012; Marchive *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2000).

La rete totale di regolazione in risposta al nitrato è molto complessa e ancora oggi non del tutto nota, anche se sono stati identificati moltissimi fattori trascrizionali (Kant, 2018). NPL7 (Nodule Inception-Like Protein 7) per esempio, è un membro della famiglia di trascrizione RWK-RK, ed è coinvolto nella segnalazione, nel trasporto e nell'assimilazione dei nitrati (Marchive *et al.*, 2013). Il nitrato va a regolare fattori di trascrizione all'interno della pianta come SPL9 (Squamosa Promoter-binding-like Protein 9), che è coinvolto nella modulazione dell'espressione di diversi trasportatori del nitrato (Krouk *et al.*, 2010). TGA1 e TGA4 (Teosinte Glume Architecture) sono implicati nella crescita delle radici laterali a seguito della percezione del nitrato (Alvarez *et al.*, 2014). TCP20, è anch'esso coinvolto nella regolazione della crescita delle radici laterali verso aree del suolo ricche di nitrati (P. Guan *et al.*, 2014). L'acronimo TCP deriva dal nome delle proteine in cui è stato inizialmente descritto questo dominio: Teosinte Branched 1 (TB1) da *Zea mays*, Cycloidea (CYC) da *Antirrhinum majus* e Proliferating Cell Factors 1 e 2 (PCF1 e PCF2) da *Oryza sativa* (De Paolo *et al.*, 2015). Ci sono, inoltre, tre fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia degli LOBD (Lateral Organ Boundary Domain) (LBD37, LBD38 e LBD3) e facenti parte del gruppo dei *zinc finger*, la cui espressione è fortemente regolata da elevate concentrazione di NO₃ (Rubin *et al.*, 2009).

Infine, due chinasi chiamate CIPK8 e CIPK32 (CBL-Interacting Protein Kinase), sono state identificate come importanti regolatori della risposta al nitrato, queste proteine vanno anche a interagire con il calcio (Wang *et al.*, 2018). In particolare si è visto che nei mutanti NPF6.3 la loro induzione è venti volte inferiore, suggerendo quindi una via di regolazione con quest'altra proteina (Ho *et al.*, 2009). Inoltre, molti studi segnalano una regolazione post-traduzionale per il controllo del nitrato nell'attività di assorbimento (Jacquot *et al.*, 2017)

1.4.4 L'assorbimento dell'ammonio

Alcune piante nel corso dell'evoluzione, hanno sviluppato sistemi di assorbimento orientati prevalentemente all'approvvigionamento di ammonio. La somiglianza a livello chimico tra potassio e ammonio ha fatto ipotizzare un sistema di assorbimento simile di queste due molecole, attraverso un sistema complesso di co-trasporto con protoni in presenza di basse concentrazioni di ammonio, mentre un trasporto passivo quando le

concentrazioni di ammonio sono alte (Muños *et al.*, 2004). Il trasporto dell'ammonio attraverso le membrane cellulari è effettuato da una famiglia di proteine integrali di membrana molto conservati dal punti di vista filogenetico, l'*Ammonium Transporter Family* (AMT/MEP/Rh)(Winkler, 2006). I membri di questa famiglia di trasportatori condividono diverse proprietà, tra cui la loro alta affinità, alta selettività e capacità di saturazione in presenza di ammonio a concentrazioni < 1 mM (Marini *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 2007). Le proteine AMT (*Ammonium Transporter Channel*) identificate nei batteri (*Escherichia coli*) ma presenti in piante, in lievito (metilammonio permeasi 2, MEP2) e cordati (Rh)(von Wittgenstein *et al.*, 2014) sono composte da un trimero complesso, con ogni monomero costituito da 11 transmembrane-*spanning* eliche. Ognuna delle tre subunità ha un poro che consente il passaggio dell'ammonio, l'undicesima elica è collegata a un C-terminale citosolico che interagisce fisicamente con le subunità adiacenti (Erade *et al.*, 2005).

Le analisi filogenetiche hanno mostrato che il C-terminale citosolico è conservato in più di 700 omologhi di AMT tra batteri, funghi e piante. Negli eucarioti la maggior parte degli studi sono stati eseguiti sul lievito *Saccharomyces cerevisiae* e nelle piante con il modello *Arabidopsis thaliana*. Al livello trascrizionale l'espressione dei trasportatori dell'ammonio dipende in gran parte dalla disponibilità di azoto, come per i trasportatori del nitrato d'altra parte (Gazzarrini *et al.*, 1999; Marini *et al.*, 1997).

Tuttavia, molti studi hanno portato alla luce l'importanza della regolazione post-traduzionale per il controllo dell'ammonio nell'attività di assorbimento. Questo livello di regolazione potrebbe essere particolarmente importante per la protezione contro alte concentrazioni di ammonio nel suolo, limitando post-trascrizionalmente la produzione dei trasportatori ed evitando quindi un'intossicazione della pianta.

In *Arabidopsis thaliana* abbiamo cinque omologhi appartenenti ad AMT, AMT1.1-AMT1.5 i quali costituiscono il clade AMT (von Wirén *et al.*, 2000). Quattro di questi cinque omologhi sono espressi nelle radici e sono up-regolati in uno stato di carenza dell'azoto (Birnbaum *et al.*, 2003; Gazzarrini *et al.*, 1999; Sohlenkamp *et al.*, 2002). Non ci sono tuttavia prove che AMT2.1 contribuisca all'assorbimento di ammonio (Sohlenkamp *et al.*, 2002), mentre misurazioni che sono state fatte direttamente sulle radici mediante tDNA mostra che AMT1.1, AMT1.2 e AMT1.3 contribuiscono in maniera significativa all'assorbimento con alta affinità per l'ammonio in piante di *Arabidopsis* carenti di azoto (Kaiser *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2007). Come MEP2 nel lievito, AMT1.1 è attivato e

disattivato direttamente dal C-terminale. L'ammonio innesca la fosforilazione di un residuo di treonina altamente conservato (Thr460), nel C-terminale di AMT1.1 in modo dipendente dal tempo di esposizione e la concentrazione dell'ammonio stesso (Lanquar *et al.*, 2009; Loqué *et al.*, 2007).

Questa fosforilazione di Thr460 in risposta ad un aumento di ammonio si correla con una riduzione dell'attività di assorbimento da parte delle radici. E' interessante vedere quindi al contrario del trasportatore di lievito MEP2, che la forma inattiva di AMT1.1 corrisponde al suo stato fosforilato. Non è noto perché trasportatori così simili come AMT1.1 e MEP2 siano regolati dalla fosforilazione in maniera opposta. Tuttavia, a differenza di MEP2 o NRT1.1, AMT1.1 non è coinvolto nella rilevazione di ammonio ma solo come trasportatore (Lima *et al.*, 2010).

Ad oggi solo AMT1.3 ha mostrato di innescare risposte di segnalazione all'ammonio, come l'inizio della crescita della radice laterale in risposta alla localizzazione dell'ammonio, suggerendo un ruolo di rilevamento per questo trasportatore (Lima *et al.*, 2010).

Attualmente non sono stati segnalati geni che codificano per proteine LATS finalizzate al trasporto dell'ammonio ma è stato pubblicato un articolo (Chiasson *et al.*, 2014) in cui una proteina della soia ha questa tipologia di trasporto.

1.4.5 L'assimilazione dell'ammonio

L'assimilazione dell'ammonio, derivante dal nitrato o direttamente assorbito dalle radici, è dovuta al lavoro della glutamina sintetasi e della glutammato sintetasi (GS, GOGAT). GS catalizza la reazione di amminazione trasformando il glutammato in glutammina con consumo di ATP. GOGAT in seguito catalizza il trasferimento di un gruppo amminico dalla glutammina al 2-oxoglutarato, con produzione di due molecole di glutammato e consumando NADP(H) o ferredossina, in questo modo l'ammonio riesce a essere assimilato completamente (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). L'isoforma cloroplastica GS2 (Glutammina sintetasi 2), assimila l'ammonio generato dalla riduzione dei nitrati e dalla fotorespirazione delle foglie, mentre l'isoforma GS1 contenuta nel citosol, è la forma principale presente nelle radici e incorpora l'ammonio prelevato dal suolo (Ishiyama *et al.*, 2004; Lam *et al.*, 1996). Su cinque geni GS1 in *Arabidopsis thaliana* (GLN1.1 – GLN1.5), GLN1.2 è il principale isoenzima a contribuire all'assimilazione dell'ammonio

(Guan *et al.*, 2016; Lothier *et al.*, 2011), e nelle radici è fortemente indotto dalla presenza di ammonio esterno (Guan *et al.*, 2016; Ishiyama *et al.*, 2004). Inoltre il mutante GLN1.2 con bassa attività della GS mostra elevato accumulo di ammonio e alterazione della crescita delle piante, suggerendo che GLN1.2 non è solo essenziale per l'assimilazione dell'ammonio ma anche per la disintossicazione delle radici (Guan *et al.*, 2016; Lothier *et al.*, 2011).

In *Arabidopsis* NADH-GOGAT è la maggiore isoforma nelle radici e la sua espressione è fortemente indotta dall'apporto di ammonio esogeno. Il mutante *knockout* NADH-GOGAT mostra un'assimilazione meno pronunciata per l'ammonio, e uno sviluppo anomalo di biomassa nella pianta (Konishi *et al.*, 2014). Inoltre il ciclo GS-GOGAT è una via alternativa per l'assimilazione dell'ammonio utilizzando la glutammato NADH-deidrogenasi (GDH), che sintetizza il glutammato nel citosol usando ammonio e 2-ossoglutarato, questa reazione è regolata positivamente dalla fornitura di ammonio (Cruz *et al.*, 2006; Sarasketa *et al.*, 2014; Tercé-Laforgue *et al.*, 2004).

A bassa disponibilità di azoto anche il GDH mitocondriale può disamminare il glutammato in 2-ossoglutarato e rilasciare ammonio, le analisi del trascrittoma hanno indicato infatti che GDH2 che codifica per la subunità alfa di GDH, serve come misuratore sensibile all'ammonio nelle radici di *Arabidopsis* (Patterson *et al.*, 2010; Ristova *et al.*, 2016).

1.4.6 Le vie di segnalazione dell'ammonio

Una risposta fisiologica immediata da parte delle cellule radicali esposte a alte concentrazioni di ammonio è una depolarizzazione transitoria della membrana plasmatica, causata dall'attivazione della pompa H⁺-ATPasi (Wang *et al.*, 1994). Parallelamente, inizia l'alcalinizzazione del citosol (Gerendás e Ratcliffe, 2000; Kosegarten *et al.*, 1997), indice che il primo effetto a breve termine di esposizione all'ammonio è inevitabilmente il cambio di pH intracellulare.

L'ammonio una volta entrato nella cellula è responsabile della sintesi di alcune molecole del metabolismo secondario chiamate terpeni, queste sono fondamentali nelle piante produttrici di resina, la quale protegge la pianta stessa da batteri e funghi (Engelsberger e Schulze, 2012). Analisi del trascrittoma hanno rilevato cambiamenti

altamente dinamici in risposta all'ammonio, a breve termine infatti vengono indotti significativamente i geni riguardanti la difesa delle piante o geni che solitamente si attivano in risposta all'acido jasmonico.

A lungo termine invece (sopra le otto ore), l'ammonio regola i geni coinvolti nei processi metabolici, nella produzione o rimozione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) in risposta allo stress esterno (Patterson *et al.*, 2010). Lo stress esterno è molto probabilmente causato dalla presenza dell'ammonio stesso, a causa dell'acidificazione dell'apoplasto delle cellule radicali, infatti ben il 21-40 % dei geni sensibili all'ammonio, sono regolati positivamente dal basso pH esterno.

Durante una fase d'intossicazione di ammonio, gli aminoacidi in eccesso vengono esportati, questa esportazione è guidata dalla pompa "Usually Multiple Amino acids Move In e out Transporters" (UMAMITs), che è coinvolta all'interno del floema nel caricamento o secrezione di aminoacidi nell'ambiente esterno (Besnard *et al.*, 2016). In particolare UMAMIT14, UMAMIT33 e UMAMIT19, sono regolate dall'esposizione di ammonio (Besnard *et al.*, 2016; Patterson *et al.*, 2010). Gli specifici meccanismi che regolano l'assorbimento, assimilazione e disintossicazione da ammonio nelle radici sono stati solo parzialmente caratterizzati. È interessante notare come l'induzione dell'espressione di alcuni geni, come GDH2 (Glutamate Dehydrogenase 2) e UMAMIT14 normalmente regolati positivamente dall'ammonio, siano invece poco espressi a seguito di un trattamento con GS-MSX (Glutamine Synthetase Inhibitor Methionine Sulfoximine) (Besnard *et al.*, 2016; Patterson *et al.*, 2010), il quale è un repressore della produzione di glutammina e glutammato, aminoacidi fondamentali per l'organizzazione dell'ammonio. Questo ci fa capire la diretta relazione tra i livelli di ammonio e la produzione di glutammina/glutammato all'interno della pianta.

L'ammonio sembra essere anche implicato nella regolazione dell'orologio circadiano della pianta attraverso il regolatore CCA1 (Circadian Clock Associated 1). In piante *knockout* per questo gene si è visto una diminuzione significativa dell'espressione dei geni ASN1 (Asparagine Synthetase 1), GLN1.3 (Glutamine Synthetase), GDH1 (Glutamate Dehydrogenase) i quali sono tutti coinvolti nell'assimilazione dell'azoto nella pianta. I meccanismi di regolazione non sono del tutto noti ma si suppone che CCA1 intervenga attraverso un dominio bZIP e induca l'espressione di tutti gli altri geni (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Nelle radici di pomodoro (Fernández-Crespo *et al.*, 2015), *Arabidopsis* (Patterson *et al.*, 2010) e riso (Xie *et al.*, 2015) l'ammonio aumenta i livelli di H₂O₂. Inoltre, l'ammonio attiva gli enzimi di depurazione dai ROS come le catalasi, glutatione reduttasi e le perossidasi (Patterson *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2015), mentre l'attivazione delle superossido dismutasi ci indica che possono formarsi anche radicali superossido. Come effetto a valle l'esposizione ad ammonio migliora la resistenza ad attacchi patogeni e attiva la difesa mediata da Acido Abscissico e putrescina (Fernández-Crespo *et al.*, 2015). Numerosi studi hanno riportato una possibile interazione tra ammonio e acido abscissico, in *Ricinus communis* il trasporto di ABA attraverso lo xilema aumenta di tre volte in presenza di ammonio (Peuke *et al.*, 1998). In riso, l'ammonio aumenta la resistenza alla siccità, in quanto apre i canali di acquaporina facilitando il passaggio di acqua nelle radici (Ding *et al.*, 2016).

In *Arabidopsis*, la proteasi intermembrana plastidiale AMOS1/EGY1 è stata identificata come un importante collegamento che integra ABA con la risposta della pianta all'ammonio (Jacquot *et al.*, 2017). Analisi del trascrittoma hanno rivelato che il 90% dei geni in risposta all'ammonio era regolato da AMOS/EGY1, questi geni portano al loro interno un motivo centrale il quale è sensibile a valori diversi di ABA. L'ammonio dunque dovrebbe innescare la clorosi fogliare, ma la risposta dipendente da AMOS1/EGY1 recluta ABA che impedisce il danneggiamento delle foglie (Jacquot *et al.*, 2017).

