



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

**Approcci fisiologici e molecolari per l'identificazione di
indicatori di qualità in semi di *Populus nigra* L.**

Relatore:

Prof.ssa Alma Balestrazzi

Correlatore:

Dott. Shraddha Shridhar Gaonkar

Tesi Sperimentale di
Giulia Doro

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

RIASSUNTO	3
1. INTRODUZIONE	5
1.1. Pioppo nero (<i>Populus nigra</i> L.).....	5
1.1.1 Caratteristiche generali e distribuzione geografica	5
1.1.2 Importanza economica ed ecologica.....	6
1.1.3 Applicazioni nel fitorisanamento.....	7
1.2. Propagazione clonale.....	8
1.3. Il processo di germinazione del seme: dinamiche e meccanismi di regolazione ..	9
1.3.1 Aspetti fisiologici del processo di germinazione di semi di pioppo nero.....	9
1.3.2 Semi: classificazione e tolleranza all'essiccazione	11
1.3.3 Conservazione e longevità dei semi di pioppo nero	12
1.4. Tecnologie di miglioramento dei semi: <i>seed priming</i> e <i>seed soaking</i>	16
1.4.1 <i>Seed priming</i> : definizione e tipologie.....	16
1.4.2 Limiti di efficacia dei trattamenti di <i>seed priming</i> applicati a semi intermedi e recalcitranti	19
1.4.3 Ruolo protettivo di flavonoidi e poliammine nel contesto del metabolismo pre-germinativo	20
1.5. Approcci di tipo “ <i>omics</i> ” applicati allo studio della qualità del seme.....	22
2. SCOPO DEL LAVORO	23
3. MATERIALI E METODI	24
3.1. Materiale vegetale, siti di raccolta e analisi del suolo	24
3.2. Protocollo di <i>seed soaking</i>	26
3.3. Test di germinazione.....	26
3.4. Quantificazione dei livelli di ROS.....	27
3.5. Misurazione del contenuto di ioni	27

3.6.	Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA	28
3.7.	Primer design e qRT-PCR.....	29
3.8.	Analisi statistiche.....	31
4.	RISULTATI.....	32
4.1.	Caratterizzazione del germoplasma CNCB di <i>Populus nigra</i> (case study 1).....	32
4.1.1	<i>Seed soaking</i> con spermidina promuove la germinazione dei semi di <i>P. nigra</i> 32	
4.1.2	I trattamenti di <i>seed soaking</i> inducono variazioni a livello di ionoma dei semi di <i>P. nigra</i>	33
4.1.3	Valutazione del profilo di espressione di geni coinvolti nella risposta del seme ai trattamenti di <i>soaking</i>	36
4.2.	Caratterizzazione del germoplasma CREA-FL di <i>Populus nigra</i> (case study 1)	38
4.2.1	Profilo fisiologico e biochimico di semi di cloni di pioppo nero	38
4.2.2	Profili di longevità dei semi di differenti cloni di <i>P. nigra</i>	40
5.	DISCUSSIONE.....	42
6.	CONCLUSIONI	50
7.	BIBLIOGRAFIA.....	52

RIASSUNTO

Il pioppo nero europeo, *Populus nigra* L., è una specie pioniera arborea nativa degli ecosistemi ripariali. Le popolazioni naturali di *P. nigra* hanno subito un significativo declino in conseguenza della perdita e della degradazione degli habitat ripariali causate dalle attività antropiche, rendendo la specie a rischio di estinzione in diverse aree d'Europa. Oltre a ricoprire un ruolo chiave per la biodiversità e la stabilità delle zone ripariali, *P. nigra* possiede un importante interesse sociale ed economico. Le coltivazioni di pioppo sono generalmente mantenute mediante propagazione clonale, tuttavia l'utilizzo prolungato di tale strumento riduce la variabilità genetica e la possibilità di identificare tratti di interesse per la resilienza agli stress ambientali. In questo contesto, la propagazione basata sui semi costituisce una strategia efficace, che necessita di essere valorizzata. Per il successo di questa tecnica è fondamentale la possibilità di stoccare i semi in banche del germoplasma. Pur avendo un'elevata germinabilità iniziale i semi di *P. nigra* sono caratterizzati da ridotta longevità e tolleranza all'essiccazione, rendendo difficoltosa la conservazione per periodi prolungati. Lo studio dei processi fisiologici e molecolari che determinano la qualità del seme può contribuire allo sviluppo di strategie per migliorarne la longevità e la performance di germinazione. Il presente lavoro di tesi prende in esame due tipologie di germoplasma di *P. nigra*. Nel primo caso, è stata analizzata una collezione di semi di pioppo nero fornita dal Centro Nazionale Carabinieri Biodiversità di Peri (Verona). Sono stati valutati gli effetti di differenti trattamenti di *seed soaking* effettuati con acqua, ed in parallelo utilizzando dosi opportunamente selezionate dei composti ad attività antiossidante spermidina e quercetina. I risultati evidenziano un significativo miglioramento dei parametri di germinazione in seguito al trattamento con spermidina 0.1 mM. Al fine di investigare i meccanismi fisiologici e molecolari alla base di tali differenze, sono state effettuate analisi di ionomica e di espressione genica che hanno evidenziato profili specifici nell'accumulo di cationi metallici e nell'espressione di geni associati al metabolismo pre-germinativo. Nel secondo caso, è stata analizzata una collezione di semi prodotti da cloni mantenuti presso il Centro CREA-FL (Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria, Dipartimento Foreste e Legno) di Casale Monferrato (Alessandria). Sono stati caratterizzati i profili di germinazione in risposta a periodi di conservazione a lungo termine, evidenziando differenze significative nella longevità del seme tra i vari genotipi. Sono stati inoltre valutati i livelli di specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS), il cui accumulo incontrollato causa danno ossidativo e deterioramento del seme. I risultati ottenuti rappresentano un punto

di partenza per supportare lo sviluppo di strategie più efficaci per la propagazione, la conservazione del germoplasma e il recupero ecologico delle popolazioni naturali di pioppo nero.

1. INTRODUZIONE

1.1. Pioppo nero (*Populus nigra* L.)

1.1.1 Caratteristiche generali e distribuzione geografica

Il pioppo nero europeo, *Populus nigra* L., è una specie arborea appartenente alla famiglia delle *Salicaceae* tipica degli ecosistemi delle zone ripariali di molti fiumi europei, asiatici e nordafricani (Vanden Broeck, 2003; de Rigo et al., 2016).

Il pioppo nero è una specie decidua di grandi dimensioni e a veloce crescita, può raggiungere i 40 m di altezza e i 200 cm di diametro del fusto. Le foglie sono cuneate a margini dentellati. I fiori sono raggruppati in amenti, ossia infiorescenze a grappolo pensili. Si formano a partire da una a tre settimane prima dell'avvio dello sviluppo fogliare a inizio primavera (marzo-aprile), periodo che corrisponde al picco di piene fluviali nelle zone temperate europee. Gli alberi di pioppo nero sono unisessuali, in quanto specie dioica, e raggiungono lo stadio riproduttivo tra i 10 e 15 anni. Gli individui maturi possono vivere per 100 anni, occasionalmente raggiungendo anche i 300-400 anni (Lefèvre et al., 2001; Vanden Broeck, 2003; de Rigo et al., 2016; Bajc et al., 2020).

Il polline prodotto dagli individui maschili è disperso per impollinazione anemofila, mediata dal vento. In seguito alla fecondazione dei fiori femminili sono prodotti fino a 250 semi di piccole dimensioni (circa 2 mm di lunghezza) per amento, rilasciati in presenza di clima caldo e secco. I semi sono circondati da un rivestimento denominato *pappo* (o *pappus*), simile a cotone, che permette loro di essere dispersi attraverso il vento e di depositarsi quando entrano in contatto con superfici umide. Il ciclo vitale del pioppo nero è influenzato dalle condizioni idrogeologiche. I semi sono dispersi nel momento che segue il periodo di picco delle piene fluviali, quando il terreno è umido e adatto alla colonizzazione. Si intuisce, quindi, che il rilascio e la colonizzazione dei semi deve rientrare in una breve finestra temporale. I semi di pioppo nero sono caratterizzati da un'elevata vitalità al momento del rilascio (circa 90%), che subisce un rapido declino nell'arco di 3-4 settimane (Lefèvre et al., 2001; Vanden Broeck, 2003; de Rigo et al., 2016; Bajc et al., 2020).

P. nigra è una specie pioniera eliofila, in grado di tollerare la luce diretta e di colonizzare suoli alluvionali anche di aree aperte e spoglie, attraverso semi, talee o frammenti di radice (Vanden Broeck, 2003). Questa specie può essere considerata come un vero e proprio "ingegnere ecosistemico" capace di modulare struttura e funzione dell'ecosistema ripariale

attraverso il controllo dei processi idrogeomorfologici e dell'habitat fluviale (Corenblit et al., 2016).

Il pioppo nero è ampiamente distribuito in Europa e si trova anche in Nordafrica e in Asia occidentale e centrale. L'area di distribuzione si estende dal Mediterraneo fino a circa 64° di latitudine a nord e dalle Isole Britanniche a ovest fino al Kazakistan e alla Cina orientale. L'areale di distribuzione comprende anche il Caucaso e gran parte del Medio Oriente (**Fig. 1**) (Vanden Broeck, 2003).



Fig. 1. Area di distribuzione di *Populus nigra* L. (www.euforgen.org/species/populus-nigra)

1.1.2 Importanza economica ed ecologica

Il pioppo nero è una specie di interesse sociale ed economico. È ampiamente coltivato in diverse regioni sia in forma di genotipo puro che come ibridi intraspecifici. I genotipi in forma pura sono impiegati in ambito ornamentale e, grazie alla loro plasticità, in contesti di protezione del suolo, di rimboschimento di aree industriali degradate e come frangivento (Yadav et al., 2010). Gli incroci di *P. nigra* con *Populus deltoides* o altre specie esotiche di pioppo forniscono adattabilità a diversi tipi di suolo e condizioni climatiche, abilità di radicamento, alta resistenza a malattie causate da *Xanthomonas populi* e una buona resistenza a *Marssonina brunnea* e al virus del mosaico del pioppo (Vanden Broeck, 2003). Già dagli anni '50 sono stati avviati numerosi programmi di conservazione *ex situ* del pioppo nero, svolti in centri specializzati (Lefèvre et al., 2001).

Il valore ecologico del pioppo nero per l'ecosistema ripariale supera nettamente il suo valore commerciale diretto. Contribuisce, come specie chiave, allo sviluppo delle foreste alluvionali in seguito ai periodi di piena, insieme alle specie del genere *Salix* spp., grazie all'elevata capacità di adattamento alle dinamiche idrogeologiche del suolo (Storme et al., 2004).

Le popolazioni naturali di *P. nigra* europee sono, però, tra le specie arboree più minacciate. I fattori di rischio sono rappresentati da: i) alterazioni dell'ecosistema ripariale, a causa delle attività antropiche come l'agricoltura, l'urbanizzazione e gli sbarramenti di fiumi, che modificano i cicli di piena fluviali; ii) la sostituzione del pioppo nero autoctono con altre specie ibride caratterizzate da una crescita più rapida; iii) l'introggressione, ossia il trasferimento di geni tra popolazioni geneticamente distinte (Vanden Broeck, 2003), come riportato nel caso del clone clone "*Italica*" (Lefèvre et al., 2001).

La conservazione *ex situ* è una strategia di breve termine, quando invece l'obiettivo è a lungo termine, sorge spontanea l'importanza della conservazione *in situ* della specie, ottenuta attraverso il ripristino attivo delle zone interessate oppure con programmi di riproduzione a lungo termine (Vanden Broeck, 2003). La soluzione più adatta è una strategia integrata che incorpora conservazione della specie *ex situ* e *in situ*, standardizzando il protocollo *ex situ* tra i paesi europei, includendo un database di cloni e delle linee guida per la coltivazione in campo e lo *storage* di semi e polline. Il pioppo nero rimane, quindi, un organismo modello per la conservazione delle risorse genetiche negli ecosistemi forestali (Lefèvre et al., 2001).

1.1.3 Applicazioni nel fitorisanamento

Il fitorisanamento è una tecnica di bonifica *in situ*, mediata dalle piante, di suoli, acque o sedimenti inquinati. Questo approccio presenta un'elevata versatilità unita a costi limitati e può essere impiegata con substrati e inquinanti di diversa origine (Yadav et al., 2010; Falconi et al., 2025).

Uno dei fattori principali da prendere in considerazione nella scelta dell'organismo vegetale da utilizzare nel fitorisanamento è la capacità di accumulare e trasportare i contaminanti, in particolare metalli, all'interno dei tessuti aerei (fitoestrazione) (Tözsér et al., 2023). Le piante legnose sono spesso preferite per la fitoestrazione, anche se le loro prestazioni nell'*uptake* di metalli sono inferiori rispetto a piante iperaccumulatrici, in quanto l'elevata produzione di biomassa porta ad una rimozione di metalli dal suolo complessivamente elevata (Di Lonardo et al., 2011). L'alta efficienza nella mobilitazione dei metalli dalla biomassa radicale ai tessuti aerei può ridurre le conseguenze dannose esercitate dagli inquinanti sull'anatomia, la fisiologia e la biochimica dell'apparato radicale. Inoltre, permette una migliore gestione della decontaminazione, in quanto con la potatura della chioma e il suo conseguente incenerimento è possibile gestire in modo efficiente i livelli di biomassa inquinata (Yadav et al., 2010). Tra le diverse specie legnose proposte il genere

Populus spp. è un eccellente candidato per la bonifica di suoli co-inquinati da inquinanti organici e inorganici. Presenta infatti caratteristiche ottimali per la fitoestrazione come, la rapida crescita, l'elevata produzione di biomassa e l'esteso sistema radicale, il quale assicura un efficiente *uptake* di acqua dal suolo contenente gli inquinanti. Il genere *Populus* spp. rappresenta un eccellente candidato per la bonifica di suoli contaminati da inquinanti organici e inorganici poiché presenta caratteristiche ottimali per la fitoestrazione (rapida crescita, elevata produzione di biomassa, esteso sistema radicale). Inoltre, sono disponibili protocolli per la coltura *in vitro* e la trasformazione genetica di pioppo che hanno consentito di sviluppare prodotti con elevata capacità di fitoestrazione (Balestrazzi et al., 2009; Tózsér et al., 2023; Yadav et al., 2010). La biomassa prodotta è utilizzata nell'industria del legname e della bioenergia (Di Lonardo et al., 2011).

Diverse specie di *Populus* spp. sono in grado di assorbire metalli pesanti come cadmio, mercurio, nichel, rame e zinco, anche se possiedono livelli ridotti di tolleranza. Molti di questi ioni metallici come, Zn^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} e Cu^{+2} , sono micronutrienti essenziali per la pianta e svolgono la funzione di cofattore per diversi enzimi chiave delle reazioni metaboliche. I metalli pesanti non essenziali possono essere accumulati a causa della scarsa capacità selettiva dei meccanismi di trasporto, come nel caso del cadmio può essere assorbito al posto dello zinco (Yadav et al., 2010). In seguito all'aumento dell'interesse nell'impiego del genere *Populus* spp. per approcci di fitorisanamento, sono aumentati il numero di studi su questo campo, in particolare, sulla caratterizzazione di cloni iperaccumulatori di metalli pesanti e sui processi metabolici coinvolti nei meccanismi di risanamento, al fine di identificare il genotipo migliore per ciascuna situazione (Yadav et al., 2010).

1.2. Propagazione clonale

Il pioppo nero europeo può essere propagato per via asessuale, o vegetativa, a partire da talee legnose di rami o fusto. Questa strategia è preferita nei contesti di coltivazioni a fini commerciali o per la conservazione di genotipi clonali. Le coltivazioni clonali consistono in individui prodotti dallo stesso materiale materno, risultando quindi, in alberi geneticamente identici tra loro (Lefèvre et al., 2001; Mushtaq et al., 2017). La propagazione clonale risulta vantaggiosa ai fini di ottenere alberi con tratti selezionati, come forma, qualità e produzione di legno, prestazioni di crescita e tolleranza a diversi stress ambientali o malattie (Mushtaq et al., 2017). Ad esempio, *Populus nigra* var. *Italica* (pioppo cipressino) è una variante del pioppo nero propagata per via vegetativa a partire da individui maschili. Il pioppo cipressino

è apprezzato per la sua forma colonnare e, grazie a questa caratteristica, è comunemente impiegato come frangivento e nelle alberature stradali (Kulczyk-Skrzeszewska & Kieliszewska-Rokicka, 2022). La possibilità di ottenere un alto numero di alberi in poco tempo è un fattore fondamentale non solo per l'industria del legname o per i vivai, ma anche per la conservazione di specie rare e a rischio, come il pioppo nero europeo (Mushtaq et al., 2017).

Malgrado i numerosi vantaggi portati dalla riproduzione vegetativa, non è possibile ignorare il declino di variabilità genetica e la mancanza di ricombinazione genica, causato dall'uso a lungo termine di questa strategia. È evidente, quindi, che per una specie come *P. nigra*, il cui germoplasma è attualmente a rischio, siano necessari programmi di miglioramento genetico. La propagazione delle piante attraverso i semi rappresenta una soluzione (Bisoffi & Frison, 1993; Iralu et al., 2019) e, in quest'ottica si è osservato un aumento degli studi sulla germinazione dei semi di specie forestali. La caratterizzazione della performance di germinazione e dei livelli di longevità dei semi risulta fondamentale non solo per la conservazione genetica *ex situ*, ma soprattutto per il ripristino ecologico delle popolazioni naturali (Iralu et al., 2019; Dalziel et al., 2022). La creazione di linee guida per la gestione ecosistemica, attraverso protocolli ottimizzati per la germinazione e per lo sviluppo di banche dei semi, costituisce un elemento cruciale per il mantenimento di specie ad alto valore ecologico ma con popolazioni naturali ridotte, come *P. nigra* (Iralu et al., 2019).

1.3. Il processo di germinazione del seme: dinamiche e meccanismi di regolazione

1.3.1 Aspetti fisiologici del processo di germinazione di semi di pioppo nero

I semi rappresentano una delle risorse alla base dei processi produttivi vitali per l'uomo. Nel corso dei millenni, l'umanità ha sfruttato i semi in ambito agricolo e alimentare, addomesticando e selezionando numerose specie vegetali e ricercando tratti specifici associati alla produttività e alla tolleranza agli stress ambientali. Molte specie forestali sono propagate per via clonale. Tuttavia, questo approccio applicato per tempi prolungati genera una perdita progressiva di variabilità genetica, interrompendo il flusso genico tra gli individui (Pires & Lima Baute, 2023). Inoltre, la frammentazione e la sottrazione di habitat non solo riducono le dimensioni delle popolazioni naturali, ma causano la perdita di tratti adattativi. In specie a rischio di estinzione come *P. nigra* è allarmante il calo della disponibilità di individui maturi in grado di disperdere polline e semi e di garantire la

produzione, quindi, nuovi individui (Lefèvre et al., 2001). In aggiunta alla già scarsa variabilità genetica, si sottolinea una mancata conoscenza delle corrette pratiche per la raccolta, selezione e conservazione dei semi di molte specie forestali (Jalonen et al., 2018). È evidente, quindi, la necessità di approfondire le attuali conoscenze, ancora in parte limitate, sulle caratteristiche dei semi di specie forestali, allo scopo di identificare fattori chiave per la produzione di semi di alta qualità. Queste attività rappresentano una forte priorità, soprattutto nell'ambito di progetti di riforestazione, conservazione e miglioramento di specie forestali, che necessitano del supporto di tecnologie innovative. La qualità del seme è definita da un complesso insieme di fattori genetici, fisici, fisiologici e sanitari che influenzano le prestazioni di germinazione e la longevità durante la conservazione. I tratti che determinano la qualità di un seme includono morfologia, dimensione, tolleranza all'essiccazione, dormienza, vigore, resistenza ai patogeni (Pires & Lima Baute, 2023). La germinazione è un processo complesso e finemente controllato che prevede una serie di cambiamenti a livello morfologico, fisiologico e molecolare (Madejón et al., 2015; Qu et al., 2020). Fattori ambientali, come temperatura, umidità e luce giocano un ruolo chiave, determinando il successo del processo di germinazione (Iralu et al., 2019). L'interazione tra le condizioni biotiche e abiotiche necessarie per la germinazione dei semi di una determinata specie, definiscono la cosiddetta "nicchia germinativa" (Dalziel et al., 2022).

