# Università degli Studi di Padova

**DIPARTIMENTO DI BIOMEDICINA COMPARATA ED ALIMENTAZIONE**

**Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali dell'Università della Tuscia**


**TESI SPERIMENTALE**

**Corso di laurea magistrale in "Biotecnologie per l'alimentazione"**

**(LM-9)**

# Predisposizione ciclica alla radicazione avventizia in due tessuti di ramo giovane e adulto in due genotipi di olivo: analisi molecolare


Relatore

Prof. Benedetto Ruperti

Correlatore

Prof. Rosario Muleo

Dott. Ivano Forgione

Candidato

Martina Pescatore

Matricola 2027734



Anno accademico 2021/2022

# INDICE

## Introduzione- prima parte


1. *Olea europaea ssp. europaea var. sativa L.* 7

1.1 Origine 7

1.2 Descrizione botanica 8

1.3 Forme di allevamento e sistemi colturali 10

1.4 Valore nutrizionale dell'olio d'oliva 12

1.5 Commercializzazione dell'olivo 13

1.5.1 Prospettive del mercato olivicolo 15

2. Predisposizione ontogenetica 17

3. L'apparato radicale 19

3.1 Crescita e architettura della radice 19

3.1.1 I processi di sviluppo che contribuiscono all'architettura dell'apparato radicale 20

3.1.2 Classificazione delle radici 21

4. La radicazione avventizia 24

4.1 Le tre fasi della radicazione avventizia 26

4.1.1 La fase di induzione 27

4.1.2 La fase di iniziazione 28

4.1.3 La fase di estensione 30

4.2 La regolazione della radicazione avventizia 31

4.2.1 I fitormoni 31

4.2.2 I carboidrati 34

4.2.3 Gli enzimi ossidativi 37

4.2.4 Le sostanze minerali 39

4.2.5 Le poliammine 40

5. L'auxina 42

5.1 La biosintesi dell'auxina 44

5.1.1 La via Trp-dipendente 45

5.1.2 La via Trp-indipendente 47

5.2 Il meccanismo d'azione dell'auxina 47

5.3 Il trasporto auxinico 49

## Analisi sperimentale-seconda parte

1. Scopo del lavoro 54

2. Materiali e metodi 56

2.1 Materiale oggetto di studio 56

2.2 Piano colturale dell'allevamento oggetto di campionamenti 56

2.3 Analisi molecolare 58

2.3.1 Estrazione RNA 58

2.3.2 Purificazione 60

2.3.3 Quantificazione 61

2.3.4 Retrotrascrizione 61

2.3.5 PCR-Real time 63

2.4 Studi di routine (formazione radici avventizie) 65

2.5 Analisi istologiche 65

3. Risultati e discussione 66

3.1 Analisi morfologiche 66

3.2 Analisi molecolari 67

3.2.1 Gene *ARF8* 67

3.2.2 Gene *ARF17* 70

3.2.3 Gene *PIN1a* 72

3.2.4 Gene *PIN5a* 74

3.2.5 Gene *PIN8* 75

3.2.6 Gene *AUX1* 76

3.2.7 Gene *BAM1* 78

3.2.8 Gene *AOX2* 81

3.2.9 Gene *FT1* 83

3.3 Analisi istologiche 83

4. Conclusioni 86

Bibliografia 88

Sitografia 116

Ringraziamenti

# RIASSUNTO

La predisposizione ontogenetica è intrinseca agli organismi viventi e guida i ritmi e i tempi degli eventi morfologici che appaiono nel corso della vita. L'ontogenesi è un processo continuo di eventi differenti, un evento morfologico succede al precedente, e ciò dipende dal susseguirsi di nuove informazioni. Un classico esempio è la transizione dalla fase giovanile a quella adulta. La radicazione avventizia (RA) è un paradigma dello scostamento dello svolgimento regolare dell'attività morfo-fisiologica. Una porzione del ramo, quando integrata nell'organo della chioma, svolge la funzione coerente e coordinata con il suo stato, ma in seguito alla separazione dal ramo il flusso regolare dell'informazione cambia repentinamente. Tra gli attori che regolano la modifica dell'informazione è da annoverare l'auxina, la quale promuove il radicamento avventizio attraverso una rete di segnalazione che coinvolge i fattori di risposta dell'auxina (ARF) e altri ormoni vegetali. L'auxina stimola la mobilitazione dei carboidrati nelle foglie e nello stelo, aumentando la traslocazione degli assimilati verso la zona dove si svilupperanno le radici.

Nell'ambito della industria vivaistica, è presente l'obiettivo di individuare il periodo idoneo per il prelievo delle talee, correlato al momento di più elevata capacità rizogena (alta competenza) dei tessuti corticali del ramo. In generale, tale obiettivo è perseguito considerando parametri morfo-fisiologici. In questo studio di tesi le attività di indagini molecolari hanno voluto chiarire se è presente una predisposizione alla radicazione avventizia dovuta alla presenza di cicli ontogenici, e, in ricaduta, indentificare determinanti molecolari da impiegare come marcatori per il campionamento delle talee. Pertanto, sono stati condotti studi molecolari durante l'arco temporale ottobre-maggio, per verificare se in *Leccino* (*LE*) e *Salviana* (*SA*) nei rami fruttiferi (RF) e succhioni (S) delle due cultivar, esistesse una predisposizione ontogenetica alla RA, ossia se la pianta predisponesse i suoi organi aerei alla competenza. Geni coinvolti nei pathway di regolazione della RA sono stati analizzati.

I risultati evidenziano un'oscillazione dell'espressione di geni, in particolare *ARF8*, promotore della radicazione, è fortemente attivo nel periodo di competenza (fine inverno-inizio primavera), mentre è ridotta nel periodo di riposo invernale, in cui si espleta l'induzione e sviluppo dell'infiorescenza (dicembre-febbraio). L'espressione del gene *ARF17*, regolatore negativo della RA, è inferiore a *ARF8* nel periodo di competenza. È stata analizzata, inoltre, l'espressione dei trasportatori dell'efflusso dell'auxina *PIN1A*, *PIN5A*, *PIN8*, e dei geni *LAX2 e AUX1* trasportatori di influsso dell'auxina, oltre a *AOX2* e *BAM1* coinvolti rispettivamente negli stati di ossidazione e nella mobilitazione di sostanze di riserva. Le analisi morfo-anatomiche hanno evidenziato nei S uno xilema molto più sviluppato. Nei tessuti corticali dei RF delle due cvs è presente uno strato continuo di grosse cellule parenchimatiche, con grosso vacuolo, mentre nei S è presente solo in *LE*. Le fibre sclerenchimatiche del floema sono disposte a gruppetti isolati in RF e S di *LE* e nel S di *SA*. Nel RF di *SA* costituisce uno strato continuo. Grazie a questo studio sono stati posti ulteriori tasselli per individuare determinati genici da impiegare come marcatori molecolari, utili nell'identificare il periodo in cui la pianta si appresta ad accettare segnali che cambiano il destino cellulare verso la Cell Fondation da cui si originano le radici avventizie.

# ABSTRACT

Ontogenetic predisposition is intrinsic to living organisms and draws rhythms and timing of morphological events that occur during life. Ontogenesis is a continuous process where one morphological event appears to the previous one and it depends on the activation of new information. A classic example is the transition from juvenile to adult stage. Adventitious rooting (AR) is a paradigm of the deviation from the regular course of morpho-physiological activity. A portion of the branch, when integrated into the canopy organ, performs a function consistent and coordinated with its state, but after the remotion the regular flow of information changes abruptly. Plant Hormones play a key role in the change of the information, and among them auxin promotes adventitious rooting through a signalling network involving auxin response factors (ARFs), and other plant hormones. Auxin stimulates the mobilisation of carbohydrates in the leaves and in the stem tissues, increasing the translocation of assimilates to the zone of adventitious root formation.

The objective of the nursery industry is to identify the appropriate time for sampling cuttings, which correlates with the time of highest rhizogenic capacity (high competence). Usually, it is pursued considering mainly morpho-physiological parameters. In this work, molecular studies were carried out during the October-May time span, to verify whether fruiting branches (FB) and young shoot (S) of cultivar *Leccino* (*LE*) and *Salviana* (*SA*) are under ontogenetic predisposition to AR, or rather, whether the plant predisposes its aerial organs to competence. This goal was reached through the expression studied of genes involved in AR regulatory pathways.

The results show an oscillation in the expression of genes, in particular the level of transcripts of *ARF8*, a rooting promoter, are higher during the period of competence (late winter-early spring), while it is lower during the period of induction involved in inflorescence structure (December-February). The expression of the *ARF17* gene, a negative regulator of RA, is lower in the competence period. The gene expression of the auxin efflux transporters *PIN1A*, *PIN5A*, *PIN8*, and the auxin-influx transporters *LAX2* and *AUX1*, as well as *AOX2* and *BAM1* involved in oxidation states and mobilisation of reserve substances, respectively, were also analyzed and many interesting transcription pathways have emerged. Morpho-anatomical analyses showed a much more developed xylem in the S. In the cortical tissues of the RF of the two cvs there is a continuous layer of large parenchyma cells, with a large vacuole, whereas in the S it is only present in the LE. The sclerenchymatic fibres of the phloem are arranged in isolated clusters in the FB and S of LE and in the S of SA. In the FB of SA it forms a continuous layer.

Thanks to this study, further steps have been taken to identify certain genes to be used as molecular markers, which are useful to identify the period when the plant is about to accept signals that change cell fate towards the cell foundation from which adventitious roots originate.

# INTRODUZIONE-PRIMA PARTE

## 1. Olea europaea

L'olivo (*Olea europaea* ssp. europaea var. sativa L.) è una delle principali colture del bacino del Mediterraneo (Fig.1) e la sua area di produzione si sta espandendo in tutto il mondo, a seguito di un aumento del consumo di olio d'oliva. Negli ultimi anni, infatti, l'olivicoltura ha raggiunto anche luoghi lontani dalle sue origini come l'Africa australe, l'Australia, il Giappone e la Cina. Gli olivi sono principalmente propagati per talea, un processo dipendente dalla capacità di formare nuove radici avventizie e proprio delle piante. Tuttavia, alcune cultivars importanti mostrano un comportamento contrario alla radicazione avventizia (Fouad et al., 1990).

Fig. 1 Olea europaea, varietà Leccino da allevamento presso Montopoli (ARSIAL)

### 1.1 Origine

Oggi, centinaia di varietà di olivo producono olio e olive da tavola (Bartolini et al., 2005). L'origine dell'olivo è ancora molto dibattuta (Vossen, 2007; Margaritis, 2013). Si è a lungo ipotizzato che l'olivo non fosse nativo del bacino mediterraneo e che le cultivar fossero state introdotte da regioni adiacenti (e.g., Oliver, 1868; Newberry, 1937; Ciferri & Breviglieri, 1942; Chevalier, 1948; Turrill, 1951), ma oggi questa idea è stata smentita ed è stata dimostrata l'origine mediterranea (e.g., Angiolillo et al., 1999; Besnard et al., 2001b; Terral et al., 2004; Carrión et al., 2010). Questa, infatti, si è ambientata molto bene nel bacino mediterraneo soprattutto in Italia, nel sud della Spagna e della Francia, in Grecia e in alcuni Paesi mediorientali che si affacciano sul Mediterraneo orientale. In Italia, si ritiene che l'uso dell'olio d'oliva si sia diffuso dalla Magna Grecia, nel Sud, al resto della penisola. Durante il Medioevo si potevano distinguere tre aree di coltivazione con piccoli oliveti nel nord d'Italia; il centro, dove le grandi famiglie fiorentine e lucchesi coltivavano le olive per il proprio consumo; e il sud, con l'importante porto commerciale dell'olio d'oliva di Gaeta e la Sicilia, comprendente grandi estensioni di oliveti. La coltivazione

dell'olivo rimase marginale fino al XIV e XV secolo, quando iniziò ad espandersi fino ad acquisire l'aspetto e l'importanza che ha oggi. Nella prima età moderna, l'olivicoltura si espanse in modo significativo in tutta la regione mediterranea, a causa non solo dello sviluppo commerciale, ma anche dell'aumento della domanda interna ed estera (dalle colonie americane). Si ritiene che l'inizio del Settecento abbia segnato il passaggio dall'olivicoltura antica a quella moderna e che abbia tracciato la mappa agricola del Mediterraneo. Poiché l'olivo è stato sfruttato dall'uomo fin dalla preistoria, è importante identificare le ragioni della sua coltivazione e definire il processo di addomesticamento. Le comunità umane sedentarie hanno probabilmente creato i primi frutteti di genotipi di olivo selezionati (in particolare, con un'allegagione più elevata, frutti più grandi e un più alto contenuto di olio) per ottimizzare la produzione di olive e di olio e soddisfare l'aumento della domanda locale o regionale dovuta alla crescita della popolazione umana. La domesticazione dell'olivo è caratterizzata anche dalla propagazione vegetativa dei genotipi (Zohary et al., 2012). Questi, sono stati probabilmente selezionati per la loro capacità di crescere in ambienti antropici e per la loro propensione alla moltiplicazione (ad esempio, innesti e talee). Tuttavia, è molto probabile che la domesticazione dell'olivo sia stata un processo continuo che ha comportato la selezione di alberi propagati sia con la riproduzione vegetativa che per riproduzione sessuale, nonché la coltivazione ripetuta di alberi selvatici che presentavano i tratti agronomici più interessanti (Rugini et al., 2016). Tali pratiche sono ancora presenti in alcuni luoghi, e il tradizionale sfruttamento delle forme spontanee può essere osservato in diversi luoghi del bacino del Mediterraneo: ad esempio, Monastero di Stavrovouni, Cipro; Montagne del Rif, Marocco; Montagne Andaluse, Spagna (Besnard et al., 2013a; Besnard et al., 2013b; Rubio de Casas et al., 2006).

L'olivo coltivato appartiene alla vasta famiglia delle Oleaceae, la quale comprende ben 30 generi (fra i quali ricordiamo il Ligustrum, il Syringa e il Fraxinus). La specie *Olea* è suddivisa in due sottospecie, l'olivo coltivato (*O. europaea ssp. europaea var. sativa*) e l'oleastro (*O. europaea ssp. europaea var. sylvestris*). Il patrimonio olivicolo italiano comprende oltre 500 cultivar; la presenza di così tante varietà è legata alle diverse condizioni ambientali che caratterizzano la nostra olivicoltura. Il sito http://www.oleadb.it è un database che raccoglie il germoplasma olivicolo e permette di avere tutte le informazioni riguardo ai caratteri morfologici e agronomici del nostro patrimonio olivicolo.

## 1.2 Descrizione botanica

L'olivo è una pianta longeva che può facilmente raggiungere alcune centinaia d'anni: questa caratteristica è da imputarsi soprattutto al fatto che rigenera completamente, o in buona parte, l'apparato epigeo e ipogeo danneggiato. L'olivo è una pianta sempreverde e la sua fase vegetativa è pressoché continua durante tutto l'anno, con un calo nel periodo invernale. L'olivo è una specie tipicamente basitone ed assume senza intervento antropico la forma tipicamente conica. Le gemme sono, prevalentemente, di tipo ascellare: da notare che in piante molto vigorose, oltre che alle gemme a fiore e a legno, si possono ritrovare anche gemme miste che producono sia fiori che foglie e rami. I fiori sono ermafroditi, pistilliferi e staminiferi: essi sono piccoli, bianchi e privi di profumo, costituiti da un calice di 4 sepali e corolla gamopetala a 4 petali bianchi. I fiori sono raggruppati in mignole di 10-

15 fiori ciascuna che si formano da gemme fiorifere o miste presenti su rami dell'anno precedente o su quelli di quell'annata (Fig. 2).

Fig.2 Fiore dell'olivo. Fonte: https://www.agraria.org

La mignolatura è scalare ed inizia a partire da fine marzo in maniera abbastanza precoce nella parte esposta a sud e termina a maggio, mese della fioritura. L'impollinazione è anemofila, ottenuta attraverso il trasporto di polline dal vento e non avviene per impollinazione entomofila (insetti pronubi). Le foglie sono di forma lanceolata, disposte in verticilli ortogonali fra di loro, coriacee. Sono di colore verde glauco e glabre sulla pagina superiore mentre hanno peli stellati su quella inferiore che le conferiscono il tipico colore argentato e la preservano dalla eccessiva traspirazione durante le calde estati mediterranee. Il frutto è una drupa ovale ed è l'unico frutto dal quale si estrae un olio. La buccia, o esocarpo, varia il suo colore dal verde al violaceo a differenza delle diverse cultivar. La polpa, o mesocarpo, è carnosa e contiene il 25-30% di olio, raccolto all'interno delle sue cellule sottoforma di piccole goccioline. Il seme è contenuto in un endocarpo legnoso, anche questo ovoidale, ruvido e di colore marrone. Caratteristiche del tronco, sin dallo stadio giovanile, è la formazione di iperplasie (ovuli, mammelloni, puppole) nella zona del colletto appena sotto la superficie del terreno; simili strutture si possono ritrovare inoltre sulle branche: comunque queste formazioni sono date non da fattori di tipo parassitario ma da squilibri ormonali e da eventi di tipo microclimatico. Le radici seminali sono prevalentemente di tipo fittonante nei primi tre anni di età, mentre dal quarto in poi si trasformano quasi completamente in radici di tipo avventizio, superficiali e che garantiscono alla pianta vigorosità. Il portamento alternato di alberi da frutto è noto fin dall'antichità, eppure rimane un problema con numerose colture di alberi da frutto ancora oggi. Monselise e Goldschmidt (1982) hanno sottolineato che la fruttificazione irregolare è il comportamento normale degli alberi nel loro ambiente naturale. Eliezer Goldschmidt (2005) ha proposto che in un ampio senso evolutivo, il cuscinetto alternativo dovrebbe forse essere inteso come un fenomeno di omeostasi. Gli alberi sotto stress possono rispondere alternando, spostando le loro risorse alla crescita vegetativa e alla struttura per un anno o due, fornendo così la piattaforma necessaria per la fruttificazione a lungo termine. La moderna coltivazione di alberi da frutto elimina molti stress naturali (ad esempio, siccità e parassiti), fornendo così un comportamento fruttifero più regolare e soddisfacendo la rigida domanda di produzione stabile da parte dell'industria della frutta.

## 1.3 Forme di allevamento e sistemi colturali

Le forme di allevamento cambiano da zona a zona, da varietà a varietà ma, soprattutto, in funzione del tipo di raccolta da praticare. L'olivo è una pianta mediterranea e come tale ha bisogno di molta luce, aria e richiede la maggior massa di foglie per dare buoni risultati produttivi, che produce su rami di un anno, da rinnovare annualmente, evitando, allo stesso tempo, gli ombreggiamenti che hanno effetti sensibili e negativi sui risultati produttivi ed economici della coltura. La forma a vaso è la più diffusa tra i sistemi di allevamento dell'olivo. Dal fusto, una volta reciso a una determinata altezza, si fanno partire esternamente delle branche che donano alla chioma la classica forma di cono, o di cilindro, oppure conico-cilindrica, o tronco-conica. Questo sistema permette di evitare l'eccessivo infittimento della vegetazione.

Fig.3 Forma di allevamento a vaso policonico

Il vaso policonico (Fig.3), con le branche impalcate a 1-2 m da terra, permette alle piante di fruttificare molto in alto, rendendo difficili e costose le operazioni di potatura e raccolta. La forma libera o a cespuglio, si ottiene senza effettuare nessun intervento di potatura alla pianta nei primi 8-10 anni, fatto salvo l'eventuale diradamento dei rametti alla base per i primi 40-50 cm, da effettuarsi subito dopo il trapianto o alla fine del primo anno. In seguito allo sviluppo dell'olivo si ottiene un cespuglio globoide con varie cime e contenuto in altezza, simile alla forma naturale. Dal decimo anno in poi si prevedono interventi di potatura più o meno drastici che possono andare da un abbassamento delle cime, con sfoltimento della chioma, a una stroncatura turnata di tutte le piante dell'appezzamento. Nella forma globosa, molto simile ad un cespuglio (Fig.4), il fusto viene reciso a una determinata altezza e le branche si sviluppano da tale piano senza un ordine prestabilito per raggiungere, con le ramificazioni, altezze diverse. Quando le ramificazioni non scendono molto lateralmente, ma si estendono soltanto nella parte superiore, come quelle del pino da pinoli, si ha l'ombrello. Tra le forme di allevamento basse ricordiamo: la palmetta libera, il vaso cespugliato, il cespuglio allargato lungo il filare (ellittico) o espanso (circolare), monocono

o a cordone, a siepone. Queste forme tendono a realizzare una massa continua di vegetazione lungo il filare alta fino a 4 m. Il vaso cespugliato presenta 3-4 branche principali che si dipartono dal suolo e possono derivare da gruppi di 3-4 piantine.

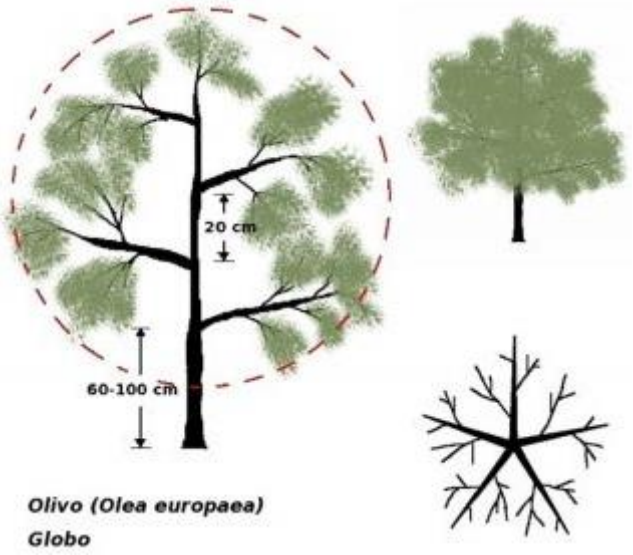



Fig.4 Forma di allevamento a globo

Il monocono (Fig.5) è una forma a tutta cima, molto simile al fusetto utilizzato in frutticoltura, di semplice manualità nella potatura. Per l'impostazione di questa forma di allevamento si consigliano potature estive di formazione nei primi due anni allo scopo di eliminare le ramificazioni basali del tronco nei primi 80-90 cm, guidare la cima al tutore e sopprimere eventuali ramificazioni laterali assurgenti che possono entrare in concorrenza con l'unica cima. I rami legnosi saranno intervallati tra loro di 50-60 cm in modo da conferire alla pianta, a struttura ultimata, la forma di un cono col vertice rivolto verso l'alto. È la forma di allevamento più adatta alla raccolta meccanica per vibrazione del tronco, ma la fruttificazione non è sempre regolare.

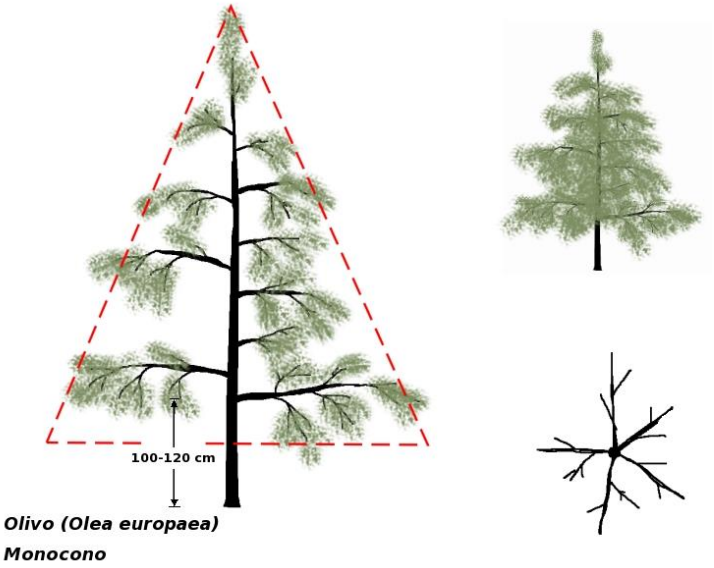



Fig.5 Forma di allevamento a monocono.

Le forme di allevamento libere sono più adatte per quelle aziende che dispongono di poca manodopera per le operazioni di potatura e raccolta. Le forme di allevamento ad alta densità consentono la raccolta meccanica in continuo e vengono utilizzate per varietà a bassa vigoria e con un portamento compatto. Le branche laterali, di uguale lunghezza, crescono attorno all'asse centrale per formare una parete di vegetazione con distanze intorno a 1,5 (sulla fila) x4 (tra le file) m.

## 1.4 Valore nutrizionale dell'olio d'oliva

L'olio d'oliva è la principale fonte di grassi nella dieta Mediterranea ed è associato ad una minore incidenza delle malattie coronariche e alcuni tumori. Particolarità dell'olio d'oliva è l'abbondanza di acido oleico, acido grasso monoinsaturo, la cui concentrazione varia dal 56% all'84% degli acidi grassi totali, mentre l'acido linoleico, il principale acido grasso polinsaturo nella nostra dieta, è presente in concentrazioni tra il 3 e il 21% (Visioli et al., 2002). Gli acidi grassi polinsaturi sono acidi grassi essenziali (EFA), poiché non possono essere sintetizzati dall'organismo. L'olio di oliva si ottiene dalla spremitura del frutto intero, permettendo di conservare le qualità organolettiche delle olive e, tra i costituenti minori, troviamo le vitamine e il β-carotene, fitosteroli, acidi terpenici, squalene, flavonoidi e altri composti fenolici. I composti fenolici (Fig.6) presenti nella drupa e nell'olio extravergine d'oliva hanno un elevato potenziale antiossidante (Fig.7) e sono associati ad effetti cardiovascolari benefici. L'olio extravergine d'oliva contiene da 150 a 200 mg/kg di α-tocoferolo con un rapporto ottimale di vitamina E per grammo di acidi grassi polinsaturi. Il corpo a livello intestinale assorbe tutti i tipi di tocoferolo ugualmente bene, ma dopo che li ha identificati, elimina i tipi β, γ e δ con la bile, mantenendo soltanto la forma α, la vera vitamina E (Viola & Viola, 2009). Le diete ad alto contenuto di acidi grassi monoinsaturi hanno meno probabilità rispetto a quelle ad alto contenuto di grassi polinsaturi di essere coinvolte nell'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDLs), meccanismo da tenere sotto controllo poiché favorisce l'insorgenza di aterogenesi e malattie coronariche (Frankel, 2011).

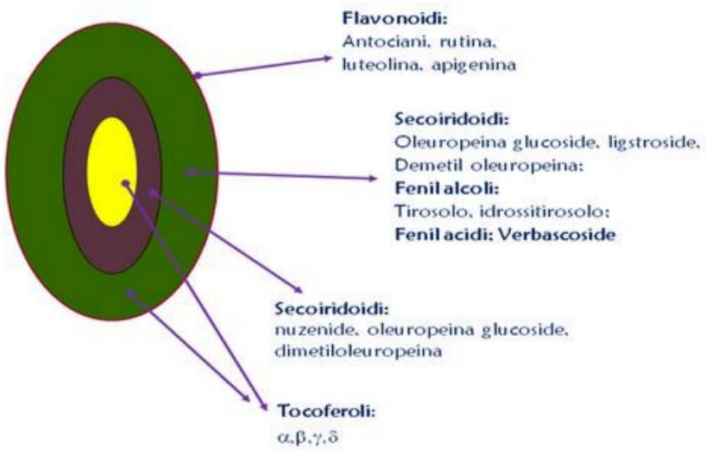



Fig.6 Composizione della drupa di olivo.

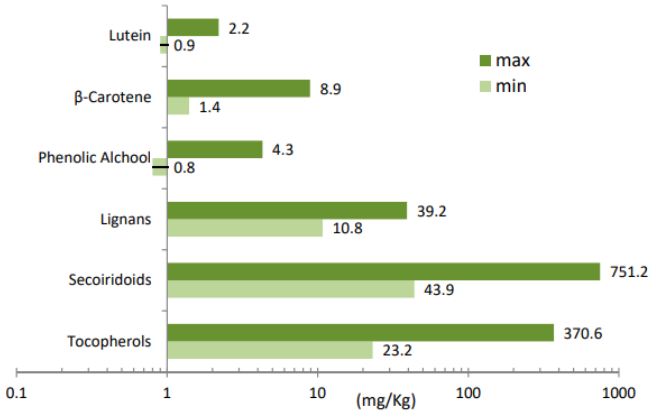



Fig.7 Concentrazione minima e massima dei principali antiossidanti nell'olio extravergine d'oliva (EVOO) proveniente da diverse regioni italiane (Antonini et al., 2016; Lanza et al., 2020; Ninfali et al., 2002; Psomiadou et al., 2000).

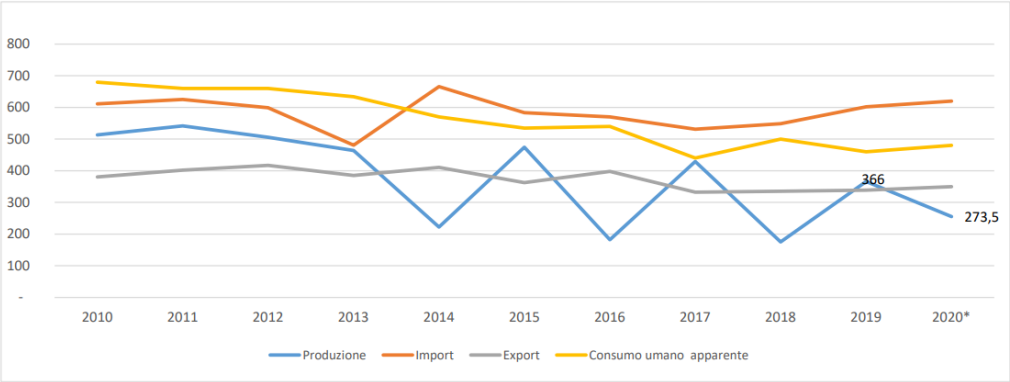
## 1.5 La commercializzazione dell'olivo

Il settore olivicolo-oleario ha una storia millenaria nella nostra cultura, presente in gran parte della nostra Penisola. La produzione di olio di oliva è concentrata nel bacino del Mediterraneo e Spagna e Italia rappresentano i Paesi che esportano maggiormente a livello mondiale. La produzione italiana copre mediamente il 15% di quella mondiale. Anche sul fronte dell'import, l'Italia è il primo grande cliente, seguita dagli Stati Uniti. Secondo il Ministero delle Politiche Agricole (MIPAAF, 2010), in Italia sono coltivati 179 334 841 olivi su 1 350 000 ettari di terreno, con una densità media di 165 piante/ha. Le aziende olivicole sono tendenzialmente di piccole dimensioni, con una media di meno di un ettaro a livello nazionale. L'olivo cresce da migliaia di anni in quasi tutta l'Italia e la maggiore produzione si concentra nelle regioni meridionali, con in testa la Puglia, seguita da Calabria e Sicilia (Fig.8).

| | Quota | Media ultime 4campagne (2017-2020) |
|---|---|---|
| Piemonte | 0,0% | 14 |
| Lombardia | 0,3% | 854 |
| Trentino Alto Adige | 0,1% | 377 |
| Veneto | 0,7% | 2.037 |
| Friuli Venezia Giulia | 0,0% | 109 |
| Liguria | 1,2% | 3.882 |
| Emilia Romagna | 0,4% | 1.202 |
| Toscana | 5,3% | 16.585 |
| Umbria | 1,7% | 5.410 |
| Marche | 1,1% | 3.435 |
| Lazio | 4,5% | 13.854 |
| Abruzzo | 3,1% | 9.613 |
| Molise | 0,9% | 2.923 |
| Campania | 4,1% | 12.814 |
| Puglia | 49,0% | 152.283 |
| Basilicata | 1,5% | 4.685 |
| Calabria | 13,6% | 42.402 |
| Sicilia | 11,1% | 34.373 |
| Sardegna | 1,3% | 4.099 |
| **Italia** | **100,0%** | **310.952** |

Fig.8 Grafico di produzione di olio d'oliva (tonnellate) in Italia basato su dati AGEA.

Il 2021 è stato un anno segnato da importanti incrementi dei listini dovuti ad una scarsa produzione del 2020. La produzione degli ultimi anni è decisamente in calo e il consumo è sempre superiore alla produzione (Fig. 9), a dimostrazione che l'Italia non è autosufficiente. L'import, necessario anche per soddisfare la domanda interna, è quasi sempre superiore all'export che rende il saldo della bilancia commerciale strutturalmente negativo in volume e in valore. Questa tendenza negativa è anche dovuta all'aumento delle temperature e alla diminuzione delle precipitazioni, oltre che agli alti costi di produzione e al basso prezzo di vendita delle olive. Tuttavia, la campagna produttiva attuale (2021/2022) si sta rilevando tutt'altro che scarsa e con una produzione di circa 3,4 milioni di tonnellate. Quasi tutti i principali produttori, comunitari e non, hanno incrementato le proprie produzioni, a partire dall'Italia.




*Fonte: ISMEA; *stima*

Fig.9 Stime ISMEA di import ed export dell'olio extravergine d'oliva in Italia.

Secondo la lista degli oli di qualità riconosciuti in Unione Europea, quasi il 40% è rappresentato da marchi italiani, pari a 48 prodotti a denominazione; tra questi, 6 sono inseriti tra i prodotti IGP. All'Italia seguono Grecia e Spagna, con 29 riconoscimenti ciascuno. Gli oli extravergini DOP e IGP vantano nel 2019 un valore di consumo di 134 milioni di euro. Il Lazio si colloca tra le prime cinque principali regioni italiane per il suo apporto alla produzione nazionale, con i suoi 67 996 ettari di superficie, 220 frantoi e circa 67 000 aziende (Brugneti, 2022). A livello regionale sono riconosciute 4 DOP (Sabina, Canino, Tuscia; Colline Pontine e nel 2021 è stata riconosciuta un'indicazione geografica protetta (IGP): Olio di Roma; tra le produzioni agroalimentari tradizionali della regione, sono stati censiti 9 oli extravergini monovarietali. Il settore olivicolo nel Lazio è fortemente in crescita, con la produzione di oli di prima qualità riconosciuti sia a livello nazionale che internazionale.

Dando uno sguardo alla situazione nella Regione Veneto, il comparto olivicolo rappresenta lo 0,5% del totale della produzione italiana. L'olivo è stato introdotto dai coloni romani sulle colline veronesi, per cui la sua coltivazione è storica. Le zone di produzione comprendono le colline della Valpolicella, di Bassano del Grappa e dei colli Euganei e Berici. Le zone del lago di Garda producono maggiormente le varietà Casaliva, Frantoio e Leccino; la varietà Leccino insieme alla Rasara caratterizza le colline Beriche ed Euganee; le Prealpi vicentine sono caratterizzate dalle varietà Leccino e Frantoio; infine, in Valpolicella abbiamo Grignano e Favaroi. Nel 2020 la resa di produzione in Veneto è fortemente cresciuta ed è risultata pari a circa 4,8 t/ha, con un forte incremento rispetto all'annata disastrosa del 2019. La maggiore produzione si ha nella provincia di Verona, seguita da Treviso e Vicenza. Il 2020 si è rivelato un anno di carica per la coltura dell'olivo con una produzione di olive pari a 24 540 tonnellate circa,

con il 70% della produzione localizzata su Verona. Dopo il forte rialzo produttivo registrato nel 2020, le olive raccolte nel 2021 sono stimate in circa 6.310 tonnellate (-74,4%).

Negli ultimi anni sta crescendo la competizione internazionale: nel Nord America cresce la produzione di olio e quello californiano è sempre più apprezzato dal mercato interno. Il Sud America è un'area in forte espansione sia dal punto di vista di produzione che del consumo e l'Argentina e il Cile sono i maggiori produttori. L'area Magrebina dell'Africa si sta sempre più affermando come bacino produttivo. In Australia sta crescendo la produzione, passata in cinque anni da 5 a 13 tonnellate, mentre l'Asia è considerata un mercato emergente, dove risultano promettenti Giappone, Cina e India. Per questo, insieme alle altre problematiche di settore, è necessaria un'analisi approfondita per individuare le strategie future che le imprese dovranno attuare.

### 1.5.1 Prospettive del mercato olivicolo

Ogni prodotto alimentare, già per il fatto di essere stato immesso nel mercato alimentare, deve essere sano, sicuro e adatto al consumo umano: gli alimenti non possono essere immessi sul mercato se sono dannosi per la saluti o inadatti al consumo, come sottolinea l'art.14 del Regolamento (CE) n.178/02 (c.d. General Food Law), che stabilisce i principi e i requisiti essenziali della legislazione alimentare, elenca le procedure nel campo della sicurezza alimentare e istituisce l'EFSA (Autorità della sicurezza alimentare a livello europeo).

La domanda di olio extravergine cresce sempre di più a seguito del maggior consumo mondiale; proprio per questo motivo, nei prossimi anni si prevede una progressiva crescita degli scambi internazionali. La riforma in atto della politica agricola comunitaria, se ben attuata, potrebbe diventare una grossa opportunità di innovazione per il settore che necessita di una visione strategica per superare questa fase di indecisione e per accrescere la propria competitività sia sul mercato interno che estero e arrivare, intanto, ad una maggiore produzione nel complesso e nello stesso tempo ad accrescere significativamente le produzioni di qualità valorizzando un patrimonio varietale unico al mondo. È necessario disegnare una strategia coerente nel Piano Strategico Nazionale della PAC 2023/2027 che risponda anche agli obiettivi di agenza 2030. Il nuovo approccio include la valorizzazione delle strategie Farm to Fork e biodiversità, per rispondere alla situazione di crisi del settore e rilanciarlo nel medio-lungo termine mediante l'attuazione di strategie innovative. La strategia Farm to Fork rappresenta un approccio globale al valore che l'Unione Europea attribuisce alla sostenibilità ambientale, per migliorare gli stili di vita, la salute e l'ambiente. Il Piano strategico della PAC prevede interventi verticali e orizzontali: i primi sono incentrati sugli investimenti che andranno a modernizzare la filiera mentre i secondi promuovono e valorizzano il prodotto e il territorio. A tal fine si devono predisporre azioni quali:

- Trasformare almeno il 40% di produzione olearia in produzioni biologiche;
- Razionalizzare l'uso di pesticidi e nutrienti con certificazione SQNPI (Sistema Qualità Nazionale Produzione Integrata), un sistema introdotto dal MIPAAF che prevede norme tecniche per ogni tipo di coltura che vanno a disciplinare le pratiche agronomiche;

- Realizzare aree olivicole per la conservazione della biodiversità del germoplasma, della resilienza ecologica e dello stoccaggio del carbonio per almeno il 20% delle superfici esistenti;
- Registrare almeno il 30% delle superfici olivicole dei paesaggi tradizionali al Registro nazionale dei paesaggi rurali storici;
- Costituire una rete di vivai olivicoli integrati nella politica della biodiversità e della ricerca in campo genetico;
- Realizzare nuovi impianti incrementando la superficie olivicola esistente per almeno il 20% con biodiversità diffusa al fine di una produzione biologica;
- Aumentare le certificazioni IG, rafforzando la produzione certificata;
- Valorizzare la commercializzazione dell'olio nonché le attività di oleoturismo;
- Crescita della produzione nazionale ma solo in termini di qualità (intrinseca, biodiversità, sostenibilità ecc.);
- Promuovere la comunicazione per accrescere le conoscenze del consumatore e degli effetti salutistici dell'olio extravergine, tenendo anche conto dell'affermazione sul mercato di nuovi oli di semi meno tradizionali, quali l'olio di lino, di canapa, di riso, ecc.;
- Promozione della competenza del consumatore per contrastare la tendenza all'appiattimento del gusto e stimolare il fabbisogno di conoscenza;
- Analisi del prezzo dell'olio extravergine, permettendo di capire dove, e a quale costo, si genera la qualità, il ruolo dei volumi, la necessità di un differenziale di prezzo.

L'intento di questo approccio strategico è portare il settore olivicolo-oleario a diventare un vero prodotto "culturale" che crei valore per i territori, per gli imprenditori e benessere per l'Europa e, più nello specifico, all'Italia. Tutto questo ponendo al centro gli obiettivi sostenibili del piano di azione di Agenda 2030.

## 2. Predisposizione ontogenetica

L'ontogenesi è un processo continuo. Nelle piante inizia a partire dalla fecondazione della cellula uovo o dalla comparsa di gemme rudimentali in organi e tessuti generativi della pianta materna, e termina con la morte della pianta. L'ontogenesi rappresenta quindi il ciclo di vita completo di una pianta, compresi tutti i suoi processi e le sue funzioni e consiste nelle seguenti fasi (Fig.10):

- Embrionale (seme o germoglio)
- Giovanile
- Maturità (sessuale o vegetativa)
- Riproduzione (sessuale o vegetativa)
- Evoluzione
- Senescenza

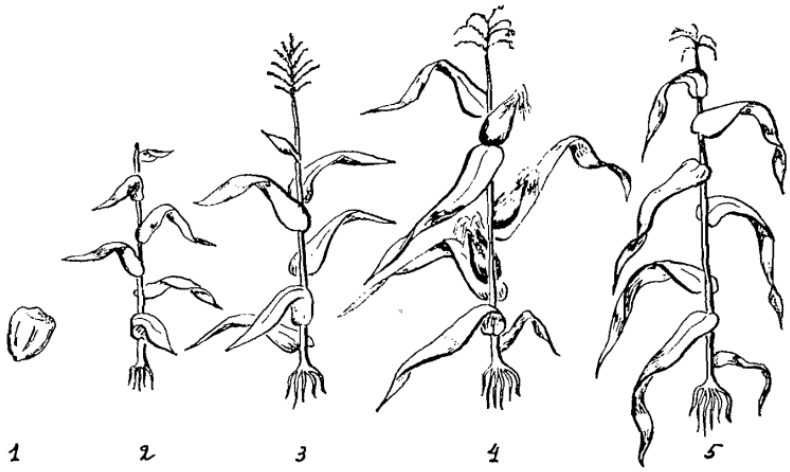



Fig.10 Stadi ontogenetici del ciclo di vita delle piante:1) embrionale; 2) giovanile; 3) maturità; 4) riproduzione; 5) senescenza (Harper et al., 1977).

Le piante monocarpiche attraversano tutti questi stadi dell'ontogenesi consecutivamente e una sola volta, per cui producono fiori e semi solo una volta nella vita. Le piante policarpiche producono fiori e frutti molte volte ogni anno, sono piante longeve. La sua durata può essere caratterizzata non solo dal tempo fisico (anni, mesi, ecc.), ma anche dal tempo biologico inerente alla vita di un organismo (Harper, 1977). La divisione del processo ontogenetico continuo in stadi funzionali consente di ottenere le scale coerenti del tempo biologico per diverse specie con diversa durata della vita. La crescita vegetativa, ovvero la formazione e la crescita degli organi vegetativi come fusti, foglie e radici, è il processo più stabile dell'ontogenesi, interrotto solo dai periodi di riposo. Lo sviluppo generativo rappresenta la formazione e la crescita di organi riproduttivi come i fiori e i frutti nelle piante da seme e i tuberi delle radici. Sia la crescita vegetativa che lo sviluppo generativo comportano la formazione di strutture qualitativamente nuove e la loro crescita quantitativa. Allo stesso tempo c'è una differenza radicale tra questi processi, che si manifesta nell'andamento generale dell'ontogenesi. La crescita vegetativa e lo sviluppo generativo, essendo diversi per sviluppo generativo, sono processi strettamente interagenti; questa interazione è di carattere conflittuale. Lo sviluppo di piante monocarpali di solito inibisce la loro crescita, mentre lo sviluppo di alberi perenni

non esercita un effetto inibitorio sulla crescita. L'effetto inverso della crescita vegetativa sullo sviluppo generativo si manifesta anche con il ritardo o l'inibizione di quest'ultimo.

L'ontogenesi delle piante, il loro passaggio da uno stadio all'altro, è il risultato dell'interattività di forze motrici interne che si sviluppano nell'organismo in relazione alle condizioni ambientali. Durante l'ontogenesi, tali forze motrici sono i contrasti tra senescenza e ringiovanimento, crescita vegetativa e sviluppo genetico. I cambiamenti di età sono la manifestazione della contraddizione tra i processi di ringiovanimento e senescenza. Durante la loro ontogenesi, le piante subiscono cambiamenti di età che si verificano sia nelle cellule, nei tessuti e negli organi, sia in interi organismi. I cambiamenti di età consistono in processi di ringiovanimento che sono caratterizzati dall'attivazione del metabolismo, dalla prevalenza del sistema e dalla formazione di nuove strutture attive, e processi di invecchiamento che sono caratterizzati da una diminuzione del metabolismo e dall'accumulo di strutture a bassa attività. I processi di invecchiamento e di ringiovanimento sono indissolubilmente interconnessi; sono caratteristici sia della giovinezza che della senescenza. Durante il periodo della giovinezza, tuttavia, l'equilibrio è spostato verso la prevalenza dei processi di ringiovanimento, mentre durante la senescenza favorisce i processi di invecchiamento.

L'ontogenesi è un processo di cambiamenti consequenziali della struttura morfologica di una pianta. In generale, la trasformazione morfologica appare sotto forma di cambiamenti consequenziali degli organi vegetali (germogli e radici) nello spazio. Durante l'intero ciclo dell'ontogenesi, le piante manifestano risposte adattative. Il fotoperiodismo e la vernalizzazione, così come le risposte delle piante ad altre condizioni ambientali, sono proprietà adattate alla sopravvivenza a condizioni avverse.

## 3. L'apparato radicale

Le funzioni principali di un sistema radicale sono l'ancoraggio e l'assorbimento di acqua e nutrienti. Negli alberi e in altre specie legnose, le estese strutture sotterranee hanno il ruolo principale di fornire sostegno piuttosto che l'acquisizione di sostanze nutritive, mentre nelle specie vegetali più piccole l'ancoraggio avviene in gran parte come funzione secondaria della crescita delle radici e lo sviluppo dell'apparato radicale è importante sia per l'ancoraggio che per l'assorbimento. L'architettura del sistema radicale è molto varia tra le diverse specie di piante, ma all'interno della specie l'architettura è flessibile e può cambiare in base alle condizioni del suolo. Le radici presentano un alto grado di plasticità fisiologica e morfologica al fine di catturare i nutrienti presenti nel suolo (Hodge et al. 2009).

### 3.1 Crescita e architettura della radice

Una delle principali differenze tra lo sviluppo di piante e animali è l'informazione posizionale piuttosto che quella cellulare nel determinare il destino cellulare nelle piante (Singh e Bhalla, 2006). Post-embrionalmente, lo sviluppo della pianta è essenzialmente guidato da cellule meristematiche localizzate nelle regioni apicali dei germogli e delle radici, indicati come meristemi apicali e capaci di auto-rinnovamento, proliferazione e generazione di un gran numero di progenie differenziata che dà origine a diversi tessuti e organi. Le cellule meristematiche nel SAM forniscono le cellule per lo sviluppo continuo di nuovi organi come i tessuti interni dello stelo, foglie, fiori, frutti e radici; le cellule meristematiche nella RAM forniscono le cellule per la formazione e lo sviluppo continuo del sistema radicale (Fig.11). Questa particolare caratteristica permette alle piante, che sono organismi sessili, di adattare la loro morfologia e lo sviluppo degli organi alle condizioni ambientali che incontrano.

