UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea magistrale in Biologia Evoluzionistica

TESI DI LAUREA

Caratterizzazione dei geni *MILDEW LOCUS O* (*MLO*) durante la simbiosi micorrizica arbuscolare in *Lotus japonicus*

Relatore: Dott. Marco Giovannetti
Correlatore: Dott. Filippo Binci
Dipartimento di Biologia

Laureando: Giacomo Rago

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

“Nature gives to every time and season some beauties of its own; and from morning to night, as from cradle to the grave, it is but a succession of changes so gentle and easy that we can scarcely mark their progress “

Charles Dickens, “The life and adventures of Nicholas Nickleby”

Sommario

1 INTRODUZIONE 1

1.1 Colonizzazione dell'apparato radicale e sviluppo della simbiosi AM 3

1.1.1 Comunicazione presimbiotica 4

1.1.2 Formazione dell'apparato di pre-penetrazione ed ingresso dell'ifa 5

1.1.3 Formazione dell'arbuscolo 5

1.2 Scambio di nutrienti 6

1.2.1 Dal fungo alla pianta 8

1.2.2 Dalla pianta al fungo 9

1.3 Caratteristiche e funzioni dei geni *MILDEW LOCUS O* (*MLO*) 10

1.3.1 Le proteine MLO sono regolate dal calcio 12

1.3.2 Ruolo dei geni MLO nella tigmomorfogenesi 13

1.3.3 Ruolo dei geni MLO nella fecondazione 14

1.3.4 Ruolo dei geni MLO nella simbiosi AM 15

1.3.5 Evoluzione e filogenesi dei geni *MLO* 15

1.4 *Lotus japonicus* come organismo modello 17

1.4.1 Geni MLO in *L. japonicus* 18

1.5 Scopo della tesi 20

2 MATERIALI E METODI 21

2.1 Linee cellulari e terreni di coltura 21

2.2 Materiale vegetale e condizioni di crescita 21

2.2.1 Sterilizzazione e germinazione dei semi di Lotus japonicus 21

2.3 Tabella 1: Lista di primer 22

2.4 Tabella 2: Lista di plasmidi 23

2.5 Analisi *in silico* 26

2.6 Amplificazione del DNA tramite PCR 26

2.7 Elettroforesi su gel di agarosio 27

2.8 Purificazione dei prodotti di PCR 27

2.9 Sistema di clonaggio Green Gate 27

***2.10* Estrazione dei plasmidi da cellule di *Escherichia coli* 28**

2.11 Test di digestione dei plasmidi tramite endonucleasi 29

2.12 Sequenziamento Sanger 29

2.13 Test di micorrizazione 29

2.14 Quantificazione di massa ed estensione dell'apparato radicale 30

2.15 Colorazione delle radici con inchiostro per il test Trouvelot 30

2.16 Estrazione di RNA dalle radici, sintesi di cDNA e RT-qPCR 31

2.17 Colorazione gus 31

2.17.1 Contro-colorazione con fucsina 32

2.17.2 Colorazione con fluorofori coniugati a Whear Germ Agglutinin 32

2.18 Analisi della risposta gravitropica delle radici 32

2.19 Analisi della crescita delle radici laterali 33

***2.20* Trasformazione mediante *Agrobacterium rhizogenes* 33**

2.21 Preparazione e trasformazione dei protoplasti 34

2.22 Misurazione della variazione della concentrazione di calcio con aequorina 34

2.23 Microscopia 35

2.24 Analisi statistica 35

3 RISULTATI 36

3.1 Il promotore di *MLO4* si attiva in cellule colonizzate dal fungo AM in *L. japonicus* 36

***3.2* Analisi del ruolo delle sequenze regolatorie AW-box e P1BS per l'attività di p*MLO4* 39**

..... 42

3.3 Quantificazione della colonizzazione fungina: confronto tra WT e mutanti mediante Trouvelot e RT-qPCR 42

3.4 I mutanti *mlo4-1* sono caratterizzati da crescita rallentata 46

3.5 I trattamenti con CO4 10^{-7} M e Myc-LCO 10^{-7} M inducono la formazione di radici laterali nel WT 49

3.6 I mutanti *mlo-4* producono un numero minore di radici laterali rispetto al WT 53

3.7 I mutanti mlo1A-1 mostrano una risposta accelerata al gravitropismo 55

3.8 Risposta a segnali Ca^{2+} 56

3.9 MLO4 localizza a livello del sistema endomembranoso 57

4 DISCUSSIONE 61

4.1 Ruolo di MLO4: comunicatore simbiotico o facilitatore della colonizzazione? 62

4.2 L'attivazione di p*MLO4* dipende dal fungo AM 64

4.3 I mutanti *mlo4-1* crescono più lentamente rispetto al WT 65

5 CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE 67

6 BIBLIOGRAFIA 69

ABSTRACT

La simbiosi micorrizica arbuscolare (AM) si instaura tra funghi del suolo del phylum Glomeromycotina e la maggior parte delle piante terrestri a livello dell'apparato radicale. Si tratta di un rapporto mutualistico in cui il fungo riceve dalla pianta carboidrati e lipidi e, in cambio, fornisce acqua e nutrienti, in particolare fosfato. Lo scambio dei nutrienti avviene a livello dell'arbuscolo, una struttura fungina altamente ramificata presente all'interno delle cellule dello strato corticale interno. Lo sviluppo della AM è un processo asincrono a più fasi che è finemente regolato a partire dallo scambio di molecole segnale da parte dei due partner simbiotici. Con l'obiettivo di identificare e caratterizzare geni di *Lotus japonicus*, pianta modello per lo studio delle endosimbiosi, coinvolti nella simbiosi AM, la tesi ha avuto come oggetto la caratterizzazione dei geni *MILDEW LOCUS O* (*MLO*). In *L. japonicus* sono presenti 15 diversi geni *MLO* coinvolti in numerosi processi che hanno come caratteristica comune la percezione di stimoli esterni e sembrano mediare l'interazione con microrganismi. Mutanti *mlo* mostrano, infatti, maggiore resistenza contro infezioni da funghi biotrofici e da studi recenti sembrano avere un ruolo nella simbiosi AM. In questo lavoro di tesi, mi sono focalizzato sul suolo di *MLO4* in quanto risulta essere il gene maggiormente espresso durante la simbiosi AM e sono stati analizzati tre diversi mutanti inserzionali *LORE1* (*mlo4-1*, *mlo4-2*, *mlo4-3*) per le loro caratteristiche fenotipiche. I risultati ottenuti mostrano che il promotore di *MLO4* è attivo in cellule che ospitano il fungo e che *mlo4-1* è caratterizzato da crescita rallentata, in particolare dell'apparato radicale, oltre a presentare una risposta tardiva del Ca^{2+} a seguito di somministrazione di un noto segnale simbiotico. Inoltre, tramite trasformazione eterologa di protoplasti di *Arabidopsis thaliana* si è visto che MLO4 localizza nel sistema delle endomembrane cellulari. Sulla base di questi risultati, si può quindi ipotizzare un ruolo di MLO4 in corrispondenza della formazione dell'arbuscolo e non si può escludere un coinvolgimento in meccanismi di *signaling* mediati da Ca^{2+}.

1 INTRODUZIONE

Le micorrize (dal greco 'mychos', fungo e 'rhiza', radice) sono associazioni simbiotiche, tra funghi del terreno e radici delle piante. Queste interazioni possono essere classificate come ectomicorrize oppure endomicorrize. Nelle ectomicorrize, predominanti negli alberi delle foreste temperate, il fungo colonizza le cellule superficiali delle radici laterali dell'ospite, rimanendo sempre all'esterno del lumen cellulare. La ramificazione delle ife porta alla formazione di una struttura definita 'mantello di rivestimento' che copre interamente l'apice radicale. A seconda della specie di pianta ospite, le ife possono poi diffondere ulteriormente nel tessuto corticale dove formano un complesso, noto come 'reticolo di Hartig', importante per lo scambio di nutrienti. Nel caso delle endomicorrize, invece, il fungo forma strutture all'interno delle cellule corticali ed è quindi in grado di crescere sia intercellularmente che intracellularmente, pur non entrando mai in diretto contatto con il citoplasma dell'ospite. Ci sono diverse tipologie di endomicorrize: micorrize arbuscolari (AM), ericoidi ed orchidee. Le micorrize ericoidi si sviluppano esclusivamente in piante dell'ordine delle Ericali e colonizzano unicamente lo strato cellulare più esterno posto a diretto contatto con il terreno (cellule rizodermali). Le cellule vengono colonizzate singolarmente e per questo motivo cellule adiacenti possono ospitare complessi fungini con differenti stadi di sviluppo (Smith e Read, Mycorrhizal Symbiosis 2008). Tutte le orchidee, nonostante la loro distribuzione cosmopolita ed il numero elevato di specie diverse, sono caratterizzate da semi di dimensione molto piccola (0.3-14 µg), privi delle risorse fondamentali per supportare le prime fasi di sviluppo (per questo motivo vengono chiamati '*dust seeds*'). Di conseguenza, l'interazione con i funghi micorrizici è di fondamentale importanza in quanto, in un processo che prende il nome di 'germinazione simbiotica', il fungo fornisce al seme i nutrienti necessari per il suo sviluppo, formando nell'embrione dei semi e nei rizomi o nelle radici delle piante adulte, degli avvolgimenti intracellulari (pelotoni). La germinazione simbiotica ed il successivo sviluppo embrionale possono avvenire solo se il fungo ha accesso ad una fonte di carboidrati fornita dalla pianta (Smith e Read, Mycorrhizal Symbiosis 2008).

AM è la tipologia di simbiosi più diffusa e si forma tra differenti specie di piante terrestri e funghi appartenenti a Glomeromycotina, sub-phylum monofiletico all'interno del phylum Mucoromycota ed equidistante da altri due sub-phyla: Mucoromycotina e Mortierellomycotina (Spatafora, et al. 2016; Malar C, et al. 2021) Questa forma di interazione è stata individuata nella maggior parte delle piante terrestri, incluse tracheofite (o piante vascolari) e briofite (o piante non vascolari), il che suggerisce una sua origine antecedente la divergenza di questi due clade monofiletici (Delaux e Schornack 2021). Anche grazie a prove fossili rinvenute nei pressi del villaggio di Rhynie, Scozia, è stato possibile stimare che la co-evoluzione di funghi e piante ha avuto inizio oltre 400 milioni di anni fa. Sono inoltre presenti fossili riconducibili a spore di funghi AM risalenti al Siluriano ed Ordoviciano (440-410 milioni di anni fa). In base a questi rinvenimenti, nonostante

non si possa essere certi della fisiologia, supponendo che funzionassero in modo analogo ai loro epigoni moderni, è possibile supporre che i funghi AM abbiano svolto un ruolo rilevante nella colonizzazione delle terre emerse. A supporto di ciò, si consideri che le prime piante terrestri erano prive di un vero e proprio sistema radicale e presentavano protosteli non sviluppati a sufficienza per garantire un adeguato approvvigionamento di nutrienti (Pirozynski e Malloch 1975).
Nonostante siano in grado di germinare nel suolo, i funghi AM sono dei biotrofi obbligati dal momento che necessitano di un ospite per completare il loro ciclo vitale e produrre spore. Sono estremamente plastici e versatili in quanto, oltre ad essere in grado di colonizzare un numero estremamente elevato di specie vegetali diverse, non necessitano di avere come nicchia simbiotica la radice ma sono anche in grado di crescere nei rizomi. Nonostante l'apparato radicale non sia essenziale per questo processo, la presenza di un tessuto multicellulare sembra esserlo (Rich, Vigneron, et al. 2021). Cellule isolate o in cultura, infatti, non sono mai colonizzate. Quindi, i funghi AM possono ottenere accesso ai tessuti radicali interni della pianta in diversi modi (rizoidi a singola cellula, peli radicali o cellule epidermiche) ma, indipendentemente dalla via d'ingresso adottata, lo sviluppo dell'arbuscolo avviene nel tessuto corticale (Bonfante e Genre 2008).
La simbiosi AM viene considerata mutualistica in quanto entrambi i partner coinvolti ricevono benefici. La pianta, infatti, fornisce al fungo fino al 20% del carbonio fissato in forma di fotosintati, per lo più acidi grassi. Il fungo, grazie all'esteso micelio extraradicale, è in grado di acquisire H_2O e nutrienti dal terreno e di fornirli alla pianta. In particolare, risulta importante l'approvvigionamento di fosfato inorganico (Pi), poiché può rappresentare fino al 70-100% dell'acquisizione totale di fosfato da parte della pianta (Choi, Summers e Paszkowski 2018).
Considerando che le piante possono avere diversi partner fungini AM, e viceversa, spesso risulta difficile quantificare i benefici conferiti dalla simbiosi. Si possono, infatti, formare dei network micorrizici comuni (CMN) costituiti da un connubio di ife extraradicali di organismi diversi connesse tra loro. Si viene così a creare una comunità di condivisione delle risorse in cui individui più deboli vengono supportati da piante con maggiore fitness. Questo meccanismo, che prende il nome di facilitazione, avviene principalmente nel caso di germogli e piante non fotosintetiche (Van Der Heijden e Horton 2009). Le radici micorrizate, spesso, mostrano un considerevole livello di colonizzazione. Anche i funghi AM, analogamente ad altri funghi, rilasciano molecole segnale (ad esempio, oligomeri di chitina), riconosciute dalla pianta, che determinano l'attivazione delle risposte di difesa. Nel caso dei funghi AM, però, si è visto che la risposta di difesa della pianta viene attivata debolmente solo nella fase iniziale dell'interazione per poi essere probabilmente repressa a vantaggio della simbiosi. Per questo motivo è stato proposto un ruolo di soppressione della difesa della pianta da parte del fungo (Jung, et al. 2012; Thomas, Liang e Haney 2021). Quindi, nonostante le difese della pianta debbano essere attenuate per permettere l'instaurarsi della simbiosi, è necessario allo stesso tempo mantenere queste difese attive per poter far fronte ad elementi patogeni della rizosfera. Inaspettatamente, è stato visto che le difese delle piante micorriziche non diminuiscono ma anzi mostrano un incremento nella resistenza ai patogeni (Jung, et al. 2012). La presenza cosmopolita dei funghi AM