Sebbene l'ammonio sembri attivare una moltitudine di vie trascrizionali all'interno della pianta, di fatto solo alcune sono state completamente chiarite. Per esempio il gene IDD10 in riso è un attivatore di molti geni coinvolti nell'assorbimento di ammonio nel metabolismo della pianta (Xuan *et al.*, 2013). IDD10 è regolato negativamente dall'ammonio stesso e dalla glutammina. E' stato identificato un altro fattore di trascrizione in GmbHLHm1 dalla soia, questo è localizzato nei simbionti all'interno dei noduli radicali che si possono sviluppare all'interno delle radici della pianta. Questo fattore aumenta il trasporto dell'ammonio (Chiasson *et al.*, 2014)

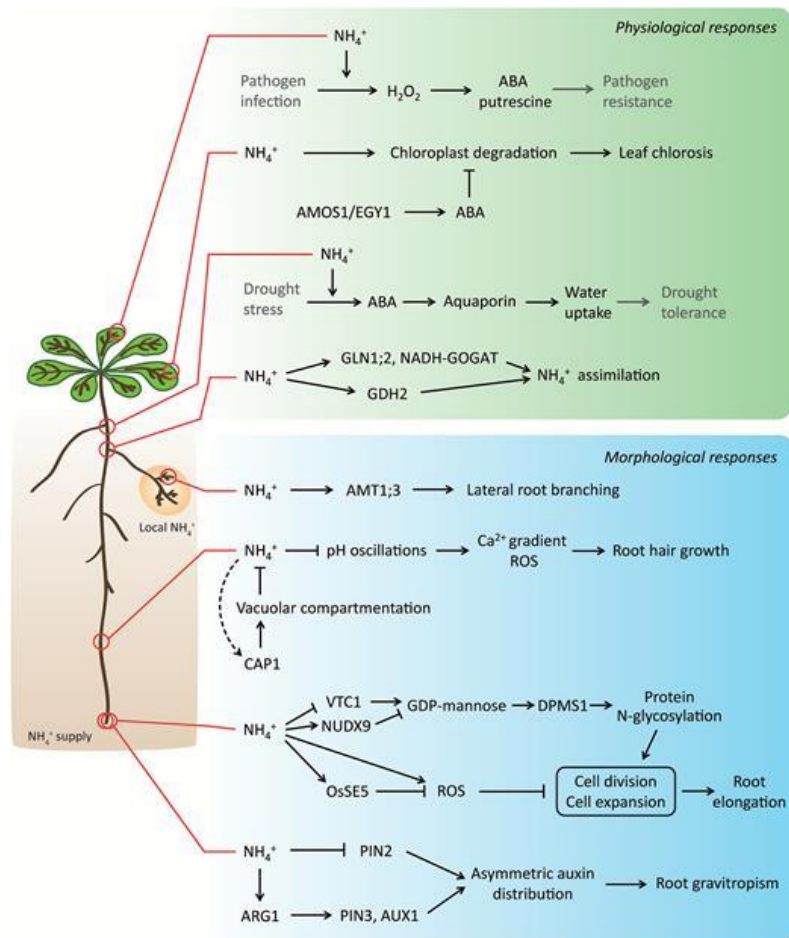


Figura 1.3: Serie di risposte fisiologiche e morfologiche che l'ammonio può dare all'interno di piante di *Arabidopsis*. (Liu e Von Wirén, 2017)

1.4.7 Risposta trascrittomico e fisiologica a nitrato e ammonio

Una varietà di effetti contrastanti sono state descritti nello stato fisiologico e trascrittomico in piante a cui è stato fornito nitrato e ammonio, ad esempio un tasso più elevato di amminoacidi nelle piante trattate con ammonio (Chaillou *et al.*, 1991; Cramer e Lewis, 1993). L'attività di numerosi enzimi è indotta o repressa a seconda del tipo di trattamento che viene impiegato, la nitrato reduttasi e nitrito reduttasi, sono specificamente indotte dal nitrato, mentre altri enzimi come la glutammato deidrogenasi, diverse ossidasi e deidrogenasi di tipo II NAD(P)H sono indotte solo dall'ammonio (Escobar *et al.*, 2006; Frechilla *et al.*, 2002; Goodchild e Givan, 1990). L'ammonio e il nitrato hanno anche effetti diversi sul livello del pH nel suolo, determinando alcalinizzazione nel caso del nitrato e acidificazione nell'ammonio (Crawford e Forde, 2002), inoltre molte piante

sembrano non crescere vigorose a livello fenotipico se nutrite per lunghi periodi con ammonio, questa sindrome detta “tossicità dell’ammonio” non è ancora del tutto compresa (Britto e Kronzucker, 2002). A livello ecologico-evoluzionistico ci sono piante che si sono adattate molto bene a terreni con alti tassi di ammonio quindi acidi, basta pensare alle piante appartenenti al genere *Hydrangea*, mentre molte prosperano solamente con terreni alcalini (Falkengren-Grerup e Schöttelndreier, 2004). Nonostante il fatto che nitrato e ammonio abbiano chiari effetti diversi sulla pianta, finora gli studi trascrittomici si sono concentrati molto di più sul nitrato, in particolare tramite utilizzo di microarray (Bi *et al.*, 2007; Birnbaum *et al.*, 2003; Gifford *et al.*, 2008; Scheible *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2000). Questi studi hanno dimostrato che fornire nitrato a piante di *Arabidopsis* carenti di azoto induce una massiccia risposta trascrizionale con conseguente regolazione positiva dei percorsi coinvolti nella biosintesi di aminoacidi e acidi nucleici, nella trascrizione dell’RNA, degli ormoni, del metabolismo in generale. Più recentemente, diversi studi hanno mostrato differenze nelle risposte molecolari del nitrato in un mutante *knockout* per la nitrato reductasi NR-Null (Rongchen Wang *et al.*, 2004) e nel mutante CHL1-1 (nuovo nome di NRT1.1 ovvero Nitrate Transporter 1.1) (Ho *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009). Entrambi i mutanti sono stati prodotti con *Arabidopsis thaliana*.

Il nitrato e l’ammonio inducono rapidamente l’espressione di geni che codificano per fattori di trascrizione quali le proteine chinasi e fosfatasi. Alcuni articoli hanno riportato che attraverso studi di Gene Ontology (Yang *et al.*, 2017) si sono identificate le aree in cui questi geni operano, prevalentemente la funzione molecolare, componente cellulare e processo biologico della cellula. Un esperimento precedente a questa ricerca, è stato fatto su delle piantine di riso, che sono state mantenute in condizioni di alte concentrazioni di nitrato d’ammonio per soli 30 minuti. Questo surplus ha indotto l’espressione di 35 geni che codificano per proteine nucleari di tipo chinasi, le quali possono agire come secondo messaggero e amplificare segnali a valle per rispondere alla presenza di nutrienti nel sistema radicale del riso. L’espressione dei 35 geni risulta essere indotta di 100 volte già dopo 15 minuti dall’inizio del trattamento. Come già riportato glutammina e glutammato, sembrano ricoprire ruoli fondamentali nella regolazione della risposta trascrittomica sia alla presenza di nitrato e ammonio (Ruffe *et al.*, 2008).

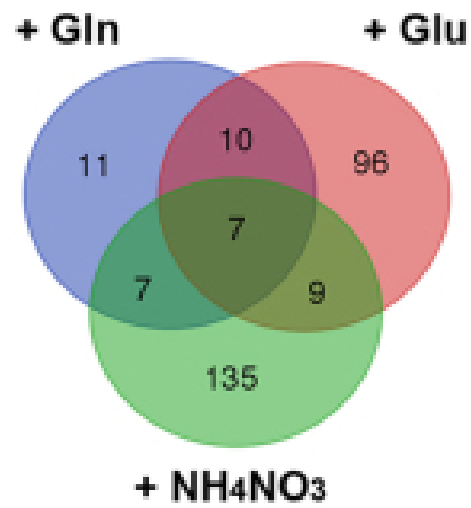


Figura 1.4: Diagramma di Venn che illustra i geni trascritti in presenza di glutammina, glutammato e ammonio/nitrato (Yang *et al.*, 2017)

2 SCOPO DEL LAVORO

L'azoto è uno delle componenti fondamentali per la vita di tutte le piante, permette la crescita, il mantenimento e la difesa della pianta stessa. Suoli ricchi di azoto sono indispensabili per la produttività delle piante da reddito quale anche il mais, tuttavia per mantenere gli standard che il mercato richiede è necessario per le aziende agricole avvalersi di fertilizzanti a base di azoto, che permettono di mantenere una produttività alta a fronte di tutte le varie condizioni ambientali. Questo lavoro nasce dall'idea che le due forme principali di azoto assorbite dalle piante, ovvero l'anione nitrato NO_3^- e il catione ammonio NH_4^+ , possano avere effetti ben distinti sulle piante sia a livello fisiologico che trascrittomico. Per provare a validare questa ipotesi è stato impostato un allevamento in camera di crescita in soluzione idroponica che ha permesso di comprendere il tipo di fenotipo che le piante sviluppavano nelle diverse situazioni, dando evidenza che le piante non si comportavano in maniera medesima anche se la fonte fornita ad esse, era sempre azoto. Per approfondire perciò la questione ci si è avvalsi dell'analisi dei trascritti tramite *RNA-sequencing*, la quale è stata determinante per comprendere che tipo di meccanismi vengono attivati in risposta alle differenti fonti azotate. I trascritti sono stati poi annotati e divisi in clusters con un arricchimento di *Gene Ontology* e *MapMan*, permettendo quindi di identificare le varie categorie di geni attivati o spenti in maniera esclusiva o condivisa da nitrato e/o da ammonio. I risultati così ottenuti hanno permesso di dare un senso al tipo di risposta fisiologica osservata durante l'allevamento. I risultati ottenuti hanno permesso di mettere in luce alcuni aspetti fondamentali della risposta di mais a queste due importanti forme azotate.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Analisi fisiologiche e fenotipiche

3.1.1 Condizioni di crescita del Mais

I semi utilizzati durante gli esperimenti fanno parte della linea pura di mais B73. Per ottenere le piantine, i semi sono stati imbibiti per 2 ore con acqua demineralizzata, quindi risciacquati e seminati ad una distanza di 1 cm l'uno dall'altro su strisce di carta da filtro bagnata con acqua demineralizzata. La germinazione dei semi è avvenuta all'oscurità per tre giorni a 25°C, arrotolando le strisce di carta da filtro con i semi ed inserendole in verticale all'interno di becher. In questo modo si simulano le condizioni che i semi hanno in campo, quindi all'oscurità, con umidità relativa alta e gravitropismo positivo.

Dopo la germinazione, le piantine sono state allevate singolarmente in tubi di vetro da 33 mL con soluzione idroponica, e messe in una camera di crescita con 14 ore di luce e 10 ore di buio, 25°C di temperatura, 70-90% di umidità relativa e 280 $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ di condizioni luminose. Per garantire un giusto apporto di ossigeno alle radici, ogni piantina aveva a disposizione un tubo che insufflava aria all'interno della soluzione nutritiva. Tutte le piantine sono state allevate per 24 ore in una soluzione priva di N come pretrattamento, quindi sono stati avviati tre tipologie di trattamenti: soluzione carente di azoto (-N), soluzione completa fornita di azoto sottoforma di nitrato ($+\text{NO}_3^-$ 1 mM) e soluzione completa fornita di azoto come ammonio ($+\text{NH}_4^+$ 1mM). Gli esperimenti sono stati condotti con tre repliche biologiche per trattamento, ogni replica aveva 20 piante. La soluzione idroponica usata è una Hoagland modificata con di base gli stessi macro- e micro-elementi in tutte le tre tesi, mentre l'unico nutriente differenziale forniva o meno la fonte azotata, cioè KCl per il trattamento in -N, KNO_3 per trattamento $+\text{NO}_3^-$ e NH_4Cl per trattamento $+\text{NH}_4^+$ (Tabella 3.1).

| Macroelementi | μM | Microelementi | μM |
|--|---------------|-------------------------|---------------|
| KNO_3 / KCl / NH_4Cl | 1000 | FeNaEDTA | 10 |
| MgSO_4 | 200 | H_3BO_3 | 4,6 |
| CaCl_2 | 200 | MnCl_2 | 0,9 |
| KH_2PO_4 | 40 | CuCl_2 | 0,036 |
| | | ZnCl_2 | 0,086 |
| | | NaMoO_4 | 0,011 |

Tabella 3.1: Elenco dei macro e microelementi usati per la soluzione idroponica

Le piante sono state allevate nei 3 diversi trattamenti da 24 h (T1) a 7 giorni (T7), cambio della soluzione nutritiva ogni due giorni (Tabella 2.2).

| T ₀ | T ₁ | T ₂ | | T ₇ |
|--------------------|----------------|----------------|--|----------------|
| 24h pretrattamento | 1° giorno | 2° giorno | | 7° giorno |
| -N | -N | -N | | -N |
| | NO_3 | NO_3 | | NO_3 |
| | NH_4 | NH_4 | | NH_4 |

Tabella 3.2: Schema dell'allevamento, dopo 24h di pretrattamento in -N, considerato come giorno 0 (T₀), le piante sono state divise a seconda del tipo di trattamento fino a T₇(giorno settimo). Le analisi fatte sono state T₁ per l'analisi bioinformatica mentre nei giorni T₃, T₆ e T₇ è stato fatto il rilevamento con DUALEX SCIENTIFIC™. Tx si riferisce al giorno x dell'allevamento, T₁ primo giorno, T₂ secondo, ecc. T₀ è il giorno di pretrattamento in cui tutte le piante sono state messe nella soluzione -N

3.1.2 Analisi pigmenti fogliari

Per misurare i valori di clorofilla (CHL), flavonoidi (FLV) e antociani (ANTH) è stato impiegato lo strumento DUALEX SCIENTIFIC+™ (Force-A, Orsay, France)(Fig. 3.1). Lo strumento calcola automaticamente anche il valore di NBI (Nitrogen Balance Index) ovvero il rapporto tra clorofilla e flavonoidi. Questo rapporto è molto importante da rilevare in quanto ci indica la salute dei metabolismi primari e secondari della pianta compreso il metabolismo del carbonio e dell'azoto (Cerovic *et al.*, 2005). La fluorescenza viene calcolata con un primo segnale vicino all'infrarosso che viene confrontato con una secondo segnale specifico per i polifenoli, verde per gli antociani e UV-A per i flavonoidi. La clorofilla invece è calcolata attraverso l'emissione di una luce rossa che quantifica la clorofilla, e poi

infrarosso che ridimensiona questo valore a seconda della struttura fogliare (Goulas *et al.*, 2004).

DUALEX SCIENTIFIC+™ permette di avere i dati dalla foglia senza recare alcun danno a essa o alla pianta, il tutto con un'operazione che dura qualche secondo. La lettura è stata



Figura 3.1: Applicazione dello strumento *in vivo*

fatta sempre in duplicato, nei giorni T₃, T₆ e T₇. Per valutare il contenuto di flavonoidi sono state fatte letture su entrambe le facce della foglia. Le foglie devono avere un'area minima di 20 mm² per permettere allo strumento di dare una misura veritiera, mentre con foglie molto piccole la lettura non è possibile, per questo non è possibile fare misurazioni nei primi giorni del trattamento (Cerovic *et al.*, 2012). I dati sono stati poi analizzati tramite test statistico ANOVA (n=30) e rappresentati come media delle tre repliche ± errore standard. Per ciascun trattamento sono state eseguite tre repliche biologiche.

3.1.3 Campionamento, Peso Fresco, Scanning e Misura Aree

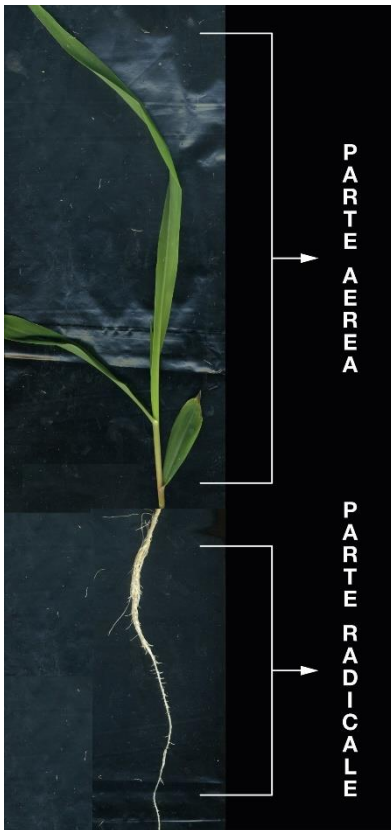


Figura 3.2: Piantina di Mais scansionata. La parte radicale verrà separata da quella aerea per calcolarne i pesi, le aree e per il campionamento

Le piante nei giorni T_1 e T_7 (in due allevamenti diversi) sono state tolte dai propri supporti di crescita evitando di danneggiare le radici, le quali sono la parte più delicata, successivamente sono state scannerizzate nella loro parte aerea e radicale e analizzate utilizzando il programma di elaborazione immagini ImageJ (<https://imagej.nih.gov>). Si è quindi calcolato l'area dell'apparato radicale e dell'apparato apicale di ogni singola pianta (Fig. 3.2), in modo da poter comprendere le differenze in termini di crescita nei vari trattamenti. Dopo questa operazione le due parti sono state tagliate nella zona di divisione tra radice e fusto e pesate, per verificare il cambiamento di peso nei vari trattamenti e poter distinguere differenze significative. Infine, per l'analisi degli amminoacidi eseguita successivamente le piante sono state congelate in azoto liquido. Tutte queste operazioni richiedono molto tempo ma devono essere operate in maniera più celere possibile per non degradare gli amminoacidi da analizzare.

3.1.4 Quantificazione degli Amminoacidi

Per analizzare gli amminoacidi presenti in radici e foglie le piante provenienti dal T_7 dell'allevamento sono state campionate e divise nella parte aerea e radicale, infine conservate in azoto liquido in provette differenti per ogni trattamento. I campioni di piante conservate in azoto liquido sono stati accuratamente pestellati fino ad ottenere una polvere molto fina, il tutto mantenendo la temperatura degli strumenti sempre molto bassa per evitare uno scongelamento del campione. Questi campioni sono stati inviati al laboratorio del prof.sso Dall'Acqua del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università di Padova per l'analisi mediante HILIC-MS/MS (Hydrophilic interaction

chromatography-Teem Mass Spectrometry). Qui sono state preparate soluzioni standard calcolando la quantità esatta di ciascun amminoacido in una soluzione diluita di HCl (0,5 M) in quattro diverse concentrazioni da 10 µg / ml a 1 µg / ml. Sono stati pesati 100 mg per ogni campione e gli amminoacidi sono stati estratti mediante ultrasuoni con la soluzione di HCl per 10 minuti a temperatura ambiente, la soluzione è stata poi centrifugata. Per l'idrolisi, è stato aggiunto acido tricloroacetico al 15% (10 ml) e i campioni sono stati lasciati a 80°C per una notte. Il pH della soluzione è stato quindi aggiustato mediante una soluzione di ammoniaca (33%) pH 2.0 e le soluzioni sono quindi state utilizzate per l'analisi. Si è utilizzata una colonna Z-HILIC Agilent, con fase stazionaria (3 x 100 mm, 4 micron) e con eluente l'acetonitrile (A) e l'acido formico (B) all'0.5%.