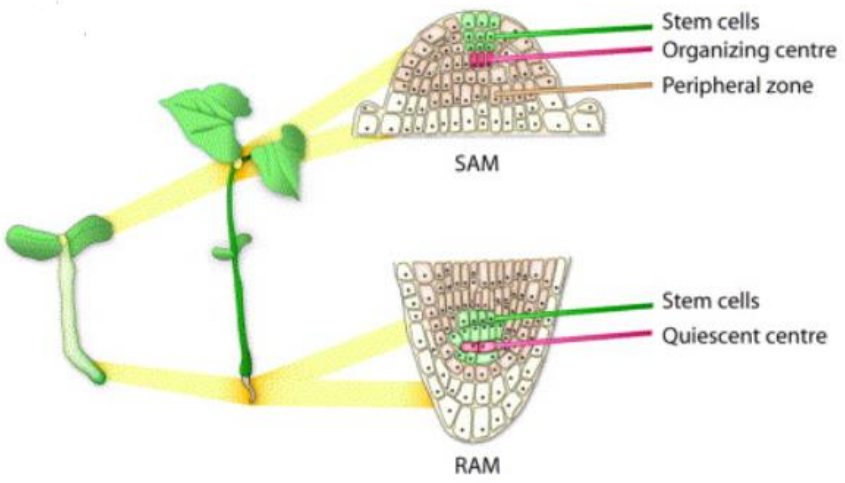



Fig.11 Nicchie di meristema apicale (SAM) e meristema apicale radicale (RAM). Le cellule del centro organizzativo (CO) forniscono segnali per il mantenimento delle cellule meristematiche sovrastanti, che sono circondate da una popolazione di cellule con scarsa capacità proliferativa nella zona periferica del meristema (ZP). Nella RAM, il centro di quiescenza (CQ) è la fonte dei segnali di manutenzione delle cellule meristematiche (Singh e Bhalla 2006).

La configurazione spaziale dell'apparato radicale (numero e lunghezza degli organi laterali), la cosiddetta architettura della radice, varia notevolmente a seconda della specie vegetale, della composizione del suolo, ed in

particolare della disponibilità d'acqua e dei nutrienti minerali (Malamy, 2005). Il sistema radicale risulta dal controllo coordinato di programmi genetici endogeni (regolamentare la crescita e l'organogenesi) e l'azione degli stimoli ambientali abiotici e biotici (Malamy, 2005). Le interazioni tra questi segnali estrinseci e intrinseci, tuttavia, complicano la dissezione di specifiche vie di trasduzione. Tali tratti complessi che dipendono da più geni possono essere analizzati attraverso la genetica quantitativa e l'identificazione di loci quantitativi (QTL) legati all'architettura delle radici (Mouchel et al., 2004; Fitzgerald et al., 2006). Comprendere i meccanismi molecolari che regolano tale plasticità evolutiva è fondamentale per il miglioramento delle colture in ambito di un'agricoltura sostenibile. La specificazione del meristema apicale della radice embrionale (RAM) avviene quasi subito nello sviluppo dell'embrione (Benfey & Scheres, 2000). Il meristema apicale della radice embrionale costituisce la nicchia delle cellule meristematiche che alla fine produce tutti gli organi sotterranei, comprese le radici laterali (Sabatini et al., 2003). L'organizzazione cellulare del RAMs di Arabidopsis è molto regolare, con le cellule iniziali che circondano il centro quiescente (CQ). Una divisione asimmetrica dell'ipofisi genera una figlia basale di grandi dimensioni e una figlia apicale più piccola, chiamata cellula a forma di lente, che è il capostipite del CQ. Durante la formazione della radice, il CQ sembra agire come un centro organizzativo che può dirigere le cellule circostanti per produrre una serie di cellule iniziali (Aida et al., 2004; Jenik et al., 2007). Diversi meccanismi specificano le iniziali al di sopra del CQ che danno origine al tessuto di base e alla stele (iniziali prossimali), così come le iniziali sotto il CQ che producono la calotta radicale (iniziali distali). Questa calotta radicale e il meristema apicale della radice sottostante formano la zona della radice chiamata apice distale, dove le cellule si dividono attivamente. Ad una certa distanza dalla RAM, le divisioni anticlinali e asimmetriche di un gruppo di cellule del periciclo sono l'evento iniziale della formazione di una radice laterale. Successivamente si ha la formazione di un primordio a forma di cupola che cresce attraverso gli strati cellulari esterni e si stabilisce un meristema. All'attivazione di questo meristema, la radice laterale emerge dalla radice parentale e continua a crescere nel terreno (Malamy, 1995). Le informazioni posizionali necessarie per la specifica del CQ sono fornite dall'azione combinata di due percorsi (Dinneny et al., 2005): la via SHORTROOT/SCARECROW che coinvolge due fattori di trascrizione fornisce informazioni radiali e il trasporto polare dell'auxina focalizza l'espressione dei fattori di trascrizione PLETHORA di classe AP2 (PLT1/PLT2) all'apice della radice. La sovrapposizione dei domini di espressione PLETHORA e SCARECROW porta alla specifica del centro quiescente.

### 3.1.1 I processi di sviluppo che contribuiscono all'architettura dell'apparato radicale

I comuni processi di sviluppo di base agiscono sulla dinamica dell'apparato radicale simultaneamente e come segue:

- Emissione di nuovi assi principali (primari o avventizi) che è altamente coordinata con la crescita dei germogli;
- La ramificazione, che consiste nello sviluppo di radici laterali lungo una radice primaria. Questo è il processo principale per moltiplicare il numero di radici. L'allungamento delle radici e la ramificazione sono processi coordinati (Lecompte & Pagès, 2007) e si mantiene un equilibrio tra numero e lunghezza delle radici;

- La crescita assiale definisce la lunghezza, la traiettoria delle radici e contribuisce alla colonizzazione delle radici in nuove zone del suolo. L'allungamento definirà la dinamica di colonizzazione del suolo, mentre la direzione definirà la sua forma. Entrambi questi parametri di architettura del sistema radicale sono da considerare, in quanto estremamente variabili tra le radici e sensibili alle condizioni esterne. La crescita assiale delle radici avviene dall'estremità distale (punta della radice) come risultato sia della divisione cellulare del meristema sia dell'allungamento all'interno della zona di allungamento. La traiettoria della radice è influenzata da diversi tropismi e la cuffia della radice sembra essere coinvolta nel rilevamento, come ad esempio, gravitropismo, idrotropismo, tropismo di P ecc. (Kaneyasu et al., 2007; Svistoonoff et al., 2007). L'influenza dei tropismi varia tra l'ordine di ramificazione delle radici o le radici avventizie (Lynch e Brown, 2001). Durante l'allungamento, l'apice della radice viene spinto in avanti nel terreno, mentre la parte della radice dietro la zona di allungamento è ancorata al suolo. Tuttavia, durante il movimento, l'apice della radice deve superare la resistenza meccanica del suolo. La presenza di zone ad alta impedenza meccanica è una delle limitazioni fisiche più comuni all'esplorazione delle radici nel suolo (Hoad et al., 1992), in quanto ha un impatto sulla velocità di crescita e sulla morfologia delle radici (Dexter, 1987; Masle, 2002), sulla direzione di crescita, sulla colonizzazione del suolo. La colonizzazione da parte delle radici porta ad un ambiente biologico e chimico specifico che può variare in base al tipo di radice. Infatti, Pierret et al. (2005) hanno dimostrato che quanto più sottili erano le radici, tanto più denso era il terreno in cui si trovavano.

- Crescita radiale: alcune, ma non tutte, le radici delle piante dicotiledoni presentano una crescita radiale che deriva dall'attività di meristemi secondari situati lateralmente. A parte le variazioni morfologiche, questo processo è importante per una serie di funzioni della radice, tra cui l'aumento delle proprietà di trasporto assiale, l'aumento della resistenza meccanica e l'ancoraggio.

- La senescenza e il decadimento delle radici: mortalità e ricambio delle radici sono processi importanti nello sviluppo e nella funzione degli apparati radicali, in particolare nelle piante perenni. Se le radici mostrano una certa plasticità nel produrre nuove radici in zone di suolo favorevoli, dovrebbero anche essere in grado di eliminare queste quando l'assorbimento delle risorse non è più efficiente. La sostituzione delle radici in decomposizione con nuove radici più efficienti (turnover di radici) è di circa il 30% della produzione primaria netta terrestre (Jackson et al., 1997).

### 3.1.2 Classificazione delle radici

L'apparato radicale, con il suo sistema radicale, con il suo sviluppo esteso ma strutturato, può essere considerato come una risposta evolutiva alla variabilità spazio-temporale dell'offerta di risorse e ai vincoli associati alla crescita (Harper et al., 1991). Di conseguenza, l'estensione nello spazio e nel tempo dell'apparato radicale è governata da regole di sviluppo guidate dalle condizioni ambientali.

L'architettura delle radici riguarda due concetti importanti: la forma dell'apparato radicale e la sua struttura. La forma definisce la posizione delle radici nello spazio e il modo in cui l'apparato radicale occupa il suolo. La sua quantificazione è generalmente ottenuta misurando variabili come la profondità delle radici, l'espansione delle radici e delle radici laterali. La struttura delle radici, invece, descrive la varietà dei componenti che costituiscono l'apparato radicale (radici e segmenti radicali) e la loro relazione (ad esempio, topologia: connessione tra radici; gradienti radicali). La differenziazione delle radici ha un importante impatto sulla relazione struttura-funzione (Carvajal et al., 1996). La rizosfera, cioè il volume di terreno intorno alle radici delle piante, è influenzato dall'attività delle radici (Hinsinger et al., 2005); la geometria delle radici è complessa, a causa del movimento specifico nello spazio di ogni radice, le posizioni relative tra le radici e la possibile sovrapposizione delle loro zone di influenza. La dinamica temporale deriva sia dalla crescita dei diversi assi radicali e dai processi fisiologici che coinvolgono i segmenti radicali, con conseguente variabilità temporale e spaziale delle funzioni lungo gli assi radicali. La diversità tra le radici all'interno dell'apparato radicale e l'eterogeneità del suolo aumenta ulteriormente questa variabilità temporale.

La morfologia in situ di un sistema radicale può essere complessa e può variare molto, anche all'interno di una stessa specie (Weaver, 1926; Cannon, 1949; Kutschera, 1960), riflettendo l'interazione tra processi di sviluppo e vincoli ambientali. Di conseguenza, la complessità del sistema radicale ha portato a una serie di sistemi di classificazione. Queste classificazioni sono basate sulla struttura dei rami (Fitter, 1987; 2002), sull'attività delle radici (Wahid, 2000) o sullo sviluppo (Cannon, 1949). Il sistema di classificazione basato sullo sviluppo è l'approccio più classico ed è utile per comprendere la crescita e per ottenere una visione più globale dell'architettura radicale. In base alla loro ontogenesi, lo sviluppo delle radici si suddivide in tre categorie principali:

- Radici primarie;
- Radici nodali (o avventizie);
- Radici laterali.

Questa classificazione riflette anche le differenze tra le specie monocotiledoni e dicotiledoni: il sistema radicale delle dicotiledoni deriva dalle radici primarie e ramificazioni laterali, con radici che possono presentare una crescita radiale. A seconda dell'estensione delle radici laterali rispetto all'asse primario, la morfologia dell'apparato radicale varia tra le radici diffuse o fascicolate. Nelle monocotiledoni, gli apparati radicali derivano non solo dalla ramificazione delle radici primarie, ma anche da radici nodali emesse (sistema di radici avventizie). Le radici delle monocotiledoni non subiscono crescita radiale secondaria, ma la radice primaria si differenzia dalla radichetta del seme già presente nell'embrione. Le radici avventizie (o nodali) si differenziano da organi diversi dalle radici (ad esempio, fusti, rizomi ecc.) e si formano in punti precisi (ad esempio, vicino ai nodi del fusto) con un modello temporale in coordinamento con lo sviluppo del germoglio. Sono spesso abbondanti e danno origine ad un sistema radicale fascicolato. Le radici avventizie sono molto meno sensibili al gravitropismo rispetto alle radici primarie (Klepper, 1992). Le radici laterali si originano dall'asse parentale e si differenziano dalle radici parentali per l'innesco di un primordio nelle cellule del periciclo situate in prossimità delle radici. Le radici laterali possono differenziarsi anche da tessuti più vecchi. Il numero massimo di ordini di ramificazione sembra essere una caratteristica genotipica. La ramificazione può anche svilupparsi per reiterazione. In questo caso, l'asse genitore si duplica in due

(o tre) assi dello stesso tipo morfologico e crea biforcazioni nel sistema radicale (Vercambre, et al. 2003). La posizione e la dinamica di emissione di radici nodali sono di primaria importanza per la struttura generale dell'apparato radicale (Klepper, 1992; Aguirrezabal, 1993; Yamazaki & Nakamoto, 1983). L'importanza rispettiva degli apparati radicali primari e avventizi, cioè i tassi di crescita relativi degli assi principali e laterali, varia tra le specie vegetali e può essere modulata dalle condizioni ambientali. Di conseguenza, le diverse specie vegetali sviluppano diverse strategie di esplorazione del suolo. Ad esempio, il mais (una monocotiledone) emette radici nodali durante tutta la sua fase vegetativa, consentendo di esplorare orizzonti del suolo poco profondi. Al contrario, il lupino a foglia stretta (una dicotiledone) esplora gli orizzonti del suolo per mezzo di una sola generazione di radici ramificate e l'emissione di nuove radici.

## 4. La radicazione avventizia

La formazione di radici avventizie è un passo chiave nella propagazione vegetativa di specie vegetali economicamente importanti, in cui le perdite si verificano a causa di una radicazione insufficiente o a causa della scarsa qualità del sistema radicale di recente sviluppo (De Klerk et al., 1999). Le radici avventizie sono radici ectopiche che sorgono naturalmente o in risposta a condizioni ambientali stressanti da vari tessuti vegetali, come steli e foglie; possono anche essere indotti da danni meccanici o a seguito di rigenerazione tissutale in vitro (Geiss et al., 2009; Pop et al., 2011).

Economicamente, le radici avventizie sono molto importanti. La propagazione mediante talee è fondamentale per molte industrie forestali e orticole, tra cui la produzione di colture legnose. Ecologicamente, le radici avventizie sono importanti per stabilizzare ambienti mutevoli come le regioni costiere, estuari e pianure alluvionali (Ondiviela et al., 2014; Krauss et al., 2003). Oltre all'importanza economica ed ecologica delle radici avventizie, svolgono un ruolo chiave per la nostra esistenza. Se vogliamo raggiungere la sicurezza alimentare globale, dobbiamo migliorare la produzione alimentare di fronte all'aumento di eventi metereologici estremi. Inoltre, dobbiamo farlo in modo più sostenibile attraverso un'applicazione limitata di fertilizzanti. Le radici avventizie si sono evolute per aiutare le piante a tollerare una varietà di situazioni stressanti e comprendere l'importanza di queste radici aiuterà lo sviluppo di colture efficienti. A differenza della maggior parte degli animali, le piante hanno sviluppato notevoli capacità di rigenerazione e propagazione. Tra l'altro, possono propagarsi sia sessualmente che vegetativamente grazie alla loro capacità di sviluppare radici avventizie da organi aerei, il che porta allo sviluppo di nuove piante clonali geneticamente identiche. La formazione di radici avventizie è un processo post-embrionale (Druege et al., 2019) che si sviluppa da cellule appartenenti a tessuti differenti da quelli della radice. La radicazione avventizia è un elemento intrinseco del normale sviluppo delle monocotiledoni (Geiss et al., 2009), mentre sia nelle monocotiledoni che nelle dicotiledoni possono verificarsi in seguito a diversi stimoli ambientali e fisiologici. La propagazione vegetativa o clonale viene sfruttata in orticoltura e nei vivai forestali per produrre un gran numero di cloni in termini relativamente brevi. Nelle specie arboree ed erbacee, il processo di radicazione avventizia in risposta al taglio, costituisce l'evento chiave della micropropagazione (Jones et al., 1977; Zimmerman et al., 1981; Collet et al., 1987).

La privazione del sistema radicale interrompe la fornitura di acqua, sostanze nutritive e ormoni vegetali come le citochinine, portando contemporaneamente all'accumulo di sostanze che di solito vengono trasportate verso il basso, come l'auxina, sopra il sito di taglio. In risposta all'escissione, viene avviato un nuovo programma di sviluppo in cui le cellule totipotenti devono rigenerare il nuovo apparato radicale nella base meristetica vicino al sito di taglio, a partire dalle cellule totipotenti nella base staminale vicino alla ferita, che alla fine porta alla rigenerazione di un nuovo apparato radicale. A seconda della pianta e del tipo di espianto, diversi tipi di cellule, possono generare radici avventizie (Altamura, 1996). Il radicamento avventizio era inizialmente considerato un processo unico ma, studi istologici e fisiologici (De Klerk et al., 1999; Friedman et al., 1985; Jasik & De Klerk, 1997; Sircar e Chatterjee, 1973), lo hanno classificato come un meccanismo di sviluppo organizzato in una sequenza di fasi interdipendenti,

ognuno con le proprie caratteristiche e requisiti (De Klerk, 1996; Gaspar et al., 1992; Gaspar et al., 1997; Jarvis, 1986; Kevers et al., 1997; Saxena et al., 2000).

La formazione di radici avventizie nei tessuti meristematici è stata ripetutamente osservata avere origine nel cambio o nei tessuti vascolari, dove coinvolge fasi sequenziali (Da Costa et al., 2013). La fase iniziale, generalmente indicata come fase di induzione, è caratterizzata da una fase di ritardo anatomico priva di cambiamenti cellulari, durante la quale si verifica la riprogrammazione cellulare iniziale. Le cellule da cui inizia la radicazione avventizia devono spesso acquisire la competenza radicale che coinvolge la de-differenziazione prima di poter rispondere a un segnale che induce la radice (Altamura, 1996; Ikeuchi et al., 2016). Il meccanismo diretto, che prevede lo sviluppo di radici avventizie a partire da specifiche classi cellulari (cambio), viene osservato con più frequenza nelle specie in grado di radicare facilmente, mentre quello di radicazione indiretta, caratterizzato nelle cellule indifferenziate, avviene nelle specie recalcitranti alla radicazione (Altamura, 1996; Falasca e Altamura, 2003; Lovell e White, 1986). I meccanismi alla base del processo di radicazione avventizia non sono del tutto comprese e diverse cultivar di olivo mostrano un comportamento recalcitrante nei confronti della propagazione per talea. La lunghezza dei diversi stadi di radicazione avventizia differisce tra le specie (Blakesley et al., 1991; Nag et al., 2001; Naija et al., 2008).

Basandosi su reperti fossili e dati filogenetici, Mhimdi e Pérez-Pérez (2020) hanno proposto la formazione di radici avventizie come stato predefinito della radice nello sviluppo delle piante, evidenziando che si potrebbe prendere in considerazione l'inizio della radice da tessuti non radicali come tratto ancestrale, poiché le radici avventizie si formano per impostazione predefinita nelle licofite e nelle felci. Secondo gli stessi autori, in molte angiosperme, la formazione di radici avventizie sembra essere repressa attraverso meccanismi che mantengono le cellule competenti in uno stato di quiescenza. L'attivazione delle cellule competenti dipende dalle condizioni ambientali a cui sono esposte le talee o le piante integre, come il trattamento esogeno con l'auxina, le ferite, i ristagni idrici o l'esposizione alla luce e la determinazione della nutrizione minerale che avviano una complessa rete di vie di segnalazione, metaboliche e di trasporto (Bannoud e Bellini, 2021; Mhimdi & Pérez-Pérez, 2020; Yang et al., 2019). Tutti questi percorsi sono sotto il controllo di geni distinti, essendo alla fine responsabili di un'efficiente riprogrammazione cellulare, acquisizione di un nuovo modello evolutivo e di differenziazione e sviluppo degli organi de novo.

La figura sottostante (Fig.12) evidenzia alcuni esempi nella diversità delle radici avventizie. Le radici avventizie si possono formare durante il normale sviluppo, comprese quelle potenzialmente stabilite nell'embrione oppure uno sviluppo avventizio in condizioni di stress (ad esempio il taglio da ferita) (Steffens & Rasmussen, 2016).

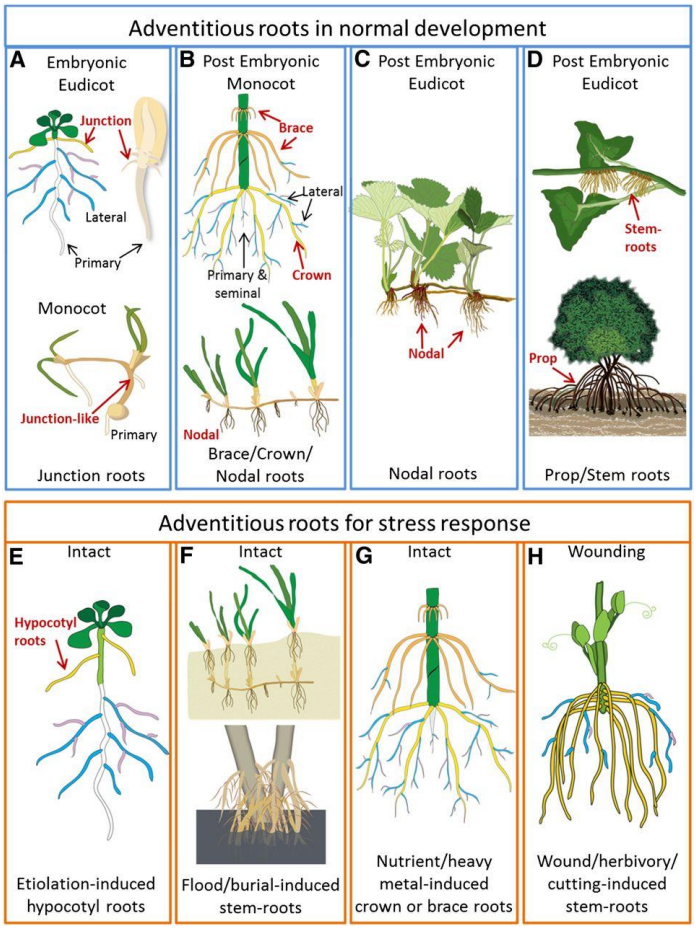



Fig.12 Le immagini da A fino a D mostrano i tipi di radici avventizie che si formano durante il normale sviluppo, comprese quelle potenzialmente stabilite nell'embrione (A); il sistema radicale dominante delle monocotiledoni, compresi il mais (immagine in alto), le radici a corona (gialle) e le radici del tutore (arancione) e le radici nodali su altre erbe (immagine in basso) B) e su eudicoti come la fragola (C); e radici non nodali che forniscono supporto a piante come edera (immagine in alto) e mangrovie (immagine in basso) D). Le immagini da E a H mostrano uno sviluppo avventizio delle radici in condizioni di stress: Arabidopsis sotto luce bassa o assente (usato come modello per la regolazione avventizia delle radici); E); la sepoltura (immagine in alto) o l'allagamento (immagine in basso) possono indurre radici avventizie da posizioni di stelo nodale o non nodale (F); lo stress da nutrienti o metalli pesanti aumenta lo sviluppo avventizio delle radici (G); e ferite come il taglio inducono de novo lo sviluppo avventizio delle radici (H). Le radici primarie e seminali sono raffigurate in bianco, le radici laterali del primo ordine in blu e le radici laterali del secondo ordine in rosa (Steffens and Rasmussen, 2016).

## 4.1 Le fasi della radicazione avventizia

La formazione di radici avventizie (RA) da talee di stelo è solitamente divisa in più fasi in base a marcatori fisiologici e metabolici (De Klerk et al., 1999) e si può riassumere in quattro fasi:

- La segnalazione della pianta attiva le cellule del tessuto;
- La divisione cellulare e la differenziazione stimolano la formazione del primordio delle radici avventizie;
- Divisione cellulare ed espansione cellulare di origine radicale;
- La crescita della radice avventizia (Lakehal e Bellini, 2019; Li et al., 2022; Zhang et al., 2017).

Quando i cambiamenti biochimici e anatomici avvengono nelle talee, il processo di induzione della RA è suddiviso in fasi distinte. De Klerk et al. (1999) hanno identificato queste quattro fasi come la de-differenziazione cellulare,

l'induzione, la formazione dei primordi e l'allungamento delle radici. L'aumento dei livelli di auxina all'inizio della rizogenesi favorisce lo sviluppo della radice primaria (Caboni et al., 1997).

Nella figura sottostante (Fig.13) sono riassunte le fasi della radicazione avventizia; le radici avventizie si formano dalle cellule profonde adiacenti al cambio vascolare, si sviluppano i primordi della radice e, infine, spingono fuori le cellule epidermiche (Guan et al., 2015)

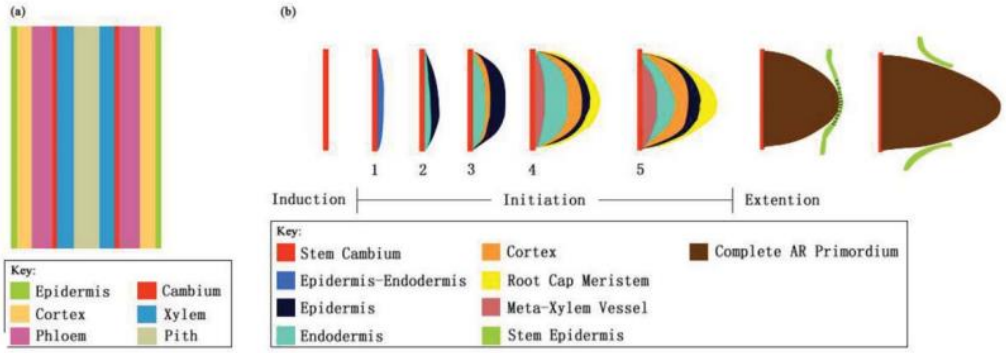



Fig.13 Organizzazione dei tessuti immaturi del fusto di una tipica pianta legnosa(a) e processo schematico di formazione delle radici avventizie (b) mostra le principali fasi di induzione, iniziazione ed estensione. (Guan et al., 2015)

### 4.1.1 La fase di induzione

Il primo stadio nella formazione avventizia delle radici è caratterizzato da eventi molecolari e biochimici e prevede la de-differenziazione e divisione cellulare delle cellule nella zona adiacente al cortex e al midollo, per la formazione delle cellule del primordio radicale nel cambio (Jasik and De Klerk, 1997). Queste cellule situate nel cambio diventano competenti nel rispondere allo stimolo rizogeno (auxina). Le cellule acquisiranno la competenza alla radicazione e quindi la capacità di recepire i segnali di induzione alla radicazione, che attivano i processi di conversione delle cellule competenti in cellule fondatrici della radice avventizia (Altamura, 1996; Ikeuchi et al., 2016). È caratterizzata da una fase di ritardo anatomico priva di cambiamenti cellulari, durante la quale si verifica la riprogrammazione cellulare iniziale. Le cellule da cui inizia la radicazione avventizia devono spesso acquisire la competenza radicale che coinvolge la de-differenziazione prima di poter rispondere a un segnale che induce la radice (Altamura, 1996; Ikeuchi et al., 2016). In questa prima fase del processo di radicazione avventizia si assiste (Jasik and De Klerk, 1997) ad un aumento del numero di granuli di amido (Fig.14) nelle cellule da cui avranno origine i primordi radicali, in associazione ad un aumento del numero di plastidi. I granuli di amido costituiscono, per l'organismo vegetale appena isolato dalla pianta madre o dal mezzo di coltura, la fonte di energia per lo sviluppo delle radici avventizie. L'idrolisi delle molecole di amido e la mobilizzazione degli zuccheri ottenuti coinciderà con un aumento del numero di mitocondri, dei dittiosomi e delle dimensioni dei nuclei nelle cellule del cambio (Jasik and De Klerk, 1997). Ross et al. (1973) hanno ipotizzato che la regione del tessuto nel quale le cellule si attivano dipenda in parte dal gradiente fisiologico delle sostanze che entrano nell'espianto dal mezzo (es. ormoni esogeni)

e in base alla presenza di cellule competenti. Nell'olivo, la fase di induzione corrisponde alle prime 96 ore dopo il trattamento di microtalee (Macedo et al., 2013).

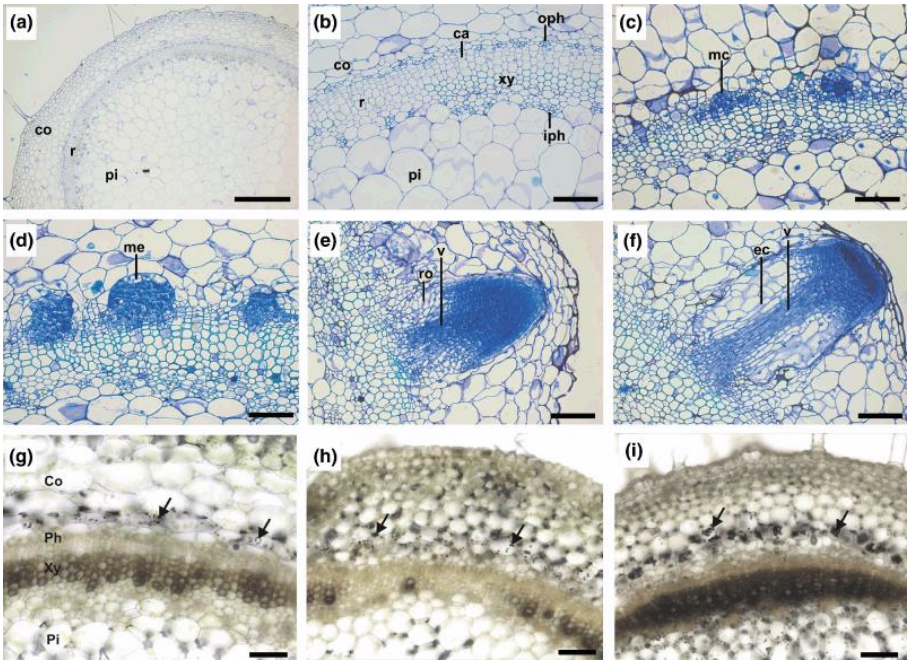



Fig.14 Anatomia della formazione avventizia delle radici (a-f) e dell'accumulo di amido (g-i) nella base dello stelo delle talee di *petunia (Petunia hybrida)*. In tutte le micrografie, le sezioni trasversali vengono mostrate 1-4 mm sopra il sito di escissione. (a,b) 0 ore dopo l'escissione (HPE): anatomia tipica del fusto costituita dalla corteccia (CO), dal parenchima del midollo (PI) e da un anello di vasi (R) con floema esterno (Oph), cambio (Ca), xilema (xy) e floema interno (iph); c) 72 HPE: prime cellule meristematiche (mc) di meristemi radicali in via di sviluppo, cioè piccole cellule con un citoplasma denso e un grande nucleo; d) 96 hpe: primi meristemi delle radici (ME); (e) 144 HPE, primordio radicale differenziato con un meristema organizzato e una differenziazione a ritroso delle cellule del corpo radicale contenenti corteccia radicale (RO) e fascio vascolare (V); f) 192 hpe, prime radici con fasci vascolari (v) al centro circondate da cellule allungate (ec) della zona di allungamento; (G–I) Colorazione istochimica dei granuli di amido a 0 HPE (G), 24 HPE (H) e 72 HPE (I). Le frecce mostrano la presenza di amido. Barra, (a), 500 µm (b–i), 100 µm (Ahkami et al., 2009).

### 4.1.2 La fase di iniziazione

Druege et al. (2019) hanno evidenziato che il passaggio tra fase di induzione e fase di iniziazione è caratterizzato dalla determinazione delle cellule fondatrici della radice avventizia, seguita da cambiamenti qualitativi delle strutture cellulari causati da divisioni cellulari regolari e dalla differenziazione nelle diverse zone che compongono la radice (Naija et al., 2008). Durante questa fase, il meristema apicale comincia ad organizzarsi (Fig.15). La fase d'iniziazione è stata descritta in cinque fasi da Itoh et al. (2005):

1) Definizione delle cellule iniziali della cuffia radicale, dell'epidermide-endoderma e del cilindro centrale. Le cellule iniziali del primordio radicale subiscono divisioni sia anticlinali che periclinali per formare i tessuti primordiali;

2) Differenziamento dell'epidermide e dell'endoderma tramite divisioni periclinali, divisioni anticlinali delle cellule della cuffia radicale e divisioni periclinali nel cilindro centrale;

3) Differenziamento dell'endoderma e formazione degli strati corticali tramite divisioni periclinali;

4) Determinazione dell'assetto principale della radice, con formazione della columella a partire dalle cellule iniziali della cuffia radicale con divisioni periclinali e formazione del metaxylema;

5) Allungamento cellulare e comparsa dei vacuoli nelle cellule della regione basale dello stelo, sviluppo del cortex e dell'apice radicale a partire dall'epidermide.

Nell'olivo, l'inizio corrisponde al periodo tra 96-336 h ed è seguito dall'espressione delle radici successivamente (Macedo et al., 2013).

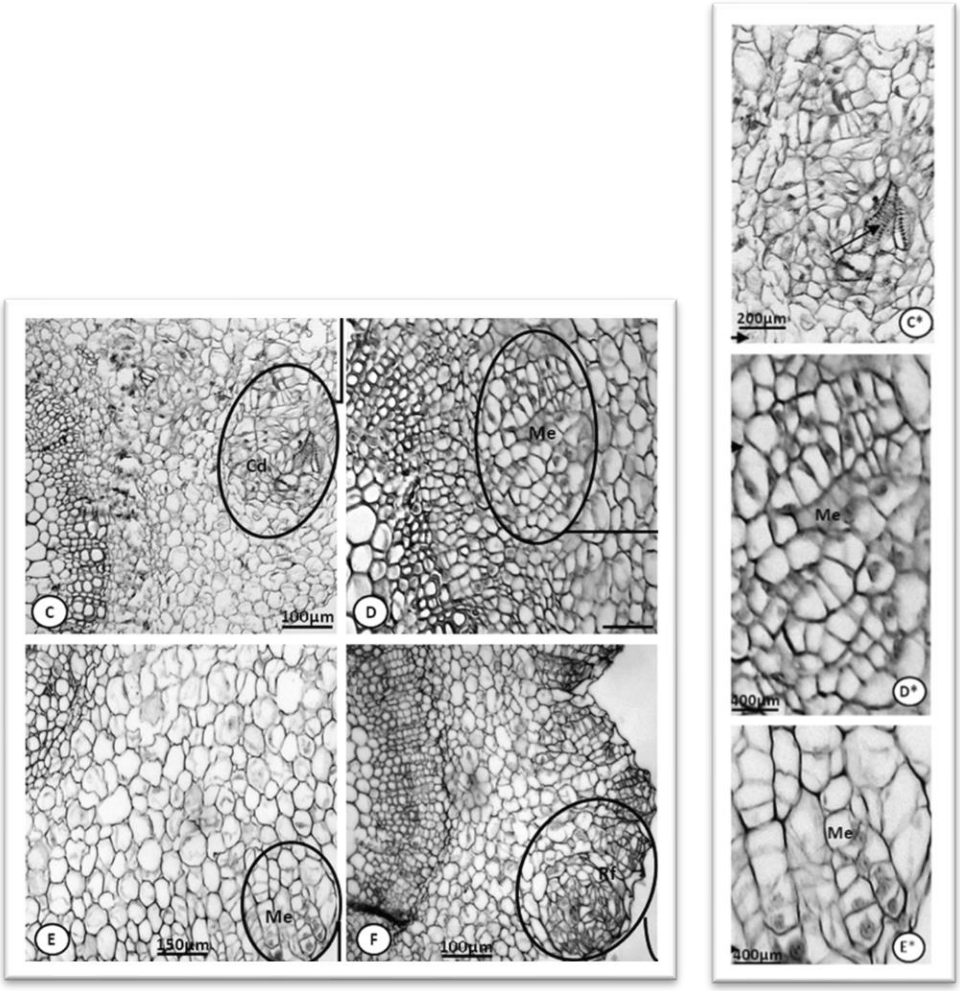



Fig.15 Eventi istologici di iniziazione in olivo dopo trattamento delle talee con IBA (Macedo et al., 2013). Nel pannello C sono evidenziate le prime divisioni cellulari (Cd) a 144 ore, che portano alla formazione del callo (ingrandimento C*). Nei pannelli D ed E (ingrandimento D* ed F*) sono visibili sezioni di fusto dopo 240 ore che mostrano due strutture meristemoidi (Me) nel floema superiore nel pannello D e nella corteccia/regione sub-epidermica nel pannello E. Nel pannello F sono visibili zone radicali morfogeniche (Rf) che si sviluppano da cellule subepidermiche 336 h dopo il trattamento di induzione radicale.

### 4.1.3 La fase di estensione

Durante la fase di estensione (Fig.16), le radici avventizie proseguono il loro accrescimento all'interno dello stelo attraverso l'epidermide ed emergono come risultato di una morte cellulare programmata (MCP) (Itoh et al., 2005; Steffens & Sauter, 2009). Secondo Steffens et al. (2012) l'induzione della morte cellulare durante l'emergenza della radice avventizia dipende dall'identità delle cellule dell'epidermide ed è principalmente controllata dall'etilene. L'etilene regola positivamente la formazione di radici avventizie durante il ristagno d'acqua e stimola anche il processo di morte cellulare programmata durante la fase di estensione. L'etilene promuove la fase di estensione perché il ristagno idrico induce l'intrappolamento dell'etilene come primo segnale di stress da ristagno idrico e quindi stimola il trasporto dell'auxina (Negi et al., 2010). Il conseguente accumulo di auxina nel fusto innesca un'ulteriore sintesi di etilene, che stimola ulteriormente un flusso di auxina verso le parti inondate della pianta. L'accumulo di auxina alla base della pianta induce contemporaneamente la crescita di radici avventizie preformate (Vidoz et al., 2010). Inoltre, l'intrappolamento di etilene nelle parti sommerse del fusto può indurre l'allentamento della parete cellulare dell'ipocotile o la MCP dell'epidermide, favorendo così l'emergenza dei primordi radicali. Il prossimo passo nel processo di radicazione è la creazione di un primordium di radice matura con connettività vascolare allo stelo. Il primordium continuerà a crescere fino alla sua comparsa dal gambo come radice funzionale e differenziata (De Klerk et al., 1999; Naija et al., 2008; Ahkami et al., 2009; Klopotek et al., 2010).

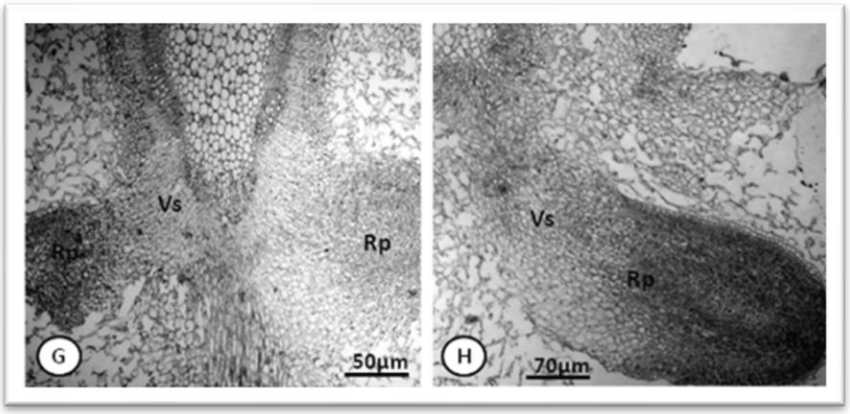



Fig.16 Eventi istologici della fase di emergenza dopo trattamento con IBA in talee di olivo (Macedo et al., 2013). I pannelli G ed H mostrano primordi di radici (Rp) in diversi stadi di sviluppo, 528 h dopo il trattamento di induzione radicale. Sono visibili i cappelli radicali (Rc) e i sistemi vascolari differenziati (Vs).

## 4.2 La regolazione della radicazione avventizia

La regolazione delle fasi di radicazione avventizia precedentemente descritte è influenzata da numerosi fattori endogeni ed esogeni che comprendono fitormoni (Fig.17), enzimi ossidativi, poliammine, carboidrati e altre sostanze nutritive (Porfirio et al., 2016). Tra questi, i fitormoni (l'auxina in particolare) e gli enzimi ossidativi sono i più discussi e studiati.

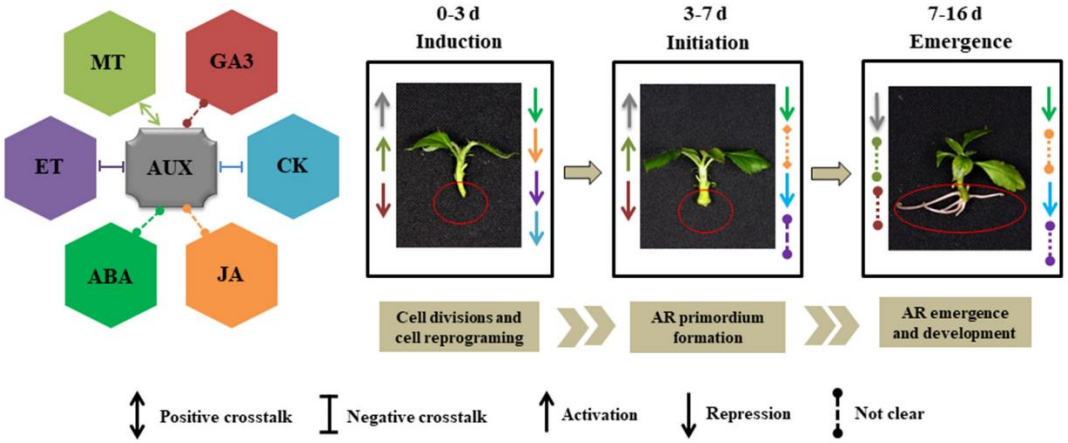



Fig.17 Un diagramma schematico suggerito degli stadi di formazione della radice avventizia (AR) (0-3 giorni, fase di induzione AR; 3-7 giorni, fase di inizio AR; e 7-16 giorni, fase di emergenza AR) influenzati dagli ormoni endogeni nel melo: auxina (AUX), acido abscissico (ABA), citochinina (CK), melatonina (MT), acido jasmonico (JA), etilene (ET) e acido gibberellico 3 $(GA)_3$). Diversi colori mostrano attività ormonali specifiche. Le diverse punte delle frecce mostrano funzioni diverse (Tahir et al., 2022).

### 4.2.1 I fitormoni

Lo sviluppo delle piante in tutte le sue fasi è regolato dall'integrazione di stimoli esogeni ed endogeni. Indipendentemente dal tipo di cellula da cui nasce la radice avventizia, i fitormoni in coordinamento con gli stimoli ambientali guidano ogni fase della radicazione avventizia. Di solito, agiscono in interazioni complesse che forniscono i robusti segnali spazio-temporali per lo sviluppo delle radici avventizie. I fitormoni, o ormoni vegetali, sono composti organici sintetizzati dalle piante che influenzano, anche a basse concentrazioni, i processi di crescita, differenziamento e sviluppo. Un fitormone può essere prodotto in organi differenti della stessa pianta; gli ormoni vegetali sono meno numerosi di quelli animali, e spesso un ormone agisce su più organi e su più funzioni. I primi fitormoni ad essere stati scoperti sono le auxine (1926) e altri ormoni vegetali regolatori della crescita e dello sviluppo sono:

- Citochinine
- Gibberelline
- Acido abscissico
- Acido jasmonico
- Etilene
- Brassinosteroidi
- Acido salicilico

- Poliammine

Non esistono ghiandole specializzate nella loro produzione ed il loro effetto non è univoco, ma variabile a seconda dell'organo a cui sono diretti. Nelle piante, non essendo presente un sistema nervoso, la coordinazione tra singole cellule, tessuti e organi è affidata agli ormoni, cioè a messaggeri chimici che sono attivi a concentrazioni molto basse ed i cui siti di produzione e di azione sono separati. Gli ormoni veicolano il "messaggio" ai recettori a cui si legano e il legame ormone-recettore induce una serie di effetti biochimici che portano alla trasduzione del segnale. Le diverse fasi di sviluppo delle radici sono controllate e regolate da vari fitormoni, tra i quali l'auxina gioca un ruolo importante (rivisto da Leyser, 2006). Nelle radici, l'auxina è coinvolta non solo nella formazione delle radici avventizie ma partecipa allo sviluppo della radice laterale e al mantenimento della dominanza apicale. Tutti questi eventi evolutivi richiedono il trasporto e la segnalazione corretta dell'auxina.

Gli articoli dei ricercatori Bannoud e Bellini (2021), Mhimdi e Pérez-Pérez (2020) e Abarca (2021), integrano recenti scoperte sul controllo molecolare e genetico della formazione di radici avventizie in diverse specie vegetali e forniscono concetti sui percorsi molecolari, presentando un elenco di geni coinvolti nella formazione di radici avventizie, nonché modelli concettuali per le interazioni delle più importanti molecole. Questi autori hanno considerato l'importante ruolo dell'accumulo iniziale di auxina e la sua canalizzazione verso le cellule fondatrici delle radici avventizie durante l'induzione radicale, riferendosi ai geni *ASA* e *YUCCA*, che codificano per la sintasi antranilato e la flavina monossigenasi, come i più importanti sul controllo della biosintesi delle auxine; ai geni *Gretchen Hagen 3* (*GH3*), che agiscono sul controllo dell'auxina o coniugazione dell'acido jasmonico e ai geni *PIN*, *AUX/LAX* e *ABCB*, sul controllo del trasporto delle auxine. Il trasporto dell'auxina, in particolare attraverso i vettori PIN, è un fattore chiave nella formazione di radici avventizie (Geiss et al., 2009; Pop et al., 2011). Elevate concentrazioni di auxina endogena o esogena inducono la formazione di radici avventizie (Boerjan et al., 1995; De Klerk et al., 1999), mentre la riduzione della segnalazione dell'auxina blocca lo sviluppo (Xu et al., 2005; Vidoz et al., 2010). Una volta separate dalla pianta donatrice, le talee rimangono private del sistema radicale e, di conseguenza, il continuum suolo-pianta-atmosfera è rotto. Inoltre, il danno meccanico comporta l'attivazione di un insieme di geni responsivi alla ferita la cui funzione è rivolta alla sigillatura della ferita e alla prevenzione dell'attacco patogeno (León et al., 2001; Delessert et al., 2004). Dopo il distacco dalla pianta donatrice, il trasporto basipeto di auxina dalle foglie mature contribuisce all'accumulo di auxina nella base dello stelo; quindi, l'aumento dei livelli di auxina nel fusto basale contribuisce ai primi eventi di formazione avventizia delle radici (Guerrero et al., 1999; Garrido et al., 2002). Nelle talee di petunia, l'IAA ha raggiunto il picco alla base dello stelo, con una rapida induzione di membri della famiglia YUCCA e due idrolasi (Ahkami et al., 2009). La sintesi di auxina mediata da YUCCA è associata all'iniziazione della radice avventizia, ma non è ancora chiaro come i segnali della ferita inneschino questi geni "*biosintetici*" (Chen et al., 2016; Sang et al., 2016). Durante la formazione di meristema apicale della radice embrionale (RAM) molti mutanti correlati all'auxina, come quelli coinvolti nella sua biosintesi (Cheng et al., 2007), o mutanti colpiti durante il trasporto o segnalazione (Dharmasiri et al., 2005; Jenik et al., 2007) non sono in grado di formare la radice embrionale. Il flusso di auxina e il suo trasporto polare (PAT), giocano un ruolo cruciale nella determinazione delle cellule fondatrici, da cui avranno origine i primordi radicali. Difetti nel trasporto polare auxinico inibiscono lo sviluppo delle cellule fondatrici e dei processi di divisione cellulare (Xu et al., 2018).