suggerisce che siano delle specie estremamente adattabili sia da un punto di vista dell'organismo simbiotico sia delle condizioni ambientali in cui possono vivere. I benefici di questa interazione non si limitano esclusivamente allo scambio di nutrienti. Considerando che molti ambienti naturali sono caratterizzati da deficit di sostanze minerali e stress abiotici (quali temperature elevate e siccità), la simbiosi AM rappresenta un vantaggio selettivo in quanto conferisce una maggiore fitness al suo ospite, incrementando l'approvvigionamento di nutrienti, la resistenza agli stress ed alle malattie e migliorandone la crescita. Ragionevolmente, questo può essere considerato il motivo per cui la simbiosi AM sia perdurata per un periodo di tempo tanto esteso. Inoltre, grazie al fitto *network* di ife extraradicali, i funghi AM hanno la potenzialità di migliorare la qualità del terreno, riducendo il rischio di erosione del suolo da parte di agenti atmosferici quali vento e pioggia e trattenendo una maggiore quantità di nutrienti. Dunque, considerando i numerosi benefici arrecati, risultano molto promettenti per applicazioni in agricoltura al fine di diminuire l'utilizzo di fertilizzanti chimici, senza però portare ad un decremento della produttività. Altre possibili applicazioni riguardano progetti di rinaturazione e riforestazione, in particolare in regioni aride, maggiormente soggette a stress abiotici.

1.1 Colonizzazione dell'apparato radicale e sviluppo della simbiosi AM

Lo sviluppo della simbiosi AM è un processo estremamente dinamico che comprende diverse fasi consecutive a livello di singolo punto di infezione, ma asincrone a livello di intero apparato radicale. Questo significa che in punti differenti della radice è possibile osservare fasi diverse del processo di colonizzazione.

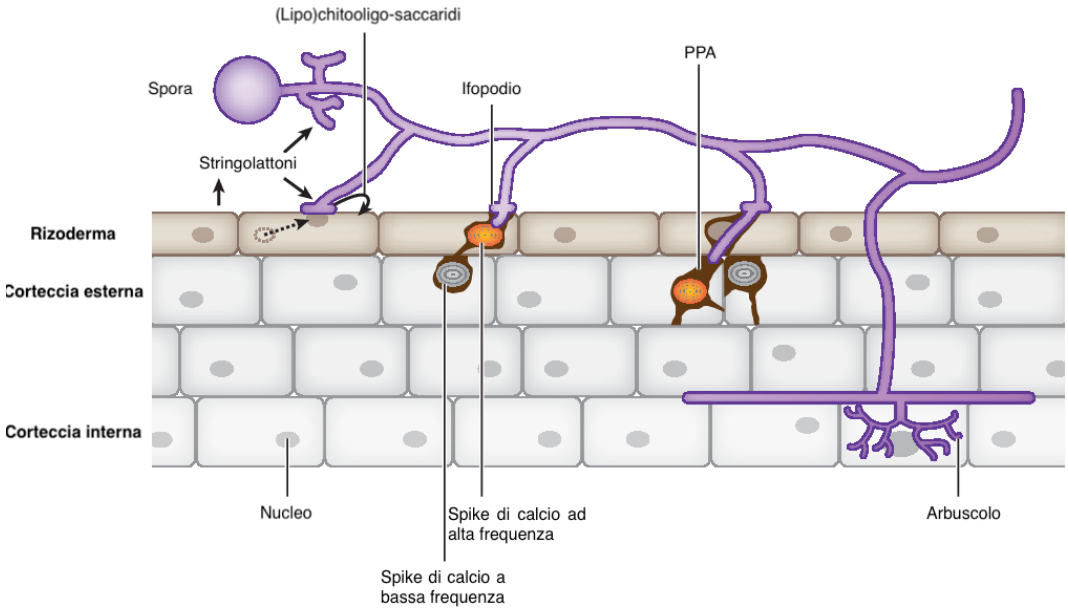


Figura 1. Rappresentazione schematica dei differenti step richiesti per la formazione della simbiosi AM *(Gutjahr e Parniske 2013)*.

1.1.1 Comunicazione presimbiotica

La prima fase della simbiosi AM consiste in uno scambio di molecole segnale rilasciate nella rizosfera dai due partner. La pianta produce i cosiddetti '*branching factors*', molecole solubili che inducono la ramificazione delle ife fungine. Un esempio sono gli strigolattoni (SL), fitormoni lattoni terpenoidi derivati dai carotenoidi, percepiti dal fungo anche a concentrazioni molto basse (10 nM). La sintesi ed il rilascio di queste molecole sono incrementate dalla carenza di fosfato, condizione che promuove la simbiosi AM. La percezione degli strigolattoni da parte del fungo AM, oltre a comportare un incremento del metabolismo fungino e a determinare la crescita e ramificazione delle ife, induce il rilascio di fattori di micorrizazione (fattori Myc), tra cui chitooligosaccaridi (CO) a catena corta (tipicamente tetrameri CO4 e pentameri CO5) e lipochitooligosaccaridi (LCO). I fattori Myc sono costituiti da un *backbone* di chitina, polimero lineare formato da quattro o cinque residui di *N-acetilglucosamina* (GlcNAc). Gli LCO si formano per l'aggiunta di un gruppo *N-acilico* allo zucchero terminale non-riducente (Gutjahr e Parniske 2013).
La chitina, essendo uno dei principali componenti della parete fungina, viene frammentata dalla pianta grazie alla secrezione di enzimi chinasi con l'obiettivo di proteggersi da potenziali infezioni. L'enzima chinasi rilasciato dalla pianta produce frammenti a catena lunga (CO8) riconosciuti da specifici recettori della pianta ed in grado di dare inizio a risposte immunitarie. Al contrario, i frammenti di CO a catena corta e gli LCO vengono prodotti attivamente dal fungo. In realtà, la distinzione tra frammenti a catena lunga ed a catena corta non è così netta. È stato visto, infatti, che anche i CO con un numero di residui variabile da 4 a 8 possono fungere da segnale simbiotico in *M. truncatula*. Quindi, dal momento che presentano derivazione comune a partire dalla chitina, è plausibile che anche CO8, oltre a CO4 e CO5, sia prodotto attivamente dai funghi AM (Feng , et al. 2019; Khokhani, et al. 2021). La comunicazione molecolare che si innesca a seguito del rilascio dei fattori Myc causa una cascata di segnalazione che comporta modificazioni metaboliche e fisiologiche, oltre a drastici cambiamenti trascrizionali. Tutto ciò viene finemente regolato da segnali Ca^{2+}, secondo messaggero fondamentale, tra le altre cose, per la risposta delle piante ai microrganismi. *Influx* di Ca^{2+} citosolici erano generalmente associati ad una risposta ad organismi patogeni e legati all'attivazione delle risposte immunitarie da parte della pianta, mentre *spiking* nucleari e peri-nucleari venivano considerati segnali simbiotici. In realtà, questa distinzione risulta essere riduttiva in quanto sono state rilevate oscillazioni nucleari di Ca^{2+} anche in risposta a patogeni. Infatti, in piante wild-type di *L. japonicus*, confrontando le curve delle concentrazioni di Ca^{2+} e prendendo in considerazione sia il picco dello *spiking* sia l'integrale dell'area sottesa alla curva, è stato visto che CO4, CO8 e Myc-LCO generano una risposta citosolica e nucleare simile (Binci, et al. 2022).
Oltre a fungere da segnale per l'instaurazione della simbiosi AM, CO4 e Myc-LCO sembrano promuovere la crescita di radici laterali e incrementare la lunghezza totale dell'apparato radicale in riso e *Medicago truncatula* (Sun, Miller, et al. 2015).

1.1.2 Formazione dell'apparato di pre-penetrazione ed ingresso dell'ifa

In risposta alla comunicazione presimbiotica, l'ifa fungina prende contatto con l'epidermide della radice dove forma l'ifopodio, una struttura cilindrica, allungata diametralmente, che funge da sito di ingresso. Contemporaneamente, la radice risponde alla formazione dell'appendice fungina mettendo in atto cambiamenti anatomici e citologici. I nuclei delle cellule della corteccia interna vanno incontro ad un incremento nelle dimensioni (passando da un diametro di 6-7 µm proprio di cellule non colonizzate ad un diametro di 10-11 µm) e ad un riarrangiamento dell'architettura della cromatina che diventa maggiormente decondensata (Genre, et al 2008; Choi, et al 2018). Inoltre, i nuclei subiscono un processo di endoreduplicazione e si posizionano in un primo tempo centralmente rispetto all'ifopodio e successivamente ai lati opposti della cellula, lasciando al centro un aggregato di microtubuli, microfilamenti di actina e cisterne del reticolo endoplasmatico. Questo aggregato si organizza in una struttura, chiamata apparato di pre-penetrazione (PPA), che funge da sito di ingresso, delineando la traiettoria di sviluppo dell'ifa attraverso le cellule della radice. Il fungo è completamente circondato da una membrana di derivazione vegetale, chiamata membrana perifungina, che impedisce all'ifa di entrare in contatto diretto con il citoplasma della pianta. Nel momento in cui il fungo raggiunge la corteccia interna, la direzione di crescita dell'ifa subisce un cambiamento drastico passando da una direzione di sviluppo radiale ad una longitudinale. Nonostante ciò, in entrambi i casi, la crescita dell'ifa è preceduta da riorganizzazione cellulare e formazione del ponte citoplasmatico che funge da traiettoria di propagazione per il fungo. La formazione del PPA, quindi, oltre ad essere un meccanismo estremamente versatile che può essere modulato in base alle specifiche necessità delle diverse tipologie cellulari, testimonia anche una partecipazione attiva da parte della pianta nell'instaurarsi della simbiosi (Genre, et al 2008; Gutjahr e Parniske 2013).

1.1.3 Formazione dell'arbuscolo

Da un punto di vista morfologico, è possibile distinguere due tipologie di micorriza arbuscolare: *Arum* e *Paris*. Il fungo AM tipo *Arum* è caratterizzato da ife intercellulari da cui si generano arbuscoli a livello di singola cellula. Il tipo *Paris*, invece, è caratterizzato da conglomerati ifali intracellulari. La divisione tra queste due tipologie di micorrize non risulta però essere netta e dipende dalle differenti interazioni possibili tra specie di pianta ospite e specie di fungo colonizzatore. Sono state, infatti, individuate specie di piante in cui sono presenti contemporaneamente entrambi i pattern di sviluppo e famiglie in cui è stata individuata più di una singola tipologia (Genre, et al. 2008).
L'arbuscolo è una struttura altamente ramificata che si forma nelle cellule della corteccia interna. La sua formazione comporta notevoli cambiamenti fisiologici e citoscheletrici, quali l'aumento in volume di nucleo e nucleoli, oltre che del citoplasma, e la frammentazione dei vacuoli. Pur occupando gran parte del volume cellulare dell'ospite, questa struttura fungina rimane sempre separata dal citosol

grazie alla presenza della membrana periarbuscolare (PAM) che determina un incremento fino a quattro volte della superficie della membrana plasmatica. L'incremento in superficie dell'area di contatto fungo-pianta determinato dalla costituzione dell'arbuscolo testimonia il suo coinvolgimento nello scambio di nutrienti. È possibile identificare tre diverse fasi che portano alla formazione dell'arbuscolo: in seguito all'ingresso dell'ifa nell'ospite, si ha la formazione di una spessa struttura ifale basale da cui diramano strutture secondarie più sottili che ramificano ulteriormente andando a costituire l'arbuscolo maturo. Una volta che la simbiosi AM è stata stabilita, il fungo produce vescicole, in cui vengono immagazzinati i lipidi, e spore asessuali (Choi, Summers e Paszkowski 2018).
Nonostante lo sforzo considerevole a cui le cellule vanno incontro per accomodare l'arbuscolo, questa struttura ha una vita effimera e dopo qualche giorno viene completamente degradata. Comunque, in piante lignee caratterizzate da crescita lenta, l'arbuscolo, oltre ad essere caratterizzato da rami con maggior spessore, è in grado di sopravvivere più a lungo. Il processo che porta al collasso dell'arbuscolo non è interamente noto ma si sa che è mediato dalle cellule della radice e viene influenzato dalla funzionalità dei trasportatori del fosfato a livello della PAM. È stato osservato che inizia a partire dalle ramificazioni più sottili fino a raggiungere il tronco principale ed è accompagnato da una incrementata formazione di setti (Choi, Summers e Paszkowski 2018). Inoltre, grazie all'analisi di mutanti *pt4* di *M. truncatula* in cui si ha degenerazione prematura dell'arbuscolo, sono stati identificati dei geni associati al processo di degradazione, molti dei quali codificano per enzimi idrolasi (Floss, et al. 2017).