La portata è di 0.450 µL/min. Ogni transizione di aminoacidi è stata ottimizzata con la soluzione standard corrispondente. Le transizioni sono riportate come segue:

| Compound | Polarity | Q1 | Q3 | Capillary Collision Dwell Time | | |
|-----------------|-----------------|-----------|-----------|---------------------------------------|--------|-------|
| glycine | Pos. | 76.00 | 30.30 | 40.000 | 8.000 | 0.100 |
| alanine | Pos. | 90.00 | 44.50 | 40.000 | 8.000 | 0.100 |
| serine | Pos. | 106.00 | 60.40 | 30.000 | 8.500 | 0.100 |
| proline | Pos. | 116.00 | 70.30 | 40.000 | 10.500 | 0.100 |
| valine | Pos. | 118.00 | 72.40 | 30.000 | 8.500 | 0.100 |
| threonine | Pos. | 120.00 | 74.40 | 30.000 | 8.000 | 0.100 |
| cystine | Pos. | 122.00 | 75.70 | 30.000 | 11.500 | 0.100 |
| isoleucine | Pos. | 132.00 | 86.50 | 40.000 | 7.000 | 0.100 |
| leucine | Pos. | 132.00 | 86.50 | 40.000 | 7.500 | 0.100 |
| asparagine | Pos. | 133.00 | 87.40 | 40.000 | 6.500 | 0.100 |
| aspartic acid | Pos. | 134.00 | 74.30 | 33.876 | 12.000 | 0.100 |
| glutammine | Pos. | 147.00 | 84.40 | 30.000 | 14.000 | 0.100 |
| lysine | Pos. | 147.10 | 84.40 | 30.000 | 13.500 | 0.100 |
| glutamic acid | Pos. | 148.00 | 83.70 | 30.000 | 13.000 | 0.100 |
| methionine | Pos. | 150.00 | 133.40 | 38.318 | 6.000 | 0.100 |
| histidine | Pos. | 156.10 | 110.00 | 40.000 | 9.500 | 0.100 |
| phenylalanine | Pos. | 166.10 | 119.60 | 40.000 | 9.500 | 0.100 |
| arginine | Pos. | 175.10 | 70.40 | 40.000 | 18.000 | 0.100 |
| tyrosine | Pos. | 182.10 | 135.60 | 40.000 | 10.000 | 0.100 |
| tryptophan | Pos. | 205.10 | 187.60 | 40.000 | 7.000 | 0.100 |

I dati rappresentano la media di tre repliche (n = 6) ± Errore standard (SE). Per l'analisi statistica, i dati derivati dal trattamento +NO₃⁻ o +NH₄⁺ rispetto a quelli delle piante di controllo (-N) sono stati testati con il test ANOVA e considerati significativamente diversi con P < 0.05.

3.2 Analisi Bioinformatica

Durante il tirocinio ho elaborato dei dati provenienti da un'analisi di *RNA sequencing* (RNA seq) ottenuti da parte di una tesi precedente alla mia ma non ancora analizzati. In questo lavoro si è sequenziato l'RNA estratto da 1.5 cm di apice radicale di piantine di mais trattate per 24 h con soluzione idroponica in carenza di azoto (-N) e per le successive 24 h (T1) ancora con carenza d'azoto (-N), oppure fornite con nitrato (+NO₃⁻) o con ammonio (+NH₄⁺). Lo scopo di questa analisi bioinformatica era determinare quali geni venivano sovra-espresi o sotto-espresi in risposta al trattamento con nitrato o con ammonio rispetto alla situazione in carenza d'azoto (-N).

3.2.1 Elaborazione delle letture di sequenziamento e analisi delle espressioni differenziali

Il sequenziamento è stato eseguito utilizzando Illumina Pipeline presso il centro di ricerca interdipartimentale per le biotecnologie innovative di Padova (CRIBI). Le sequenze grezze risultanti (23–35 milioni per libreria) sono state elaborate usando Trimmomatic 0.33 (Bolger *et al.*, 2014). Le sequenze filtrate risultanti sono state mappate sul genoma di riferimento del mais B73 (RefGen ZmB73 Assembly AGPv4 e Zea_mays.AGPv4.38.gtf annotazione della trascrizione di Gramene, Tello-Ruiz *et al.*, 2018) con Tophat 2.0.13 (D. Kim *et al.*, 2013) utilizzando le seguenti modifiche rispetto ai parametri predefiniti: dimensione massima dell'introne, 60.000; dimensione minima introne, 5; tollerate fino a tre discrepanze. I file di allineamento di sequenza (formato BAM) sono stati quindi filtrati utilizzando Samtools (H. Li *et al.*, 2009) per rimuovere gli allineamenti con MAPQ inferiore a 1 (corrispondente a letture multi-mappate assegnate a più di 10 posizioni genomiche diverse). Le analisi delle espressioni differenziali sono state eseguite con Cuffdiff v2.2.1 (Trapnell *et al.*, 2013) selezionando le seguenti opzioni: multi-read-correct; compatible-hits-norm; dispersion-method per condition; library-norm-method quartile. I geni che mostravano un FDR (*False Discovery Rate*) con un valore di p-value ≤ 0.05 sono stati considerati geni espressi in modo differenziale (DEG). Il clustering gerarchico dei DEG è stato eseguito utilizzando il software Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>) e visualizzati come una *heat map*.

3.2.2 Gene Ontology, arricchimento e analisi funzionale

L'arricchimento dei termini GO è stato determinato confrontando il numero di termini GO nei geni con espressione differenziale (DEG, *Differential Expressed Gene*) con il software Ontologizer (Bauer *et al.*, 2008) utilizzando l'approccio *term-for-term* per l'analisi statistica di sovra-rappresentazione e una correzione di Bonferroni per test multipli. L'annotazione è stata ottenuta dal progetto mais-GAMER (Wimalanathan *et al.*, 2018). L'analisi funzionale dei DEG è stata effettuata utilizzando il software MapMan (Thimm *et al.*, 2004; Usadel *et al.*, 2009) e la sovra-rappresentazione delle categorie è stata determinata utilizzando il test di Fisher e i *p-value* risultanti sono stati adeguati secondo Benjamini e Hochberg (Benjamini e Hochberg, 1995). Un valore di *cut-off* critico al 0.05 (corrispondente a un punteggio $Z \geq 1.96$) è stato applicato per selezionare le categorie arricchite statisticamente significative.

4 RISULTATI

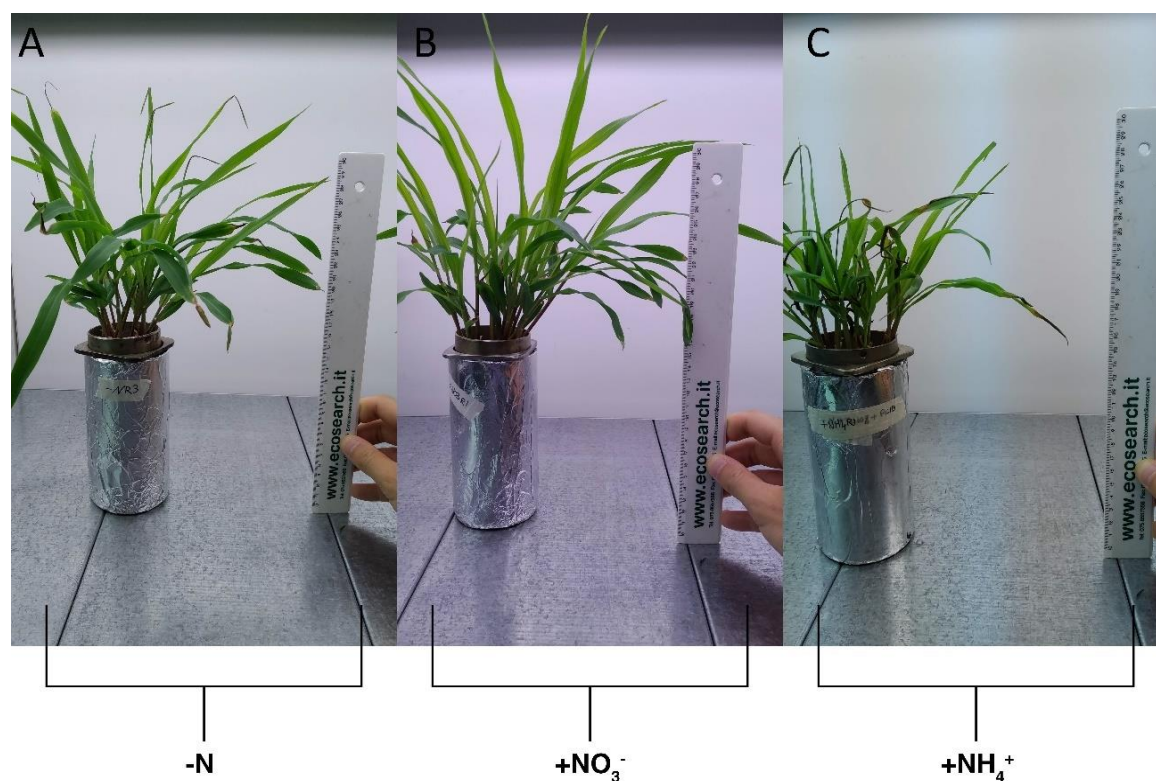


Figura 4.1: Piante trattate in -N (A), +NO₃⁻ (B) e +NH₄⁺ (C) nel giorno T₇. Piante di mais nel settimo giorno di trattamento nei loro supporti. E' stata messa un righello di fianco a ciascun vaso per mostrare la crescita differenziale tra i tre diversi trattamenti.

4.1 Lunghezza e area

Dopo sette giorni dall'inizio del trattamento (T₇) la radice primaria delle piante, le aree delle foglie e l'area delle radici sono state misurate. La lunghezza della radice primaria è stata misurata anche a un giorno dall'inizio del trattamento (T₁). Le piante trattate con NO₃⁻ o con NH₄⁺ hanno sviluppato una netta differenza di lunghezza della radice primaria e di area sia delle foglie che delle radici (Fig. 4.1). Le piante trattate con -N hanno un comportamento medio tra +NO₃⁻ e +NH₄⁺, infatti la lunghezza della radice primaria è inferiore a +NO₃⁻ ma superiore di NH₄⁺, e si osserva lo stesso comportamento per l'area delle foglie, mentre l'area delle radici è statisticamente superiore sia ad ammonio che a nitrato. Le piante trattate con NH₄⁺ hanno sviluppato un chiaro deficit di crescita in tutti i campi, sono infatti fenotipicamente più tozze e visibilmente in uno stato di sofferenza. La

lunghezza della radice primaria, l'area media delle foglie e delle radici sono statisticamente inferiori rispetto a -N (-100% per le foglie, -75% per le radici) e +NO₃⁻ (-117% per le foglie, -50% per le radici). Al contrario le piante trattate con nitrato sembrano godere di una condizione vantaggiosa, infatti la lunghezza della radice primaria è il 14% più lunga rispetto alle piante in carenza di azoto (-N), e il 60% più lunga rispetto a quelle trattate con ammonio (Fig. 4.2-A). Significativa anche la differenza delle aree delle foglie tra piante trattate con ammonio e nitrato, le foglie trattate con NO₃⁻ sono infatti il 100% più ampie rispetto a quelle trattate con NH₄⁺ (Fig. 4.2-B). Confrontando le due diverse fonti azotate con il trattamento -N, si può osservare come l'ammonio riduca del 46% l'area sia di foglia che radice, mentre il nitrato induce un significativo aumento dell'area fogliare (+10%) mentre riduce l'area radicale (-17%).

4.2 Pesì

Nel primo giorno (T₁) e settimo giorno dopo l'inizio dei trattamenti (T₇) le piante sono state separate dalla loro parte aerea e radicale e pesate tramite una bilancia di precisione (Fig. 3.2-C-D-E). Il peso fresco delle foglie delle piante trattate in -N e +NO₃⁻ era statisticamente uguale, mentre al contrario le piante trattate con NH₄⁺ presentavano un peso fogliare ridotto di quasi la metà, un fatto che si può collegare alla scarsa area sviluppata dalle foglie che hanno subito questo trattamento. A livello delle radici si è notata ancora una volta una crescita molto più accentuata nelle piante trattate con NO₃⁻ rispetto a -N e con una differenza del 60% tra le piante trattate con nitrato e quelle trattate con ammonio. Nel primo giorno di trattamento T₁ le piante trattate con nitrato e le -N sono statisticamente uguali, mentre quelle trattate con ammonio hanno valori significativamente più bassi. In T₇ le piante trattate con nitrato presentavano una biomassa totale superiore del 13% rispetto alle piante carenti in azoto e quasi raddoppiata rispetto alle piante trattate con ammonio.

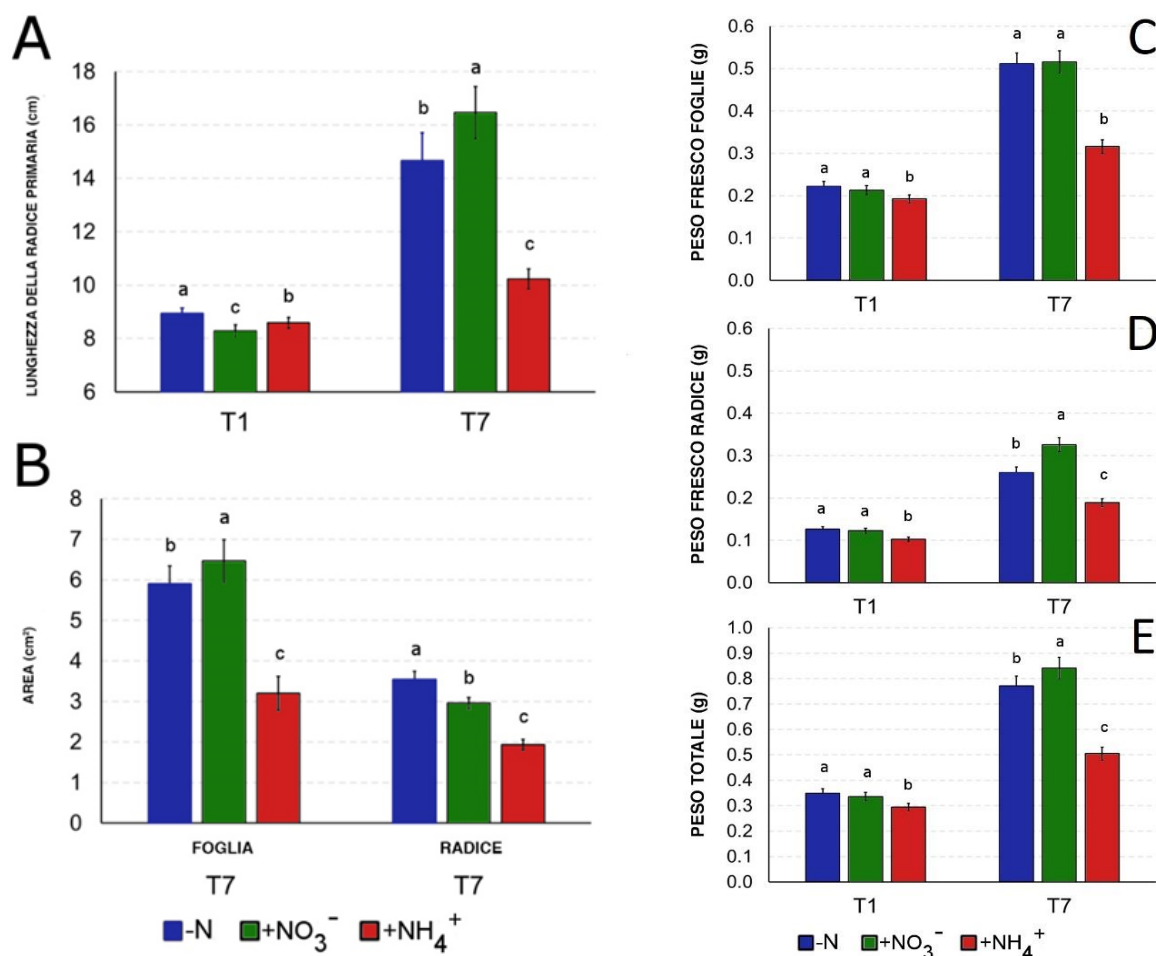


Figura 4.2: Lunghezza della radice prima (A), Area delle foglie (B), Peso fresco delle foglie (C), Peso fresco delle radici (D) e Peso totale (E) delle piante di mais sottoposte ai diversi trattamenti. T₁ sono un giorno di trattamento, T₇ sette giorni di trattamento. Le barre di errore rappresentate indicano la media di tre repliche biologiche, le lettere diverse indicano la differenza statistica tra le barre (p <0,05) da un test ANOVA.

4.3 Analisi con DUALEX SCIENTIFIC™

Come spiegato nel paragrafo 3.1.2 dei materiali e metodi, DUALEX SCIENTIFIC™ è uno strumento che, sfruttando semplicemente l'emissione di luce a varie larghezza d'onda, permette di ottenere informazioni sui pigmenti principali presenti nell'epidermide fogliare, senza recare danno alla pianta. Le componenti verificabili sono clorofilla (CHL, Fig.4.3-A), flavonoidi (FLV, Fig. 4.3-B), NBI (Indice di Bilancio dell'Azoto, Fig. 4.3-C) e antociani (ANTH, Fig. 4.3-D). L'analisi è stata effettuata nelle foglie in T₃, T₆ e T₇, quindi rispettivamente a tre, sei e sette giorni dall'inizio dei trattamenti in carenza di azoto (-N), presenza di azoto come

nitrato ($+NO_3^-$) o come ammonio ($+NH_4^+$). Già dopo tre giorni (T_3) si può vedere una differenza significativa in tutti e tre i trattamenti, in particolare la clorofilla è più alta in ordine in $+NO_3^-$, -N e $+NH_4^+$. Gli antociani invece si accumulano nelle piante trattate con ammonio. L'NBI, è molto alto nelle piante $+NH_4^+$ e statisticamente uguale nelle piante -N e $+NO_3^-$ nei giorni T_6 e T_7 , mentre in T_3 sono anch'essi diversi ma comunque il 100% minori rispetto a $+NH_4^+$. I flavonoidi nel corso dell'esperimento rimangono mediamente più bassi del 50% in $+NH_4^+$ rispetto agli altri due trattamenti, stazionari in -N mentre tendono a diminuire in $+NO_3^-$ fino ad arrivare ai livelli di -N. Anche per quanto riguarda NBI e antociani nei giorni T_6 e T_7 i valori di $+NO_3^-$ e -N tendono ad allinearsi, l'unica cosa che realmente cambia è il valore di clorofilla, il quale risultava statisticamente differente ma comunque molto vicino nei due trattamenti. Per $+NH_4^+$ la clorofilla sale tra T_3 e T_6 aumentando del 19% ma diminuisce visibilmente in T_7 del 21%, per quanto riguarda i flavonoidi si ha invece un trend in diminuzione ma quasi costante, comunque rimane inferiore del 60% rispetto altri due trattamenti in T_7 .