Citochinine (CK) ed auxine agiscono in maniera antagonista nei processi di radicazione avventizia. Le citochinine bloccano il differenziamento cellulare nella regione localizzata tra la zona di allungamento radicale e la zona di divisione cellulare, senza però agire sulla proliferazione del meristema radicale (Ioio et al., 2007). L'aumento di auxina e la riduzione dei livelli di CK è fondamentale per la formazione delle radici avventizie nelle talee (Da Costa et al., 2013) (Fig.18). Inizialmente, l'acido jasmonico (JA) può promuovere la formazione di centri di accumulo di carboidrati prima dell'induzione radicale. Durante la fase di induzione, l'auxina (IAA) viene deviata dal flusso basipeto nello xilema dai trasportatori PIN1, attraverso il periciclo attivando le proteine LAX3, e si accumula nell'endoderma, aumentando l'espressione di *WOX5*. Questa fase è regolata positivamente da auxina, poliammine, CK ed etilene. CK ed etilene sembrano avere un duplice ruolo, regolando negativamente anche l'induzione. L'ABA inibisce questa fase. I livelli di JA e auxina sono diminuiti dalla coniugazione con aminoacidi, consentendo il progresso della fase di iniziazione. Gli stringolattoni possono sopprimere l'azione dell'auxina o possono inibire direttamente il radicamento avventizio. Durante l'iniziazione, i trasportatori di PIN1 guidano il flusso di auxina verso la punta del primordio radicale attraverso le file di cellule centrali perché CK sottoregola *PIN*1 e *LAX*3 negli strati cellulari periferici. Ciò si traduce in un massimo auxina sulla punta distale del primordio avventizio della radice (ARP), diminuendo l'espressione di *WOX5* e stabilendo il centro quiescente (CQ). Questo massimo di auxina viene mantenuto attraverso una maggiore biosintesi dell'auxina da parte di YUCCA6. La protrusione è probabilmente favorita da LAX3 attivo nell'endoderma, nella corteccia e nell'epidermide intorno alla punta del primordio della radice avventizia. La fase iniziale è regolata negativamente da poliammine, auxina, ABA ed eventualmente gibberellina (GA) e stringolattoni. Durante la fase di espressione il QC viene incorporato nel massimo di auxina dove vengono mantenute le espressioni di *WOX5* e *YUCCA6*, creando un accumulo apicale costante di auxina. CK è presente anche nell'ARP e contribuisce all'omeostasi dell'auxina down-regolando *PIN*1 e *LAX3* (Fig.18).

L'etilene svolge una funzione cruciale nella regolazione delle radici avventizie in molte specie. L'etilene inibisce o promuove il processo di sviluppo delle radici a seconda del processo. La sintesi dell'etilene è indotta in risposta a stress biotici ed abiotici di vario genere come ferimento, attacco di patogeni, anossia e siccità (Bleecker & Kende, 2000). Ha un ruolo stimolante nella fase iniziale, ma riflette un ruolo inibitorio nelle fasi successive della radicazione avventizia (De Klerk et al., 1999). Lo sviluppo delle radici può anche essere inibito dall'etilene, principalmente limitando l'espansione cellulare, ma ciò non influisce sull'attivazione del meristema radicale.

Tutti questi geni coinvolti nella formazione delle radici avventizie controllano il trasporto auxinico e i livelli di auxina, il mantenimento del centro quiescente (CQ) e la successiva istituzione e differenziazione del primordio della radice avventizia (Li, 2021; Bannoud e Bellini, 2021; Mhimdi e Pérez-Pérez, 2020; Abarca, 2021). Questo crosstalk degli ormoni vegetali è fondamentale nel regolare la formazione delle radici avventizie, all'interno di un processo che coinvolge una gerarchia di fattori di trascrizione, cioè legati alla modulazione di eventi epigenetici. La perdita della capacità radicante con l'invecchiamento della pianta (maturazione-recalcitranza alla radicazione avventizia indotta) è un grave problema nella riproduzione ed è stata anche studiata nella propagazione di molte specie arboree. Nonostante tutte le ricerche effettuate e le informazioni raggiunte negli ultimi anni, i meccanismi sottostanti la recalcitranza alla radicazione avventizia indotta dalla fase adulta e dall'ambiente regolante la

radicazione avventizia, così come molti altri aspetti della radicazione avventizia nel processo di formazione, sono ancora lontani dall'essere pienamente compresi (Druege et al., 2019; Bannoud e Bellini, 2021; Abarca, 2021).

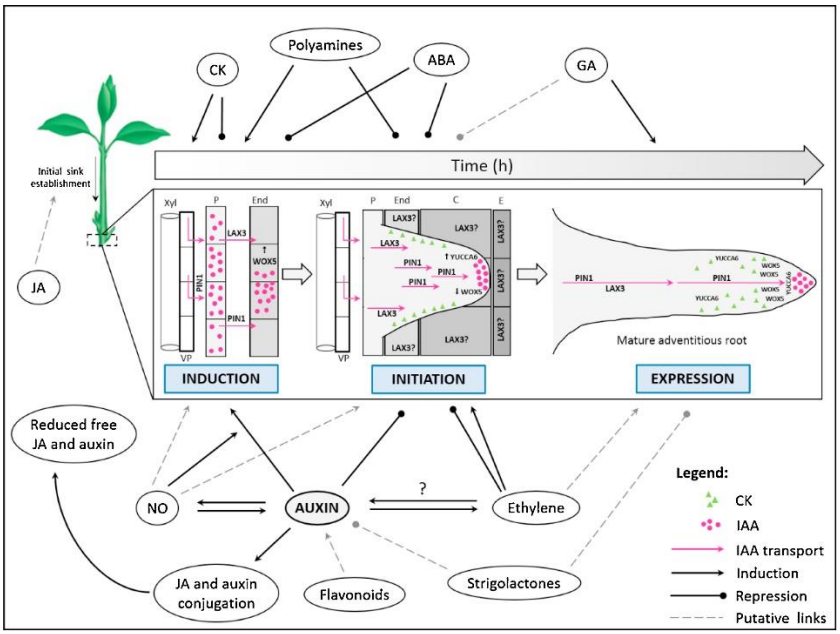



Fig.18 Possibili eventi istologici e fisiologici e interazioni ormonali coinvolte nella formazione avventizia delle radici (Da Costa et al., 2013; Della Rovere et al., 2013; Druege et al., 2014). Inizialmente l'acido jasmonico può promuovere la creazione di centri di accumulo di carboidrati prima dell'induzione. Durante la fase di induzione l'auxina (IAA) viene deviata dal flusso basipeto nello xilema dei trasportatori PIN1, attraverso il periciclo attivando le proteine LAX3, e si accumula nell'endoderma, aumentando l'espressione di WOX5. Questa fase è regolata positivamente da auxina, poliammine, CK ed etilene. CK ed etilene sembrano avere un duplice ruolo.

### 4.2.2 I carboidrati

Sebbene l'assimilazione fotosintetica del carbonio avvenga solo alla luce, i processi di crescita ed assimilazione e manutenzione che richiedono carbonio si verificano durante il ciclo giorno-notte (Reddy et al. 2004; Walter & Schurr 2005; Nozue & Maloof 2006). Il carbonio è disponibile di notte perché il tasso di assimilazione alla luce è sufficiente a sostenere non solo la domanda di crescita, ma anche l'accumulo di composti di stoccaggio nella foglia, che vengono poi mobilitati per fornire carbonio per la crescita durante la notte ed essere accumulati nei tessuti di riserva. In Arabidopsis (Caspar et al., 1985; Gibon et al., 2004; Lu et al., 2005) e molte altre specie vegetali (Geiger & Servaites, 1994; Geiger et al., 2000), i prodotti immediati dell'assimilazione fotosintetica del carbonio alla luce sono suddivisi tra saccarosio, immediatamente disponibile per la crescita e amido, che si accumula nella foglia durante il giorno. Di notte, l'amido viene degradato per produrre saccarosio. L'amido viene quasi ma non totalmente rimobilitato entro la fine della notte nelle piante che crescono con un livello adeguato di nutrienti e una temperatura favorevole. Il modello di assimilazione, stoccaggio e utilizzo del carbonio in 24 ore nasconde una ricchezza di flessibilità e controllo complessi e sottili. In primo luogo, è ovvio che l'utilizzo del carbonio per la crescita non è semplicemente sintonizzato sulla fornitura immediata di carbonio assimilato. Il carbonio di nuova assimilazione fornisce sia la domanda immediata che, attraverso l'accumulo di composti di stoccaggio, una

domanda "anticipata" durante la notte successiva. Ciò implica che il tasso di sintesi dell'amido durante il giorno è regolato da meccanismi che anticipano la quantità di carbonio richiesta durante la notte. In secondo luogo, il tasso di degradazione dell'amido durante la notte è essenzialmente lineare e porta ad un utilizzo quasi completo della fornitura di amido proprio alla fine della notte. Il tasso di degradazione è fissato da meccanismi che "misurano" la quantità di amido nella foglia alla fine della giornata e anticipano la durata della notte, al fine di mantenere un costante apporto di carbonio dall'amido durante la notte. Numerosi studi dimostrano che i cambiamenti nelle condizioni ambientali si traducono in precisi aggiustamenti di assimilazione e stoccaggio che servono a mantenere questo modello di base. Ad esempio, un cambiamento nella lunghezza del giorno provoca alterazioni sia nella suddivisione del fotoassimilato tra amido e saccarosio durante il giorno, sia nel tasso di degradazione dell'amido durante la notte. Il tasso di sintesi dell'amido è inversamente correlato alla lunghezza del giorno in modo che la proporzione di fotoassimilati messi da parte per l'uso notturno è maggiore quanto più lunga è la notte (Chatterton & Silvius, 1979; 1980; 1981; Jablonski & Gelger, 1987; Lorenzen & Ewing, 1992; Gibon et al., 2004a). Questo modello, finemente regolato, mantiene un bilancio del carbonio appropriato per una crescita sostenuta in un ciclo giorno-notte e stabilisce un nuovo bilancio del carbonio e un nuovo tasso di crescita in risposta alle alterazioni della disponibilità di carbonio imposte dalle perturbazioni ambientali. Un improvviso esaurimento di carboidrati ("fame di carbonio") invia segnali ai processi di crescita che innescano la cessazione della crescita su una scala temporale molto breve. Le ripetizioni della condizione di fame di carbonio, o episodi prolungati e meno gravi di alterata disponibilità di carbonio, innescano aggiustamenti che ottimizzano l'uso del carbonio disponibile in modo da evitare la fame di carbonio e la cessazione della crescita. Gli aggiustamenti includono un tasso più elevato di sintesi dell'amido durante la notte in modo che sia lineare e consumi con precisione tutto l'amido sintetizzato durante il giorno e un tasso di crescita diminuito. Le piante rispondono in due modi distinti ai cambiamenti nella disponibilità di carbonio. Una risposta "acuta" è osservata in condizioni di improvvisa carenza di carbonio. La crescita si ferma bruscamente e non viene ripresa per diverse ore dopo il sollievo della fame. Le risposte "acclimatiche" regolano l'equilibrio tra domanda e offerta per ottimizzare la capacità di crescita sostenuta. Queste risposte operano durante i normali cicli giorno-notte per garantire che la fame di carbonio non si verifichi e quindi che la crescita sia sostenuta. Coordinano la suddivisione dei prodotti dell'assimilazione fotosintetica del carbonio durante il giorno, il tasso di utilizzo dell'amido durante la notte e il tasso di crescita. Le risposte acclimatanti consentono anche adeguamenti su una scala temporale più lunga ai cambiamenti ambientali che influenzano la disponibilità di carbonio: è prevedibile, ad esempio, che le risposte acclimatanti adeguino la crescita e il bilancio del carbonio man mano che l'impianto subisce cambiamenti stagionali nel livello di luce, nella durata del giorno, nella temperatura e nella disponibilità di acqua. Un'altra importante funzione delle risposte di segnalazione alla disponibilità di carbonio può essere quella di bilanciare la crescita in siti e tempi diversi all'interno della pianta. Un esempio lampante è fornito dalla crescita riproduttiva (Boyle et al., 1991; Guilioni et al., 2003; McLaughlin & Boyer. 2004a, b; Mäkelä et al., 2005). La crescita è sostenuta dal metabolismo dei carboidrati (Smith e Stitt, 2007). Gli zuccheri servono come substrati per la biosintesi dei principali componenti cellulari e sono derivati dalla fotosintesi durante il giorno. Durante la notte, quando la fotosintesi non è possibile, gli zuccheri derivano dalla degradazione dell'amido accumulato nel cloroplasto. Ciò è mediato principalmente dall'azione delle β-amilasi localizzate nei cloroplasti, che generano maltosio dall'amido per l'esportazione al citosol (Chia et al., 2004; Fulton et al., 2008).

Gli zuccheri fungono anche da segnali normativi. Alti livelli di zucchero innescano la repressione della fotosintesi e l'induzione dell'accumulo dei carboidrati, mentre bassi livelli innescano una cessazione della crescita e l'induzione di processi catabolici (Koch, 1996; Bläsing et al., 2005; Rolland et al., 2006; Baena-González et al., 2007). Durante il ciclo diurno, le fluttuazioni dei livelli di zucchero endogeno hanno dimostrato di essere il principale fattore che guida i cambiamenti nel trascrittoma di *Arabidopsis thaliana* (Bläsing et al., 2005).

È stato dimostrato che le auxine hanno il maggiore effetto sul radicamento (Hartmann et al., 2002; Kelen & Ozkan 2003; Negash, 2003). Tuttavia, le auxine non promuovono l'iniziazione delle radici o hanno solo un leggero effetto radicante nel caso di cultivar di olive difficili da radicare (Wiesman & Lavee, 1995). Un equilibrio tra fattori stimolatori ed inibitori endogeni è necessario, nonché fattori nutrizionali per promuovere il radicamento delle talee di olivo. Il processo di radicazione nelle talee è particolarmente lungo ed è importante che le talee siano continuamente alimentate con un'elevata quantità di energia e materiali strutturali cellulari per l'inizio del primordio radicale (Kim & Yoo, 1996). Inoltre, è stato suggerito che i carboidrati promuovono il radicamento in un modo non collegato al loro ruolo di substrati che forniscono energia (Haissig, 1989). Pertanto, i carboidrati influenzano il metabolismo dell'auxina indicando che possono migliorare l'effetto stimolante di IBA nei processi di radicazione. Le auxine possono anche influenzare l'utilizzo dei carboidrati, visto che l'applicazione esogena dell'auxina nella zona di radicazione attiva il metabolismo degli zuccheri per liberare energia e fornire carbonio per la sintesi di altri composti essenziali (Haissig, 1974). Il rapido aumento dei livelli di carboidrati alla base dello stelo dopo l'applicazione di auxina suggerisce che essa stimola la creazione di un flusso di carboidrati alla base dello stelo, contribuendo alla formazione di primordi radicali (Agulló-Antón et al., 2011). Nella maggior parte delle specie, il trasporto a lunga distanza di assimilati è sotto forma di saccarosio. Questo processo è guidato da un gradiente di concentrazione tra i tessuti di origine. La scissione di saccarosio rende più rapida la pendenza; pertanto, gli enzimi sucrolitici sono pensati per contribuire alla ripartizione dei carboidrati (Roitsch & González, 2004). Tahir et al. (2022) hanno evidenziato come nella fase iniziale di sviluppo, un gran numero di granuli di amido sono presenti nelle cellule che hanno iniziato la formazione di primordi radicali alla base dello stelo, e quindi la percentuale di plastidi è cresciuta, con i granuli di amido che occupano una quota maggiore di tutti i plastidi apparenti nello stesso stadio. L'utilizzo degli zuccheri prodotti dall'idrolisi di tutti questi granuli di amido fornisce energia per il radicamento avventizio, che è associato ad un aumento del numero di mitocondri cambiali, dittiosomi e nuclei a scapito visibile dell'espansione vacuolare. Inoltre, Pawlicki et al., (1995) hanno utilizzato diverse combinazioni e concentrazioni di carboidrati e auxina per studiare la differenziazione delle radici avventizie. Hanno scoperto che il saccarosio (29-50 mM) stimolava il radicamento avventizio ma supportava anche la formazione del callo. Al contrario, il sorbitolo, che è richiesto in grandi quantità per un radicamento avventizio ottimale, non era molto favorevole alla formazione del callo. C'era anche una sinergia tra saccarosio e auxina, che facilitava il radicamento avventizio.

Molti studi hanno dimostrato una correlazione positiva della capacità di radicazione con il contenuto di carboidrati delle talee (Kim & Yoo, 1996; Aslmoshtaghi & Shahsavar, 2010). Il contenuto di carboidrati è maggiore nelle cultivar facili da radicare che in quelle difficili da radicare (Couvillon, 1988; Kim & Yoo, 1996), mentre l'apporto e la ridistribuzione dei carboidrati nelle talee può limitare la loro capacità di radicazione (Hartmann et al., 2001).

Pertanto, il ruolo dei carboidrati nella formazione di radici avventizie nelle talee rimane controverso (Ragonezi et al., 2010). I carboidrati non agiscono solamente come fonti di energia nel processo di radicazione avventizia, ma anche come molecole segnale nelle cellule vegetali. È stato osservato come saccarosio, glucosio e fruttosio agiscano positivamente sull'induzione della radicazione avventizia in Arabidopsis, a differenza del mannosio che non influenza questo processo (Takahashi et al., 2003). Il glucosio è un importante molecola segnale per l'acido abscissico e l'etilene e indirettamente per l'auxina grazie all'interazione con i due fitormoni (Leon & Sheen, 2003). Wang e Ruan (2013) hanno dedotto, che il dialogo incrociato tra glucosio e auxina, controlli il ciclo cellulare e l'espansione cellulare nei tessuti non fotosinteticamente autonomi, attraverso un meccanismo complesso che coinvolge cicline e CDK così come l'espressione genica mediata dall'esochinasi. Inoltre, è stato riportato che la stimolazione dei fattori di trascrizione (ARF), da parte dell'acido indolo-3-acetico (IAA), coincida con una maggiore disponibilità di zuccheri nel sito di sviluppo dei primordi radicali (Nanda & Jain, 1972). L'auxina stimola la mobilitazione dei carboidrati nelle foglie e nello stelo superiore, aumentando la traslocazione degli assimilati verso la zona delle radici (Altman & Wareing, 1975; Veierskov & Andersen, 1982; Haisig, 1986). Tuttavia, i processi regolatori sottostanti tra gli ormoni che promuovono le radici e i livelli di carboidrati durante la formazione avventizia delle radici sono sconosciuti.

### 4.2.3 Gli enzimi ossidativi

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono un altro gruppo di molecole di segnalazione descritte come attori centrali nel coordinamento delle risposte agli stress biotici e abiotici nelle piante, nonché nella regolazione della crescita e dello sviluppo delle piante. Le specie reattive dell'ossigeno rappresentano un segnale a valle per l'allungamento e la crescita indotta dall'auxina (Schopfer, 2001; Schopfer et al., 2002; Liszkay et al., 2004; Schopfer & Liszkay, 2006) e per il gravitropismo radicale (Joo et al., 2001). Le auxine svolgono un ruolo centrale nel controllo della radicazione avventizia (Pacurar et al., 2014; Pop et al., 2011; Vidoz et al., 2010; Ford et al., 2002), e per questo motivo la radicazione avventizia nelle talee di olivo è stata suggerita come risposta diretta alla crescita, che comporta una riprogrammazione indotta dallo stress del destino delle cellule di germoglio con cui le piante diminuiscono l'esposizione allo stress (Arnholdt-Schmitt et al., 2006a; Santos Macedo et al., 2012). L'esistenza di cross-talk tra ROS e omeostasi e segnalazione dell'auxina è ampiamente riportata come induttore del processo di radicazione avventizia (Xu et al., 2005; Liu et al., 2009; Brinker et al., 2004). In effetti, il trasporto di auxina, in particolare attraverso i vettori di auxina PIN, è un fattore chiave nella formazione di radici avventizie. Le ROS possono alterare il trasporto direzionale dell'auxina inducendo enzimi coniuganti l'auxina o riducendo la trascrizione di geni responsivi all'auxina. Nelle punte delle radici di mais, il massimo di auxina è correlato a un cambiamento nello stato redox poiché l'ossidazione aumenta nelle regioni in cui ci sono i massimi di auxina (Jiang et al., 2003). Gli enzimi ossidativi sono stati a lungo correlati alla formazione avventizia delle radici, in particolare il gruppo delle perossidasi e delle polifenoli-ossidasi. Le perossidasi (POX) sono un gruppo di proteine emiche che catalizzano l'ossidazione di diversi donatori di elettroni, come composti fenolici e IAA (Bandurski et al., 1995, Hiraga et al., 2001), utilizzando il perossido d'idrogeno come agente ossidativo. Un gruppo di isoforme POX, comunemente noto come IAA-ossidasi, è considerato responsabile della decarbossilazione ossidativa enzimatica dell'IAA (Ljung et al.,

2002) e l'attività di questo gruppo di enzimi è stata in gran parte associata al radicamento avventizio (Bansal & Nanda, 1981; Güneş, 2000). L'attività delle perossidasi può diminuire durante la radicazione sebbene alcune isoforme specifiche, come IAAox, aumentino la loro attività per controllare i livelli di IAA e facilitino lo sviluppo di nuove radici avventizie, stimolando la formazione di lignina e la reticolazione dei componenti della parete cellulare. Questo spiegherebbe anche perché gli espianti trattati con IBA hanno una maggiore attività di POX durante la fase di emergenza, poiché sono prodotte più radici sono in risposta al trattamento con IBA. Una diminuzione dell'attività POX durante la formazione delle radici potrebbe essere il risultato del trattamento che induce le radici stesse. Le polifenoli-ossidasi (PPO) sono un gruppo di enzimi ossidativi contenenti rame che catalizzano due reazioni: idrossilazione dei monofenoli in o-difenoli (Mayer, 2006) e ossidazione dei o-difenoli in o-chinoni (Constabel & Barbehenn, 2008). Le PPO sono anche in grado di degradare altri composti fenolici, strutturalmente più complessi, come gli antociani e altri polifenoli (Jiménez e Garcìa-Carmona, 1999). Il coinvolgimento combinato di auxina e POX nella crescita e nello sviluppo delle piante è stato recentemente descritto in *Arabidopsis*, dove il gene *FtSH4* è stato suggerito quale mediatore del metabolismo, del trasporto o del sistema di segnalazione dell'auxina (Zhang et al., 2014). I mutanti *ftsh4-4* hanno mostrato carenze di crescita e sviluppo, tra cui livelli di IAA più bassi e alti livelli di $H_2O_2$, che sono stati attribuiti a una maggiore espressione genica POX. Un contenuto e un'attività POX superiori al normale influenzerebbero i livelli di auxina che, a loro volta, comporterebbero difetti di crescita. Questa conclusione è stata corroborata dal fatto che nei mutanti *ftsh4-4* i geni POX più altamente espressi erano le isoforme IAAox PRX33, PRX34 e PRX37 (Zhang et al., 2014). L'acclimatazione allo stress è spesso accompagnata da un aggiustamento metabolico. L'ossidasi alternativa (AOX) svolge un ruolo centrale nel determinare l'equilibrio reattivo delle specie reattive dell'ossigeno e può essere indotta da stress di tipo abiotico e biotico (Santos-Macedo et al., 2012). AOX è una chinolo ossidasi terminale situata sul lato della matrice della membrana mitocondriale interna e funziona come enzima chiave nella via respiratoria alternativa (McDonald et al., 2015). Il metabolismo secondario durante la radicazione avventizia può essere associato all'attività di AOX. Una complessa interazione tra AOX e $H_2O_2$ nella segnalazione cellulare è evidente. L'applicazione di $H_2O_2$ esogena potrebbe sostituire l'auxina come agente radicante nelle talee di olivo (Santos-Macedo et al., 2009) e la presenza di un inibitore di AOX, l'acido salicildrossamico (SHAM), riduce la percentuale di radicazione anche in presenza di auxina esogena (Santos-Macedo et al., 2012). Il perossido d'idrogeno funziona come molecola di segnalazione e media vari processi fisiologici e biochimici, oltre a controllare le risposte a vari stimoli nelle piante (Neil et al., 2002). Li et al. (2009) hanno dimostrato che $H_2O_2$ potrebbe funzionare come molecola di segnalazione coinvolta nello sviluppo di radici avventizie. La produzione di $H_2O_2$ è stata fortemente indotta in piantine trattate con acido indolo-3-butirrico (IBA), suggerendo che quest'ultimo ha indotto la sovrapproduzione di $H_2O_2$ e promosso la radicazione avventizia.

### 4.2.4 Sostanze minerali

I nutrienti minerali sono importanti per la crescita delle piante. Una carenza di qualsiasi elemento essenziale, come carbonio o macro o micronutrienti, può limitare la formazione di radici avventizie, sia a livello sistemico, agendo sui principali processi fisiologici, sia per effetti su processi associati all'induzione, all'iniziazione e all'emergenza delle radici (Druege et al., 2019). La separazione di un espianto o di una talea dalla pianta donatrice disturba l'afflusso di nutrienti, di conseguenza, le quantità di elementi minerali presenti saranno i soli disponibili fino al ripristino della capacità di assorbimento dei nutrienti. Numerosi studi (Druege et al., 2000, 2004; Ahkami et al., 2009; Zerche & Druege, 2009; Agulló-Antón et al., 2011) sulla formazione di radici avventizie nelle talee legnose di diverse specie in substrati privi di nutrienti, hanno evidenziato come sia importante il ruolo del pool endogeno iniziale di nutrienti nel sito di taglio. Diverse specie vegetali indicano che la formazione di radici nelle talee può essere compromessa da un basso apporto di K o Fe alle piante donatrici (Henry et al., 1992; Tsipouridis et al., 2006). Altri studi si sono concentrati sul ruolo dell'azoto nelle piante in allevamento, che è ulteriormente collegato al metabolismo dei carboidrati. Studi che hanno esaminato il pelargonio (*Pelargonium* × *hortorum*), il crisantemo indicum, *l'Euphorbia pulcherrima* e la petunia hanno dimostrato che il numero e la lunghezza delle radici sono positivamente correlati con la concentrazione iniziale totale di azoto nelle talee; in petunia, in particolare, questo fenomeno è associato ad una maggiore differenziazione di nuove cellule meristematiche in radici avventizie pienamente sviluppate (Druege et al., 2000, 2004; Zerche & Druege, 2009; Zerche et al., 2016). Il monitoraggio di K, micronutrienti e amminoacidi come composti mobili dell'azoto nella base dello stelo delle talee durante la formazione di radici avventizie ha indicato che la formazione di queste non dipende solo dal contenuto iniziale di nutrienti nei tessuti al momento dell'escissione di taglio, ma in particolare comporta la successiva mobilizzazione e traslocazione nel sito di taglio (Svenson & Davies, 1995; Ahkami et al., 2009).

Nonostante l'importanza accertata della composizione minerale del mezzo radicale sulla base di studi empirici che esaminano la propagazione *in vitro* di varie specie vegetali, poco si sa sui meccanismi di assorbimento dei nutrienti nella base dello stelo delle talee prima della comparsa delle radici. L'analisi del trascrittoma della base di taglio della petunia ha rivelato una sovra regolazione di 18 geni coinvolti nell'acquisizione di N, P, K, S, Fe e Zn durante l'inizio precoce dei primordi radicali (Ahkami et al., 2014). Questi risultati suggeriscono che la base di taglio acquisisce la capacità di assorbimento specifica dei nutrienti, che è caratteristica del sistema radicale, e che la formazione di radici può essere migliorata dall'applicazione locale di alcuni nutrienti limitanti alla zona di radicazione.

La figura sottostante (Fig.19) riassume gli effetti riportati dell'applicazione di nutrienti locali alla base dello stelo sulla formazione di radici nelle talee. Questi studi, che indicano effetti positivi di N, K, Ca, B, Fe e Zn, hanno coinvolto varie specie vegetali e sono spesso condotti in diversi sistemi di crescita, influenzando ulteriormente le condizioni chimiche della zona radicale.

| Mineral element | Supplied form | Plant species | Reported effect | Reference |
|---|---|---|---|---|
| N | $NaNO_3$<br>$NH_4Cl$ | *Eucalyptus globulus* Labill.<br>*Eucalyptus globulus* Labill. | Increased rooting percentage,<br>AR number and length<br>Decreased AR number and length | Schwambach *et al.* (2005, 2015)<br>Schwambach *et al.* (2005) |
| | Glutamic acid | *Eucalyptus globulus* Labill. | Increased AR number and decreased AR length | Schwambach et. al. (2005) |
| | $(NH_4)_2SO_4$ | *Petunia hybrida* Vilm. | Increased AR initiation and enhanced meristematic cell division | Hilo *et al.* (2017) |
| | Arginine<br>Ornithine<br>Glutamic acid | *Malus domestica* L. | Increased rooting percentage and AR number | Orlikowska (1992) |
| K | KCl | *Cucumis sativus* L.<br>*Phaseolus radiatus* L.<br>*P. vulgaris* L. | Increased AR number | Zhao *et al.* (1991) |
| Ca | $CaCl_2$ | *Pisum sativum* L. | Increased AR elongation | Eliasson (1978) |
| B | $H_3BO_3$ + IBA | *Phaseolus aureus* Roxb. | Increased AR number and length | Middleton *et al.* (1978) |
| | $H_3BO_3$ | *Helianthus annuus* L. | Increased initiation of ARs and meristematic activity | Josten and Kutchera (1999) |
| Fe | FeEDDHA | *Prunus amygdalus×P. persica* | Increased rooting percentage, AR number and length | Molassiotis *et al.* (2003) |
| | FeEDDHA | *Petunia hybrida* Vilm. | Increased AR initiation and enhanced meristematic cell division | Hilo *et al.* (2017) |
| Zn | $ZnSO_4$ + NAA | *Mangifera indica* L. | Increased rooting percentage, AR number and total AR length | Yamashita *et al.* (2006) |
| | Zinc ammonium acetate | *Physocarpus opulifolius* (L.) Maxim. | Increased rooting percentage, rooting quality and stem elongation | Pacholczak and Szydło (2008) |

Fig.19. Ruolo dell'applicazione esogena di nutrienti minerali in talee di stelo (Druege et al., 2019).

### 4.2.5 Poliammine

Le poliammine sono cationi a basso peso molecolare, ubiquitari in tutti gli organismi viventi (Cohen, 1998) che agiscono come regolatori della crescita e sono state descritte come interagenti con gli ormoni delle piante (Alabadí et al.,1996; Tonon et al., 2001), sebbene la loro classificazione sia ancora controversa (Rademacher, 2015). Dato il loro ruolo nella replicazione del DNA, sono state associate a un gran numero di processi di sviluppo nelle piante, tra cui la divisione cellulare e l'organogenesi, l'embriogenesi, l'iniziazione e lo sviluppo floreale, lo sviluppo dei frutti, la crescita delle radici, la senescenza e lo stress abiotico (Alcázar et al., 2010; Bais & Ravishankar, 2002; Galston & Sawhney, 1990). Le principali poliammine (Fig.20) presenti nelle piante sono la putrescina (Put), la spermidina (Spd) e la spermina (Spm), e il loro ruolo nella formazione delle radici avventizie è stato suggerito da diversi autori in differenti specie legnose, compreso l'olivo (Rugini e Wang, 1986). L'accumulo di poliammine è associato allo sviluppo delle radici avventizie (Altamura et al., 1991, 1993; Friedman et al., 1982, 1985), mentre a basse concentrazioni di poliammine corrisponde una diminuzione della crescita di radici avventizie.

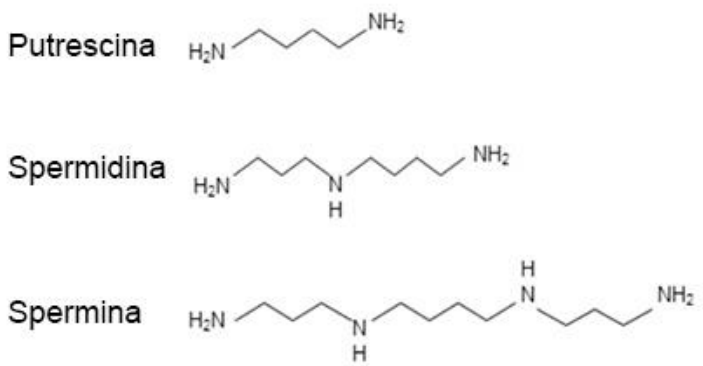



Fig.20 Le principali poliammine coinvolte nei processi di radicazione avventizia. Fonte: web

L'elevata flessibilità del metabolismo delle poliammine in risposta allo stress ambientale e il legame metabolico tra la sintesi di poliammina ed etilene suggeriscono fortemente che le poliammine possono svolgere un ruolo nella plasticità indotta dall'ambiente dello sviluppo delle radici. Le poliammine agiscono positivamente sulla radicazione avventizia stimolando l'attività delle perossidasi vegetali (POX), in quanto il trattamento con perossido di idrogeno ($H_2O_2$), prodotto del catabolismo della Putrescina e substrato delle POX, porta ad un incremento della percentuale di radicazione e la riduzione dei tempi di comparsa delle radici avventizie (Rugini et al., 1992). Inoltre, trattamenti con inibitori della sintesi delle poliammine, come la difluorometilornitina (DFMO) e la difluorometilarginina (DFMA), inibiscono la radicazione avventizia (Hausman et al., 1994; Martin-Tanguy & Carré, 1993; Naija et al., 2009) e l'utilizzo di poliammine esogene può inibire DFMO e DFMA (Biondi et al., 1990).

## 5. L'auxina

Il coinvolgimento delle auxine nel radicamento avventizio è stato studiato a lungo (Wiesman et al., 1989) e sono ampiamente utilizzate nei protocolli di propagazione delle piante come composti che inducono radici (Preece, 2003). L'auxina è un importante ormone vegetale che svolge un ruolo fondamentale nella crescita e nello sviluppo delle piante, comprese le risposte di rigenerazione e adattamento. Le due principali auxine naturali sono l'acido indolo-3-acetico (IAA) e l'acido indolo-3-butirrico (IBA) che possono essere quantificate con vari metodi, come recentemente esaminato da Porfirio et al. (2016). L'evidenza suggerisce che l'IAA probabilmente promuove il radicamento avventizio attraverso una rete di segnalazione simile a quella che si verifica nelle radici laterali, coinvolgendo fattori di risposta dell'auxina (ARF) e altri ormoni vegetali (Porfirio et al., 2016). L'attività dell'auxina IBA sembra essere il risultato della sua conversione in IAA (Korasick et al., 2013) da parte di enzimi perossisomiali (Strader & Bartel., 2011: Zolman et al., 2007: Zolman et al., 2008). Sebbene il genotipo sembri avere un'influenza più forte sulle prestazioni di radicazione, i cambiamenti nella concentrazione di auxina sono stati associati sia alle fasi interdipendenti del processo che alla capacità di radicazione di una specie o cultivar (Ayoub & Qrunfleh, 2008, Nag et al., 2001). Secondo De Klerk et al. (1995), gli alti livelli di auxina necessari per il successo della fase di induzione diventano inibitori durante l'espressione della radice, probabilmente perché alte concentrazioni di auxina inibiscono l'allungamento delle radici e promuovono la differenziazione cellulare (Li et al., 2009). Questo implica che il catabolismo IAA è obbligatorio per evitare l'inibizione dello sviluppo delle radici.

I livelli e la distribuzione dell'acido indolo-3-acetico auxina attivo (IAA) sono strettamente controllati attraverso la sintesi, l'inattivazione e il trasporto. Sono stati identificati molti precursori dell'auxina e forme modificate di auxina, utilizzate per regolare l'omeostasi dell'auxina; tuttavia, si sa molto poco sull'integrazione della biosintesi multipla dell'auxina e delle vie di inattivazione. L'IAA è strutturalmente correlata e derivata biochimicamente dal triptofano (Trp). Tuttavia, il triptofano non è assolutamente necessario per la sintesi di IAA e per la biosintesi dell'auxina sono state proposte diverse vie ramificate, sia dipendenti che indipendenti dal Trp (Normanly et al., 2004; Woodward et al., 2005). Poiché questi percorsi biosintetici sono ridondanti e mostrano forti differenze specie e tessuto-specifiche, il contributo di ogni percorso non è chiaro. Inoltre, l'IAA può essere inattivato o immagazzinato attraverso la coniugazione ad amminoacidi, zuccheri e peptidi (Normanly et al., 2004; Woodward et al., 2005). L'aumento della produzione di auxina nella pianta dalla sovraespressione di geni batterici (Klee et al., 1987; Romano et al., 1995) o endogeni della pianta (Normanly et al., 2004; Woodward et al., 2005) per il metabolismo dell'auxina ha prodotto fenotipi simili a quelli indotti dall'applicazione esogena dell'auxina, indicando che la regolazione della biosintesi e del metabolismo dell'auxina è importante per la crescita e lo sviluppo delle piante. Mantenere adeguati livelli cellulari di auxina attiva è importante per regolare tutti gli aspetti della crescita e dello sviluppo delle piante. I livelli cellulari di auxina possono essere alterati dal suo trasporto, dalla biosintesi dell'auxina e dall'interconversione delle forme di auxina modificate. Molte piccole molecole, se fornite esogenamente, inducono una risposta all'auxina. Questi composti includono auxine attive presenti in natura (Fig.21), come l'acido indolo-3-acetico (IAA), l'acido 4-cloroindolo-3-acetico (4-Cl-IAA) e l'acido fenilacetico (PAA); precursori inattivi dell'auxina presenti in natura, come l'acido indolo-3-piruvico (IPyA), l'indoleacetamina (IAM), l'indolo-3-acetaldoxima (IAOx), l'indolo-3-acetonitrile (IAN) e l'indolo-3-acetaldeide (IAAld); e forme di stoccaggio di auxina

presenti in natura, come l'acido indolo-3-butirrico (IBA), il metil-IAA (MeIAA) e le auxine coniugate ad amminoacidi o zuccheri. Inoltre, i composti sintetici (Fig. 1B), come l'acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D), l'acido 1-naftalenacetico (NAA), l'acido 3,6-dicloro-2-metossibenzoico (dicamba) e l'acido 4-ammino-3,5,6-tricloropicolinico (picloram), inducono una risposta all'auxina. Nei tessuti vegetali, l'IAA in forma libera si attesta intorno al 25% dell'IAA totale, la restante parte è costituita da forme inattive come precursori, molecole di stoccaggio e coniugati (Ludwing-Muller, 2011). Le forme di stoccaggio dell'IAA sono costituite dalla sua forma metilata MeIAA e dall'acido indol-3-butirrico (IBA). L'acido indolo-3-butirrico (IBA) è il principale precursore dell'IAA, il quale viene sintetizzato a partire da IBA con una reazione simile alla ß-ossidazione degli acidi grassi, catalizzata da enzimi perossisomiali (Zolman et al., 2011; Strader et al., 2010). Studi su individui mutanti in cui è stato bloccato il pathway della ß-ossidazione, risultano sensibili all'IAA e insensibili all'IBA, confermando la sua natura di precursore inattivo dell'IAA e l'ipotesi per cui qualsiasi risposta all'auxina negli organismi vegetali sia attribuibile solamente alla sua conversione in IAA (Strader et al., 2010). È stato dimostrato che l'IAA derivato dall'IBA svolga funzioni specifiche nello sviluppo di radici e germogli (Frick et al., 2018). Ad esempio, l'induzione della radicazione laterale sembrerebbe essere strettamente dipendente dalla conversione da IBA a IAA nel cappuccio laterale della radice (De Rybel et al., 2012; Xuan et al., 2015). L'estere metilico dell'IAA (MeIAA) è una molecola volatile non polare, trasportata nella pianta per diffusione o per trasporto attivo. In Arabidopsis, la sintesi di questa molecola è mediata dall'enzima carbossimetil transferasi (IAMT) (Zubieta et al., 2003). Nello studio di Qin et al. (2005), è stato osservato come l'applicazione di MeIAA esogeno inibisca la crescita delle radici e l'allungamento dell'ipocotile delle piantine cresciute al buio, in misura paragonabile all'applicazione di IAA, indicando che MeIAA regoli i livelli di IAA endogeni. Le forme coniugate dell'IAA maggiormente studiate sono i coniugati con aminoacidi. Il processo di coniugazione è mediato dagli enzimi IAA-amido sintetasi, codificati dai geni di risposta all'auxina della famiglia GRETCHEN HAGEN 3 (Staswick et al., 2005; Ludwig-Muller, 2009). Gli enzimi codificati dai geni GH3 non agiscono solamente sull'auxina ma anche su altri ormoni, come l'acido jasmonico (Staswick et al., 2005); la coniugazione degli aminoacidi Asp, Met, Trp e Ile all'acido jasmonico influenza il processo di regolazione del processo di radicazione avventizia (Gutierrez et al., 2012). I coniugati IAA-aa più abbondanti, ovvero l'IAA-Asp e IAA-Glu (Kowalczyk et al., 2001) non sono considerati forme di stoccaggio di IAA reversibili, ma cataboliti: non è stata infatti rilevata la presenza di IAA in seguito al trattamento di Arabidopsis con IAA-Asp e IAA-Glu esogeni (Bartel et al., 1995). Sono varie le forme di auxina attiva e inattiva presenti in natura, così come i suoi precursori e i ruoli per gli input da diverse auxine modificate al pool di auxine attive che influenzano la crescita e lo sviluppo delle piante.

È interessante notare che l'applicazione esogena di ciascuna auxina porta a uno spettro di effetti distinto ma parzialmente sovrapponibile (Normanly et al., 2004). Ciò è forse dovuto alle specifiche proprietà di trasporto per ciascun tipo di auxina e differenze nella permeabilità dei tessuti e nella stabilità metabolica.

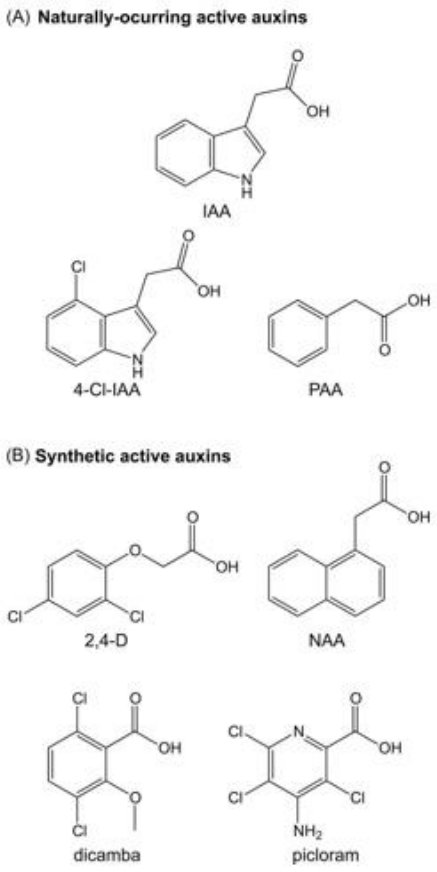



Fig.21 Le auxine attive presenti in natura (A) e sintetiche (B) (Korasick et al., 2013).

## 5.1 La biosintesi dell'auxina

IAA è l'auxina attiva naturale meglio studiata. La biosintesi di IAA può verificarsi attraverso due vie principali: vie dipendenti dal triptofano e triptofano-indipendenti. Diverse vie di biosintesi dell'auxina triptofano dipendenti contribuiscono ai livelli di IAA, tra cui la via IAOx, la via IAM e la via IPyA (Fig.22).

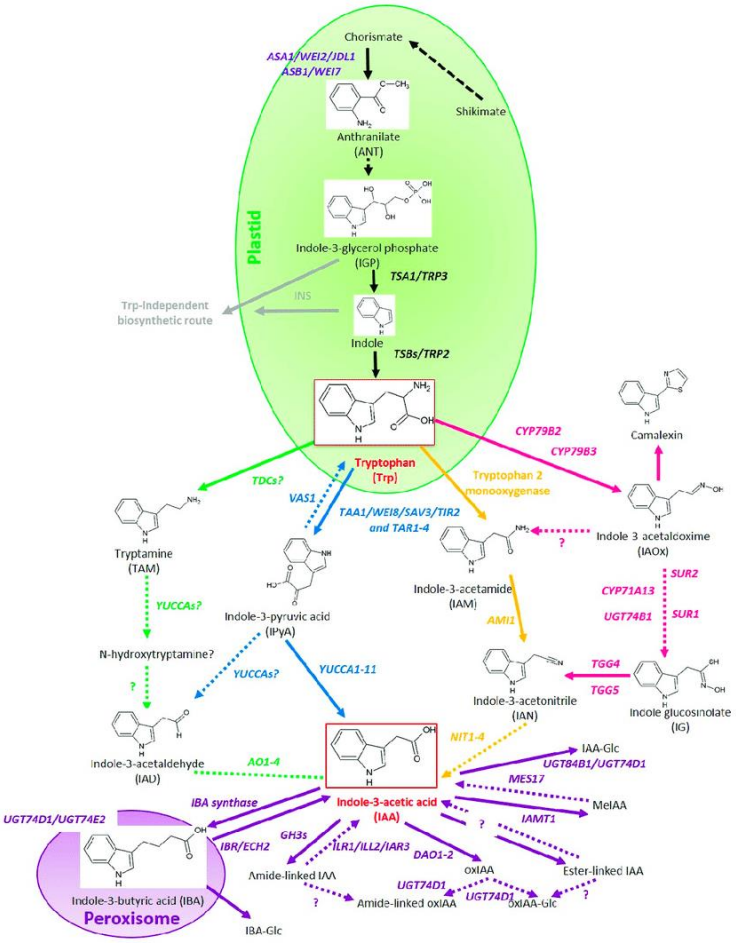



Fig.22 Potenziali vie biosintetiche di IAA. Le frecce continue indicano i percorsi in cui sono stati identificati gli enzimi coinvolti per la biosintesi (Olantunji et al., 2017).

### 5.1.1 Le vie Trp-dipendenti

La via Trp dipendente è invece costituita dall'insieme di pathways che contribuiscono alla regolazione dei livelli di IAA nella pianta (Woodward & Bartel, 2005; Pollmann et al., 2006a; Chandler, 2009; Mano et al., 2010; Normanly, 2010; Zhao, 2010). I pathway coinvolti nella sintesi di IAA sono:

- indole-3-acetaldoxime (IAOX) pathway;

- indole-3-acetamide (IAM) pathway;

- indole-3-pyruvic acid (IPA) pathway;

- tryptamine (TAM) pathway;

Tra tutte le vie biosintetiche, quella dell'acido-3-indol piruvico è la più nota; il pathway è costituito da due step che permettono la conversione del Trp in IAA.