Ciascuna specie vegetale possiede una nicchia germinativa propria, nel caso di *P. nigra*, i semi sono caratterizzati da una nicchia ristretta. Per la corretta germinazione e insediamento di questi semi, è richiesta una piena esposizione alla luce e un substrato costantemente umido nelle prime settimane di sviluppo, poichè le plantule sono estremamente sensibili allo stress idrico. Tali condizioni si verificano generalmente solo in specifici periodi dell'anno, in particolare nelle fasi successive ai picchi di piena degli ecosistemi ripariali, quando il ritiro delle acque lascia esposti i depositi alluvionali spogli e umidi, composti da sedimenti fini capaci di trattenere elevate quantità di acqua (Lefèvre et al., 2001). I tratti morfologici e fisiologici dei semi di pioppo nero riflettono la pressione selettiva attuata dalla nicchia germinativa (Dalziel et al., 2022). *P. nigra* possiede semi di piccole dimensioni (<2 mm) per garantire la dispersione anemofila, circondati da pappo per permettere l'adesione a terreni umidi. Sono, inoltre, distinti da un'alta vitalità, ma bassa longevità, da un investimento minimo nelle riserve e di conseguenza dall'assenza di dormienza poiché la germinazione è destinata ad avvenire in un breve *frame* temporale (Lefèvre et al., 2001). Un'approfondita analisi dei tratti propri del seme e della sua nicchia germinativa sono alla base dello sviluppo di protocolli finalizzati ad una corretta conservazione e a trattamenti,

come il *seed priming*, volti a migliorare le prestazioni di germinazione e sviluppo della plantula (Dalziel et al., 2022).

1.3.2 Semi: classificazione e tolleranza all'essiccazione

Tra i principali fattori che incidono sulla conservazione dei semi si trovano il contenuto interno d'acqua e la temperatura di stoccaggio. È noto come semi caratterizzati da elevata tolleranza agli ambienti aridi manifestano livelli superiori di longevità. La tolleranza all'essiccazione, infatti, è un tratto quantitativo strettamente legato alla longevità dei semi (Walters, 2015; Pires & Lima Baute, 2023). Una delle procedure più comunemente utilizzate per la conservazione a lungo termine prevede l'essiccazione dei semi. Tuttavia, non tutti i semi possiedono il tratto di tolleranza alla disidratazione (Pires & Lima Baute, 2023).

In base alla tolleranza alla disidratazione e di conseguenza al grado di longevità, i semi sono classificati in tre categorie: ortodossi, intermedi e recalcitranti. I semi ortodossi tollerano bassi livelli di contenuto d'acqua, fino al $0.03\text{-}0.07 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ DW}$ (*dry weight*), e possono essere conservati a lungo a -20°C (*storage* convenzionale). Molte specie di interesse agricolo producono semi che ricadono all'interno di questa categoria. I semi recalcitranti, invece, non tollerano la disidratazione e difficilmente possono essere conservati a lungo termine. Il livello di contenuto d'acqua endogeno che determina la mortalità dei semi recalcitranti è compreso nel range di $0.20\text{-}0.30 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ DW}$. Questa soglia può variare molto in base alla specie. Non potendo essere soggetti ad essiccazione, i semi recalcitranti mantengono un elevato contenuto di acqua e sono metabolicamente attivi. Di conseguenza, si verificano un rapido consumo delle risorse ed una accelerazione dei processi di deterioramento. Inoltre, queste condizioni favoriscono l'attacco e la diffusione di patogeni. La terza categoria include i semi intermedi che presentano tratti appartenenti ad entrambi i gruppi precedentemente descritti. In particolare, i semi intermedi sono in grado di tollerare contenuti d'acqua, in un range compreso tra i $0.11\text{-}0.13 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ DW}$, e possiedono ridotti livelli di longevità, indipendentemente dalle modalità di conservazione (Michalak et al., 2015; Walters, 2015; Iralu et al., 2019; Pires & Lima Baute, 2023).

Definire la corretta classificazione, basata sulla tolleranza all'essiccazione, per i semi della specie d'interesse permette di concentrarsi sulla loro qualità e di sviluppare strategie per il corretto stoccaggio (Pires & Lima Baute, 2023). Nella famiglia delle *Salicaceae* la classificazione dei semi è molto variabile, più di 30 specie producono semi descritti come ortodossi, mentre altri sono classificati come intermedi. Questa variabilità non rende

possibile una previsione nel comportamento di *storage* in specie per le quali non sono presenti sufficienti dati.

La classificazione dei semi di *P. nigra* è tutt'ora incerta. Secondo le linee guida di Gosling (2007) i semi di *P. nigra* sono recalcitranti, a causa della loro rapida perdita di vitalità e non è possibile conservarli per più di pochi giorni. Questa classificazione viene supportata dallo studio di Lefebvre et al. (2022) che si basa sulla caratterizzazione morfologica e fisiologica dei semi di pioppo nero. I semi di *P. nigra* possiedono un sottile tegumento che permette un rapido assorbimento di acqua durante la germinazione e livelli ridotti di oligosaccaridi, tratto ricorrente nei semi recalcitranti. Questo limitato investimento, in termini di energia metabolica, nella produzione di carboidrati complessi, è correlato all'incapacità dei semi di tollerare l'essiccazione. Tuttavia, Michalak et al. (2015) hanno valutato la tolleranza all'essiccazione nei semi di *P. nigra*, suggerendo che essi debbano essere classificati come "intermedi".

La rapida perdita di vitalità e la bassa tolleranza all'essiccazione dei semi di pioppo nero rappresenta un serio problema per la conservazione a lungo termine in banche del germoplasma. Dato l'ampio interesse per l'applicazione di *P. nigra* nei programmi di recupero ecologico, le ricerche si sono concentrate nell'identificazione di protocolli ottimizzati di stoccaggio *ex situ* (Michalak et al., 2015; Pawłowski et al., 2019).

1.3.3 Conservazione e longevità dei semi di pioppo nero

La pressione esercitata dal cambiamento climatico e la perdita di habitat hanno reso la conservazione delle risorse genetiche vegetali una priorità globale. L'approccio più efficiente ed economicamente sostenibile per soddisfare tale necessità è lo stoccaggio, o *storage*, dei semi all'interno di banche del germoplasma, o banche dei semi (Rajjou & Debeaujon, 2008; Nadarajan et al., 2023). Esse rappresentano una risorsa cruciale per la conservazione delle specie e per il ripristino ecologico, in particolare per specie minacciate o in via d'estinzione. La perdita di vitalità riduce le probabilità di successo di germinazione dei semi, poiché aumenta la loro suscettibilità a fattori di stress e ne causa il deterioramento. Il mantenimento di un'elevata vitalità dei semi rimane la sfida principale per le strutture coinvolte nella conservazione a lungo termine (Iralu et al., 2019).

La longevità dei semi si definisce come il periodo durante il quale il seme, e di conseguenza l'embrione, rimane vitale (Pawłowski et al., 2019). È un tratto complesso e il cui studio richiede competenze di tipo fisiologico, biochimico, biofisico e molecolare (Nadarajan et al.,

2023). La longevità dipende da fattori genetici e ambientali, come la temperatura di conservazione, il contenuto interno d'acqua e la qualità dei semi (**Fig. 2**) (Rajjou & Debeaujon, 2008). La conservazione ad elevata temperatura e umidità relativa causa il rapido deterioramento delle strutture cellulari e riduce la longevità dei semi. In queste condizioni ambientali, la fluidità del citoplasma aumenta e si osserva l'aggregazione di proteine denaturate. Altri fattori che influiscono sulla longevità includono i raggi UV, che causano danni al DNA, o l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) che causano danni ossidativi a lipidi, proteine e acidi nucleici (Sano et al., 2016).

I semi ortodossi sono in grado di tollerare eventi di essiccazione, questo permette loro di sopravvivere per decenni in uno stato di quiescenza. Le attività cellulari e metaboliche sono al minimo, ciò è possibile grazie allo stato amorfo del citoplasma. In seguito alla riduzione del contenuto d'acqua interno, i tessuti del seme subiscono un processo di vitrificazione, con la transizione del citoplasma da uno stato fluido a uno stato non cristallino (amorfo). La limitata mobilità molecolare garantita dallo stato vitrificato si pensa sia fortemente correlata alla longevità dei semi. Durante tale processo le molecole d'acqua sono progressivamente sostituite da oligosaccaridi, come saccarosio e raffiniosio. Gli oligosaccaridi appartenenti alla famiglia del raffiniosio (*RFOs, raffinose family oligosaccharides*) inibiscono la cristallizzazione del saccarosio, favorendo di conseguenza l'instaurarsi dello stato amorfo. Gli oligosaccaridi non solo rappresentano la principale fonte di energia durante la germinazione ma svolgono un ruolo di protezione dal danno ossidativo a livello delle membrane, mantenendo i lipidi in uno stato fluido (Sano et al., 2016; Nadarajan et al., 2023). In passato, si riteneva che la vitrificazione fosse una caratteristica esclusiva dei semi ortodossi e che non si verificasse in semi recalcitranti. Studi recenti hanno tuttavia dimostrato che tale processo può aver luogo sia in cellule tolleranti sia cellule sensibili all'essiccazione. Ciò che distingue i semi recalcitranti dai semi ortodossi, quindi, sembra essere l'entità della contrazione cellulare durante il processo di essiccazione, prima della formazione dello stato vetroso. I semi ortodossi sono caratterizzati da cellule con una massa secca e quantità di riserve maggiori, che di conseguenza tendono a contrarsi meno, a differenza dei semi recalcitranti che a causa delle poche riserve subiscono una forte contrazione (Nadarajan et al., 2023).

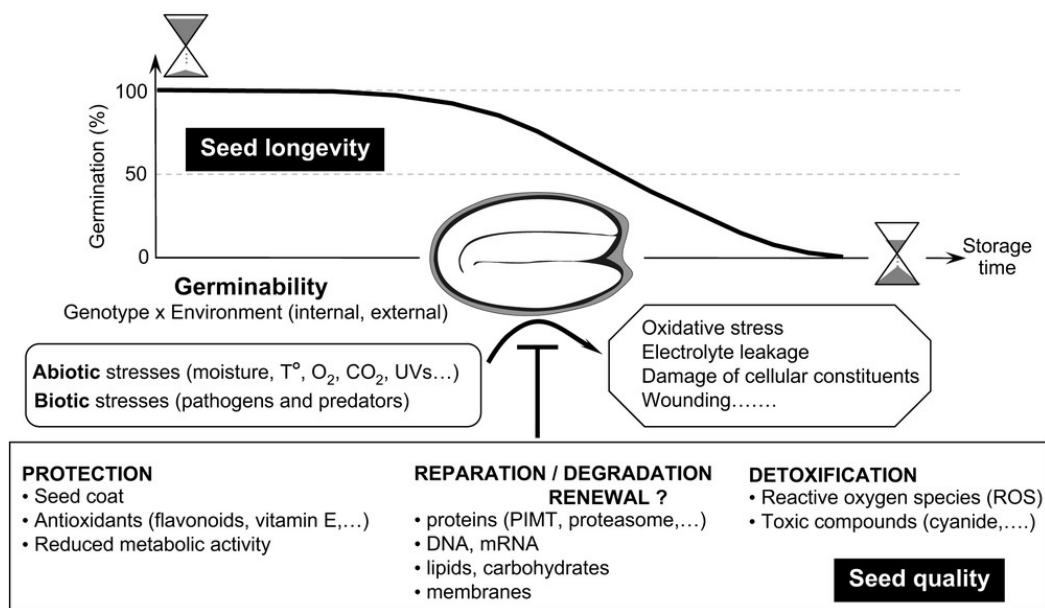


Fig. 2. Rappresentazione schematica dei parametri principali che determinano la longevità dei semi. (Rajjou & Debeaujon, 2008).

La tolleranza all'essiccazione e la stabilità dello stato vitrificato del citoplasma sono tratti continui che permettono una più corretta classificazione dei semi in ortodossi, intermedi o recalcitranti. Tale classificazione è fondamentale ai fini dell'identificazione e dello sviluppo di un protocollo di stoccaggio adatto ai semi di interesse. I semi ortodossi possono essere conservati all'interno di frigoriferi per periodi a medio termine e a lungo termine in congelatori. Lo stoccaggio di semi recalcitranti, invece, non è generalmente consigliato; tuttavia, di recente, l'interesse per le criobiotechnologie e la loro applicazione nelle banche del germoplasma ha subito una forte crescita. Attraverso questo approccio è possibile conservare semi di specie caratterizzati da ridotta longevità, come i semi recalcitranti, o semi di cui non si hanno sufficienti informazioni per prevedere il loro comportamento di conservazione (Nadarajan et al., 2023).

La criopreservazione prevede l'utilizzo dell'azoto liquido come agente criogenico e la temperatura di conservazione deve essere mantenuta tra i -170°C e -196°C . Studi in *Populus* spp. e *Salix* spp., specie caratterizzate da semi con bassa longevità, hanno dimostrato che grazie alla conservazione in azoto liquido i semi sono in grado di mantenere dall'80 al 100% della vitalità fino a 20 anni, mentre in condizioni di *storage* convenzionale la longevità varia dai 3 ai 12 anni (Michalak et al., 2015; Nadarajan et al., 2023). La maggiore criticità dei protocolli di criopreservazione rimane l'ottimizzazione del contenuto endogeno di acqua e del tasso di raffreddamento ai fini di impedire la formazione di cristalli di ghiaccio. Se l'ottimizzazione di questi due fattori non dovesse bastare è possibile l'utilizzo di

crioprotettori, soluzioni in grado di essiccare il citoplasma, di ridurre la formazione di cristalli di ghiaccio o limitare l'impatto dello stress ossidativo. Questa tecnologia rappresenta una risorsa fondamentale per ampliare le possibilità di conservazione a lungo termine delle risorse genetiche vegetali (Kim, 2018; Nadarajan et al., 2023).

Per il corretto sviluppo di protocolli di stoccaggio è fondamentale considerare quanto a lungo è richiesto che i semi mantengano elevata vitalità e qual è la finalità della conservazione. Ad esempio, per semi d'interesse commerciale è richiesta una sopravvivenza di 1-5 anni, mentre per semi rilevanti per il recupero ecologico è richiesta una sopravvivenza di 20-25 anni. La durata della sopravvivenza richiesta dipende da diversi fattori, come la rarità della specie, la difficoltà di rigenerazione e la probabilità di reintroduzione negli habitat adeguati (Nadarajan et al., 2023). *P. nigra* è una specie minacciata ad ampio interesse ecologico; perciò, il suo mantenimento a lungo termine all'interno di banche del germoplasma è essenziale per la conservazione della diversità genetica. Come già discusso, i semi di pioppo nero sono caratterizzati da una bassa longevità, e la loro classificazione non è tuttora definita, secondo alcuni studi i suoi semi dovrebbero ricadere all'interno della classe "recalcitranti", mentre per altri all'interno della classe "intermedi" (Gosling, 2007; Lefebvre et al., 2022; Michalak et al., 2015). L'indecisione sulla corretta classificazione e la mancata conoscenza di pratiche di stoccaggio adatte rendono la conservazione del pioppo nero, già minacciato dalla perdita di habitat, ancora più complessa (Suszka et al., 2014). Lo studio di Pawłowski et al. (2019) analizza le variazioni nel proteoma di semi di *P. nigra* soggetti a diverse tecniche di *storage*, evidenziando come lo stoccaggio a 3°C causi una forte riduzione nella vitalità già dopo il primo anno, accompagnata da un aumento dei livelli di enzimi associati alla risposta agli stress. Al contrario, a temperature sottozero, in particolare a -20°C, la germinabilità rimane elevata per almeno due anni. Il mantenimento di una vitalità elevata è associato ad una riduzione nell'abbondanza di proteine coinvolte in attività metaboliche, come glicolisi e gluconeogenesi, e di proteine legate al *turnover* proteico. Si osserva, invece, un accumulo di proteine *late embryogenesis abundant* (LEA), associate alla stabilizzazione delle membrane cellulare e dei tessuti in condizioni di stress idrico. La capacità dei semi di *P. nigra* di mantenere un'elevata vitalità a -20°C è stata supportata anche da Suszka et al. (2014). Nello studio si osserva come i semi di pioppo nero mantengano elevati tassi di germinabilità per almeno 2 anni se stoccati a -20°C, sia in semi freschi ($0.15 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ DW}$) che in semi esposti precedentemente ad essiccazione ($0.07 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ DW}$). Complessivamente le corrette tecniche di stoccaggio per i semi di pioppo nero prevedono l'impiego di temperature sottozero, le quali garantiscono un rallentamento nel deterioramento e un mantenimento di elevati tassi

di germinabilità. In particolare, la criopreservazione viene suggerita come una strategia efficace per la conservazione a lungo termine *ex situ* del germoplasma di *P. nigra*.

1.4. Tecnologie di miglioramento dei semi: *seed priming* e *seed soaking*

1.4.1 *Seed priming*: definizione e tipologie

Il *seed priming* rientra nelle tecnologie di miglioramenti dei semi (pre-semina) che prevedono l'esposizione dei semi a specifici trattamenti volti a migliorare la loro germinabilità e la loro sopravvivenza in presenza di fattori di stress biotici o abiotici. Queste tecnologie sono storicamente sfruttate in ambito agricolo, ma recentemente è emersa la loro applicabilità anche in progetti di conservazione e recupero ecologico. Per tali progetti, pratiche di miglioramento della qualità dei semi sono fondamentali, poichè spesso sono disponibili quantità limitate di semi. Le cosiddette *Seed Enhancement Technologies* (SETs) includono *priming*, *coating* e *conditioning* (Brown et al., 2021; Dalziell et al., 2022).

Il *seed priming* è un trattamento pre-semina che prevede la loro imbibizione d'acqua o soluzioni osmotiche contenenti additivi come estratti o ormoni vegetali oppure il contatto con substrati umidi. Lo scopo del trattamento è l'attivazione dei processi metabolici caratterizzanti la fase iniziale della germinazione (metabolismo pre-germinativo), ai fini di ottenere una germinazione temporalmente controllata, rapida e sincronizzata (**Fig. 3**). La tecnica prevede il blocco della germinazione completa, impedendo l'emergenza della radichetta attraverso l'essiccazione dei semi fino al contenuto endogeno d'acqua originale, prima dell'imbibizione. Questo passaggio, definito anche *dry-back*, permette lo stoccaggio dei semi soggetti a *priming* per utilizzi futuri (**Fig. 3**). La durata e l'intensità del *dry-back* deve essere controllata, tenendo in considerazione la tolleranza all'essiccazione dei semi, in modo da non ridurre la longevità. Il successo del *seed priming* è infatti fortemente correlato alla specie, genotipo, fisiologia dell'organismo vegetale e alla tipologia di *priming* utilizzata (Paparella et al., 2015; Brown et al., 2021). Attraverso il corretto protocollo di *priming* adatto alla specie/varietà d'interesse è possibile migliorare le prestazioni di germinazione, insediamento e crescita dell'organismo vegetale anche in condizioni ambientali avverse, come lo stress idrico, termico, salino e nutritivo (Devika et al., 2021; Jatana et al., 2024).

Il metabolismo pre-germinativo è contraddistinto dall'innesco di numerosi processi cellulari essenziali per la germinazione, come la sintesi di proteine e acidi nucleici e l'induzione di attività enzimatiche associate al ciclo di Krebs e alla catena di trasporto di elettroni. Sono,

inoltre, sintetizzate sostanze in grado di promuovere la crescita ed enzimi coinvolti nella mobilizzazione di biomolecole e nel contrasto dello stress ossidativo. Durante la fase di imbibizione lo stress ossidativo causato dal forte accumulo di ROS può causare estesi danni al DNA, portando all'innescio di meccanismi di riparo ai danni cellulari (Paparella et al., 2015; Gohari et al., 2026). I processi di divisione ed espansione cellulare sono supportati dalla sintesi di proteine coinvolte nel mantenimento dell'integrità e della funzionalità delle membrane. L'integrità delle membrane permette di minimizzare fenomeni di *leakage* assicurare l'efficienza metabolica della cellula. Le tecniche di *priming* rendono possibile l'attivazione uniforme del metabolismo pre-germinativo, migliorando i meccanismi antiossidanti, di sintesi proteica e di riparo ai danni cellulari. (Gohari et al., 2026).