1.2 Scambio di nutrienti

Il fosfato (Pi) è uno dei 17 nutrienti essenziali per la pianta e, assieme ad azoto (N) e potassio (K), viene classificato come macronutriente, arrivando a costituire fino al 0.2% della massa secca della pianta. Nel suolo si trova maggiormente in forma inorganica (Pi) e, nonostante possa essere presente a concentrazioni elevate, essendo caratterizzato da bassa solubilità e mobilità, risulta di difficile acquisizione da parte delle piante. L'ingresso di Pi nella pianta avviene grazie alla presenza di peli ed apici radicali, attraverso gli strati cellulari più esterni. L'assorbimento di Pi causa la diminuzione della sua concentrazione nella rizosfera e porta alla formazione della cosiddetta '*depletion zone'* nella regione di assorbimento diretto in prossimità dell'apparato radicale. Inoltre, il Pi è presente nel suolo in forma di ione carico negativamente ($H_2PO_4^-$) il che lo rende facilmente sequestrabile da cationi quali Fe, Al e Ca, in particolare in suoli acidi tipici delle regioni tropicali, diminuendone ulteriormente la disponibilità. È stato infatti calcolato che oltre il 67% dei terreni agricoli è caratterizzato da carenza di fosfato, rendendo irrinunciabile l'utilizzo di fertilizzanti chimici per ottenere rese elevate (Smith, et al. 2011).
Quindi, l'approvvigionamento di Pi comporta costi metabolici e richiede la presenza di proteine di trasporto ad alta affinità. Per superare queste limitazioni, le piante hanno evoluto diverse strategie fisiologiche tra cui aumentare la superficie di contatto radice-suolo tramite lo sviluppo di peli radicali in modo da

massimizzare l'accesso al Pi libero oppure solubilizzare il Pi secernendo acidi organici, quali malato e citrato, in grado di legarsi ai cationi al posto del Pi, e fosfatasi che mineralizza il Pi da composti organici. Senza dubbio, una delle strategie più importanti consiste nell'instaurazione della simbiosi AM che gioca un ruolo centrale nell'approvvigionamento del Pi. Infatti, dal momento che il micelio fungino cresce in lunghezza fino a cento volte di più rispetto ai peli radicali, questa interazione permette di superare la *depletion zone* della radice. Essendo un rapporto mutualistico, l'ospite della simbiosi fornisce in cambio al fungo carbonio organico (C) indispensabile per la sua crescita. Nonostante la pianta debba andare incontro a delle spese in termini di C donato al fungo, i vantaggi che riceve (quali, ad esempio, maggiore sviluppo della parte vegetativa il che determina un incremento nella fotosintesi e quindi nella produzione stessa di C oppure minor investimento nell'apparato radicale in quanto la pianta non ha la necessità di esplorare una superficie di terreno estesa per approvvigionare il Pi necessario) rendono la simbiosi AM un'interazione sicuramente vantaggiosa (Smith, et al. 2011). La disponibilità di Pi per la pianta è un parametro cruciale per l'instaurazione ed il mantenimento della simbiosi, tanto che si parla di 'paradigma dell'inibizione da fosfato'. In base a questo paradigma, l'utilizzo di fertilizzanti che determinano alta disponibilità di Pi può comportare una diminuzione nella percentuale di colonizzazione dell'apparato radicale e, di conseguenza, inibire, o perlomeno ostacolare, l'instaurazione della simbiosi AM. Questo, però, non implica necessariamente che in eccesso di Pi la pianta controlli o sopprima l'attività fungina. Sicuramente, però, elevate concentrazioni di Pi possono alterare alcune caratteristiche della colonizzazione come, ad esempio, lo sviluppo degli arbuscoli e diminuire la biomassa del fungo AM, sia a livello di apparato radicale che nel suolo. In realtà, le prove a favore dell'ipotesi sostenute da questo paradigma derivano principalmente da esperimenti eseguiti in laboratorio in condizioni sterili il che offre una visione certamente limitata in quanto non permette di tenere in considerazione la varietà di taxa di fungi AM e la vastità della comunità microbica presente nel suolo. In uno studio condotto in suolo su manioca (*M. esculenta*) è stato infatti visto che in molti casi l'aggiunta di Pi non ha alcun effetto negativo sulla simbiosi AM, ma anzi in alcuni casi determina un suo incremento. Il paradigma proposto risulta quindi una generalizzazione e sarebbe più corretto affermare che non è tanto la disponibilità di Pi nel suolo a modulare il livello di colonizzazione simbiotica, quanto piuttosto la tipologia di pianta, i taxa di fungo AM e le caratteristiche del terreno e quindi, tra le altre cose, la comunità microbica che vi risiede (Venegas, et al. 2021).

I funghi AM sono biotrofi obbligati in quanto necessitano del C fornito dal partner per poter completare il proprio ciclo vitale. Dal momento che la maggior parte delle ife fungine, delle vescicole e delle spore è costituita da lipidi, inizialmente si pensava che i carboidrati forniti dalla pianta fossero convertiti in lipidi (Smith e Read, 2008). Di recente, diversi gruppi di ricerca (Bravo, et al. 2017; Keymer, et al. 2017; Luginbuehl, et al. 2017; Jiang, et al. 2017) hanno però dimostrato che i funghi AM sono privi di geni acidi grassi sintasi (FAS) necessari per la sintesi *de novo* di acidi grassi a catena lunga 16:0. Presentano, però, enzimi coinvolti nel loro allungamento e nella desaturazione. Il fatto che il profilo isotopico degli acidi grassi

16:0 nella pianta ospite e nel fungo AM sia pressoché identico dimostra che si verifica un trasferimento di FAs 16:0 dall'ospite al simbionte (Keymer, et al. 2017). Di conseguenza, i funghi AM dipendono dall'ospite per l'ottenimento di acidi grassi come testimoniato anche dall'incremento, sia nel fungo che nella pianta, dell'espressione di geni coinvolti nel metabolismo lipidico in cellule contenenti arbuscoli. Inoltre, analizzando mutanti di *L. japonicus* caratterizzati da uno sviluppo arbuscolare difettivo, è stato evidenziato il ruolo chiave svolto dall'arbuscolo nello sviluppo del fungo AM in quanto l'ottenimento di lipidi da parte dell'arbuscolo risulta fondamentale per la formazione delle vescicole, del micelio extraradicale e delle spore. La perdita di geni FAS da parte del fungo, apparentemente dannosa in quanto lo rende dipendente dall'ospite per la biosintesi di lipidi, può essere spiegata da un punto di vista evoluzionistico considerando il costo energetico. Risulta, infatti, probabilmente più costoso per il fungo mettere in funzione la *machinery* di biosintesi degli acidi grassi e un sistema di trasporto per il C fornito dalla pianta piuttosto che trasportare i lipidi forniti dall'ospite per tutta l'estensione del micelio extraradicale. Per questo motivo, i funghi AM sarebbero evoluti perdendo la capacità di sintetizzare in autonomia i lipidi, permettendo però una proliferazione più rapida del micelio extraradicale e quindi un maggior approvvigionamento di nutrienti per supportare l'ospite (Keymer, et al. 2017).

1.2.1 Dal fungo alla pianta

Una volta terminata l'acquisizione dal suolo da parte del fungo, il Pi deve essere distribuito nella pianta a livello di singola cellula e successivamente ai vari compartimenti cellulari ed organelli. Dopo essere entrato nel citoplasma fungino, il Pi si accumula a livello del vacuolo, dove viene rapidamente convertito in polifosfato (Poli-P), polimero lineare composto da molteplici Pi connessi da legami fosfoanidridici ad alta energia. Dopo essersi accumulato nel vacuolo, Poli-P viene traslocato dall'ifa extraradicale all'ifa intraradicale dove viene idrolizzato e, probabilmente, trasferito al compartimento apoplastico periarbuscolare permettendo alla pianta l'accesso al Pi. Il meccanismo di idrolisi di Poli-P non è ancora interamente noto ma sembra coinvolgere gli enzimi fosfatasi presenti attorno agli arbuscoli (Javot, et al. 2007).
I livelli intracellulari di Pi vengono strettamente controllati in quanto possono avere effetto su diverse reazioni cellulari. Poiché spesso il Pi deve essere trasportato contro gradiente elettrochimico, sono necessari trasportatori attivi. Nelle piante sono stati identificati diversi trasportatori simporto $Pi:H^+$. I più noti appartengono alla famiglia PHT1 (*Phosphate Transporters 1*) e sono localizzati a livello di membrana plasmatica. Altre due famiglie di trasportatori simporto sono state invece identificate negli organelli (plastidi e mitocondri) (Nussaume, et al. 2011). In diverse specie, tra cui *Medicago truncatula*, riso, patata e pomodoro, è stato identificato un sottogruppo di trasportatori PHT1 la cui espressione è strettamente indotta dalla presenza del fungo AM. Questo sottogruppo di trasportatori è differente dagli altri trasportatori PHT1 la cui espressione è invece incrementata nelle radici micorrizate pur mantenendo un'espressione basale

anche in radici prive di fungo AM. In *Medicago truncatula* è stato caratterizzato il trasportatore MtPT4, espresso esclusivamente a livello di membrana periarbuscolare. Inoltre, è stato possibile individuarlo solo in arbuscoli in sviluppo o già maturi, a sostegno dell'idea che gli arbuscoli fungano da principale sito di scambio del Pi tra i due simbionti. Perdita della funzione di MtPT4 porta a degenerazione prematura dell'arbuscolo e interruzione della simbiosi. In *Lotus japonicus* è stato in seguito identificato LjPT4, omologo di MtPT4. È stato dimostrato che LjPT4 è fondamentale per la corretta formazione dell'arbuscolo e per incrementare l'ottenimento del Pi da parte della pianta. Integrando segnali sulla disponibilità di Pi della pianta, LjPT4 è in grado di regolare lo sviluppo della pianta stessa, ad esempio modulando la ramificazione dell'apparato radicale (Javot, et al. 2007; Volpe, et al. 2016).

1.2.2 Dalla pianta al fungo

È stato recentemente scoperto che i funghi AM, oltre a consumare fino al 20% del carbonio fissato dalla pianta durante la fotosintesi fornendo in cambio H_2O e nutrienti, ricevono dall'ospite anche acidi grassi. Questo appare particolarmente sorprendente considerando l'enorme quantità di trigliceridi necessaria per supportare il metabolismo, la crescita e la sporulazione del micelio. È stato infatti osservato che i funghi AM possono sintetizzare acido palmitico (C16:0) solo nell'ifa intraradicale, mentre l'allungamento e la desaturazione degli acidi grassi può avvenire indipendentemente dall'ospite. Prova dell'auxotrofia dei funghi AM per gli acidi grassi è stata fornita da analisi del genoma di *R. irregularis* che testimonia l'assenza di geni che codificano per l'enzima FAS tipo I responsabile della sintesi di C16:0. È invece presente FAS tipo II, il cui ruolo però rimane ancora sconosciuto (Rich, et al. 2017).
La biosintesi dei lipidi è un processo fondamentale per lo sviluppo arbuscolare, come dimostrato analizzando mutanti di *Medicago truncatula* per i geni *FatM* e *REDUCED ARBUSCULAR MYCORRHIZA2 (RAM2)*. *FatM* permette la formazione nei plastidi di grandi quantità di acidi grassi C16:0, interrompendo l'allungamento della catena e rilasciando acidi grassi liberi che fungono da substrato per *RAM2*. *RAM2* codifica per GPAT (Glycerol 3-Phosphate Acyl Transferase). Si è visto che mutazioni in entrambi questi geni determinano ramificazione scorretta dell'arbuscolo. Il processo che porta alla formazione dell'arbuscolo richiede inoltre l'intervento di un complesso costituito da due trasportatori *STR* e *STR2* che, considerando la loro localizzazione a livello di membrana peri-arbuscolare, potrebbe essere coinvolto nel trasporto dei lipidi verso l'arbuscolo. L'attivazione di *RAM2* e *STR* è controllata dal fattore trascrizionale GRAS *REDUCED ARBUSCULAR MYCORRHIZA1* (*RAM1*). RAM1, FatM, RAM2 e STR/STR2 sembrano quindi formare un'unità operativa unica specifica per AM e coinvolta nella biosintesi dei lipidi e nel trasporto negli arbuscociti. Appaiono essere, infatti, assenti dal genoma di piante che hanno perso l'abilità di formare AM (Rich, et al. 2017; Keymer, et al. 2017).