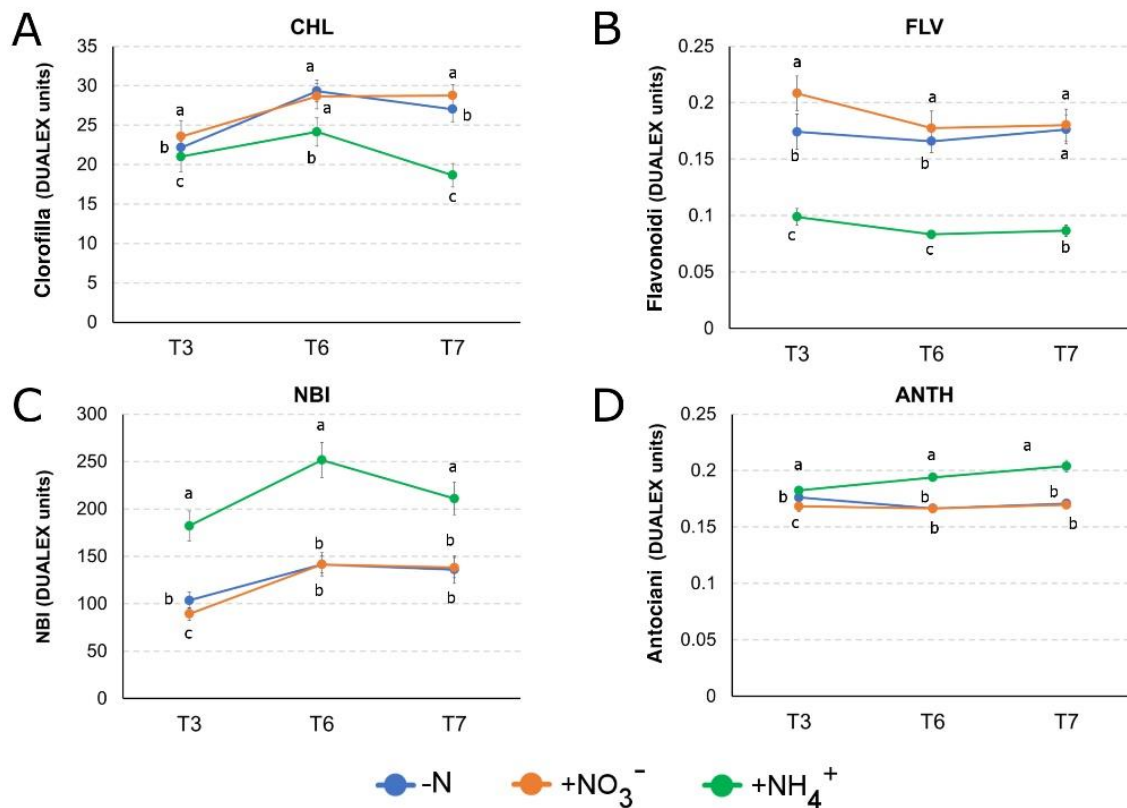


Figura 4.3: Valori di contenuto di clorofilla delle foglie (A), contenuto di flavonoidi delle foglie (B), indice di bilancio dell'azoto NBI (C) e contenuto di antociani delle foglie (D). Le piantine di mais sono state allevate 24 ore in una soluzione nutritiva priva di N e quindi trasferite in una soluzione con N 1 mM (NO₃⁻ o NH₄⁺) o in una soluzione priva di N (-N) per ulteriori 3 giorni (T₃), 6 giorni (T₆) e 7 giorni (T₇). L'assorbanza dell'epidermide è stata ottenuta con il sensore ottico DUALEX SCIENTIFIC™ (Force-A) alla stessa ora di ogni giorno specifico. I valori rappresentano la media di tre repliche ± errore standard (SE) (n = 20). Grazie ad un test ANOVA, lettere simili nel punto corrispondente indicano trattamenti statisticamente non diversi (p < 0.05).

4.4 Amminoacidi

Le piante nel giorno T₇ sono state sottoposte a quantificazione degli amminoacidi, sia nelle radici che nelle foglie. L'analisi ha analizzato sia gli amminoacidi presenti in forma libera che quelli idrolizzati, ovvero quelli che erano presenti al momento del campionamento sottoforma di proteine.

I risultati mostrano un'alta produzione di cisteina negli amminoacidi idrolizzati, presenti sia in radici che foglie, tuttavia i valori risultano significativamente alti anche nelle foglie del trattamento -N, mentre nelle radici il valore più alto si registra in seguito a trattamento con ammonio (+60% rispetto agli altri due trattamenti). Altri risultati significativi sono stati un livello significativamente alto di molti amminoacidi liberi (Ala

alanina, Asn asparagina, Asp aspartato, Glu glutammato, Leu/Ile leucina/isoleucina, Met metionina, Pro prolina, Val valina) all'interno delle foglie da parte delle piante trattate con ammonio. Allo stesso modo si osserva come le piante in -N mostrino un livello significativamente alto di amminoacidi idrolizzati a livello della radice (Ala alanina, Arg arginina, His istidina, Leu/Ile leucina/isoleucina, Phe fenilalanina, Pro prolina, Ser serina, Thr treonina, Val valina). Sia negli amminoacidi idrolizzati delle foglie, che negli amminoacidi liberi delle radici, molti amminoacidi esprimevano lo stesso livello statistico nei diversi trattamenti, ad esempio i livelli di fenilalanina (Phe) e serina (Ser) negli amminoacidi idrolizzati delle foglie, erano uguali nei tre trattamenti senza alcuna differenza statistica. Allo stesso modo asparagina (Asn), metionina (Met), prolina (Pro) e valina (Val) liberi nelle radici avevano lo stesso livello in tutti e tre trattamenti. Esaminando più nel dettaglio possiamo vedere come negli amminoacidi idrolizzati delle foglie, il trattamento in -N mostri valori statisticamente più alti in tutti gli amminoacidi (Fig. 4.4-A), mentre nel caso di istidina (His), leucina/isoleucina (Leu/Ile), prolina (Pro) e treonina (Thr) i livelli risultano staticamente uguali alle piante trattate con ammonio. La metionina (Met) invece è alta sia per le piante -N che per le piante trattate con ammonio, mentre nel caso di fenilalanina (Phe) e serina (Ser) non ci sono differenze statisticamente significative nei tre trattamenti. La situazione cambia negli amminoacidi idrolizzati delle radici (Fig. 3.4-B), in quanto il trattamento -N è generalmente quello che ha valori più alti, tranne nella cisteina (Cys) dove il trattamento con ammonio è significativamente il più alto, mentre gli altri due trattamenti non hanno differenze statistiche. Inoltre, sempre negli amminoacidi idrolizzati delle radici, non c'è differenza statistica tra -N e $+NO_3^-$ in prolina (Pro) e treonina (Thr) mentre l'ammonio rimane sempre significativamente più basso di questi due trattamenti. Negli amminoacidi liberi delle foglie (Fig. 4.4-C) l'ammonio è il trattamento che ha un valore significativamente più alto in assoluto, mentre l'unica eccezione risultano essere arginina (Arg) e istidina (His) dove i tre trattamenti non hanno differenze. Il livello di serina (Ser) nelle piante trattate con ammonio e nitrato risulta essere statisticamente uguale, mentre le piante carenti in azoto hanno valori più bassi del 50%. Per quanto riguarda la tirosina (Tyr), si osserva una diminuzione di questo amminoacido nelle piante trattate con ammonio del 50% rispetto agli altri due trattamenti. In aggiunta, la tirosina risulta essere l'unico amminoacido libero nelle foglie dove l'ammonio risulta più basso rispetto a -N e $+NO_3^-$. Un'altra cosa importante da segnalare, è l'uguaglianza tra -N e $+NO_3^-$, nei livelli di

leucina/isoleucina (Leu/Ile) che rimangono sotto il 150% rispetto al trattamento in ammonio. Infine, il pannello nel pannello degli amminoacidi liberi nelle radici (Fig.4.4-D) mostra molti amminoacidi statisticamente uguali. Il trattamento con ammonio non porta mai ad il valore più alto di amminoacidi, tranne nell'istidina (His) dove è del 75% più abbondante rispetto agli altri due trattamenti. Il trattamento in -N risulta indurre valori di amminoacidi liberi nella radice significativamente più alti solamente in alanina (Ala) e serina (Ser), mentre asparagina (Asn), aspartato (Asp), leucina/isoleucina (Leu/Ile), metionina (Met), prolina (Pro), e valina (Val) risultano statisticamente uguali. Per quanto riguarda le piante fornite di ammonio, il valore significativamente più alto di amminoacidi liberi nella radice risulta essere in glutammato (Glu) e tirosina (Tyr).

In sintesi, il trattamento in -N porta a livelli molto alti di amminoacidi idrolizzati delle radici e bassi invece negli amminoacidi liberi delle foglie, il trattamento in nitrato ($+NO_3^-$) porta a valori di amminoacidi generalmente inferiori o simili a -N, mentre il trattamento in ammonio ($+NH_4^+$) induce invece valori di amminoacidi liberi statisticamente più alti globalmente nelle foglie e in alcuni casi nelle radici.

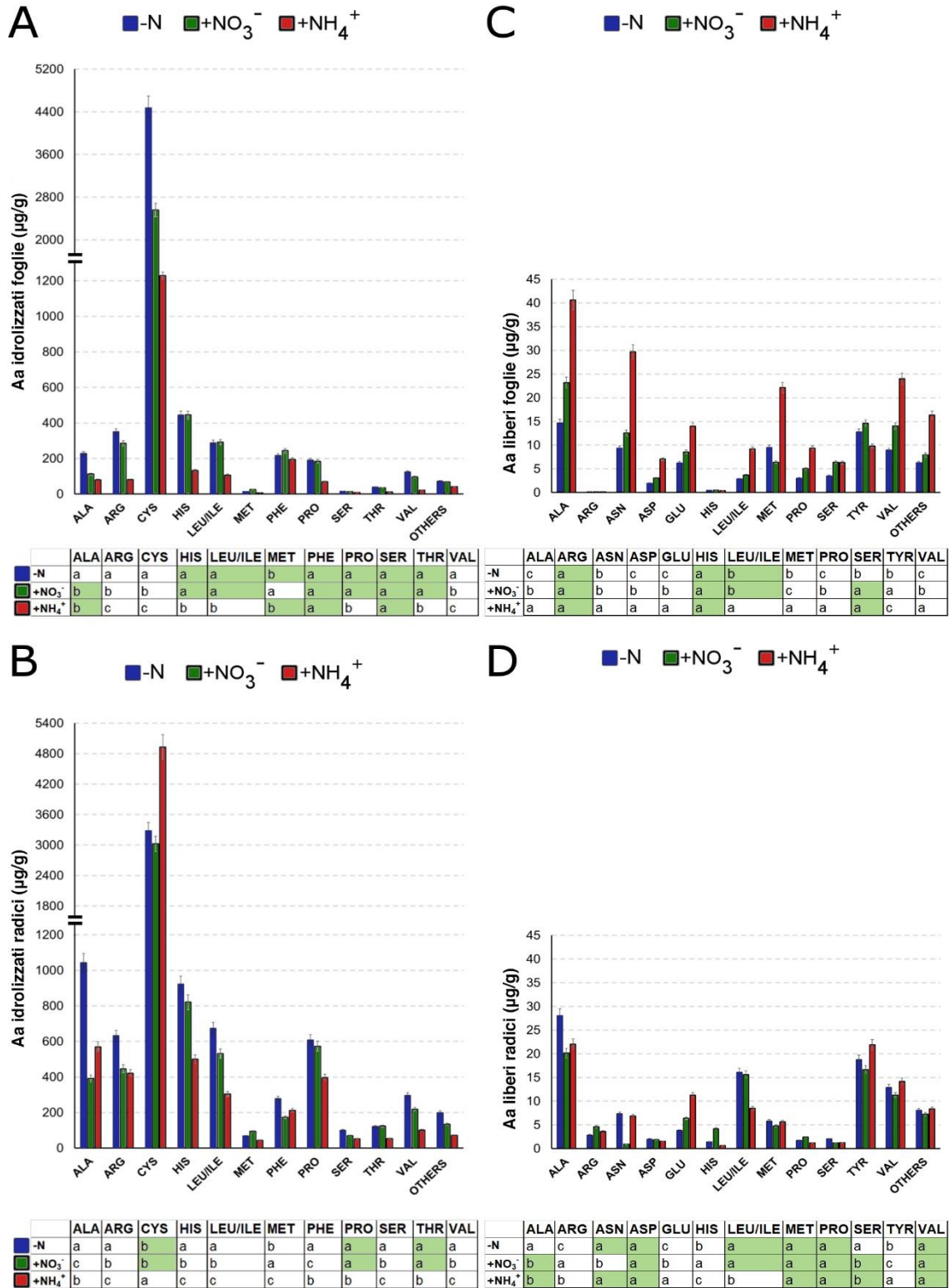


Figura 4.4: Livelli degli aminoacidi idrolizzati (A-B) e degli aminoacidi liberi (C-D) nelle foglie (A-C) e nelle radici (B-D). Per ogni grafico sono riportati i risultati del test ANOVA ($P < 0,05$). Ogni valore è calcolato come media di tre replicati biologici \pm SE ($n = 20$).

4.5 Analisi di espressione genica tramite RNA-seq

La tecnica RNA-Seq è stata impiegata per ottenere il profilo trascrittomico dell'apice della radice del mais in risposta alla carenza di azoto (-N) o alla fornitura di N come nitrato 1 mM (NO_3^-) o ammonio 1mM (NH_4^+), ogni trattamento è stato testato in triplicato. L'RNA è stato estratto da campioni di radice (tre repliche biologiche per ciascun trattamento) ed utilizzato per la preparazione delle librerie per il sequenziamento Illumina. Dopo il sequenziamento, sono state rimosse le *reads* di bassa qualità, ottenendo da 23 a 35 milioni di *reads* di alta qualità per replicato biologico, con circa il 98% di queste mappate sul genoma di riferimento del mais B73. Cuffdiff v2.2.1 (Trapnell *et al.*, 2013) è stato quindi utilizzato per assemblare le *reads* allineate in trascrizioni e stimarne l'abbondanza nelle diverse condizioni (esprese come RPKM - *Reads* per milione di Kilobasi). I valori di espressione genica sono stati quindi utilizzati per identificare i geni espressi in modo differenziale (DEG) confrontando le piante N-supply ($+\text{NO}_3^-$ o $+\text{NH}_4^+$) rispetto alle piante cresciute in N-carenza (-N).

I geni che mostrano un FDR (*False Discovery Rate*) con un p-value ≤ 0.05 sono stati considerati geni espressi in modo differenziale (DEG, *Differentially expressed gene*). L'analisi dell'espressione differenziale ha mostrato un totale di 2613 DEG rilevati tra i confronti di $+\text{NO}_3^-/-\text{N}$ e $+\text{NH}_4^+/-\text{N}$ (Fig. 4.5A). Tra questi, 1349 erano specificatamente regolati da $+\text{NO}_3^-$, mentre 1264 risultavano significativamente regolati da $+\text{NH}_4^+$. I DEG sono stati quindi classificati come up-regolati o down-regolati di conseguenza in base alla direzione della variazione di espressione registrata tra la fornitura di N (NO_3^- o NH_4^+) e i campioni -N. Solo i geni che mostravano un rapporto tra il trattamento azotato ($+\text{NO}_3^-$ o $+\text{NH}_4^+$) e -N pari ad un $\log_2 > 0.58$ (corrispondenti a una variazione di 1.5 volte del livello di espressione) sono stati considerati significativamente influenzati dal rispettivo trattamento. Considerando i trascritti differenzialmente espressi tra i due trattamenti azotati, la maggior parte di essi risultava up-regolata dall'ammonio (45%), subito seguiti da quelli up-regolati dal nitrato (30%) e down-regolati dal nitrato (22%), con solo il 4% di questi down-regolati dall'ammonio (Fig. 4.5A). Tra i 1349 DEG regolati dal nitrato, il 41.9% era significativamente up-regolato e il 58.1% significativamente down-regolato, mentre tra i 1264 DEG regolati dall'ammonio, ben il 92% era significativamente up-regolato e solo l'8% risultava significativamente down-regolato dal catione. I geni up- e down-regolati da

ciascun trattamento, sono stati quindi riuniti in gruppi in base all'entità dei loro cambiamenti di espressione (Fig. 4.5B-C). La maggior parte dei DEG regolati dal nitrato ha mostrato una variazione di \log_2 tra 1 e 2.5 (32%), essendo quindi up-regolati da 2 a quasi 6 volte rispetto al trattamento -N, mentre il 21% mostrava una repressione da 2 a quasi 6 volte ($-2.5 < \log_2 < -1$). Solo il 5.7% e il 2.7% dei trascritti hanno mostrato rispettivamente una maggiore induzione ($\log_2 > 2.5$) o riduzione ($\log_2 < -2.5$) dell'espressione (Fig. 4.5B). D'altra parte, la categoria più rappresentata per i DEG regolati dall'ammonio risultava quella tra $1 < \log_2 < 2.5$, mostrando come quasi il 70% dei geni fossero sovraregolati da 2 a quasi 6 volte dal catione, mentre il 18% risultava indotto più di 6 volte e solo il 5.6% down-regolato da 2 a quasi 6 volte ($-2.5 < \log_2 < -1$) (Fig. 4.5C).