Nella via dell'IAOx, gli enzimi del citocromo P450, CYP79B2 e CYP79B3 convertono triptofano in IAOx (Hull et al., 2000; Mikkelsen et al., 2000; Zhao et al., 2002). L'IAOx è ampiamente utilizzato per produrre composti di

difesa come i glucosinolati o le camalexine (Bak et al., 2001; Zhao et al., 2002; Mikkelsen et al., 2004) ed è anche utilizzato per produrre IAA (Zhao et al., 2002; Sugawara et al., 2009). IAM, un'altra fonte di auxina, è probabilmente prodotta sia da IAOx che da un'altra fonte sconosciuta (Sugawara et al., 2009). I livelli di IAM sono ridotti nel mutante cyp79b2 cyp79b3 (Sugawara et al., 2009), che è difettoso nella conversione di Trp in IAOx (Mikkelsen et al., 2000; Zhao et al., 2002), coerentemente con il contributo di IAOx ai livelli di IAM. Inoltre, la sintesi di IAM da IAOx è stata dimostrata direttamente in saggi in cui cyp79b2 cyp79b3 è stato alimentato con IAOx marcato con 13C6 per generare IAM marcato con 13C6 (Sugawara et al., 2009). Inoltre, lo IAM è stato rilevato in molte specie in cui non è stato rilevato lo IAOx, sollevando la possibilità che lo IAM possa essere prodotto anche in una via indipendente da IAOx. Lo IAM può essere convertito in IAA attivo attraverso l'attività di amidasi 1 (Pollmann et al., 2003).

La via IPyA sembra essere la principale responsabile della produzione di IAA libero (Zhao et al., 2012) ed è l'unica via in cui sono stati identificati tutti i passaggi da Trp a IAA. La conversione di Trp in IAA attraverso la via IPyA è un processo a due fasi: la famiglia di aminotransferasi Trp (Tryptophan Aminotransferase TA1) e delle proteine TA1- RELATED converte Trp in IPyA e la famiglia di monossigenasi flaviniche YUCCA converte IPyA in IAA (Casanova et al., 2019; Ljung et al., 2013). La famiglia YUCCA è nota per convertire l'IPyA in IAA attivo (Mashiguchi et al., 2011; Stepanova et al., 2011; Won et al., 2011) utilizzando NADPH e ossigeno nel processo di conversione (Dai et al., 2013). La sovraespressione di molti membri della famiglia YUCCA determina fenotipi di sovrapproduzione di auxina (Zhao et al., 2001; Marsch-Martinez et al., 2002; Woodward & Bartel, 2005; Cheng et al., 2006; Kim et al., 2007; Mashiguchi et al., 2011). È interessante notare che la IAAld è stata identificata in diverse specie vegetali e che in precedenza è stata ipotizzata come precursore dell'auxina (Seo et al., 1998) e inclusa come intermedio in molte vie biosintetiche dell'auxina proposte in precedenza (recensione di Woodward & Bartel, 2005). Inoltre, l'applicazione di IAAld determina un aumento dei livelli di IAA libero (Larsen, 1949, 1951; Bower et al., 1978; Koshiba et al., 1996; Tsurusaki et al., 1997), coerentemente con la possibilità che l'IAAld sia direttamente convertito in IAA in pianta. L'enzima ARABIDOPSIS ALDEHYDE OXIDASE1 (AAO1) è stato suggerito per convertire l'IAAld in IAA (Seo et al., 1998). Tuttavia, il ruolo di AAO1 nella conversione dell'IAAld in IAA è stato messo in discussione, poiché il mutante aba3, che non riesce a produrre il cofattore molibdeno necessario per l'attività di AAO (Schwartz et al., 1997), non mostra difetti evidenti legati all'auxina e non accumula IAAld (Mashiguchi et al., 2011), suggerendo che i membri di AAO non contribuiscono alla regolazione dell'omeostasi dell'auxina o alla regolazione della conversione di IAAld in IAA. Attualmente, non si ipotizza che l'IAAld sia un intermedio nelle vie di biosintesi dell'auxina proposte, nonostante la sua presenza naturale e la conversione in pianta dell'IAAld fornito in IAA. Pertanto, l'IAAld è un intermedio orfano nelle vie biosintetiche dell'IAA attualmente proposte; saranno necessari studi futuri per identificare gli enzimi necessari per la conversione dell'IAAld in IAA e per determinare se l'IAAld svolge un ruolo nell'omeostasi dell'auxina attraverso le vie biosintetiche dell'auxina Trp-dipendenti o Trp-indipendenti.

Il triptofano decarbossilasi (TDC) è un enzima citosolico che converte triptofano in TAM, che è un protoalcaloide in una fase iniziale della via biosintetica dell'alcaloide indolo terpenoide (Di Fiore et al., 2002). Questi geni TDC sono stati funzionalmente caratterizzati e partecipano alla biosintesi degli alcaloidi indolici e della serotonina. È

stato anche proposto che la via TAM sia una delle vie biosintetiche di IAA. Il gene YUCCA, appartenente alla famiglia delle monoossigenasi, sembra ossidare TAM in N-idrossitriptamina, isolata da *A. thaliana*.

### 5.1.2 La via Trp-indipendente

Le vie biosintetiche Trp indipendenti potrebbero contribuire all'omeostasi dell'auxina (Normanly et al., 2004). L'analisi dei mutanti Trp in Arabidopsis e mais non ha rivelato differenze nei livelli di IAA liberi rispetto al wild-type (Wright et al., 1991; Normanly et al., 1993), coerentemente con la possibilità che l'IAA possa essere sintetizzato in assenza di triptofano. Poco si sa sui potenziali intermedi nella via Trp-indipendente proposta, e nessuno dei geni coinvolti è stato identificato; la via indipendente dal triptofano è postulata come derivare da indolo o indolo-3-glicerolo fosfato (Ouyang et al., 2000). Alcuni studi hanno messo in discussione la probabilità di un percorso indipendente dal triptofano. La conversione non enzimatica dell'indolo-3-glicerolo fosfato, che si accumula eccessivamente nel mutante trp3-1 di Arabidopsis, in IAA durante l'estrazione è stata suggerita come fonte di IAA in campioni esaminati per i livelli di auxina (Müller &Weiler, 2000). Inoltre, il triptofano viene convertito in modo efficiente in IAA nei chicchi di mais e non è concorrente dell'indolo, suggerendo che la conversione da Trp a IAA è il principale driver dell'omeostasi dell'auxina (Glawischnig et al., 2000). L'identificazione molecolare degli enzimi necessari per la biosintesi di IAA Trp-indipendente chiarirebbe queste differenze.

## 5.2 Meccanismo d'azione dell'auxina

Per comprendere l'azione pleiotropica dell'auxina e della selezione della risposta cellulare definitiva, è bene avere chiari quelli che sono i meccanismi molecolari d'azione. Questi includono generalmente lo studio dei recettori ormonali, le vie di trasduzione e il coinvolgimento di alcuni programmi genetici che forniscono la risposta finale delle cellule all'ormone auxinico. Sebbene molte delle vie di segnalazione che portano alle risposte mediate dall'auxina devono ancora essere chiarite, sono disponibili conoscenze significative sui recettori nucleari per l'auxina. L'auxina induce un'oscillazione del potenziale bioelettrico; questo effetto, specifico per ogni tessuto, dipende dall'età e dalla fase di crescita delle cellule. Al momento della percezione nel nucleo, l'auxina può innescare risposte trascrizionali ampie e specifiche. Nella recente letteratura, due diverse proteine sono accettate come veri recettori auxinici: le proteine Auxin Binding Protein1 (ABP1) e Transport Inhibitor Response1/Auxin Signaling F-box (TIR1/AFB). I componenti principali del meccanismo di segnalazione auxinico appartengono a tre famiglie di proteine: i corecettori dell'auxina F-box transport inhibitor response 1/auxin signaling F-box protein (TIR1/AFB), i repressori trascrizionali dell'auxina (Aux/IAA) e i fattori di trascrizione ARF. L'auxina promuove un'interazione tra le proteine TIR1/AFB e Aux/IAA, con conseguente degradazione degli Aux/IAA e rilascio della repressione ARF (Wang & Estelle, 2014; Salehin et al., 2015).

La famiglia TIR1/AFB dei membri della proteina F-box è stata la prima autentica famiglia di recettori dell'auxina ad essere scoperta (Dharmasiri et al., 2005a; Kepinski & Leyser, 2005). Queste proteine formano complessi

regolatori nucleari chiamati SCF-E3-ubiquitina ligasi e sono responsabili della degradazione mirata di una famiglia di repressori trascrizionali chiamati proteine Aux/IAA (Gray et al., 2001). Le proteine Aux/IAA sono repressori trascrizionali che agiscono tramite dimerizzazione con fattori di trascrizione auxin-responsive factors (ARF). I repressori trascrizionali Aux/IAA interagiscono con le proteine nella via di segnalazione dell'auxina attraverso una serie di domini proteici. In generale, gli Aux/IAA comprendono tre domini funzionali: un motivo EAR a ripetizione di leucina all'interno del dominio I (Kagale & Rozwadowski, 2011), un dominio interno II che contiene un motivo degron GWPP-core e una regione c-terminale che forma un dominio Phox e Bem1 (PB1) di tipo I/II (Guilfoyle, 2015). Il dominio PB1 facilita l'interazione con le proteine ARF e l'autodimerizzazione (Vernoux et al., 2011).

L'auxina promuove un'interazione tra le proteine TIR1/AFB e Aux/IAA: il legame dell'auxina alla subunità F-box (TIR1/AFB) dei complessi SCF TIR1/AFB, la loro affinità verso il dominio II delle proteine Aux/IAA migliora; l'auxina, così, agisce da "colla molecolare" unendo le due proteine. Questo legame innesca l'ubiquitinazione di Aux/IAA da parte dei complessi SCF (Fig.23) portando alla sua distruzione da parte del proteasoma 26S (Tan et al., 2007; Chapman & Estelle, 2009; dos Santos Maraschin et al., 2009). La degradazione del repressore rilascia l'attività trascrizionale degli ARF e verranno espressi i geni auxin-responsive.

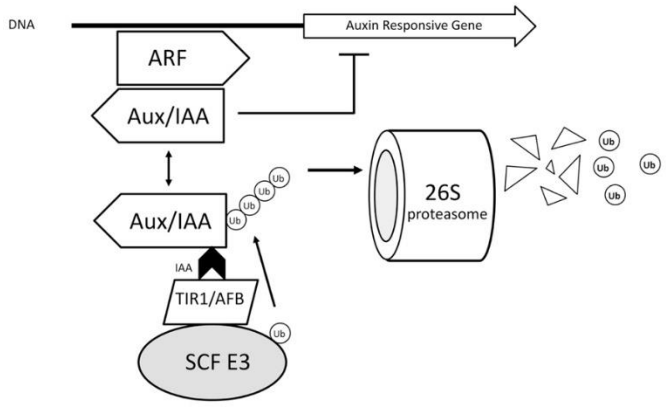



Fig.23 Meccanismo d'azione auxinico basato su TIR1 (Da Costa et al., 2013).

L'auxina colpisce tutti gli aspetti della crescita cellulare, compreso l'allungamento, la divisione cellulare e la differenziazione (Perrot-Rechenmann, 2010; Takatsuka & Umeda, 2014). L'auxina funziona innescando risposte trascrizionali a livello di genoma attraverso i suoi effetti sull'attività che ha su ARF. La figura sottostante (Fig.24) evidenzia come a bassi livelli di auxina, i repressori trascrizionali Aux/IAA interagiscono con gli ARF e reprimono la loro attività. Tuttavia, in presenza di auxina le proteine TIR1/AFB si legano ai repressori trascrizionali AUX/IAA e mediano la loro poliubiquitinazione e la successiva degradazione proteasomiale. I repressori trascrizionali Aux/IAA interagiscono con le proteine nella via di segnalazione dell'auxina attraverso una serie di domini proteici.

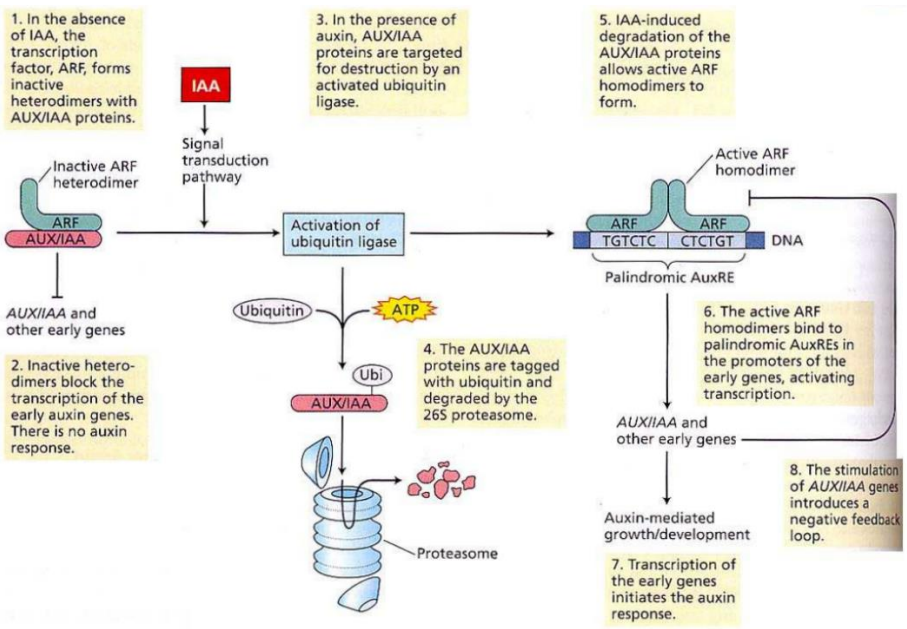



Fig.24 Meccanismo di segnalazione dell'auxina. Fonte: https://didattica-2000.archived.uniroma2.it/FIS_VEG/deposito/13auxina.pdf.

Tuttavia, oltre al meccanismo di segnalazione auxinico basato su TIR1, abbiamo anche la percezione di auxina mediata da ABP1. Si ritiene che le risposte rapide dell'auxina siano mediate da ABP1. L'auxina è percepita da ABP1 sulla superficie esterna della membrana plasmatica. Lo scenario attuale suggerisce che le proteine ABP1 e TIR1/AFB siano componenti di un meccanismo a due recettori per le risposte auxiniche (Scherer, 2011) con ABP1 che è un sensore precoce delle concentrazioni apoplastiche di auxina. ABP1 regola il trasporto di auxina e le risposte precoci, veloci, trascrizionali-indipendenti, di membrana e citosoliche, come l'acidificazione dell'apoplasto e l'allungamento precoce. TIR1/AFB sarebbero i recettori responsabili della percezione delle concentrazioni di auxina nucleare e citosolica, coinvolti in risposte evolutive successive a lungo termine, innescando risposte adattative trascrizionali all'ingresso del segnale generato dal trasporto di auxina regolato da ABP1 (Scherer, 2011). Attualmente, non è noto come ABP1 venga esportato nella membrana plasmatica (Da Costa et al., 2013).

## 5.3 Il trasporto auxinico

Il trasporto di auxina influenza una varietà di importanti processi di crescita e sviluppo nelle piante, tra cui la regolazione del germoglio e della ramificazione delle radici. Il trasporto intercellulare dell'auxina è cruciale per la maggior parte degli effetti noti dell'auxina. Il trasporto dell'auxina avviene attraverso due sistemi interconnessi (Fig.25): un flusso veloce non direzionale nel floema oppure in maniera polare, grazie a specifiche proteine di trasporto. Le proteine che mediano il trasporto polare dell'auxina appartengono a tre classi principali di trasportatori: i vettori di afflusso auxina permeasi 1 (AUX1)/LAX e due classi di portatori di efflusso, le proteine PIN e la superfamiglia proteica *ABCB* (ATP-BINDIND B) (Noh et al., 2001; Zhang et al., 2018; Jenness et al., 2019). All'interno delle cellule dei tessuti vegetali, il trasporto della molecola avviene tramite la generazione di un gradiente protonico prodotto dalle ATPasi di membrana. L'accumulo di protoni nell'apoplasto induce una riduzione del pH con conseguente protonazione delle molecole di IAA localizzate a livello extracellulare. L'ingresso

delle molecole di auxina protonate, è mediato dai trasportatori AUX/LAX IAA (Bennett et al., 1996; Péret et al., 2012), appartenenti alla famiglia delle acid/auxin permeasi (AAAP). Nell'ambiente intracellulare, la presenza di un pH superiore indurrà la perdita del protone nelle molecole di IAA. Gli ioni di IAA risultanti non saranno più in grado di attraversare la membrana plasmatica e verranno trasportati fuori nell'apoplasto grazie ai trasportatori per l'efflusso PIN-FORMED (PIN), appartenenti alla famiglia dei carriers per l'efflusso (AEC) a sua volta appartenente alla superfamiglia dei bile/arsenite/riboflavin transporter (BART) e dai trasportatori ATP-binding cassette type B (ABCB)/Pglyciprotein (PGP) (Chen et al., 2011; Han et al., 2021).

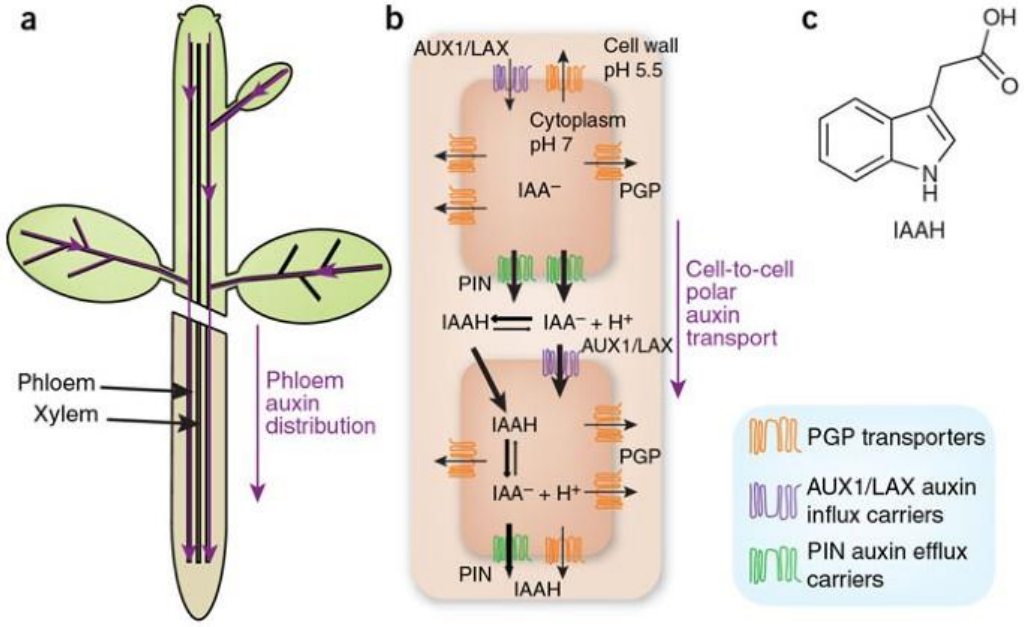



Fig.25 Il meccanismo di trasporto auxinico (Friml et al. 2009)

Il trasporto polare della principale auxina endogena IAA ha vettori specifici che consentono il flusso intercellulare di auxina. Negli steli, il trasporto è attivo e basipeto (dall'apice del germoglio alla base). Secondo il modello chemiosmotico (Raven, 1975), esiste un gradiente di pH tra il mezzo intra- ed extracellulare, generato dall'azione delle pompe protoniche nella membrana plasmatica, che guidano i protoni nell'apoplasto, rendendolo acido. Nell'apoplasto, l'IAA può essere trovato sia in forma anionica che protonata. La forma protonata è più lipofila e in grado di diffondersi facilmente attraverso la membrana plasmatica (Woodward & Bartel, 2005; Zažímalová et al., 2010). D'altra parte, la forma anionica manca di questa capacità e, affinché entri nella cellula, è necessaria l'azione di portatori di afflusso di auxina. Questi vettori sono proteine amminoacidiche permeasi simile della famiglia AUX1/LAX (Vieten et al., 2007). Queste proteine agiscono come portatori H/IAA e possono partecipare all'emergenza radicale laterale e allo sviluppo dei peli radicali (Vanneste & Friml, 2009). I membri della famiglia delle proteine PIN formed (PIN) sono coinvolti nell'efflusso dell'auxina e la loro distribuzione asimmetrica nelle cellule è fondamentale per il caratteristico trasporto polare lungo gli steli. La corretta localizzazione delle proteine PIN è determinata dal loro stato di fosforilazione, definito dall'equilibrio tra la proteina chinasi PID (PINOID) e la fosfatasi PP2A. Nel caso di primordi emergenti, l'espressione di PID viene attivata, trasformando la proteina PIN in una forma fosforilata, portando alla sua localizzazione apicale nella cellula. D'altra parte, nella maggior parte delle situazioni, PP2A è più attivo di PID, portando alla proteina PIN de-fosforilata, con conseguente

localizzazione basale nella cellula (Michniewicz et al., 2007). Il trasporto basipeto dell'auxina è influenzato anche dal rapporto di luce rosso/rosso lontano (R:FR) (Morelli & Ruberti, 2002). Alla luce del giorno aperto (alto R: FR), l'auxina si muove dal germoglio alla radice principalmente attraverso il cilindro centrale. Tuttavia, in condizioni di ombra (basso R: FR), è preferibile una nuova via, dagli strati cellulari esterni. Questa via alternativa è meno efficace e porta ad aumentare i livelli di auxina negli strati cellulari esterni al cilindro centrale nello stelo, migliorando l'allungamento cellulare in questo organo. Di conseguenza, meno auxina viene trasportata attraverso il sistema vascolare, diminuendo la differenziazione vascolare e il contenuto di auxina che raggiunge la radice.

Recenti scoperte hanno rivelato la funzione di una nuova famiglia di presunti trasportatori auxinici, i PIN-LIKES (Barbez et al., 2012; Feraru et al., 2012). Queste proteine sono considerate evolutivamente più vecchie delle proteine PIN e probabilmente hanno preceduto il trasporto di auxina PIN-dipendente (Feraru et al., 2012), ma sono simili ai membri della famiglia PIN e contengono anche il dominio di trasporto dell'auxina, che si prevede svolga questa funzione. Le proteine PILS sono localizzate nel reticolo endoplasmatico (ER) e sono coinvolte nel trasporto intracellulare di IAA libera dal citosol al reticolo endoplasmatico (Barbez et al., 2012; Feraru et al., 2012). Secondo questi risultati, l'attività della PILS promuove l'accumulo di auxina nel reticolo endoplasmatico aumentando i coniugati di auxina ammidica, riducendo i livelli di auxina libera. Questa azione potrebbe essere coinvolta in una regolazione di tipo compartimentato del metabolismo auxinico (Barbez et al., 2012).

È sempre più chiaro che il trasporto polare dell'auxina (PAT) è un meccanismo importante nelle piante, per cui l'auxina viene incanalata in specifici tessuti vegetali al fine di innescare o mantenere determinate risposte di sviluppo. L'effetto della sovrapproduzione o degradazione di auxina, almeno in alcuni tessuti come i cotiledoni embrionali e gli apici radicali in *Arabidopsis thaliana*, può, in larga misura, essere compensata da PAT (Weijers et al., 2005). Pertanto, la distribuzione complessiva dell'auxina nella pianta è determinata dagli effetti netti della biosintesi, del metabolismo e, del trasporto direzionale dell'auxina. L'auxina è l'unico tra gli ormoni vegetali ad essere trasportato in modo polare attraverso i tessuti vegetali. Esperimenti che utilizzano l'auxina marcata radioattivamente hanno mostrato che la traslocazione dell'auxina coinvolge due vie fisiologicamente distinte: in primo luogo, l'auxina viene traslocata rapidamente con il flusso di massa di altri metaboliti nel floema maturo e, in secondo luogo, viene trasportata dall'apice del germoglio da un molto più lento, dipendente dal vettore, trasporto polare da cellula a cellula. Una volta nel sistema polare di trasporto auxinico, due distinti meccanismi di trasporto controllano separatamente l'afflusso e l'efflusso cellulare. Sia l'afflusso che l'efflusso sono stati dimostrati indipendentemente nelle singole cellule vegetali e nei segmenti di tessuto. In confronto a IAA, l'altra importante auxina naturale, IBA, viene anch'essa trasportata in modo polare, che può essere disaccoppiata dal trasporto polare di IAA. L'IBA è più stabile dell'IAA e persiste più a lungo nei tessuti vegetali (De Klerk et al., 1999), essendo trasportata a livello basipeto negli ipocotili delle piantine (Rashotte et al., 2003), similmente all'IAA. Tuttavia, l'IBA non sembra essere trasportata nelle infiorescenze, a differenza dell'IAA (Rashotte et al., 2003). Le mutazioni che interessano il trasporto di IAA non hanno causato effetti significativi nel trasporto di IBA. Le differenze tra il trasporto IBA e IAA suggeriscono che IBA potrebbe utilizzare trasportatori distinti da quelli che caratterizzano lo spostamento di IAA (Strader & Bartel, 2011). È interessante che l'analogo sintetico, 1-NAA, pur essendo un eccellente substrato per l'efflusso cellulare, è solo scarsamente trasportato per afflusso. La mancanza di afflusso è

compensata dalla diffusione passiva di 1-NAA nelle cellule. Inibitori dell'efflusso di auxina come l'acido 1-N-naftilftalamico (NPA) e l'acido 2,3,5-triiodo benzoico (TIBA) sono stati utilizzati per più della metà di secolo per studiare lo sviluppo delle piante auxina-dipendente. L'uso di inibitori dell'efflusso di auxina ha facilitato la caratterizzazione fisiologica della PAT. D'altra parte, gli inibitori di afflusso di auxina come acido 1-naftossiacetico (1-NOA) e l'acido 3-cloro-4-idrossifenilacetico (CHPAA) è stato scoperto solo di recente. Pertanto, l'afflusso e l'efflusso cellulare contribuiscono alla distribuzione dell'auxina guidata da PAT e sono fondamentali per molti processi di sviluppo. I primi step di formazione delle radici avventizie riguardano il gradiente IAA e l'accumulo in cellule specifiche, attraverso il trasporto polare auxinico (PAT) e la biosintesi locale dell'auxina, coniugazione e degradazione. La biosintesi di IAA è essenziale per la formazione di radici avventizie e PAT gioca un ruolo chiave nella distribuzione di IAA e del gradiente. Ad esempio, una sovrapproduzione di IAA in Arabidopsis guida la formazione di radici avventizie nell'ipocotile. IAA è sintetizzato nel meristema e nei tessuti giovani. L'acido indol-3 acetico ha un trasporto basipeto dall'apice del germoglio. Questo tipo di trasporto è gravitropico-indipendente. Le auxine, principalmente nella forma di acido-3-indolacetico (IAA), sono dei regolatori della crescita negli organismi vegetali, svolgendo ruoli chiave nei principali processi legati alla crescita e allo sviluppo della pianta come organogenesi, dominanza apicale, induzione radicale e nella risposta a stress biotici e abiotici (Guilfoyle & Hagen, 2007; Mockaitis & Estelle, 2008; Su et al.,2015). Utilizzando inibitori del trasporto dell'auxina polare, varie indagini su talee o piantine sradicate hanno fornito prove di un contributo significativo di questo tipo di trasporto alla radicazione avventizia ( Nordström et al., 1991; Liu & Reid, 1992; Koukourikou-Petridou & Bangerth, 1997; Guerrero et al., 1999; Garrido et al., 2002; Nicolás et al., 2004). Pochi studi che analizzano l'espressione di geni che codificano per i portatori di auxina durante la rizogenesi avventizia sono stati condotti su talee di *Pinus contorta* (Brinker et al., 2004), piante di riso intatte (Xu et al., 2005), talee di garofano (del Rocio Oliveros-Valenzuela et al., 2008; Acosta et al., 2009) e segmenti di cotiledone di mango (Li et al., 2012). Gli studi con garofano e mango hanno mostrato la necessità di una maggiore espressione dei trasportatori di auxina e un aumento del trasporto di auxina polare durante la fase di induzione e formazione di radici avventizie. Il ruolo centrale dell'auxina nella regolazione di vari processi fisiologici della pianta ha indotto l'introduzione nelle pratiche colturali di prodotti contenenti auxine e composti auxinici naturali o sintetici, utilizzati, ad esempio, per indurre la radicazione avventizia nelle talee e negli espianti in vitro, per aumentare la produzione di frutti o per l'eliminazione di specie infestanti (Blakeslee et al., 2019).

I vettori di efflusso PIN sono ampiamente diffusi e caratterizzati in diverse specie vegetali. Nella pianta modello *Arabidopsis, i* portatori di afflusso ed efflusso sono codificati da piccole famiglie di geni composte rispettivamente da quattro geni AUX/LAX (Parry et al., 2001) e otto geni *PIN* (Friml et al., 2003). I vettori di efflusso PIN sono ampiamente diffusi e caratterizzati in diverse specie vegetali e assolvono a varie funzioni. Tra queste abbiamo lo sviluppo della radice e l'utilizzo di auxine esogene gioca un ruolo centrale nella formazione di radici avventizie per diverse specie vegetali. In Arabidopsis gli otto membri della famiglia PIN sono raggruppati in due sottoclassi in base alla lunghezza del loro dominio idrofilo centrale (Fig.26). PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 e PIN7 sono localizzati nella membrana plasmatica. Tuttavia, non risiedono staticamente nella membrana plasmatica ma costituiscono un ciclo tra la membrana plasmatica e i compartimenti endosomiali. I tre membri rimanenti della famiglia AtPIN mostrano un anello idrofilo centrale parzialmente (PIN6) o drasticamente ridotto (PIN5 e PIN8)

(Křeček et al., 2009). I PIN corti sembrano localizzarsi in larga misura nel reticolo endoplasmatico e, sebbene presumibilmente agiscano come trasportatori di auxina, non facilitano direttamente il trasporto di auxina tra le cellule, ma mediano la compartimentazione intracellulare dell'auxina e l'omeostasi (Mravec et al., 2005).

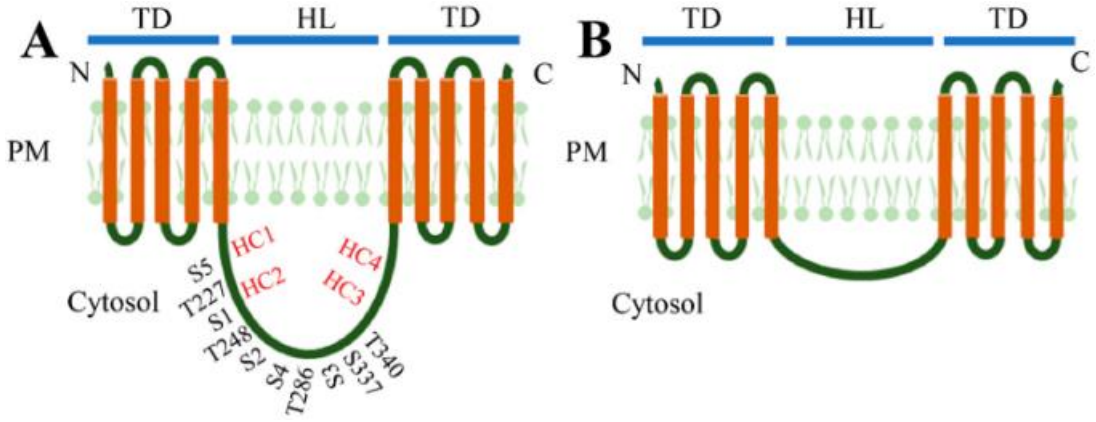



Fig.26 Struttura delle proteine PIN lunghe (A) e delle proteine PIN corte (B). Le proteine PIN ospitano un tipico ciclo idrofilo lungo centrale (HL) tra ammino- e carbossi-terminale termina con cinque domini transmembrana (TD) che si estendono sulla membrana plasmatica (PM) (Zhou et al., 2018).

Alcune di queste proteine svolgono funzione legate all'iniziazione e allo sviluppo delle radici, come nel caso di PIN1 (Xu et al., 2005), PIN3, PIN5 e PIN6 (Zhou et al., 2018). L'auxina, come l'acido indol-3 acetico (IAA) promuove la radicazione avventizia, e l'omeostasi dell'auxina è associata a differenti step di sviluppo dei processi di radicazione. La scoperta che i portatori di afflusso ed efflusso si distribuiscono all'interno della membrana plasmatica in modo asimmetrico fornisce prove dirette del modello chemiosmotico del trasporto polare dell'auxina, cioè l'auxina si muove seguendo i gradienti elettrochimici (Galweiler et al. 1998; Swarup et al. 2001). Una caratteristica dell'auxina è il suo complesso trasporto inter- e intracellulare, che dà luogo a variazioni spaziotemporali nelle concentrazioni di auxina e, di conseguenza, alla segnalazione dell'auxina che governa molti aspetti dello sviluppo delle piante.

Friml et al. (2003) hanno dimostrato elegantemente che bloccare la formazione dei massimi di auxina durante l'embriogenesi utilizzando approcci mutazionali o farmacologici interrompe i processi chiave di patterning come la specifica della cellula apicale e dei suoi derivati. Al contrario, Reinhardt et al. (2003) hanno mostrato che l'aggiunta ectopica di auxina esogena è in grado di ripristinare la formazione del meristema fogliare e floreale nei tessuti aerei che non sono in grado di modellare la loro auxina endogena. Gli studi di Friml et al. (2003), Benkovà et al. (2003), Reinhardt et al. (2003) hanno dimostrato definitivamente che il trasporto di auxina svolge un ruolo chiave nella mobilizzazione dell'auxina durante i processi organogenici embrionali, radicali e di germoglio.

# SECONDA PARTE-PIANO SPERIMENTALE

## 1. Obiettivo del progetto di tesi

La riproduzione vegetativa o clonale è uno dei metodi di moltiplicazione più utilizzati per la produzione commerciale di molte colture arboree, da frutto e forestali, orticole e floreali. Oltre il 70% dei sistemi di propagazione utilizzate nelle industrie della frutticoltura dipende dal successo della radicazione delle talee. Ad esempio, le grandi industrie floricole internazionali si affidano esclusivamente alla propagazione asessuata per talea (Joiner, 1986). La radicazione avventizia è un paradigma dello scostamento dello svolgimento regolare dell'attività morfo-fisiologica. Una porzione di stelo, quando integrata nell'organo della pianta, svolge una funziona coerente e coordinata con il suo stato, ma in seguito all'asportazione il flusso regolare dell'informazione genica cambia repentinamente. In Italia, il patrimonio olivicolo è vastissimo, dato che l'olivo caratterizza i paesaggi mediterranei sia con *Olea europea* var. *sylvestris* che con *Olea europea* var. *sativa.* Tra i metodi di propagazione in olivo, quello della radicazione avventizia è il più utilizzato e, data l'importanza degli ormoni per la propagazione vegetativa, l'auxina è uno degli ormoni utilizzati come induttori del processo di radicazione avventizia. L'auxina promuove la radicazione avventizia attraverso una rete di segnalazione che coinvolge fattori di risposta dell'auxina (ARF) e altri ormoni vegetali, che possono anche fungere da inibitori della radicazione avventizia. L'auxina stimola la mobilitazione dei carboidrati nelle foglie e nello stelo, aumentando la traslocazione degli assimilati verso la zona delle radici. L'utilizzo dell'auxina per stimolare la radicazione e migliorare l'induzione radicale nelle talee ha portato a nuovi prodotti e industrie orticole. Tuttavia, la propagazione per talea è caratterizzata da una grande eterogeneità nei tassi di riuscita, data da una variabilità naturale alla rizogenesi delle diverse varietà che caratterizzano il nostro patrimonio olivicolo e dalle condizioni ambientali.

L'obiettivo del progetto di tesi è quello di individuare se nel periodo idoneo al prelievo delle talee, correlato al momento di più elevata capacità rizogena (alta competenza) considerando parametri morfo-fisiologici e studi molecolari. Gli studi morfo-fisiologici hanno previsto la preparazione di talee per ogni varietà oggetto di studio (Leccino e Salviana) e per ogni tessuto (ramo fruttifero e succhione). Le talee sono state preparate e trattate con IBA, un'auxina promotore del processo di radicazione avventizia e a questo studio sono stati associati i dati molecolari. Gli studi molecolari sono stati effettuati in vivo su campioni prelevati nell'arco temporale ottobre-maggio, per verificare se nelle cultivars di Leccino e Salviana, nei rami fruttiferi e nei succhioni, esistesse una predisposizione ontogenica alla radicazione avventizia, ossia se la pianta predisponesse i suoi organi aerei alla competenza. I geni oggetto di analisi sono i fattori di trascrizione nella risposta all'auxina (ARF); in particolare, è stato studiato l'espressione del gene *ARF8*, promotore della radicazione avventizia e di *ARF17*, inibitore dell'auxina e quindi regolatore negativo della radicazione avventizia. Questi due fattori di trascrizione sono coinvolti nei processi di iniziazione del processo di radicazione avventizia, dove si ha la formazione della *cell fondation* e lo sviluppo della struttura della radice. Visto il ruolo dell'auxina nel promuovere i processi di radicazione, si è analizzata l'espressione genica delle proteine di efflusso *PIN1a*, *PIN5a* e *PIN8* e della proteina di influsso *AUX1*. Diversi studi hanno inoltre dimostrato il ruolo dei carboidrati nel favorire la radicazione, per cui un altro gene oggetto di studio è la β-amilasi *BAM1* coinvolta nella scissione dell'amido. Couvillon (1988), e Kim & Yoo,

(1996) hanno evidenziato come il contenuto di carboidrati sia maggiore nelle cultivar facili da radicare che in quelle difficili da radicare. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS), infine, possono alterare il trasporto direzionale dell'auxina, inducendo enzimi coniuganti l'auxina o bloccando la trascrizione di geni responsivi all'auxina; pertanto, AOX*2*, il gene studiato in questo piano sperimentale, è un'ossidasi alternativa che potrebbe essere coinvolta nei processi di radicazione avventizia.

# 2. MATERIALI E METODI

## 2.1 Materiale oggetto di studio

Le analisi sono state eseguite presso il "Laboratorio di Eco-Fisiologia molecolare delle piante arboree" dell'Università degli Studi della Tuscia e i campionamenti sono stati eseguiti nel campo collezione posto nell'Azienda Dimostrativa Sperimentale dell'ARSIAL di Montopoli in Sabina, dove sono stati campionati fusticini e foglie dalle varietà Salviana, Salvia e Leccino (Fig.27), rispettivamente succhione e ramo fruttifero. Leccino, rispetto a Salvia e Salviana, presenta una minore capacità rizogena, indipendentemente dal trattamento e dal periodo di prelievo delle marze. I campioni sono stati preparati subito con azoto liquido e conservati a -80°C per le successive estrazioni al fine di studiarne l'espressione genica.

Fig.27 Cv Leccino nella collezione dell'Azienda Dimostrativa Sperimentale dell'ARSIAL di Montopoli Sabina.

## 2.2 Piano colturale dell'allevamento oggetto di campionamenti

La messa a dimora delle piantine di 16 – 18 mesi, tutte propagate per talea è stata effettuata nel mese di marzo del 1990, preceduta da una operazione di rippatura incrociata ad una profondità media di circa 1 metro e da una aratura per interramento concimazione organica (circa 600 q/ha di letame maturo) e q.li di perfosfato triplo e 2 q.li di solfato di potassio. Il sesto di impianto è 6 metri x 6 metri. La forma di allevamento delle piante è a monocono. La pianta, con questa forma di allevamento, si sviluppa in verticale, con un fusto centrale, che raggiunge un'altezza massima di 5 metri, su cui sono inserite le branche secondarie in ordine decrescente, riducendo la loro ampiezza verso l'esterno dal basso verso l'alto. La cima risulta quindi alleggerita in modo da non ombreggiare la parte sottostante. Questa forma è adatta alla raccolta meccanica.

I parassiti maggiormente presenti sono:

- La *Palpita unionalis*, conosciuta come Margaronia dell'Olivo o Piralide dell'Olivo, che attacca i germogli, i rami in allungamento e le nuove foglie che, a prima vista, sembrano "mangiucchiate", mentre le vecchie foglie risultano perfettamente sane; le lesioni sono quindi localizzate sull'apice vegetativo e non diffuse su tutta la pianta;

- La *Prays oleae*, ovvero la Tignola dell'olivo, i cui danni variano a seconda della generazione che li compie e a seconda dell'infestazione, ma, in linea generale, vanno a danneggiare sia i fiori, che le foglie e i frutti;

- La *Dasineura oleae*, conosciuta come Cicedomia, che penetrano nei tessuti delle foglie, inducono l'anomala crescita dei tessuti vegetali e la formazione della galla. Il tutto si traduce nella riduzione della capacità fotosintetica, di traslocazione dei fotosintetati e, di conseguenza, un calo della produzione;

- La *Bactrocera oleae*, o Mosca olearia (Fig.28), i cui danni, essendo un lepidottero, sono provocati maggiormente dalle larve che si nutrono della polpa ed espongono la drupa ad attacchi di microrganismi e batteri, portando alla cascola delle stesse. Inoltre, la puntura dell'ovideposizione, può essere vettore di altre numerose patologie, come, ad esempio, la rogna dell'olivo.

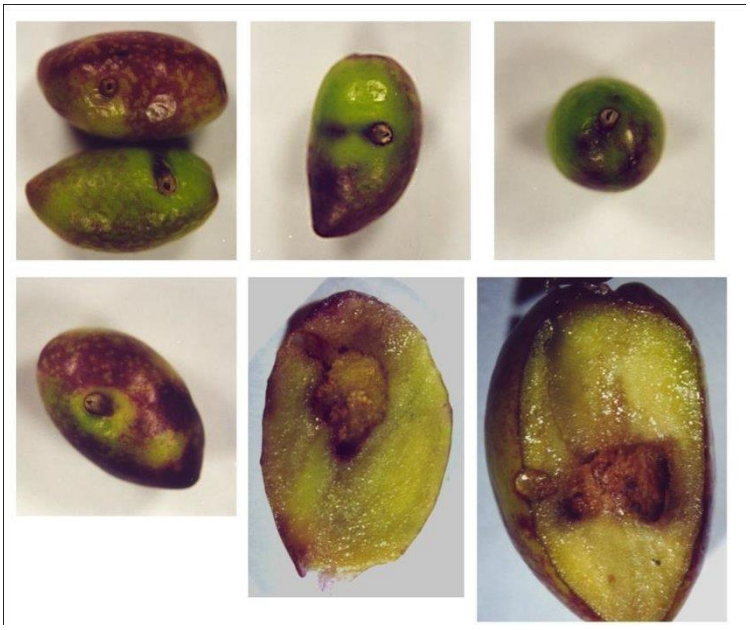


Fig.28 Bactrocera oleae in drupa di olivo (Ochando et al., 2010)

Per il controllo della *Bactrocera Oleae* , a partire dal mese di luglio si posizionano le trappole sessuali per il monitoraggio del volo del parassita e si effettuano trattamenti preventivi attraverso l'uso di Farina di Basalto (agosto) e di Manisol (entro la metà di Settembre; sono prodotti a duplice funzione che oltre a costituire un importante apporto di rame (Manisol) per le esigenze nutrizionali della pianta, rappresenta un'efficace protezione nei confronti dei colpi di calore e delle bruciature causate dalle radiazioni solari e ostacola la deposizione della mosca dell'olivo. Per quanto riguarda il controllo, soprattutto del Cicloconio (occhio di pavone) si effettuano annualmente tre trattamenti a base di rame, il primo con solfato di rame (dopo la potatura), il secondo e terzo con Ossicloruro di rame (settembre e dopo la raccolta). Oltre alla concimazione di fondo, per i primi 3 anni è stata effettuata una concimazione azotata localizzata, dal quarto in poi sono state distribuite circa 100 UF/Ha di azoto. Per quanto riguarda la gestione del terreno vengono effettuate annualmente circa 3 - 4 trinciature con le quali si

controllano le erbe infestanti nonché i residui della potatura. La potatura effettuata esclusivamente da terra (salvo qualche eccezione per piante "scappate" in alto), così come la raccolta, vengono effettuate manualmente; nel caso della seconda, vengono utilizzate delle attrezzature agevolatrici (pettini) e, nell'anno preso in esame 2020/2021, è stata effettuata a metà di ottobre, di solito viene anticipata di qualche giorno per prevenire attacchi tardivi della mosca dell'olivo e conseguente perdita di produzione sia a livello quantitativo ma soprattutto qualitativo, le olive vengono conservate in casse forate e trasferite in bins per il trasporto al frantoio, le operazioni di molitura vengono effettuate entro 24 – 48 ore dalla raccolta.

## 2.3 Analisi molecolare

Lo studio dell'espressione genica è stato eseguito utilizzando un pool di campioni da cui sono stati ottenuti due repliche biologiche per ogni tempo di campionamento. I campioni sono stati preparati subito dopo il prelievo mantenendo la catena del freddo e con l'utilizzo di mortaio e pestello si è andati a pestellare i campioni oggetto di studio con l'aiuto di azoto liquido. Al fine di studiare l'espressione genica, ho estratto l'RNA dai campioni di fusto e foglia di ogni varietà e tessuto, ho eseguito le procedure di purificazione per eliminare il DNA presente e ho retrotrascritto a cDNA per studiare l'espressione genica di geni coinvolti nella radicazione avventizia e l'andamento auxinico delle tre varietà di olivo in diversi periodi dell'anno.

### 2.3.1 Estrazione RNA

In ogni estrazione è stato utilizzato il protocollo di estrazione CTAB e la qualità dell'estrazione è stata valutata in elettroforesi su gel d'agarosio al 2%. Il bagnetto e il CTAB favoriscono la rottura delle membrane cellulari, visto che il CTAB è un detergente. Il cloroformio isoamilico è un solvente organico che elimina gran parte delle proteine e dei pigmenti (tra cui la clorofilla). Si aggiunge isopropanolo per far avvenire la precipitazione del DNA: l'alcool, rispetto al DNA, è più affine all'acqua, per cui l'acqua che circonda il DNA mantenendolo in soluzione viene sequestrata dall'alcool e il DNA, non più idratato e non essendo solubile in acqua, precipita sul fondo della provetta.