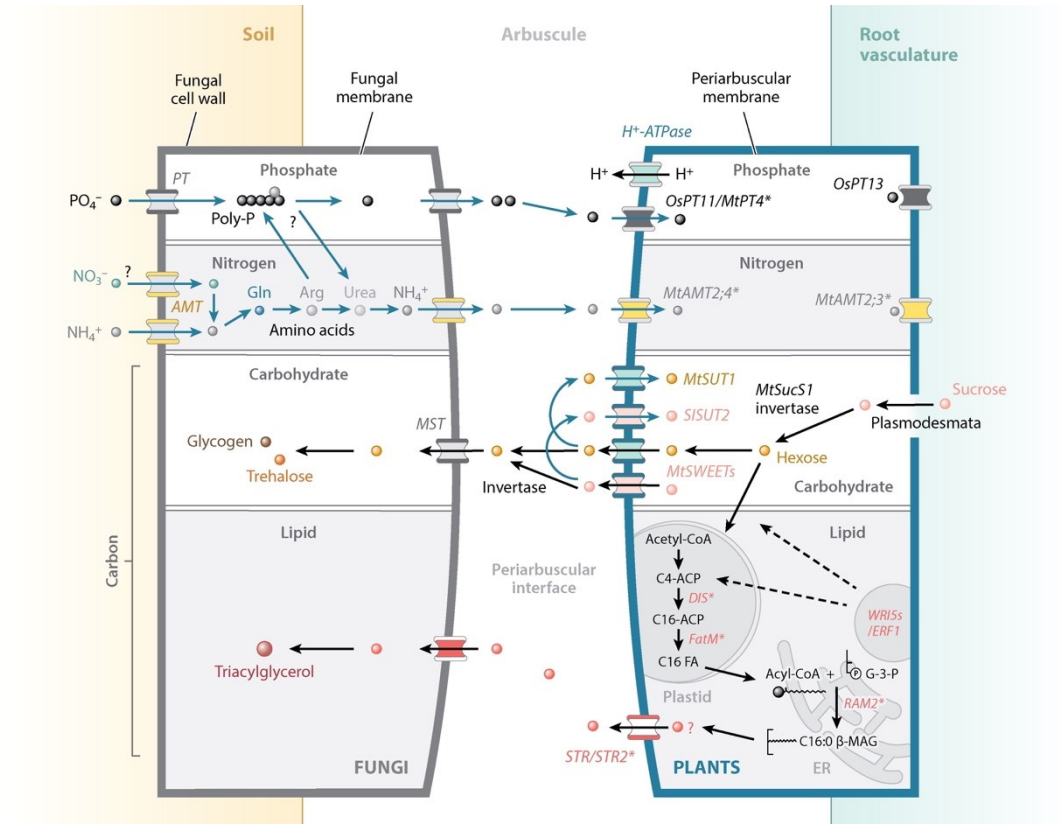


Figura 2. Rappresentazione schematica dello scambio di nutrienti che avviene tra i due partner simbiotici e dei geni coinvolti *(Choi, Summers e Paszkowski 2018)*.

1.3 Caratteristiche e funzioni dei geni *MILDEW LOCUS O* (*MLO*)

La co-evoluzione di piante e microrganismi nel corso di milioni di anni ha portato allo sviluppo di diverse strategie per garantire la sopravvivenza dell'ospite vegetale promuovendo da una parte le simbiosi benefiche e limitando dall'altra l'azione dei patogeni. Gli organismi patogeni mettono in atto a loro volta delle strategie per prevaricare sull'ospite, co-evolvendo con quest'ultimo il che determina un'elevata specializzazione per un unico o un numero limitato di ospiti. Si viene quindi a creare un delicato equilibrio che, se rotto, può portare a perdita di suscettibilità da parte dell'ospite, il che può rappresentare un problema in quanto, spesso, i geni S (di suscettibilità) ricoprono ruoli fisiologici per la pianta che, se vengono meno, possono portare ad una diminuzione della *fitness* della stessa. Grazie a specifici recettori chiamati PRR (*Pattern Recognition Receptors*), l'ospite è in grado di distinguere molecole patogene o PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) da molecole *self* o DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*). Il riconoscimento di molecole PAMPs/DAMPs determina una risposta immunitaria da parte dell'ospite. Questa risposta è data dai geni R (di resistenza), caratterizzati da elevata *evolvability* in quanto devono continuamente far fronte ai tentativi dei patogeni di prevaricare sulla loro risposta. Non tutti i patogeni, però, vengono soppressi o eliminati dalla pianta. In alcuni casi, gli

organismi biotrofi sono in grado di creare delle interazioni ospite-patogeno sfruttando la presenza dei geni S (di suscettibilità). Mutazioni nei geni R determinano un aumento della suscettibilità della pianta al patogeno, mentre mutazioni nei geni S ne incrementano la resistenza (van Schie e Takken 2014). Un esempio di fattore di suscettibilità è il gene *Mildew resistance locus O*, identificato per la prima volta in orzo (*Hordeum vulgare*) (Büschges, et al. 1997). Questo gene è necessario affinché *Blumeria graminis*, patogeno biotrofico, agente eziologico dell'oidio o 'mal bianco' (meglio noto con il termine inglese '*powdery mildew*'), che determina lo sviluppo di una patina biancastra sulla superficie fogliare, possa infettare l'ospite. Mutanti omozigoti per il gene *MLO*, resistenti quindi al patogeno, sono stati selezionati e vengono usati ormai da decenni in agricoltura. Nonostante sia stata individuata per la prima volta in *H. vulgare*, la resistenza contro il fungo patogeno, causata da una mutazione *loss-of-function* del gene *HvMLO*, non è limitata a questo cereale, ma è stata identificata anche in altre specie di piante monocotiledoni ed eudicotiledoni (Humphry, Consonni e Panstruga 2006). A seguito del clonaggio del gene effettuato nel 1997, si è visto che *MLO* codifica una proteina con sette eliche transmembrana ed un dominio C-terminale legante calmodulina (Büschges, et al. 1997). I domini transmembrana sono caratterizzati da un gruppo carbossilico terminale intracellulare ed un gruppo amminico terminale extracellulare, risultando in tre *loop* extracellulari (o luminali) e tre *loop* intracellulari (o citosolici). In orzo, il secondo e terzo *loop* citosolico sembrano essere particolarmente importanti da un punto di vista funzionale, in quanto rappresentano una regione di accumulo di mutazioni che porta alla perdita di funzione di *MLO*. L'inattivazione di questa proteina, causata da *knock-out* o *knock-down*, risulta quindi nella resistenza al patogeno (Zhu, et al. 2021). L'avanzamento nelle analisi filogenetiche ha permesso di ricondurre *MLO* ad una grande famiglia genica divisa in sette clade. Le proteine MLO che determinano il fenotipo di resistenza al fungo patogeno appartengono al clade IV e V (Acevedo-Garcia, Kusch e Panstruga 2014). Successivi studi hanno evidenziato un ruolo dei geni *MLO* in diversi processi biologici, tra cui la tigmomorfogenesi dell'apparato radicale, la fertilizzazione e la colonizzazione da parte del fungo AM *R. irregularis* (Fig. 3). Inoltre, si è visto che sussiste una stretta correlazione tra la funzione svolta dai geni MLO e il clade evolutivo di apparenza (Tian, et al. 2020).

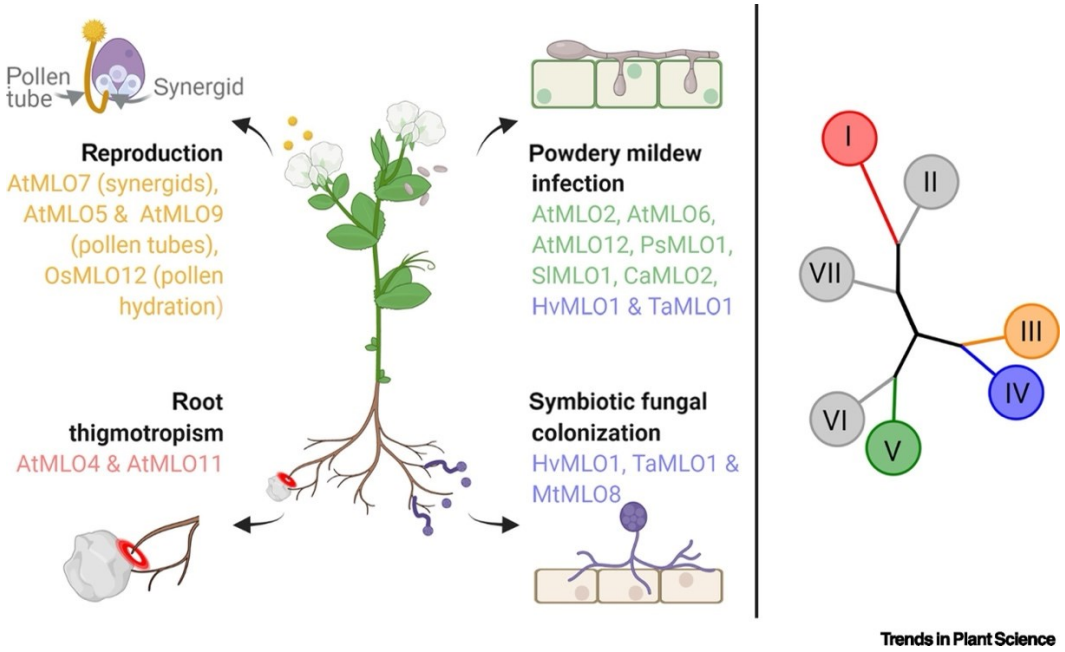


Figura 3. Rappresentazione delle varie funzioni svolte da MLO in molteplici processi che condividono come caratteristica comune la percezione di uno stimolo esterno. A destra, albero filogenetico che mostra i sette clade in cui è divisa la famiglia genica *MLO (Jacott, et al. 2021)*.

1.3.1 Le proteine MLO sono regolate dal calcio

Nonostante le proteine MLO svolgono funzioni molto differenti tra loro, una caratteristica che le accomuna consiste nella percezione delle variazioni di [Ca^{2+}] intracellulari e nella trasmissione del segnale derivato da questi influssi di Ca^{2+} ad altre proteine ed enzimi coinvolti negli specifici processi (Fig. 4) (Yang, et al. 2021; Jacott, et al. 2021). Gli ioni di calcio (Ca^{2+}), come secondo messaggero nelle piante, coordinano numerose risposte fisiologiche, biotiche ed abiotiche, legandosi a specifici sensori che decodificano la firma del Ca^{2+}e mettono in atto risposte cellulari differenti. Nelle piante ci sono quattro classi principali di sensori per Ca^{2+}: le proteine calmodulina (CaM) o CaM-*like* (CMLs), le proteine calcineurine B-like (CBLs), le proteine CBL che interagiscono con proteine chinasi (CIPKs) e le chinasi calcio-dipendenti (CPKs). È stato osservato che le proteine MLO sono caratterizzate all'estremità C-terminale da specifici domini conservati a cui si legano le CaM. Il ruolo delle proteine CaM consiste nel fungere da intermedio nella percezione di variazioni nei livelli intracellulari di Ca^{2+} e nel rilascio di segnali che comunichino tali variazioni ad enzimi sensibili al Ca^{2+}, canali ionici ed altre proteine. La perdita del legame alla CaM diminuisce l'abilità di MLO di regolare negativamente la difesa contro la *powdery mildew* (Kim, et al. 2002). Inoltre, il flusso di Ca^{2+} attraverso la membrana plasmatica rappresenta una comunicazione precoce durante la simbiosi, la risposta contro i patogeni e quella nei confronti di stimoli meccanici. Dunque, per questi motivi, l'attività e la funzione delle proteine MLO sembrano essere strettamente legate ai segnali Ca^{2+} (Jacott, et al. 2021).

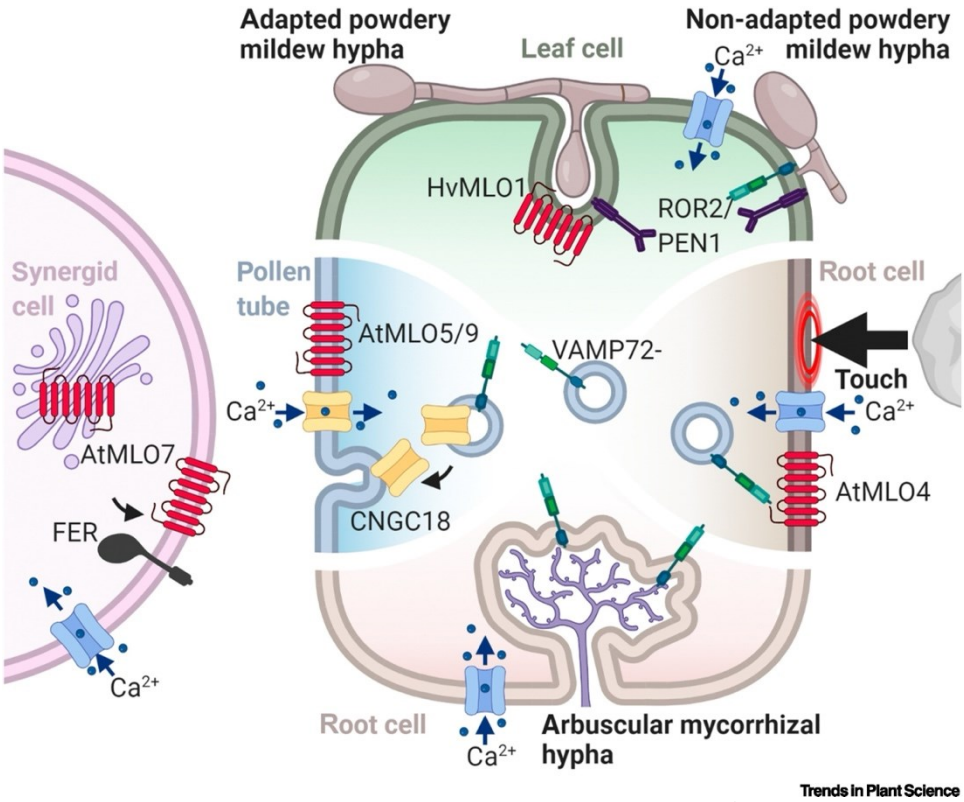


Figura 4. Rappresentazione schematica che illustra il ruolo dei flussi di Ca^{2+} attraverso la membrana plasmatica nei vari processi in cui sono coinvolte le proteine MLO *(Jacott, et al. 2021)*.

