

La cuticola in mais (*Zea mays*): studio dell'interazione tra geni che ne regolano la deposizione

La cuticola è uno strato idrofobico costituito principalmente da cutina, cere e suberina che ricopre, esternamente e in modo continuo, le cellule dell'epidermide fogliare e dei giovani fusti. Svolge funzioni fisiologicamente importanti per la pianta stessa, quali la limitazione della perdita d'acqua, la diffrazione della luce e l'impedimento del ristagno dell'acqua sulla pianta proveniente dalle precipitazioni ambientali. Costituisce, inoltre, una barriera nei confronti dell'attacco e della penetrazione di organismi patogeni.

Durante lo sviluppo della pianta di mais (*Zea mays*), specie vegetale impiegata in questo studio, si distinguono diverse fasi: una fase giovanile che comprende le prime quattro-cinque foglie, una fase di transizione e una fase adulta, dall'ottava foglia in poi. Nella fase giovanile le foglie sono dotate di una lamina opaca, ricca di composti cerosi, altamente idrofobica, mentre nella fase adulta presentano una lamina lucida e idrofila. Queste due fasi sono facilmente distinguibili perché le foglie giovanili, se spruzzate con acqua, trattengono le goccioline sulla propria superficie, mentre nelle foglie adulte le gocce scivolano immediatamente a terra.

Lo scopo del mio lavoro è stato quello di individuare e descrivere le interazioni tra i geni chiave che regolano la deposizione della cuticola in giovani plantule di *Zea mays*. Lo studio si è focalizzato su geni che rivestono un ruolo importante nella formazione della cuticola durante la prima fase di crescita della pianta. Per questo motivo, tutte le analisi sono state condotte su plantule nella fase giovanile.

In particolare, si è posta l'attenzione su tre geni della cuticola già caratterizzati e descritti in letteratura: due sono fattori di regolazione della deposizione delle cere, mentre il terzo codifica per un enzima coinvolto nella biosintesi delle cere. Seguendo un approccio di genetica diretta, sono state ottenute popolazioni segreganti per mutanti in ognuno di questi geni. Tale mutazione determina, nel primo mutante, la fusione del coleoptile con la prima foglia e la fusione parziale di quest'ultima con la seconda; inoltre, le prime foglie che riescono ad espandersi sono, oltre che fuse, anche arricciate. Nel secondo e terzo mutante l'alterata deposizione della cuticola si traduce in una drastica riduzione delle cere che, durante la fase giovanile, dovrebbero invece ricoprire la lamina fogliare; le foglie si mostrano lucide e se spruzzate con acqua trattengono le goccioline. Dovendo studiare l'interazione tra i geni, sono stati inoltre generati dei doppi mutanti, ovvero individui con mutazioni a carico di due geni contemporaneamente.

Per poter confermare il genotipo delle piante, dalla prima foglia di ogni plantula è stato estratto il DNA ed è stata effettuata la *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Nel complesso, per caratterizzare i genotipi mutanti sono state impiegate diverse metodologie.

Al fine di evidenziare significative alterazioni nello sviluppo, per ciascun genotipo sono stati misurati i seguenti parametri: l'altezza (cm) della plantula dalla base del culmo alla terza foglia, il peso (g) e l'area (mm²) della terza foglia intera, quest'ultima calcolata utilizzando il programma ImageJ.

Seguendo un approccio di tipo morfo-fisiologico, sono stati condotti saggi di *chlorophyll leaching* grazie ai quali è stato possibile analizzare le diverse alterazioni dello strato cuticolare e studiare la permeabilità epidermica della foglia. Tale parametro è infatti funzione dell'alterazione cuticolare: una cuticola alterata risulta essere molto permeabile, con un elevato rilascio di clorofilla in un lasso di tempo ristretto. Per ogni genotipo, con un numero minimo di 4 e massimo di 6 repliche biologiche, si è accertato che la foglia di interesse (seconda, terza o quarta foglia) fosse integra; dopo averle recise dalle plantule, le singole foglie sono state immerse in una soluzione di etanolo e acqua deionizzata all'interno di provette affinché la clorofilla venisse estratta. Con uno spettrofotometro si è determinato il contenuto di clorofilla misurando lo spettro di assorbimento del pigmento a 647 e 664 nm, eseguendo una analisi al giorno per circa due settimane. I dati grezzi sono stati elaborati su fogli Excel con apposite formule, mentre l'applicazione di un test statistico ha permesso di valutare l'eventuale significatività delle differenze di permeabilità osservate nei campioni.

Nelle ultime fasi del lavoro, si è indagato sul ruolo che ha cuticola nel favorire il raffreddamento della lamina fogliare. L'obiettivo è stato quindi capire se le alterazioni della cuticola avessero delle conseguenze, non solo a livello di permeabilità fogliare, ma anche a livello di traspirazione cuticolare. Le prime foglie dei mutanti e del controllo sono state recise dalle plantule e fotografate con una termocamera per analizzare le differenze di temperatura fogliare. Le fotografie sono state elaborate con l'ausilio del programma Research IR4 per ottenere i dati relativi alla temperatura media della foglia.

Al termine di questo studio, si è potuto concludere che le mutazioni nei geni della cuticola hanno un effetto significativo sullo sviluppo della pianta rispetto al controllo. In generale le plantule mutanti registrano valori dei parametri considerati (altezza, area fogliare) significativamente più bassi.

Poiché si parla di geni, molto spesso nei progetti di ricerca, metodologie di analisi che si basano su aspetti morfo-fisiologici tendono ad essere soppiantati da analisi prettamente molecolari. Il mio studio ha invece dimostrato come il *chlorophyll leaching* sia un metodo semplice ma valido per studiare l'effetto delle mutazioni sulla deposizione della cuticola e sulla sua funzione. Grazie ad esso è stato possibile formulare una importante conclusione: gli individui mutanti, rispetto al controllo, possiedono una alterazione della deposizione della cuticola tale da determinare una maggiore e significativa permeabilità epidermica.

Quando applicato allo studio dei doppi mutanti, il saggio di *chlorophyll leaching* ha consentito di ottenere dati preliminari sulle interazioni tra i geni: nel primo doppio mutante si ipotizza che i due geni interagiscano tra loro tramite epistasi; riguardo al secondo doppio mutante tra i geni non si osserva nessun effetto additivo o di soppressione e pertanto si può ipotizzare che uno dei due geni regoli, direttamente o indirettamente, il secondo.

Infine, è emerso che le lamine fogliari degli individui mutanti sono più fredde rispetto alle foglie del controllo.

I dati ottenuti sono importanti per gli studi e i progetti relativi a una migliore conoscenza e comprensione dei processi fisiologici che avvengono in *Zea mays*, nonché all'individuazione dei geni coinvolti negli stessi. In particolare, questo lavoro permetterà in futuro di studiare la diversità dei mutanti sui quali si è focalizzato il mio tirocinio al fine di, per esempio, modificare alcune caratteristiche della cuticola. Da un punto di vista agronomico assume particolare interesse la possibilità di aumentare la deposizione dei polimeri che costituiscono la cuticola in piante di interesse agrario, riducendo di conseguenza fenomeni quali l'eccessiva evapotraspirazione e il surriscaldamento della foglia.

Si prospettano studi più approfonditi sull'interazione tra i geni della cuticola che arricchiranno, con le analisi molecolari, i dati acquisiti in questo lavoro. Il fine sarà quello di ottenere un modello che illustri i meccanismi di regolazione fino ad ora solo ipotizzati.