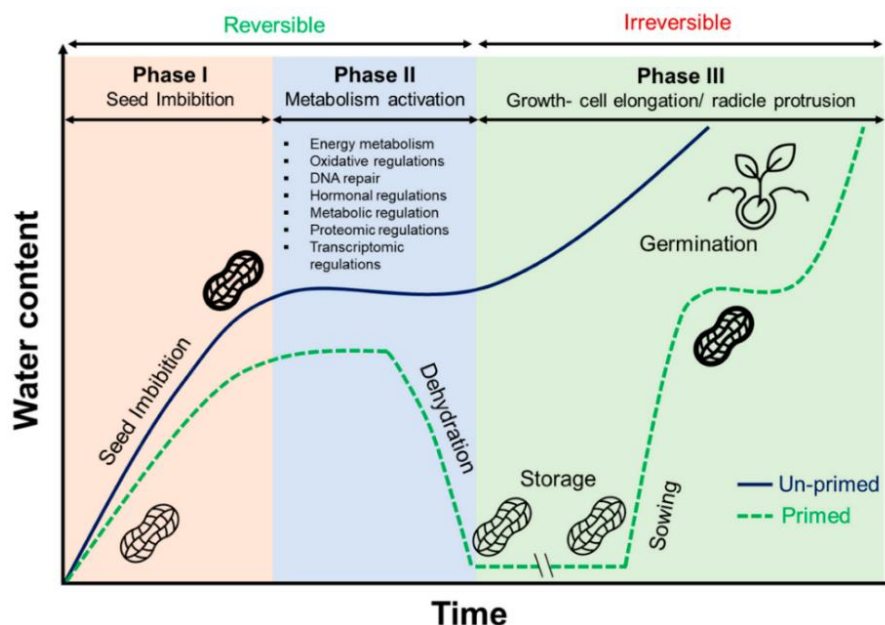


Fig. 3. Rappresentazione schematica del processo di *seed priming* (Jatana et al., 2024).

L'efficienza del *seed priming* dipende dalla tipologia di *priming* scelta (Gohari et al., 2026). Le molteplici tecniche di *priming* si differenziano in base alla soluzione utilizzata durante l'imbibizione o alle condizioni specifiche a cui è esposto il seme durante il trattamento (MacDonald & Mohan, 2025). L'*hydropriming* è la tecnica di *seed priming* più semplice ed economica, la quale prevede l'immersione dei semi in acqua e il loro *dry-back* prima della semina. L'*hydropriming* migliora la germinabilità dei semi e il vigore delle plantule, supportandone l'insediamento anche in condizioni di stress abiotici. Il principale svantaggio è l'assorbimento d'acqua incontrollato da parte dei semi, poiché l'affinità per l'acqua varia nei diversi tessuti del seme. Per minimizzare questo inconveniente è importante definire il

corretto volume d'acqua richiesto per idratare i semi e l'adeguata temperatura e durata dell'immersione. (Marthandan et al., 2020; Gohari et al., 2026).

L'*osmopriming* è la tecnica più comunemente utilizzata, i semi vengono reidratati in soluzioni osmotiche a basso potenziale idrico, come il glicole polietilenico, o PEG. Questo tipo di immersione permette al seme di assorbire l'acqua lentamente, prolungando lo stadio di imbibizione e consentendo un avanzamento graduale della germinazione. I bassi potenziali idrici delle soluzioni osmotiche permettono di attivare il metabolismo pre-germinativo evitando la protrusione della radichetta. In confronto all'*hydropriming*, con questa tecnica l'assorbimento dell'acqua è controllato, ciò riduce la produzione di ROS e di conseguenza si ha una migliore risposta alle fonti di stress ambientale (Marthandan et al., 2020; Gohari et al., 2026). L'*osmopriming* ricade sotto una categoria di *priming* più ampia detta *priming* chimico o *chemopriming*. Nel *chemopriming* si utilizzano agenti di *priming* di natura vegetale o sintetica, come soluzioni di sali inorganici, ormoni (come acido salicilico e gibberelline), poliammine (spermina, spermidina, putresceina), carboidrati (tralosio, zucchero, rafinosio), vitamine o specie reattive di ossigeno-azoto-zolfo. Il *priming* chimico ha efficienze molto diverse in base all'agente chimico utilizzato. Tenendo in considerazione la fitotossicità e la durata del trattamento per ciascun organismo vegetale è possibile sviluppare protocolli di *chemopriming* in grado di portare a forti miglioramenti nelle prestazioni di germinazione e crescita (Marthandan et al., 2020; MacDonald & Mohan, 2025; Gohari et al., 2026). Il trattamento di *priming* che prevede l'utilizzo di sali inorganici, come NaCl, Na₂CO₃, KCl, KNO₃, CaCl₂, e CaSO₄ è definito *halopriming*. In condizioni di stress abiotici l'*halopriming* viene applicato come strategia preventiva, in quanto consente l'attivazione di diverse vie metaboliche legate alla protezione dei tessuti cellulari e all'omeostasi (Gohari et al., 2026). Nel caso del protocollo di *hormopriming* si utilizzano soluzioni di immersione contenenti fitormoni, i cui principali sono acido gibberellico, etilene, auxina, citochinine e acido abscissico (MacDonald & Mohan, 2025). Il *nutripriming* è una tipologia specifica di *priming* chimico che prevede l'imbibizione dei semi in soluzioni contenenti micro e macronutrienti, in grado di incrementare la germinabilità, la resilienza e la tolleranza allo stress dei semi. L'adeguato apporto di nutrienti ai semi assiste la sintesi proteica, l'elongazione e espansione cellulare promuovendo l'insediamento delle piante, migliorando la resa e la qualità dei semi (Gohari et al., 2026).

I semi soggetti a *biopriming* sono trattati con soluzioni contenenti microrganismi benefici come funghi e batteri in grado di promuovere la crescita delle piante (*plant growth-promoting bacteria*). È una tecnica *eco-friendly* in grado di promuovere naturalmente la

resilienza del raccolto, riducendo la necessità di fertilizzanti chimici e fungicidi contribuendo, quindi, allo sviluppo di tecniche agricole sostenibili (Gohari et al., 2026). Il *solid matrix priming* (SMP), o *matrix priming*, è una tecnica semplice ed economica che consiste nell'idratazione controllata dei semi mediante miscelazione con substrati solidi ad alta capacità di ritenzione idrica, come vermiculite, sabbia o perlite. Questa tecnica permette una moderata imbibizione del seme, favorendo l'attivazione dei processi fisiologici e metabolici legati alla germinazione senza indurre l'emergenza della radichetta. Inoltre, il SMP migliora la tolleranza agli stress ambientali e incrementa la concentrazione di enzimi antiossidanti e di riserve organiche della cellula (Gohari et al., 2026). Il *nanopriming* prevede invece l'utilizzo di nanoparticelle al fine di migliorare la germinazione e lo sviluppo della plantula. Grazie alle ridotte dimensioni e all'elevata superficie specifica, le nanoparticelle facilitano l'assorbimento di acqua e nutrienti, stimolano il sistema antiossidante e aumentano la tolleranza agli stress abiotici. Questa tecnica può inoltre modulare pathway metabolici e l'espressione di geni coinvolti nella risposta agli stress, contribuendo al miglioramento delle prestazioni fisiologiche della pianta (Gohari et al., 2026).

Il *seed priming* è ampiamente utilizzato in ambito agricolo grazie alla sua efficacia e al suo basso costo economico, infatti grazie a questa tecnologia è possibile migliorare il vigore dei semi e di conseguenza la loro qualità (Corbineau et al., 2023; Devika et al., 2021). Il *seed priming* rappresenta una prospettiva futura per un'agricoltura sostenibile grazie alla possibilità del ridotto uso di erbicidi e pesticidi. Gli studi delle prestazioni dei semi *primed* in campo e della loro longevità durante lo stoccaggio richiedono maggiore attenzione in quanto, attraverso la comprensione delle interazioni fra le diverse fonti di stress ambientale, è possibile ottenere importanti informazioni sulla fisiologia e sviluppo dei semi (Gohari et al., 2026).

1.4.2 Limiti di efficacia dei trattamenti di *seed priming* applicati a semi intermedi e recalcitranti

Lo stoccaggio dei semi soggetti a tecniche di *priming* rappresenta una necessità pratica fondamentale al fine di facilitarne l'uso, il trasporto e la manovrabilità. Il controllo del *dry-back* è un requisito chiave per uno stoccaggio efficace, in quanto attraverso un'essiccazione eccessivamente rapida, intensa e non adatta ai tratti del seme si potrebbero perdere i benefici del *priming* (Di Girolamo & Barbanti, 2012). I semi recalcitranti e/o sensibili all'essiccazione possono essere soggetti a trattamenti di imbibizione, ma la semina deve

essere effettuata entro una breve finestra temporale (Struve, 1998). Si ritiene più corretto, quindi, l'utilizzo di tecniche di *seed soaking* e non *seed priming*, dove il passaggio di *dry-back* è escluso, in quanto potenzialmente pericoloso per la vitalità del seme (Gaonkar et al., 2025).

1.4.3 Ruolo protettivo di flavonoidi e poliammine nel contesto del metabolismo pre-germinativo

La produzione di ROS durante l'imbibizione dei semi costituisce un segnale positivo per la germinazione. Tuttavia, al di sopra di una soglia critica, l'accumulo eccessivo di ROS compromette vitalità del seme. Il concetto di “*oxidative window*” rappresenta molto bene questa condizione: il livello dei ROS durante la germinazione deve essere finemente controllato per evitare conseguenze deleterie (Fuchs et al., 2023; Gaonkar et al., 2025). Flavonoidi e poliammine sono metaboliti coinvolti in diversi meccanismi fisiologici e nello sviluppo degli organismi vegetali e svolgono un ruolo fondamentale contro stress biotici e abiotici (Lepiniec et al., 2006; Hasanuzzaman et al., 2019; Zhou et al., 2019). L'utilizzo di flavonoidi e poliammine come agenti di *priming* contribuisce a contrastare l'accumulo di ROS (Fuchs et al., 2023; Gaonkar et al., 2024).

I flavonoidi sono un'ampia famiglia di metaboliti secondari delle piante, suddivisi in flavonoli, flavoni, isoflavonoidi, flavanoni, isoflavoni, catechine e antocianine. Data la loro ampia diversificazione, i flavonoidi sono composti sintetizzati in tutti gli organi e compartimenti degli organismi vegetali. Sono associati a diverse funzioni fisiologiche, come lo sviluppo di odori, gusti e, in particolare, di colore di fiori e frutti. Essi svolgono un ruolo non solo di attrazione degli impollinatori ma anche una funzione protettiva, come nel caso di alcuni composti tossici per i predatori, e contribuiscono a mitigare l'impatto di numerosi stress ambientali, ad es. salinità, siccità e radiazioni UV (Singh et al., 2021; Shah et al., 2022). I flavonoli includono composti come quercetina, myricetina, fisetina e kaempferolo. La quercetina svolge un ruolo cruciale non solo durante la germinazione del seme e lo sviluppo della plantula ma anche nella tolleranza a stress ambientali. La quercetina possiede attività antiossidante, agisce mantenendo bilanciati i livelli di ROS e regolando l'attività degli enzimi antiossidanti glutazione reduttasi (GR), glutazione perossidasi (GPX), glutazione-S-transferasi (GST), ascorbato perossidasi (APX) e superossido dismutasi (SOD). I flavonoli, in particolare la quercetina, contribuiscono alla via di trasduzione del segnale mediata dalle auxine e dall'acido abscissico (ABA) (Singh et al., 2021).

L'utilizzo di flavonoidi come agenti di *priming* è stato testato in semi soia e colza, riscontrando un'influenza positiva sulla germinazione in condizioni di stress salino (Singh et al., 2021). Studi condotti su *Medicago truncatula* hanno dimostrato che l'imbibizione dei semi con soluzioni di quercetina è in grado di mitigare gli effetti dell'invecchiamento post-*priming*, migliorando la germinabilità, la vitalità e la crescita delle plantule. Tali effetti sono associati a una riduzione dell'accumulo di ROS e a un incremento del potenziale antiossidante del seme, suggerendo che la quercetina possa contribuire a rallentare i processi di deterioramento e a preservare la longevità dei semi dopo il trattamento di *priming* (Gaonkar et al., 2024).

Le poliammine sono piccoli composti azotati policationici alifatici estremamente diffusi nel regno vegetale (Fuchs et al., 2023; Shokri et al., 2024). Le poliammine includono spermidina e spermina, e il loro precursore putrescina (Shokri et al., 2024). L'utilizzo di poliammine come agenti di *priming* risulta particolarmente promettente, considerando il ruolo molteplice di queste molecole nei processi di sviluppo e differenziamento, di regolazione genica e di sintesi degli acidi nucleici, e di rimozione dei ROS. Le proprietà antiossidanti delle poliammine sono rese possibili dalla presenza di siti di legame anionici e cationici, che permettono loro di agire inibendo la perossidazione lipidica e le reazioni ossidative (Fuchs et al., 2023). In condizioni di stress indotto dalla presenza di metalli pesanti, l'applicazione esogena di soluzioni contenenti poliammine negli organismi vegetali incrementa la tolleranza contro la tossicità da metalli e stimola l'attività del sistema di difesa dal danno ossidativo e l'espressione di antiossidanti enzimatici e non enzimatici, come glutatione (GSH) e ascorbato (AsA) (Hasanuzzaman et al., 2019). Lo studio di Fuchs et al. (2023) in semi recalcitranti di *Acer saccharinum* dimostrano come trattamenti di imbibizione con soluzioni spermidina aumentino la germinabilità in semi soggetti a media-severa disseccazione. Lo studio sottolinea come la spermidina abbia un effetto positivo sull'integrità di membrana, in quanto riduce il danno alle membrane cellulari e il leakage di elettroliti. Lo studio di Gaonkar et al. (2025) analizza l'effetto della spermidina in semi di *Populus alba* L. stoccati a lungo termine. In seguito al trattamento di *seed soaking* con soluzioni di spermidina 100 μ M la germinabilità è aumentata rispetto ai semi non trattati, confermando i risultati ottenuti in altre specie quali *Osyris lanceolata*, *Psidium guajava*, *Pinus roxburghii*, *Litchi chinensis*, and *Pouteria campachiana*.

1.5. Approcci di tipo “omics” applicati allo studio della qualità del seme

Il termine “omics” si utilizza per definire approcci di analisi ad elevata risoluzione quali genomica/epigenomica, trascrittomica, proteomica, metabolomica e ionomica. Gli studi omici e multi-omici contribuiscono all’avanzamento delle conoscenze di biologia del seme, aiutando la comprensione di complessi meccanismi di regolazione (Auroux et al., 2026). Hanno utilizzato approcci di proteomica per identificare variazioni nel proteoma del seme di pioppo nero, correlabili a evidenti segni del deterioramento (Pawłowski et al., 2019).

Lo ionoma è definito come la composizione di nutrienti ed elementi traccia nei tessuti vegetali, il suo studio attraverso approcci di ionomica contribuisce alla comprensione dell’omeostasi ionica negli organismi vegetale (Xiao et al., 2021). Lo studio dello ionoma può inoltre fornire informazioni sui processi di assorbimento, accumulo e mobilizzazione degli elementi minerali, contribuendo alla comprensione dei meccanismi che regolano il trasporto dei nutrienti e delle loro interazioni con le vie di segnalazione ormonale durante lo sviluppo, la maturazione e la germinazione del seme (Martínez-Ballesta et al., 2020). A sottolineare l’interazione tra le diverse discipline omiche, variazioni nello ionoma sono collegati a cambiamenti nel trascrittoma, proteoma e metaboloma in quanto tutti sono controllati dal genoma che di fatto risponde alle condizioni ambientali (Xiao et al., 2021).

Lo ionoma viene ampiamente analizzato in ambito agronomico per valutare l’assorbimento e l’accumulo di minerali da parte degli organismi vegetali, al fine di migliorarne la resa e la qualità del germoplasma (Luo et al., 2023; Qin et al., 2021). Tuttavia, le applicazioni della ionomica ai semi risultano ancora limitate rispetto agli studi condotti su tessuti vegetativi e specie di interesse agronomico. In particolare, i meccanismi che regolano l’accumulo, la distribuzione e la mobilizzazione degli elementi minerali nei diversi compartimenti del seme durante maturazione, conservazione e germinazione rimangono ancora poco compresi (Martínez-Ballesta et al., 2020). Tale lacuna risulta ancora più evidente nelle specie forestali, come *P. nigra*, per le quali sono disponibili poche informazioni riguardanti le relazioni tra ionoma, qualità fisiologica del seme, longevità e risposta a trattamenti applicati in fasi di pre-semina.

2. SCOPO DEL LAVORO

Il presente lavoro di tesi sperimentale si pone come obiettivo la caratterizzazione fisiologica e molecolare di due collezioni di germoplasma di *Populus nigra*, fornite rispettivamente dal Centro Nazionale Carabinieri Biodiversità (CNCB) di Peri (Verona) e dal Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Dipartimento Foreste e Legno (CREA-FL) di Casale Monferrato (Alessandria). Lo scopo ultimo della ricerca è lo sviluppo e l'ottimizzazione di protocolli adeguati alla propagazione attraverso semi e alla conservazione a lungo termine del germoplasma. L'attività sperimentale rientra nell'ambito del progetto *National Biodiversity Future Center-NBFC -National-Recovery and Resilience Plan (NRRP) – NextGenerationEU*, “Node 4-Ecosystems functions, services and solutions”, Activity 5 (*Conceptual framework and methodological tools of Nature Based Solution and Restoration Ecology*). Task 4.5.2 (*Monitoraggio, caratterizzazione funzionale e tracciabilità del materiale di propagazione di base con alta resilienza ai cambiamenti climatici e finalizzato al rimboschimento di siti forestali soggetti ad eventi estremi*).

L'efficacia di trattamenti di *seed soaking* nel miglioramento della germinazione è stata valutata utilizzando campioni di semi forniti dal Centro Nazionale Carabinieri Biodiversità (CNCB) di Peri (Verona). Sono stati sviluppati tre differenti tipologie di *seed soaking* basati sull'imbibizione dei semi per 4 ore in H₂O (I), in una soluzione contenente spermidina 0.1 mM (II) e in una soluzione contenente quercetina 2 mM (III). Per ciascun gruppo sperimentale sono stati analizzati la performance di germinazione, il profilo ionomico del seme e i livelli di espressione di geni correlati al metabolismo delle poliammine, ai sistemi di risposta antiossidante e alla mobilizzazione dei cationi metallici.

Lo studio condotto sui campioni provenienti dal Centro CREA-FL (Casale Monferrato) si è focalizzato sulla caratterizzazione della variabilità interclonale in termini di germinazione e vitalità del seme e sui livelli di longevità. I semi sono stati sottoposti a test di germinazione, identificando la vitalità iniziale. Parallelamente sono stati analizzati i livelli di stress ossidativo mediante quantificazione delle specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS), mediante saggio DCFH-DA. Infine, per valutare la variabilità in termini di longevità, è stata monitorata la germinabilità dei semi conservati -20°C per un periodo di 12 mesi.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Materiale vegetale, siti di raccolta e analisi del suolo

I semi di pioppo nero (*Populus nigra* L.) utilizzati in questo lavoro di tesi sono stati forniti in parte dal Dott. Lorenzo Gui, Centro Nazionale Carabinieri Biodiversità (CNCB) di Peri (Verona) (<https://rgpbio.it/cncb/peri/>) (**Fig. 4**), impegnato nella intera filiera produttiva di materiale di propagazione forestale ai sensi della Direttiva 1999/105/CE, relativa alla produzione e alla commercializzazione dei materiali forestali di moltiplicazione, recepita dal D. L.vo. 386/2003. Il Centro ospita l'unico laboratorio italiano abilitato alla certificazione del materiale forestale di moltiplicazione secondo le regole internazionali dell'International Seed Testing Association (ISTA). Altri semi di pioppo nero sono stati forniti dal Dott. Pier Mario Chiarabaglio, Dipartimento Foreste e Legno del Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA-FL) di Casale Monferrato (AL). Si tratta dei semi ottenuti da 10 cloni (**Fig. 5**) che appartengono alla collezione mantenuta presso tale Centro.