1.3.2 Ruolo dei geni MLO nella tigmomorfogenesi

Tra le varie funzioni svolte, MLO è coinvolto anche nella regolazione della crescita dell'apparato radicale (Cheng, et al. 2009). La radice è un organo estremamente flessibile e plastico, capace di adattarsi a condizioni mutevoli. La crescita direzionale della radice è modulata da diversi fattori, tra cui la gravità, la disponibilità di acqua e nutrienti e la presenza di barriere fisiche. Interpretando ed integrando diversi stimoli ambientali, la pianta può modificare la direzionalità (tropismo) ed i *pattern* (morfogenesi) di crescita della radice. Come la pianta sia in grado di percepire i diversi stimoli non è ancora interamente noto, mentre è stato appurato che la risposta a stimoli fisici prevede l'azione del Ca^{2+} come secondo messaggero, la produzione di specie reattive dell'ossigeno ed il cambiamento del pH citoplasmatico ed extracellulare. Sembra, inoltre, che la crescita della radice, inclusa la tigmomorfogenesi, sia modulata dai fitormoni auxina e acido jasmonico (Cheng, et al. 2009).

Sono stati identificati in *Arabidopsis thaliana* due mutanti della famiglia *MLO* (At1g11000 e At5g53760; clade I) che, in seguito a contatto con una barriera fisica, mostrano dei *pattern* di crescita della radice aberranti, caratterizzati da spiralizzazione. Questo fenotipo, oltre a non essere stato individuato in altri mutanti che determinano un'architettura anomala dell'apparato radicale, sembra essere indipendente dalla luce e da flavonoidi endogeni coinvolti nella regolazione dell'auxina, fitormone centrale nel coordinamento di molti processi di accrescimento della pianta, mentre appare sensibile alle condizioni di pH (a pH >

6.5 si ha la perdita della curvatura della radice tipica dei mutanti) e ai livelli esogeni di Ca^{2+} (concentrazioni di Ca^{2+} determinano *rescue* del fenotipo WT nel background genetico mutato) (Bidzinski, et al. 2014). Come visto in precedenza, le proteine MLO sono caratterizzate da un dominio C-terminale legante calmodulina (CaMBD) che sembrerebbe interagire con specifiche calmoduline (CaMs) o proteine *calmodulin-like* (CML). Questa famiglia proteica è coinvolta in vari processi, tra cui la regolazione dello sviluppo della pianta in seguito a cambiamenti ambientali, la crescita e la risposta a stress biotici ed abiotici. Analizzando i *pattern* di co-espressione dei geni *MLO* e *CaM/CML*, si è visto che sono espressi in vari tessuti ed in differenti fasi di sviluppo. Inoltre, è stato osservato che mutanti singoli *mlo4* (clade I) e *cml12* presentano fenotipo simile a quello di mutanti doppi per quanto riguarda la crescita delle radici (Zhu, et al. 2021). La presenza di proteine CLM risulta quindi fondamentale per la funzione di MLO. Si è visto che i mutanti presentano una risposta al gravitropismo accelerata (la curvatura dell'apice radicale avviene più rapidamente rispetto al WT). Dal momento che la risposta gravitropica è stata associata al contenuto di amido nella cuffia radicale, come atteso i mutanti presentano un numero di granuli di amido maggiore rispetto al WT. I risultati ottenuti indicherebbero, dunque, il coinvolgimento di proteine MLO appartenenti al clade I nella risposta gravitropica della radice, probabilmente tramite interazione con le proteine CaM/CML, regolando il contenuto di amido nella cuffia radicale (Zhu, et al. 2021).

1.3.3 Ruolo dei geni MLO nella fecondazione

Oltre che nella tigmomorfogenesi, i geni MLO sono coinvolti anche nel processo di fecondazione durante il quale a livello dello stigma, a partire da un granulo pollinico idratato, si sviluppa il tubetto pollinico, struttura che ha il compito di trasmettere il gamete maschile all'interno degli ovuli inseriti nell'ovario. Affinché la fecondazione possa avvenire con successo, gli organi riproduttivi femminili, compreso l'ovulo, emettono dei segnali molecolari (ad esempio, in *Arabidopsis*, vengono prodotti dei peptidi appartenenti alla famiglia delle defensine) per guidare la crescita del tubetto pollinico all'interno del sacco embrionale. Il meccanismo tramite cui il tubetto pollinico decodifica i segnali direzionali provenienti dall'ovario non è ancora completamente noto (Kessler, et al. 2010). In questo processo sembrano essere coinvolte le proteine MLO, responsabili del reclutamento dei canali calcio CNGC18 per modificare il gradiente di Ca^{2+} a livello dell'apice del tubetto pollinico in crescita. In particolare, è stato visto che in *Arabidopsis* i geni MLO1, MLO5 e MLO9 (At4g02600, At2g33670 e At1g42560; clade III), espressi nel polline e nel tubetto pollinico, sono coinvolti nella corretta percezione di questi segnali. Infatti, è stato osservato che il tubetto pollinico WT presenta, a livello dell'apice, un gradiente di Ca^{2+} necessario per il suo allungamento. Nel momento in cui il tubetto pollinico riceve uno stimolo direzionale, il segnale viene percepito e tradotto in un accumulo di proteine MLO5/9 che reclutano i canali per il Ca^{2+} CNGC18, permettendo di modulare la crescita nella direzione corretta. Nel caso dei mutanti *mlo5/9*, invece, il gradiente di Ca^{2+} nell'apice presenta un'estensione inferiore, causando una crescita

rallentata del tubetto pollinico. Inoltre, il tubetto pollinico non è in grado di decodificare il segnale proveniente dall'ovario e, poiché non vengono reclutati un numero insufficiente di canali CNGC18, non avviene la curvatura del tubetto pollinico nella direzione corretta. Riassumendo, il tubetto pollinico WT entra direttamente nel micropilo dell'ovulo, mentre nel caso dei mutanti *mlo* si è osservata una curvatura errata del tubetto pollinico all'avvicinarsi all'ovulo, risultando in fecondazione ritardata o aborto (Meng, et al. 2020).

1.3.4 Ruolo dei geni MLO nella simbiosi AM

Studi più recenti hanno dimostrato che i geni *MLO* svolgono un ruolo anche nella simbiosi AM (Hilbert, et al. 2020; Jacott, et al. 2020). Analizzando i livelli di espressione di *MLO* in orzo (*Hordeum vulgare*), frumento (*Triticum aestivum*) e *Medicago truncatula* e quantificando la presenza di arbuscoli e vescicole a tre *time-point* differenti (22, 29 e 36 giorni dopo l'inoculo con *R. irregularis*), è stato dimostrato che i mutanti sono caratterizzati da una riduzione nel numero di arbuscoli e vescicole in fase precoce della simbiosi. Dopo 36 giorni, infatti, i mutanti non mostrano differenze nella micorrizazione rispetto al WT. Questi risultati suggeriscono che lo sviluppo della micorrizazione è rallentato nei mutanti ma che, ad un certo punto, recupera raggiungendo i livelli del WT (Jacott, et al. 2020). In un altro studio svolto su orzo si è arrivati, invece, a risultati opposti osservando dopo sei settimane dall'inoculo con il fungo AM un incremento nella micorrizazione nel mutante *mlo-5* rispetto al WT. Nello specifico, risultano più elevati i valori di %F, %A e %a, mentre non sembrano esserci variazioni nell'intensità di micorrizazione (%M e %m). Non viene escluso, però, che a *time-point* precoci questa mutazione possa determinare un decremento nella colonizzazione, come visto nel lavoro di Jacott et al. (Hilbert, et al. 2020).

Nonostante le funzioni descritte fino ad ora per i geni MLO possano sembrare apparentemente distinte, tutte presentano come caratteristica comune la percezione di stimoli esterni, sia che siano tipologie cellulari differenti (come nel caso del tubetto pollinico e dell'ovario per la fecondazione), un organismo (partner simbiotico) oppure un oggetto fisico (superfici solide nel caso del tigmomorfismo) (Jacott, et al. 2021). Ad oggi, resta comunque ignota la funzione biologica delle proteine MLO.

1.3.5 Evoluzione e filogenesi dei geni *MLO*

Nonostante ad oggi ci sia ancora molto da scoprire sulla storia evolutiva delle proteine MLO, grazie ad analisi filogenetiche è possibile far risalire l'origine di questa famiglia genica alle prime fasi evolutive dello sviluppo delle piante terrestri (circa 400-450 milioni di anni). Questo implica che le proteine MLO presentano una funzione estremamente antica, conservata fino ai giorni nostri in quanto vitale o comunque di grande importanza per l'organismo (Devoto, et al. 2003). Durante il corso dell'evoluzione, la famiglia proteica ha formato diverse sottofamiglie, riconoscibili grazie ad analisi filogenetiche e distinguibili in sette clade differenti.

Questa categorizzazione è stata criticata da alcuni studi che affermano l'esistenza di quattro, sei o addirittura otto clade differenti (Feechan, et al. 2008; Deshmukh, et al. 2014; Pessina, et al. 2014).

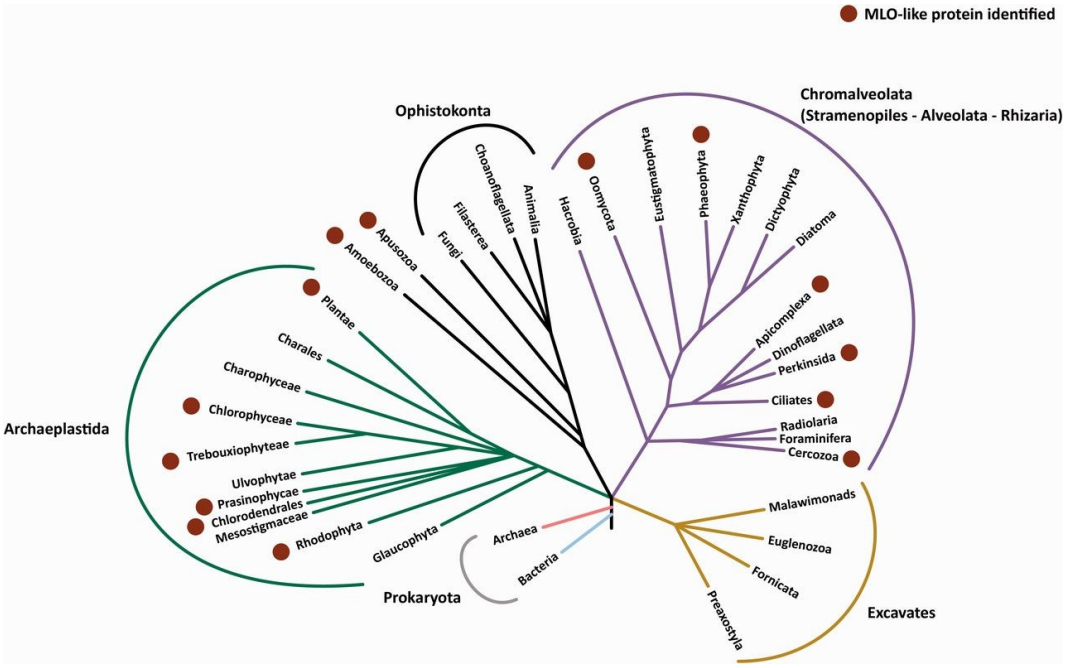


Figura 5. Lo schema mostra un albero filogenetico semplificato in cui vengono indicati i vari regni ed i corrispondenti clade principali. I pallini rossi indicano che almeno una proteina MLO-*like* è stata identificata per il rispettivo clade *(Kusch, Pesch e Panstruga 2016)*

Il clade I sembra essere il più antico (viene fatto risalire a 490 milioni di anni fa, periodo in cui sono comparse le prime piante terrestri). Per quanto concerne le funzioni svolte, le proteine del clade I sarebbero coinvolte nei processi di regolazione della crescita radicale. Inoltre, dal momento che tutte le proteine MLO di *Selaginella* e *Physcomitrella* (appartenenti al phylum delle *Bryophyta*, piante non vascolari; *Physcomitrella* è un muschio privo di un vero e proprio apparato radicale) sono state fatte risalire al clade I, si può pensare al coinvolgimento di queste proteine anche in processi non meglio definiti che coinvolgono la fisiologia di muschi e piante non producenti semi. Successivamente, si sarebbero differenziati i clade II e IV, presenti nelle gimnosperme. Queste proteine potrebbero essere coinvolte nel processo di evoluzione del seme, innovazione evolutiva associata alle gimnosperme. In realtà, la presenza di proteine MLO del clade II e/o IV nelle felci (organismi che si riproducono attraverso la sporulazione e non producono quindi semi) sembrerebbe opporsi alla funzione precedentemente delineata. I clade III, V e VI si sarebbero evoluti nelle fasi precoci dello sviluppo delle angiosperme (*Amborella trichopoda*, angiosperma basale considerata il *sister group* di monocotilegoni ed eudicotiledoni, presenta *MLO* appartenenti ai clade I-VI). Questo suggerisce che gli *MLO* appartenenti a questi clade siano coinvolti nell'evoluzione delle piante da fiore. Gli *MLO* del clade III sono coinvolti nell'idratazione del granulo pollinico e nella crescita del tubetto pollinico. La funzione delle proteine del clade IV sembra almeno parzialmente sovrapporsi

con quella del clade V (comprende geni coinvolti nella suscettibilità/resistenza al *powdery mildew*). Il clade VII è stato identificato solo nelle eudicotiledoni. Gli *MLO* di questo clade potrebbero essere quindi coinvolti in processi fisiologici esclusivi delle eudicotiledoni anche se non è ancora stato identificato nessun fenotipo mutante o funzione ad essi associata (Devoto, et al. 2003; Kusch, Pesch e Panstruga 2016). Grazie ad estese ricerche con BLASTP contro proteomi di diverse specie di alghe, funghi, eucarioti unicellulari ed animali, è stato possibile scoprire la presenza di proteine MLO-*like* in specie di *Chlorophyta* (alghe verdi), il che testimonia l'esistenza di un progenitore di *MLO* nell'antenato comune di alghe verdi e piante terrestri. Nessuna proteina MLO-*like* è stata, invece, identificata in batteri, archea, funghi e metazoa. Analogamente alle proteine MLO delle piante terrestri, anche quelle delle piante non-terrestri sono generalmente caratterizzate da 6-8 domini transmembrana (anche se numerose proteine deviano da questa topologia). Inoltre, la similarità nella sequenza tra proteine MLO di specie vegetali terrestri e non terrestri risulta essere largamente variabile. In generale, sembrerebbe che i domini transmembrana TM1 e TM3 rappresentino un elemento condiviso tra le sequenze *MLO* delle varie linee e potrebbero indicare un elemento centrale da cui tutte le proteine MLO si sono evolute (Kusch, Pesch e Panstruga 2016).