Il protocollo di estrazione è quello descritto da *Muleo et al. (2009)*

- Recuperare i campioni al -80°C
- Pesare circa 0,4 g di materiale vegetale (fresco o congelato)
- Raffreddare il mortaio con azoto liquido
- Preparare in una falcon 4 mL di buffer CTAB, costituito da TrisHCl 100 mM pH 8,0, 20 mM EDTA pH 8,0, 1,4 M NaCl, CTAB 3% w/v
- Porre il materiale vegetale in un mortaio con una spatolata di PVP-40
- Aggiungere azoto liquido e triturare con pestello per ottenere una polvere fine
- Versare il buffer nel mortaio
- Favorire congelamento e scongelamento

- Trasferire materiale liquido in una falcon da 15 mL e aggiungere 4,48 μL di β-mercaptoetanolo
- Vortexare un minuto
- Incubare in bagnetto a 60°C per 15 minuti, invertendo ogni 5 minuti
- Trasferire 1 mL in eppendorf da 2 mL ed aggiungere 1 mL di cloroformio isoamilico ed invertire bene
- Centrifugare a 10000 rpm per 10 minuti a 4°C
- Trasferire il surnatante in eppendorf da 2 ml ed aggiungere uguale volume di cloroformio isoamilico ed invertire bene
- Centrifugare 10000 rpm per 10 minuti a 4°C
- Trasferire il surnatante in eppendorf da 1.5 ml ed aggiungere 1/10 del volume dell'acetato di sodio e 1 volume di isopropanolo
- Incubare a -20°C per un'ora e mezza
- Centrifugare ai massimi rpm per 20 minuti a 4°C
- Eliminare il surnatante ponendo attenzione a conservare il pellet
- Aggiungere EtOH 70% (in base alla quantità di isopropanolo e di surnatante) dal freezer
- Centrifugare ai massimi rpm per 10 minuti a 4°C
- Eliminare totalmente l'etanolo, lasciare asciugare e risospendere il campione in 50 μl di $H_2O$ sterile
- Conservare a -80°C

La qualità dell'RNA estratto è stata valutata mediante elettroforesi su gel d'agarosio. Questa tecnica permette di visualizzare gli acidi nucleici che si muovono lungo le maglie del gel e per fare questo la composizione del gel d'agarosio è al 2% in tampone TBE. Il protocollo per la preparazione del gel d'agarosio è il seguente:

- Aggiungere 0,6 g di polvere d'agarosio in 35 mL di TBE
- Riscaldare la soluzione fino al raggiungimento del punto di ebollizione per favorire la solubilizzazione dell'agarosio
- Raffreddare fino al raggiungimento di una temperatura di 40°C e aggiungere 2,5 μl di Bromuro di Etidio
- Versare la soluzione nell'apposito contenitore e attendere la solidificazione del gel

I campioni sono stati caricati su gel aggiungendo per il marker 2,5 μL di DNA molecular weight marker VIII 0,019-1,11 kbp, 3 μL di loading dye e 3 μL di $H_2O$, mentre per i campioni sono stati aggiunti 2 μL di loading dye, 3 μL di $H_2O$ e 5 μL di DNA. La corsa è avvenuta a 80V per 45 minuti e successivamente il gel è stato visualizzato sotto la lampada a UV-B (Fig.29).

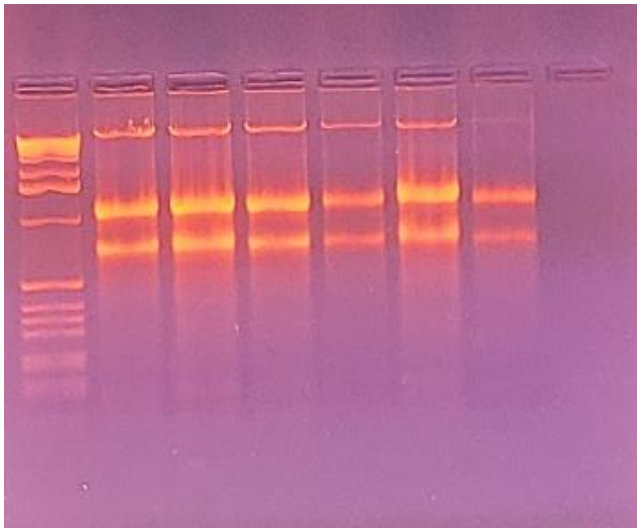


Fig.29 Elettroforesi su campioni d'estrazione da Salviana ramo fruttifero e succhione

### 2.3.2 Purificazione

La purificazione ha l'obiettivo di rimuovere tutto il DNA presente nei campioni ottenuti dai processi di estrazione. La DNasi è un'endonucleasi che digerisce il DNA a singola e doppia elica, idrolizzando i legami fosfodiesterici che producono mono e oligodeossiribonucleotidi con gruppi 5'-fosfato e 3'OH. L'attività enzimatica è strettamente dipendente da $Ca^{2}+$ ed è attivata da ioni magnesio. In presenza di ioni magnesio, la DNasi I scinde ciascun filamento double strand del DNA in modo casuale. Il protocollo utilizzato, presente all'interno del kit Thermoscientific DNase I-RNase-free, è il seguente:

- Inserire 16 µL di campione d'estrazione in una eppendorf da 1,5 mL.
- Aggiungere 2 µL di 10X buffer con $MgCl_2$ in ogni campione
- Aggiungere 2 µL di DNasi in ogni campione
- Incubare a 37°C per 30 minuti
- Aggiungere 1 µL 50 mM EDTA e incubare a 65°C per 10 minuti
- Conservare i campioni a -80°C

Per confermare l'efficacia del processo di purificazione è stata eseguita una corsa su gel d'agarosio (Fig.30), utilizzando lo stesso protocollo dell'analisi post-estrazione.

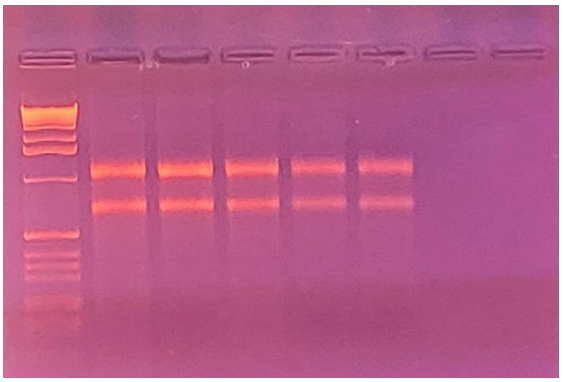


Fig.30 Elettroforesi di conferma della corretta purificazione dei campioni estratti e purificati.

### 2.3.3 Quantificazione

La quantificazione dell'RNA presente nei campioni è stata eseguita utilizzando il Multiskan SkyHigh UV/Visible microplate spectrophotometer (Thermofisher), utilizzando 2 µL di campione come indicato dallo strumento. Una volta quantizzati, ho portato tutti i campioni ad una concentrazione di 200 µl.

### 2.3.4 Retrotrascrizione

Il processo di retrotrascrizione permette di sintetizzare una molecola di cDNA (DNA complementare) a partire da una molecola di RNA. La trascrittasi inversa è una DNA polimerasi che utilizza come filamento stampo una molecola di RNA per sintetizzare una molecola di DNA. Il cDNA è una molecola più stabile e meno sensibile alla degradazione. Inoltre, il cDNA di un gene si differenzia da esso perché privo di introni, che sono stati rimossi durante la maturazione del pre-mRNA in mRNA. La trascrittasi inversa ha bisogno, oltre all'RNA stampo, di dNTPs (deossiribonucleotidi trifosfati), primer, una soluzione tampone e magnesio. I primer rappresentano l'innesco per l'enzima e legano le sequenze complementari del filamento di RNA, poi l'enzima estende le sequenze andando a formare il DNA complementare.

Il protocollo di retrotrascrizione utilizzato è il seguente:

- Scongelare in ghiaccio yourSIAL cDNA Synthesis Mix 5x ed agitare qualche secondo
- Preparare la mastermix aggiungendo per ogni campione
  - 4 µL di cDNA Synthesis Mix 5x
  - 1 µL di RTasi 20x
  - RNA totale (compreso tra 4,.0 pg e 0,4 µg)
  - H2O fino a 20 µL
- Incubare la mix a 42°C per 30 minuti

- Incubare a 85°C per 10 minuti per denaturare la RTasi
- Il cDNA ottenuto può essere utilizzato direttamente per le reazioni di PCR oppure può essere conservato a -20°C

Il cDNA Synthesis Mix 5x contiene primer oligo(dT)-ancora ed esameri random ad una concentrazione ottimizzata, 15 mM di $MgCl_2$, 5 mM di dNTPs, enhancers e stabilizzatori. Il cDNA ottenuto è stato quantizzato con lo strumento Multiskan SkyHigh UV/Visible microplate spectrophotometer (Thermofisher). I cDNA ottenuti sono stati conservati a -20°C. In seguito, sono state eseguite delle analisi PCR, per testare le coppie di primers relative ad ogni singolo gene, al fine di ottenere un unico amplicone. Dopo questo passaggio, effettuato con il termociclatore MJ Research PTC-150 Thermal Cycler, si può procedere all'analisi dell'espressione genica. Le coppie di primers utilizzate sono le seguenti:

| Gene | Primer forward (Fw) | Primer reverse (Rv) | Bp cDNA | T(°C) melting |
|---|---|---|---|---|
| PIN1a | TATGAGAAGGGCAGT AGAAGATTAGAGCAT | GGGCCAATGAATTCCG TTTC | 86 | Fw:64 Rv: 57.3 |
| PIN1c | GGCTATGAATGTGATG TGTCGAT | TTTCGGTGTCCAAGTCT TTGA | 64 | Fw: 58.9 Rv: 55.9 |
| PIN3a | TTTGGAATGTTGATTG CATTG | TTCAACGAAGCGTCAC AATC | 128 | Fw: 52 Rv: 55.3 |
| PIN5a | CGTCATTTTAGATAGT ATCCATTGATGT | TTTATACTGGAAAGTC CTAGTCAGCA | 53 | Fw: 59.3 Rv: 60.1 |
| PIN8 | GCCAATTGCATTAGCC TACTACTTC | GCACGAGATGAATCTT GTGTTATCA | 73 | Fw: 61.3 Rv: 59.7 |
| ARF8 | TGCAGCAGAGAGTTGA TCCA | GCAAATCTCCGCTTCC ACAA | 102 | Fw: 59.02 Rv: 59.12 |
| ARF17 | GCGTTAAGATGGCTGT GGAG | TCCCACATCACCTCAA GCAT | 133 | Fw: 58.99 Rv: 59.01 |
| BAM1 | TGCCACGATATGATGA CTACGC | TCAGGTTGGAACAAAT CCGGGTTC | 132 | Fw: 60.3 Rv: 62.7 |
| AUX1 | CAGTGCAAGCCTCCAA TACC | CAAAGAAGTGTGACCC TCTCG | 109 | Fw: 59.4 Rv: 59.8 |
| AOX2 | AGCTCCGGTTGGTTAC CACTA | CAGGCATAAGTAAGTG GCATGTT | 115 | Fw: 59.8 Rv: 58.9 |
| EF1A | CCTCTTGGACGATTTG CTGT | CCTGTTGGCTCCTTCTT GTC | 85 | Fw: 57.3 Rv: 59.4 |
| FT1 | CTAGGGTTGAAATTGG TGGTGAT | TGCAAGTATTCTCTGA GGCTAGAC | 113 | Fw: 58.1 Rv: 59.6 |

Le reazioni di PCR sono state eseguite utilizzando il protocollo EURX con i seguenti quantitativi:

- Inserire 35,5 μL di $H_2O$
- Inserire 5 μL di Buffer A
- Inserire 3 μL di $MgCl_2$
- Inserire 1 μL di d NTP mix 10mM (dATP, dGTP, dCTP and dTTP pH neutro)

- Inserire 1 μL di primer forward e 1 μL di primer reverse 10 μM
- Inserire 0,5 μL di Taq polimerasi
- Inserire 3 μL di cDNA diluito 1:10

Le condizioni di reazione utilizzate sono:

- 95°C per 4 minuti

  35 cicli:

  - 95°C per 30 secondi
  - 58°C per 45 secondi
  - 72°C per 30 secondi
- 72°C gradi per 7 minuti
- 4°C in continuo

I singoli prodotti di PCR sono stati visualizzati tramite elettroforesi su gel d'agarosio con lo stesso protocollo utilizzato per le analisi di post-estrazione e purificazione e quantificati con analisi spettrofotometrica con strumento Multiskan SkyHigh UV/Visible microplate spectrophotometer (Thermofisher).

### 2.3.5 PCR Real time

Il cDNA è stato amplificato con il termociclatore LC480II® (Roche, Italia), analizzando due repliche biologiche per tre repliche tecniche per ogni campione. I cDNA, precedentemente quantizzati, sono stati portati tutti alla concentrazione finale di 10 ng/μL in un volume finale di 200 μL, seguendo la proporzione:

$$Concentrazione\ iniziale\ (ng/\mu L): Volume\ iniziale(\mu L) = Concentrazione\ finale(ng/\mu L): Volume\ finale(\mu L)$$

Ogni reazione (10 μL) conteneva 5 μL di LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche), 0,3 μM di ogni primer, 4,4 μL di cDNA (concentrazione 10 ng/μL). Il SYBR Green è un'intercalante fluorescente del DNA. La fluorescenza del SYBR Green aumenta considerevolmente nel momento in cui la molecola si intercala nel solco minore del DNA a doppio filamento. Il dato quantitativo della fluorescenza emessa è direttamente proporzionale alla quantità di DNA a doppio filamento presente in ogni campione (che è, a sua volta, proporzionale alla quantità di DNA presente nel campione iniziale), a patto che la molecola intercalante sia presente in eccesso. La lettura della fluorescenza avviene al termine di ogni ciclo di amplificazione. Le condizioni di reazione utilizzate per la Real time sono:

- Pre-incubazione: 95°C per 5 minuti

- Amplificazione per 40 cicli:
  - 95°C per 10 secondi
  - 58-61°C (in base alla coppia di primers utilizzata) per 20 secondi
  - 72°C per 30 secondi
- Melting curve
  - 95°C per 5 secondi
  - 65-97°C con incremento di 1°C ogni minuto

Al termine della PCR, per valutare la presenza di un unico amplicone è stata analizzata la curva di dissociazione di ogni amplificato dove è stato osservato un solo picco per ogni reazione.

L'abbondanza relativa è stata quantificata utilizzando il metodo "Standard curve" (Livak and Schmittgen, 2001) e il trascritto del gene *Elongation Factor* (EF) è stato usato come reference gene per la normalizzazione dei risultati. L'efficienza della PCR è stata stimata utilizzando sei punti per la creazione di una retta di taratura costruita con diluizioni seriali (10 volte) di templato. Dopo aver quantizzato ho portato i campioni alla concentrazione di 1 ng/µL e ho fatto le successive diluizioni (100pg, 10pg, 1pg, 100fg, 10 fg e 1fg) (Fig.31).

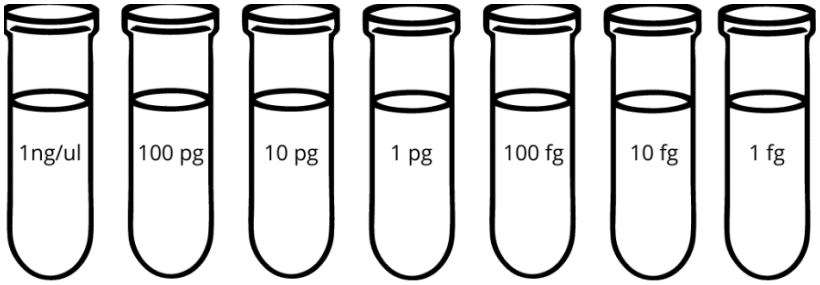



Fig.31 Diluizioni seriali campioni per retta di taratura: 100pg (145 µL $H_2O$ sterile e 5 µl di campione 1 ng/µl), 10 pg (135 µl di $H_2O$ sterile e 15 µl di campione alla concentrazione di 100 pg), 1 pg (135 µl di H2O sterile e 15 µl di campione alla concentrazione di 10 pg), 100 fg (135 µl di H2O sterile e 15 µl di campione alla concentrazione di 1 pg), 10 fg (135 µl di H2O sterile e 15 µl di campione alla concentrazione di 100 fg), 1 fg (135 µl di H2O sterile e 15 µl di campione alla concentrazione di 10 fg).

La retta di taratura (Fig.32) permette di determinare la concentrazione di un campione incognito per interpolazione. Per interpretare i dati sperimentali è necessario che vi sia una relazione lineare tra la concentrazione e la risposta dello strumento. Detta **x** la concentrazione dell'analita e della **y** la risposta dello strumento è necessario ottenere una retta di equazione y=mx+n essendo m il coefficiente angolare e n l'intercetta. A tale scopo si preparano soluzioni a concentrazione nota e si riportano i risultati su Excel.

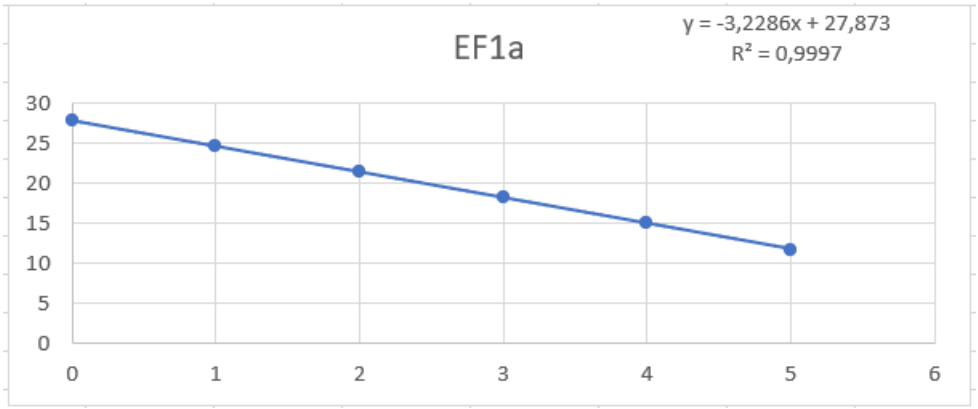



Fig.32 Retta di taratura del gene *EF1a*, utilizzato come gene reference per lo studio dell'espressione genica.

## 2.4 Studi di routine (formazione radici avventizie)

Il 15 marzo 2022 sono state preparate settantacinque talee per ogni varietà oggetto di studio (Leccino, Salvia e Salviana) e per ogni tessuto (succhione e ramo fruttifero). L'utilizzo dell'ormone IBA (acido indolbutirrico-fitormone) per la preparazione delle talee, alla concentrazione di 2000 ppm, favorisce la radicazione. Le talee sono state riunite in mazzi di un certo numero, facendo in modo che le basi si trovino alla stessa altezza, ed immerse nel formulato contenente l'auxina. Questa operazione deve essere eseguita a temperatura ambiente e lontano dalla luce diretta del sole. Dopo il trattamento auxinico, le talee sono state infisse nel substrato di radicazione, ad una profondità di circa 5-10 cm e ad una distanza di 3-4 cm per garantire l'illuminazione delle foglie. Questi studi di routine sono stanti effettuati per confermare le precedenti prove effettuate ad aprile 2021 e il 30 settembre 2021, dove è stato dimostrato che Salviana presenta una maggiore capacità rizogena, a prescindere dal trattamento e dal periodo di prelievo delle marze.

## 2.5 Analisi istologiche

Subito dopo il campionamento, le porzioni basali delle talee sono state immerse e conservate in una soluzione alcolica al 70% per preservare le cellule in crescita dalla degradazione. I campioni, congelati con una cella di Peltier, sono stati tagliati con microtomi rotanti per ottenere sezioni di 10-15 mm di spessore. Le sezioni sono state colorate con safranina (1% in acqua) e soluzione di Lugol, quindi fissate su vetrini da microscopio. Successivamente, ogni microsezione è stata esaminata con un microscopio ottico Nikon Eclipse E800 collegato ad una fotocamera per microscopio Nikon DS-Fi2 (Nikon Corporation, Tokyo). La safranina colora in rosso la lignina, evidenziando così le pareti cellulari lignificate (per lo più secondarie), mentre il Lugol evidenzia l'amido.

## 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Il processo che porta alla formazione delle radici avventizie è suddiviso in quattro stadi principali, ognuno caratterizzato da specifici eventi morfologici e molecolari (Li et al., 2009b). L'espressione di geni candidati alla radicazione avventizia è stata valutata in due organi, fusto e foglia, e nei tessuti di due stadi differenti dello sviluppo di un ramo: quello giovanile, detto succhione, e quello adulto che è in grado di fiorire, detto ramo fruttifero.

### 3.1 Analisi morfologiche

I dati morfologici (Fig.33) ottenuti dalle talee di olivo delle cvs Leccino e Salviana mostrano una percentuale di radicazione maggiore nella cv. Salviana. Tuttavia, a livello di tessuto si sono riscontrate delle differenze tra le due varietà: in Leccino la percentuale di radicazione è maggiore in succhione, mentre in Salviana è maggiore nel ramo fruttifero. Le talee di ciascuna varietà e tessuto sono state trattate con IBA e per estrapolare i dati è stata pulita ciascuna talea per misurare la percentuale di radicazione, di germogliamento, il numero e la lunghezza delle radici (cm).

| | SETTEMBRE 2021 | | | | MARZO 2022 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | % radicazione | Numero radici | Lunghezza radici | % germogliamento | % radicazione | Numero radici | Lunghezza radici | % germogliamento |
| **Leccino fruttifero** | 43% | 2 ± 1 | 5,78 ± 4,13 | 0% | 24% | n.d. | n.d. | 0% |
| **Leccino succhione** | 74% | 7 ± 3 | 12,99 ± 4,71 | 33% | 34% | n.d. | n.d. | 13% |
| **Salviana fruttifero** | 84% | 4 ± 2 | 12,27 ± 6,15 | 48% | 71% | n.d. | n.d. | 36% |
| **Salviana succhione** | 76% | 4 ± 1 | 8,95 ± 3,86 | 91% | 91% | n.d. | n.d. | 26% |

Fig.33 Analisi morfologiche degli eventi di radicazione avventizia nelle due cultivar oggetto di studio, Leccino e Salviana. I valori rappresentano le medie ± la deviazione standard

L'immagine sottostante (Fig.34) mostra una talea radicata e non radicata della cv. Salviana. La rizogenesi aumenta, in generale, con l'aumentare della concentrazione dell'auxina; tuttavia, sopra il valore ottimale può provocare un effetto tossico con conseguente riduzione della rizogenesi. Tutte le talee sono state trattate allo stesso modo, ed alla stessa concentrazione di IBA, per rendere omogeneo l'assorbimento del formulato utilizzato, al fine di evidenziare differenze nelle attitudini a radicare. Il trattamento basale con l'auxina è il metodo più appropriato e la sua efficacia è data dal fatto che il principio attivo, somministrato nei tessuti dai quali si differenziano le radici, esplica una maggiore azione rizogena, stimolata dalla auxina esogena.

Fig.34 Talea non radicata e radicata della cv. Salviana del mese di marzo 2022. La concentrazione di auxina alla quale le talee sono state esposte è di 2000 ppm per sei secondi.

## 3.2 Analisi molecolari

Dopo aver estratto l'RNA dai campioni di fusto e foglia (ramo fruttifero e succhione), averlo purificato e retro-trascritto sono state eseguite le reazioni di amplificazione PCR-Real time, studiando l'espressione dei geni: *ARF8* e *ARF17*, *PIN1a*, *PIN5a*, *PIN8*, *AUX1, BAM1*, *AOX2*.

### 3.2.1 Gene *ARF8*

Fig.35 Struttura del gene *ARF8* di *Olea europaea subsp. europaea*. La struttura evidenzia la presenza di 14 esoni (rettangoli blu) e di 13 introni (grigio) e le regioni 3' d 5'-UTR (a lato).

Il gene *ARF8* (Fig.35) è un fattore di trascrizione che promuove gli eventi di radicazione avventizia, andando ad attivare geni di risposta all'auxina. I livelli di espressione del gene *ARF8* sono stati analizzati nel periodo ottobre-maggio per valutare l'andamento di questo gene nei periodi competenza alla radicazione avventizia e nei periodi di induzione fiorale. Relativamente ai risultati ottenuti rispetto al gene *ARF8* (Fig.36), la sua espressione è in linea con la predisposizione ontogenetica di olivo. L'espressione è minima nei periodi di induzione fiorale (dicembre-febbraio), mentre aumenta nei periodi competenza della pianta (marzo-aprile) sia in Leccino che in Salviana. Differenze si riscontrano a livello di tessuto, dove il gene *ARF8* è espresso maggiormente in ramo fruttifero e non in succhione, sia in Leccino che Salviana. Unica eccezione è il mese di ottobre, dove i trascritti *ARF8* sono indotti maggiormente nel succhione di Leccino (0,096) e non nel ramo fruttifero (0,051). Gli alti valori di espressione

relativa del gene determinati nel mese di ottobre sono attribuibili al decorso stagionale; infatti, le condizioni climatiche hanno determinato il prosieguo dell'attività vegetativa del periodo tardo estate – inizio autunno, in cui sono stati eseguiti dei taleaggi per indurre la radicazione avventizia.

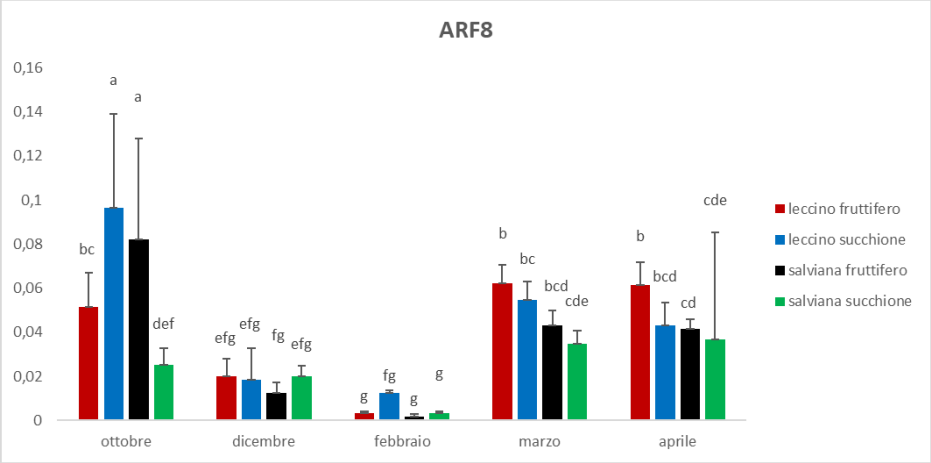



Fig.36 Risultati dell'espressione relativa (y) del gene *ARF8* nei mesi ottobre-aprile (x), nei tessuti succhione e ramo fruttifero delle varietà Leccino e Salviana. Gli istogrammi rappresentano la media e le barre l'errore standard.

Confrontando i dati di fusto con i dati di foglia (Fig.37), sempre relativi al gene *ARF8*, si osserva lo stesso andamento nei mesi di marzo e aprile, sia a livello di tessuto che di varietà oggetto di studio. Tuttavia, l'espressione è inferiore rispetto al fusto, dove a marzo si ha un'espressione nei rami fruttiferi di Leccino (0,062) e nei rami fruttiferi di Salviana di (0,043), mentre in foglia l'espressione nei rami fruttiferi di Leccino è cinque volte più piccola (0,012) e in Salviana undici volte più piccola (0,004). Nei succhioni di entrambe le varietà si riscontra lo stesso andamento, con il gene ARF8 maggiormente indotto in fusto. Interessante appaiono i valori di espressione del gene nelle foglie del succhione di Salviana, poiché esso è inferiore in assoluto, indicando che esso potrebbe svolgere un ruolo nel controllo della radicazione avventizia in questo tipo di ramo. Infatti, la percentuale di radicazione si riduce rispetto al ramo fruttifero. Inoltre, considerando l'insieme dei risultati ottenuti dall'analisi dei due tipi di organi sembrerebbe che sia importante l'espressione di questo gene in entrambi gli organi, anche se i livelli di espressione che avvengono nei tessuti dei rami siano vincolanti, mentre quelli che avvengono nelle foglie appiano modulare il processo.

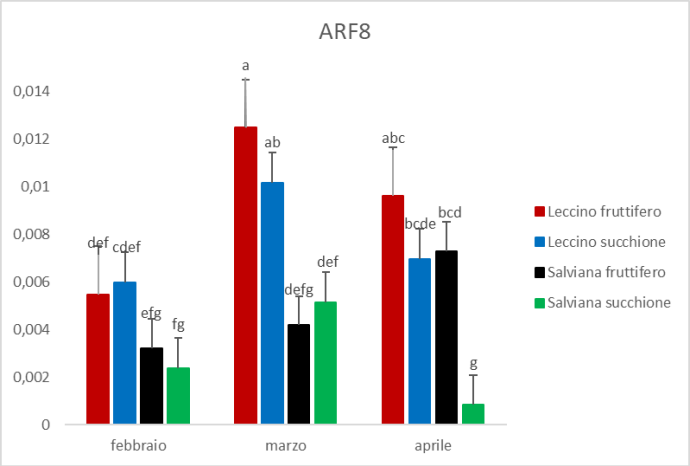


Fig.37 Risultati dell'espressione relativa (y) del gene ARF8 nei mesi febbraio-aprile (x), nei tessuti fogliari del ramo di succhione e del ramo fruttifero delle varietà Leccino e Salviana. Gli istogrammi rappresentano la media e le barre l'errore standard.

L'auxina controlla l'inizio della radicazione avventizia attivando *ARF6* e *ARF8*, portando alla downregulation della segnalazione inibitoria COI1 (Gutierrez et al., 2009, 2012). *ARF6*, *ARF8* e *ARF17* interagiscono in una rete complessa e agiscono a monte di GH3.3, GH3.5, GH3.6. Il primo gene GH3 è stato identificato come un gene precoce auxin-responsive nella soia (Hagen et al., 1984) e, da allora, geni GH3-like sono stati trovati in molte specie di piante. Tuttavia, è solo di recente che sono stati dimostrati codificare enzimi in grado di coniugare vari amminoacidi, portando all'attivazione, inattivazione o degradazione di queste molecole (Staswick et al., 2005; Chen et al., 2010; Wang et al., 2010; Westfall et al., 2010). Studi su *Arabidopsis* e riso hanno dimostrato che YUCCA6 media direttamente la formazione di radici avventizie aumentando i livelli di IAA non solo attraverso la biosintesi diretta, ma anche influenzando l'espressione dei geni GH3 (Kim et al., 2007; Yamamoto et al., 2007). I geni della famiglia *GH3* codificano per le sintetasi IAA-amido, che catalizzano la coniugazione di vari amminoacidi in auxina e jasmonato, e di conseguenza controllano il livello di IAA libero (Ljung et al., 2002; Staswick et al., 2005; Sorin et al., 2006; Ludwig-Muller et al., 2009). Il contenuto di proteine GH3.3, GH3.5 e GH3.6 è positivamente correlato con il numero di radici avventizie ma non con il contenuto di auxina endogena (Sorin et al., 2006). *ARF6* è un regolatore positivo insieme ad *ARF8*. Uno studio di Pacurar et al., del 2014, ha proposto che l'attivazione dei geni *GH3* potrebbe essere dovuto alla degradazione indotta dall'auxina di *ARF6* e *ARF8*. L'espressione del gene *ARF8* è correlata ai livelli di auxina presenti, tramite l'interazione con le proteine Aux/IAA. Le proteine della famiglia Aux/IAA IAA6, IAA9 e IAA17 interagiscono con *ARF6* e *ARF8* per reprimere la loro attività a bassi livelli di auxina. Ad alti livelli di IAA, le proteine Aux/IAA formano un complesso corecettore auxina con TIR1 e AFB2 e sono degradate attraverso il proteasoma 26S. Gli *ARF6* e gli *ARF8* rilasciati avviano ulteriormente l'espressione di geni auxin-responsive per la formazione di radici avventizie. IAA6, IAA9 e IAA17 reprimono l'espressione di GH3.3, GH3.5 e GH3.6, mentre *ARF6* e *ARF8* attivano la loro espressione (Fig.38).

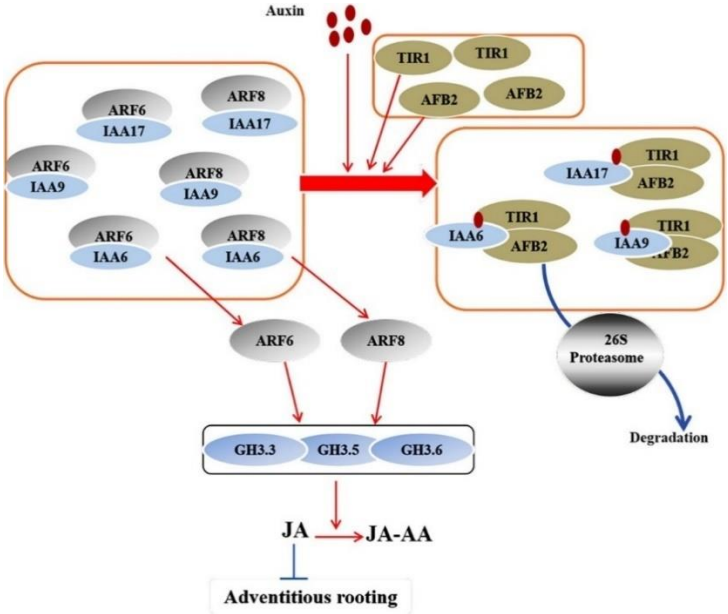



Fig.38 Pathway della regolazione di *ARF6* e *ARF8*; le frecce rosse rappresentano la regolazione positiva, mentre le barre blu rappresentano la regolazione negativa.

La regolazione di *ARF8* non avviene solo a livello trascrizionale ma anche a livello post-trascrizionale con i miRNA che mediano la degradazione dei trascritti del gene *ARF8*, regolando la sua attività (Li et al., 2021, Valerio et al., in press). Si può quindi dedurre che la concentrazione di auxina nei mesi di ottobre, febbraio, marzo ed aprile era sufficientemente elevata da inibire i regolatori negativi dell'auxina, appartenenti alla famiglia Aux/IAA. È evidente l'oscillazione periodica nel ramo ma, allo stesso tempo, visto il taglio della talea fatto ad un centimetro dall'internodo, anche la foglia potrebbe contribuire all'afflusso del trascritto *ARF8* o della sua proteina codificante.

Il nostro sistema è coerente con l'andamento stagionale; la periodicità non è sincrona con il riposo invernale e con l'induzione fiorale, data dal gene *FT1* che non è espresso. I trascritti del gene *ARF8* o le proteine codificate da suddetto gene prodotto dalle foglie potrebbero quindi concorrere come modulatori del processo di radicazione.

### 3.2.2 Gene *ARF17*

Fig.39 Struttura del gene *ARF17* di Olea europaea subsp. europaea. La struttura evidenzia la presenza di 2 esoni (rettangoli blu) e di 2 introni (grigio) e le regioni 3' d 5'-UTR (a lato).

Il gene *ARF17* (Fig.39) è un fattore di trascrizione regolatore negativo della radicazione avventizia. Insieme ai regolatori positivi della radicazione avventizia, ARF6 e ARF8, svolge un ruolo importante nel regolare l'attività dei geni *GH3.3*, *GH3.5* e *GH3.6*. I geni *GH3* regolano la radicazione avventizia agendo sui livelli di IAA libero e sull'acido jasmonico (Li et al., 2021). *COI1* è controllato da una complessa diafonia tra le proteine miRNA, ARF e GH3 che regolano la coniugazione del jasmonato e il conseguente effetto del jasmonato sullo sviluppo di radici avventizie (Gutierrez et al., 2012). ARF17 regola negativamente l'inizio della radicazione avventizia reprimendo l'espressione dei geni *ARF6*, *GH3.3*, *GH3.5*, *GH3.6* (Fig.40) che sono coinvolti nell'omeostasi dell'auxina e del jasmonato. Vi è un sottile equilibrio tra il repressore ARF17 e gli attivatori ARF6 e ARF8 che controllano l'inizio della radicazione avventizia attraverso una sottile via regolatoria (Sorin et al., 2005; Gutierrez et al., 2009). *AGO1* codifica per una proteina legante i miRNA che regola il silenziamento genico post-trascrizionale (Morel et al., 2002; Vaucheret et al., 2004). Studi sui mutanti *ago1* di *Arabidopsis* rivelano che AGO1 controlla i geni regolati all'omeostasi dell'auxina sovraregolando l'espressione di *ARF17* e dei geni *GH3*-like, inibendo la radicazione avventizia.

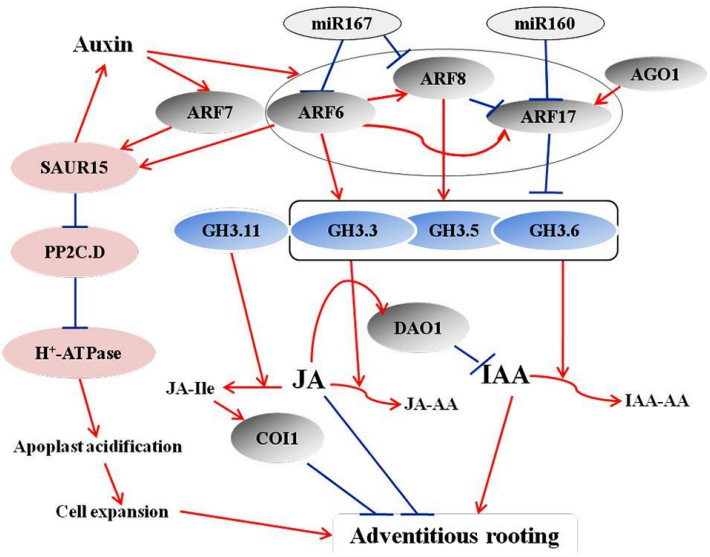



Fig.40 Regolazione negativa di ARF17

I risultati ottenuti sul gene A*RF17* (Fig.41) mostrano bassi livelli di espressione, soprattutto per il campione di Salviana succhione. In particolare, nel mese di ottobre i valori dei succhioni di Leccino e dei rami fruttiferi di Salviana sono superiori a 0,06, mentre nel mese di dicembre i valori scendono in ogni varietà e tessuto; unica eccezione è Salviana succhione, dove il valore sale a 0,02. Nei mesi di febbraio e marzo, invece, i valori rimangono più o meno costanti, per poi scendere nel mese di aprile, dove l'espressione nei succhioni di Salviana è nulla. In foglia (Fig.42), si ha un'espressione maggiore nei succhioni di Leccino (0,089) e nei rami fruttiferi di Salviana (0,14) nel mese di febbraio. Nei mesi di marzo e aprile abbiamo un'espressione più bassa rispetto al mese di febbraio, ad eccezione dei rami fruttiferi di Leccino e dei succhioni di Salviana. Dai risultati ottenuti si può dedurre che la concentrazione auxinica nei mesi di dicembre e febbraio non era sufficientemente elevata da reprimere l'attività della famiglia di proteine Aux/IAA IAA6, IAA9 e IAA17.

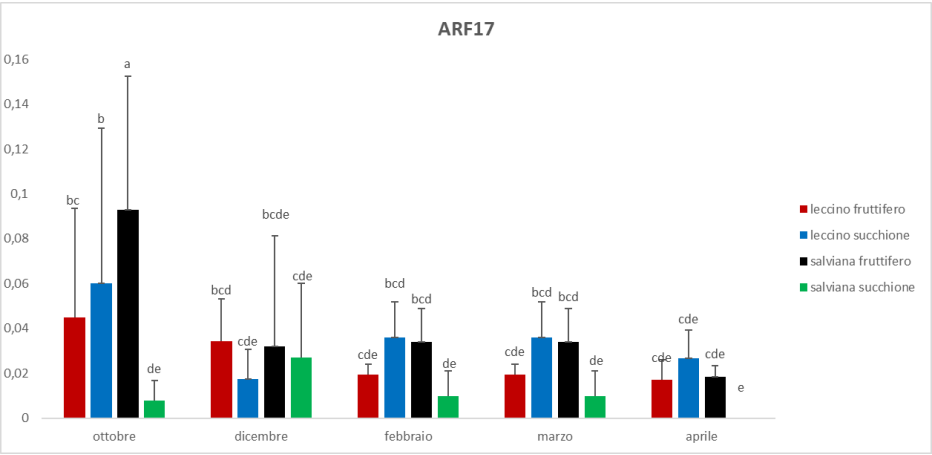



Fig.41 Andamento temporale (x) dei livelli di espressione (y) del gene *ARF17* nelle cv. Leccino e Salviana nei tessuti di ramo fruttifero e succhione. Gli istogrammi rappresentano la media e le barre l'errore standard.

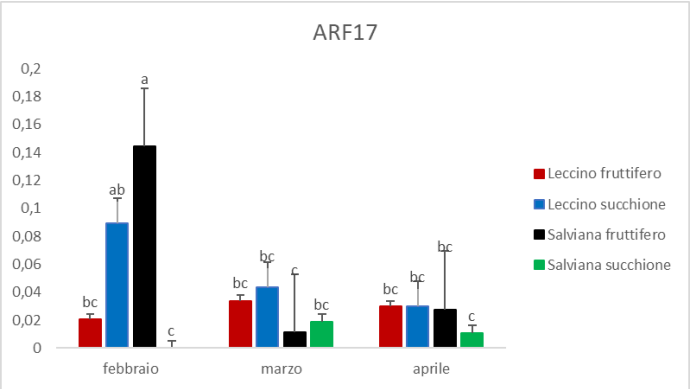



Fig.42 Andamento temporale (x) dei livelli di espressione (y) del gene *ARF17* nelle foglie delle cv. Leccino e Salviana nei tessuti di ramo fruttifero e succhione. Gli istogrammi rappresentano la media e le barre l'errore standard.

I valori ottenuti rispetto al gene *ARF17* sono in linea con la periodicità stagionale. Confrontando questi dati con il gene *ARF8* si può constatare come i valori di marzo e aprile siano il doppio rispetto al gene *ARF17* che presenta un'attivazione molto più bassa (<0,04). Inoltre, l'espressione di *ARF17* è maggiore in foglia, quindi potrebbe essere che svolga una funziona regolativa in questo organo. Tutti questi dati sono in linea con la predisposizione ontogenetica della pianta, considerando che con l'inizio della primavera la pianta entra nel periodo di competenza.

### 3.2.3 Gene *PIN1a*

Le auxine svolgono un ruolo centrale nel controllo della radicazione avventizia. Le auxine sono distribuite in tutta la pianta da due sistemi di trasporto interconnessi e il trasporto polare è la principale via di distribuzione dell'auxina (Tanaka et al., 2006).

Fig.43 Struttura del gene *PIN1a* di Olea europaea subsp. europaea. La struttura evidenzia la presenza di 6 esoni (rettangoli blu) e di 5 introni (grigio) e le regioni 3' d 5'-UTR (a lato).

Il gene *PIN1a* (Fig.43) codifica una proteina di efflusso delle auxine e tra le sue funzioni abbiamo quelle legate all'iniziazione e allo sviluppo delle radici nel riso (Xu et al., 2005). *AtPIN1* è espresso durante la radicazione avventizia nell'ipocotile delle piantine di Arabidopsis e concorre nell'aumento dei livelli di auxina per l'inizio della radice avventizia (Della Rovere et al., 2016). Inoltre, mutazione di *PIN1* e *PIN3* riducono la formazione di radici avventizie negli ipocotili di piantine di Arabidopsis (Sukumar et al., 2013). La proteina PIN1a si localizza nella membrana plasmatica e presenta un anello idrofilico centrale "lungo". In uno studio, Velada et al. (2020) hanno evidenziato differenze significative nei livelli di espressione di *OePIN1a-c* tra microtalee di olivo non trattate e trattate con IBA. Mentre nella fase di induzione, da 4 ore dalla formazione della microtalea fino alle 24 ore, l'espressione di tutti e tre i trascritti è maggiore nei campioni trattati con IBA, nella fase d'iniziazione l'espressione

di tutti e tre i trascritti è inferiore nei campioni trattati con IBA, suggerendo che una riduzione del trasporto auxinico ha effetti sulla ridistribuzione dell'auxina in tutti i tessuti.

I risultati ottenuti (Fig.44) mostrano come i livelli di espressioni di *PIN1a* siano maggiori nei periodi di competenza a radicare della pianta e differenze significative si riscontrano anche a livello di tessuto dei rami e degli organi. In Salviana l'espressione è maggiore nel ramo fruttifero, e lo stesso è osservabile in Leccino (unica eccezione nel mese di aprile). Questi dati sono in accordo con la stagionalità di olivo, con il mese di marzo che vede un'induzione nei fusti dei fruttiferi di Leccino (1,18) e di Salviana (0,78). Questo andamento rimane costante nel mese di aprile, con un leggero calo in Leccino.

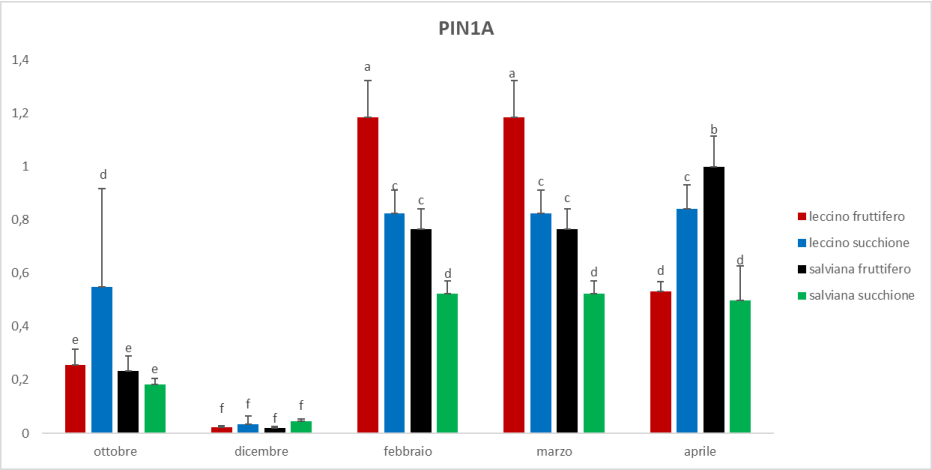



Fig.44 Andamento temporale (x) dell'espressione relativa (y) del gene *PIN1a* nei mesi ottobre-aprile (x), nei tessuti del ramo succhione e ramo fruttifero delle cv Leccino e Salviana. Gli istogrammi rappresentano la media e le barre l'errore standard.

In foglia (Fig.45), l'espressione di *PIN1a* è molto più bassa rispetto alle analisi effettuate su fusto; tuttavia, a livello di tessuto si ha comunque una maggiore espressione nei rami fruttiferi e non in succhione. Questo profilo d'espressione in foglia non indica che questo organo non partecipi ai processi di regolazione, anzi potrebbe confermare la ciclicità della pianta che a seconda del periodo attiverà o meno diversi pathway. Visto il taglio della talea effettuato sotto all'internodo, all'oscillazione periodica del gene *PIN1a* nei fusti potrebbero prendere parte anche i trascritti o le proteine codificate da foglia.