Fig. 4. Inquadramento geografico e confini amministrativi del Comune di Mori (Trento). (Wikimedia Commons, opera originale di Arno-Co (2023), rilasciata sotto licenza CC BY-SA 4.0).



Fig. 5. Rappresentazione grafica dell'origine geografica dei cloni di *Populus nigra* L. mantenuti presso il CREA-Foreste e Legno di Casale Monferrato (AL).

I 10 cloni sono stati ottenuti per propagazione clonale attraverso talee di individui provenienti da popolazioni naturali di pioppo nero, situate in diverse località in Italia (**Fig. 5, Tabella. 1**). Il materiale vegetale è stato raccolto nell'impianto situato presso il Centro CREA-FL di Casale Monferrato, a Maggio 2025 e mantenuto all'interno di apposite buste di plastica. I semi dei baccelli maturi e leggermente aperti sono stati separati manualmente dal pappo e in seguito sono stati stoccati in sacchetti di plastica sigillati sottovuoto a -20°C per 1 anno.

Nel caso del sito CNCB di Peri (Verona), sono stati effettuati dei campionamenti di suolo. Le analisi chimico-fisiche sono state poi effettuate da un laboratorio specializzato (LabAnalysis Group, Casanova Lonati, Pavia; <https://www.labanalysis.it/>), utilizzando metodiche analitiche standard: EPA 3051A 2007 (*microwaved assisted acid digestion of sediments, sludges, soils and oils*), EPA 6020B 2014 (*inductively coupled plasma-mass spectrometry*).

Tabella. 1. Caratteristiche dei cloni di *Populus nigra* L. mantenuti presso il Centro CREA-Foreste e Legno di Casale Monferrato (AL) analizzati in questo studio.

Clone	Sesso	Sito di raccolta	Tipo di campione	Origine del clone
N692	F	Zelata (PV)	Talee	Naturale
N760	F	Bosco negri (PV)	Talee	Naturale
N581	F	Ozzero (MI)	Talee	Naturale
N1034	F	Francavilla Bisio (AL)	Talee	Naturale
N1088	F	Serravalle Scrivia (AL)	Talee	Naturale
N1028	F	Francavilla Bisio (AL)	Talee	Naturale
N1037	F	Serravalle Scrivia (AL)	Talee	Naturale
N1012	F	Francavilla Bisio (AL)	Talee	Naturale
N1085	F	Serravalle Scrivia (AL)	Talee	Naturale
N185	F	Casino di Terra (PI)	Talee	Naturale

3.2. Protocollo di *seed soaking*

I trattamenti di *seed soaking* sono stati effettuati come descritto di seguito. Aliquote di semi (30 mg) sono state sottoposte a imbibizione con H₂O (1 ml) e con soluzioni contenenti spermidina 0.1 mM (1 ml, SPD) e quercetina 2 mM (1ml, QRT) per 4 h all'interno della camera termostata. Al termine i semi sono stati asciugati con carta assorbente e sottoposti a test di germinazione. I semi secchi (*dry seeds*) non trattati (UT, *untreated*) sono stati usati come controllo. I campioni per le successive analisi molecolari sono stati trasferiti di azoto liquido (N₂) e stoccati a –80 °C. Il sistema sperimentale è illustrato in **Fig. 6 a**.

3.3. Test di germinazione

I test di germinazione sono stati condotti come descritto di seguito. I semi di pioppo nero provenienti dal sito CNCB di Peri (Verona) sono stati trasferiti in piastre Petri (diametro 90 mm) contenenti carta da filtro inumidita con 2.5 mL di H₂O. In ciascuna piastra sono stati trasferiti 20 semi e sono stati utilizzati 5 replicati per trattamento. Le piastre Petri sono state sigillate con parafilm e mantenute all'interno della camera di coltura a 22 °C in condizioni di luce con densità di flusso fotonico di 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperiodo di 16 h/8 h e umidità relativa (RH, *relative humidity*) pari al 70–80% all'interno dei contenitori. La germinazione è stata monitorata per 6 giorni. I semi in cui è avvenuta la protrusione della radichetta sono

stati considerati come germinati. Nel caso dei semi provenienti dal Centro CREA-FL (Casale Monferrato), i test di germinazione sono stati condotti in piastre Petri a 3 settori (diametro 90 mm) contenuti, per ciascun settore, carta da filtro inumidita con 1 mL di H₂O. In ogni settore sono stati trasferiti 10 semi, per un totale di 30 semi per piastra, ogni piastra è stata considerata come 3 replicati. La germinazione è stata monitorata per 7 giorni. I test di germinazione con i semi conservati a -20°C sono stati ripetuti a tempi successivi di 3, 6 e 12 mesi. La performance di germinazione è stata valutata utilizzando il parametro di germinabilità (G%), definito come la percentuale di semi germinati alla fine del test di germinazione.

3.4. Quantificazione dei livelli di ROS

I livelli di ROS sono stati quantificati nei semi di pioppo nero utilizzando il colorante fluorogenico 2',7'-diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA, Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Il colorante è convertito in un composto non fluorescente in seguito alla deacetilazione mediata dalle esterasi cellulari, per poi essere ossidato e convertito nel composto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceina (DFC) dai ROS. Il composto DFC può essere rilevato mediante spettroscopia di fluorescenza con spettri di eccitazione ed emissione massimi rispettivamente a 495 nm e 529 nm (Gaonkar et al., 2025). Il protocollo utilizzato è stato descritto da Griffo et al. (2023), applicando le seguenti modificazioni: campioni di 10 semi sono stati incubati per 45 min con 50 µL di una soluzione contenente DCFH-DA 10 µM e successivamente è stata misurata la fluorescenza a 517 nm usando il termociclatore Rotor-Gene 6000 (Corbett Robotics, Brisbane, Australia), impostando il programma per un ciclo di 30 s a 25 °C. Per ciascun clone di poppo nero sono stati valutati cinque replicati da 10 semi ciascuno. Come controllo negativo, è stato utilizzato un campione contenente solo DCFH-DA per sottrarre la fluorescenza di base. La fluorescenza è stata calcolata normalizzando i campioni rispetto ai controlli ed è espressa in Unità di Fluorescenza Relativa (R.F.U., *Relative Fluorescence Units*).

3.5. Misurazione del contenuto di ioni

L'analisi del contenuto di ioni in semi CNCB di *P. nigra* soggetti a trattamenti di *seed soaking* è stata effettuata in collaborazione con il Prof. Fabrizio Araniti (Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali - Produzione, Territorio, Agroenergia, Università degli Studi

di Milano). I campioni sono stati essiccati in forno a 70 °C per 72 ore fino al raggiungimento di un peso costante. Il tessuto essiccato (circa 100 mg) da ciascuna replica biologica sono stati trasferiti in recipienti di digestione in Teflon contenenti 10 mL di HNO₃ al 67% e mineralizzati utilizzando un sistema di digestione a microonde (MULTIWAVE-GO, Anton Paar GmbH). La digestione a microonde è stata eseguita utilizzando un programma di temperatura a due fasi (Fase 1: aumento della temperatura a 180 °C in 30 min; Fase 2: mantenimento della temperatura a 180 °C per 10 min). Dopo un tempo di raffreddamento di 20 min, i campioni mineralizzati sono stati trasferiti in provette di polipropilene e diluiti 1:100 con una soluzione di HNO₃ 0,3 M in acqua Milli-Q. Le concentrazioni degli elementi sono state misurate mediante ICP-MS (spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente, AGILENT 7850 ICP-MS). Per verificare l'efficienza di nebulizzazione, una soluzione contenente 200 µg L⁻¹ di uno standard interno (45Sc, 72Ge, 89Y, 103Rh, 159Tb, 165Ho) è stata introdotta a monte del nebulizzatore nel flusso del campione. Le interferenze analitiche sono state eliminate mediante una cella di collisione con un flusso di He di 5 mL min⁻¹. Le concentrazioni elementari sono state quantificate utilizzando curve di calibrazione esterne ed espresse su base di peso secco.

3.6. Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA

Aliquote (80-90 mg) di semi di poppo nero sono state macinate in N₂ liquido. Il materiale ottenuto è stato raccolto in provette Eppendorf da 1.5 mL. Il protocollo di estrazione dell'RNA vegetale utilizzato è stato descritto da Oñate-Sánchez & Vicente-Carbajosa (2008), applicando le seguenti modifiche. Ad ogni provetta Eppendorf, contenente circa 50 mg di semi polverizzati, è stato aggiunto un volume di 550 µL di tampone di estrazione (0.4 M LiCl, 0.2 M TrisHCl pH 8.0, 25 mM EDTA, 1% SDS) e 550 µL di cloroformio. I campioni sono stati successivamente miscelati mediante vortex per 10 s. In seguito, le provette sono state centrifugate a 10.000 rpm per 3 min a 4 °C. Il surnatante è stato raccolto e trasferito in nuove provette Eppendorf da 1.5 mL, a ciascuna provetta sono stati aggiunti 500 µL di fenolo acido, miscelandole, in seguito, mediante vortex per 10 s. Un volume di 200 µL di cloroformio è stato aggiunto a ciascun campione, ogni provetta è stata miscelata e centrifugata a 10.000 rpm per 3 min a 4 °C. Il surnatante è stato raccolto e trasferito in nuove provette Eppendorf da 1.5 mL, a ciascuna provetta è stato aggiunto 1/3 di volume di cloruro di litio. I campioni sono stati incubati per 60 min a 4°C e poi centrifugati a 10.000 rpm per 30 min a 4°C. Il surnatante è stato rimosso e il pellet di RNA è stato sottoposto lavaggio con

100 µL etanolo al 70% raffreddato in ghiaccio. I campioni sono stati centrifugati a 10.000 rpm per 1 min a 4°C. E' stato effettuato un secondo lavaggio con 100 µL etanolo al 100% raffreddato in ghiaccio. Il pellet di RNA è lasciato asciugare all'aria e in seguito risospeso in dH₂O *nuclease-free*. La concentrazione di RNA in ciascun campione è misurata usando uno spettrofotometro Biowave (Biochrom Ltd., Cambridge, UK), mentre l'integrità dell'RNA è valutata mediante elettroforesi su gel d'agarosio. I cDNA sono stati ottenuti utilizzando il RevertAid First-Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Monza, Italia), in accordo con i suggerimenti del produttore.

3.7. Primer design e qRT-PCR

Le reazioni di qRT-PCR (*quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*) sono state svolte utilizzando il termociclatore CFX Duet Real-time PCR (Bio-Rad Laboratories Inc., Milano) e il kit Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Monza), seguendo le indicazioni del produttore. Il software Bio-rad CFX maestro (Bio-Rad Laboratories Inc.) è stato utilizzato per eseguire le analisi. Il protocollo di amplificazione applicato è il seguente: denaturazione a 95 °C per 10 min, 45 cicli a 95 °C per 15 s, 60 °C per 30 s, e 72 °C per 30 s.

Le sequenze codificanti (CDS, *coding DNA sequence*) dei geni di interesse sono state identificate in base alle sequenze nucleotidiche disponibili nella banca dati *Phytozome* (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) utilizzando come riferimento il genoma della specie modello *Arabidopsis thaliana* TAIR10 (Phytozome genome ID: 167, NCBI taxonomy ID: 3702). Successivamente, sono stati identificati gli omologhi nella specie *Populus trichocarpa* v4.1 (Phytozome genome ID: 533, NCBI taxonomy ID: 3694), dalla quale si sono ottenute le relative sequenze codificanti. Gli omologhi in *Populus nigra* sono stati ottenuti utilizzando la funzione Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a partire dalle CDS di *P. trichocarpa*, selezionando le sequenze con la percentuale di identità più alta rispetto alla *query*. I geni sono considerati omologhi putativi poiché le sequenze d'interesse disponibili di *P. nigra* sono annotate come “*predicted*”.

Per ciascun gene, sono state progettate coppie di oligonucleotidi (*primers*) utilizzando il programma *PrimerQuest Tool* (<https://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>) e sono state successivamente analizzate attraverso il programma *Oligo Analyzer* (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). Le coppie di *primers* sono riportati in **Tabella 2**. Dall'elenco di geni possibili è stato selezionato come gene *reference* *PnPP2A*

(XM_062125892.1), in quanto è stato riportato come gene *house-keeping* in pioppo, esibendo espressione stabile in diversi tessuti (Tang et al., 2019). La quantificazione relativa dei trascritti è stata effettuata come descritto da Thomsen et al. (2010), utilizzando un valore di efficienza (E) pari ad 1.8. Tutte le reazioni sono state effettuate in triplicato. Lo Z-score (centrato sulla media e diviso per la deviazione standard di ciascuna variabile) è stato calcolato sui valori di Ct linearizzati e utilizzato per generare heatmaps relative ai livelli di espressione genica.

Tabella 2. Lista delle sequenze delle coppie di oligonucleotidi (*primers*) utilizzate per l'analisi qRT-PCR. *PP2A*, SERINE/THREONINE-PROTEIN PHOSPHATASE PP2A-2 CATALYTIC SUBUNIT. *SPDS1*, SPERMIDINE SYNTHASE 1. *SPMS*, SPERMINE SYNTHASE-LIKE. *PAO1*, POLYAMINE OXIDASE 1. *SOD1*, SUPEROXIDE DISMUTASE [CU-ZN] 1. *SOD2*, SUPEROXIDE DISMUTASE [CU-ZN] 2. *CAT1*, CATALASE ISOZYME 1. *CAT2*, CATALASE-2. *APX*, L-ASCORBATE PEROXIDASE, CYTOSOLIC. *DHAR2*, GLUTATHIONE S-TRANSFERASE DHAR2-LIKE. *PCS*, GLUTATHIONE γ -GLUTAMYL CYSTEINYLTRANSFERASE 1-LIKE. *GHS2*, GLUTATHIONE SYNTHETASE, CHLOROPLASTIC. *Pn*, *Populus nigra*

Gene (Accession n°)	Oligonucleotide Forward	Oligonucleotide Reverse
<i>PnPP2A</i> (XM_062125892.1)	5'-GCTTCCTGGCTGGTTTACT-3'	5'-GCTCCATTGCTCCCTCTTAT-3'
<i>PnSPDS1</i> (XM_062118065.1)	5'-TTGGGAGTAAGGGAGGGTTT-3'	5'-AATCGTTGCTGTTGGTCTCTG-3'
<i>PnSPMS</i> (XM_062101481.1)	5'-GGCAGAAAGTATGTGGCTTCA-3'	5'-CTGTTGAGCAGAGGACAAACC-3'
<i>PnPAO1</i> (XM_062102120.1)	5'-CAAACACACACACCCACACA-3'	5'-CCATTCTCCGCCAATACCTTTC-3'
<i>PnSOD1</i> (XM_062089199.1)	5'-TGTTGGAAGGGCTGTTGTTG-3'	5'-AAACTACGGTGGAGTGAGGTAG-3'
<i>PnSOD2</i> (XM_062117129.1)	5'-ACCCATCTCTTCACTCTCCTT-3'	5'-GCTGACACCTTCACTGCTATT-3'
<i>PnCAT1</i> (XM_062111670.1)	5'-AAGCCCAACCCTAAGTCTCATA-3'	5'-TCTTGCGGAACACCCAAATC-3'
<i>PnCAT2</i> (XM_062116693.1)	5'-ATGCTCCAAAGTGTGCTCATC-3'	5'-GCCAGTGTGAATGACAGAAGG-3'
<i>PnAPX</i> (XM_062099260.1)	5'-ACTTCGTGTCTTGAATAACCATCC-3'	5'-TCTCCACTGCCTTCTGATACTC-3'
<i>PnDHAR2</i> (XM_062129641.1)	5'-GTTGTTGTTCTCCCGTGAATCT-3'	5'-AAGGCTCAACCACCACATTAC-3'
<i>PnPCS</i> (XM_062106298.1)	5'-GGGTAAAGTTGAAGCGTATCG-3'	5'-TGACCAGTTCCTGTCTGTTT-3'
<i>PnGHS2</i> (XM_062090367.1)	5'-AGAGAAGGCGGAGGAAACAATA-3'	5'-AAATGTGGGCGAAACCATAGG-3'

3.8. Analisi statistiche

Per la valutazione degli effetti dei diversi trattamenti di *seed soaking* sulla germinabilità dei semi provenienti dal sito CNBC (Peri, Verona), le differenze significative (p -value < 0.05) sono state valutate mediante *one way* ANOVA e test di Duncan, confrontando i quattro gruppi di trattamento (UT: non trattati, H₂O: acqua, SPD: spermidina, QRT: quercetina). Le reazioni di *qRT-PCR* sono state svolte in triplicato, i valori grezzi sono stati normalizzati mediante Z-score (centrato sulla media e diviso per la deviazione standard di ciascuna variabile) e le differenze significative (p -value < 0.05) tra i dati di espressione genica sono state determinate mediante *one way* ANOVA e test di Duncan, confrontando i gruppi di trattamento precedentemente elencati. Per la valutazione delle differenze significative (p -value < 0.05) della germinabilità e dell'accumulo di ROS tra diverse tipologie clonali provenienti dal Centro CREA-FL (Casale Monferrato) sono state effettuate analisi *one way* ANOVA e test di Duncan. Per la valutazione delle prestazioni di conservazione della seconda collezione di semi, le differenze significative (p -value < 0.05) sono state valutate mediante *two way* ANOVA considerando come fattori la tipologia clonale e il periodo di conservazione.

I software disponibili pubblicamente SumAOV (© 2014 by Houssein I. Assaad; <https://houssein-assaad.shinyapps.io/SumAOV/>) e TwoWayANOVA (© 2014 by Houssein I. Assaad; <https://houssein-assaad.shinyapps.io/TwoWayANOVA/>), sviluppati da Assaad et al. (2015) sono stati utilizzati per svolgere *one way* ANOVA, *two way* ANOVA e test di Duncan.

I dati relativi al contenuto ionico in ciascun gruppo di semi esposti a trattamenti di *seed soaking* sono stati analizzati utilizzando il software MetaboAnalyst 6.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/>), disponibile pubblicamente. I dati sono stati sottoposti ad *auto-scaling* (valori centrati sulla media e divisi per la deviazione standard di ciascuna variabile), prima di eseguire analisi univariata (ANOVA) e multivariata, analisi delle componenti principali (Principal Component Analysis, PCA). I dati relativi alla longevità dei semi di diverse tipologie clonali provenienti dal Centro CREA-FL (Casale Monferrato) sono stati analizzati utilizzando il software MetaboAnalyst 6.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/>), disponibile pubblicamente. I dati sono stati sottoposti ad *auto-scaling* (valori centrati sulla media e divisi per la deviazione standard di ciascuna variabile), prima di eseguire l'analisi delle componenti principali (*Principal Component Analysis*, PCA).

4. RISULTATI

4.1. Caratterizzazione del germoplasma CNCB di *Populus nigra* (case study 1)

4.1.1 *Seed soaking* con spermidina promuove la germinazione dei semi di *P. nigra*

Al fine di valutare l'effetto dei trattamenti di *seed soaking* sulla germinabilità dei semi di *P. nigra*, è stato allestito il sistema sperimentale illustrato in **Fig. 6 a**. I risultati dei test di germinazione evidenziano che il trattamento con spermidina 0.1 mM (SPD) induce un incremento significativo (p -value < 0.05) del parametro G% (9 ± 2.24 %), rispetto al controllo non trattato (UT, *untreated*) (1 ± 2.24 %) (**Fig. 6 b**).