1.4 *Lotus japonicus* come organismo modello

Le Leguminosae sono seconde solo alle Gramineae per quanto riguarda la loro importanza come fonte alimentare per l'uomo, mangime per gli animali e materiale grezzo per l'industria. Globalmente, circa un terzo delle coltivazioni sono dedicate ai legumi, grande e variegata famiglia che comprende circa 700 generi e 20.000 specie. Oltre ad essere un'importante fonte di nutrienti, i legumi svolgono ruoli benefici quali, ad esempio, la produzione di un vasto numero di metaboliti secondari, tra cui gli isoflavonoidi. Inoltre, vengono considerati specie 'pioniere' grazie alla loro capacità di sopravvivere in terreni poveri di nutrienti instaurando relazioni simbiotiche con i batteri del suolo fissatori di azoto ed i funghi AM. Nonostante ciò, negli ultimi decenni si sta assistendo ad una diminuzione nella resa dei legumi rispetto a quella dei cereali. Questo è dovuto a numerosi fattori, tra cui stress biotici ed abiotici (salinità, carenza d'acqua, acidità del terreno e penuria di nutrienti), oltre alla diffusione di malattie. Produrre piante in grado di resistere a queste condizioni avverse risulta quindi di primaria importanza. *Lotus japonicus* e *Medicago truncatula* sono stati scelti come organismo modello grazie ad alcune loro caratteristiche (genoma dalle dimensioni ridotte, ciclo vitale breve e disponibilità di protocolli per la trasformazione con *A. rhizogenes*) ed a causa delle numerose limitazioni che presentano molte specie commerciali (genomi di dimensioni troppo elevate, difficoltà di trasformazione, produzione di semi in basso numero, tempi di generazione troppo lunghi) (Udvardi , et al. 2005).
L. japonicus (Gifu progenie B-129) è stato identificato per la prima volta come pianta modello grazie ad uno studio effettuato presso l'università di Aarhus, Danimarca (Kurt Handberg 1992).

Il genere *Lotus*, comprendente oltre 200 diverse specie, appartiene alla famiglia delle Fabaceae. *L. japonicus* è una pianta perenne dalle dimensioni ridotte, contraddistinta da fioritura abbondante. È una specie diploide (*n* = 6), autofertile, caratterizzata da un genoma con architettura relativamente semplice e di dimensioni ridotte (472 Mbp). Produce baccelli cilindrici, lunghi circa 3 cm e contenenti fino a venti semi (i semi maturi pesano approssimativamente 1-1.2 mg). Durante le settimane successive alla germinazione, la pianta tende a crescere lentamente mentre, una volta raggiunta la maturità, è caratterizzata da crescita più rapida fino a formare un cespuglio con numerosi rami lunghi fino a 30 cm. Il tempo di generazione è di circa tre mesi. È una specie in grado di crescere in varie condizioni ambientali (le condizioni migliori prevedono una temperatura tra 18-22°C ed umidità al 70%). Risulta sensibile a quantità eccessive d'acqua e viene preferito l'innaffiamento dal basso piuttosto che dall'alto direttamente sulla pianta (Udvardi, et al. 2005; Pajuelo e Stougaard, 2005) Sono disponibili collezioni mutanti Lotus Retrotransposon Element 1 (*LORE1*) derivate dall'inserzione nel genoma di elementi endogeni Long-Terminal Repeat (LRT), retrotrasposoni tipicamente presenti in numero basso di copie e inseriti prevalentemente in corrispondenza di regioni geniche (Małolepszy, et al. 2016).

Crescita	Capacità di sopravvivere in diverse condizioni ambientali
	Tempi di generazione brevi (3-4 mesi)
	Pianta primaria di dimensioni ridotte; sviluppo di ramificazioni secondarie del fusto
	Perenne
	Baccelli longitudinali
	Infiorescenze indefinite (indeterminate o aperte)
	Semi di dimensione ridotta (peso di 1.000 semi = circa 1.2 grammi)
Propagazione	Auto-fertilità
	Infiorescenze abbondanti
	Elevata produzione di semi (fino a 20 semi per baccello; 6.000 semi per pianta)
	Semplice impollinazione manuale
Caratteristiche del genoma	Dimensioni ridotte (472 Mbp)
	Diploide (2n = 12)
Trasformazione genetica	Possibilità di trasformazione con *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*

Tabella 1 Riassunto delle principali caratteristiche di *L. japonicus* come pianta modello.

1.4.1 Geni MLO in *L. japonicus*

Come visto in precedenza, le proteine MLO sono caratterizzate da sette domini transmembrana (TM) ed un dominio C-terminale legante calmodulina (CaMBD). Analizzando il genoma di *L. japonicus*, sono state identificate 15 proteine MLO

differenti appartenenti a diversi clade, fatta eccezione per il clade VI. Studi precedenti hanno dimostrato che durante il processo di simbiosi si verifica una sovraespressione di geni (tra cui anche *MLO*) coinvolti in modo diretto o indiretto nell'accomodazione fungina e quindi nella riorganizzazione cellulare. Per confermare il profilo di espressione genica, è stata eseguita una RT-PCR su microdissezioni laser di cellule arbuscolate (Guether, et al. 2009). Il mio lavoro di tesi si è focalizzato sul ruolo svolto dalla proteina MLO4 (clade IV; ID gene: LotjaGi1g1v0568000) nella simbiosi AM. Analizzando il livello di espressione genico, è stato deciso di prendere in considerazione anche i geni MLO2B (clade II; ID gene: LotjaGi3g1v0260400), MLO3A (clade III; ID gene LotjaGi2g1v0353500) e MLO5C (clade V; ID gene LotjaGi2g1v0362100). Inoltre, per studiare la risposta al gravitropismo sono stati utilizzati mutanti per il gene MLO1A (clade I; ID gene LotjaGi6g1v0362200).

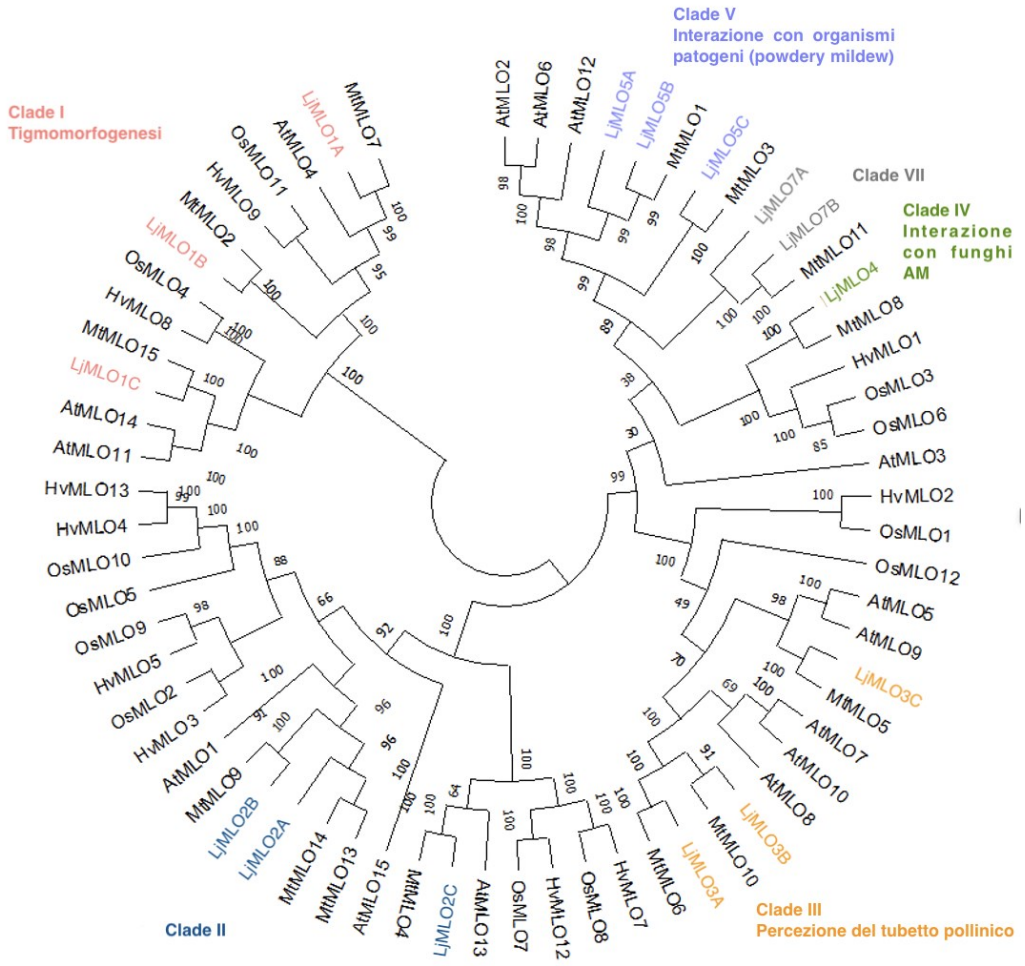


Figura 6. Albero filogenetico raffigurante i differenti geni MLO in *Medicago truncatula*, *Arabidopsis thaliana*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa* e *Lotus japonicus* (scritti in colori differenti in base al clade di appartenenza). L'albero è stato ottenuto con MegaX utilizzando come metodo di inferenza la *maximum likelihood*. I numeri in corrispondenza dei nodi dei rami indicano i valori di Bootstrap assegnati.

1.5 Scopo della tesi

Lo scopo di questo lavoro di tesi consiste nella caratterizzazione del ruolo svolto dai geni *MLO* nella simbiosi AM in *L. japonicus*. A questo scopo, sono state analizzate tre diverse linee di mutanti inserzionali *LORE1* (*mlo4-1*, *mlo4-2*, *mlo4-3*) per le loro caratteristiche fenotipiche ed è stata investigata la possibile funzione di MLO4. Per fare ciò, oltre a quantificare il livello di micorrizazione, è stata analizzata l'estensione e la massa dell'apparato radicale a diversi stadi di sviluppo dopo l'inoculo con il fungo. Con lo scopo di valutare l'attività del promotore di *MLO4* sono stati effettuati dei saggi con il gene reporter *GUS* con vettori ottenuti tramite metodo di clonaggio GreenGate. Infine, per localizzare la proteina MLO4 a livello subcellulare sono stati utilizzati come sistema eterologo protoplasti di *Arabidopsis thaliana*.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Linee cellulari e terreni di coltura

Per la trasformazione batterica sono state usate cellule di *Escherichia coli* DH5α oppure di *Agrobacterium rhizogenes* AR1193.
Le cellule di *Escherichia coli* DH5α, rese chimicamente competenti con $RbCl_2$, vengono conservate a -80°C in aliquote da 50 µl. Dopo averle fatte scongelare in ghiaccio, vengono aggiunti 7 µl di digestione-ligazione per singola aliquota di cellule competenti. Dopo 20 minuti, vengono sottoposte a shock termico (1 minuto a 42°C) e rimesse in ghiaccio per 2 minuti. Dopo aver aggiunto 500 µl di LB liquido, le cellule vengono incubate a 37°C, 200 rpm per un'ora per permettere alle cellule di esprimere la resistenza all'antibiotico. A seguito della trasformazione, vengono piastrati 400 µl di soluzione LB liquido + cellule batteriche in piastre Petri contenenti 25 ml di terreno LB con aggiunta di Agar 1% (10 g NaCl, 10 g triptone, 5 g estratto di lievito; pH aggiustato a 7 con NaOH) addizionato con antibiotici (ampicillina 500µg/ml; kanamicina 500µg/ml), in base al plasmide ospite. Infine, le piastre vengono incubate a 37°C *overnight*.
Le cellule di *Agrobacterium rhizogenes* AR1193, rese chimicamente competenti con $CaCl_2$, vengono conservate a -80°C in aliquote da 100 µl. Dopo averle fatte scongelare in ghiaccio, viene aggiunto 1 µg del plasmide di interesse e vengono messe in azoto liquido per 5 minuti (tecnica del Freeze&Thaw). Dopo 10 minuti a temperatura ambiente, viene aggiunto 1 ml di terreno liquido LB senza antibiotico. Le cellule vengono poi messe a 28°C, 150-200 rpm per due ore. Dopo il periodo di incubazione, i batteri vengono centrifugati (4000 rpm per 5 minuti), risospesi nel volume desiderato e fatte crescere in piastre Petri contenenti terreno LB con aggiunta di Agar 1% addizionato con rifampicina 50 µl, kanamicina 50 µl ed ampicillina 100 µl. Le piastre sono poi state incubate al buio a 28°C per tre giorni per permettere la crescita batterica.