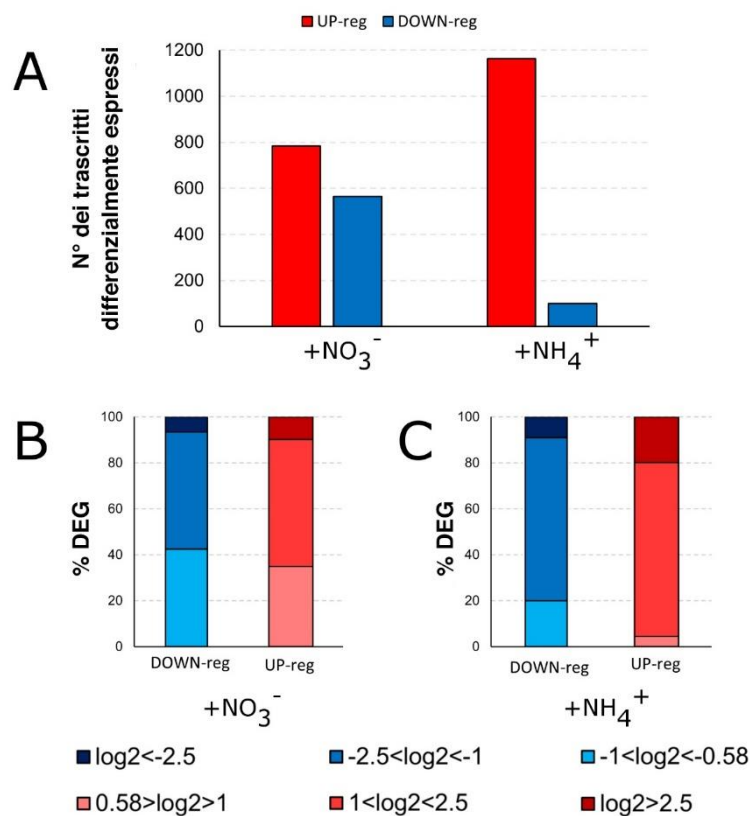


Figura 4.5: Distribuzione dei geni espressi in modo differenziale (DEG) identificati mediante analisi RNA-Seq ($FDR \leq 0.05$) dal confronto tra radice di piantine di mais fornite per 24 ore con $+NO_3^-$ o $+NH_4^+$ rispetto al controllo -N (soluzione nutritiva carente di azoto). I dati sono mostrati come numero di geni espressi in modo differenziale in risposta a ciascun trattamento (A) e come percentuale in $+NO_3^-$ (B) e $+NH_4^+$ (C) sulla quantità totale di DEG. Tra i DEG up- e down-regolati, sono mostrati diversi intervalli di induzione o repressione come \log_2 dei cambiamenti dell'espressione genica (B-C). I DEG sono stati classificati come up-regolati ($+NO_3^- / -N > 0.58$; $+NH_4^+ / -N > 0.58$) o down-regolati ($+NO_3^- / -N < -0.58$; $+NH_4^+ / -N < -0.58$) in base ai loro valori di \log_2 (corrispondenti a un aumento o una diminuzione dell'espressione di 1.5 volte).

Confrontando i DEG regolati in modo differenziale dal nitrato o dall'ammonio (Fig. 4.6), è stato possibile notare solo pochi geni sovrapposti tra le due fonti azotate, ovvero 289 (12.4%). Tra questi, 229 (9.9%) risultavano sovraregolati sia in risposta a NO_3^- che a NH_4^+ , mentre 28 (1.2%) apparivano down-regolati sia in risposta a NO_3^- che a NH_4^+ , 31 (1.3%) down-regolati dal nitrato ma allo stesso tempo up-regolati dall'ammonio e solo 1 era up-regolato dal nitrato e down-regolato dall'ammonio. D'altra parte, la maggior parte dei DEG ovvero 2613 (87.6%) è risultata regolata in modo specifico ed esclusivo da nitrato o ammonio rispetto alle radici trattate con -N, come descritto nel diagramma di Venn.

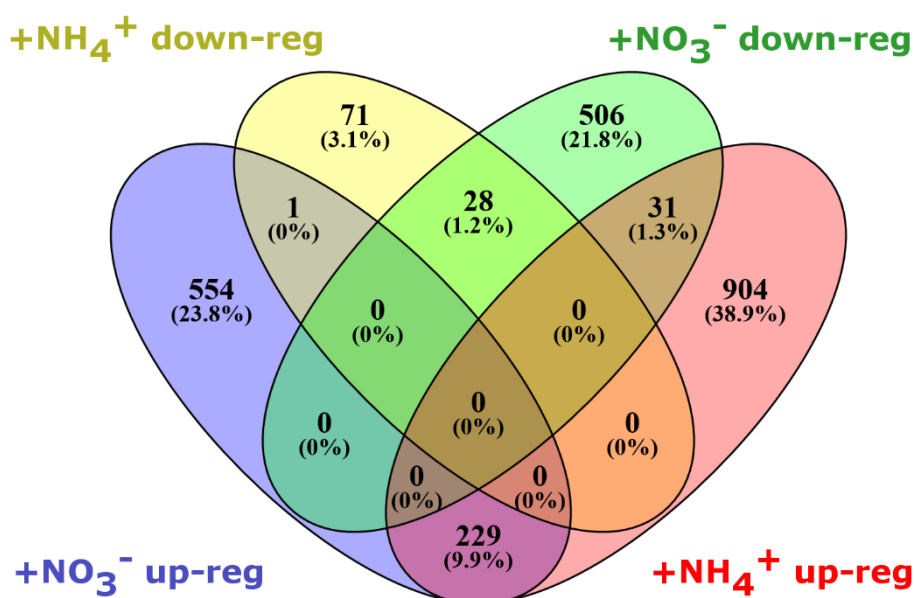


Figura 4.6: Diagramma di Venn che mostra il confronto numerico e percentuale di geni differenzialmente espressi significativi che si sovrapponevano nei trattamenti $+\text{NO}_3^-$ e $+\text{NH}_4^+$ rispetto al controllo (-N). Il diagramma mostra il confronto numerico e percentuale di tutti i geni espressi differenzialmente significativi up- e down-regolati dopo i trattamenti $+\text{NO}_3^-$ e $+\text{NH}_4^+$. I numeri senza sovrapposizione rappresentano i geni identificati in modo univoco come DEG nel trattamento corrispondente.

Per analizzare al meglio la sovrapposizione e l'esclusiva risposta della radice alle 24 ore di nitrato o ammonio, è stato quindi eseguito un raggruppamento gerarchico di DEG utilizzando il software Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>) e i risultati sono stati visualizzati come *heat-map* (Fig. 4.7). I DEG espressi in modo differenziale in almeno un trattamento sono stati suddivisi in 8 gruppi secondo i loro profili di espressione. A partire dall'analisi di Venn, l'analisi del cluster ha confermato l'esistenza di gruppi di geni comunemente regolati dalla fornitura di nitrato e ammonio (cluster 2-3-4-8), mentre altri sono specificamente regolati solo dal nitrato (cluster 5 e 7) o da ammonio

(cluster 1 e 6). Inoltre, la *heat-map* ha messo in evidenza un diverso comportamento all'interno dei geni up-regolati da entrambi gli ioni, rivelando 183 DEG che sono debolmente up-regolati dal nitrato ma fortemente up-regolati dall'ammonio (cluster 2) e 237 DEG con una forte sovraespressione indotta dal nitrato e una debole sovraespressione indotta dalla fornitura di ammonio (cluster 3).

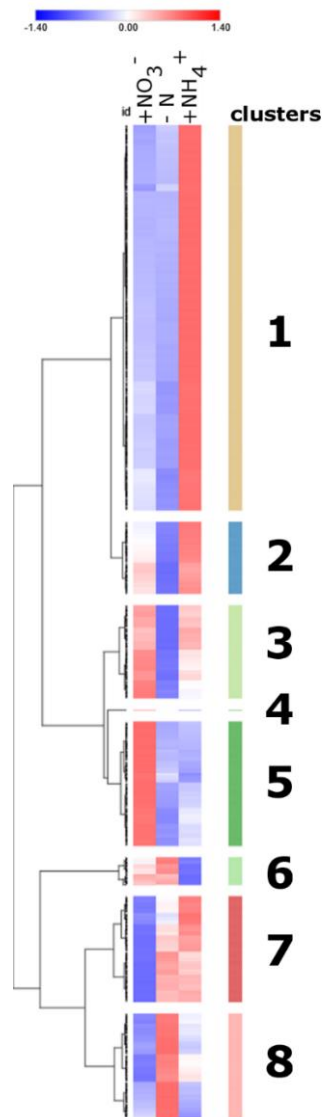


Figura 4.7: Analisi di clustering di geni espressi in modo differenziale nei trattamenti +NO₃⁻ e +NH₄⁺ rispetto al controllo (-N) nei tessuti delle radici di mais. I valori RPKM rappresentati come *z-score* per i 2324 geni risultati differenzialmente espressi in almeno in un trattamento sono stati utilizzati per un'analisi di clustering gerarchico. L'analisi ha rivelato 8 diversi clusters con comportamenti di espressione specifici in risposta a differenti forniture di N o deficit di N. I valori di espressione per ciascun gene in ciascun trattamento sono riportati in una scala di colore da blu a rosso (blu: valori di RPKM inferiori, rosso: valori di RPKM più alti). RPKM: Letture per Kb per milione.

4.6 Annotazione e classificazione dei DEG raggruppati in categorie funzionali GO

Per comprendere meglio l'effetto diverso e simile della fornitura di NO_3^- e NH_4^+ per 24 ore sull'apice della radice del mais, è stata eseguita un'analisi di arricchimento di *Gene Ontology* (GO) con il software Ontologizer (Bauer *et al.*, 2008) per analizzare gli 8 clusters con risposta diversa alla fornitura di N (Fig. 4.8). L'unico cluster non arricchito era il cluster 4, poiché includeva solo un gene indotto dal nitrato e represso dall'ammonio. Questo gene corrisponde a Zm00001d015905, annotato come "*sweet4a - sugars will eventually be exported transporter4a*" nel database MaizeGDB (www.maizegdb.org). Nel test di arricchimento degli altri 7 cluster, sono state identificate 100 categorie GO arricchite. Da queste, 40 sono state arricchite esclusivamente per il trattamento $+\text{NH}_4^+$ (cluster 1 e 6), mentre 25 sono state arricchite solo per il trattamento $+\text{NO}_3^-$ (cluster 5 e 7). Dei 40 GO arricchiti nelle piante trattate con ammonio, 37 erano raggruppati interamente nel cluster 1, essendo quindi sovraespressi solo dall'ammonio, e 3 nel cluster 6, rappresentando così i GO specifici per una down-regolazione indotta dal catione.

La risposta specifica all'ammonio di DEG up-regolati nel cluster 1 ha mostrato fino a 7 termini correlati a "via di segnalazione mediata dagli ormoni", in particolare in risposta a etilene, acido salicilico, acido jasmonico, karrikine e acido abscissico. È interessante notare come questi ormoni potrebbero essere collegati per le loro funzioni al principale effetto dato dall'ammonio detto "risposta allo stimolo biotico". Infatti, l'ammonio ha indotto un arricchimento in termini di "risposta immunitaria" e "regolazione della morte cellulare programmata" sia nel cluster 1 che nel cluster 2, quest'ultimo includeva quei geni fortemente up-regolati da $+\text{NH}_4^+$ e debolmente up-regolati da $+\text{NO}_3^-$. Inoltre, un altro termine rilevante per il cluster 1 è "risposta alla carenza idrica". D'altra parte, guardando i pochissimi termini arricchiti per il cluster 6, solo il termine "proliferazione cellulare" è unico per i DEG repressi esclusivamente dell'ammonio.

Tra i termini GO specifici per la risposta $+\text{NO}_3^-$, i termini univoci relativi alla sovraregolazione indotta dal nitrato sono il "legame con polisaccaridi" e "apoplasto" all'interno del cluster 5 (DEG up-regolati solo dal nitrato) e cluster 3 (DEG fortemente up-regolati da nitrato e solo debolmente da ammonio). Per quanto riguarda i termini arricchiti in DEG repressi dal trattamento $+\text{NO}_3^-$ (cluster 7), molti termini potrebbero essere correlati

al trasporto transmembrana, come "componente integrale della membrana plasmatica", "trasporto transmembrana cationico" e "attività di trasportatore transmembrana attivo". Inoltre, altri termini arricchiti specifici di questo gruppo sono correlati al metabolismo secondario, come "biosintesi di fenilpropanoidi" e "biosintesi di metaboliti secondari".

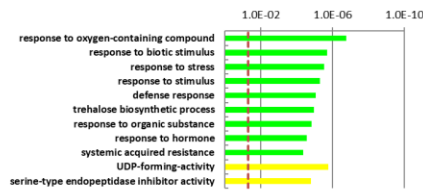
All'interno della risposta comune sia al nitrato che all'ammonio, risultano termini simili riguardanti l'organizzazione del citoscheletro che sono stati arricchiti nel cluster 8 (termini arricchiti da DEG down-regolati sia da $+NH_4$ e $+NO_3$) e nel cluster 6 (termini arricchiti da DEG down-regolati da $+NH_4$). Questi termini sono "costituente strutturale del citoscheletro", "microtubulo", "attività motoria dei microtubuli" e "complesso chinesinico". Inoltre, all'interno del cluster 8 e del cluster 7 (termini arricchiti dai DEG down-regolati da $+NO_3$) i termini comuni sono "attività perossidasi", "disintossicazione da ossidanti cellulari" e "risposta allo stress ossidativo".

Da questi risultati, sembra che NH_4^+ influenzi fortemente l'equilibrio ormonale vegetale a favore degli ormoni coinvolti nella risposta allo stress, in particolare attivando le vie biotiche di stress e di difesa. Inoltre, l'unico termine per i DEG regolati dall'ammonio è "proliferazione cellulare". D'altro canto, il nitrato reprime l'espressione dei geni relativi al trasporto transmembrana e al metabolismo secondario, mentre da questo arricchimento GO sono apparse poche informazioni specifiche sulla up-regolazione indotta dal nitrato, soprattutto per quanto riguarda la localizzazione a livello apoplastico. Infine, il solo DEG nel cluster 4 (up-regolazione del nitrato, down-regolazione dell'ammonio) è riferito al trasporto di zuccheri. Inoltre, entrambe queste fonti di N inorganiche riducono i geni regolati coinvolti nella disintossicazione dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS), mostrando così come la radice ha bisogno di questi radicali come molecole di segnalazione che influenzano l'organizzazione delle cellule a livello del citoscheletro.

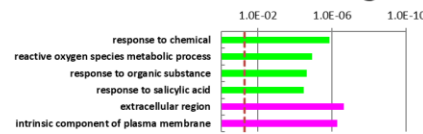
cluster 1: UP-reg NH_4^+



cluster 2: weak UP-reg NO_3^- ; strong UP-reg NH_4^+



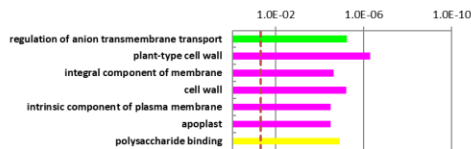
cluster 3: strong UP-reg NO_3^- ; weak UP-reg NH_4^+



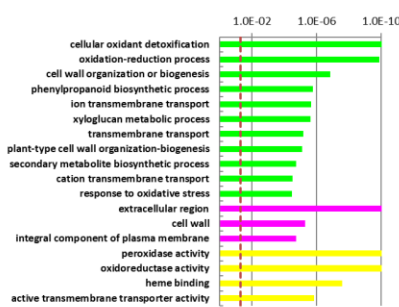
cluster 4: UP-reg NO_3^- ; DOWN-reg NH_4^+

No enriched terms found:
The cluster has only one term (Zm00001d015905) annotated as "sugars will eventually be exported transporter 4a"

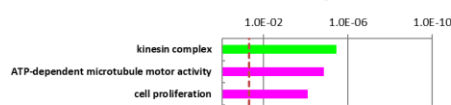
cluster 5: UP-reg NO_3^-



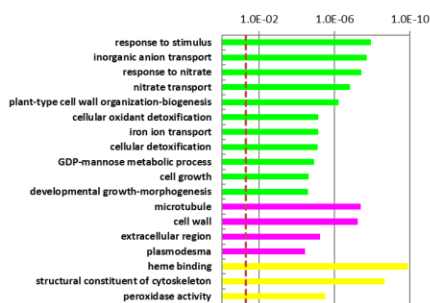
cluster 7: DOWN-reg NO_3^-



cluster 6: DOWN-reg NH_4^+



cluster 8: DOWN-reg NO_3^- ; DOWN-reg NH_4^+



■ Biological process (BP)
■ Cellular component (CC)
■ Molecular function (MF)
- - - Threshold (p<0.05)

Figura 4.8: Analisi di arricchimento di DEG raggruppati in 8 gruppi usando Ontologizer. La figura mostra le categorie GO rappresentate nei gruppi di geni up e down-regolati nei trattamenti $+\text{NO}_3^-$ e $+\text{NH}_4^+$ rispetto al controllo $-\text{N}$ nei tessuti delle radici di mais. Il programma Ontologizer ha come opzioni di lingua soltanto la lingua inglese.

4.7 Classificazione dei DEG in categorie funzionali di MapMan

Oltre all'arricchimento GO, sono state eseguite analisi funzionali dei DEG mediante analisi di sovrarappresentazione di *MapMan*. Sono stati trovati diversi percorsi arricchiti tra geni espressi in modo differenziale nei trattamenti azotati analizzati (Fig. 4.9). Tuttavia, come previsto, alcune categorie di geni si sono arricchite in modo simile in seguito dell'applicazione dei due trattamenti N. Le categorie *MapMan* "Metabolismo dell'azoto" e "organizzazione cellulare" sono state fortemente arricchite nei DEG sia di $+NO_3^-$ che di $+NH_4^+$, con il primo gruppo che mostrava una significativa regolazione dei geni correlati al metabolismo del nitrato e il secondo una forte down-regolazione dei geni coinvolti nell'organizzazione del citoscheletro attraverso actina e tubulina. Inoltre, il termine "parete cellulare" è stato significativamente represso in presenza di $+NO_3^-$, mentre i geni appartenenti a questo gruppo non erano significativamente regolati da $+NH_4^+$.

Il gruppo "regolazione della trascrizione" appariva regolato principalmente dalla fornitura di ammonio, mentre solo il fattore di trascrizione AP/EREBP (TF) appariva sovraregolato sia dall'ammonio che dal nitrato. D'altra parte, l'ammonio ha indotto una forte ed esclusiva sovraregolazione anche dei geni codificanti i fattori di trascrizione WRKY.

I geni coinvolti nelle "risposte al metabolismo ormonale" sono stati regolati in modo differenziato sia dal nitrato che dall'ammonio, con quest'ultimo più efficace, come già dimostrato dall'arricchimento GO. Il metabolismo dell'etilene e dell'acido salicilico sembra essere indotto da NH_4^+ , mentre il metabolismo delle gibberelline è risultato represso dall'ammonio e la degradazione dell'acido abscissico repressa dal nitrato.