Nel caso dei campioni sottoposti a imbibizione con acqua (H₂O, 4 ± 2.24 %) e quercetina 2 mM (QRT, 4 ± 6.65 %) non sono state osservate differenze significative (p -value < 0.05) se confrontati con i semi non trattati (UT, *untreated*, 1 ± 2.24 %) o con i semi trattati con spermidina 0.1 mM. I risultati di questi esperimenti suggeriscono che il trattamento di *seed soaking* con spermidina 0.1 mM costituisce un approccio promettente al fine di migliorare la germinabilità in semi di *P. nigra*.

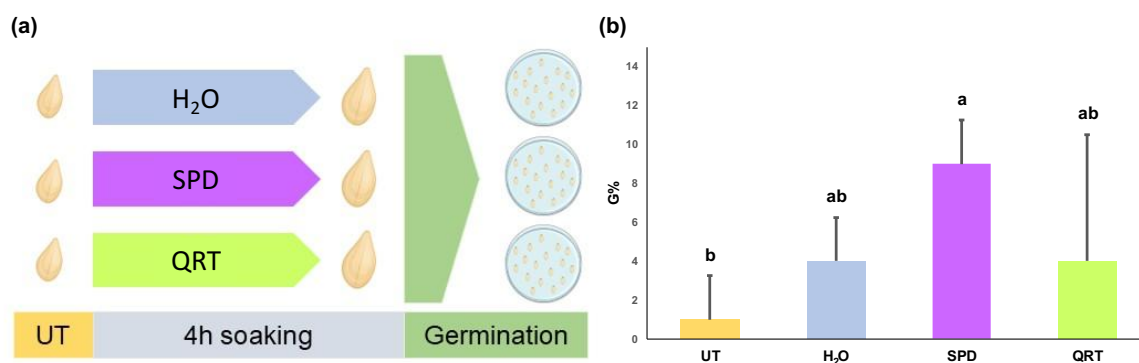


Fig. 6. Rappresentazione grafica del sistema sperimentale dei diversi trattamenti di *seed soaking* e relativo impatto sulla germinazione. **(a)** Sistema sperimentale sviluppato per valutare l'impatto dei trattamenti di *seed soaking* sulla germinazione in semi della prima collezione di *P. nigra*. UT, controllo non trattato; H₂O, semi sottoposti ad imbibizione con acqua; SPD, semi sottoposti ad imbibizione con spermidina 0.1 mM; QRT, semi sottoposti ad imbibizione con quercetina 2 mM. **(b)** Germinabilità percentuale (G%). L'analisi statistica dei dati è stata effettuata con *one-way* ANOVA e test di Duncan, le medie senza lettere in comune sono significativamente (p -value < 0.05) diverse.

4.1.2 I trattamenti di *seed soaking* inducono variazioni a livello di ionoma dei semi di *P. nigra*

L'analisi del contenuto di ioni in semi CNCB di *P. nigra* soggetti a trattamenti di *seed soaking* è stata effettuata in collaborazione con il Prof. Fabrizio Araniti (Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali - Produzione, Territorio, Agroenergia, Università degli Studi di Milano). L'analisi dei componenti principali (PCA, *Principal Component Analysis*) ha consentito di evidenziare differenze nello ionoma dei campioni analizzati: non trattato (UT, *untreated*), imbibizione in acqua (H₂O), imbibizione con spermidina 0.1 mM (SPD) e imbibizione con quercetina 2 mM (QRT) (

Fig. 7 a). L'imbibizione con H₂O è risultato essere la principale fonte di variabilità all'interno del *dataset* lungo la componente principale numero 1 (*Principal Component 1*, PC1). PC1 contribuisce al 43.9% della variabilità osservata e alla separazione del *cluster* del controllo non trattato, evidenziando come l'imbibizione di per sé, indipendentemente della tipologia di soluzione utilizzata, sia in grado di indurre variazioni nel contenuto di ioni dei semi (**Fig. 7 a**). La componente PC2 contribuisce al 32% della variabilità osservata ed evidenzia la separazione tra i *clusters* relativi al trattamento con acqua (H₂O) rispetto ai trattamenti con spermidina 0.1 mM (SPD) e con quercetina 2 mM (QRT). Non è stato possibile rilevare una separazione netta tra i *clusters* relativi ai trattamenti con la poliammina spermidina (SPD) ed il composto flavonoide quercetina (QRT). L'analisi PCA mette in luce come il trattamento di imbibizione possa influenzare il profilo dello ionoma dei semi di *P. nigra*.

Le alterazioni nello ionoma dei semi sottoposti a trattamenti di *seed soaking* sono state rappresentate sotto forma di *heat map* (

Fig. 7 b). In questo caso, gli analiti sono stati suddivisi in macronutrienti, micronutrienti ed elementi traccia e metalli pesanti. I valori riportati, in seguito alla normalizzazione tramite Z-score, sono rappresentati in rosso se indicano concentrazioni relativamente elevate rispetto alla media, e in blu se indicano concentrazioni relativamente inferiori alla media. I macronutrienti rappresentati da fosforo (P), magnesio (Mg) e calcio (Ca) mostrano livelli inferiori nei semi non trattati (UT, *untreated*), rispetto ai campioni sottoposti a *soaking* con acqua (H₂O), spermidina 0.1 mM (SPD), e quercetina 2 mM (QRT) (**Fig. 7 a**). Il macronutriente potassio (K) è caratterizzato da un andamento opposto poichè il controllo non trattato (UT, *untreated*) presenta un incremento nella concentrazione di tale ione, mentre i campioni sottoposti a *soaking* presentano una riduzione nel contenuto di potassio. Il campione non trattato evidenzia una forte diminuzione dei micronutrienti zinco (Zn) e

manganese (Mn), mentre i trattamenti stimolano un aumento dei livelli di tali ioni. I micronutrienti selenio (Se) e ferro (Fe) subiscono un forte incremento in risposta al trattamento con acqua (H₂O) rispetto ai semi non trattati e ai semi trattati con spermidina (SPD) e quercetina (QRT). I micronutrienti molibdeno (Mo), rame (Cu) e nichel (Ni) presentano un andamento analogo al potassio (K), con livelli superiori nel controllo non trattato. I metalli pesanti rilevati, fortemente tossici, includono piombo (Pb), tallio (Tl), alluminio (Al), cadmio (Cd), arsenico (As). Si è osservata una riduzione della concentrazione di tali metalli nei trattamenti con spermidina 0.1 mM (SPD) e quercetina 2 mM (QRT), rispetto al controllo non trattato (UT, *untreated*) e al trattamento con acqua (H₂O). Il *soaking* con acqua comporta un accumulo di arsenico e cadmio, mentre nei semi non trattati si è riscontrato un incremento di piombo, tallio e alluminio. Il trattamento con spermidina (SPD) ha indotto un consistente accumulo di cromo (Cr), se paragonato agli altri trattamenti mentre l'imbibizione con quercetina (QRT) promuove l'assorbimento o la ritenzione di sodio (Na). L'impatto del trattamento sulla concentrazione degli ioni individuati mediante l'analisi univariata *one-way* ANOVA è illustrato attraverso l'utilizzo di *boxplots* (

Fig. 7 c). Gli ioni che presentano variazioni significative rientrano nella categoria di elementi traccia e metalli pesanti, sottolineando come tale gruppo abbia influito maggiormente alle differenze nello ionoma del seme tra i trattamenti. Coerentemente con quanto mostrato dalla *heat map* (

Fig. 7 b), le concentrazioni di alluminio (Al) e piombo (Pb) sono elevate nel controllo non trattato (UT, *untreated*) rispetto ai trattamenti mentre nel caso del piombo (Pb) l'imbibizione in acqua mostra una concentrazione maggiore rispetto ai trattamenti con spermidina (SPD) e quercetina (QRT). Le concentrazioni di tallio (Tl) evidenziano una gradualità crescente da destra verso sinistra, dove nel controllo non trattato (UT) le concentrazioni sono più elevate mentre nel trattamento con quercetina (QRT) sono minori. Il sodio (Na) presenta un andamento opposto a quello del tallio (Tl), con gradualità crescente da sinistra verso destra. Il cromo (Cr) come già evidenziato dalla *heat map*, è caratterizzato da un forte accumulo o ritenzione nei semi trattati con spermidina (SPD), in confronto agli altri trattamenti e al controllo.

I dati delle concentrazioni di metalli pesanti ottenuti dall'analisi dei campioni di suolo raccolti nel sito CNCB sono illustrati in **Tabella 3**. In entrambi i campioni di suolo tutti i contaminanti monitorati, nello specifico Arsenico (As), Cadmio (Cd), Cromo (Cr), Mercurio (Hg), Nichel (Ni), Piombo (Pb), Rame (Cu) e Zinco (Zn) presentano concentrazioni al di sotto del limite indicato dal decreto legislativo D.Lgs. 152/06. Nel caso dell'alluminio (Al)

non viene indicato un limite di legge, in quanto non è considerato come contaminante di origine antropica, ma come uno dei principali costituenti della crosta terrestre.

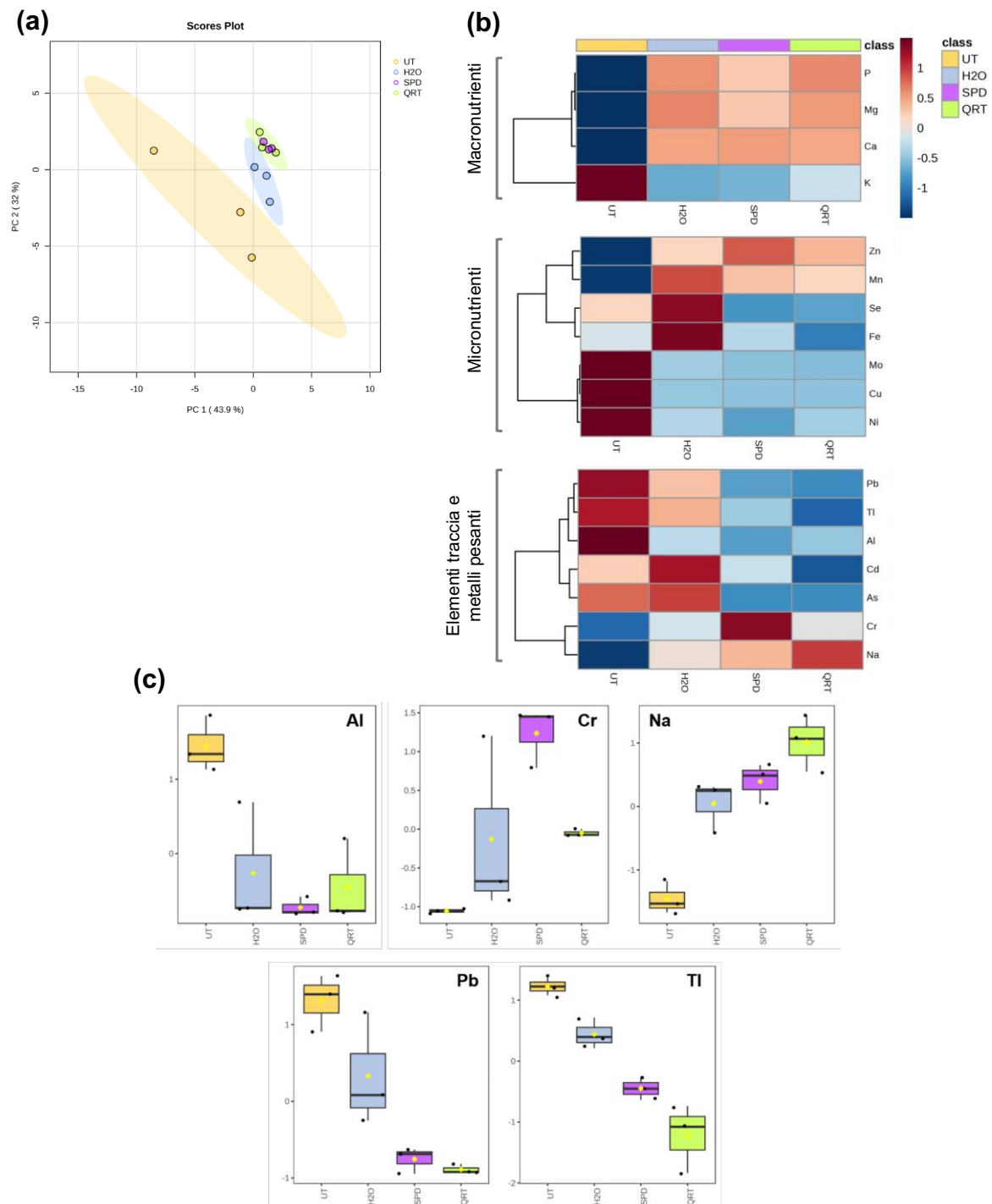


Fig. 7. Panoramica dei risultati ottenuti dall'analisi dello ionoma di semi di *P. nigra* sottoposti a diversi trattamenti di *seed soaking* (H₂O, acqua; SPD, spermidina 0.1 mM; QRT, quercetina 2 mM). **(a)** *Principal Component Analysis* (PCA). **(b)** *Heat map* che rappresenta i valori medi del contenuto di ioni nei semi sottoposti a trattamenti di *seed soaking* (distanza misurata applicando il metodo euclideo). Gli ioni sono stati suddivisi in base alla loro funzione fisiologica: macronutrienti: fosforo (P), magnesio (Mg), calcio (Ca), potassio (K); micronutrienti: zinco (Zn), manganese (Mn), selenio (Se), ferro (Fe), molibdeno (Mo), rame (Cu), nichel (Ni); elementi traccia e metalli pesanti: piombo (Pb), tallio (Tl), alluminio (Al), cadmio (Cd), arsenico (As), cromo (Cr), sodio (Na). **(c)** *Boxplots* relativi alle concentrazioni di ioni significativi: Alluminio (Al), Cromo (Cr), Sodio (Na), Piombo (Pb) e Tallio (Tl) nei quattro gruppi di sperimentali. I punti neri rappresentano i singoli replicati

biologici, mentre il rombo giallo indica il valore medio. Gli ioni significativi sono stati ottenuti attraverso ANOVA (test LSD con $P \leq 0.05$ e $FDR \leq 0.05$).

Tabella 3. Concentrazione di metalli pesanti nei due campioni di suolo raccolti nel sito CNCB e relativo valore medio. Campione 1 - coordinate: 45.8446080; 10.9943830; Campione 2 - coordinate: 45.8445210; 10.9944900. Il limite legale di concentrazione di metalli pesanti è definito secondo l'Allegato 5, Tabella 1 del D.Lgs. 152/06, relativo a “Concentrazione soglia di contaminazione nel suolo e nel sottosuolo riferiti alla specifica destinazione d'uso dei siti da bonificare”.

Ione	Campione 1 (mg/kg)	Campione 2 (mg/kg)	Media (mg/kg)	Limite Legale (mg/kg)
Arsenico (As)	4.50	7.30	5.90	20
Cadmio (Cd)	0.11	0.17	0.14	2
Cromo totale (Cr)	10.10	12.00	11.05	150
Mercurio (Hg)	0.04	0.07	0.06	1
Nichel (Ni)	13.29	11.50	12.35	120
Piombo (Pb)	14.10	9.10	11.60	100
Rame (Cu)	23.80	9.80	16.80	120
Zinco (Zn)	31.60	54.00	42.80	150
Alluminio (Al)	7680.00	9130.00	8405.00	-

4.1.3 Valutazione del profilo di espressione di geni coinvolti nella risposta del seme ai trattamenti di *soaking*

Al fine di investigare i meccanismi fisiologici e molecolari alla base delle variazioni del contenuto ionico evidenziate dall'analisi dello ionoma, è stato valutato il profilo di espressione di alcuni geni coinvolti nel metabolismo delle poliammine, nella risposta antiossidante e nella chelazione di metalli pesanti. Tale studio è stato effettuato mediante analisi *qRT-PCR* su RNA estratto da semi di *P. nigra* esposti ai differenti trattamenti di *seed soaking*: imbibizione in acqua (H_2O), imbibizione con spermidina 0.1 mM (SPD) e imbibizione con quercetina 2 mM (QRT). Il controllo non trattato (UT, *untreated*) è stato analizzato in parallelo.

I geni *PnSPDS1*, *PnSPMS* e *PnPAO* codificano gli enzimi spermidina sintasi 1, spermina sintasi e poliammina ossidasi 1 coinvolti nel metabolismo delle poliammine. I geni *PnSPDS1* e *PnSPMS* sono risultati maggiormente espressi, in modo significativo, in semi trattati con

spermidina 0.1 mM (SPD). L'espressione del gene *PnPAO* non presenta alcuna differenza significativa tra i diversi trattamenti e il controllo (**Fig. 8**).

La risposta antiossidante è stata valutata quantificando l'espressione di geni codificanti le isoforme 1 e 2 dell'enzima superossido dismutasi (*PnSOD1* e *PnSOD2*), gli isoenzimi catalasi 1 e 2 (*PnCAT1* e *PnCAT2*), l'enzima *L*-ascorbato perossidasi (*PnAPX*) e l'enzima glutatione *s*-transferasi *DHAR2-like* (*PnDHAR2*). Questi enzimi rivestono un ruolo fondamentale nella detossificazione dei ROS. Sono stati individuati elevati livelli di espressione di *PnSOD1* e *PnDHAR2* nel controllo (UT, *untreated*) rispetto ai trattamenti. Il gene *PnAPX* segue un *trend* opposto, in quanto sono stati riscontrati livelli di espressione più elevati nei trattamenti di imbibizione in acqua (H₂O), imbibizione con spermidina 0.1 mM (SPD) e imbibizione con quercetina 2 mM (QRT), rispetto al controllo non trattato (UT, *untreated*). Il gene *PnSOD2* è caratterizzato da un accumulo significativo di trascritto nei semi trattati con acqua (H₂O) e quercetina (QRT) rispetto al controllo (UT). I livelli di trascritto *PnSOD2* nei semi trattamenti con spermidina 0.1 mM (SPD) sono significativamente inferiori rispetto ai semi trattati con acqua (H₂O). I livelli di espressione di *PnCAT1* e *PnCAT2* hanno mostrato un incremento significativo nei semi trattati con spermidina 0.1 mM (SPD), rispetto ai semi non trattati (UT) e ai semi trattati con acqua (H₂O) (**Fig. 8**). Non è stato osservato alcun accumulo significativo dei trascritti *PnPCS* e *PnGHS2* nei trattamenti esaminati (**Fig. 8**). Tali geni codificano rispettivamente gli enzimi glutatione γ -glutamylcisteinyltransferasi 1 o fitochelatina sintasi e glutatione sintetasi, coinvolti nella chelazione e nella mobilizzazione di cationi metallici all'interno della cellula.

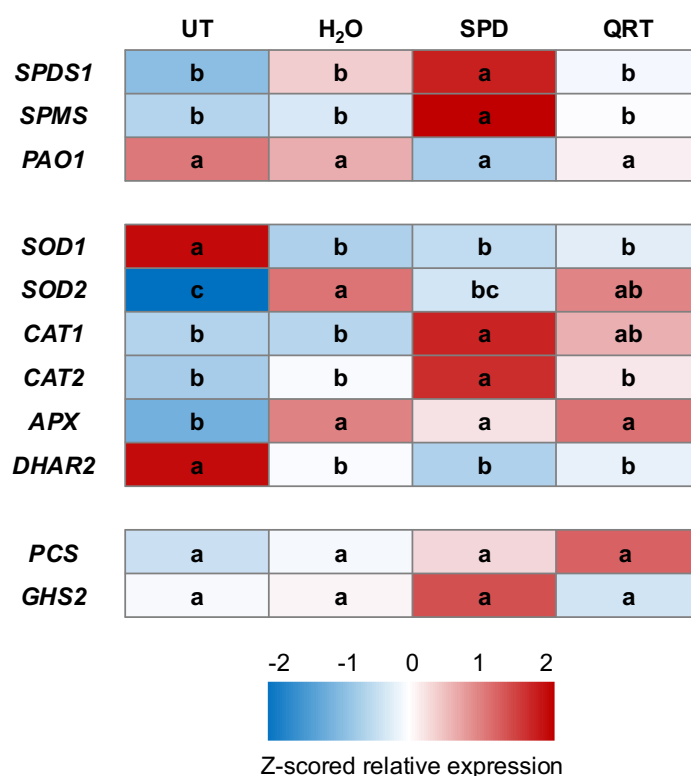


Fig. 8. *Heat map* che illustra i profili di espressione dei geni coinvolti nel metabolismo delle poliammine, nella risposta antiossidante e nella chelazione di ioni metallici, valutata mediante *qRT-PCR*. I dati sono stati normalizzati mediante approccio Z-score. L'assenza di lettere in comune indica campioni significativamente differenti (p -value < 0.05), in base all'analisi one way ANOVA e test di Duncan. UT, non trattato (*untreated*); H₂O, trattamento con acqua; SPD, trattamento con spermidina 0.1 mM; QRT, trattamento con quercetina 2 mM. SPDS1, spermidina sintasi 1. SPMS, spermina sintasi. PAO1, poliammina ossidasi 1. SOD1, superossido dismutasi [Cu-Zn] 1. SOD2, superossido dismutasi [Cu-Zn] 2. CAT1, isoenzima 1 della catalasi. CAT2, catalasi-2. APX, l-ascorbato perossidasi, citosolica. DHAR2, glutazione s-transferasi DHAR2-like. PCS, glutazione γ - glutamilcisteiniltransferasi 1. GHS2, glutazione sintetasi. Pn, *Populus nigra*.