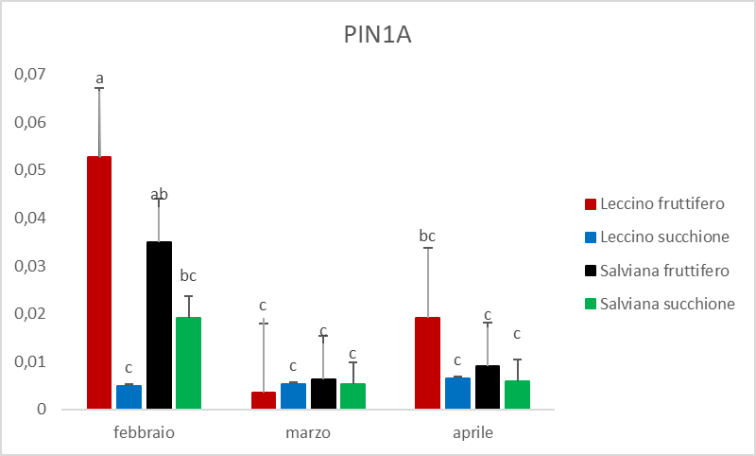



Fig.45 Andamento temporale (x) dell'espressione relativa (y) del gene *PIN1a* nei mesi febbraio-aprile (x), ne tessuti delle foglie di succhione e ramo fruttifero delle cv Leccino e Salviana. Gli istogrammi rappresentano la media e le barre l'errore standard.

### 3.2.4 Gene *PIN5a*

Fig.46 Struttura del gene *PIN5a* di Olea europaea subsp. europaea. La struttura evidenzia la presenza di 3 esoni (rettangoli blu) e di 2 introni (grigio) e le regioni 3' d 5'-UTR (a lato).

All'interno della sottofamiglia genica *OePIN5* si è deciso di analizzare il gene *PIN5a* (Fig.46); la proteina codificata dal gene è importante anch'essa per l'efflusso dell'auxina. È inclusa nelle proteine con un dominio idrofilico drasticamente ridotto (PIN a catena corta). PIN5 è localizzata nel reticolo endoplasmatico con un anello idrofilico centrale ridotto e contribuisce all'omeostasi intracellulare dell'auxina (Ganguly et al., 2012). AtPIN5 è indicata per avere una funzione nella regolazione dell'omeostasi intracellulare dell'auxina e del metabolismo auxinico. OePIN5, pertanto, influenzerebbe l'omeostasi dell'auxina, portando a cambiamenti nella distribuzione e nel trasporto dell'auxina, svolgendo un ruolo nell'inizio della radicazione avventizia nelle talee, in vitro e in vivo, di olivo, forse a livello della *Cell Fondation*. Si ritiene che la proteina PIN5 medi il trasporto dell'auxina dal citosol nel lume del reticolo endoplasmatico; quindi, un'azione antagonista di PIN8 implicherebbe o un trasporto di auxina svolto da PIN8 dal reticolo endoplasmatico al citosol o una regolazione negativa mediata da PIN8 dell'attività di PIN5 (Dal Bosco et al., 2012; Ding et al., 2012). I risultati delle PCR-Real time (Fig.47) mostrano una maggiore induzione dei trascritti *PIN5a* nei mesi di competenza della pianta alla radicazione. A livello di tessuto, si ha una maggiore espressione nei succhioni di Salviana nei mesi di febbraio (27,7) e aprile (15,7), mentre nei mesi di ottobre, dicembre e marzo è indotto nei rami fruttiferi. In Leccino l'espressione è maggiore nei rami fruttiferi nei mesi di febbraio (12,8) e marzo (18). Confrontando le due varietà, il gene è indotto principalmente in Salviana.

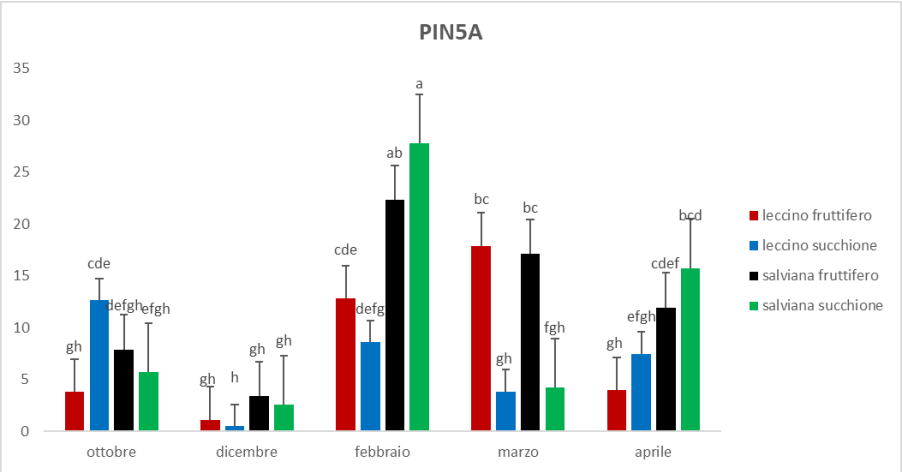



Fig.47 Andamento temporale (x) dell'espressione relativa (y) del gene *PIN5a* nei mesi ottobre-aprile (x), nei tessuti del ramo succhione e ramo fruttifero delle cv Leccino e Salviana. Gli istogrammi rappresentano la media e le barre l'errore standard.

I risultati su foglia (Fig.48) mostrano invece un andamento diverso rispetto all'espressione ottenuta dai fusti. L'induzione di questo gene in Salviana è assente, tranne nei rami fruttiferi nel mese di marzo; in Leccino è leggermente espresso nei rami fruttiferi di febbraio e marzo, mentre nei mesi di marzo e aprile si ha un'induzione

nei succhioni. Questi risultati sono in accordo con la letteratura (Ding et al., 2012; Mravec et al., 2009), confermando la relazione antagonista tra il gene *PIN5* e *PIN8*.

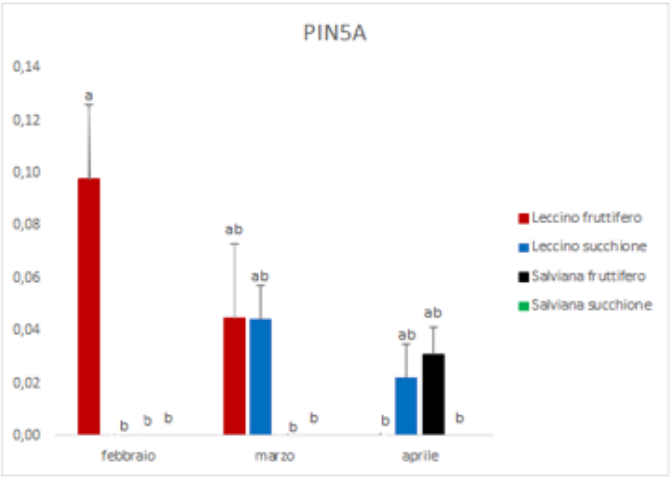



Fig.48 Andamento temporale (x) dell'espressione relativa (y) del gene *PIN5a* nei mesi febbraio-aprile (x), nei tessuti del ramo succhione e ramo fruttifero delle cv Leccino e Salviana. Gli istogrammi rappresentano la media e le barre l'errore standard.

### 3.2.5 Gene *PIN8*

Fig.49 Struttura del gene *PIN8* di Olea europaea subsp. europaea. La struttura evidenzia la presenza di 5 esoni (rettangoli blu) e di 5 introni (grigio) e le regioni 3' d 5'-UTR (a lato).

La proteina PIN8 (Fig.49) è localizzata nel reticolo endoplasmatico e come PIN5 ha un anello idrofilico centrale ridotto e contribuisce al trasporto dell'auxina e all'omeostasi intracellulare. PIN8 si localizza prevalentemente nei compartimenti intracellulari e la cellula che esprime PIN8 si predispone ad una segnalazione auxina-positiva per lo sviluppo di radici laterali. Il vettore di afflusso di auxina AUX1 integra la funzione di PIN8. Queste osservazioni suggeriscono che PIN8 localizzata internamente agisce come fornitore di auxina nelle cellule vicine al primordio radicale. Le analisi genetiche (Ding et al., 2012; Mravec et al., 2009) rivelano un'azione antagonista di *PIN5* e *PIN8* nella regolazione dell'omeostasi intracellulare dell'auxina e del gametofito, nonché nello sviluppo degli sporofiti. I risultati delle PCR-Real time (Fig.50) mostrano un'interazione più o meno stabile di *PIN5* e *PIN8*, che regolano negativamente le reciproche capacità di trasporto. Nei fusti, ad eccezione del mese di ottobre, si ha un'espressione di *PIN8* quasi assente. Nelle foglie di Salviana il gene *PIN8* risulta espresso sia nel ramo fruttifero sia nel succhione, mentre l'espressione del gene *PIN5a* era nulla, ad eccezione dei rami fruttiferi del mese di aprile. L'espressione di *PIN5a* è maggiore nel fusto e non nella foglia (Fig.51); al contrario, il gene *PIN8* è indotto principalmente nei trascritti di foglia, in febbraio. Questo potrebbe confermare la relazione antagonista tra *PIN8* e *PIN5*, anche se

non è da escludere un'azione di regolazione, anche seppur indiretta sulla regolazione dell'espressione del gene *PIN5*.

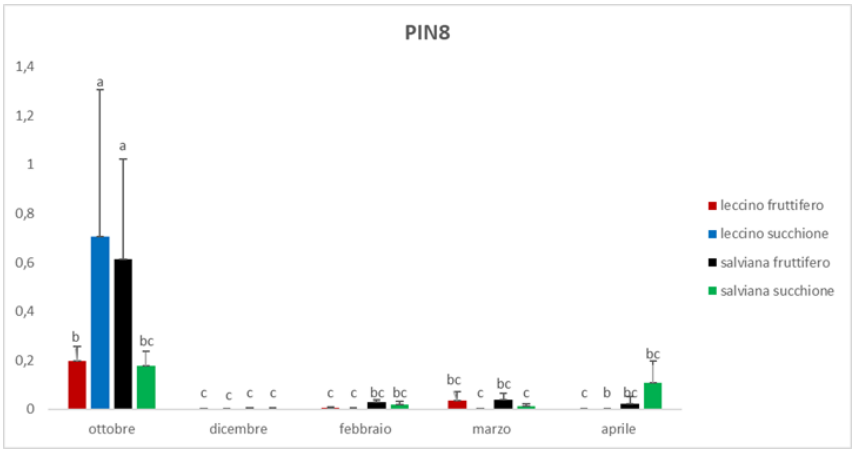



Fig.50 Andamento temporale (x) dell'espressione relativa (y) del gene *PIN8* nei mesi ottobre-aprile (x), nei tessuti del ramo succhione e ramo fruttifero delle cv Leccino e Salviana. Gli istogrammi rappresentano la media e le barre l'errore standard.

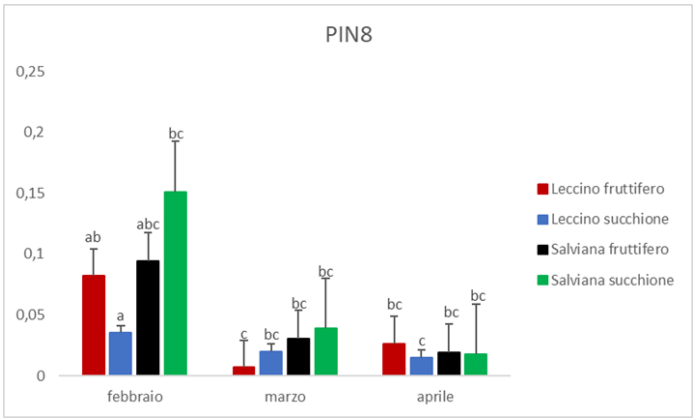



Fig.51 Andamento temporale (x) dell'espressione relativa (y) del gene *PIN8* nei mesi febbraio-aprile (x), nei tessuti del ramo succhione e ramo fruttifero delle cv Leccino e Salviana. Gli istogrammi rappresentano la media e le barre l'errore standard.

### 3.2.6 Gene *AUX1*

Fig.52 Struttura del gene *AUX1* di Olea europaea subsp. europaea. La struttura evidenzia la presenza di 8 esoni (rettangoli blu) e di 8 introni (grigio) e le regioni 3' d 5'-UTR (a lato).

Il gene *AUXIN RESISTANCE1* (*AUX1*) (Fig.52) è riconosciuto come carrier dell'afflusso di auxina. AUX1 risiede nella membrana plasmatica apicale delle cellule del protofloema. Mutanti *aux1* sviluppano poche radici e mostrano un ridotto gravitropismo radicale; riducono l'accumulo di IAA nelle radici e agiscono come trasportatori di afflusso di auxina per stimolare la crescita delle radici attraverso l'allocazione di IAA tra gli organi radicali. È stata dimostrata l'importanza del trasportatore dell'auxina, AUX1, nella distribuzione ormonale durante l'inizio dei

peli radicali (Jones et al., 2009; Kramer &Bennett, 2006), e i portatori di afflusso AUX1 sono necessari per creare il modello di distribuzione dell'auxina sulla punta della radice (Band et al., 2014). AUX1 aumenta notevolmente il flusso di auxine nel cappuccio radicale laterale e nelle cellule epidermiche e probabilmente controlla i livelli di auxina nei tessuti. È stato anche dimostrato che l'up-regulation di *AUX1* aumenta l'accumulo di auxina negli apici delle radici laterali, che è un prerequisito per l'allungamento laterale della radice (Giehl et al., 2012). In generale, le proteine AUX1/LAX mediano il flusso di auxina e aiutano a generare massimi e minimi di auxina. Le analisi fenotipiche hanno portato alla scoperta che i mutanti *aux1* erano difettosi nel trasporto basipeto di auxina e che AUX1 è un vettore di assorbimento dell'auxina. I risultati delle PCR-Real time (Fig.53) nei fusti mostrano come questo gene sia fortemente espresso nei succhioni della cultivar Leccino, rispetto al ramo fruttifero. L'espressione di *AUX1* in Salviana, nei mesi di febbraio e marzo, è maggiore nel ramo succhione, e ad aprile i valori si equivalgono.

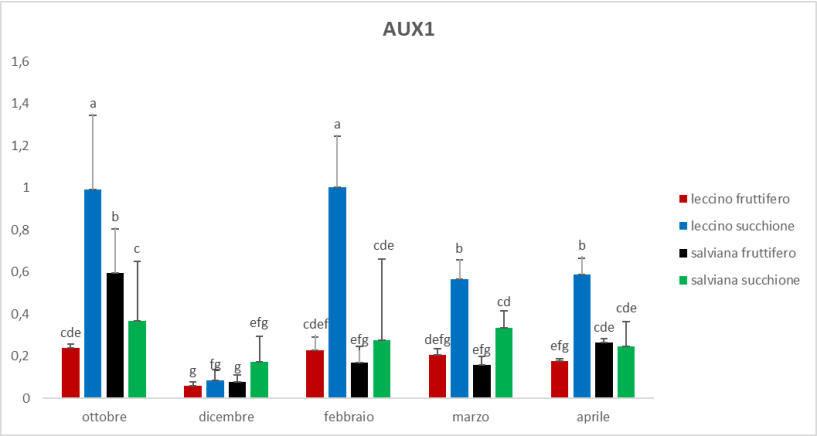



Fig. 53 Andamento temporale (x) dell'espressione relativa (y) del gene *AUX1* nei tessuti dei rami fusti delle cvs. Leccino e Salviana di ramo fruttifero e succhione. Gli istogrammi rappresentano la media e le barre l'errore standard

In foglia (Fig.54), l'espressione è maggiore nella cv Leccino rispetto a Salviana; tuttavia, l'induzione di questo gene è maggiore in fusto. In merito all'andamento nei vari tessuti, in Leccino si ha una maggiore espressione nel ramo fruttifero nei mesi di febbraio e aprile, mentre in Salviana ho una maggiore espressione nel ramo fruttifero nei mesi di febbraio e marzo.

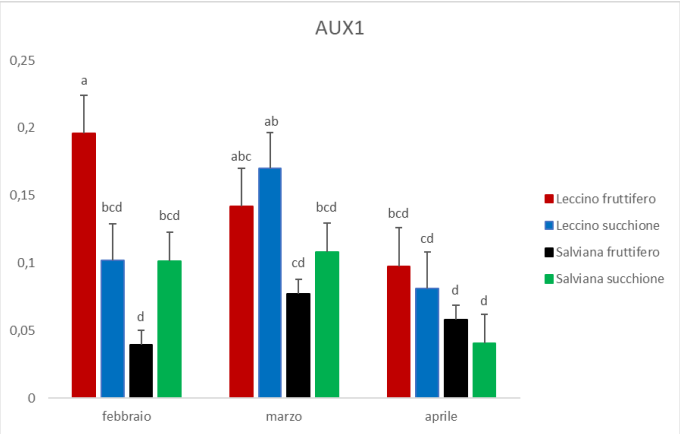



Fig.54 Andamento temporale (x) dell'espressione relativa (y) del gene AUX1 nei tessuti fogliari dei rami fusti delle cvs. Leccino e Salviana di ramo fruttifero e succhione. Gli istogrammi rappresentano la media e le barre l'errore standard.

I risultati sono in linea con la periodicità stagionale, visto che nei periodi di competenza della pianta abbiamo un profilo d'espressione che è il doppio o anche più del doppio rispetto al mese di dicembre. Ad esempio, nel mese di febbraio si assiste ad un aumento dell'induzione del gene in Leccino succhione (1), mentre nel mese di dicembre questo era scarsamente espresso (<0,2). Il gene *AUX1* potrebbe quindi mediare una serie di risposte che contribuiscono allo sviluppo della pianta sia in fusto che in foglia.

### 3.2.7 Gene *BAM1*

Fig.55 Struttura del gene BAM1 di Olea europaea subsp. europaea. La struttura evidenzia la presenza di 4 esoni (rettangoli blu) e di 3 introni (grigio) e le regioni 3' d 5'-UTR (a lato).

L'amido è la forma più abbondante di carboidrati. Questi ricchi di energia, nella maggior parte delle piante, sono immagazzinati sotto forma di amido, rendendolo un composto integrale ed essenziale nei processi vitali della pianta. È un polisaccaride, cioè un polimero costituito da numerose unità di glucosio unite da legami glicosidi. I processi metabolici richiedono la conversione dell'amido immagazzinato in zuccheri semplici e utilizzarli per produrre energia o nella produzione di molecole essenziali per la via anabolica. La rottura dell'amido richiede enzimi catalitici. Le amilasi catalizzano la de-ramificazione di composti complessi che immagazzinano energia (amido e polisaccaridi) e li convertono in zuccheri semplici come glucosio e maltosio mediante idrolisi. Le amilasi sono state studiate ampiamente sull'organismo modello *Arabidopsis thaliana,* dove l'enzima è codificato da nove geni *BAM*, designati come *BAM1* (Fig.55) fino a *BAM9*. La proteina BAM1 (Fig.56) è localizzata nei plastidi, dove potrebbe partecipare alla degradazione dell'amido (Fulton et al., 2008; Lao et al., 1999). Uno studio (Monroe, 2020) su cinque mutanti di *Arabidopsis*, ognuno dei quali esprime solo un BAM cataliticamente attivo, ha evidenziato come sia BAM1 che BAM3 supportino la crescita della pianta, con la degradazione dell'amido fogliare. La regolazione genetica della produzione enzimatica è principalmente nota per essere influenzata da due fattori principali, ossia l'induzione e la repressione a livello trascrizionale (Amore et al., 2013). Tali regolazioni a livello molecolare sono governate dalla presenza o assenza dei substrati enzimatici, dalla concentrazione dei substrati e dalla presenza di composti con struttura simile a quella del substrato enzimatico (Ray et al., 1996). Oltre all'amido, anche l'amilopectina e l'amilosio innescano la produzione di amilasi. Le foglie svolgono un ruolo significativo come organi di stoccaggio, mentre le radici accumulano le quantità più basse di monosaccaridi (CHO). In condizioni ambientali favorevoli, gli alberi acquisiscano il CHO richiesto da una prolungata attività fotosintetica, preservando determinati livelli di riserve per garantire la sopravvivenza nel clima mediterraneo (Bustan et al., 2011).

Fig. 56 Struttura della β-amilasi in soia (*Glycine max*).

I carboidrati rappresentano la fonte di energia per i processi metabolici della talea. Pertanto, affinché la rizogenesi possa avvenire normalmente, questi composti devono essere disponibili. Il loro ruolo nella radicazione è sempre stato controverso ma sono coinvolti nei processi di sviluppo delle radici una volta che si sono formate. Uno studio sul ruolo dei carboidrati nei processi di radicazione avventizia è stato effettuato su talee di olivo delle cultivar "Arbequina" e "Kalamata" (Denaxa et al., 2012). I risultati dello studio suggeriscono che l'IBA aumenta la capacità di radicazione nella cultivar di olivo "Arbequina" facile da radicare, ma è stata inefficace nello stimolare il radicamento nella cultivar "Kalamata" difficile da radicare. Quest'ultima presentava anche una minore concentrazione di stachiosio, glucosio, saccarosio, fruttosio e mannitolo. È stato osservato che il migliore periodo di radicazione coincide con la più alta concentrazione di zuccheri solubili endogeni, in particolare quella di glucosio e la più bassa concentrazione di amido. La disponibilità di carboidrati nelle talee sembra essere un fattore importante nell'iniziazione delle radici, ma non è l'unico fattore determinante. Durante lo sviluppo avventizio delle radici in talee di *Tectona grandis*, i livelli di zucchero e amido sono diminuiti (Jasik e Klerk, 1997; Husen e Pal, 2007). Livelli più elevati di zuccheri solubili migliorano il radicamento avventizio in molte specie, tra cui petunia (Druege & Kadner, 2008), Pelargonium spp. (Druege et al., 2004), *Chrysanthemum spp.* (Druege et al., 2000). L'auxina (Husen e Pal, 2007), il perossido d'idrogeno e l'ossido nitrico (Liao et al., 2010) aumentano i livelli totali di zucchero solubile. Inoltre, è stato dimostrato che l'aumento di radicazione delle talee in condizioni di scarsa illuminazione può essere collegato ad un aumento dello zucchero solubile (Druege et al., 2004; Druege & Kadner, 2008; Husen, 2008; Klopotek et al., 2010).

I risultati di questo studio sono in linea con i risultati ottenuti dalle nostre analisi sul gene *BAM1* (Fig.57). Il gene *BAM1* è infatti maggiormente espresso nella cultivar che presenta una maggiore capacità di radicazione (Salviana) rispetto a Leccino, nel periodo di massima competenza a generare radici avventizie. Il gene *BAM1* che scinde amido e polisaccaridi in zuccheri semplici, quali glucosio e maltosio è espresso maggiormente nei rami fruttiferi sia di Leccino che di Salviana. In particolare, questo picco di espressione si riscontra nel mese di marzo, dove i rami fruttiferi di Leccino (0,8) e Salviana (1,2) mostrano i più alti profili d'espressione. Confrontando le due cultivar, Salviana è più predisposta alla radicazione e presenta una maggiore espressione del gene. I risultati sono in linea

con l'andamento delle auxine nei mesi di campionatura, confermando le evidenze di Sairanen et al (2012), secondo cui gli zuccheri influenzano la coniugazione e il trasporto dell'auxina (Ljung et al., 2015). Questa interazione tra fitormoni e carboidrati è stata dimostrata controllare lo sviluppo e la crescita delle radici nelle piantine di *Arabidopsis thaliana* (Mishra et al., 2009). L'apporto di auxina alle talee di *Dalbergia sissoo* ha migliorato il contenuto di zuccheri solubili totali e amido, promuovendo la radicazione avventizia (Husen, 2008). Nel loro insieme, i dati disponibili e mostrati dalle analisi di questo progetto di tesi, mostrano come una bassa allocazione di carboidrati al sito di formazione delle radici può limitare la radicazione avventizia.

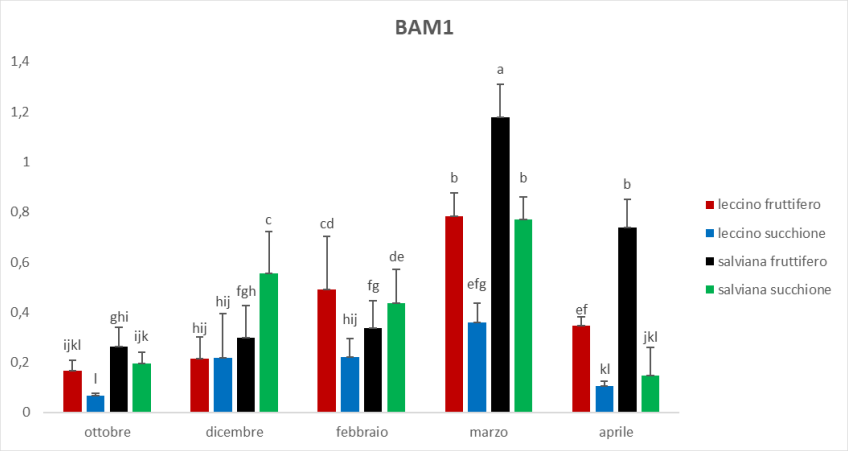



Fig.57 Andamento temporale (x) dell'espressione relativa (y) del gene *BAM1* nei tessuti dei rami delle cvs. Leccino e Salviana di ramo fruttifero e succhione. Gli istogrammi rappresentano la media e le barre l'errore standard

Lo stesso gene è stato studiato non solo sui fusticini di ciascuna varietà e tessuto, ma anche in un organo differente, la foglia (Fig.58). In foglia, il gene *BAM1* è maggiormente espresso in Leccino e non in Salviana. Quest'ultima presenta un'induzione maggiore in succhione nei mesi di febbraio e marzo, mentre in Leccino il gene *BAM1* abbiamo l'espressione opposta, con i rami fruttiferi più espressi. Il leggero aumento della espressione di *BAM1* nelle foglie potrebbe essere associato ad una tendenza generale alla diminuzione dei carboidrati negli steli basali. La maggiore riserva di zucchero osservata nel fusto basale potrebbe aver fornito alle foglie il carbonio necessario per svolgere le proprie funzioni. L'induzione maggiore del gene *BAM1* nelle foglie e non nel fusto, si suppone possa essere dovuta al fatto che la foglia rappresenta un organo di stoccaggio per la pianta e produce una quantità maggiore di zuccheri dati dalla fotosintesi.

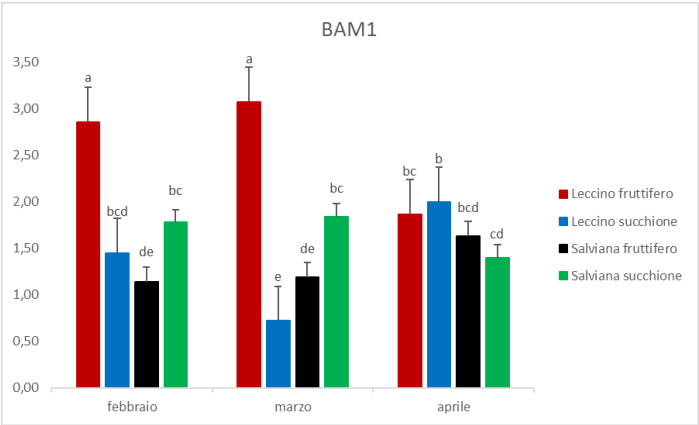


Fig.58 Andamento temporale (x) dell'espressione relativa (y) del gene BAM1 nei tessuti fogliari dei rami fusti delle cvs. Leccino e Salviana di ramo fruttifero e succhione. Gli istogrammi rappresentano la media e le barre l'errore standard.

### 3.2.8 Gene *AOX2*

L'ossidasi alternativa (AOX) è stata proposta come marcatore funzionale candidato in una serie di eventi che coinvolgono la differenziazione cellulare, compresa l'efficienza di radicazione in talee di olivo (*Olea europaea L.*). La catena di trasporto degli elettroni mitocondriali della pianta è caratterizzata dalla presenza dell'ossidasi alternativa (AOX) che compete per gli elettroni con la via standard del citocromo (Cyt) (Fiorani et al., 2005). L'AOX si ramifica dalla catena respiratoria principale a livello del pool di ubichinone e catalizza la riduzione di quattro elettroni dell'ossigeno in acqua senza alcuna produzione di ATP. Pertanto, AOX può utilizzare il riducente in eccesso dalla via Cyt e quindi determina l'equilibrio delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nelle piante (Amirsadeghi et al., 2006). AOX è nota per essere indotta in risposta a diverse condizioni di stress abiotici e biotici delle piante o inibizione della catena respiratoria (Vanlerberghe e McIntosh 1996). Recenti evidenze suggeriscono che in condizioni di stress i mitocondri generano ROS che giungono al nucleo come segnale per indurre la trascrizione di geni come *AOX*, i cui prodotti sono necessari per tollerare maggiormente lo stress (Dutilleul et al., 2003). Le ossidasi alternative vegetali (AOX) sono codificate da una famiglia di multigeni nucleari divisa in due sottofamiglie, *AOX1* e *AOX2* nelle dicotiledoni, mentre solo i membri *AOX1* sono stati trovati nelle monocotiledoni (Polidoros et al., 2009). Arnholdt-Schmitt (2006b) hanno suggerito che il gene *AOX* può svolgere un ruolo cruciale nell'avvio di programmi cellulari adattativi allo stress e fornire marcatori per la crescita delle piante sotto stress. La catena di trasporto degli elettroni mitocondriali della pianta è caratterizzata dalla presenza di AOX, che compete per gli elettroni con la via standard del citocromo (Cyt) (Fiorani et al. 2005). Nelle piante superiori, gli elettroni prodotti dall'ossidazione respiratoria del NAD possono fluire dall'ubichinone direttamente all'AOX, saltando così due dei tre siti di conservazione dell'energia che supportano la fosforilazione ossidativa (complessi III e IV) (Feng et al. 2013). Santos Macedo et al. (2009) hanno dimostrato che il trattamento SHAM (inibitore di AOX) ha ridotto il numero di talee di germogli radicate nelle cultivars facili da radicare in *Olea europaea* L. Hedayati et al. (2015) hanno dimostrato che il gene *OeAOX2* (Fig.59) era l'unico gene fortemente indotto in individui ad alto radicamento.

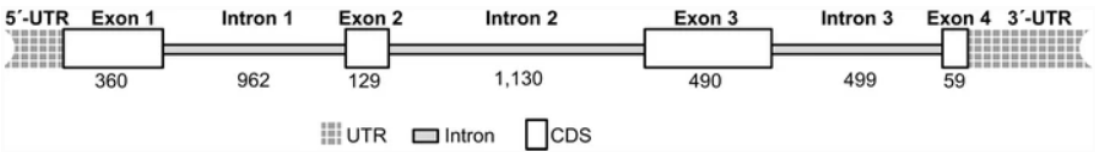



Fig.59 Struttura del gene OeAOX2 nell'olivo, cv. Leccino. Sono riportati quattro esoni, tre introni e le regioni 3' d 5'-UTR. Sotto la figura è indicata la lunghezza di ciascuna porzione genica (bp), riferendosi all'allele 1.

L'$H_2O_2$ sembra interagire con l'ossidasi alternativa (AOX) (Macedo et al., 2009; 2012) e l'ossido nitrico (Da Costa et al., 2013). La forte induzione di trascritti *OeAOX2*, esclusivamente in genotipi ad alta radicazione, in alcune fasi del processo di radicazione supporta fortemente il ruolo di questo gene nella radicazione dell'olivo, con particolare riferimento alle fasi di induzione, iniziazione e allungamento (Hedayati et al., 2015).

I risultati ottenuti dalle PCR-Real time (Fig.60) mostrano una forte induzione dei trascritti *OeAOX2* nei tessuti dei rami di succhione di Leccino nei mesi di febbraio (0,048) e marzo (0,056), mentre questo è meno presente in Salviana, sia nei rami fruttiferi che nei succhioni nel mese di marzo. Nel mese di febbraio, l'espressione è maggiore nei rami fruttiferi di Salviana (0,067), ed è minore nei rami fruttiferi di Leccino (0,036). Questo è in linea con i risultati ottenuti dalle analisi morfologiche di marzo, indicando una forte induzione del gene *OeAOX2* in Leccino nel mese di marzo. La figura in basso (Fig.56) mostra invece i risultati relativi alla foglia che confermano i risultati su fusto, anche se con valori di espressione superiori. In Salviana, il gene *OeAOX2* è scarsamente espresso, mentre in Leccino presenta un profilo di espressione maggiore, anche se il trend è di una maggiore espressione nei rami fruttiferi delle due varietà. Questo potrebbe indicare che i mitocondri fogliari svolgono un importante ruolo nell'equilibrio dello stress ossidativo, ma non sono gli unici geni a partecipare allo stress ossidativo. La minor espressione nei fusti potrebbe essere data dal fatto che sono espressi altri geni, rispetto al gene *AOX2,* per modulare gli stress abiotici e biotici.

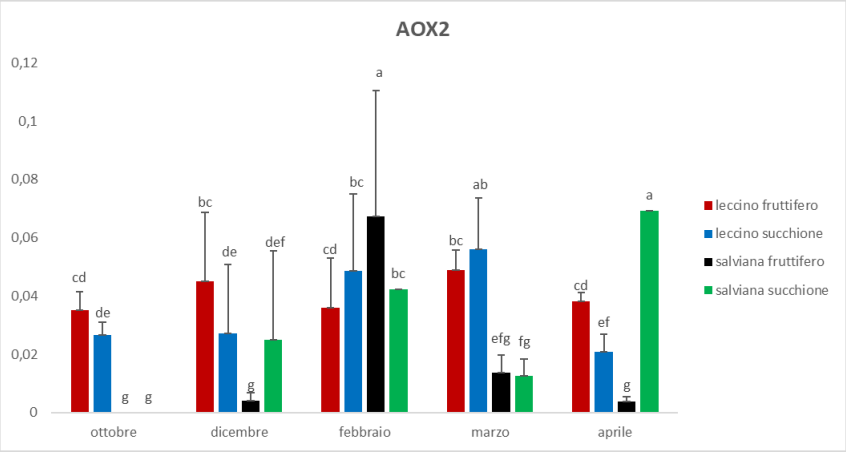



Fig.60 Andamento temporale (x) dell'espressione relativa (y) del gene *AOX2* nei tessuti dei rami fusti delle cvs. Leccino e Salviana di ramo fruttifero e succhione. Gli istogrammi rappresentano la media e le barre l'errore standard

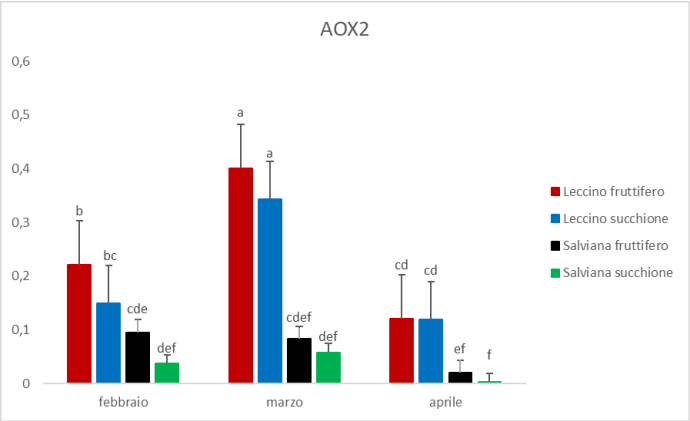



Fig.61 Andamento temporale (x) dell'espressione relativa (y) del gene *AOX2* nei tessuti fogliari dei rami fusti delle cvs. Leccino e Salviana di ramo fruttifero e succhione. Gli istogrammi rappresentano la media e le barre l'errore standard.

### 3.2.9 Gene *FT1*

Il *FLOWERING LOCUS T (FT)* è il gene pivot del sistema di induzione fiorale, poiché la proteina muovendosi dalla foglia nei tessuti della gemma, attiva il segnale per la conversione da gemma vegetativa a gemma a fiore. Nella regolazione dell'espressione del gene, oltre allo sviluppo della pianta dalla fase giovanile a quella adulta (Sgamma et al., 2014), concorrono anche il fotoperiodo e la vernalizzazione a cui sottostà la pianta. Studi condotti da Haberman (2017) sui geni codificanti *OeFT1/FT2* coinvolti nell'induzione a fiore hanno evidenziato che l'espressione del gene *OeFT2* era più alta nelle foglie verso la fine dell'inverno. Questo perché la trascrizione dei geni *FT1* e *FT2* è temporalmente e spazialmente separata ed è sotto la regolazione di fattori endogeni ed ambientali. In pioppo (*Populus deltoides*), Hsu et al. (2011) hanno studiato l'espressione temporale dei geni *FT1/FT2,* dove è emerso che *FT*1 avvia la transizione dei meristemi vegetativi alla fase riproduttiva, mentre *FT2* controlla la crescita vegetativa, compresa la cessazione della crescita, il germogliamento e l'induzione della dormienza. In *Arabidopsis*, l'attivazione della trascrizione *FLOWERING LOCUS T (FT)* nel tessuto vascolare fogliare (floema) induce la fioritura. Il declino della formazione avventizia delle radici è legato anche al passaggio dall'interruttore ontogenetico vegetativo a quello floreale, probabilmente a causa dell'omeostasi dell'auxina. L'auxina, infatti, partecipa non solo ai processi di radicazione avventizia ma regola molte funzioni della pianta, tra cui quello di segnale di controllo che sincronizza lo sviluppo dei fiori. Il declino correlato alle radici nel radicamento avventizio è legato ai segnali che controllano il passaggio alla fioritura o subito dopo e non a un segnale o a una competizione di risorse prodotta dai fiori stessi (Rasmussen et al., 2015). Il gene *FT1* è stato analizzato in foglia ma nei mesi di campionamento (febbraio-aprile) non è risultato espresso. Questo dato conferma il fatto che la pianta è sottoposta ad una ciclicità, ad una periodicità, che porta all'attivazione di pathway diversi che contribuiscono alle diverse funzioni della pianta.

## 3.3 Analisi istologiche

La maturità del germoglio utilizzato per la preparazione del taglio sembra influenzare fortemente le prestazioni di radicazione (Therios, 2009). Gli espianti prelevati dai tessuti giovanili della pianta mostrano una capacità di radicazione superiore a quella prelevata dalla parte matura dell'albero, generalmente quella distale. In olivo è stato osservato un anello continuo di sclerenchima tra il floema e la corteccia (Ayoub e Qrunfleh, 2008). Questo è considerato un tratto caratteristico del genere *Olea* (Ayoub e Qrunfleh, 2006). Studi pubblicati da Macedo et al. (2013) hanno dimostrato che nelle talee di *Olea europaea* cv. "Cobrancosa" facile da radicare i primordi radicali si sono formati nelle cellule del cambio. Le analisi morfo-anatomiche evidenziano che nella corteccia dei rami fruttiferi delle due cvs è presente uno strato continuo di grosse cellule parenchimatiche, con grosso vacuolo, mentre nei succhioni è presente solo in Leccino. Le fibre sclerenchimatiche del floema sono disposte a gruppetti isolati nei rami fruttiferi e succhioni di Leccino e nei succhioni di Salviana. Nei rami fruttiferi di Salviana invece, le fibre sclerenchimatiche, costituiscono uno strato continuo. Nelle talee che hanno attivato il processo di radicazione, si può notare che nel ramo fruttifero di Salviana (Fig. 62A), la radice avventizia prolifera nel floema secondario e nella corteccia, lasciando quasi inalterato il cambio e lo xilema (freccia, Fig. 62A). Nel ramo succhione (Fig. 62B), invece, la proliferazione della radice avventizia sembra originarsi dallo xilema (Fig. 62B freccia), interessando anche

il midollo, e organizzarsi in una struttura dove si stanno differenziando dei fasci vascolari. In Leccino, il meristema della radice avventizia fra lo xilema e il cambio (Fig. 62C freccia), dà origine a una struttura che si sta organizzando nella corteccia. In tutti i casi le fibre sclerenchimatiche sono spinte verso l'esterno, alla periferia della radice.

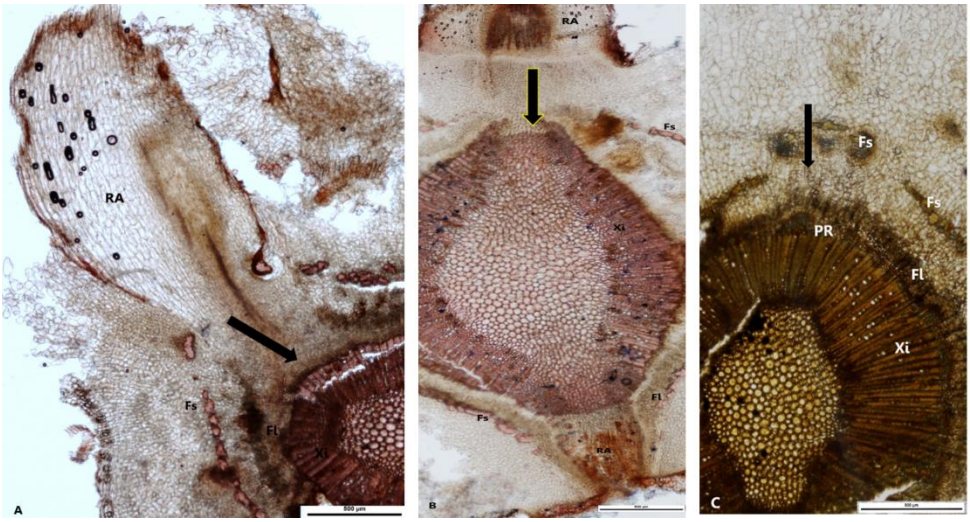



Fig.62 Sezioni trasversali di talee di *Olea europaea*: A e B cv. Salviana rispettivamente ramo fruttifero e ramo succhione colorati con Safranina; C cv. Leccino ramo fruttifero colorato con Lugol. *Fs*: fibre sclerenchimatiche; *Fl*: floema; *Xi*: xilema; *RA*: radice avventizia; *PR*: meristema di radice avventizia.

Studi precedenti hanno confrontato talee di olivo facili e difficili da radicare e non hanno osservato differenze anatomiche tra i genotipi studiati. È stato osservato un anello di fibre sclerenchimatiche continuo tra il floema e la corteccia (Ayoub e Qrunfleh, 2008; Peixe et al., 2007b). Questa è considerata una caratteristica del genere Olea (Ayoub e Qrunfleh, 2006) ed è stata precedentemente indicata come una possibile barriera meccanica all'emersione delle radici in cultivar recalcitranti (Ciampi e Gellini, 1963; Qrunfleh et al., 1994; Salama et al., 1987). Tuttavia, i dati più recenti sull'argomento dimostrano che un anello di questo tipo, anche con 3-6 strati cellulari, non può essere un fattore limitante per la radicazione (Ayoub e Qrunfleh, 2006, 2008). Altamura (1996) aveva già suggerito di escludere questa relazione putativa tra l'anello sclerenchimatico e la capacità di radicazione avventizia di una specie per due fattori:

1) l'espansione e la proliferazione delle cellule indotta dai trattamenti con auxina possono causare rotture dell'anello sclerenchimatico;
2) il primordio radicale in via di sviluppo, invece di spingere attraverso l'anello, può aggirarlo, rivolgendosi verso il basso ed emergendo dalla base della talea.

Anche nella Grevillea spp. come nell'olivo, cultivar con diversa capacità di radicazione hanno presentato talee di fusto che erano anatomicamente simili, con un anello di sclerenchima continuo che separa la corteccia dal floema. Tuttavia, a differenza dell'olivo, sono stati osservati cambiamenti anatomici diversi durante la radicazione delle talee di Grevillea. Nelle cultivar di facile attecchimento, la divisione cellulare è stata osservata solo in un'area localizzata del tessuto vascolare, spostando le fibre sclerenchima, lasciando inalterate le altre regioni di questi tessuti. Al contrario, le cultivar di difficile cultivar di difficile radicazione hanno mostrato una rapida divisione cellulare in tutti i tessuti (eccetto il midollo) e una totale disaggregazione dello sclerenchima, ma questi eventi non hanno portato all'organizzazione di nuove cellule per formare i primordi radicali. Gli autori suggeriscono che la

minore capacità di radicazione di queste cultivar potrebbe essere correlata alla perdita di competenza a livello cellulare (Krisantini et al., 2006). Il fatto che il ramo fruttifero presenti uno strato continuo di fibre sclerenchimatiche e lasci inalterato il cambio e il floema potrebbe spiegare la predisposizione maggiore di questo tessuto e di questa varietà alla radicazione, rispetto alla cv. Leccino.

# 4. CONCLUSIONI

La propagazione mediante talee è fondamentale per molte industrie frutticole, forestali e orticole, compresa la coltivazione del melo (*Malus domestica*), dell'uva (*Vitis vinifera*) e delle drupacee. Oltre all'importanza economica ed ecologica delle radici avventizie, svolgono un ruolo chiave per la nostra esistenza.

La radicazione avventizia è regolata da una rete di segnalazione che regola l'inizio e l'emergenza delle radici, con un aumento dei flussi di auxina e dell'etilene e l'inibizione della citochinina e degli stringolattoni. I risultati sono in accordo con gli studi effettuati in vitro da Porfirio et al., 2016. Il periodo dell'anno in cui vengono prelevate le talee sembra influire sulle prestazioni di radicazione ed è quindi importante scegliere la stagione ideale per ottenere la massima risposta alla radicazione. Nonostante alcuni risultati discordanti (Mousa, 2003; Talaie e Ghassemi, 1996), esiste una tendenza stagionale per la percentuale di radicazione, con un massimo in estate e minima durante l'autunno e l'inverno (Da Silva et al., 2012; De Oliveira, 2003; Fouad et al., 1990; Gellini, 1965; Mancuso, 1998; Therios, 2009). Le differenze nella risposta alla radicazione sono attribuite al comportamento alterno delle piante, che può essere correlato ai cambiamenti di carboidrati nel corso delle stagioni (Denaxa et al., 2012; De Oliveira et al., 2003). Anche la vicinanza al raccolto è stata indicata come una spiegazione per una migliore risposta alla radicazione in un determinato periodo dell'anno (De Oliveira, 2009). Tuttavia, anche la giovanilità deve essere presa in considerazione: mentre le talee giovani hanno ottime prestazioni di radicazione, le talee mature radicano meglio se prelevate in tarda primavera e/o estate (Therios, 2009).

Dalle analisi effettuate mediante PCR-Real time si conferma l'importanza dell'amido e di altri zuccheri nei processi di radicazione avventizia. I carboidrati svolgono un ruolo importante, non solo fornendo energia per i processi biosintetici in nuovi meristemi e radici, ma anche influenzando l'espressione genica, in co-azione con l'auxina. Il gene *BAM1* è maggiormente espresso in Salviana, varietà che dalle evidenze morfologiche ha evidenziato una tendenza maggiore alla radicazione, rispetto a Leccino, dove l'induzione a radicare è minore. Differenze si riscontrano anche a livello di tessuto, dove il ramo fruttifero presenta un profilo di espressione migliore rispetto al succhione. Questo può essere anche dato dal fatto che i tessuti giovani potrebbero essere soggetti ad una diversa regolazione dell'espressione dei geni. Il gene *AOX2* ha invece mostrato risultati contrastanti rispetto alle evidenze morfologiche. Secondo lo studio di Hedayati et al. 2015., i trascritti *OeAOX2* sono indotti in particolare nei genotipi che presentano un'elevata capacità di radicare. I fattori di trascrizione *ARF8* e *ARF17* seguono l'andamento stagionale di olivo; infatti, l'espressione è maggiore nei periodi di ripresa vegetativa e minima nei periodi di dicembre-febbraio. I valori di *ARF8* nei mesi di marzo e aprile sono il doppio rispetto ai risultati ottenuti su *ARF17* negli stessi mesi.