Inoltre, NO_3^- induce l'attivazione dei gruppi "degradazione lipidica" e "degradazione proteica", aggiungendo così nuovi dati ai pochi ottenuti con l'arricchimento GO. Nel gruppo "metabolismo secondario", i geni regolati da NO_3^- regolano positivamente geni coinvolti nella sottocategoria del "metabolismo dello zolfo", NH_4^+ regola positivamente la sottocategoria dei "flavonoidi", mentre il "metabolismo della lignina" viene significativamente represso dal nitrato. Inoltre, NH_4^+ induce un forte arricchimento dei termini nel gruppo dello "stress biotico", confermando così ciò che è stato osservato anche dall'arricchimento GO.

In sintesi, questi risultati forniscono nuove informazioni sull'importanza della regolamentazione dei fattori di trascrizione esercitata esclusivamente dall'ammonio

(WRKY) e dall'ammonio insieme al nitrato (AP2/EREBP). È stato mostrato un effetto positivo del nitrato sulla degradazione dei lipidi e delle proteine, insieme a un effetto negativo sulla parete cellulare. Inoltre, è confermato l'effetto negativo di entrambe le fonti di azoto sulle perossidasi e sull'organizzazione del citoscheletro, mentre si mostra un effetto negativo del nitrato sui processi di trasporto del nitrato stesso.

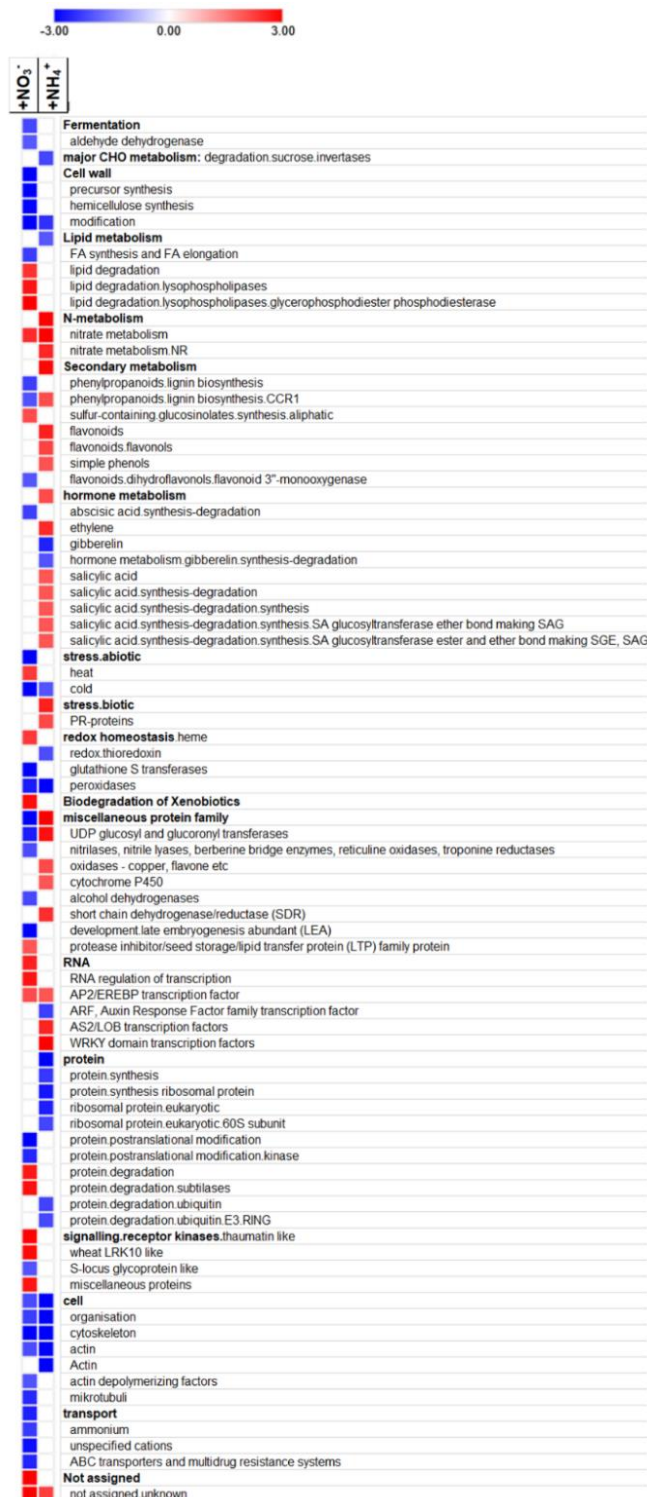


Figura 4.9: Categorie funzionali di *MapMan* arricchite dai DEG identificati nei due trattamenti azotati rispetto alla carenza di azoto ($+NO_3^-/-N$; $+NH_4^+/-N$). I valori *z-score* sono stati dedotti dai *p-value* (ovvero 1.96 corrisponde a un *p-value* di 0.05) e sono mappati in una scala di colore da blu a rosso (blu: DEG sotto-espressi, rosso: DEG sovra-espressi).

5 DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Il nitrato rappresenta un segnale fondamentale nella vita della pianta ed è assorbito attraverso almeno tre differenti meccanismi ovvero iHATS, cHATS e LATS (Hachiya e Sakakibara, 2017) che portano la pianta stessa a una capacità molto alta di percezione di questo prezioso nutriente all'interno del suolo, e di regolare la crescita e la vita di conseguenza (Eléonore Bouguyon et al., 2012). Nei prossimi decenni di fronte all'aumento sempre più repentino della popolazione umana, potrebbe essere necessario aumentare in assenza di altre alternative più sostenibili, la produzione di fertilizzante basato sull'azoto con tutti i rischi ambientali che questa pratica ne consegue (Good e Beatty, 2011). Sarà necessario perciò comprendere ancora meglio, come le piante percepiscono l'azoto in una forma molecolare piuttosto che in un'altra, in maniera tale da formulare fertilizzanti più efficienti che rendano le piante più produttive con un conseguente minore spreco di risorse sia economiche che ambientali. In questo lavoro ci si è concentrati sullo studio delle differenze fisiologiche e trascrittomiche in piante di mais B73 allevate in idroponica in condizioni di carenza di azoto (-N), presenza di nitrato (+NO₃⁻, 1 mM) o presenza di ammonio (+NH₄⁺, 1 mM). Le analisi fisiologiche hanno messo in luce un effetto negativo dell'ammonio sulla crescita e sull'efficienza fotosintetica, confermando l'ipotesi dell'esistenza di una "sindrome dell'ammonio" già ampiamente riportata in letteratura in altre specie (González-Hernández *et al.*, 2019). Le piante che sviluppano questa sindrome sono meno performanti rispetto alle altre, hanno delle superficie fogliari mediamente più piccole con vistose clorosi e necrosi, una radice primaria meno lunga e un peso totale della pianta di molto inferiore rispetto agli altri due trattamenti, come anche evidenziato in uno studio condotto su di *Nicotiana tabacum* (Liu *et al.*, 2000). Al contrario, le piante trattate con +NO₃⁻ come si può vedere in figura 4.1 sono molto più vigorose anche rispetto alle piante -N e mostrano performance significativamente superiori rispetto a piante allevate in -N e in +NH₄⁺, come anche già riportato in letteratura (Kováčik e Bačkor, 2007). L'analisi con lo strumento DUALEX SCIENTIFIC™ ci dà un'ulteriore conferma di come le piante trattate con ammonio sviluppino un fenotipo diverso rispetto alle piante trattate con nitrato e in carenza di azoto. La presenza di +NH₄⁺ determina sempre un accumulo di antociani statisticamente superiore rispetto agli altri due trattamenti, questo potrebbe derivare da una maggior necessità di difesa da stress di tipo ossidativo (J. Kim et al., 2017).

Gli antociani infatti tra le altre funzioni, sono prodotti in caso di presenza troppo elevata di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Inoltre, i livelli inferiori di clorofilla e flavonoidi osservati nelle piante trattate con ammonio rispetto agli altri due trattamenti sembra essere correlato allo stato fisiologico di stress delle piante $+NH_4^+$, in conseguenza alle numerose clorosi e necrosi presenti nelle foglie si abbassano i livelli di clorofilla e flavonoidi. Per approfondire i meccanismi alla base di queste importanti differenze è stata condotta anche un'analisi trascrittomico ad ampio spettro. I risultati dell'analisi di *Gene Ontology* evidenziano come i geni la cui espressione risulta significativamente indotta dall'ammonio siano coinvolti nei *pathway* ormonali generalmente associati alla risposta della pianta allo stress, quali l'acido abscissico, l'etilene, le karrikinine, l'acido jasmonato (Verma *et al.*, 2016). Oltre a questi si osserva anche l'attivazione di geni correlati ad altre due categorie associate allo stress, ovvero la "morte cellulare programmata" e la "proliferazione cellulare", confermando l'ipotesi che le piante trattate con ammonio siano in uno stato di "allarme" come se fossero sotto attacco da un agente biotico. Anche in altre specie è stata riportata una produzione di fitormoni quali ABA e etilene in seguito ad un trattamento con ammonio (Sun *et al.*, 2017). Al contrario il trattamento con nitrato, sembra spegnere l'espressione di geni coinvolti nel sistema di difesa della pianta contro gli stati reattivi dell'ossigeno e nei processi di trasporto di nutrienti, quest'ultimo effetto è già riportato in letteratura (Meng *et al.*, 2016).

L'analisi dei trascritti differenzialmente espressi, ha evidenziato una differenza molto marcata in termini di numerosità di trascritti indotti dal nitrato (565) e dall'ammonio (1163). Tra tutti questi meno del 10% erano espressi contemporaneamente sia nel trattamento $+NO_3^-$ che in $+NH_4^+$ mentre 904 erano regolati esclusivamente dall'ammonio e 325 solo dal nitrato, con un rapporto di quasi 1:3.

L'analisi del contenuto di amminoacidi ha evidenziato un aumento della maggior parte degli amminoacidi liberi nelle foglie di piante trattate con ammonio. Questo risultato si può spiegare andando a ricercare la via di assimilazione dell'ammonio che per essere assimilato deve essere trasformato per prima cosa in glutammato, altri studi con *Camellia sinensis* hanno riportato alti livelli di glutammato dopo un trattamento in ammonio (W. Li *et al.*, 2017) e in generale un aumento degli amminoacidi liberi (Ruan *et al.*, 2019), sempre livelli alti di glutammato a seguito di trattamento con ammonio sono stati invece rilevati in un esperimento con *Oryza sativa* (Sun *et al.*, 2017). Un altro studio su *Matricaria*

chamomilla ha confermato invece i livelli alti di prolina in seguito a un trattamento con ammonio, inoltre le piante esattamente come in questo studio, sviluppavano vistose necrosi e un generale avvizzimento (Kováčik e Klejdus, 2014). L'aumento di questo amminoacido è indice di una situazione negativa all'interno della pianta in quanto esso è sintetizzato a seguito di una risposta allo stress, inoltre in seguito della sintesi di prolina si alzano i livelli anche di altri amminoacidi (Kováčik *et al.*, 2010). Un'osservazione simile in altre specie è stata spiegata come conseguenza dall'aumento delle attività di glutamina sintetasi (GS) e glutammato deidrogenasi (GDH), risposta tipica alla nutrizione con solo ammonio, altri studi con piante di specie differenti, hanno rilevato cambiamenti di amminoacidi simili a seguito di un trattamento più o meno lungo con ammonio (Domínguez-Valdivia *et al.*, 2008; Lasa *et al.*, 2002). Un'altra ipotesi che è possibile fare è che la presenza di più azoto nel suolo, sottoforma di nitrato o ammonio comporta la mobilitazione della riserva N da fonti come il pool di amminoacidi vacuolari, l'induzione di un trasportatore ad alta affinità e il potenziamento della biosintesi degli amminoacidi mediante l'up-regolazione degli enzimi appropriati (Onodera e Ohsumi, 2005), ipotesi avallata da un altro studio su riso che anche dopo una breve esposizione ad ammonio vede un aumento di espressione di molti geni correlati alla sintesi di amminoacidi (Chandran *et al.*, 2016). In letteratura è stata identificata un'ipotesi a supporto di una presenza di amminoacidi così alta nelle radici delle piante trattate con ammonio. La pompa amminoacidica UMAMIT14 (Usually Multiple Acids Move In and out Transporters 14) (Besnard *et al.*, 2016; Patterson *et al.*, 2010) infatti, è presente nel floema e nel periciclo delle cellule radicali e in diversi esperimenti (Besnard *et al.*, 2016; Müller *et al.*, 2015) è ritenuta responsabile della traslocazione di vari amminoacidi (Arg, Ala, Glu, Ser, Gly, Gln, Asn, Pro, Thr Val, His, Ile, Leu, e Phe), da varie parti della pianta verso le radici a seguito di una situazione di stress da parte della pianta.

I livelli alti di tirosina sembrano essere in linea con quanto emerge dall'analisi di *Gene Ontology*, che evidenzia geni legati al metabolismo degli "amminoacidi aromatici", tra cui troviamo la tirosina, nei termini arricchiti indotti dall'ammonio. I livelli alti di cisteina rilevati negli amminoacidi idrolizzati, sono spiegabili in quanto essendo il metabolismo dell'azoto e dello zolfo strettamente collegati all'interno della pianta, un aumento di nitrato o ammonio comporta un aumento degli amminoacidi contenenti zolfo tra i quali spicca la cisteina (Clarkson *et al.*, 1989), anomalo è invece la presenza molto alta di questo amminoacido nelle piante carenti di azoto. Possiamo concludere ipotizzando che il nitrato

e l'ammonio sicuramente hanno effetti diversi sulle piante di mais B73, il nitrato crea un effetto positivo sulla crescita che favorisce lo sviluppo di biomassa e la resa della pianta. Inoltre, il nitrato abbassa le difese della pianta stessa, e diminuisce il trasporto del nitrato verso l'apoplasto come se ci fosse una sorta di feedback negativo, anche la risposta al nitrato viene abbassata. In ogni caso la pianta sviluppa un fenotipo vigoroso, con un 70% di biomassa totale in più rispetto alle stesse piante trattate con ammonio. L'ammonio infatti, innesca risposte conducibili a una situazione di stress da parte della pianta, i trascritti prodotti riconducono a ormoni e amminoacidi che indicano una situazione fisiologica precaria della pianta, confermata anche delle varie analisi fisiologiche eseguite. Inoltre l'ammonio sembra avere un effetto positivo sul metabolismo degli amminoacidi liberi, specialmente nella parte apicale della pianta, tuttavia la stimolazione di diversi fitormoni (ABA, etilene, acido salicilico) e anche l'aspetto necrotico delle piante ci fa supporre che all'interno di esse ci sia una grossa quantità di specie reattive dell'ossigeno libere, probabilmente superiore alla normale quantità che le piante usano quotidianamente come molecole segnale (Baxter-Burrell *et al.*, 2002).

Sia per quanto riguarda gli effetti del nitrato che per quanto riguarda l'ammonio saranno necessari ulteriori studi per approfondire il loro effetti su tutto il ciclo della pianta e in pieno campo.

6 BIBLIOGRAFIA

- Alboresi, A., Gestin, C., Leydecker, M., Bedu, M., Meyer, C., Truong, H., (2005). Nitrate, a signal relieving seed dormancy in Arabidopsis. *Plant, Cell & Environment*, 28(4), 500–512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01292.x>
- Alvarez, J. M., Riveras, E., Vidal, E. A., Gras, D. E., Contreras-López, O., Tamayo, K. P., Aceituno, F., Gómez, I., Ruffel, S., Lejay, L., Jordana, X., Gutiérrez, R. A. (2014). Systems approach identifies TGA1 and TGA4 transcription factors as important regulatory components of the nitrate response of Arabidopsis thaliana roots. *The Plant Journal*, 80(1), 1–13. <https://doi.org/10.1111/tpj.12618>
- Andrade, S. L. A., Dickmanns, A., Ficner, R., Einsle, O. (2005). Crystal structure of the archaeal ammonium transporter Amt-1 from Archaeoglobus fulgidus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(42), 14994 LP – 14999. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506254102>
- Bauer, S., Grossmann, S., Vingron, M., Robinson, P. N. (2008). Ontologizer 2.0 - A multifunctional tool for GO term enrichment analysis and data exploration. *Bioinformatics*, 24(14), 1650–1651. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn250>
- Baxter-Burrell, A., Yang, Z., Springer, P. S., Bailey-Serres, J. (2002). RopGAP4-dependent Rop GTPase rheostat control of Arabidopsis oxygen deprivation tolerance. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5575), 2026–8. <https://doi.org/10.1126/science.1071505>
- Benjamini, Y., Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological 1995.pdf. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*, 57(1), 289–300. <https://doi.org/10.2307/2346101>
- Besnard, J., Pratelli, R., Zhao, C., Sonawala, U., Collakova, E., Pilot, G., Okumoto, S. (2016). UMAMIT14 is an amino acid exporter involved in phloem unloading in Arabidopsis roots. *Journal of Experimental Botany*, 67(22), 6385–6397. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw412>
- Bi, Y. M., Wang, R. L., Zhu, T., Rothstein, S. J. (2007). Global transcription profiling reveals differential responses to chronic nitrogen stress and putative nitrogen regulatory components in Arabidopsis. *BMC Genomics*, 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2164->

- Birnbaum, K., Shasha, D. E., Wang, J. Y., Jung, J. W., Lambert, G. M., Galbraith, D. W., Benfey, P. N. (2003). A Gene Expression Map of the Arabidopsis root. *Science*, 302(5652), 1956 LP – 1960. <https://doi.org/10.1126/science.1090022>
- Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Boone, L., Van linden, V., De Meester, S., Vandecasteele, B., Muylle, H., Roldán-Ruiz, I., Nemecek, T., Dewulf, J. (2016). Environmental life cycle assessment of grain maize production: An analysis of factors causing variability. *Science of The Total Environment*, 553, 551–564. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.089>
- Bouguyon, E, Brun, F., Meynard, D., Kubeš, M., Pervent, M., Leran, S., Lacombe, B., Krouk, G., Guiderdoni, E., Zažímalová, E., Hoyerová, K., Nacry, P., Gojon, A. (2015). Multiple mechanisms of nitrate sensing by Arabidopsis nitrate transceptor NRT1.1. *Nature Plants*, 1, 15015. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.15>
- Bouguyon, Eléonore, Gojon, A., Nacry, P. (2012). Nitrate sensing and signaling in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23(6), 648–654. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.01.004>
- Britto, D. T., Kronzucker, H. J. (2002). NH₄⁺ toxicity in higher plants: A critical review. *Journal of Plant Physiology*, 159(6), 567–584. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-0774>
- Cerezo, M., Camañes, G., Flors, V., Primo-Millo, E., García-Agustín, P. (2007). Regulation of nitrate transport in citrus rootstocks depending on nitrogen availability. *Plant Signaling & Behavior*, 2(5), 337–42. <https://doi.org/10.4161/psb.2.5.4578>
- Cerovic, Z., Cartelat, A., Goulas, Y., Meyer, S. (2005). In-field assessment of wheat-leaf polyphenolics using the new optical leaf-clip Dualex. *Precision Agriculture 2005, ECPA 2005*.
- Cerovic, Z. G., Masdoumier, G., Ghozlen, N. Ben, Latouche, G. (2012). A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids. *Physiologia Plantarum*, 146(3), 251–60.