2.2 Materiale vegetale e condizioni di crescita

Si è fatto uso di piante *wild-type* (WT) 'Gifu' di *Lotus japonicus* e di tre linee mutanti *LORE1* per il gene *MLO4*: *mlo4-1* (30015501), *mlo4-2* (30010345) e *mlo4-3* (30107425) in cui, rispettivamente, l'inserzione era avvenuta in corrispondenza del primo, del quattordicesimo e del settimo esone.

2.2.1 Sterilizzazione e germinazione dei semi di Lotus japonicus

Per la sterilizzazione, sono stati selezionati un numero variabile di semi in base al *set-up* sperimentale previsto, posti in un mortaio e scarificati tramite carta abrasiva. Successivamente, sono stati inseriti in un tubo da 2 ml e, in sterilità, sono stati aggiunti 2 ml di NaClO 0.5%. Dopo 11 minuti, è stato eliminato NaClO 0.5% e sono stati eseguiti due lavaggi con ddH_2O sterile. I semi sono stati lasciati in acqua

per alcuni minuti. Dopo aver assorbito una sufficiente quantità di acqua, apparendo visibilmente più grandi, sono stati trasferiti in piastre Petri con H_2O e Plant Agar 1%. Le piastre sono state poi coperte con carta stagnola e poste in camera di crescita (condizioni di crescita: luce per 16 ore, buio per 8 ore; temperatura 23°C, umidità 50%) per tre giorni in modo da consentirne la germinazione. Infine, le plantule sono state trasferite in piastre quadrate con ½ B5 e Plant Agar 0.8%, pH 5.5.
A seguito della sterilizzazione, per permetterne la germinazione, i semi sono stati collocati in numero di 50-60 in piastre Petri con H_2O e Plant Agar 1%. Dopo tre giorni al buio, i semi germinati sono stati trasferiti in piastre quadrate con ½ B5 (Duchefa) e Plant Agar 0.8%, pH 5.5. Nel caso di piante le cui radici sono state trasformate con *Agrobacterium rhizogenes*, al fine di evitare una crescita eccessiva delle cellule batteriche, dopo ulteriori tre giorni si è provveduto al loro trasferimento in piastre quadrate ½ B5 e Plant Agar 0.8% addizionate con Cefotaxime 300µg/ml.
Per il test di micorrizazione, dopo 15 giorni di crescita in piastre quadrate con ½ B5 e Plant Agar 0.8%, le piante, trasferite in vasi riempiti con sabbia del fiume Piave, precedentemente lavata con ddH_2O ed autoclavata. Nei giorni successivi, sono state periodicamente annaffiate con terreno liquido Long Ashton a bassa concentrazione di fosfato (20 µM) per favorire l'instaurarsi della simbiosi AM (per preparare 1 L di terreno: 2.5 ml di $Ca(NO_3)_2$ x $4H_2O$, 2.5 ml di KNO_3, 2.5 ml di $MgSO_4$ x $7H_2O$, 2.5 ml di Fe-EDTA (acido etilendiamminotetraacetico), 66 µl KH_2PO_4, 2.3 ml di KCl e 7 ml di microelementi).

2.3 Tabella 1: Lista di primer

Primer comuni usati per il clonaggio GreenGate		
M13_F	GTCACGACGTTGTAAACG	
LacP_F	TTTACACTTTATGCTTCCGG	
T7_F	TAATACGACTCACTATAGGG	
Primer usati per amplificare la sequenza codificante *MLO4*		
C98	MLO4_moduloA_F	AACAGGTCTCAGGCTCCATGGCAGGACCAGCTCTT
C99	MLO4_moduloA_R	AACAGGTCTCAAACTTCCTGACTTTAATGAATTCATGATTCATTAAC
C100	MLO4_moduloB_F	AACAGGTCTCAAGTTTCAACCGTTTGACCTTAATCC
C101	MLO4_moduloB_R	AACAGGTCTCACTGAAGGCTTGTCAAATGAAAAATCG
Primer usati per mutazioni del promotore di *MLO4*		
C155	ModuloA_F	AACAGGTCTCAACCTGTCAAACCGCGCCTAACATTT
C156	ModuloA_R	AACAGGTCTCATGTTTTTACAAGTTAATTTATTGTTTTAGAATTTTTCTTAAACA
C157	ModuloB_ΔAW box _F	AACAGGTCTCAAACATTATATTAATTAATCAATTATGTCTTGT

C158	ModuloB_ΔAW box R	AACAGGTCTCAAGCCGTTAATTTTGCTCTCAGCTT
C159	ModuloB_ΔAW box_ΔP1BS	AACAGGTCTCAAACAGCATATGCTTATATTAATTAATC AATTATG
C160	ModuloA_+AWb ox_R	AACAGGTCTCATGTTCGGCCTATGCAAGGTTTACAAG
Primer per RT-PCR		
	qPCR_Ubi_F	GATTCATATCCTGTTACTT
	qPCR_Ubi_R	TAACCTCCTCCTATCATCT
	qPCR_PT4_F	ATTACAGCAACTTGTGTTAG
	qPCR_PT4_R	CTTGAACGATGTCGATTTAG

2.4 Tabella 2: Lista di plasmidi

Green Gate	
GG108	Vettore di destinazione pGGsun-GA, contenente una cassetta di selezione *ccdB* fiancheggiata da siti di riconoscimento per *BsaI*. Gene per la resistenza alla kanamicina.
GG7	Modulo B del clonaggio Green Gate. Vettore di clonaggio contenente *mcherry-linker*. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG9	Modulo B del clonaggio Green Gate; B-Dummy. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG20	Modulo C del clonaggio Green Gate. Vettore di clonaggio contenente il gene *gus* (1814 bp). Vettore *backbone* pUC19. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG21	Modulo D del clonaggio Green Gate. Vettore di clonaggio contenente linker-GFP. Vettore *backbone* pUC19. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG22	Modulo D del clonaggio Green Gate; D-Dummy. Vettore *backbone* pUC19. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG29	Modulo E del clonaggio Green Gate. Vettore di clonaggio contenente terminatore UBQ10. Vettore *backbone* pUC19. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG35	Modulo F del clonaggio Green Gate. Vettore di clonaggio contenente terminatore cassetta di resistenza alla kanamicina. Vettore *backbone* pUC19. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG43	*Empty entry vector* utilizzato per creare i moduli del promotore per il sistema di clonaggio Green Gate. Contiene una cassetta di selezione *ccdB*.
GG44	*Empty entry vector* utilizzato per creare i moduli tag N-terminali per il sistema di clonaggio Green Gate. Contiene una cassetta di selezione *ccdB*.
GG45	*Empty entry vector* utilizzato per creare i moduli delle sequenze codificanti (CDS) per il sistema di clonaggio Green Gate. Contiene una cassetta di selezione *ccdB*.

GG46	*Empty entry vector* utilizzato per creare i moduli tag C-terminali per il sistema di clonaggio Green Gate. Contiene una cassetta di selezione *ccdB*.
GG47	*Empty entry vector* utilizzato per creare i moduli terminatori per il sistema di clonaggio Green Gate. Contiene una cassetta di selezione *ccdB*.
GG48	*Empty entry vector* utilizzato per creare i moduli delle cassette di resistenza per il sistema di clonaggio Green Gate. Contiene una cassetta di selezione *ccdB*.
GG59	*Entry vector* contenente il promotore di *Lotus japonicus* pLjUBI. Vettore *backbone* GG43. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG60	Vettore di espressione contenente *yellow fluorescent protein* (YFP) fusa ad *equorina* nucleare (NLS-YFP) ed a *mCherry*, sotto il controllo di pLjUBI. Vettore *backbone* GG108. Prodotto mediante taglio e ligazione dei siti BsaI. Gene per la resistenza alla kanamicina.
GG62	Vettore di espressione contenente *yellow fluorescent protein* (YFP) fusa ad *equorina* citosolica (CYA) ed a *mCherry*, sotto il controllo di pLjUBI. Vettore *backbone* GG108. Prodotto mediante taglio e ligazione dei siti BsaI. Gene per la resistenza alla kanamicina.
GG69	*Entry vector* contenente la cassetta tUBI-GFP. Vettore *backbone* GG48. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG75	Vettore di espressione contenente tripla GFP nucleare fusa a *mCherry*, sotto il controllo di pLjUBI. Vettore *backbone* GG108. Prodotto mediante taglio e ligazione dei siti BsaI. Gene per la resistenza alla kanamicina.
GG77	*Entry vector* contenente la cassetta di resistenza costituita da tUBI e tripla GFP nucleare. Vettore *backbone* GG48. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG78	*Entry vector* contenente la cassetta di resistenza costituita da tUBI e tripla *mCherry* nucleare. Vettore *backbone* GG48. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG83	*Entry vector* contenente il promotore di LjMLO4 (circa 1900 bp). Vettore *backbone* GG43. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG84	*Entry vector* contenente il promotore di LjMLO5C (circa 500 bp). Vettore *backbone* GG43. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG85	*Entry vector* contenente il promotore di LjMLO2B (circa 2500 bp). Vettore *backbone* GG43. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG86	*Entry vector* contenente il promotore di LjMLO2B (circa 5000 bp). Vettore *backbone* GG43. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG87	*Entry vector* contenente il promotore di LjMLO3A (circa 1500 bp). Vettore *backbone* GG43. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG88	Vettore di espressione contenente il gene *gus* sotto il controllo di p*MLO4* (e*ntry vector* GG83). Vettore *backbone* GG108. Gene per la resistenza alla kanamicina.

GG89	Vettore di espressione contenente il gene *gus* sotto il controllo di p*MLO5C* (e*ntry vector* GG84). Vettore *backbone* GG108. Gene per la resistenza alla kanamicina.
GG90	Vettore di espressione contenente il gene *gus* sotto il controllo di p*MLO2B* (e*ntry vector* GG86). Vettore *backbone* GG108. Gene per la resistenza alla kanamicina.
GG91	Vettore di espressione contenente il gene *gus* sotto il controllo di p*MLO3A* (e*ntry vector* GG87). Vettore *backbone* GG108. Gene per la resistenza alla kanamicina.
GG94	*Entry vector* contenente la sequenza genomica di LjMLO4. Vettore *backbone* GG45. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG124	Vettore di espressione contenente il gene *mlo4* fuso a *mCherry* (N-terminale) sotto il controllo di p*LjUBI*. Vettore *backbone* GG108. Prodotto mediante taglio e ligazione dei siti BsaI. Gene per la resistenza alla kanamicina.
GG125	Vettore di espressione contenente il gene *mlo4* fuso a GFP (C-terminale) sotto il controllo di p*LjUBI*. Vettore *backbone* GG108. Prodotto ottenuto mediante taglio e ligazione dei siti BsaI. Gene per la resistenza alla kanamicina.
GG142	Vettore di espressione contenente il gene *gus* sotto il controllo di p*MLO4*_ΔAWbox_ΔP1BS. Vettore *backbone* GG108. Prodotto ottenuto mediante taglio e ligazione dei siti BsaI; fusione di GG148 e GG146 come moduli A e B nel protocollo di clonaggio Green Gate. Gene per la resistenza alla kanamicina.
GG143	Vettore di espressione contenente il gene *gus* sotto il controllo di p*MLO4*_ΔP1BS. Vettore *backbone* GG108. Prodotto ottenuto mediante taglio e ligazione dei siti BsaI; fusione di GG147 e GG146 come moduli A e B nel protocollo di clonaggio Green Gate. Gene per la resistenza alla kanamicina.
GG144	Vettore di espressione contenente il gene *gus* sotto il controllo di p*MLO4*_ΔAWbox. Vettore *backbone* GG108. Prodotto ottenuto mediante taglio e ligazione dei siti BsaI; fusione di GG147 e GG145 come moduli A e B nel protocollo di clonaggio Green Gate. Gene per la resistenza alla kanamicina.
GG145	*Entry vector* contenente p*MLO4*_ΔAWbox (modulo B; dalla posizione -1 alla posizione -224) Vettore *backbone* GG44. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG146	*Entry vector* contenente p*MLO4*_ΔAWbox_ΔP1BS (modulo B; dalla posizione -1 alla posizione -208) Vettore *backbone* GG44. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG147	*Entry vector* contenente p*MLO4*_ΔAWbox (modulo A; dalla posizione -2000 alla posizione -208) Vettore *backbone* GG43. Gene per la resistenza all'ampicillina.