Ponendo invece la nostra attenzione sui trasportatori auxinici PIN1a, PIN5a, PIN8 e AUX1, si può notare come queste siano in linea con la diversa tendenza stagionale alla radicazione. Una maggiore comprensione delle proteine di trasporto dell'auxina ha contribuito a perfezionare i precedenti modelli di trasporto dell'auxina e ha evidenziato come cambiamenti a livello cellulare regolano il flusso auxinico. Le auxine, infatti, essendo regolatori positivi, partecipano ai processi di radicazione. I geni *PIN* sono maggiormente espressi nei periodi di ripresa vegetativa (fine febbraio) e si nota come la loro espressione segua l'andamento del gene *BAM1*. L'espressione dei geni *PIN*,

in particolare *PIN1a* e *PIN5a*, aumenta nel mese di febbraio, mese in cui si assiste anche ad un aumento dell'espressione della β-amilasi. Si può quindi supporre che il contenuto di carboidrati nel corso delle stagioni possa influire sulla percentuale di radicazione e sul trasporto auxinico. Nell'olivo c'è quindi una periodicità stagionale, come si può riscontrare dai diversi profili d'espressione dei geni studiati. Tuttavia, non è l'unico fattore determinante la diversa capacità di radicazione nelle diverse cvs di olivo e le evidenze istologiche mostrano come la diversa distribuzione delle fibre sclerenchimatiche potrebbe influire sull'efficienza di radicazione. Dalle analisi morfo-anatomiche è emerso come nei succhioni sia presente uno xilema molto più sviluppato. Nella corteccia dei rami fruttiferi delle due cvs è presente uno strato continuo di grosse cellule parenchimatiche, con grosso vacuolo. Queste grosse cellule parenchimatiche sono tuttavia assenti nei rami fruttiferi di Leccino. Conoscere il periodo ottimale per il prelievo delle talee è utile a tutte le industrie forestali e orticole, per ottenere delle rese ottimali e far fronte alle richieste sempre più importanti da parte degli allevamenti intensivi.

Con questo studio sono state poste le basi per individuare determinanti genici da impiegare come marcatori molecolari, utili nell'individuazione del periodo in cui la pianta è predisposta ad accettare segnali che modificano il destino cellulare in direzione della Cell Fondation da cui si originano le radici avventizie.

BIBLIOGRAFIA

Abarca, D. (2021). Identifying Molecular Chechkpoints for Adventitious Root Induction: Are We Ready to Fill the Gaps? *Frontiers in Plant Science*, *12*, 341.

Acosta, M., Oliveros-Valenzuela, M. R., Nicolás, C., & Sánchez-Bravo, J. (2009). Rooting of carnation cuttings: the auxin signal. *Plant Signaling & Behavior*, *4*(3), 234-236.

Agnoletti, M., & Emanueli, F. (Eds.). (2016). *Biocultural diversity in Europe*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing.

Aguirrezabal, L. A. N., Pellerin, S., & Tardieu, F. (1993). Carbon nutrition, root branching and elongation: can the present state of knowledge allow a predictive approach at a whole-plant level? *Environmental and Experimental Botany*, *33*(1), 121-130.

Agulló-Antón, M. Á., Sánchez-Bravo, J., Acosta, M., & Druege, U. (2011). Auxins or sugars: what makes the difference in the adventitious rooting of stored carnation cuttings? *Journal of Plant Growth Regulation*, *30*(1), 100-113.

Agulló-Antón, M. Á., Ferrández-Ayela, A., Fernández-García, N., Nicolás, C., Albacete, A., Pérez-Alfocea, F., ... & Acosta, M. (2014). Early steps of adventitious rooting: morphology, hormonal profiling and carbohydrate turnover in carnation stem cuttings. *Physiologia plantarum*, *150*(3), 446-462.

Ahkami, A. H., Lischewski, S., Haensch, K. T., Porfirova, S., Hofmann, J., Rolletschek, H., ... & Hajirezaei, M. R. (2009). Molecular physiology of adventitious root formation in Petunia hybrida cuttings: involvement of wound response and primary metabolism. *New Phytologist*, *181*(3), 613-625.

Ahkami, A. H., Melzer, M., Ghaffari, M. R., Pollmann, S., Javid, M. G., Shahinnia, F., et al. (2013). Distribution of indole-3-acetic acid in Petunia hybrida shoot tip cuttings and relationship between auxin transport, carbohydrate metabolism and adventitious root formation. Planta. 238, 499–517. doi: 10.1007/s00425-013-1907-z

Ahkami, A., Scholz, U., Steuernagel, B., Strickert, M., Haensch, K. T., Druege, U., ... & Hajirezaei, M. R. (2014). Comprehensive transcriptome analysis unravels the existence of crucial genes regulating primary metabolism during adventitious root formation in Petunia hybrida. *PLoS One*, *9*(6), e100997.

Aida, M., Beis, D., Heidstra, R., Willemsen, V., Blilou, I., Galinha, C., ... & Scheres, B. (2004). The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche. *Cell*, *119*(1), 109-120.

Alabadí, D., Aguero, M. S., Pérez-Amador, M. A., & Carbonell, J. (1996). Arginase, arginine decarboxylase, ornithine decarboxylase, and polyamines in tomato ovaries (changes in unpollinated ovaries and parthenocarpic fruits induced by auxin or gibberellin). *Plant Physiology*, *112*(3), 1237-1244.

Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C. & Tiburcio, A. F. (2010). Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. Planta, 231(6), 1237-1249

Ali, A., Ahmad, T., Abbasi, N. A., & Hafiz, I. A. (2009). Effect of different concentrations of auxins on in vitro rooting of olive cultivar 'Moraiolo'. *Pak. J. Bot*, *41*(3), 1223-1231.

Ali, A. H. N., & Jarvis, B. C. (1988). Effects of auxin and boron on nucleic acid metabolism and cell division during adventitious root regeneration. *New phytologist*, *108*(4), 383-391.

Altamura, M. M. (1996). Root histogenesis in herbaceous and woody explants cultured in vitro. A critical review. *Agronomie*, *16*(10), 589-602.

Altamura, M. M., Torrigiani, P., Capitani, F., Scaramagli, S., & Bagni, N. (1991). De novo root formation in tobacco thin layers is affected by inhibition of polyamine biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, *42*(12), 1575-1582.

Altamura, M. M., Torrigiani, P., Falasca, G., Rossini, P., & Bagni, N. (1993). Morpho-funcional gradients in superficial and deep tissues along tobacco stem: polyamine levels, biosynthesis and oxidation, and organogenesis in vitro. *Journal of Plant Physiology*, *142*(5), 543-551.

Altman, A., & Wareing, P. F. (1975). The effect of IAA on sugar accumulation and basipetal transport of 14C-labelled assimilates in relation to root formation in Phaseolus vulgaris cuttings. *Physiologia Plantarum*, *33*(1), 32-38.

Amirsadeghi, S., Robson, C. A., McDonald, A. E., & Vanlerberghe, G. C. (2006). Changes in plant mitochondrial electron transport alter cellular levels of reactive oxygen species and susceptibility to cell death signaling molecules. *Plant and Cell Physiology*, *47*(11), 1509-1519.

Amore A, Giacobbe S, Faraco V (2013) Regulation of cellulase and hemicellulase gene expression in fungi. Curr Genomics 14(4):230–249

Angiolillo A, Mencuccini M, Baldoni L (1999) Olive genetic diversity assessed using amplified polymorphic fragment length polymorphisms. Theor Appl Genet 98:411–421.

Antonini, E.; Farina, A.; Scarpa, E.S.; Frati, A.; Ninfali, P. Quantity and quality of secoiridoids and lignans in extra virgin olive oils: The effect of two- and three-way decanters on Leccino and Raggiola olive cultivars. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2016**, *67*, 9–15.

Apel, K.; Hirt, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2004**, *55*, 373–399.

Arnholdt-Schmitt, B.; Costa, J.H.; de Melo, D.F. AOX—A functional marker for efficient cell reprogramming under stress? *Trends Plant Sci.* **2006a**, *11*, 281–287.

Arnholdt-Schmitt, B.; Santos Macedo, E.; Peixe, A.; Cardoso, H.; Cordeiro, A. AOX—A potential functional marker for efficient rooting in olive shoot cuttings. In Proceedings of the Second International Seminar Olivebioteq, Marsala Mazara del Vallo, Italy, 5–10 November 2006b; pp. 249–254.

Aslmoshtaghi, E., & Shahsavar, A. R. (2010). Endogenous soluble sugars, starch contents and phenolic compounds in easy- and difficult–to–root olive cuttings.

Ayoub, S. J., & Qrunfleh, M. M. (2006, August). A study on some physiological and anatomical aspects of rooting'Nabali'and'Raseei'olive semi-hardwood stem cuttings. In *XXVII International Horticultural Congress-IHC2006: International Symposium on Citrus and Other Tropical and Subtropical 773* (pp. 221-226).

Ayoub, S., Qrunfleh, M.M., 2008. A study on some physiological and anatomical aspects of rooting 'Nabali' and 'Raseei' olive semi-hardwood stem cuttings. Acta Hortic. 773, 221–226

Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J. M., & Sheen, J. (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, *448*(7156), 938-942.

Bais, H.P. & Ravishankar, G.A. (2002). Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 69(1), 1-34

Bak S, Tax FE, Feldmann KA, Galbraith DW, Feyereisen R. 2001. CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis. Plant Cell 13, 101–111.

Band, L. R., Wells, D. M., Fozard, J. A., Ghetiu, T., French, A. P., Pound, M. P., ... & Bennett, M. J. (2014). Systems analysis of auxin transport in the Arabidopsis root apex. The Plant Cell, 26(3), 862-875.

Bandurski, R. S., Cohen, J. D., Slovin, J. P., & Reinecke, D. M. (1995). Auxin biosynthesis and metabolism. In *Plant hormones* (pp. 39-65). Springer, Dordrecht.

Bannoud, F., & Bellini, C. (2021). Adventitious rooting in Populus species: Update and perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 918.

Bansal, M. P., & Nanda, K. K. (1981). IAA oxidase activity in relation to adventitious root formation on stem cuttings of some forest tree species. *Experientia*, *37*(12), 1273-1274.

Barbez, E., Kubeš, M., Rolčík, J., Béziat, C., Pěnčík, A., Wang, B., ... & Kleine-Vehn, J. (2012). A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. *Nature*, *485*(7396), 119-122.

Barcaccia, G., Falcin Barcaccia, G., Falcinelli M., (2006). Genetica e genomica, Vol III Genomica e Biotecnologie genetiche. Liguori Editore. 739-740.

Bartel, B. and Fink, G.R. (1995). ILR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates. Science, 268, 1745–1748.

Bartolini G, Prevost G, Messeri C, Carignani C (2005) Olive Germplasm: cultivars and world-wide collections. FAO/Plant Production and Protection, Rome

Bellamine, J., Penel, C., Greppin, H., & Gaspar, T. (1998). Confirmation of the role of auxin and calcium in the late phases of adventitious root formation. *Plant growth regulation*, *26*(3), 191-194.

Bellini, C., Pacurar, D. I., & Perrone, I. (2014). Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annu Rev Plant Biol*, *65*(1), 639-666.

Benfey, P. N., & Scheres, B. (2000). Root development. *Current Biology*, *10*(22), R813-R815.

Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G., & Friml, J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, *115*(5), 591-602.

Bennett, M. J., Marchant, A., Green, H. G., May, S. T., Ward, S. P., Millner, P. A., ... & Feldmann, K. A. (1996). Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science*, *273*(5277), 948-950.

Bertram, L., & Veierskov, B. (1989). A relationship between irradiation, carbohydrates and rooting in cuttings of Pisum sativum. *Physiologia plantarum*, *76*(1), 81-85.

Besnard G, Baradat P, Breton C, Khadari B, Bervillé A (2001b) Olive domestication from structure of oleasters and cultivars using nuclear RAPDs and mitochondrial RFLPs. Genet Sel Evol 33: S251–S2

Besnard G, El Bakkali A, Haouane H, Baali-Cherif D, Moukhli A et al (2013a) Population genetics of Mediterranean and Saharan olives: geographic patterns of differentiation and evidence for early-generations of admixture. Ann Bot 112:1293–1302

Besnard G, Khadari B, Navascués M, Mazuecos-Fernandez M, El Bakkali A et al (2013b) The complex history of the olive tree: from late quaternary diversification of mediterranean lineages to primary domestication in the northern Levant. Proc Roy Soc Lond B 280:20122833

Besnard, G., Terral, J. F., & Cornille, A. (2018). On the origins and domestication of the olive: a review and perspectives. *Annals of botany*, *121*(3), 385-403.

Biondi, S., Diaz, T., Iglesias, I., Gamberini, G., & Bagni, N. (1990). Polyamines and ethylene in relation to adventitious root formation in Prunus avium shoot cultures. Physiologia Plantarum, 78(3), 474-483.

Blakeslee, J. J., Peer, W. A., & Murphy, A. S. (2005). Auxin transport. Current opinion in plant biology, 8(5), 494-500.

Blakeslee, J. J., Spatola Rossi, T., & Kriechbaumer, V. (2019). Auxin biosynthesis: spatial regulation and adaptation to stress. *Journal of Experimental Botany*, *70*(19), 5041-5049.

Blakesley, D. (1994). *Auxin Metabolism and Adventitious Root Initiation. Biology of Adventitious Root Formation, 143–154*. doi: 10.1007/978-1-4757-9492-2_11

Blakesley, D., Weston, G., Hall, J., 1991. The role of endogenous auxin in root initiation. Plant Growth Regul. 10, 341–353

Bläsing, O. E., Gibon, Y., Günther, M., Höhne, M., Morcuende, R., Osuna, D., ... & Stitt, M. (2005). Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *17*(12), 3257-3281.

Bleecker, A. B., & Kende, H. (2000). Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual review of cell and developmental biology*, *16*(1), 1-18.

Boerjan, W., Cervera, M. T., Delarue, M., Beeckman, T., Dewitte, W., Bellini, C., ... & Inzé, D. (1995). Superroot, a recessive mutation in Arabidopsis, confers auxin overproduction. *The Plant Cell*, *7*(9), 1405-1419.

Bower PJ, Brown HM, Purves WK. 1978. Cucumber seedling indoleacetaldehyde oxidase. Plant Physiology 61, 107–110.

Boyle, M. G., Boyer, J. S., & Morgan, P. W. (1991). Stem infusion of liquid culture medium prevents reproductive failure of maize at low water potential. *Crop Science*, *31*(5), 1246-1252.

Brinker, M., van Zyl, L., Liu, W., Craig, D., Sederoff, R. R., Clapham, D. H., & von Arnold, S. (2004). Microarray analysis of gene expression during adventitious root development in Pinus contorta. *Plant physiology*, *135*(3), 1526-1539.

Bustan, A., Avni, A., Lavee, S., Zipori, I., Yeselson, Y., Schaffer, A. A., ... & Dag, A. (2011). Role of carbohydrate reserves in yield production of intensively cultivated oil olive (Olea europaea L.) trees. *Tree physiology*, *31*(5), 519-530.

Caboni, E., Tonelli, M. G., Lauri, P., Iacovacci, P., Kevers, C., Damiano, C., & Gaspar, T. (1997). Biochemical aspects of almond microcuttings related to in vitro rooting ability. *Biologia Plantarum*, *39*(1), 91-97.

Cannon, W. A. (1949). A tentative classification of root systems. *Ecology*, 542-548.

Cardoso, H., Peixe, A., Bellini, C., Porfírio, S., & Druege, U. (2022). Advances on the Biological Mechanisms Involved in Adventitious Root Formation: From Signaling to Morphogenesis. *Frontiers in Plant Science*, *13*.

Carrión Y, Ntinou M, Badal E (2010) Olea europaea L. in the north mediterranean basin during the Pleniglacial and the early-middle Holocene. Quat Sci Rev 29:952–968

Carvajal, M., Cooke, D. T., & Clarkson, D. T. (1996). Plasma membrane fluidity and hydraulic conductance in wheat roots: interactions between root temperature and nitrate or phosphate deprivation. *Plant, Cell & Environment*, *19*(9), 1110-1114.

Casanova-Sáez, R.; Voß, U. (2019). Auxin metabolism controls developmental decisions in land plants. Trends Plant Science, 24, 741–754.

Caspar, T., Huber, S. C., & Somerville, C. (1985). Alterations in growth, photosynthesis, and respiration in a starchless mutant of Arabidopsis thaliana (L.) deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant Physiology*, *79*(1), 11-17.

Chailakhian, M. K. (1961). Principles of ontogenesis and physiology of flowering in higher plants. *Canadian Journal of Botany*, *39*(7), 1817-1841.

Chandler J.W. (2009). Local auxin production: a small contribution to a big field. Bioessays, 31, 60–70.

Chapman, E. J., & Estelle, M. (2009). Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annual review of genetics*, *43*(1), 265-285.

Chatterton, N. J., & SILVIUS, J. E. (1980). Photosynthate partitioning into leaf starch as affected by daily photosynthetic period duration in six species. *Physiologia plantarum*, *49*(2), 141-144.

Chatterton, N. J., & Silvius, J. E. (1979). Photosynthate partitioning into starch in soybean leaves: I. Effects of photoperiod versus photosynthetic period duration. *Plant Physiology*, *64*(5), 749-753.

Chatterton, N. J., & Silvius, J. E. (1981). Photosynthate partitioning into starch in soybean leaves: II. Irradiance level and daily photosynthetic period duration effects. *Plant Physiology*, *67*(2), 257-260.

Cheng, Y., & Zhao, Y. (2007). A role for auxin in flower development. *Journal of integrative plant biology*, *49*(1), 99-104.

Chen, L.Q.; Tong, J.H.; Xiao, L.T.; Ruan, Y.; Liu, J.C.; Zeng, M.H.; Huang, H.; Wang, J.W.; Xu, L. YUCCA-mediated auxin biogenesis is required for cell fate transition occurring during de novo root organogenesis in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* **2016**, *67*, 4273–4284

Chen, Q., Westfall, C. S., Hicks, L. M., Wang, S. & Jez, J. M. (2010). Kinetic basis for the conjugation of auxin by a GH3 family indole-acetic acid-amido synthetase. Journal of Biological Chemistry, 285(39), 29780-29786

Chevalier A (1948) L'origine de l'Olivier cultivé et ses variations. Rev Int Bot Appl Agri Trop 28:1–25

Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Messerli, G., Chen, J., Zeeman, S. C., ... & Smith, A. M. (2004). A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in Arabidopsis leaves at night. *The Plant Journal*, *37*(6), 853-863.

Ciampi, C., & Gellini, R. (1963). Insorgenza e sviluppo Delle Radici Avventizie In Olea Europaea L.: Importanza della struttura anatomica agli effetti dello sviluppo delle radichette. *Plant Biosystem*, *70*(1), 62-74.

Ciferri R, Breviglieri N (1942) Introduzione ad una classificazione morfo-ecologica dell'olivo coltivato in Italia. L'Olivicoltore 19:1–7

Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., ... & Coupland, G. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of Arabidopsis. *science*, *316*(5827), 1030-1033.

Cohen, S. S. (1998). Guide to the Polyamines. Oxford University Press.

Collet, G. F., & LE, L. C. (1987). Micropropagation de porte-greffes de pommier et de poirier. I: Etablissement et multiplication in vitro de Pyrus malus L.(M25, M26, M27, MM106, M9 type Jork) et de Cydonia oblonga Mill.(A). *Revue suisse de viticulture, arboriculture, horticulture*, *19*(4), 253-259.

Constabel, C. P., & Barbehenn, R. (2008). Defensive roles of polyphenol oxidase in plants. In *Induced plant resistance to herbivory* (pp. 253-270). Springer, Dordrecht.

Couée, I., Hummel, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., & El Amrani, A. (2004). Involvement of polyamines in root development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *76*(1), 1-10. heng, Y., & Zhao, Y. (2007). A role for auxin in flower development. *Journal of integrative plant biology*, *49*(1), 99-104.

Da Costa, C. T., de Almeida, M. R., Ruedell, C. M., Schwambach, J., Maraschin, F. S., & Fett-Neto, A. G. (2013). When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Frontiers in plant science*, *4*, 133.

Dai X, Mashiguchi K, Chen Q, Kasahara H, Kamiya Y, Ojha S, Dubois J, Ballou D, Zhao Y. 2013. The biochemical mechanism of auxin biosynthesis by an Arabidopsis YUCCA flavin-containing monooxygenase. Journal of Biological Chemistry 288, 1448–1457.

Dal Bosco, C., Dovzhenko, A., & Palme, K. (2012). Intracellular auxin transport in pollen: PIN8, PIN5 and PILS5. *Plant signaling & behavior*, *7*(11), 1504-1505.

Da Silva, L.F.O., De Oliveira, A.F., Pio, R., Zambon, C., Oliveira, D.L., 2012. Enraizamento de estacas semilenhosas de cultivares de oliveira. Bragantia 71, 488–492.

Davies, F. T., Davis, T. D., & Kester, D. E. (1994). Commercial importance of adventitious rooting to horticulture. In *Biology of adventitious root formation* (pp. 53-59). Springer, Boston, MA.

Deak, K. I., & Malamy, J. (2005). Osmotic regulation of root system architecture. *The Plant Journal*, *43*(1), 17-28.

De Klerk, G. J., Brugge, J. T., & Marinova, S. (1997). Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation in vitro in Malus 'Jork 9'. *Plant cell, tissue and organ culture*, *49*(1), 39-44.

De Klerk, G. J. (1996). Markers of adventitious root formation. *Agronomie*, *16*(10), 609-616.

De Klerk, G. J., Van Der Krieken, W., & de Jong, J. C. (1999). Review the formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *35*(3), 189-199.

Delessert, C., Wilson, I., Van Der Straeten, D., Dennis, E., & Dolferus, R. (2004). Spatial and temporal analysis of the local response to wounding. *Plant molecular biology*, *55*(2), 165-181.

Della Rovere, F., Fattorini, L., D'angeli, S., Veloccia, A., Falasca, G., & Altamura, M. M. (2013). Auxin and cytokinin control formation of the quiescent centre in the adventitious root apex of Arabidopsis. *Annals of Botany*, *112*(7), 1395-1407.

del Rocio Oliveros-Valenzuela, M., Reyes, D., Sanchez-Bravo, J., Acosta, M., & Nicolas, C. (2008). Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an auxin influx carrier in carnation cuttings. Expression in different organs and cultivars and its relationship with cold storage. *Plant Physiology and Biochemistry*, *46*(12), 1071-1076.

Denaxa, N. K., Vemmos, S. N., & Roussos, P. A. (2012). The role of endogenous carbohydrates and seasonal variation in rooting ability of cuttings of an easy and a hard to root olive cultivars (Olea europaea L.). Scientia Horticulturae, 143, 19-28.

De Oliveira, A., Pasqual, M., Chalfun, N.N.J., Regina, M. de A., Rincón, C.D.R., 2003. Enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira sob efeito de diferentes épocas, substratos e concentrações de ácido indolbutirico. Ciência e Agrotecnologia 27, 117–125.

De Oliveira, A.F., Chalfun, N.N.J., Alvarenga, Â.A., Vieira Neto, J., Pio, R., Oliveira, D.L. de, 2009. Estaquia de oliveira em diferentes épocas, substratos e doses de AIB diluído em NaOH e álcool. Ciência e Agrotecnologia 33, 79–85.

De Oliveira, A.F., Pasqual, M., Chalfun, N.N.J., Regina, M. de A., Rincón, C.D.R., 2003. Influência do número de nós em estacas semilenhosas de oliveira (Olea europaea L.) no enraizamento sob câmara de nebulização. Ciência e Agrotecnologia 27, 332–338.

De Rybel, B., Audenaert, D., Xuan, W., Overvoorde, P., Strader, L. C., Kepinski, S., ... & Beeckman, T. (2012). A role for the root cap in root branching revealed by the non-auxin probe naxillin. *Nature chemical biology*, *8*(9), 798-805.

De Smet, I., Tetsumura, T., De Rybel, B., Frey, N. F. D., Laplaze, L., Casimiro, I., ... & Beeckman, T. (2007). Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of Arabidopsis.

Dexter, A. R. (1987). Mechanics of root growth. *Plant and soil*, *98*(3), 303-312.

Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., & Estelle, M. (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, *435*(7041), 441-445.

Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Lechner, E., Yamada, M., Hobbie, L., ... & Estelle, M. (2005). Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Developmental cell*, *9*(1), 109-119.

Dhonukshe, P.; Brewer, P.B.; Friml, J. Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: A means to coordinate plant development. Cell. Mol. Life Sci. C 2006, 63, 2738–2754

Dick, J. M., & Dewar, R. C. (1992). A mechanistic model of carbohydrate dynamics during adventitious root development in leafy cuttings. *Annals of Botany*, *70*(4), 371-377.

Di, D. W., Zhang, C., Luo, P., An, C. W., & Guo, G. Q. (2016). The biosynthesis of auxin: how many paths truly lead to IAA? *Plant growth regulation*, *78*(3), 275-285.

Diez, C. M., Trujillo, I., Martinez-Urdiroz, N., Barranco, D., Rallo, L., Marfil, P., & Gaut, B. S. (2015). Olive domestication and diversification in the Mediterranean Basin. *New Phytologist*, *206*(1), 436-447.

Di Fiore, S., Li, Q., Leech, M. J., Schuster, F., Emans, N., Fischer, R., & Schillberg, S. (2002). Targeting tryptophan decarboxylase to selected subcellular compartments of tobacco plants affects enzyme stability and in vivo function and leads to a lesion-mimic phenotype. *Plant Physiology*, *129*(3), 1160-1169.

Ding, Z., Wang, B., Moreno, I., Dupláková, N., Simon, S., Carraro, N., ... & Friml, J. (2012). ER-localized auxin transporter PIN8 regulates auxin homeostasis and male gametophyte development in Arabidopsis. *Nature communications*, *3*(1), 1-11.

Dinneny, J. R., & Benfey, P. N. (2005). Stem cell research goes underground: The Retinoblastoma-related gene in root development. *Cell*, *123*(7), 1180-1182.

dos Santos Maraschin, F., Memelink, J., & Offringa, R. (2009). Auxin-induced, SCFTIR1-mediated poly-ubiquitination marks AUX/IAA proteins for degradation. *The Plant Journal*, *59*(1), 100-109.

Drossopoulos, J. B., & Niavis, C. A. (1988). Seasonal changes of the metabolites in the leaves, bark and xylem tissues of olive tree (Olea europaea. L) II. Carbohydrates. *Annals of Botany*, *62*(3), 321-327.

Druege, U. (2006). Ethylene and plant responses to abiotic stress. In Ethylene action in plants (pp. 81-118). Springer, Berlin, Heidelberg.

Druege, U., Franken, P., & Hajirezaei, M. R. (2016). Plant hormone homeostasis, signaling, and function during adventitious root formation in cuttings. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 381.

Druege, U., Hilo, A., Pérez-Pérez, J. M., Klopotek, Y., Acosta, M., Shahinnia, F., ... & Hajirezaei, M. R. (2019). Molecular and physiological control of adventitious rooting in cuttings: phytohormone action meets resource allocation. *Annals of botany*, *123*(6), 929-949.

Druege, U., & Kadner, R. (2008). Response of post-storage carbohydrate levels in pelargonium cuttings to reduced air temperature during rooting and the relationship with leaf senescence and adventitious root formation. *Postharvest Biology and Technology*, *47*(1), 126-135.

Druege, U., Zerche, S., & Kadner, R. (2004). Nitrogen-and storage-affected carbohydrate partitioning in high-light-adapted Pelargonium cuttings in relation to survival and adventitious root formation under low light. Annals of Botany, 94(6), 831-842.

Druege, U., Zerche, S., Kadner, R., & Ernst, M. (2000). Relation between nitrogen status, carbohydrate distribution and subsequent rooting of chrysanthemum cuttings as affected by pre-harvest nitrogen supply and cold storage. Annals of Botany, 85(5), 687-701.

Dutilleul, C., Garmier, M., Noctor, G., Mathieu, C., Chétrit, P., Foyer, C. H., & de Paepe, R. (2003). Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. *The Plant Cell*, *15*(5), 1212-1226.

Eliezer Goldschmidt, E. (2005). Regulatory aspects of alternate bearing in fruit trees. *Italus Hortus (Italy)*.

Fabbri, A., Bartolini, G., Lambardi, M., & Kailis, S. (2004). *Olive propagation manual*. Landlinks Press.

Faivre-Rampant, O., Dommes, J., Gaspar, T., D'Angeli, S., Falasca, G., & Altamura, M. M. (2003). Rooting blockage in the tobacco rac mutant occurs at the initiation phase and induces diversion to xylem differentiation. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, *137*(2), 163-174.

Falasca, G., & Altamura, M. M. (2003). Histological analysis of adventitious rooting in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh seedlings. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, *137*(3), 265-273.

Feng, H., Guan, D., Sun, K., Wang, Y., Zhang, T., & Wang, R. (2013). Expression and signal regulation of the alternative oxidase genes under abiotic stresses. *Acta Biochim Biophys Sin*, *45*(12), 985-994.

Feraru, E., Vosolsobě, S., Feraru, M. I., Petrášek, J., & Kleine-Vehn, J. (2012). Evolution and structural diversification of PILS putative auxin carriers in plants. *Frontiers in plant science*, *3*, 227.

Fiorani, F., Umbach, A. L., & Siedow, J. N. (2005). The alternative oxidase of plant mitochondria is involved in the acclimation of shoot growth at low temperature. A study of Arabidopsis AOX1a transgenic plants. *Plant physiology*, *139*(4), 1795-1805.

Fitter, A. H. (1987). An architectural approach to the comparative ecology of plant root systems. *New phytologist*, *106*, 61-77.

Fitter, A. (2002). Characteristics and functions of root systems. In *Plant roots* (pp. 49-78). CRC Press.

Ford, Y. Y., Bonham, E. C., Cameron, R. W. F., Blake, P. S., Judd, H. L., & Harrison-Murray, R. S. (2002). Adventitious rooting: examining the role of auxin in an easy-and a difficult-to-root plant. *Plant Growth Regulation*, *36*(2), 149-159.

Fouad, M., Fayek, M., Selim, H., El-Sayed, M., 1990. Rooting of eight olive cultivars under mist. Acta Horticulturae 286, 57–60.

Frankel, E. N. (2011). Nutritional and biological properties of extra virgin olive oil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, *59*(3), 785-792.

Frick, E. M., & Strader, L. C. (2018). Roles for IBA-derived auxin in plant development. *Journal of Experimental Botany*, *69*(2), 169-177.

Friedman, R. A., Altman, A., & Bachrach, U. (1982). Polyamines and root formation in mung bean hypocotyl cuttings: I. effects of exogenous compounds and changes in endogenous polyamine content. *Plant Physiology*, *70*(3), 844-848.

Friedman, R. A., Altman, A., & Bachrach, U. (1985). Polyamines and root formation in mung bean hypocotyl cuttings: II. Incorporation of precursors into polyamines. *Plant Physiology*, *79*(1), 80-83.

Friml, J. (2003). Auxin transport—shaping the plant. *Current opinion in plant biology*, *6*(1), 7-12.

Fulton, D. C., Stettler, M., Mettler, T., Vaughan, C. K., Li, J., Francisco, P., ... & Zeeman, S. C. (2008). β-AMYLASE4, a noncatalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active β-amylases in Arabidopsis chloroplasts. *The Plant Cell*, *20*(4), 1040-1058.

Galston, A. W., & Sawhney, R. K. (1990). Polyamines in plant physiology. *Plant physiology*, *94*(2), 406-410.

Galweiler, L., Guan, C., Muller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A., & Palme, K. (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue. *Science*, *282*(5397), 2226-2230.

Ganguly, A., Park, M., Kesawat, M. S., & Cho, H. T. (2014). Functional analysis of the hydrophilic loop in intracellular trafficking of Arabidopsis PIN-FORMED proteins. *The Plant Cell*, *26*(4), 1570-1585.

Garrido G, Ramón Guerrero J, Angel Cano E, Acosta M, Sánchez-Bravo J (2002) Origin and basipetal transport of the IAA responsible for rooting of carnation cuttings. Physiol Plant 114: 303–312

Gaspar T., Kevers C. and Hausman J.F. 1997. Indissociable chief factors in the inductive phase of adventitious rooting. In: Altman A. and Waisel M. (ed.), Biology of Root Formation and Development. Plenum Press, New York.

Gaspar, T., Kevers, C., Hausman, J.F., Berthon, J.Y. & Ripetti, V. (1992). Practical uses of peroxidase activity as a predictive marker of rooting performance of micropropagated shoots. Agronomie, 12(10), 757-765.

Geiger, D. R., & Servaites, J. C. (1994). Diurnal regulation of photosynthetic carbon metabolism in C3 plants. *Annual review of plant biology*, *45*(1), 235-256.

Geiger, D. R., Servaites, J. C., & Fuchs, M. A. (2000). Role of starch in carbon translocation and partitioning at the plant level. *Functional Plant Biology*, *27*(6), 571-582.

Geiss, G., Gutierrez, L., & Bellini, C. (2009). Adventitious root formation: new insights and perspectives. *Annual plant reviews*, *37*(1), 127-156.

Ge, L., & Wang, L. (2012). Molecular mechanism of adventitious root formation in rice. *Plant Growth Regulation*, *68*(3), 325-331.

Gellini, R., 1965. Seasonal variation in the rooting of olive cuttings. Atti Giorn. Stud. Prop. Spec, legn., Pisa, 1964. 76–86.

Ghosh, A., Dey, K., Mani, A., Bauri, F. K., & Mishra, D. K. (2017). Efficacia di diversi livelli di IBA e NAA sulla radicazione delle talee di Phalsa (Grewia asiatica L.). *IJCS*, *5*(6), 567-571.

Gibon, Y., Blaesing, O. E., Hannemann, J., Carillo, P., Höhne, M., Hendriks, J. H., ... & Stitt, M. (2004). A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in Arabidopsis using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *The Plant Cell*, *16*(12), 3304-3325.

Giehl, R. F., Lima, J. E., & von Wirén, N. (2012). Localized iron supply triggers lateral root elongation in Arabidopsis by altering the AUX1-mediated auxin distribution. *The Plant Cell*, *24*(1), 33-49.

Glawischnig E, Tomas A, Eisenreich W, Spiteller P, Bacher A, Gierl A. 2000. Auxin biosynthesis in maize kernels. Plant Physiology 123, 1109–1119.

Gonin, M., Bergougnoux, V., Nguyen, T. D., Gantet, P., & Champion, A. (2019). What makes adventitious roots? *Plants*, *8*(7), 240.

Gray, W. M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., & Estelle, M. (2001). Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature*, *414*(6861), 271-276.

Grieneisen, V. A., Xu, J., Marée, A. F., Hogeweg, P., & Scheres, B. (2007). Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. Nature, 449(7165), 1008-1013.

Guan, L., Murphy, A. S., Peer, W. A., Gan, L., Li, Y., & Cheng, Z. M. (2015). Physiological and molecular regulation of adventitious root formation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *34*(5), 506-521.

Guerrero, J. R., Garrido, G., Acosta, M., & Sanchez-Bravo, J. (1999). Influence of 2, 3, 5-triiodobenzoic acid and 1-N-naphthylphthalamic acid on indoleacetic acid transport in carnation cuttings: relationship with rooting. *Journal of Plant Growth Regulation*, *18*(4), 183-190.

Guilfoyle, T. J., & Hagen, G. (2007). Auxin response factors. *Current opinion in plant biology*, *10*(5), 453-460.

Guilfoyle, T. J. (2015). The PB1 domain in auxin response factor and Aux/IAA proteins: a versatile protein interaction module in the auxin response. *The Plant Cell*, *27*(1), 33-43.

Guilioni, L., Wéry, J., & Lecoeur, J. (2003). High temperature and water deficit may reduce seed number in field pea purely by decreasing plant growth rate. *Functional Plant Biology*, *30*(11), 1151-1164.

GÜNEŞ, T. (2000). Peroxidase and IAA-Oxidase Activities During Rooting in Cuttings of ThreePoplar Species. *Turkish Journal of Botany*, *24*(2), 97-102.

Gutierrez, L., Mongelard, G., Floková, K., Păcurar, D. I., Novák, O., Staswick, P., ... & Bellini, C. (2012). Auxin controls Arabidopsis adventitious root initiation by regulating jasmonic acid homeostasis. *The Plant Cell*, *24*(6), 2515-2527.

Haberman, A., Bakhshian, O., Cerezo-Medina, S., Paltiel, J., Adler, C., Ben-Ari, G., ... & Samach, A. (2017). A possible role for flowering locus T-encoding genes in interpreting environmental and internal cues affecting olive (Olea europaea L.) flower induction. *Plant, Cell & Environment*, *40*(8), 1263-1280.

Hagen, G., Kleinschmidt, A., & Guilfoyle, T. (1984). Auxin-regulated gene expression in intact soybean hypocotyl and excised hypocotyl sections. *Planta*, *162*(2), 147-153.

Haissig, B. E. (1989). Carbohydrate relations during propagation of cuttings from sexually mature Pinus banksiana trees. *Tree Physiology*, *5*(3), 319-328.

Haissig, B. E. (1974). Metabolism during adventitious root primordium initiation and development. *NZJ For. Sci*, *4*(2), 324-337.

Haissig, B. E. (1974). Origins of adventitious roots. *NZJ For. Sci*, *4*(2), 299-310.

Haissig, B. E. (1989). Removal of the stem terminal and application of auxin change carbohydrates in Pinus banksiana cuttings during propagation. *Physiologia Plantarum*, *77*(2), 179-184.

Han, H., Adamowski, M., Qi, L., Alotaibi, S. S., & Friml, J. (2021). PIN-mediated polar auxin transport regulations in plant tropic responses. *New Phytologist*, *232*(2), 510-522.

Harper, J. F., Sussman, M. R., Schaller, G. E., Putnam-Evans, C., Charbonneau, H., & Harmon, A. C. (1991). A calcium-dependent protein kinase with a regulatory domain similar to calmodulin. *Science*, *252*(5008), 951-954.

Harper, J. L. (1977). Population biology of plants. *Population biology of plants.*

Hartmann H.T., Kester D.E., Davies F.T. Jr., Geneve R.L. (2002). Hartmann and Kester's Plant Propagation: Principles and Practices, 7th edn. Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ, USA. Hartmann, H.T., & Kester, D.E. (1975). Plant propagation: principles and practices. Prentice-Hall.

Hausman, J.F., Gevers, C., & Gaspar, T. (1994). Involvement of putrescine in the inductive rooting phase of poplar shoots raised in vitro. Physiologia Plantarum, 92(2), 201-206.

Hedayati, V., Mousavi, A., Razavi, K., Cultrera, N., Alagna, F., Mariotti, R., ... & Baldoni, L. (2015). Polymorphisms in the AOX2 gene are associated with the rooting ability of olive cuttings. *Plant Cell Reports*, *34*(7), 1151-1164.

Henry, P. H., Blazich, F. A., & Hinesley, L. E. (1992). Nitrogen nutrition of containerized eastern redcedar. II. Influence of stock plant fertility on adventitious rooting of stem cuttings. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *117*(4), 568-570.

Hinsinger, P., Gobran, G. R., Gregory, P. J., & Wenzel, W. W. (2005). Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New phytologist*, *168*(2), 293-303.

Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., & Matsui, H. (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, *42*(5), 462-468.

Hoad SP, Russel G, Lucas ME, Bingham IJ (1992) The management of wheat, barley and oat root systems. Adv Agron 74:193–246 doi:10.1016/S0065-2113(01)74034-5

Hodge, A., Berta, G., Doussan, C., Merchan, F., & Crespi, M. (2009). Plant root growth, architecture and function. *Plant and soil*, *321*(1), 153-187.

Hsu, C. Y., Adams, J. P., Kim, H., No, K., Ma, C., Strauss, S. H., ... & Yuceer, C. (2011). FLOWERING LOCUS T duplication coordinates reproductive and vegetative growth in perennial poplar. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(26), 10756-10761.

Hull AK, Vij R, Celenza JL. 2000. Arabidopsis cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 97, 2379–2384.

Husen, A. (2008). Stock-plant etiolation causes drifts in total soluble sugars and anthraquinones, and promotes adventitious root formation in teak (Tectona grandis L. f.) coppice shoots. Plant Growth Regul. 54, 13–21.

Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., & Sugimoto, K. (2016). Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Development*, *143*(9), 1442-1451.

Ioio, R. D., Linhares, F. S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P., & Sabatini, S. (2007). Cytokinins determine Arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation. *Current biology*, *17*(8), 678-682.

Itoh, T., Kojima, Y., Nishioka, T., Maki, K., & Kimura, M. (2005). Root fracture in immature anterior teeth followed for 15 years. *Dental Traumatology*, *21*(4), 229-233.

Jablonski, L. M., & Geiger, D. R. (1987). Responses of sugar beet plant morphology and carbon distribution to shortened days. *Plant physiology and biochemistry (Paris)*, *25*(6), 787-796.

Jackson, R. B., Mooney, H. A., & Schulze, E. D. (1997). A global budget for fine root biomass, surface area, and nutrient contents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(14), 7362-7366.

Jarvis, B.C. (1986). Endogenous control of adventitious rooting in non woody cuttings. In New root formation in plants and cuttings (pp. 191-222). Springer, Dordrecht.

Jasik, J., & De Klerk, G.J. (1997). Anatomical and ultrastructural examination of adventitious root formation in stem slices of apple. Biologia Plantarum, 39(1), 79-90.

Jenik, P. D., Gillmor, C. S., & Lukowitz, W. (2007). Embryonic patterning in Arabidopsis thaliana. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, *23*, 207-236.

Jenness, M. K., Carraro, N., Pritchard, C. A., & Murphy, A. S. (2019). The Arabidopsis ATP-BINDING CASSETTE transporter ABCB21 regulates auxin levels in cotyledons, the root pericycle, and leaves. *Frontiers in plant science*, *10*, 806.

Jiang, K., Meng, Y. L., & Feldman, L. J. (2003). Quiescent center formation in maize roots is associated with an auxin-regulated oxidizing environment.

Joiner, J.N., 1981, "Foliage Plant Production," Prentice Hall, Englewood Cliffs.

Jones, A. R., Kramer, E. M., Knox, K., Swarup, R., Bennett, M. J., Lazarus, C. M., ... & Grierson, C. S. (2009). Auxin transport through non-hair cells sustains root-hair development. *Nature cell biology*, *11*(1), 78-84.

Jones, O. P., Hopgood, M. E., & O'Farrell, D. (1977). Propagation in vitro of M. 26 apple rootstocks. *Journal of Horticultural Science*, *52*(2), 235-238.

Joo, J. H., Bae, Y. S., & Lee, J. S. (2001). Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant physiology*, *126*(3), 1055-1060.

Kagale, S., & Rozwadowski, K. (2011). EAR motif-mediated transcriptional repression in plants: an underlying mechanism for epigenetic regulation of gene expression. *Epigenetics*, *6*(2), 141-146.

Kaneyasu, T., Kobayashi, A., Nakayama, M., Fujii, N., Takahashi, H., & Miyazawa, Y. (2007). Auxin response, but not its polar transport, plays a role in hydrotropism of Arabidopsis roots. *Journal of experimental botany*, *58*(5), 1143-1150.

Kaniewski, D., Van Campo, E., Boiy, T., Terral, J. F., Khadari, B., & Besnard, G. (2012). Primary domestication and early uses of the emblematic olive tree: palaeobotanical, historical and molecular evidence from the Middle East. *Biological Reviews*, *87*(4), 885-899.

Kelen, M., & Ozkan, G. (2003). Relationships between rooting ability and changes of endogenous IAA and ABA during the rooting of hardwood cuttings of some grapevine rootstocks. *European Journal of Horticultural Science*, 8-13.

Kepinski, S., & Leyser, O. (2005). The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, *435*(7041), 446-451.

Kevers C, Hausman JF, Faivre-Rampant O, Evers D, Gaspar T (1997) Hormonal control of adventitious rooting: progress and questions. J Appl Bot 71: 71–79

Kim, C., & Yoo, B. (2006). Rheological properties of rice starch–xanthan gum mixtures. *Journal of Food Engineering*, *75*(1), 120-128.

Kim JI, Sharkhuu A, Jin JB, et al. 2007. yucca6, a dominant mutation in Arabidopsis, affects auxin accumulation and auxin-related phenotypes. Plant Physiology 145, 722–735.

Klee, H. J., Horsch, R. B., Nichee, M. A., Hein, M. B. and Hoffmann, N. L. (1987) The effects of overproduction of two Agrobacterium tumefaciens T-DNA auxin biosynthetic gene products in transgenic petunia plants. Genes Dev. 1, 86–96.

Klepper, B. (1992). Development and growth of crop root systems. In *Limitations to plant root growth* (pp. 1-25). Springer, New York, NY.

Klopotek, Y., Haensch, K. T., Hause, B., Hajirezaei, M. R., & Druege, U. (2010). Dark exposure of petunia cuttings strongly improves adventitious root formation and enhances carbohydrate availability during rooting in the light. *Journal of plant physiology*, *167*(7), 547-554.

Koch, K. E. (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual review of plant biology*, *47*(1), 509-540.

Komarov, A. S., Palenova, M. M., & Smirnova, O. V. (2003). The concept of discrete description of plant ontogenesis and cellular automata models of plant populations. *Ecological Modelling*, *170*(2-3), 427-439.

Korasick, D. A., Enders, T. A., & Strader, L. C. (2013). Auxin biosynthesis and storage forms. Journal of experimental botany, 64(9), 2541-2555.

Koshiba T, Saito E, Ono N, Yamamoto N, Sato M. 1996. Purification and properties of flavin- and molybdenum-containing aldehyde oxidase from coleoptiles of maize. Plant Physiology 110, 781–789.

Koukourikou-Petridou, M. A., & Bangerth, F. (1997). Effect of changing the endogenous concentration of auxins and cytokinins and the production of ethylene in pea stem cuttings on adventitious root formation. *Plant growth regulation*, *22*(2), 101-108.

Kramer, E. M., & Ackelsberg, E. M. (2015). Auxin metabolism rates and implications for plant development. Frontiers in Plant Science, 6, 150.

Kramer, E. M., & Bennett, M. J. (2006). Auxin transport: a field in flux. *Trends in plant science*, *11*(8), 382-386.

Krauss, K. W., Allen, J. A., & Cahoon, D. R. (2003). Differential rates of vertical accretion and elevation change among aerial root types in Micronesian mangrove forests. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *56*(2), 251-259.

Křeček, P., Skůpa, P., Libus, J., Naramoto, S., Tejos, R., Friml, J., & Zažímalová, E. (2009). The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. Genome biology, 10(12), 1-11.

Krisantini, S., Johnston, M., Williams, R. R., & Beveridge, C. (2006). Adventitious root formation in Grevillea (Proteaceae), an Australian native species. *Scientia Horticulturae*, *107*(2), 171-175.

Korasick, D. A., Enders, T. A., & Strader, L. C. (2013). Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of experimental botany*, *64*(9), 2541-2555.