4.2. Caratterizzazione del germoplasma CREA-FL di *Populus nigra* (case study 1)

4.2.1 Profilo fisiologico e biochimico di semi di cloni di pioppo nero

Al fine di valutare la performance di germinazione e i livelli di stress ossidativo in semi di differenti cloni di *P. nigra* appartenenti alla collezione di germoplasma del Centro CREA-FL di Casale Monferrato (AL), sono stati effettuati test di germinazione e si è quantificato l'accumulo di ROS, mediante saggio DCFH-DA (**Fig. 9**). I semi dei cloni N581, N1034, N692 sono stati preventivamente esclusi dalle analisi, in quanto non vitali. L'analisi del parametro di germinabilità (G%, **Fig. 9 a**) ha evidenziato una marcata variabilità tra la vitalità tra semi dei differenti cloni. Il clone N1037 ha mostrato una spiccata germinabilità nei tre replicati studiati, raggiungendo valori pari al 100 %. I risultati ottenuti con il clone

N1037 differiscono significativamente dai profili ottenuti con i cloni N1085, N1012, N185. I cloni N1088 e N760 raggiungono elevati valori di germinazione, rispettivamente $90.00 \pm 5.77\%$ e $83.30 \pm 8.82\%$, paragonabili ai valori prodotti dal clone N1037. I cloni N1085, N1028, N1012 hanno rivelato livelli intermedi di germinazione ($73.30 \pm 3.33\%$, $56.70 \pm 8.82\%$ e $43.30 \pm 6.67\%$). I semi del clone N185 hanno evidenziato valori di germinabilità significativamente inferiori ($10.00 \pm 5.77\%$) rispetto ai valori ottenuti con gli altri cloni esaminati.

I risultati relativi alla quantificazione del contenuto di ROS nei semi dei differenti cloni di *P. nigra*, ottenuti mediante saggio DCFH-DA, sono illustrati in **Fig. 9 b**. Il picco massimo di accumulo di ROS è stato rilevato nel clone N1028 (1.22 ± 0.83 R.F.U.), un valore significativamente superiore rispetto ai valori ottenuti in altri cloni caratterizzati da un ridotto accumulo di ROS, quali N1037 (0.22 ± 0.10 R.F.U.), N1085 (0.17 ± 0.12 R.F.U.), N1012 (0.30 ± 0.02 R.F.U.), N185 (0.12 ± 0.12 R.F.U.). I cloni N1088 e N760 hanno rivelato livelli di ROS intermedi, pari a 1.012 ± 0.51 R.F.U. e 0.56 ± 0.37 R.F.U., rispettivamente.

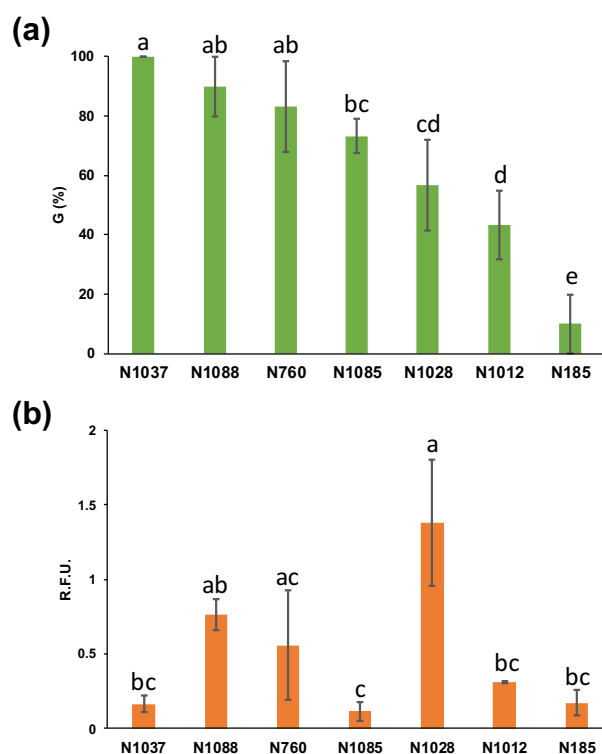


Fig. 9. Caratterizzazione fisiologica e biochimica dei semi di pioppo nero forniti dal Centro CREA-FL. **(a)** Germinabilità (G%) calcolata per i semi dei differenti cloni di *P. nigra*. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata con *one-way* ANOVA e test di Duncan, le medie senza lettere in comune sono significativamente (p -value < 0.05) diverse. **(b)** Valutazione dell'accumulo di ROS espresso in R.F.U. (*Relative Fluorescence Unit*) calcolata per semi dei differenti cloni di *P. nigra*. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata con *one-way* ANOVA e test di Duncan, le medie senza lettere in comune sono significativamente (p -value < 0.05) diverse.

4.2.2 Profili di longevità dei semi di differenti cloni di *P. nigra*

I semi dei differenti cloni forniti dal Centro CREA-FL di Casale Monferrato (AL) sono stati stoccati in buste di plastica sottovuoto per 1 anno a -20 °C. La performance di germinazione è stata valutata a 0, 3, 6 e 12 mesi dall'inizio dello stoccaggio e i risultati di questa analisi sono illustrati in **Fig. 10**.

Il clone N1037 ha mantenuto ottime prestazioni di germinazione, esibendo il 100% di germinabilità in tutti i test eseguiti durante lo stoccaggio. Il clone N1088, che già mostrava elevate prestazioni di germinazione iniziale, ha mantenuto questo profilo, mentre il clone N760 ha subito una riduzione significativa nella germinabilità (G%) dopo 12 mesi. I cloni N1085, N1028, N1012 e N185 esibivano una germinabilità (G%) iniziale intermedia o bassa e in tutti i casi hanno rivelato una riduzione drastica nella vitalità già dopo il terzo mese di stoccaggio. In particolare, i cloni N1085, N1012 e N185 hanno manifestato una percentuale di germinazione (G%) pari a 0% già dopo il terzo mese di conservazione, mentre il clone N1028 al mese 3 e 6 presenta una germinabilità significativamente ridotta (~20%) fino ad una capacità di germinazione totalmente assente al dodicesimo mese (**Fig. 10 a**).

L'analisi PCA è stata impiegata per evidenziare il profilo globale delle dinamiche di germinazione dei semi dei differenti cloni nell'arco di 12 mesi di stoccaggio a -20°C. I risultati dell'analisi PCA sono illustrati in **Fig. 10 b**. La capacità di mantenere elevati livelli di germinabilità nell'arco dei 12 mesi rappresenta la principale fonte di variabilità all'interno del dataset lungo la componente principale numero 1 (Principal Component 1, PC1). La componente PC1 contribuisce al 71,8% della variabilità osservata e alla separazione dei *cluster* relativi ai cloni che esibiscono e mantengono alte prestazioni di germinazione e i cloni caratterizzati da perdita in germinabilità. La componente PC2 contribuisce al 20% della variabilità osservata ed evidenzia, in particolare, la separazione tra il *cluster* relativo al clone N1037, che esibiva e manteneva massima germinabilità e longevità, e i *clusters* relativi ai cloni N1088 e N760 caratterizzati da elevate germinabilità e longevità. Il *cluster* relativo al clone N1028 si discosta dai *clusters* relativi ai cloni con intermedia e bassa germinabilità e longevità, evidenziando l'effetto della riduzione, ma non totale perdita di vitalità nei primi 6 mesi. L'analisi PCA mette in luce la variabilità nelle prestazioni di stoccaggio delle diverse tipologie di cloni di *P. nigra*.

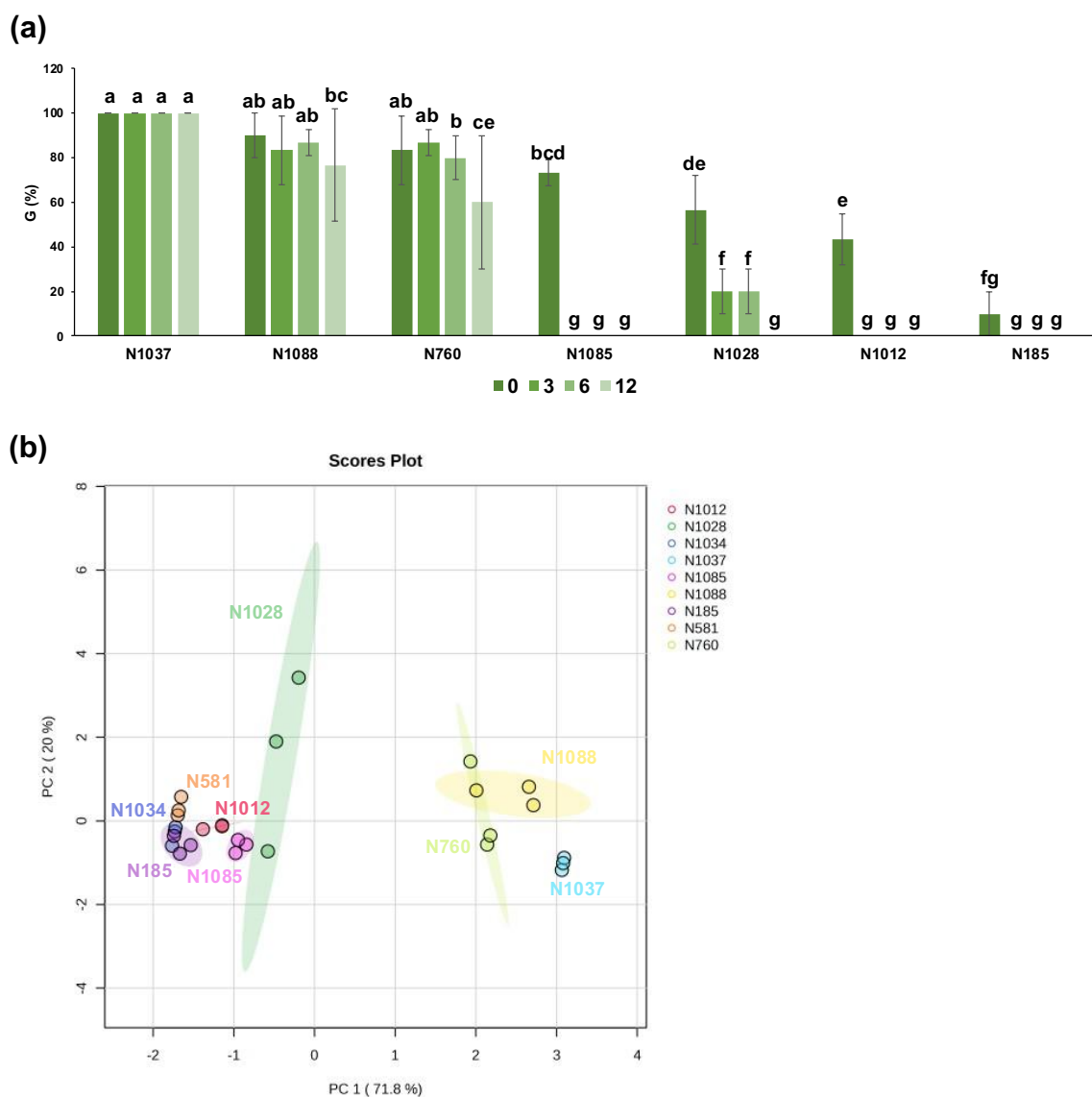


Fig. 10. Dati relativi alla longevità dei semi di pioppo nero forniti dal Centro CREA-FL, monitorata per 12 mesi. **(a)** Germinabilità percentuale (G%) calcolata a 0, 3, 6, 12 mesi per semi di ogni tipologia clonale. Sono stati esclusi i cloni N581, N1034, N692 perché non vitali. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata con *two-way* ANOVA e test di Duncan, le medie senza lettere in comune sono significativamente (p -value < 0.05) diverse. **(b)** *Two-dimensional score plot* della *Principal Component Analysis* (PCA) dei risultati relativi alla longevità di *P. nigra*.

5. DISCUSSIONE

Il destino di molte specie forestali native, tra cui *Populus nigra* L., è ad oggi, minacciato dalla progressiva riduzione della biodiversità e dalla frammentazione degli habitat a causa delle attività antropiche. La conservazione e la valorizzazione di queste specie non solo sono fondamentali per il loro utilizzo in ambito commerciale, come nell'industria del legname, in ambito paesaggistico e in programmi di fitorisanamento di aree degradate, ma risultano cruciali per la resilienza e la regolazione degli ecosistemi naturali. In questo scenario, la propagazione attraverso i semi rappresenta uno strumento essenziale per preservare la variabilità genetica intra-specifica, mitigando i rischi di estinzione. Di conseguenza, studi focalizzati sui fattori genetici, fisici, fisiologici e fitosanitari che contribuiscono a definire la qualità dei semi rappresentano ad oggi una priorità per le specie forestali, specialmente per il miglioramento di tratti quali vigore, tolleranza all'essiccazione, longevità e resistenza ai patogeni. A differenza delle specie di interesse agronomico, lo sviluppo di protocolli per il miglioramento della qualità dei semi di specie forestali risulta essere un processo estremamente complesso e difficoltoso, poiché questa tipologia di seme presenta tratti fenotipici e fisiologici più eterogenei, anche all'interno di individui appartenenti alla stessa popolazione (Pires & Lima Baute, 2023).

Il presente lavoro di tesi si pone come obiettivo la caratterizzazione fisiologica e molecolare di due collezioni di germoplasma di *P. nigra*, attraverso la valutazione dell'efficacia di trattamenti di *seed soaking* nel miglioramento della germinazione e lo studio della variabilità dei fattori che influenzano la qualità semi. Le attività sperimentali rientrano nell'ambito del progetto *National Biodiversity Future Center-NBFC -National-Recovery and Resilience Plan (NRRP) – NextGenerationEU*, “Node 4-Ecosystems functions, services and solutions”, Activity 5 (*Conceptual framework and methodological tools of Nature Based Solution and Restoration Ecology*). Task 4.5.2 (*Monitoraggio, caratterizzazione funzionale e tracciabilità del materiale di propagazione di base con alta resilienza ai cambiamenti climatici e finalizzato al rimboschimento di siti forestali soggetti ad eventi estremi*).

Il presente lavoro di tesi si pone come obiettivo la caratterizzazione fisiologica e molecolare di due collezioni di germoplasma di *P. nigra*, attraverso la valutazione dell'efficacia di trattamenti di *seed soaking* nel miglioramento della germinazione e lo studio della variabilità dei fattori che influenzano la qualità semi. Le attività sperimentali rientrano nell'ambito del progetto. Lo studio di Gaonkar et al. (2025) supporta l'efficacia di trattamenti di *seed soaking* con spermidina 0.1 mM su semi di *Populus alba*, clone “Villafranca”, conservati a lungo

termine. Inoltre, Fuchs et al. (2023) hanno dimostrato che ~~su~~semi recalcitranti di *Acer saccharinum*, soggetti livelli medio-alti di disidratazione, e sottoposti a imbibizione con soluzioni spermidina presentano un incremento nella percentuale di germinazione. Taie et al. (2019) hanno evidenziato l'effetto positivo dell'applicazione esogena di poliammine sulla crescita di piante di *Triticum aestivum* L. esposte a stress da cadmio e piombo. Il ruolo antiossidante e anti-aging delle poliammine, e in particolare gli effetti benefici associati alla spermidina, sono stati ampiamente dimostrati in ambito animale e vegetale (Blagojević et al., 2026). Nel presente lavoro di tesi, contrariamente alla spermidina, il trattamento di imbibizione con quercetina non ha indotto un miglioramento significativo della germinazione. La quercetina è un flavonoide che svolge un ruolo rilevante nella mitigazione dello stress biotico e abiotico, in particolare nello scavenging dei ROS e nella modulazione dell'attività di enzimi antiossidanti, quali superossido dismutasi, catalasi, glutatione perossidasi e ascorbato perossidasi (Singh et al., 2021). L'attività antiossidante della quercetina e la capacità di questo composto di interagire con altri componenti cellulari è stata da Iacopini et al. (2008) in uno studio sulla capacità antiossidante di composti fenolici presenti in estratti di seme e buccia di *Vitis vinifera*. Il ruolo positivo della quercetina nella mitigazione dell'*aging* in semi di *Medicago truncatula* è stato esaminato da Gaonkar et al. (2024).

I risultati ottenuti dai test di germinazione sono stati successivamente integrati da analisi di tipo fisiologico e molecolare. I profili di ionomica dei semi CNCB di *P. nigra* hanno consentito di evidenziare come i trattamenti di *seed soaking* alterino il contenuto di ioni e la loro ridistribuzione all'interno dei semi. Sulla base dell'analisi PCA, è stato possibile dimostrare la presenza di un impatto significativo dei trattamenti sul contenuto di ioni. Si osserva una netta separazione tra i cluster relativi ai semi trattati (H₂O, SPD, QRT) rispetto al cluster dei semi non trattati (UT). L'imbibizione in acqua costituisce uno stimolo fisiologico in grado di avviare la ridistribuzione e mobilizzazione degli elementi chimici, alla base della riattivazione del metabolismo basale del seme.

Tuttavia l'iniziale imbibizione in acqua dei semi può causare la perdita di micro e macronutrienti come K, Mg, Cl, Ca e Mn mediante la diffusione passiva attraverso la membrana plasmatica. La quantità di ioni persi attraverso la membrana dipende dalla struttura del tegumento e della testa del seme (Lott et al., 1991). I semi di *P. nigra* sono caratterizzati da una testa che circonda il seme molto sottile, che non ritarda la perdita o l'ingresso di acqua (Lefebvre et al., 2022), e questa specificità morfologica potrebbe aver favorito il fenomeno del *leakage* durante l'idratazione. Nei semi poco vigorosi o danneggiati

dalle fasi di maturazione ed essiccazione, il rapido ingresso di acqua provoca uno shock strutturale alle membrane non ancora riorganizzate, determinando la fuoriuscita di elettroliti e, nei casi più gravi, la morte cellulare (Eggert & Von Wirén, 2013; Özden, 2022).

Nonostante l'attuale conoscenza del ruolo e dei processi di distribuzione degli elementi minerali durante la germinazione sia ancora limitata, è noto che molti elementi, ad es. Mg, S, Zn, Fe, Cu, Ni, Mo, e Mn agiscono come cofattori di proteine correlate allo stress, mentre Ca e B stabilizzano le pareti consentendo l'espansione cellulare. Altri elementi sono componenti di membrane biologiche e molecole energetiche (P) o regolano il turgore e l'osmoregolazione (K) (Eggert & Von Wirén, 2013). Nel nostro studio, le differenze più marcate rispetto al controllo non trattato hanno riguardato i macronutrienti P, Ca, Mg e K, i quali hanno seguito due *trend* opposti. Mentre P, Ca e Mg mostrano concentrazioni superiori nei semi sottoposti a imbibizione, il potassio (K) poiché si accumulano maggiormente nel controllo non trattato. L'aumento simultaneo di Ca e P riflette la forte affinità chimica tra il calcio e i gruppi fosfato (Mulet et al., 2020). Al contrario, il calo del potassio nei semi trattati è probabilmente legato al fatto che questo elemento può essere rilasciato rapidamente per diffusione passiva attraverso il tegumento sottile (Eggert & Von Wirén, 2013; Hasanuzzaman et al., 2018). Sebbene l'efflusso di elettroliti sia comunemente associato a una risposta allo stress, nel caso specifico del potassio questo rilascio immediato potrebbe agire da "interruttore" metabolico benefico per la cellula, stimolando i processi catabolici e il rilascio di energia necessari ad avviare la germinazione (Demidchik et al., 2014). Il calo dei livelli di K nei semi trattati potrebbe rappresentare un segnale positivo per l'attivazione metabolismo pre-germinativo del seme.