<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01639.x>

Chaillou, S., Vessey, J. K., Morot-gaudry, J. F., Raper, C. D., Henry, L. T., Boutin, J. P. (1991). Expression of characteristics of ammonium nutrition as affected by pH of the root medium. *Journal of Experimental Botany*, 42(2), 189–196.

<https://doi.org/10.1093/jxb/42.2.189>

Chandran, A. K. N., Priatama, R. A., Kumar, V., Xuan, Y., Je, B. Il, Kim, C. M., Jung, K. H., Han, C. deok. (2016). Genome-wide transcriptome analysis of expression in rice seedling roots in response to supplemental nitrogen. *Journal of Plant Physiology*, 200, 62–75. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.06.005>

Chapple, W. P., Cecava, M. J., Faulkner, D. B., Felix, T. L. (2015). Effects of feeding processed corn stover and distillers grains on growth performance and metabolism of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 93(8), 4002–11.

<https://doi.org/10.2527/jas.2015-9059>

Chiasson, D. M., Loughlin, P. C., Mazurkiewicz, D., Mohammadidehcheshmeh, M., Fedorova, E. E., Okamoto, M., McLean, E., Glass, A. D. M., Smith, S. E., Bisseling, T., Tyerman, S. D., Day, D. A., Kaiser, B. N. (2014). Soybean SAT1 (Symbiotic Ammonium Transporter 1) encodes a bHLH transcription factor involved in nodule growth and NH₄⁺ transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(13), 4814–4819. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312801111>

Clarkson D. T., Saker, L. R., Purves, J. V. (1989). Depression of Nitrate and Ammonium Transport in Barley Plants with Diminished Sulphate Status. Evidence of Co-regulation of Nitrogen and Sulphate Intake. *Journal of Experimental Botany*, 40(9), 953–963. <https://doi.org/10.1093/jxb/40.9.953>

Cramer, M. D., Lewis, O. A. M. (1993). The influence of NO₃⁻ and NH₄⁺ nutrition on the carbon and nitrogen partitioning characteristics of wheat (*Triticum aestivum* L.) and maize (*Zea mays* L.) plants. *Plant and Soil*, 154(2), 289–300.

<https://doi.org/10.1007/BF00012534>

Crawford, N. M., Forde, B. G. (2002). Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. *The Arabidopsis Book*, 1, e0011.

<https://doi.org/10.1199/tab.0011>

Crawford, N. M., Glass, A. D. M. (1998, October 1). Molecular and physiological aspects of

- nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd.
[https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01311-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01311-9)
- Cren, M., Hirel, B. (1999). Glutamine Synthetase in Higher Plants Regulation of Gene and Protein Expression from the Organ to the Cell. *Plant and Cell Physiology*, 40(12), 1187–1193. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029506>
- Cruz, C., Bio, A. F. M., Domínguez-Valdivia, M. D., Aparicio-Tejo, P. M., Lamsfus, C., Martins-Loução, M. A. (2006). How does glutamine synthetase activity determine plant tolerance to ammonium? *Planta*, 223(5), 1068–80.
<https://doi.org/10.1007/s00425-005-0155-2>
- De Paolo, S., Gaudio, L., Aceto, S. (2015). Analysis of the TCP genes expressed in the inflorescence of the orchid *Orchis italica*. *Scientific Reports*, 5, 16265. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/srep16265>
- Ding, L., Li, Y., Wang, Y., Gao, L., Wang, M., Chaumont, F., Shen, Q., Guo, S. (2016). Root ABA accumulation enhances rice seedling drought tolerance under ammonium supply: Interaction with aquaporins. *Frontiers in Plant Science*, 7(AUG2016).
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01206>
- Domínguez-Valdivia, M. D., Aparicio-Tejo, P. M., Lamsfus, C., Cruz, C., Martins-Loução, M. A., Moran, J. F. (2008). Nitrogen nutrition and antioxidant metabolism in ammonium-tolerant and -sensitive plants. *Physiologia Plantarum*, 132(3), 359–369.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01022.x>
- Engelsberger, W. R., Schulze, W. X. (2012). Nitrate and ammonium lead to distinct global dynamic phosphorylation patterns when resupplied to nitrogen-starved *Arabidopsis* seedlings. *Plant Journal*, 69(6), 978–995. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04848.x>
- Escobar, M. A., Geisler, D. A., Rasmusson, A. G. (2006). Reorganization of the alternative pathways of the *Arabidopsis* respiratory chain by nitrogen supply: opposing effects of ammonium and nitrate. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 45(5), 775–88. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02640.x>
- Falkengren-Grerup, U., Schöttelndreier, M. (2004). Vascular plants as indicators of nitrogen enrichment in soils. *Plant Ecology*, 172(1), 51–62.
<https://doi.org/10.1023/B:VEGE.0000026033.43070.e9>

- Fernández-Crespo, E., Scalschi, L., Llorens, E., García-Agustín, P., Camañes, G. (2015). NH₄⁺ protects tomato plants against *Pseudomonas syringae* by activation of systemic acquired acclimation. *Journal of Experimental Botany*, 66(21), 6777–6790. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv382>
- Fischer, K., Barbier, G. G., Hecht, H.-J., Mendel, R. R., Campbell, W. H., Schwarz, G. (2005). Structural basis of eukaryotic nitrate reduction: crystal structures of the nitrate reductase active site. *The Plant Cell*, 17(4), 1167–1179. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.029694>
- Frechilla, S., Lasa, B., Aleu, M., Juanarena, N., Lamsfus, C., Aparicio-Tejo, P. M. (2002). Short-term ammonium supply stimulates glutamate dehydrogenase activity and alternative pathway respiration in roots of pea plants. *Journal of Plant Physiology*, 159(8), 811–818. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00675>
- Fredes, I., Moreno, S., Díaz, F. P., Gutiérrez, R. A. (2019). Nitrate signaling and the control of *Arabidopsis* growth and development. *Current Opinion in Plant Biology*, 47, 112–118. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2018.10.004>
- Gazzarrini, S., Lejay, L., Gojon, A., Ninnemann, O., Frommer, W. B., Von Wirén, N. (1999). Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. *Plant Cell*, 11(5), 937–947. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.5.937>
- Gerendás, J., Ratcliffe, R. G. (2000). Intracellular pH regulation in maize root tips exposed to ammonium at high external pH. *Journal of Experimental Botany*, 51(343), 207–219. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.343.207>
- Gifford, M. L., Dean, A., Gutierrez, R. A., Coruzzi, G. M., Birnbaum, K. D. (2008). Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(2), 803–808. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709559105>
- Gojon, A., Krouk, G., Perrine-Walker, F., Laugier, E. (2011). Nitrate transceptor(s) in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(7), 2299–2308. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq419>
- González-Hernández, A. I., Fernández-Crespo, E., Scalschi, L., Hajirezaei, M.-R., von Wirén, N., García-Agustín, P., Camañes, G. (2019). Ammonium mediated changes in carbon

- and nitrogen metabolisms induce resistance against *Pseudomonas syringae* in tomato plants. *Journal of Plant Physiology*, 239, 28–37.
<https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2019.05.009>
- Good, A. G., Beatty, P. H. (2011). Fertilizing nature: a tragedy of excess in the commons. *PLoS Biology*, 9(8), e1001124–e1001124.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001124>
- Good, A. G., Shrawat, A. K., Muench, D. G. (2004). Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Trends in Plant Science*, 9(12), 597–605.
<https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2004.10.008>
- Goodchild, J. A., Givan, C. V. (1990). Influence of ammonium and extracellular pH on the amino and organic acid contents of suspension culture cells of *Acer pseudoplatanus*. *Physiologia Plantarum*, 78(1), 29–37. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1990.tb08710.x>
- Goulas, Y., Cerovic, Z. G., Cartelat, A., Moya, I. (2004). Dualex: A new instrument for field measurements of epidermal ultraviolet absorbance by chlorophyll fluorescence. *Applied Optics*, 43(23), 4488–4496. <https://doi.org/10.1364/AO.43.004488>
- Guan, M., de Bang, T. C., Pedersen, C., Schjoerring, J. K. (2016). Cytosolic glutamine synthetase Gln1;2 is the main isozyme contributing to GS1 activity and can be up-regulated to relieve ammonium toxicity. *Plant Physiology*, 171(3), 1921–1933.
<https://doi.org/10.1104/pp.16.01195>
- Guan, P., Wang, R., Nacry, P., Breton, G., Kay, S. A., Pruneda-Paz, J. L., Davani, A., Crawford, N. M. (2014). Nitrate foraging by Arabidopsis roots is mediated by the transcription factor TCP20 through the systemic signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(42), 15267–15272. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411375111>
- Gutiérrez, R. A., Stokes, T. L., Thum, K., Xu, X., Obertello, M., Katari, M. S., Tanurdzic, M., Dean, A., Nero, D. C., McClung, C. R., Coruzzi, G. M. (2008). Systems approach identifies an organic nitrogen-responsive gene network that is regulated by the master clock control gene CCA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(12), 4939–4944.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0800211105>

- Hachiya, T., Sakakibara, H. (2017, May 1). Interactions between nitrate and ammonium in their uptake, allocation, assimilation, and signaling in plants. *Journal of Experimental Botany*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw449>
- Hirel, B., Le Gouis, J., Ney, B., Gallais, A. (2007). The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany*, 58(9), 2369–2387. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm097>
- Ho, C., Lin, S., Hu, H., Tsay, Y. (2009). CHL1 Functions as a Nitrate Sensor in Plants. *Cell*, 138(6), 1184–1194. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.004>
- Ishiyama, K., Inoue, E., Watanabe-Takahashi, A., Obara, M., Yamaya, T., Takahashi, H. (2004). Kinetic Properties and Ammonium-dependent Regulation of Cytosolic Isoenzymes of Glutamine Synthetase in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(16), 16598–16605. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313710200>
- Jacquot, A., Li, Z., Gojon, A., Schulze, W., Lejay, L. (2017). Post-translational regulation of nitrogen transporters in plants and microorganisms. *Journal of Experimental Botany*, 68(10), 2567–2580. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx073>
- Kaiser, B. N., Rawat, S. R., Siddiqi, M. Y., Masle, J., Glass, A. D. M. (2002). Functional analysis of an Arabidopsis T-DNA “Knockout” of the high-affinity NH₄⁺ transporter AtAMT1;1. *Plant Physiology*, 130(3), 1263–1275. <https://doi.org/10.1104/pp.102.010843>
- Kant, S. (2018). Understanding nitrate uptake, signaling and remobilisation for improving plant nitrogen use efficiency. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 74, 89–96. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.08.034>
- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., Salzberg, S. L. (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology*, 14(4), R36. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-4-r36>
- Kim, J., Lee, W. J., Vu, T. T., Jeong, C. Y., Hong, S.-W., Lee, H. (2017). High accumulation of anthocyanins via the ectopic expression of AtDFR confers significant salt stress tolerance in Brassica napus L. *Plant Cell Reports*, 36(8), 1215–1224.

- <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2147-7>
- Kochian, L. V. (2016). Root architecture. *Journal of Integrative Plant Biology*, 58(3), 190–192. <https://doi.org/10.1111/jipb.12471>
- Konishi, N., Ishiyama, K., Matsuoka, K., Maru, I., Hayakawa, T., Yamaya, T., Kojima, S. (2014). NADH-dependent glutamate synthase plays a crucial role in assimilating ammonium in the Arabidopsis root. *Physiologia Plantarum*, 152(1), 138–151. <https://doi.org/10.1111/ppl.12177>
- Kosegarten, H., Grolig, F., Wieneke, J., Wilson, G., Hoffmann, B. (1997). Differential ammonia-elicited changes of cytosolic pH in root hair cells of rice and maize as monitored by 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5 (and -6)-carboxyfluorescein-fluorescence ratio. *Plant Physiology*, 113(2), 451–461. <https://doi.org/10.1104/pp.113.2.451>
- Kováčik, J., Bačkor, M. (2007). Changes of phenolic metabolism and oxidative status in nitrogen-deficient Matricaria chamomilla plants. *Plant and Soil*, 297(1–2), 255–265. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9346-x>
- Kováčik, J., Klejdus, B. (2014). Induction of phenolic metabolites and physiological changes in chamomile plants in relation to nitrogen nutrition. *Food Chemistry*, 142, 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.074>
- Kováčik, J., Klejdus, B., Hedbavny, J., Zoń, J. (2010). Copper Uptake Is Differentially Modulated by Phenylalanine Ammonia-lyase Inhibition in Diploid and Tetraploid Chamomile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(18), 10270–10276. <https://doi.org/10.1021/jf101977v>
- Krapp, A., Berthomé, R., Orsel, M., Mercey-Boutet, S., Yu, A., Castaings, L., Elftieh, S., Major, H., Renou, J.-P., Daniel-Vedele, F. (2011). Arabidopsis roots and shoots show distinct temporal adaptation patterns toward nitrogen starvation. *Plant Physiology*, 157(3), 1255–1282. <https://doi.org/10.1104/pp.111.179838>
- Krouk, G., Mirowski, P., LeCun, Y., Shasha, D. E., Coruzzi, G. M. (2010). Predictive network modeling of the high-resolution dynamic plant transcriptome in response to nitrate. *Genome Biology*, 11(12), R123–R123. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-12-r123>
- Lam, H.-M., Coschigano, K. T., Oliveira, I. C., Melo-Oliveira, R., Coruzzi, G. M. (1996). The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acid in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1), 569–593.

<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.569>

- Lanquar, V., Loqué, D., Hörmann, F., Yuan, L., Bohner, A., Engelsberger, W. R., Lalonde, S., Schulze, W. X., von Wirén, N., Frommer, W. B. (2009). Feedback inhibition of ammonium uptake by a phospho-dependent allosteric mechanism in arabidopsis. *Plant Cell*, 21(11), 3610–3622. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.068593>
- Lasa, B., Frechilla, S., Aparicio-Tejo, P. M., Lamsfus, C. (2002). Role of glutamate dehydrogenase and phosphoenolpyruvate carboxylase activity in ammonium nutrition tolerance in roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(11), 969–976. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01451-1](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01451-1)
- Léran, S., Varala, K., Boyer, J.-C., Chiurazzi, M., Crawford, N., Daniel-Vedele, F., David, L., Dickstein, R., Fernandez, E., Forde, B., Gassmann, W., Geiger, D., Gojon, A., Gong, J.-M., Halkier, B. A., Harris, J. M., Hedrich, R., Limami, A. M., Rentsch, D., Seo, M., Tsay, Y.-F., Zhang, M., Coruzzi, G., Lacombe, B. (2014). A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends in Plant Science*, 19(1), 5–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.08.008>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, W., Xiang, F., Zhong, M., Zhou, L., Liu, H., Li, S., Wang, X. (2017). Transcriptome and metabolite analysis identifies nitrogen utilization genes in tea plant (*Camellia sinensis*). *Scientific Reports*, 7(1), 1693. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01949-0>
- Lima, J. E., Kojima, S., Takahashi, H., von Wirén, N. (2010). Ammonium triggers lateral root branching in Arabidopsis in an AMMONIUM TRANSPORTER1;3-dependent manner. *Plant Cell*, 22(11), 3621–3633. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.076216>
- Liu, Y., Von Wirén, N. (2017, May 1). Ammonium as a signal for physiological and morphological responses in plants. *Journal of Experimental Botany*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx086>
- Loqué, D., Lalonde, S., Looger, L. L., Von Wirén, N., Frommer, W. B. (2007). A cytosolic trans-activation domain essential for ammonium uptake. *Nature*, 446(7132), 195–198. <https://doi.org/10.1038/nature05579>
- Lothier, J., Gaufichon, L., Sormani, R., Lemaître, T., Azzopardi, M., Morin, H., Chardon, F.,