Kowalczyk, M. and Sandberg, G. (2001). Quantitative analysis of indole-3- acetic acid metabolites in Arabidopsis. Plant Physiology, 127, 1845–1853.

Kulaeva, O. N., & Prokoptseva, O. S. (2004). Recent advances in the study of mechanisms of action of phytohormones. *Biochemistry (Moscow)*, *69*(3), 233-247.

Kuroha, T., Kato, H., Asami, T., Yoshida, S., Kamada, H., and Satoh, S. (2002). A transzeatin riboside in root xylem sap negatively regulates adventitious root formation on cucumber hypocotyls. J. Exp. Bot. 53, 2193–2200. doi: 10.1093/ jxb/erf077

Kutschera, L. (1960). Root atlas of Central European weeds and crop plants of arable land. *Root atlas of Central European weeds and crop plants of arable land.*

Lakehal, A., & Bellini, C. (2019). Control of adventitious root formation: insights into synergistic and antagonistic hormonal interactions. *Physiologia Plantarum*, *165*(1), 90-100.

Lanza, B., & Ninfali, P. (2020). Antioxidants in extra virgin olive oil and table olives: Connections between agriculture and processing for health choices. *Antioxidants*, *9*(1), 41.

Lao, N. T., Schoneveld, O., Mould, R. M., Hibberd, J. M., Gray, J. C., & Kavanagh, T. A. (1999). An Arabidopsis gene encoding a chloroplast-targeted β-amylase. *The Plant Journal*, *20*(5), 519-527.

Larsen P. 1949. Conversion of indole acetaldehyde to indoleacetic acid in excised coleoptiles and in coleoptile juice. Americal Journal of Botany 36, 32–41.

Larsen P. 1951. Enzymatic conversion of indole acetaldehyde and naphthalene acetaldehyde to auxins. Plant Physiology 26, 697–707.

Laskowski, M., Biller, S., Stanley, K., Kajstura, T., & Prusty, R. (2006). Expression profiling of auxin-treated Arabidopsis roots: toward a molecular analysis of lateral root emergence. *Plant and Cell Physiology*, *47*(6), 788-792.

Lavee, S. (2007, January). Biennial bearing in olive (Olea europaea). In *Annales Ser His Nat* (Vol. 17, pp. 101-112).

Lavy, M., & Estelle, M. (2016). Mechanisms of auxin signaling. *Development*, *143*(18), 3226-3229.

Lecompte, F., & Pagès, L. (2007). Apical diameter and branching density affect lateral root elongation rates in banana. *Environmental and Experimental Botany*, *59*(3), 243-251.

Ledo, A., Paul, K. I., Burslem, D. F., Ewel, J. J., Barton, C., Battaglia, M., ... & Chave, J. (2018). Tree size and climatic water deficit control root to shoot ratio in individual trees globally. *New Phytologist*, *217*(1), 8-11.

León, J., Rojo, E., & Sánchez-Serrano, J. J. (2001). Wound signalling in plants. *Journal of experimental botany*, *52*(354), 1-9.

León, P., & Sheen, J. (2003). Sugar and hormone connections. *Trends in plant science*, *8*(3), 110-116.

Leyser, O. (2006). Dynamic integration of auxin transport and signalling. *Current Biology*, *16*(11), R424-R433.

Liao, W. B., Xiao, H. L., & Zhang, M. L. (2010). Effect of nitric oxide and hydrogen peroxide on adventitious root development from cuttings of ground-cover chrysanthemum and associated biochemical changes. *Journal of Plant Growth Regulation*, *29*(3), 338-348.

Li, S. W., Xue, L., Xu, S., Feng, H., & An, L. (2009). Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. The Botanical Review, 75(2), 230-247.

Li, S. W. (2021). Molecular bases for the regulation of adventitious root generation in plants. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 614072.

Li, S. W., Xue, L., Xu, S., Feng, H., & An, L. (2009). Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. The Botanical Review, 75(2), 230-247.

Liszkay, A., van der Zalm, E., & Schopfer, P. (2004). Production of reactive oxygen intermediates (O2−, H2O2, and OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant physiology*, *136*(2), 3114-3123.

Liu, J. H., & Reid, D. M. (1992). Auxin and ethylene-stimulated adventitious rooting in relation to tissue 9. *Journal of Experimental Botany*, *43*(9), 1191-1198.

Liu, S., Wang, J., Wang, L., Wang, X., Xue, Y., Wu, P., & Shou, H. (2009). Adventitious root formation in rice requires OsGNOM1 and is mediated by the OsPINs family. *Cell research*, *19*(9), 1110-1119.

Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, *140*(5), 943-950.

Ljung, K., Hull, A. K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J., & Sandberg, G. (2005). Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots. The Plant Cell, 17(4), 1090-1104.

Ljung, K., Hull, A. K., Kowalczyk, M., Marchant, A., Celenza, J., Cohen, J. D., & Sandberg, G. (2002). Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in Arabidopsis thaliana. *Plant molecular biology*, *49*(3), 249-272.

Ljung, K., Nemhauser, J. L., & Perata, P. (2015). New mechanistic links between sugar and hormone signalling networks. *Current Opinion in Plant Biology*, *25*, 130-137.

Lorenzen, J. H., & Ewing, E. E. (1992). Starch accumulation in leaves of potato (Solanum tuberosum L.) during the first 18 days of photoperiod treatment. *Annals of Botany*, *69*(6), 481-485.

Lovell, P. H., & White, J. (1986). Anatomical changes during adventitious root formation. In *New root formation in plants and cuttings* (pp. 111-140). Springer, Dordrecht.

Loumou, A., & Giourga, C. (2003). Olive groves: ``The life and identity of the Mediterranean". *Agriculture and human values*, *20*(1), 87-95.

Ludwig-Muller, J. et al., (2009). Moss (Physcomitrella patens) GH3 proteins act in auxin homeostasis. New Phytologist, 181, 323–338.

Lu, Y., Gehan, J. P., & Sharkey, T. D. (2005). Daylength and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism. *Plant physiology*, *138*(4), 2280-2291.

Lynch, J.P. & Brown, K.M. 2001) Topsoil foraging—an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. Plant Soil 237, 225–237

Macedo, E. S., Sircar, D., Cardoso, H. G., Peixe, A., and Arnholdt-Schmitt, A. (2012). Involvement of alternative oxidase (AOX) in adventitious rooting of Olea europaea L. microshoots is linked to adaptive phenylpropanoid and lignin metabolism. Plant Cell Rep. 31, 1581–1590. doi: 10.1007/s00299-012-1272-6

Macedo, E., Vieira, C., Carrizo, D., Porfirio, S., Hegewald, H., Arnholdt-Schmitt, B., ... & Peixe, A. (2013). Adventitious root formation in olive (Olea europaea L.) microshoots: anatomical evaluation and associated biochemical changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *88*(1), 53-59.

Mäkelä, P., Mclaughlin, J. E., & Boyer, J. S. (2005). Imaging and quantifying carbohydrate transport to the developing ovaries of maize. *Annals of Botany*, *96*(5), 939-949.

Malamy, J. E. (2005). Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, cell & environment*, *28*(1), 67-77.

Mancuso, S., 1998. Seasonal dynamics of electrical impedance parameters in shoots and leaves related to rooting ability of olive (Olea europaea) cuttings. Tree Physiology 19, 95–101.

Mano, Y., & Nemoto, K. (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of experimental Botany*, *63*(8), 2853-2872.

Mano Y., Nemoto K., Suzuki M., Seki H., Fujii I., Muranaka T. (2010). The AMI1 gene family: indole-3-acetamide hydrolase functions in auxin biosynthesis in plants. Journal of Experimental Botany, 61,25–32. Martin-Tanguy, J. (2001). Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). Plant Growth Regulation, 34(1), 135- 148.

Margaritis E (2013) Distinguishing exploitation, domestication, cultivation and production: the olive in the third millennium Aegean. Antiquity 337:746–757

Marsch-Martinez N, Greco R, Van Arkel G, Herrera-Estrella L, Pereira A. 2002. Activation tagging using the En-I maize transposon system in Arabidopsis. Plant Physiology 129, 1544–1556.

Martin-Tanguy, J. & Carré, M. (1993). Polyamines in grapevine microcuttings cultivated in vitro. Effects of amines and inhibitors of polyamine biosynthesis on polyamine levels and microcutting growth and development. Plant Growth Regulation, 13(3), 269-280.

Mashiguchi K, Tanaka K, Sakai T, et al. 2011. The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 108, 18512–18517.

Masle, J. (2002). High soil strength: mechanical forces at play on root morphogenesis and in root: shoot signaling. *Plant roots: the hidden half*, 807-819.

McDonald, A. E., Costa, J. H., Nobre, T., de Melo, D. F., & Arnholdt-Schmitt, B. (2015). Evolution of AOX genes across kingdoms and the challenge of classification. *Alternative Respiratory Pathways in Higher Plants; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA*, 267-272.

Mclaughlin, J. E., & Boyer, J. S. (2004a). Glucose localization in maize ovaries when kernel number decreases at low water potential and sucrose is fed to the stems. *Annals of Botany*, *94*(1), 75-86.

Mclaughlin, J. E., & Boyer, J. S. (2004b). Sugar-responsive gene expression, invertase activity, and senescence in aborting maize ovaries at low water potentials. *Annals of Botany*, *94*(5), 675-689.

Mhimdi, M., & Pérez-Pérez, J. M. (2020). Understanding of adventitious root formation: what can we learn from comparative genetics? *Frontiers in plant science*, *11*, 582020.

Michniewicz, M., Brewer, P. B., & Friml, J. (2007). Polar auxin transport and asymmetric auxin distribution. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, *5*.

Mikkelsen MD, Hansen CH, Wittstock U, Halkier BA. 2000. Cytochrome P450 CYP79B2 from Arabidopsis catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. Journal of Biological Chemistry 275, 33712–33717.

Mikkelsen MD, Naur P, Halkier BA. 2004. Arabidopsis mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis. The Plant Journal 37, 770–777.

Mishra, B. S., Singh, M., Aggrawal, P., and Laxmi, A. (2009). Glucose and auxin signaling interaction in controlling Arabidopsis thaliana seedlings root growth and development. PLoS ONE 4: e4502. doi: 10.1371/journal.pone.0004502

Mockaitis, K., & Estelle, M. (2008). Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annual review of cell and developmental biology*, *24*.

Monroe, J. D. (2020). Involvement of five catalytically active Arabidopsis β-amylases in leaf starch metabolism and plant growth. *Plant Direct*, *4*(2), e00199.

Monselise, S. P., & Goldschmidt, E. E. (1982). Alternate bearing in fruit trees. *Horticultural reviews*, *4*(1), 128-173.

Morel, J. B., Godon, C., Mourrain, P., Béclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., ... & Vaucheret, H. (2002). Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *The Plant Cell*, *14*(3), 629-639.

Morelli, G., & Ruberti, I. (2002). Light and shade in the photocontrol of Arabidopsis growth. *Trends in plant science*, *7*(9), 399-404.

Moubayidin, L., Di Mambro, R., and Sabatini, S. (2009). Cytokinin–auxin crosstalk. Trends Plant Sci. 14, 557–562. doi: 10.1016/j.tplants.2009.06.010

Mouchel, C. F., Briggs, G. C., & Hardtke, C. S. (2004). Natural genetic variation in Arabidopsis identifies BREVIS RADIX, a novel regulator of cell proliferation and elongation in the root. *Genes & development*, *18*(6), 700-714.

Mousa, A.-A.K., 2003. Rooting Response of "Nabali" and "Improved Nabali" Olive Cuttings to Indole Butyric Acid Concentration and Collection Season. Pakistan Journal of Biological Sciences 6, 2040– 2043.

Mravec, J., Skůpa, P., Bailly, A., Hoyerová, K., Křeček, P., Bielach, A., ... & Friml, J. (2009). Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature*, *459*(7250), 1136-1140.

Muleo, R., Colao, M. C., Miano, D., Cirilli, M., Intrieri, M. C., Baldoni, L., & Rugini, E. (2009). Mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis in olive germplasm. Genome, 52(3), 252-260

Müller, A., & Weiler, E. W. (2000). Indolic constituents and indole-3-acetic acid biosynthesis in the wild-type and a tryptophan auxotroph mutant of Arabidopsis thaliana. *Planta*, *211*(6), 855-863.

Nag, S., Saha, K., & Choudhuri, M. A. (2001). Role of Auxin and Polyamines in Adventitious Root Formation in Relation to Changes in Compounds Involved in Rooting. *Journal of Plant Growth Regulation*, *20*(2).

Naija, S., Elloumi, N., Ammar, S., Kevers, C., & Dommes, J. (2009). Involvement of polyamines in the adventitious rooting of micropropagated shoots of the apple rootstock MM106. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 45(1), 83-91.

Naija, S., Elloumi, N., Jbir, N., Ammar, S., & Kevers, C. (2008). Anatomical and biochemical changes during adventitious rooting of apple rootstocks MM 106 cultured in vitro. *Comptes rendus biologies*, *331*(7), 518-525.

Nanda, K. K., & Jain, M. K. (1972). Utilization of sugars and starch as carbon sources in the rooting of etiolated stem segments of Populus nigra. *New Phytologist*, *71*(5), 825-828.

Naramoto, S. (2017). Polar transport in plants mediated by membrane transporters: focus on mechanisms of polar auxin transport. Current opinion in plant biology, 40, 8-14.

Negash, L. (2003). Vegetative propagation of the threatened African wild olive [Olea europaea L. subsp. cuspidata (Wall. ex DC.) Ciffieri]. *New Forests*, *26*(2), 137-146.

Negi, S., Ivanchenko, M. G., and Muday, G. K. (2008). Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in Arabidopsis thaliana. Plant J. 55, 175– 187. doi: 10.1111/j.1365-313x.2008.03495.x

Negi, S., Sukumar, P., Liu, X., Cohen, J. D., and Muday, G. K. (2010). Genetic dissection of the role of ethylene in regulating auxin-dependent lateral and adventitious root formation in tomato. Plant J. 61, 3–15. doi: 10.1111/j.1365- 313x.2009.04027.x

Neil, S., Desikan, R., & Hancock, J. (2002). Hydrogen peroxide signaling. *Curr Opin Plant Biol*, *5*(5), 388-95.

Newberry PE (1937) On some African species of the genus Olea and the original home of the cultivated olive-tree. Proc Linn Soc Lond 150:3–16

Ninfali, P.; Bacchiocca, M.; Biagiotti, E.; Servili, M.; Montedoro, G. Validation of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) parameter as a new index of quality and stability of virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2002**, *79*, 977–982.

Niu, L., Yu, J., Liao, W., Yu, J., Zhang, M., and Dawuda, M. M. (2017). Calcium and calmodulin are involved in nitric oxide-induced adventitious rooting of cucumber under simu

Noh, B., Murphy, A. S., & Spalding, E. P. (2001). Multidrug resistance–like genes of Arabidopsis required for auxin transport and auxin-mediated development. *The Plant Cell*, *13*(11), 2441-2454.

Nordstrom, A. C., Jacobs, F. A., & Eliasson, L. (1991). Effect of exogenous indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid on internal levels of the respective auxins and their conjugation with aspartic acid during adventitious root formation in pea cuttings. *Plant physiology*, *96*(3), 856-861.

Normanly J. (2010). Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. Cold Spring Harbor Perspectivesin Biology, 2, a001594.

Normanly, J., Slovin, J. P. and Cohen, J. D. (2004) Auxin biosynthesis and metabolism. In: Plant Hormones: Biosynthesis, Transduction, Action! pp. 36–62, Davies, P. J. (ed.), Kluwer Academic Publishers Ithaca, NY.

Nozue, K., & Maloof, J. N. (2006). Diurnal regulation of plant growth. *Plant, Cell & Environment*, *29*(3), 396-408.

Ochando, M. D., Reyes, A., Segura, D., & Callejas, C. (2010). Phylogeography: its importance in insect pest control. *Rutgers, DS*, 31-56.

Olatunji, D., Geelen, D., & Verstraeten, I. (2017). Control of endogenous auxin levels in plant root development. International Journal of Molecular Sciences, 18(12), 2587.

Oliver D (1868) Flora of Tropical Africa. Reeve L & Co, Ashford

Ondiviela, B., Losada, I. J., Lara, J. L., Maza, M., Galván, C., Bouma, T. J., & van Belzen, J. (2014). The role of seagrasses in coastal protection in a changing climate. *Coastal Engineering*, *87*, 158-168.

Ouyang J, Shao X, Li J. 2000. Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in Arabidopsis thaliana. The Plant Journal 24, 327–333.

Overvoorde, P., Fukaki, H., & Beeckman, T. (2010). Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *2*(6), a001537.

Pacurar DI, Perrone I, Bellini C (2014) Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. Physiol Plant 151: 83–96

Parry, G., Delbarre, A., Marchant, A., Swarup, R., Napier, R., Perrot-Rechenmann, C., & Bennett, M. J. (2001). Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation aux1. *The Plant Journal*, *25*(4), 399-406.

Pasternak, T.; Potters, G.; Caubergs, R.; Jansen, M.A.K. Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. *J. Exp. Bot.* **2005**, *56*, 1991–2001.

Pawlicki, N., & Welander, M. (1995). Influence of carbohydrate source, auxin concentration and time of exposure on adventitious rooting of the apple rootstock Jork 9. *Plant Science*, *106*(2), 167-176.

Peer, W.A.; Cheng, Y.; Murphy, A.S. Evidence of oxidative attenuation of auxin signalling. *J. Exp. Bot.* **2013**, *64*, 2629–2639.

Péret, B., Swarup, K., Ferguson, A., Seth, M., Yang, Y., Dhondt, S., ... & Swarup, R. (2012). AUX/LAX genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during Arabidopsis development. *The Plant Cell*, *24*(7), 2874-2885.

Péret, B., Li, G., Zhao, J., Band, L. R., Voß, U., Postaire, O., ... & Bennett, M. J. (2012). Auxin regulates aquaporin function to facilitate lateral root emergence. *Nature cell biology*, *14*(10), 991-998.

Perrot-Rechenmann, C. (2010). Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *2*(5), a001446.

Pierret, A., Moran, C. J., & Doussan, C. (2005). Conventional detection methodology is limiting our ability to understand the roles and functions of fine roots. *New Phytologist*, *166*(3), 967-980.

Polidoros, A. N., Mylona, P. V., & Arnholdt-Schmitt, B. (2009). Aox gene structure, transcript variation and expression in plants. *Physiologia Plantarum*, *137*(4), 342-353.

Pollmann S., Muller A., Weiler E.W. (2006a). Many roads lead to 'auxin': of nitrilases, synthases, and amidases. Plant Biology (Stuttgart), 8, 326–333.

Pollmann S, Neu D, Weiler EW. 2003. Molecular cloning and characterization of an amidase from Arabidopsis thaliana capable of converting indole-3-acetamide into the plant growth hormone, indole3-acetic acid. Phytochemistry 62, 293–300.

Pop, T. I., Pamfil, D. D., & Bellini, C. C. (2011). Auxin control in the formation of adventitious roots. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanica Cluj-Napoca*, *39*(1), 307-316.

Porfirio, S., Calado, M. L., Noceda, C., Cabrita, M. J., da Silva, M. G., Azadi, P., & Peixe, A. (2016). Tracking biochemical changes during adventitious root formation in olive (Olea europaea L.). *Scientia horticulturae*, *204*, 41-53.

Potters, G.; Pasternak, T.P.; Guisez, Y.; Palme, K.J.; Jansen, M.A.K. Stress-induced morphogenic responses: Growing out of trouble? *Trends Plant Sci.* **2007**, *12*, 98–105.

Preece, J. E. (2003). A century of progress with vegetative plant propagation. *HortScience*, *38*(5), 1015-1025.

Psomiadou, E.; Tsimidou, M.; Boskou, D. α-Tocopherol content of greek virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1770–1775.

Qi, L., Chen, L., Wang, C., Zhang, S., Yang, Y., Liu, J., ... & Wang, R. (2020). Characterization of the auxin efflux transporter PIN proteins in pear. Plants, 9(3), 349.

Qin, G. et al., (2005). An indole-3-acetic acid carboxyl methyltransferase regulates Arabidopsis leaf development. Plant Cell, 17, 2693–2704.

Qrunfleh, M. M., Rushdi, Y., Musmar, T., & Rushdi, L. (1994). Root Formation in Cuttings of the'Nabali'Olives with Uniconazole and Indolebutyric Acid. *Dirasat*, *21*(6), 71-79.

Rademacher, W. (2015). Plant growth regulators: backgrounds and uses in plant production. *Journal of plant growth regulation*, *34*(4), 845-872.

Ramirez-Carvajal, G. A., Morse, A. M., Dervinis, C., and Davis, J. M. (2009). The cytokinin type-B response regulator PtRR13 is a negative regulator of adventitious root development in Populus. Plant Physiol. 150, 759–771. doi: 10.1104/pp.109.137505

Rashotte, A. M., Poupart, J., Waddell, C. S., & Muday, G. K. (2003). Transport of the two natural auxins, indole-3-butyric acid and indole-3-acetic acid, in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *133*(2), 761-772.

Rasmussen, A., Hosseini, S. A., Hajirezaei, M. R., Druege, U., & Geelen, D. (2015). Adventitious rooting declines with the vegetative to reproductive switch and involves a changed auxin homeostasis. *Journal of Experimental Botany*, *66*(5), 1437-1452.

Ray RR, Jana SC, Nanda G (1996) Induction and carbon catabolite repression in the biosynthesis of beta-amylase by Bacillus megaterium B6. Biochem Mol Biol Int 38(2):223–230

Reddy, A. R., Chaitanya, K. V., & Vivekanandan, M. (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of plant physiology*, *161*(11), 1189-1202.

Reinhardt, D., Pesce, E. R., Stieger, P., Mandel, T., Baltensperger, K., Bennett, M., ... & Kuhlemeier, C. (2003). Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature*, *426*(6964), 255-260.

Reinhold, H., Soyk, S., Šimková, K., Hostettler, C., Marafino, J., Mainiero, S., ... & Zeeman, S. C. (2011). β-Amylase–Like proteins function as transcription factors in Arabidopsis, controlling shoot growth and development. *The Plant Cell*, *23*(4), 1391-1403.

Roitsch, T., & González, M. C. (2004). Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in plant science*, *9*(12), 606-613.

Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., & Sheen, J. (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, *57*, 675-709.

Romano, C. P., Robson, P. R., Smith, H., Estelle, M. and Klee, H. (1995) Transgene-mediated auxin overproduction in Arabidopsis: hypocotyl elongation phenotype and interactions with the hy6–1 hypocotyl elongation and axr1 auxin-resistant mutants. Plant Mol. Biol. 27, 1071–1083.

Ross, M.K., Thorpe, T.A., & Costerton, J.W. (1973). Ultrastructural aspects of shoot initiation in tobacco callus cultures. American Journal of Botany, 60(8), 788-795.

Rout, G. R. (2006). Effect of auxins on adventitious root development from single node cuttings of Camellia sinensis (L.) Kuntze and associated biochemical changes. *Plant growth regulation*, *48*(2), 111-117.

Rubio de Casas R, Besnard G, Schönswetter P, Balaguer L, Vargas P (2006) Extensive gene flow blurs phylogeographic but not phylogenetic signal in Olea europaea L. Theor Appl Genet 113:575–583

Rugini, E., Baldoni, L., Muleo, R., & Sebastiani, L. (Eds.). (2016). *The olive tree genome* (Vol. 978, pp. 3-319). Berlin, Germany: Springer.

Rugini, E., Cristofori, V., & Silvestri, C. (2016). Genetic improvement of olive (Olea europaea L.) by conventional and in vitro biotechnology methods. *Biotechnology advances*, *34*(5), 687-696.

Rugini, E., & Wang, X. S. (1986). Effect of polyamines, 5-azacytidine and growth regulators on rooting in vitro of fruit trees, treated and untreated with Agrobacterium rhizogenes. In *Proceedings of the International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Minnesota, August* (pp. 3-8).

Ruzicka, K., Ljung, K., Vanneste, S., Podhorska, R., Beeckman, T., Friml, J., et al. (2007). Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. Plant Cell 19, 2197–2212. doi: 10.1105/tpc.107.052126

Sabatini, S., Heidstra, R., Wildwater, M., & Scheres, B. (2003). SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem. *Genes & development*, *17*(3), 354-358.

Sairanen, I., Novák, O., Pěnčík, A., Ikeda, Y., Jones, B., Sandberg, G., & Ljung, K. (2012). Soluble carbohydrates regulate auxin biosynthesis via PIF proteins in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *24*(12), 4907-4916.

Salama, M. A., Zahran, M. A., & Hassan, M. M. (1987). Comparing the rooting ability of some olive cultivars propagated by leafy cuttings under mist [Egypt]. *Annals of Agricultural Science (Egypt)*.

Salehin, M., Bagchi, R., & Estelle, M. (2015). SCFTIR1/AFB-based auxin perception: mechanism and role in plant growth and development. *The Plant Cell*, *27*(1), 9-19.

Sang, Y.L.; Cheng, Z.J.; Zhang, X.S. Endogenous auxin biosynthesis and de novo root organogenesis. *J. Exp. Bot.* **2016**, *67*, 4011–4013.

Santos Macedo, E., Cardoso, H. G., Hernández, A., Peixe, A. A., Polidoros, A., Ferreira, A., ... & Arnholdt-Schmitt, B. (2009). Physiologic responses and gene diversity indicate olive alternative oxidase as a potential source for markers involved in efficient adventitious root induction. *Physiologia Plantarum*, *137*(4), 532-552.

Santos Macedo, E.; Sircar, D.; Cardoso, H.G.; Peixe, A.; Arnholdt-Schmitt, B. (2012). Involvement of alternative oxidase (AOX) in adventitious rooting of *Olea europaea* L. microshoots is linked to adaptive phenylpropanoid and lignin metabolism. *Plant Cell Rep.* *31*, 1581–1590.

Sauer, M., & Kleine-Vehn, J. (2019). PIN-FORMED and PIN-LIKES auxin transport facilitators. *Development*, *146*(15), dev168088.

Saxena, C., Samantaray, S., Rout, G. R., & Das, P. (2000). Effect of auxins on in vitro rooting of Plumbago zeylanica: peroxidase activity as a marker for root induction. *Biologia Plantarum*, *43*(1), 121-124.

Scherer, G. F. (2011). AUXIN-BINDING-PROTEIN1, the second auxin receptor: what is the significance of a two-receptor concept in plant signal transduction? *Journal of Experimental Botany*, *62*(10), 3339-3357.

Schopfer, P. (2001). Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: implications for the control of elongation growth. *The Plant Journal*, *28*(6), 679-688.

Schopfer, P., Liszkay, A., Bechtold, M., Frahry, G., & Wagner, A. (2002). Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta*, *214*(6), 821-828.

Schopfer, P., & Liszkay, A. (2006). Plasma membrane-generated reactive oxygen intermediates and their role in cell growth of plants. *Biofactors*, *28*(2), 73-81.

Schwartz SH, Léon-Kloosterziel KM, Koornneef M, Zeevaart JAD. 1997. Biochemical characterization of the aba2 and aba3 mutants of Arabidopsis thaliana. Plant Physiology 114, 161–166.

Seo M, Akaba S, Oritani T, Delarue M, Bellini C, Caboche M, Koshiba T. 1998. Higher activity of an aldehyde oxidase in the auxin-overproducing superroot1 mutant of Arabidopsis thaliana. Plant Physiology 116, 687–693.

Sgamma, T., Jackson, A., Muleo, R., Thomas, B., & Massiah, A. (2014). TEMPRANILLO is a regulator of juvenility in plants. *Scientific reports*, *4*(1), 1-11.

Singh, M. B., & Bhalla, P. L. (2006). Plant stem cells carve their own niche. *Trends in Plant Science*, *11*(5), 241-246.

Sircar, P. K. and Chatterjee, S. K. 1973: Physiological and biochemical control of meristemization and adventitious root formation in Vigna hypocotyl cuttings. Plant Propagator 19: 17-27

Smith, A. M., & Stitt, M. (2007). Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, cell & environment*, *30*(9), 1126-1149.

Sorin, C., Bussell, J. D., Camus, I., Ljung, K., Kowalczyk, M., Geiss, G., ... & Bellini, C. (2005). Auxin and light control of adventitious rooting in Arabidopsis require ARGONAUTE1. *The Plant Cell*, *17*(5), 1343-1359.

Sorin, C., Negroni, L., Balliau, T., Corti, H., Jacquemot, M. P., Davanture, M., ... & Bellini, C. (2006). Proteomic analysis of different mutant genotypes of Arabidopsis led to the identification of 11 proteins correlating with adventitious root development. *Plant Physiology*, *140*(1), 349-364.

Staswick, P. E. (2009). The tryptophan conjugates of jasmonic and indole-3-acetic acids are endogenous auxin inhibitors. Plant Physiol. 150, 1310–1321. doi: 10.1104/pp.109.138529

Staswick, P. E., Serban, B., Rowe, M., Tiryaki, I., Maldonado, M. T., Maldonado, M. C., & Suza, W. (2005). Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *The Plant Cell*, *17*(2), 616-627.

Steffens, B., Kovalev, A., Gorb, S. N., & Sauter, M. (2012). Emerging roots alter epidermal cell fate through mechanical and reactive oxygen species signaling. *The Plant Cell*, *24*(8), 3296-3306.

Steffens, B., & Rasmussen, A. (2016). The physiology of adventitious roots. Plant physiology, 170(2), 603-617.

Steffens, B., & Sauter, M. (2009). Epidermal cell death in rice is confined to cells with a distinct molecular identity and is mediated by ethylene and H2O2 through an autoamplified signal pathway. *The Plant Cell*, *21*(1), 184-196.

Steffens, B., Wang, J., & Sauter, M. (2006). Interactions between ethylene, gibberellin and abscisic acid regulate emergence and growth rate of adventitious roots in deepwater rice. *Planta*, *223*(3), 604-612.

Stepanova, A. N., Hoyt, J. M., Hamilton, A. A., and Alonso, J. M. (2005). A Link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root specific ethylene-insensitive mutants in Arabidopsis. Plant Cell 17, 2230–2242. doi: 10.1105/tpc.105.033365

Stepanova, A. N., Yun, J., Likhacheva, A. V., and Alonso, J. M. (2007). Multilevel interactions between ethylene and auxin in Arabidopsis roots. Plant Cell 19, 2169–2185. doi: 10.1105/tpc.107.052068

Stepanova AN, Yun J, Robles LM, Novak O, He W, Guo H, Ljung K, Alonso JM. 2011. The Arabidopsis YUCCA1 flavin monooxygenase functions in the indole-3-pyruvic acid branch of auxin biosynthesis. Plant Cell 23, 3961–3973.

Strader, L. C., & Bartel, B. (2011). Transport and metabolism of the endogenous auxin precursor indole-3-butyric acid. *Molecular plant*, *4*(3), 477-486.

Strader, L. C., Chen, G. L., & Bartel, B. (2010). Ethylene directs auxin to control root cell expansion. *The Plant Journal*, *64*(5), 874-884.

Sugawara S, Hishiyama S, Jikumaru Y, Hanada A, Nishimura T, Koshiba T, Zhao Y, Kamiya Y, Kasahara H. 2009. Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 106, 5430–5435.

Sukumar, P., Maloney, G. S., & Muday, G. K. (2013). Localized induction of the ATP-binding cassette B19 auxin transporter enhances adventitious root formation in Arabidopsis. *Plant physiology*, *162*(3), 1392-1405.

Su, Y. H., Liu, Y. B., and Zhang, X. S. (2011). Auxin–cytokinin interaction regulates meristem development. Mol. Plant 4, 616–625. doi: 10.1093/mp/ssr007

Svenson, S. E., & Davies, F. T. (1995). Change in tissue mineral elemental concentration during root initiation and development of poinsettia cuttings. *HortScience*, *30*(3), 617-619.

Svistoonoff, S., Creff, A., Reymond, M., Sigoillot-Claude, C., Ricaud, L., Blanchet, A., ... & Desnos, T. (2007). Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nature genetics*, *39*(6), 792-796.

Swarup, R., & Bennett, M. (2003). Auxin transport: the fountain of life in plants? *Developmental cell*, *5*(6), 824-826.

Swarup, R., Friml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K., & Bennett, M. (2001). Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. *Genes & development*, *15*(20), 2648-2653.

Swarup, R., Perry, P., Hagenbeek, D., Van Der Straeten, D., Beemster, G. T., Sandberg, G., et al. (2007). Ethylene upregulates auxin biosynthesis in Arabidopsis seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. Plant Cell 19, 2186–2196. doi: 10.1105/tpc.107.052100

Tahir, M. M., Mao, J., Li, S., Li, K., Liu, Y., Shao, Y., ... & Zhang, X. (2022). Insights into Factors Controlling Adventitious Root Formation in Apples. *Horticulturae*, *8*(4), 276.

Takahashi, F., Sato-Nara, K., Kobayashi, K., Suzuki, M., & Suzuki, H. (2003). Sugar-induced adventitious roots in Arabidopsis seedlings. *Journal of plant research*, *116*(2), 83-91.

Takatsuka, H., & Umeda, M. (2014). Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. *Journal of experimental botany*, *65*(10), 2633-2643.

Talaie, A., Ghassemi, M., 1996. Study of the Effect of Different Media Beds, Time, and Wounding Factors on the Rooting of Semi-hard Cuttings of Olive [Olea europaea (Roghani & Zard Zeitoun CV)] under Mist Conditions. HortScience 31, 635–635.

Tanaka, H.; Dhonukshe, P.; Brewer, P.B.; Friml, J. Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: A means to coordinate plant development. Cell. Mol. Life Sci. C 2006, 63, 2738–2754

Tan, X., Calderon-Villalobos, L. I. A., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C. V., Estelle, M., & Zheng, N. (2007). Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature*, *446*(7136), 640-645.

Teale, W. D., Paponov, I. A., & Palme, K. (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. Nature reviews Molecular cell biology, 7(11), 847-859.

Terral JF, Alonso N, Buxói Capdevila R, Chatti N, Fabre L et al (2004) Historical biogeography of olive domestication (Olea europaea L.) as revealed by geometrical morphometry applied to biological and archaeological material. J Biogeogr 31:63–77

Therios, I.N., 2009. Olives. CABI.

Tiwari, S. B., Hagen, G., & Guilfoyle, T. (2003). The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *The Plant Cell*, *15*(2), 533-543.

Tognetti, V.B.; Mühlenbock, P.; van Breusegem, F. Stress homeostasis - the redox and auxin perspective. *Plant Cell Environ.* **2012**, *35*, 321–333.

Tonon, G., Kevers, C., & Gaspar, T. (2001). Changes in polyamines, auxins and peroxidase activity during in vitro rooting of Fraxinus angustifolia shoots: an auxin-independent rooting model. *Tree Physiology*, *21*(10), 655-663.

Tsipouridis, G., Thomidis, T., & Bladenopoulou, S. (2006). Seasonal variation in sprouting of GF677 peach× almond (Prunus persica× Prunus aygdalus) hybrid root cuttings. *New Zealand journal of crop and horticultural science*, *34*(1), 45-50.

Tsurusaki K, Takeda K, Sakurai N. 1997. Conversion of indole3-acetaldehyde to indole-3-acetic acid in cell-wall fraction of barley (Hordeum vulgare) seedlings. Plant and Cell Physiology 38, 268–273.

Turrill WB (1951) Wild and cultivated olives. Kew Bull 3:437–442.

Valerio, C., Medori, G., Luziatelli, F., Melini, F., Gatti, L., Ruzzi, M., Muleo, R., Forgione, I. (2023). Bioregulation of adventitious root induction by metabolites secreted from plant growth promoting Pantoea agglomerans strains. Acta Horticulturae, in press.

Vanlerberghe, G. C., & Mclntosh, L. (1996). Signals regulating the expression of the nuclear gene encoding alternative oxidase of plant mitochondria. *Plant Physiology*, *111*(2), 589-595.

Vanneste, S., & Friml, J. (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell*, *136*(6), 1005-1016.

Vaucheret, H., Vazquez, F., Crété, P., & Bartel, D. P. (2004). The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes & development*, *18*(10), 1187-1197.

Veierskov, B., Andersen, A. S., Stummann, B. M., & Henningsen, K. W. (1982). Dynamics of extractable carbohydrates in Pisum sativum. II. Carbohydrate content and photosynthesis of pea cuttings in relation to irradiance and stock plant temperature and genotype. *Physiologia Plantarum*, *55*(2), 174-178.

Velada, I., Cardoso, H., Porfirio, S., & Peixe, A. (2020). Expression profile of PIN-formed auxin efflux carrier genes during IBA-induced in vitro adventitious rooting in Olea europaea L. *Plants*, *9*(2), 185.

Velada, I., Grzebelus, D., Lousa, D., Soares, C. M., Santos Macedo, E., Peixe, A., et al. (2018). AOX1-Subfamily gene members in Olea europaea cv. "Galega vulgar" - Gene characterization and expression of transcripts during IBA-induced in vitro adventitious rooting. Int. J. Mol. Sci. 19, 597. doi: 10.3390/ijms19020597

Vercambre, G., Doussan, C., & Habib, R. (2003). Architectural analysis and synthesis of the plum tree root system in an orchard using a quantitative modelling approach. *Plant and Soil*, *251*(1), 1-11.

Vernoux, T., Brunoud, G., Farcot, E., Morin, V., Van den Daele, H., Legrand, J., ... & Traas, J. (2011). The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex. *Molecular systems biology*, *7*(1), 508.

Vidoz, M. L., Loreti, E., Mensuali, A., Alpi, A., and Perata, P. (2010). Hormonal interplay during adventitious root formation in flooded tomato plants. Plant J. 63, 551–562. doi: 10.1111/j.1365-313x.2010.04262.x

Vieten, A., Sauer, M., Brewer, P. B., & Friml, J. (2007). Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. Trends in plant science, 12(4), 160-168.

Viola, P., & Viola, M. (2009). Virgin olive oil as a fundamental nutritional component and skin protector. *Clinics in dermatology*, *27*(2), 159-165.

Visioli, F., Poli, A., & Gall, C. (2002). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal research reviews*, *22*(1), 65-75.

Vossen P (2007) Olive oil: history, production, and characteristics of the world's classic oils. HortScience 42:1093–1100

Wahid, P. A. (2000). A system of classification of woody perennials based on their root activity patterns. *Agroforestry systems*, *49*(2), 123-130.

Walter, A., & Schurr, U. (2005). Dynamics of leaf and root growth: endogenous control versus environmental impact. *Annals of botany*, *95*(6), 891-900.

Wang, L., & Ruan, Y. L. (2013). Regulation of cell division and expansion by sugar and auxin signaling. *Frontiers in plant science*, *4*, 163.

Wang, R., & Estelle, M. (2014). Diversity and specificity: auxin perception and signaling through the TIR1/AFB pathway. *Current opinion in plant biology*, *21*, 51-58.

Wang, S., Bai, Y., Shen, C., Wu, Y., Zhang, S., Jiang, D. & Qi, Y. (2010). Auxin-related gene families in abiotic stress response in Sorghum bicolor. Functional & Integrative Genomics, 10(4), 533-546.

Weaver, J. E. (1926). *Root development of field crops*. McGraw-Hill Book Company.

Weijers, D., Sauer, M., Meurette, O., Friml, J., Ljung, K., Sandberg, G., Hooykaas, P. and Offringa, R. (2005) Maintenance of embryonic auxin distribution for apical-basal patterning by PIN-FORMED-dependent auxin transport in Arabidopsis. Plant Cell 17, 2517–2526.

Westfall, C. S., Herrmann, J., Chen, Q., Wang, S., & Jez, J. M. (2010). Modulating plant hormones by enzyme action: the GH3 family of acyl acid amido synthetases. *Plant Signaling & Behavior*, *5*(12), 1607-1612.

Wiesman, Z., & Lavee, S. (1995). Relationship of carbohydrate sources and indole-3-butyric acid in olive cuttings. *Functional Plant Biology*, *22*(5), 811-816.

Wiesman, Z., Riov, J., & Epstein, E. (1989). Characterization and rooting ability of indole-3-butyric acid conjugates formed during rooting of mung bean cuttings. *Plant Physiology*, *91*(3), 1080-1084.

Willer, H., & Lernoud, J. (2017). *The world of organic agriculture. Statistics and emerging trends 2017* (pp. 1-336). Research Institute of Organic Agriculture FiBL and IFOAM-Organics International.

Xi, W., Gong, X., Yang, Q., Yu, H., & Liou, Y. C. (2016). Pin1At regulates PIN1 polar localization and root gravitropism. Nature communications, 7(1), 1-10.

Won C, Shen X, Mashiguchi K, Zheng Z, Dai X, Cheng Y, Kasahara H, Kamiya Y, Chory J, Zhao Y. 2011. Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF ARABIDOPSIS and YUCCAs in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 108, 18518–18523.

Woodward, A. W. and Bartel, B. (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. Ann. Bot. (Lond.) 95, 707-735

Wright AD, Sampson MB, Neuffer MG, Michalczuk L, Slovin JP, Cohen JD. 1991. Indole-3-acetic acid biosynthesis in the mutant maize orange pericarp, a tryptophan auxotroph. Science 254, 998–1000.

Xuan, W. et al., (2015). Root cap-derived auxin pre-patterns the longitudinal axis of the Arabidopsis root. Current Biology, 25, 1381–1388.

Xu, F., He, S., Zhang, J., Mao, Z., Wang, W., Li, T., ... & Yang, H. Q. (2018). Photoactivated CRY1 and phyB interact directly with AUX/IAA proteins to inhibit auxin signaling in Arabidopsis. *Molecular Plant*, *11*(4), 523-541.

Xu, M., Zhu, L., Shou, H., & Wu, P. (2005). A PIN1 family gene, OsPIN1, involved in auxin-dependent adventitious root emergence and tillering in rice. *Plant and cell physiology*, *46*(10), 1674-1681.

Yamazaki, K., & Nakamoto, T. (1983). Primary root formation in the growing shoots of several cereal crops. *Japanese Journal of Crop Science*, *52*(3), 342-348.

Yang, H., Klopotek, Y., Hajirezaei, M. R., Zerche, S., Franken, P., and Druege, U. (2019). Role of auxin homeostasis and response in nitrogen limitation and dark stimulation of adventitious root formation in petunia cuttings. Ann. Botany. 124, 1053–1066. doi: 10.1093/aob/mcz09

Zažímalová, E., Murphy, A. S., Yang, H., Hoyerová, K., & Hošek, P. (2010). Auxin transporters—why so many?. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *2*(3), a001552.

Zerche S, Druege U. 2009. Nitrogen content determines adventitious rooting in Euphorbia pulcherrima under adequate light independently of pre-rooting carbohydrate depletion of cuttings. Scientia Horticulturae 121: 340–347.

Zerche S, Haensch KT, Druege U, Hajirezaei MR. 2016. Nitrogen remobilisation facilitates adventitious root formation on reversible dark-induced carbohydrate depletion in Petunia hybrida. BMC Plant Biology 16: 219. doi: 10.1186/s12870-016-0901-6.

Zhang, Q., Huber, H., Beljaars, S. J., Birnbaum, D., de Best, S., de Kroon, H., & Visser, E. J. (2017). Benefits of flooding-induced aquatic adventitious roots depend on the duration of submergence: linking plant performance to root functioning. *Annals of botany*, *120*(1), 171-180.

Zhang, S., Wu, J., Yuan, D., Zhang, D., Huang, Z., Xiao, L., & Yang, C. (2014). Perturbation of auxin homeostasis caused by mitochondrial FtSH4 gene-mediated peroxidase accumulation regulates Arabidopsis architecture. *Molecular Plant*, *7*(5), 856-873.

Zhang, T., Li, R., Xing, J., Yan, L., Wang, R., & Zhao, Y. (2018). The YUCCA-auxin-WOX11 module controls crown root development in rice. *Frontiers in plant science*, *9*, 523.

Zhao, Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual review of plant biology*, *61*, 49.

Zhao Y. 2012. Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. Molecular Plant 5, 334–338.

Zhao Y, Christensen SK, Fankhauser C, Cashman JR, Cohen JD, Weigel D, Chory J. 2001. A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. Science 291, 306–309.

Zhao Y, Hull AK, Gupta NR, Goss KA, Alonso J, Ecker JR, Normanly J, Chory J, Celenza JL. 2002. Trp-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. Genes & Development 16, 3100–3112.

Zhou DX, Yin K, Xue HW (2003) Effect of polar auxin transport on rice root development. Acta Bot Sin 45: 1421–1427

Zhou, J. J., & Luo, J. (2018). The PIN-FORMED auxin efflux carriers in plants. *International journal of molecular sciences*, *19*(9), 2759.

Zimmerman, R. H. (1981, June). Micropropagation of fruit plants. In *Symposium on Growth Regulators in Fruit Production 120* (pp. 217-222).

Zohary D, Hopf M, Weiss E (2012) Domestication of plants in the old world: the origin and spread of cultivated plants in southwest asia, europe, and the mediterranean basin. Oxford University Press, New York

Zolman, B.K. et al., (2008). Identification and characterization of Arabidopsis indole-3-butyric acid response mutants defective in novel peroxisomal enzymes. Genetics, 180, 237–251.

Zolman, B. K., Nyberg, M., & Bartel, B. (2007). IBR3, a novel peroxisomal acyl-CoA dehydrogenase-like protein required for indole-3-butyric acid response. *Plant molecular biology*, *64*(1), 59-72.

Zubieta, C. et al., (2003). Structural basis for substrate recognition in the salicylic acid carboxyl methyltransferase family. Plant Cell, 15, 1704–1716.

SITOGRAFIA

Ismea - Istituto di Servizi per il Mercato Agricolo Alimentare - ISMEA

Primer3 Input

PubMed (nih.gov)

Reverse Complement (bioinformatics.org)

The Olive Genome | CNAG Assembly and Annotation Team

Veneto Agricoltura – Agenzia Veneta per il Settore Primario

www.agea.gov.it

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.oleadb.it

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Ruperti che in questi mesi ha risolto qualsiasi problema legato alla burocrazia, mi ha aiutato nella scelta della tesi ed è stato sempre disponibile per chiarimenti pratici. Ringrazio il mio correlatore, il Prof. Muleo dell'Università degli studi della Tuscia che fin dal primo giorno mi ha accolto nel suo laboratorio e aiutato nella realizzazione di questo progetto di tesi, il Dott. Ivano Forgione che è stato il mio supporto pratico all'interno del laboratorio e la Dott.ssa Caterina Valerio e Gabriele Medori. Ringrazio anche l'Istituto per la BioEconomia (CNR, Sesto Fiorentino), in particolare la Dott.ssa Cristiana Giordano che ha eseguito le analisi istologiche sui miei campioni.

Ringrazio la mia famiglia, senza di loro non avrei mai raggiunto questo traguardo; non sono stati soltanto un aiuto economico ma anche dei miei sostenitori, soprattutto quando non credevo nelle mie capacità. Un pensiero anche ai miei amici, a partire dalle mie amicizie più consolidate fino a quelle create durante il mio percorso qui a Padova: le serate passate insieme e gli esaurimenti per gli esami sono momenti che porterò sempre con me.