Al contrario, lo studio di Eggert & Von Wirén (2013) condotto in semi di *Brassica napus* L., dimostra che la perdita di K è correlata a livelli di germinabilità inferiori, mentre una perdita di Ca e Mg è associata alla diminuzione della germinabilità. Variazioni nei livelli di Fe, Mn, Cu, Mo e Ni non hanno influenzato negativamente il processo di germinazione.

L'analisi ANOVA ha evidenziato 5 elementi le cui concentrazioni sono statisticamente diverse tra i trattamenti testati: alluminio (Al), cromo (Cr), sodio (Na), piombo (Pb) e tallio (Tl). Si tratta di metalli pesanti dannosi per gli organismi vegetali, la loro tossicità è spesso dovuta a fenomeni di competizione o analogia chimica con i nutrienti essenziali. Ad esempio, la tossicità del tallio (Tl⁺) si esplica proprio ingannando i trasportatori del potassio (K⁺) a causa di un raggio ionico e di una carica simili (Rader et al., 2019), così come l'alluminio (Al⁺) esercita un ruolo antagonista nei confronti del magnesio (Mg⁺) durante il trasporto

(Zhang et al., 2020). Mentre, altri metalli come il cadmio competono con cationi divalenti quali Ca, Mg, Mn, Fe (Luo et al., 2023).

Dalle analisi del suolo dei campioni raccolti nel comune di Mori (Trento) si evidenzia che il terreno non presenta alcuna contaminazione da metalli pesanti, poiché la concentrazione di tali elementi risulta essere al di sotto delle soglie indicate dal D. Lgs. 152/06. Di conseguenza, la presenza di questi metalli nel controllo e la loro successiva diminuzione nei semi trattati non riflette un fenomeno di inquinamento del suolo di provenienza, ma suggerisce che il processo di imbibizione favorisca la mobilitazione e il parziale dilavamento di questi elementi. Le analisi del suolo permettono di ottenere un quadro completo per la corretta interpretazione dell'interazione tra organismi e ambiente, sottolineando l'importanza dell'utilizzo di approcci multipli negli studi di tipo ambientale.

In questo studio, Al, Pb e Tl presentano concentrazioni progressivamente inferiori nei semi sottoposti a imbibizione. In letteratura è ampiamente documentato che l'accumulo di metalli pesanti è associato all'accumulo di ROS e al conseguente incremento dello stress ossidativo (Kranner & Colville, 2011). L'applicazione esogena di poliammine e flavonoidi è in grado di mitigare la tossicità indotta dai metalli grazie alla capacità di *scavenging* dei ROS (Kebert et al., 2017; Arikan et al., 2023). Le poliammine stesse, data la loro natura policationica, possono interagire con i cationi metallici, come Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{3+} , competendo per i siti di legame carichi negativamente presenti sulle membrane cellulari, modulandone così la permeabilità durante l'idratazione. Inoltre, il metabolismo delle poliammine è strettamente interconnesso alla sintesi del glutathione (GSH), una molecola chiave non solo nel contrasto diretto dello stress ossidativo, ma anche come precursore fondamentale delle fitochelatine (γ -clutammil-cisteinil-isopeptidi). Queste ultime sono molecole in grado di chelare efficacemente i metalli pesanti grazie all'abbondanza di gruppi tiolici (-SH) nella loro struttura, e la loro produzione *in vivo* è fortemente indotta dalla presenza di diversi elementi metallici (Memon & Schröder, 2009; Hasanuzzaman et al., 2019). Nel contesto del nostro studio, l'apporto esogeno di spermidina e quercetina potrebbe quindi aver potenziato preventivamente questo network di protezione antiossidante e strutturale, stabilizzando le membrane e favorendo l'esclusione o il dilavamento di Al, Pb e Tl durante la fase critica del *soaking*.

Le concentrazioni di sodio (Na^{+}) presentano un andamento opposto rispetto ai metalli pesanti appena descritti, mostrando un incremento progressivo nei campioni idratati, con un picco particolarmente evidente nel trattamento con quercetina. Il sodio è un elemento non

essenziale per la maggior parte delle piante e il suo eccessivo accumulo nel citoplasma è notoriamente fonte di stress salino. Tuttavia, concentrazioni basse o moderate possono risultare benefiche, stimolando la crescita cellulare e fungendo da vicariante in condizioni di limitata disponibilità di potassio. Per evitare effetti citotossici, risulta fondamentale la capacità della cellula di sequestrare e compartimentalizzare il sodio all'interno del vacuolo. I trattamenti di imbibizione esogena, in particolare con il flavonoide quercetina, potrebbero supportare il mantenimento di questo meccanismo di segregazione energetica o modulare i trasportatori di membrana, prevenendo al contempo la perdita incontrollata di soluti attraverso il *leakage* cellulare, tipicamente causato dallo shock idrico iniziale (Wu, 2018).

Nel caso del cromo (Cr), i livelli risultano elevati nei semi soggetti al trattamento con spermidina. Questo comportamento anomalo suggerisce una specifica interazione chimica tra la poliammina esogena e lo ione cromo. La spermidina potrebbe promuovere la chelazione e la ritenzione del cromo all'interno di complessi stabili, coordinati e non tossici, alterandone il coefficiente di ripartizione e impedendone il dilavamento rispetto agli altri trattamenti (Abdullah et al., 2024).

In conclusione, lo studio approfondito delle dinamiche di mobilitazione, ritenzione e rilascio ionico nei semi sottoposti a trattamenti di imbibizione costituisce un ambito ancora pionieristico e poco esplorato nella biologia dei semi forestali. L'analisi dello ionoma apre dunque la strada alla scoperta di complessi meccanismi di omeostasi minerale che interagiscono attivamente con il metabolismo pre-germinativo del seme, condizionandone il vigore e la capacità di stabilimento della plantula.

L'analisi *qRT-PCR* dei profili di espressione dei geni coinvolti nel metabolismo delle poliammine ha mostrato un accumulo dei trascritti di geni *PnSPDS1*, *PnSPMS* in risposta al trattamento con spermidina 0.1 mM. *PnSPDS1* codifica per l'enzima che converte la putrescina in spermidina, la quale viene successivamente convertita in spermina dall'azione dell'enzima spermina sintasi (*PnSPMS*). L'accumulo dei trascritti *PnSPDS1* e *PnSPMS* suggerisce che l'apporto esogeno di spermidina sia in grado di stimolare positivamente l'intera via metabolica. Questo risultato è in accordo con gli studi di Fu et al. (2020) e Gaonkar et al. (2024) che dimostrano come protocolli ottimizzati di *priming* o *soaking* che utilizzano poliammine esogene possano indurre la trascrizione dei geni per la biosintesi di questi metaboliti, migliorando la tolleranza agli stress. Tuttavia, Huang et al. (2017) hanno dimostrato che, in semi di *Zea mays* L. trattati con spermidina, non si verificano incrementi nei livelli di espressione dei geni *ZmSPDS* e *ZmSPMS*. Infine, il trascritto del gene *PnPAO*

coinvolto nel catabolismo delle poliammine, non ha evidenziato variazioni significative in risposta ai trattamenti. La complessa interazione tra catabolismo e via biosintetica delle poliammine garantisce risposte immediate e funzionali al variare delle condizioni ambientali ed endogene (Hasanuzzaman et al., 2019).

I profili di espressione dei geni codificanti gli enzimi coinvolti nel sistema di detossificazione dei ROS non sono uniformi tra i vari campioni e presentano *trend* diversi. Il campione non trattato ha mostrato un accumulo dei trascritti *PnSOD1* e *PnDHAR2*, suggerendo un attivo coinvolgimento nella risposta antiossidante. Al contrario, la riduzione dei livelli dei trascritti *PnSOD1* e *PnDHAR2* nei semi idratati suggerisce che i trattamenti di *seed soaking* mitigano lo stato di stress primario, controllando l'accumulo di ROS. Si è osservato un accumulo del trascritto *PnSOD2* in risposta a imbibizione sia con acqua che con quercetina. Questo risultato sottolinea la variabilità nell'espressione dei geni che codificano per le differenti isoforme degli enzimi antiossidanti (Molina-Rueda et al., 2013).

I trascritti dei geni *PnCAT1* e *PnCAT2*, che codificano per due differenti isoforme dell'enzima catalasi, presentano un'accumulo in risposta a spermidina. Questi risultati sono in accordo con lo studio di Cao et al. (2023) condotto su semi di *Brassica oleracea* var. *Acephala* L. trattati con spermidina 0.5 mM supportano. Infine, l'espressione del gene *PnAPX* (ascorbato perossidasi) ha rivelato un incremento in tutti i campioni idratati rispetto al controllo UT, confermando come l'induzione della via delle perossidasi sia un evento ubiquitario e strettamente legato al riavvio del metabolismo pre-germinativo del seme.

I trascritti *PnPCS* (fitochelatina sintasi) e *PnGHS2* (glutazione sintetasi), coinvolti nei processi di mobilitazione e chelazione dei metalli, non hanno mostrato variazioni significative in risposta ai trattamenti testati. Di conseguenza, la progressiva riduzione delle concentrazioni di alluminio, piombo e tallio evidenziata dall'analisi del contenuto ionico nei semi di *P. nigra* non è imputabile all'attivazione di complessi meccanismi attivi di chelazione o mediati da fitochelatine. Al contrario, trova conferma l'ipotesi di un fenomeno chimico-fisico di *leakage* indotto dal flusso idrico dell'imbibizione, combinato con interazioni competitive aspecifiche sulla membrana cellulare, stabilizzata dall'azione protettiva e antiossidante dei trattamenti con spermidina e quercetina.

La caratterizzazione della collezione CREA-FL di semi di *P. nigra* ha permesso di valutare la variabilità interclonale e di identificare importanti indicatori fisiologici legati alla qualità del germoplasma. I risultati dei test di germinazione iniziali hanno evidenziato una marcata eterogeneità tra i differenti cloni. Questo comportamento conferma come nelle specie

forestali, a differenza delle colture agrarie, i semi mantengano un'intrinseca e maggiore variabilità nei tratti morfologici e fisiologici, riscontrabile anche all'interno della stessa popolazione o tra individui della stessa specie (Pires & Lima Baute, 2023). Questa eterogeneità è rappresentata dal confronto nelle performance di germinazione tra il clone N1037, il quale ha mostrato germinabilità pari al 100%, e il clone N185, il quale ha registrato un tasso di germinazione drasticamente ridotto, fermandosi a circa il 10%.

I dati forniti dal saggio fluorimetrico DCFH-DA hanno consentito di stimare il contenuto di ROS intracellulari, un parametro strettamente correlato all'entità dello stress ossidativo. È noto che un eccessivo accumulo di ROS comporti severi danni a livello cellulare attraverso la perossidazione dei lipidi di membrana, la degradazione proteica e, nei casi più gravi, la morte cellulare, dimostrandosi come uno dei principali fattori limitanti per la germinazione e la longevità dei semi (Li et al., 2014). Tuttavia, nonostante i loro potenziali effetti deleteri, i ROS svolgono un ruolo chiave nel metabolismo pre-germinativo agendo come segnale positivo per la germinazione. Si definisce infatti “finestra ossidativa” quel ristretto intervallo di concentrazione di ROS entro il quale queste specie chimiche promuovono attivamente i processi metabolici legati al risveglio embrionale. Di conseguenza, la quantificazione dello stress ossidativo basale permette di identificare le tipologie clonali qualitativamente superiori, poiché i semi dotati di maggiore vigore dimostrano una migliore capacità nel bilancio dei ROS, mantenendone i livelli entro i confini di questa finestra fisiologica. Il saggio DCFH-DA permette di valutare i livelli di ROS intracellulari, ma presenta dei limiti metodologici nell'individuare tutte le specie chimiche presenti, poiché la sonda DCFH-DA non è ossidata direttamente da H_2O_2 . Il protocollo risente di alcune interferenze ambientali, come luce, pH e livelli di O_2 (Griffo et al., 2023).

Questa premessa tecnica risulta cruciale per interpretare i risultati ottenuti in questo lavoro. Nel presente dataset, il clone N1037 è caratterizzato da livelli di ROS significativamente bassi, in accordo con il 100% di tasso di germinazione. Al contrario, ridotti livelli di ROS sono stati riscontrati anche nel clone N185 caratterizzato da livelli bassi di germinazione. Il clone N1028 ha evidenziato un elevato accumulo di ROS associato a livelli intermedi di germinabilità. La mancanza di un pattern univoco e lineare che correli l'accumulo di ROS e la performance di germinazione potrebbe essere attribuito a differenze nella risposta antiossidante nei semi dei differenti cloni di pioppo nero.

Lo studio dei profili di longevità ha infine permesso di identificare i cloni di *P. nigra* dotati di migliori prestazioni nella conservazione a lungo termine. Coerentemente con i test iniziali,

il campione N1037 ha mantenuto un'elevata capacità germinativa durante il primo anno di stoccaggio a -20°C, un comportamento analogo è stato mostrato anche dai cloni N1088 e N760. Questi dati confermano l'adeguatezza di tali parametri di refrigerazione per la conservazione a lungo termine del pioppo nero, in accordo con quanto precedentemente riportato (Suszka et al., 2014; Pawłowski et al., 2019; Michalak et al., 2022). Contrariamente, i cloni N1085, N1028, N1012 e N185, hanno mostrato una rapida perdita di longevità. Sebbene questo studio non abbia risolto in modo definitivo il dibattito tuttora aperto in letteratura circa la classificazione dei semi di pioppo nero (Kalemba et al., 2015; Michalak et al., 2015), i risultati hanno messo in luce la rilevanza della variabilità interclonale. Risulta quindi chiara la necessità dello studio della longevità in semi di *Populus* spp. non solo a livello specie-specifico ma anche a livello della specifica linea clonale o varietà. Questa consapevolezza risulta fondamentale per lo sviluppo di protocolli di stoccaggio su misura, volti a ottimizzare le strategie di conservazione *ex situ* all'interno delle banche del germoplasma e a garantire la salvaguardia di questa importante risorsa forestale.

6. CONCLUSIONI

In conclusione, il presente lavoro di tesi ha permesso di approfondire le dinamiche fisiologiche e molecolari che regolano la vitalità dei semi di pioppo nero (*Populus nigra* L.). Data la rilevanza ecologica e commerciale di questa risorsa forestale, un'estensiva caratterizzazione dei semi risulta necessaria, per questa e altre specie con un destino simile, al fine di tracciare nuove prospettive per l'ottimizzazione delle strategie di conservazione *ex situ* e di recupero ecologico.

Le attività sperimentali hanno evidenziato un netto miglioramento della germinazione nei semi CNCB di *P. nigra* soggetti a *seed soaking* con spermidina 0.1 mM. L'analisi dell'espressione genica ha fatto chiarezza sui meccanismi alla base di tale miglioramento. L'applicazione esogena di spermidina aumenta l'espressione di geni associati alla biosintesi delle poliammine, sottolineando il ruolo di questo composto nell'induzione dell'intera via metabolica endogena. Il ruolo antiossidante delle poliammine è stato inoltre confermato dall'incremento dell'espressione dei due isoenzimi della catalasi, coinvolti nella rimozione dei ROS.

I trattamenti di imbibizione non solo aiutano il seme a gestire lo stress ossidativo regolando gli enzimi associati alla risposta antiossidante, ma influenzano anche l'omeostasi ionica all'interno delle cellule. Sebbene i meccanismi alla base della diffusione, del trasporto e della sequestrazione degli ioni, in particolare dei metalli, non siano ancora del tutto chiari, i nostri studi hanno messo in relazione la mobilitazione ionica (avvenuta come conseguenza dell'imbibizione e del parziale dilavamento) con l'attivazione del metabolismo pre-germinativo. Questi risultati evidenziano l'importanza delle analisi di ionomica nella biologia del seme e nel monitoraggio della qualità del germoplasma, indicando la necessità di ulteriori avanzamenti per chiarire i complessi meccanismi di omeostasi ionica.

Le attività condotte sui semi CREA-FL di *P. nigra* hanno invece permesso di indagare i tratti fisiologici alla base della vitalità e della longevità. In particolare, è emersa una marcata differenza tra le diverse linee clonali, evidenziando come le caratteristiche genotipiche possano influenzare i tratti fisiologici e le performance di conservazione a lungo termine a –20°C. Questo tipo di ricerche è di fondamentale importanza per lo sviluppo di protocolli mirati e specifici per la conservazione del germoplasma forestale.