- Reisdorf-Cren, M., Avice, J. C., Masclaux-Daubresse, C. (2011). The cytosolic glutamine synthetase GLN1;2 plays a role in the control of plant growth and ammonium homeostasis in *Arabidopsis* rosettes when nitrate supply is not limiting. *Journal of Experimental Botany*, *62*(4), 1375–1390.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erq299>
- Marchive, C., Roudier, F., Castaings, L., Bréhaut, V., Blondet, E., Colot, V., Meyer, C., Krapp, A. (2013). Nuclear retention of the transcription factor NLP7 orchestrates the early response to nitrate in plants. *Nature Communications*, *4*, 1713. Retrieved from
<https://doi.org/10.1038/ncomms2650>
- Marini, A. M., Soussi-Boudekou, S., Vissers, S., Andre, B. (1997). A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, *17*(8), 4282–4293. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.8.4282>
- 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>
- Mcallister, C. H., Beatty, P. H., Good, A. G. (2012, December). Engineering nitrogen use efficient crop plants: The current status. *Plant Biotechnology Journal*.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00700.x>
- Meng, S., Su, L., Li, Y., Wang, Y., Zhang, C., Zhao, Z. (2016). Nitrate and Ammonium Contribute to the Distinct Nitrogen Metabolism of *Populus simonii* during Moderate Salt Stress. *PloS One*, *11*(3), e0150354.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150354>
- Mifflin, B J. (1974). The location of nitrite reductase and other enzymes related to amino Acid biosynthesis in the plastids of root and leaves. *Plant Physiology*, *54*(4), 550–555.
<https://doi.org/10.1104/pp.54.4.550>
- Mifflin, Ben J, Habash, D. Z. (2002). The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *Journal of Experimental Botany*, *53*(370), 979–987.
<https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.979>
- Misra, A. K., Tiwari, P. K., Venturino, E. (2016). Modeling the impact of awareness on the

- mitigation of algal bloom in a lake. *Journal of Biological Physics*, 42(1), 147–65.
<https://doi.org/10.1007/s10867-015-9397-9>
- Müller, B., Fastner, A., Karmann, J., Mansch, V., Hoffmann, T., Schwab, W., Suter-Grotemeyer, M., Rentsch, D., Truernit, E., Ladwig, F., Bleckmann, A., Dresselhaus, T., Hammes, U. Z. (2015). Amino acid export in developing arabidopsis seeds depends on UmamiT facilitators. *Current Biology*, 25(23), 3126–3131.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.038>
- Muños, S., Cazettes, C., Fizames, C., Gaymard, F., Tillard, P., Lepetit, M., Lejay, L., Gojon, A. (2004). Transcript profiling in the chl1-5 mutant of Arabidopsis reveals a role of the nitrate transporter NRT1.1 in the regulation of another nitrate transporter, NRT2.1. *The Plant Cell*, 16(9), 2433–2447. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.024380>
- Noguero, M., Lacombe, B. (2016). Transporters Involved in Root Nitrate Uptake and Sensing by Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1391.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01391>
- O’Brien, J. A., Vega, A., Bouguyon, E., Krouk, G., Gojon, A., Coruzzi, G., Gutiérrez, R. A. (2016). Nitrate Transport, Sensing, and Responses in Plants. *Molecular Plant*, 9(6), 837–856. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.05.004>
- Onodera, J., Ohsumi, Y. (2005). Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(36), 31582–31586. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506736200>
- Patterson, K., Cakmak, T., Cooper, A., Lager, I., Rasmusson, A. G., Escobar, M. A. (2010). Distinct signalling pathways and transcriptome response signatures differentiate ammonium- and nitrate-supplied plants. *Plant, Cell and Environment*, 33(9), 1486–1501. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02158.x>
- Peuke, A. D., Jeschke, W. D., Hartung, W. (1998). Foliar application of nitrate or ammonium as sole nitrogen supply in Ricinus communis. II. The flows of cations, chloride and abscisic acid. *New Phytologist*, 140(4), 625–636.
<https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1998.00304.x>
- Presterl, T., Seitz, G., Landbeck, M., Thiemt, E. M., Schmidt, W., Geiger, H. H. (2003). Improving Nitrogen-Use Efficiency in European Maize Funding for this study was provided by the Ministry of Agriculture of Baden-Württemberg (Grant No. 89.23-20,

- No. 23-92.9, and No. 23-95.8) and the KWS SAAT AG, Einbeck. *Crop Science*, 43, 1259–1265. <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.1259>
- Ranum, P., Peña-Rosas, J. P., Garcia-Casal, M. N. (2014). Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1312(1), 105–112. <https://doi.org/10.1111/nyas.12396>
- Ristova, D., Carré, C., Pervent, M., Medici, A., Kim, G. J., Scalia, D., Ruffel, S., Birnbaum, K. D., Lacombe, B., Busch, W., Coruzzi, G. M., Krouk, G. (2016). Combinatorial interaction network of transcriptomic and phenotypic responses to nitrogen and hormones in the Arabidopsis thaliana root. *Science Signaling*, 9(451). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaf2768>
- Ruan, L., Wei, K., Wang, L., Cheng, H., Wu, L., Li, H. (2019). Characteristics of Free Amino Acids (the Quality Chemical Components of Tea) under Spatial Heterogeneity of Different Nitrogen Forms in Tea (Camellia sinensis) Plants. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(3). <https://doi.org/10.3390/molecules24030415>
- Rubin, G., Tohge, T., Matsuda, F., Saito, K., Scheible, W.-R. (2009). Members of the LBD family of transcription factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(11), 3567–3584. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.067041>
- Ruffe, S., Freixes, S., Balzergue, S., Tillard, P., Jeudy, C., Martin-Magniette, M. L., Van Der Merwe, M. J., Kakar, K., Gouzy, J., Fernie, A. R., Udvardi, M., Salon, C., Gojon, A., Lepetit, M. (2008). Systemic signaling of the plant nitrogen status triggers specific transcriptome responses depending on the nitrogen source in Medicago truncatula. *Plant Physiology*, 146(4), 2020–2035. <https://doi.org/10.1104/pp.107.115667>
- Sagnelli, D., Kirkensgaard, J. J. K., Giosafatto, C. V. L., Ogradowicz, N., Kruczała, K., Mikkelsen, M. S., Maigret, J.-E., Lourdin, D., Mortensen, K., Blennow, A. (2017). All-natural bio-plastics using starch-beta-glucan composites. *Carbohydrate Polymers*, 172, 237–245. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.05.043>
- Sakakibara, Y., Kimura, H., Iwamura, A., Saitoh, T., Ikegami, T., Kurisu, G., Hase, T. (2012). A new structural insight into differential interaction of cyanobacterial and plant ferredoxins with nitrite reductase as revealed by NMR and X-ray crystallographic studies. *The Journal of Biochemistry*, 151(5), 483–492.

<https://doi.org/10.1093/jb/mvs028>

Sarasketa, A., González-Moro, M. B., González-Murua, C., Marino, D. (2014). Exploring ammonium tolerance in a large panel of *Arabidopsis thaliana* natural accessions. *Journal of Experimental Botany*, *65*(20), 6023–6033.

<https://doi.org/10.1093/jxb/eru342>

Scheible, W. R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M. K., Stitt, M. (2004). Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiology*, *136*(1), 2483–2499.

<https://doi.org/10.1104/pp.104.047019>

Sohlenkamp, C., Wood, C. C., Roeb, G. W., Udvardi, M. K. (2002). Characterization of *Arabidopsis* AtAMT2, a high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane. *Plant Physiology*, *130*(4), 1788–1796.

<https://doi.org/10.1104/pp.008599>

Sun, L., Di, D., Li, G., Kronzucker, H. J., Shi, W. (2017). Spatio-temporal dynamics in global rice gene expression (*Oryza sativa* L.) in response to high ammonium stress. *Journal of Plant Physiology*, *212*, 94–104. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.02.006>

Suzuki, A., Knaff, D. B. (2005). Glutamate synthase: structural, mechanistic and regulatory properties, and role in the amino acid metabolism. *Photosynthesis Research*, *83*(2), 191–217. <https://doi.org/10.1007/s11120-004-3478-0>

Taulemesse, F., Le Gouis, J., Gouache, D., Gibon, Y., Allard, V. (2015). Post-flowering nitrate uptake in wheat is controlled by N status at flowering, with a putative major role of root nitrate transporter NRT2.1. *PloS One*, *10*(3), e0120291–e0120291.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120291>

Tello-Ruiz, M. K., Naithani, S., Stein, J. C., Gupta, P., Campbell, M., Olson, A., Wei, S., Preece, J., Geniza, M. J., Jiao, Y., Lee, Y. K., Wang, B., Mulvaney, J., Chougule, K., Elser, J., Al-Bader, N., Kumari, S., Thomason, J., Kumar, V., Bolser, D. M., Naamati, G., Tapanari, E., Fonseca, N., Huerta, L., Iqbal, H., Keays, M., Munoz-Pomer Fuentes, A., Tang, A., Fabregat, A., D'Eustachio, P., Weiser, J., Stein, L. D., Petryszak, R., Papatheodorou, I., Kersey, P. J., Lockhart, P., Taylor, C., Jaiswal, P., Ware, D. (2018).

- Gramene 2018: Unifying comparative genomics and pathway resources for plant research. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D1181–D1189.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx1111>
- Tercé-Laforgue, T., Dubois, F., Ferrario-Méry, S., de Crezenzo, M.-A. P., Sangwan, R., Hirel, B. (2004). Glutamate dehydrogenase of tobacco is mainly induced in the cytosol of phloem companion cells when ammonia is provided either externally or released during photorespiration. *Plant Physiology*, 136(4), 4308–17.
<https://doi.org/10.1104/pp.104.047548>
- Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L. A., Rhee, S. Y., Stitt, M. (2004). MAPMAN: A user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant Journal*, 37(6), 914–939. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02016.x>
- Toledo Machado, A., Fernandes, M. S. (2001). Participatory maize breeding for low nitrogen tolerance. *Euphytica*, 122(3), 567–573.
<https://doi.org/10.1023/A:1017543426136>
- Trapnell, C., Hendrickson, D. G., Sauvageau, M., Goff, L., Rinn, J. L., Pachter, L. (2013). Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nature Biotechnology*, 31(1), 46–53. <https://doi.org/10.1038/nbt.2450>
- 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>
- Trucillo Silva, I., Abbaraju, H. K. R., Fallis, L. P., Liu, H., Lee, M., Dhugga, K. S. (2017). Biochemical and genetic analyses of N metabolism in maize testcross seedlings: 1. Leaves. *Theoretical and Applied Genetics*, 130(7), 1453–1466.
<https://doi.org/10.1007/s00122-017-2900-x>
- Usadel, B., Poree, F., Nagel, A., Lohse, M., Czedik-Eysenberg, A., Stitt, M. (2009). A guide to using MapMan to visualize and compare Omics data in plants: A case study in the crop species, Maize. *Plant, Cell and Environment*, 32(9), 1211–1229.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01978.x>
- Verma, V., Ravindran, P., Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of

- stress responses. *BMC Plant Biology*, *16*, 86. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0771-y>
- Vidal, E. A., Araus, V., Lu, C., Parry, G., Green, P. J., Coruzzi, G. M., Gutiérrez, R. A. (2010). Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(9), 4477–4482. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909571107>
- von Wirén, N., Gazzarrini, S., Gojon, A., Frommer, W. B. (2000). The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Current Opinion in Plant Biology*, *3*(3), 254–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837267>
- von Wittgenstein, N. J. J. B., Le, C. H., Hawkins, B. J., Ehltng, J. (2014). Evolutionary classification of ammonium, nitrate, and peptide transporters in land plants. *BMC Evolutionary Biology*, *14*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-11>
- Walch-Liu, P., Neumann, G., Bangerth, F., Engels, C. (2000). Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. *Journal of Experimental Botany*, *51*(343), 227–237. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.343.227>
- Wang, C., White, P. J., Li, C. (2017). Colonization and community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in maize roots at different depths in the soil profile respond differently to phosphorus inputs on a long-term experimental site. *Mycorrhiza*, *27*(4), 369–381. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0757-5>
- Wang, C., Zhang, W., Li, Z., Li, Z., Bi, Y., Crawford, N. M., Wang, Y. (2018). FIP1 Plays an Important Role in Nitrate Signaling and Regulates CIPK8 and CIPK23 Expression in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 593. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00593>
- Wang, M. Y., Glass, A., Shaff, J. E., Kochian, L. V. (1994). Ammonium Uptake by Rice Roots (III. Electrophysiology). *Plant Physiology*, *104*(3), 899–906. <https://doi.org/10.1104/pp.104.3.899>
- Wang, R., Guegler, K., LaBrie, S. T., Crawford, N. M. (2000). Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. *The Plant Cell*, *12*(8), 1491–1509. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.8.1491>

- Wang, Rongchen, Tischner, R., Gutiérrez, R. A., Hoffman, M., Xing, X., Chen, M., Coruzzi, G., Crawford, N. M. (2004). Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of Arabidopsis. *Plant Physiology*, *136*(1), 2512–22.
<https://doi.org/10.1104/pp.104.044610>
- Wang, Rongchen, Xing, X., Wang, Y., Tran, A., Crawford, N. M. (2009). A Genetic screen for nitrate regulatory mutants captures the nitrate transporter gene NRT1.1. *Plant Physiology*, *151*(1), 472–478. <https://doi.org/10.1104/pp.109.140434>
- Wang, Y., Hsu, P., Tsay, Y. (2012). Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends in Plant Science*, *17*(8), 458–467.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.006>
- Wen, B., Li, C., Fu, X., Li, D., Li, L., Chen, X., Wu, H., Cui, X., Zhang, X., Shen, H., Zhang, W., Xiao, W., Gao, D. (2019). Effects of nitrate deficiency on nitrate assimilation and chlorophyll synthesis of detached apple leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, *142*, 363–371. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2019.07.007>
- Wimalanathan, K., Friedberg, I., Andorf, C. M., Lawrence-Dill, C. J. (2018). Maize GO Annotation—Methods, Evaluation, and Review (maize-GAMER). *Plant Direct*, *2*(4).
<https://doi.org/10.1002/pld3.52>
- Winkler, F. K. (2006). Amt/MEP/Rh proteins conduct ammonia. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, *451*(6), 701–7. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1511-6>
- Xie, Y., Mao, Y., Xu, S., Zhou, H., Duan, X., Cui, W., Zhang, J., Xu, G. (2015). Heme-heme oxygenase 1 system is involved in ammonium tolerance by regulating antioxidant defence in *Oryza sativa*. *Plant, Cell & Environment*, *38*(1), 129–143.
<https://doi.org/10.1111/pce.12380>
- Xu, G., Fan, X., Miller, A. J. (2012). Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, *63*, 153–82. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105532>
- Xuan, Y. H., Priatama, R. A., Huang, J., Je, B. Il, Liu, J. M., Park, S. J., Piao, H. L., Son, D. Y., Lee, J. J., Park, S. H., Jung, K. H., Kim, T. H., Han, C. (2013). Indeterminate domain 10 regulates ammonium-mediated gene expression in rice roots. *The New Phytologist*, *197*(3), 791–804. <https://doi.org/10.1111/nph.12075>
- Yang, H.-C., Kan, C.-C., Hung, T.-H., Hsieh, P.-H., Wang, S.-Y., Hsieh, W.-Y., Hsieh, M.-H.

- (2017). Identification of early ammonium nitrate-responsive genes in rice roots. *Scientific Reports*, 7(1), 16885. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17173-9>
- Yuan, L., Loqué, D., Kojima, S., Rauch, S., Ishiyama, K., Inoue, E., Takahashi, H., von Wirén, N. (2007). The organization of high-affinity ammonium uptake in Arabidopsis roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. *The Plant Cell*, 19(8), 2636–2652. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.052134>
- Zhang, H., Jennings, A., Barlow, P. W., Forde, B. G. (1999). Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(11), 6529–6534. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6529>

SITI WEB CONSULTATI

- <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- <https://software.broadinstitute.org/morpheus/>
- <https://imagej.nih.gov>
- <https://software.broadinstitute.org/morpheus/>
- <http://www.maizegdb.org>

RINGRAZIAMENTI

Molte persone che magari non hanno mai frequentato un ambiente universitario potrebbero pensare che un percorso di questo genere sia merito esclusivamente di una sola persona, che s’impegna e studia duramente, per ottenere alla fine di un lungo percorso il titolo di “dottore”. E in parte è vero.

Ma tutti noi “dottori” sappiamo che in realtà una laurea è una sinergia di molte persone e situazioni che l’hanno resa tale, come una pianta che lavora in sinergia nelle sue componenti per produrre ossigeno, crescere e vivere. Dedico questa laurea non a me stesso, che sarebbe egoistico nonché riduttivo, ma a queste grandi e speciali persone:

Innanzitutto, a mamma Valeria e papà Gianni, per il sostegno di questi lunghi anni, per le litigate, le gioie, i momenti di felicità e quelli di sconforto. Per i sacrifici che avete fatto per farmi studiare le parole non basteranno mai, nemmeno se continuassi a scrivere per l’eternità. Perciò a voi un unico e immenso grazie, siete delle persone veramente speciali ricordatelo a voi stessi ogni giorno.

A Lorenzo, che con la leggerezza di una canzone di Giovanni Caccamo è arrivato nella mia vita, insperato e desiderato nel momento in cui avevo più bisogno. Grazie per sopportarmi e avermi dato la forza di uscire dalla mia “chiusura”.

A mia sorella Alice e mio cognato Francesco, ai miei nipoti Caterina e Giosuè che con la dolcezza di un elefante sono entrati nella famiglia nel corso di queste due lauree.

Agli zii Edda e Mario, per le parole gentili, l’amore e l’affetto di cui mi hanno sempre fatto dono.

All’amica di una vita, Roberta, per i consigli preziosi, le litigate da coltello, e le avventure passate assieme nel corso di questi anni.

Agli amici storici, Mattia, Mirco, Damiano e Dario, per le serate passate assieme e i giretti in Opel/Tucson.

Ad Alessia, l'anno 2017 è stato forse uno dei più divertenti della mia vita specialmente grazie a te.

A Elisa, Greta e Jole, per i campiscuola passati assieme e le serate con i giochi in scatola più improbabili.

Alle amiche e amici di Biologia, per la disperazione di Anatomia compavata, per il divertimento e l'amicizia passati dentro e fuori il mitico Fiore di Botta.

A Giulia e Terry, un mix perfetto tra Pianiga e Valsugana che ha reso questa magistrale veramente speciale e sicuramente vissuta al meglio.

Alla professoressa Quaggiotti e alla dottoressa Ravazzolo, per i preziosi insegnamenti, consigli e aiuto datemi nel corso del tirocinio e della stesura della tesi.

A tutti voi grazie, questa laurea ricordatevi è anche vostra,

Lele