In definitiva, la combinazione di analisi di diversa natura, molecolare, fisiologica, chimico-ambientale e omica, si è dimostrata la strategia più efficace per caratterizzare correttamente il germoplasma. Questo approccio integrato può portare a significativi avanzamenti nelle

tecnologie ad oggi disponibili nell'ambito della biologia vegetale, offrendo strumenti concreti per conservare correttamente il prezioso patrimonio genetico delle specie forestali e la loro biodiversità.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abdullah, Wani, K. I., Naeem, M., Jha, P. K., Jha, U. C., Aftab, T., & Prasad, P. V. V. (2024). Systems biology of chromium-plant interaction: Insights from omics approaches. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1305179. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1305179>
- Arikan, B., Yildiztugay, E., & Ozfidan-Konakci, C. (2023). Protective role of quercetin and kaempferol against oxidative damage and photosynthesis inhibition in wheat chloroplasts under arsenic stress. *Physiologia Plantarum*, 175(4), e13964. <https://doi.org/10.1111/ppl.13964>
- Assaad, H. I., Hou, Y., Zhou, L., Carroll, R. J., & Wu, G. (2015). Rapid publication-ready MS-Word tables for two-way ANOVA. *SpringerPlus*, 4(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-0795-z>
- Auroux, L., Liew, L. C., Whelan, J., & Lewsey, M. G. (2026). Advances in seed omics. *Journal of Experimental Botany*, 77(7), 2045–2058. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraf294>
- Bajc, M., Aravanopoulos, F., Westergren, M., Fussi, B., Kavaliauskas, D., Alizoti, P., Kiourtsis, F., & Kraigher, H. (A c. Di). (2020). *Manual for forest genetic monitoring*. Slovenian Forestry Institute, Silva Slovenica Publishing Centre. <https://doi.org/10.20315/SFS.167>
- Balestrazzi, A., Macovei, A., Testoni, C., Raimondi, E., Donà, M., & Carbonera, D. (2009). Nitric Oxide Biosynthesis in white poplar (*Populus alba* L.) suspension cultures challenged with heavy metals.
- Bisoffi, S., & Frison, G. (1993). Progressi nel Miglioramento Genetico e nella Tecniche di Coltivazione del Pioppo in Italia *Agricoltura Ricerca*. 147/148.
- Blagojević, B. D., Brunel-Muguet, S., Šućur, R., Mladenov, V., Balaž, I., Vollmann, J., Fotopoulos, V., & Mäder, K. (2026). The role of spermidine in plants and humans: A pathway from climate change adaptation to health benefits. *Npj Science of Food*, 10(1), 68. <https://doi.org/10.1038/s41538-025-00695-2>
- Brown, V. S., Erickson, T. E., Merritt, D. J., Madsen, M. D., Hobbs, R. J., & Ritchie, A. L. (2021). A global review of seed enhancement technology use to inform improved

- applications in restoration. *Science of The Total Environment*, 798, 149096. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149096>
- Cao, D., Huang, Y., Mei, G., Zhang, S., Wu, H., & Zhao, T. (2023). Spermidine enhances chilling tolerance of kale seeds by modulating ROS and phytohormone metabolism. *PLOS ONE*, 18(8), e0289563. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0289563>
- Corbineau, F., Taskiran-Özbingöl, N., & El-Maarouf-Bouteau, H. (2023). Improvement of Seed Quality by Priming: Concept and Biological Basis. *Seeds*, 2(1), 101–115. <https://doi.org/10.3390/seeds2010008>
- Corenblit, D., Steiger, J., Charrier, G., Darrozes, J., Garófano-Gómez, V., Garreau, A., González, E., Gurnell, A. M., Hortobágyi, B., Julien, F., Lambs, L., Larrue, S., Otto, T., Roussel, E., Vautier, F., & Voldoire, O. (2016). *Populus nigra* L. establishment and fluvial landform construction: Biogeomorphic dynamics within a channelized river. *Earth Surface Processes and Landforms*, 41(9), 1276–1292. <https://doi.org/10.1002/esp.3954>
- Dalziel, E. L., Lewandowski, W., Commander, L. E., Elliott, C. P., Erickson, T. E., Tudor, E. P., Turner, S. R., & Merritt, D. J. (2022). Seed traits inform the germination niche for biodiverse ecological restoration. *Seed Science and Technology*, 50(2), 103–124. <https://doi.org/10.15258/sst.2022.50.1.s.06>
- de Rigo, D., Enescu, C. M., Houston Durrant, T., Caudullo, G. (2016). *Populus nigra* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: SanMiguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. (Eds.), European Atlas of Forest Tree Species. Publ. Off. EU, Luxembourg, pp. e0182a4+. https://ies-ows.jrc.ec.europa.eu/efdac/download/Atlas/pdf/Populus_nigra.pdf
- Demidchik, V., Straltsova, D., Medvedev, S. S., Pozhvanov, G. A., Sokolik, A., & Yurin, V. (2014). Stress-induced electrolyte leakage: The role of K⁺-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1259–1270. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru004>
- Devika, O. S., Singh, S., Sarkar, D., Barnwal, P., Suman, J., & Rakshit, A. (2021). Seed priming: a potential supplement in integrated resource management under fragile intensive ecosystems. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 654001. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.654001>

- Di Girolamo, G., & Barbanti, L. (2012). Treatment conditions and biochemical processes influencing seed priming effectiveness. *Italian Journal of Agronomy*, 7(2), e25. <https://doi.org/10.4081/ija.2012.e25>
- Di Lonardo, S., Capuana, M., Arnetoli, M., Gabbrielli, R., & Gonnelli, C. (2011). Exploring the metal phytoremediation potential of three *Populus alba* L. clones using an in vitro screening. *Environmental Science and Pollution Research*, 18(1), 82–90. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0354-7>
- Eggert, K., & Von Wirén, N. (2013). Dynamics and partitioning of the ionome in seeds and germinating seedlings of winter oilseed rape. *Metallomics*, 5(9), 1316. <https://doi.org/10.1039/c3mt00109a>
- Falconi M. et al. (2025), Phytoremediation Monograph. IMPEL, COMMON FORUM, EIONET, NICOLE report no 2022/11 PHYTO, 199 pages. Brussels, ISBN 978-2-931225-36-3
- Fu, Y., Zhang, Z., Liu, J., Chen, M., Pan, R., Hu, W., Guan, Y., & Hu, J. (2020). Seed priming with spermidine and trehalose enhances chilling tolerance of rice via different mechanisms. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39(2), 669–679. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-10009-y>
- Fuchs, H., Plitta-Michalak, B. P., Małecka, A., Ciszewska, L., Sikorski, Ł., Staszak, A. M., Michalak, M., & Ratajczak, E. (2023). The chances in the redox priming of nondormant recalcitrant seeds by spermidine. *Tree Physiology*, 43(7), 1142–1158. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpad036>
- Gaonkar, S. S., Ciceri, L., Romelli, M., Pagano, A., Giovannelli, A., Chiarabaglio, P. M., Balestrazzi, A., & Macovei, A. (2025). Spermidine treatments improve germination of long-term stored seeds: a case study of *Populus alba* Clone ‘Villafranca’. *Seeds*, 4(2), 25. <https://doi.org/10.3390/seeds4020025>
- Gaonkar, S. S., Sincinelli, F., Balestrazzi, A., & Pagano, A. (2024). Quercetin and rutin as tools to enhance antioxidant profiles and post-priming seed storability in *Medicago truncatula*. *Agriculture*, 14(5), 738. <https://doi.org/10.3390/agriculture14050738>
- Gohari, G., Spanos, A., Ioannou, A., Efstathiou, I., Panahirad, S., Kolbert, Z., & Fotopoulos, V. (2026). Seed priming approaches for climate-resilient agriculture. *Journal of Experimental Botany*, 77(7), 2013–2026. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraf440>

- Gosling, P. (2007). *Raising trees and shrubs from seed*. Forestry Commission Practice Guide. Forestry Commission, Edinburgh. i–iv + 1–28 pp. <https://cdn.forestresearch.gov.uk/2007/08/fcpg018.pdf>
- Griffo, A., Bosco, N., Pagano, A., Balestrazzi, A., & Macovei, A. (2023). Noninvasive methods to detect reactive oxygen species as a proxy of seed quality. *Antioxidants*, 12(3), 626. <https://doi.org/10.3390/antiox12030626>
- Hasanuzzaman, M., Alhaithloul, H. A. S., Parvin, K., Bhuyan, M. H. M. B., Tanveer, M., Mohsin, S. M., Nahar, K., Soliman, M. H., Mahmud, J. A., & Fujita, M. (2019). Polyamine action under metal/metalloid stress: regulation of biosynthesis, metabolism, and molecular interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3215. <https://doi.org/10.3390/ijms20133215>
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M., Nahar, K., Hossain, Md., Mahmud, J., Hossen, Md., Masud, A., Moumita, & Fujita, M. (2018). Potassium: A vital regulator of plant responses and tolerance to abiotic stresses. *Agronomy*, 8(3), 31. <https://doi.org/10.3390/agronomy8030031>
- Huang, Y., Lin, C., He, F., Li, Z., Guan, Y., Hu, Q., & Hu, J. (2017). Exogenous spermidine improves seed germination of sweet corn via involvement in phytohormone interactions, H₂O₂ and relevant gene expression. *BMC Plant Biology*, 17(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0951-9>
- Iacopini, P., Baldi, M., Storch, P., & Sebastiani, L. (2008). Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(8), 589–598. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.03.011>
- Iralu, V., Barbhuyan, H. S. A., & Upadhaya, K. (2019). Ecology of seed germination in threatened trees: A review. *Energy, Ecology and Environment*, 4(4), 189–210. <https://doi.org/10.1007/s40974-019-00121-w>
- Jalonen, R., Valette, M., Boshier, D., Duminil, J., & Thomas, E. (2018). Forest and landscape restoration severely constrained by a lack of attention to the quantity and quality of tree seed: Insights from a global survey. *Conservation Letters*, 11(4), e12424. <https://doi.org/10.1111/conl.12424>

- Jatana, B. S., Grover, S., Ram, H., & Baath, G. S. (2024). Seed Priming: molecular and physiological mechanisms underlying biotic and abiotic stress tolerance. *Agronomy*, 14(12), 2901. <https://doi.org/10.3390/agronomy14122901>
- Kalemba, E. M., Suszka, J., & Ratajczak, E. (2015). The role of oxidative stress in determining the level of viability of black poplar (*Populus nigra*) seeds stored at different temperatures. *Functional Plant Biology*, 42(7), 630–642. <https://doi.org/10.1071/FP14336>
- Kebert, M., Rapparini, F., Neri, L., Bertazza, G., Orlović, S., & Biondi, S. (2017). Copper-induced responses in poplar clones are associated with genotype- and organ-specific changes in peroxidase activity and proline, polyamine, ABA, and IAA Levels. *Journal of Plant Growth Regulation*, 36(1), 131–147. <https://doi.org/10.1007/s00344-016-9626-x>
- Kim, D. H. (2018). Extending *Populus* seed longevity by controlling seed moisture content and temperature. *PLOS ONE*, 13(8), e0203080. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203080>
- Kranner, I., & Colville, L. (2011). Metals and seeds: Biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. *Environmental and Experimental Botany*, 72(1), 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.05.005>
- Kulczyk-Skrzeszewska, M., & Kieliszewska-Rokicka, B. (2022). Influence of drought and salt stress on the growth of young *Populus nigra* ‘Italica’ plants and associated mycorrhizal fungi and non-mycorrhizal fungal endophytes. *New Forests*, 53(4), 679–694. <https://doi.org/10.1007/s11056-021-09879-6>
- Lefebvre, M., Villar, M., Boizot, N., Delile, A., Dimouro, B., Lomenech, A.-M., & Teyssier, C. (2022). Variability in seeds’ physicochemical characteristics, germination and seedling growth within and between two French *Populus nigra* L. populations. *Peer Community Journal*, 2, e10. <https://doi.org/10.24072/pcjournal.86>
- Lefèvre, F., N. Barsoum, B. Heinze, D. Kajba, P. Rotach, S.M.G. de Vries and J. Turok. 2001. EUFORGEN Technical Bulletin: *In situ* conservation of *Populus nigra*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy
- Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J.-M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N., & Caboche, M. (2006). Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 405–430. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105252>

- Li, Z., Peng, Y., Zhang, X.-Q., Ma, X., Huang, L.-K., & Yan, Y.-H. (2014). Exogenous spermidine improves seed germination of white clover under water stress via involvement in starch metabolism, antioxidant defenses and relevant gene expression. *Molecules*, 19(11), 18003–18024. <https://doi.org/10.3390/molecules191118003>
- Lott, J. N. A., Cavdek, V., & Carson, J. (1991). Leakage of K, Mg, Cl, Ca and Mn from imbibing seeds, grains and isolated seed parts. *Seed Science Research*, 1(4), 229–233. <https://doi.org/10.1017/S0960258500000945>
- Luo, Q., Bai, B., Xie, Y., Yao, D., Chen, Z., Zhang, D., Liu, Y., Xiao, Y., Yu, Y., & Wu, J. (2023). Spatial ionomics provides new insights into the accumulation and transport of mineral ions in rice (*Oryza sativa* L.) under Cadmium stress. *Environmental and Experimental Botany*, 208, 105267. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2023.105267>
- MacDonald, M. T., & Mohan, V. R. (2025). Chemical seed priming: molecules and mechanisms for enhancing plant germination, growth, and stress tolerance. *Current Issues in Molecular Biology*, 47(3), 177. <https://doi.org/10.3390/cimb47030177>
- Madejón, P., Cantos, M., Jiménez-Ramos, M. C., Marañón, T., & Murillo, J. M. (2015). Effects of soil contamination by trace elements on white poplar progeny: Seed germination and seedling vigour. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(11), 663. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4893-8>
- Marthandan, V., Geetha, R., Kumutha, K., Renganathan, V. G., Karthikeyan, A., & Ramalingam, J. (2020). Seed Priming: a feasible strategy to enhance drought tolerance in crop plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8258. <https://doi.org/10.3390/ijms21218258>
- Martínez-Ballesta, M. D. C., Egea-Gilabert, C., Conesa, E., Ochoa, J., Vicente, M. J., Franco, J. A., Bañon, S., Martínez, J. J., & Fernández, J. A. (2020). The importance of ion homeostasis and nutrient status in seed development and germination. *Agronomy*, 10(4), 504. <https://doi.org/10.3390/agronomy10040504>
- Memon, A. R., & Schröder, P. (2009). Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 16(2), 162–175. <https://doi.org/10.1007/s11356-008-0079-z>

- Michalak, M., Plitta, B. P., Tylkowski, T., Chmielarz, P., & Suszka, J. (2015). Desiccation tolerance and cryopreservation of seeds of black poplar (*Populus nigra* L.), a disappearing tree species in Europe. *European Journal of Forest Research*, 134(1), 53–60. <https://doi.org/10.1007/s10342-014-0832-4>
- Michalak, M., Plitta-Michalak, B. P., Naskręt-Barciszewska, M. Z., Barciszewski, J., & Chmielarz, P. (2022). DNA methylation as an early indicator of aging in stored seeds of “exceptional” species *Populus nigra* L. *Cells*, 11(13), 2080. <https://doi.org/10.3390/cells11132080>
- Molina-Rueda, J. J., Tsai, C. J., & Kirby, E. G. (2013). The populus superoxide dismutase gene family and its responses to drought stress in transgenic poplar overexpressing a pine cytosolic glutamine synthetase (GS1a). *PLoS ONE*, 8(2), e56421. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056421>
- Mulet, J. M., Campos, F., & Yenush, L. (2020). Editorial: Ion Homeostasis in Plant Stress and Development. *Frontiers in Plant Science*, 11, 618273. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.618273>
- Mushtaq, T., Banyal, R., Mugloo, J., Mushtaq, T., & Aziz, M. A. (2017). Clonal forestry: An effective technique for increasing the productivity of plantations. *SKUAST Journal of Research*, 19(1), 22–28.
- Nadarajan, J., Walters, C., Pritchard, H. W., Ballesteros, D., & Colville, L. (2023). Seed longevity—The evolution of knowledge and a conceptual framework. *Plants*, 12(3), 471. <https://doi.org/10.3390/plants12030471>
- Oñate-Sánchez, L., & Vicente-Carbajosa, J. (2008). DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. *BMC Research Notes*, 1(1), 93. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-1-93>
- Özden, E. (2022). Imbibition-induced changes in cell membrane on germination and some physiological parameters in aged cress (*Lepidium sativum* L.) seeds. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 46(4), 453–465. <https://doi.org/10.55730/1300-011X.3017>
- Paparella, S., Araújo, S. S., Rossi, G., Wijayasinghe, M., Carbonera, D., & Balestrazzi, A. (2015). Seed priming: State of the art and new perspectives. *Plant Cell Reports*, 34(8), 1281–1293. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1784-y>

- Pawłowski, T. A., Klupczyńska, E. A., Staszak, A. M., & Suszka, J. (2019). Proteomic analysis of black poplar (*Populus nigra* L.) seed storability. *Annals of Forest Science*, 76(4), 104. <https://doi.org/10.1007/s13595-019-0887-y>
- Pires, R. M. D. O., & Lima Baute, J. (2023). IMPORTANCE OF SEED QUALITY FOR THE FORESTRY SECTOR. *Boletim Técnico Sif*, 03(05), 1–06. <https://doi.org/10.53661/2763-686020230000005>
- Qin, X., Xia, Y., Hu, C., Yu, M., Shabala, S., Wu, S., Tan, Q., Xu, S., & Sun, X. (2021). Ionomics analysis provides new insights into the co-enrichment of cadmium and zinc in wheat grains. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 223, 112623. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112623>
- Qu, C., Zhang, S., Zhao, H., Chen, J., Zuo, Z., Sun, X., Cheng, Y., Xu, Z., & Liu, G. (2020). Analysis of the energy source at the early stage of poplar seed germination: Verification of Perl's pathway. *3 Biotech*, 10(10), 418. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02413-z>
- Rader, S. T., Maier, R. M., Barton, M. D., & Mazdab, F. K. (2019). Uptake and fractionation of Thallium by *Brassica juncea* in a geogenic Thallium-amended substrate. *Environmental Science & Technology*, 53(5), 2441–2449. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06222>
- Rajjou, L., & Debeaujon, I. (2008). Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *Comptes Rendus. Biologies*, 331(10), 796–805. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.07.021>
- Sano, N., Rajjou, L., North, H. M., Debeaujon, I., Marion-Poll, A., & Seo, M. (2016). Staying alive: molecular aspects of seed longevity. *Plant and Cell Physiology*, 57(4), 660–674. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv186>
- Shah, A., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2022). Seed priming with *devosia* sp. cell-free supernatant (CFS) and *Citrus* bioflavonoids enhance canola and soybean seed germination. *Molecules*, 27(11), 3410. <https://doi.org/10.3390/molecules27113410>
- Shokri, G., Amiri, J., & Barin, M. (2024). Spermidine mitigates salt stress in grapevine with alterations in physicochemical properties and nutrient composition. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 187(4), 516–532. <https://doi.org/10.1002/jpln.202400003>

- Singh, P., Arif, Y., Bajguz, A., & Hayat, S. (2021). The role of quercetin in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 166, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.05.023>
- Storme, V., Vanden Broeck, A., Ivens, B., Halfmaerten, D., Van Slycken, J., Castiglione, S., Grassi, F., Fossati, T., Cottrell, J. E., Tabbener, H. E., Lefèvre, F., Saintagne, C., Fluch, S., Krystufek, V., Burg, K., Bordács, S., Borovics, A., Gebhardt, K., Vornam, B., ... Smulders, M. J. M. (2004). *Ex-situ* conservation of Black poplar in Europe: Genetic diversity in nine gene bank collections and their value for nature development. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(6), 969–981. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1523-6>
- Struve, D. K. (1998). Seed conditioning of red oak: A recalcitrant North American seed. *Scientia Agricola*, 55(spe), 67–73. <https://doi.org/10.1590/S0103-90161998000500012>
- Suszka, J., Plitta, B. P., Michalak, M., Bujarska-Borkowska, B., Tylkowski, T., & Chmielarz, P. (2014). Optimal seed water content and storage temperature for preservation of *Populus nigra* L. germplasm. *Annals of Forest Science*, 71(5), 543–549. <https://doi.org/10.1007/s13595-014-0368-2>
- Taie, H. A. A., Seif El-Yazal, M. A., Ahmed, S. M. A., & Rady, M. M. (2019). Polyamines modulate growth, antioxidant activity, and genomic DNA in heavy metal–stressed wheat plant. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(22), 22338–22350. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05555-7>
- Tang, F., Chu, L., Shu, W., He, X., Wang, L., & Lu, M. (2019). Selection and validation of reference genes for quantitative expression analysis of miRNAs and mRNAs in Poplar. *Plant Methods*, 15(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0420-1>
- Thomsen, R., Sølvsten, C. A. E., Linnet, T. E., Blechingberg, J., & Nielsen, A. L. (2010). Analysis of qPCR data by converting exponentially related Ct values into linearly related X_0 values. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 08(05), 885–900. <https://doi.org/10.1142/S0219720010004963>
- Tőzsér, D., Horváth, R., Simon, E., & Magura, T. (2023). Heavy metal uptake by plant parts of *Populus* species: A meta-analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(26), 69416–69430. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-27244-2>

- Vanden Broeck, A. (2003). EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for European black poplar (*Populus nigra*). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. pp. 1-6. https://www.euforgen.org/uploads/tx_news/927_Technical_guidelines_for_genetic_conservation_and_use_for_black_poplar__Populus_nigra_.pdf
- Walters, C. (2015). Orthodoxy, recalcitrance and in-between: Describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. *Planta*, 242(2), 397–406. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2312-6>
- Wu, H. (2018). Plant salt tolerance and Na⁺ sensing and transport. *The Crop Journal*, 6(3), 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2018.01.003>
- Xiao, W., Liu, P., Wang, K., Yang, Z., & Wang, L. (2021). Relationship between ionomics and transcriptomics of rice plant in response to arsenite stress. *Environmental and Experimental Botany*, 189, 104565. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104565>
- Yadav, R., Arora, P., Kumar, S., & Chaudhury, A. (2010). Perspectives for genetic engineering of poplars for enhanced phytoremediation abilities. *Ecotoxicology*, 19(8), 1574–1588. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0543-7>
- Zhang, Z., Liu, D., Meng, H., Li, S., Wang, S., Xiao, Z., Sun, J., Chang, L., Luo, K., & Li, N. (2020). Magnesium alleviates aluminum toxicity by promoting polar auxin transport and distribution and root alkalization in the root apex in populus. *Plant and Soil*, 448(1–2), 565–585. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04459-7>
- Zhou, X.-L., Chen, Z.-D., Zhou, Y.-M., Shi, R.-H., & Li, Z.-J. (2019). The Effect of Tartary Buckwheat Flavonoids in Inhibiting the Proliferation of MGC80-3 Cells during Seed Germination. *Molecules*, 24(17), 3092. <https://doi.org/10.3390/molecules24173092>