GG148	*Entry vector* contenente p*MLO4* (modulo A; dalla posizione -2000 alla posizione -208) Vettore *backbone* GG43. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG165	Vettore di espressione contenente il gene *mlo4* sotto il controllo di pLjUBI. Linker GFP usato come modulo D. GG78 usato come modulo F (marker di trasformazione). Vettore *backbone* GG108. Prodotto ottenuto mediante taglio e ligazione dei siti BsaI. Gene per la resistenza alla kanamicina.

2.5 Analisi *in silico*

Il software Benchling.com è stato usato per disegnare i primer e pianificare le procedure di clonaggio e restrizione enzimatica, per manipolare le sequenze di DNA *in silico*, per analizzare i risultati dei sequenziamenti e per effettuare allineamenti.
Primer-BLAST è stato utilizzato per identificare specifici primer per le sequenze di DNA di interesse da amplificare.
Lotus Base (https://lotus.au.dk, (Mun, et al. 2016)) è stato utilizzato per ottenere le sequenze nucleotidiche dal genoma di *L. japonicus* ecotipo Gifu.

2.6 Amplificazione del DNA tramite PCR

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è stata utilizzata per amplificare sequenze di DNA di interesse di *L. japonicus* Gifu con la Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (BioLabs): 1 µl di 5X Q5 Reaction Buffer, 0.5 µl di primer forward 10mM, 0.5 µl di primer reverse 10mM, 1 µl di templato di DNA, 0.05 µl di Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, ddH_2O fino a 10 µl. La reazione di PCR è stata eseguita in termociclatore: 30" a 98°C, (10" a 98°C, 20" a 50-72°C, estensione a 72°C) x 35 cicli, 2' a 72°C. La temperatura di annealing dipende dalla coppia di primer utilizzata, mentre il tempo di estensione dipende dalla lunghezza dell'amplicone, considerando che il tempo raccomandato è di 20-30 secondi/kb.
Inoltre, la PCR è stata utilizzata come test diagnostico per accertarsi della presenza del corretto plasmide nelle colonie batteriche in seguito a trasformazione con i costrutti GreenGate. A questo scopo, ogni reazione conteneva: 1 µl di colonia batterica risospesa in 9 µl di H_2O come templato, 0.4 µl di primer forward 10µM, 0.4 µl di primer reverse 10µM, 0.4 µl di dNTPs 10mM, 0.05 µl di PCR Bio Classic Taq, 1 µl di 10x PCR Bio Classic Buffer + 30 mM MgCl, 6.75 µl di H_2O. La reazione di PCR è stata eseguita in termociclatore: 30" a 98°C, (10" a 98°C, 30" a 50-72°C, estensione a 72°C) x 35 cicli, 2' a 72°C, *hold* a 4-10°C. La temperatura di annealing dipende dalla coppia di primer utilizzata, mentre il tempo di estensione dipende dalla lunghezza dell'amplicone, considerando che il tempo raccomandato è di 20-30 secondi/kb.

2.7 Elettroforesi su gel di agarosio

Per separare frammenti di DNA di lunghezza differente in seguito a PCR e digestione enzimatica, i campioni di interesse sono stati fatti correre su gel 1% agarosio disciolto in TAE 1x (40 mM Tris, 20 mM acido acetico e 1 mM EDTA), con 4 µl di Midori Green Advance DNA Stain. I campioni sono stati mescolati con 6x Purple Gel Loading Dye e fatti correre per 20' a 110 V. Sono stati caricati come ladder 3 µl di Quick-Load® Purple 1 kb (New BioLabs) 1:10. Il gel di agarosio è stato poi visualizzato tramite luce UV e l'immagine è stata analizzata mediante Quantity One 1-D Analysis Software (BioRad).

2.8 Purificazione dei prodotti di PCR

La purificazione è stata effettuata direttamente dai prodotti di PCR tramite DNA Clean & Concentrator (Zymo Research): 100 µl di campione, 500 µl di DNA Binding Buffer, eluizione finale in 12 µl di H_2O.
Alternativamente, in seguito alla corsa su gel elettroforetico, dopo aver verificato la corretta lunghezza, gli ampliconi sono stati purificati tramite Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) ed eluiti in 15 µl di H_2O.

2.9 Sistema di clonaggio Green Gate

Il sistema di clonaggio Green Gate rappresenta un adattamento del metodo Golden Gate che permette la produzione di cassette di espressione a partire da singoli moduli considerati come *building blocks*, in modo rapido ed efficiente, anche per le piante (Lampropoulos, et al. 2013).
Il sistema Green Gate si basa sull'assemblaggio di sei differenti *entry vectors* pUC19, contenenti gli elementi di interesse all'interno di un *destination vector*. Le forbici in magenta rappresentano i siti di taglio riconosciuti da *Bsa*I. I sei differenti moduli si inseriscono nel *destination vector* tra il *left border* (LB) ed il *right border* (RB). Questi sei moduli comprendono un promotore, un N-tag terminale, una sequenza codificante (quindi il gene di interesse), un C-tag terminale, un terminatore ed una cassetta di resistenza che permette di selezionare le piante trasformate. L'ordine di inserimento dei moduli all'interno del *destination vector* è predefinito e non è possibile cambiarlo poiché è determinato dalla presenza di sette diverse *overhangs*. Ogni modulo presenta, infatti, una coda protrudente al 5' che è complementare alla coda protrudente al 3' del modulo precedente. Le singole *overhangs* differiscono tra loro per almeno due dei quattro nucleotidi che le compongono. La differenza è dovuta al fatto che il taglio viene effettuato sempre dall'enzima *Bsa*I la cui sequenza di riconoscimento è sempre la medesima, mentre il sito di taglio è posto a valle rispetto a quello di riconoscimento ed è indipendente dalla sequenza nucleotidica (Fig. 7).
Per creare gli *entry vector*: 300 ng dell'inserto di interesse, 1 µl di T4 DNA Ligase Buffer 10X (NEB), 1 µl vettore *backbone*, 0.5 µl di *Bsa*I-HF®v2 (NEB), ddH_2O per raggiungere 9.5 µl di volume totale. La mix di reazione è stata posta a 37°C per 1

ora. È stata poi effettuata l'inattivazione di *Bsa*I (80°C per 20 minuti) e sono stati addizionati 0.5 µl di T4 DNA Ligase (2 ore a temperatura ambiente per permettere l'attività della ligasi; 10 minuti a 65°C per inattivare l'enzima).
Per creare il *destination vector*: 120 ng del vettore *backbone*, 80 ng per ciascuno dei 6 moduli, 1 µl di T4 DNA Ligase Buffer 10X (NEB), 0.3 µl di *Bsa*I-HF®v2 (NEB), 0.3 µl di T4 DNA Ligase, ddH_2O per raggiungere 10 µl di volume totale. La reazione è stata effettuata tramite termociclatore: (2" a 37°C, 5" a 16°C) x 50 cicli, 5" a 50°C, 5" a 80°C, *hold* a 16°C.

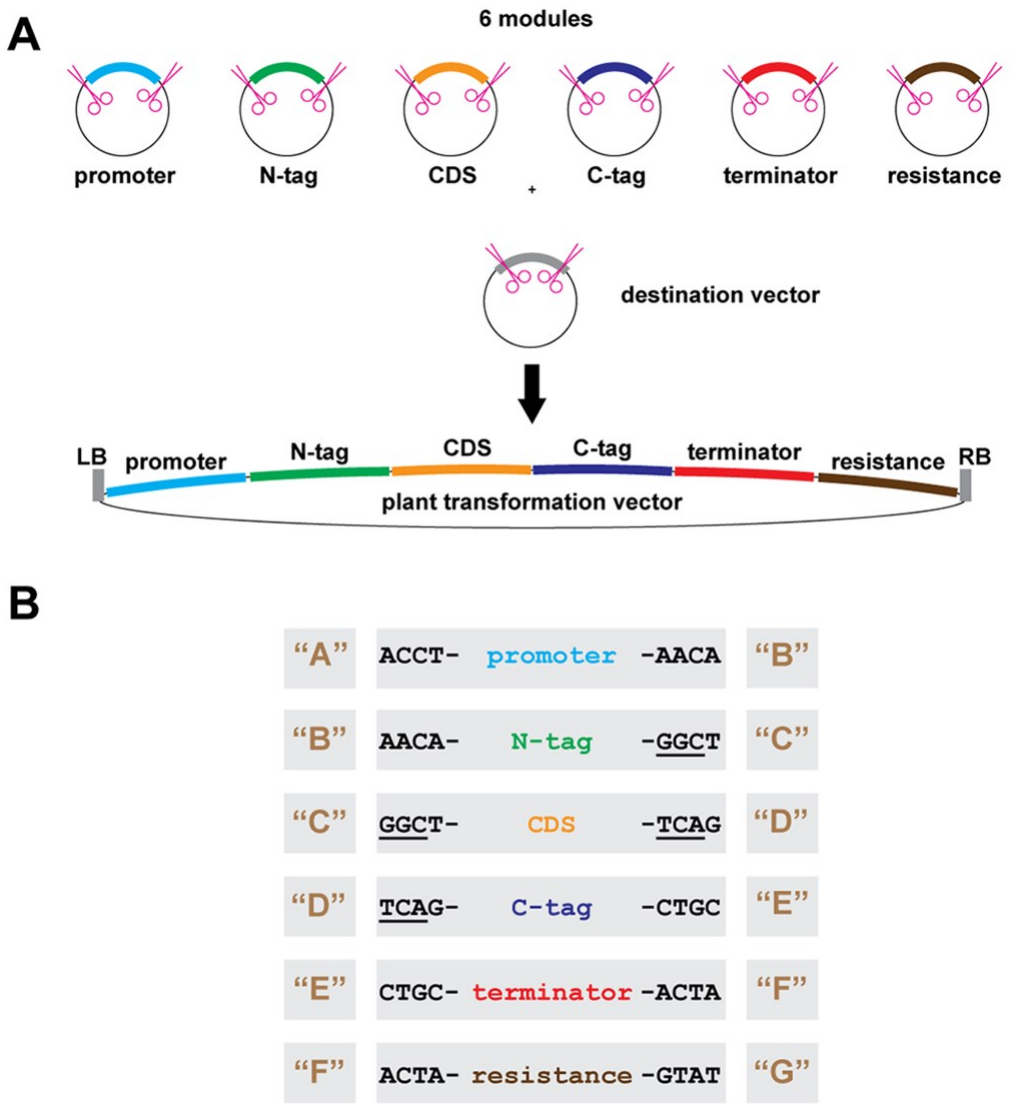


Figura 7. Rappresentazione schematica del sistema Green Gate *(Lampropoulos, et al. 2013)*.

2.10 Estrazione dei plasmidi da cellule di *Escherichia coli*

Dopo aver individuato tramite Colony-PCR le colonie trasformate con il costrutto di interesse, le cellule batteriche (5 µl) sono state fatte crescere in un tubo Falcon

da 15 ml contenente 4 ml di LB liquido addizionato con antibiotico, *overnight* a 37°C. Il giorno seguente, i plasmidi sono stati purificati mediante ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research) ed eluiti in 25 µl di ddH_2O. In seguito, sono state eseguite analisi quantitative e qualitative tramite spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher).

2.11 Test di digestione dei plasmidi tramite endonucleasi

Per verificare il corretto assemblaggio dei plasmidi, sono state eseguite restrizioni enzimatiche: 1 µl di plasmide, 0.5 µl di enzima *Eco*RI (NEB), 1 µl di rCutSmart™ Buffer 10X (NEB), H_2O per portare a volume (10 µl). Come controllo negativo, viene aggiunto 1 µl di plasmide a 9 µl di H_2O. La reazione di digestione viene effettuata a 37°C per un'ora. In seguito, vengono aggiunti 2 µl di Gel Loading Buffer ed i frammenti vengono separati tramite elettroforesi su gel.

2.12 Sequenziamento Sanger

In seguito alla digestione tramite endonucleasi, se i plasmidi mostravano il corretto pattern di bande, è stato eseguito il sequenziamento tramite il metodo Sanger effettuato da BMR Genomics (200-250 ng di DNA, 1 µl di primer; le microprovette da PCR sono state poi poste a 65°C con il tappo aperto per permettere l'evaporazione dell'H_2O).

2.13 Test di micorrizazione

Un volume necessario di inoculo liquido di *R. irregularis*, contenente 1000 spore/ml, è stato centrifugato per 10 minuti a 2100 rpm in modo da far precipitare le spore. Dopo aver eliminato il surnatante, i funghi sono stati risospesi in ½ H_2O del rubinetto e ½ ddH_2O. È stata eseguita una seconda centrifuga a 2100 rpm ed eliminata l'acqua in eccesso. L'inoculo è stato successivamente portato a volume con H_2O.
Per effettuare il test di micorrizazione, vasi di plastica (diametro 9 cm) sono stati riempiti per circa metà del loro volume con sabbia di fiume lavata con ddH_2O ed autoclavata. Successivamente, dopo aver inoculato ciascun vaso con 3000 spore di *R. irregularis* (750 spore per pianta), è stata aggiunta sabbia fino a riempirlo completamente. In seguito, sono stati creati quattro fori superficiali in cui sono state inserite le piantine. I vasi, collocati in un recipiente, sono stati coperti con uno strato di pellicola trasparente per permettere il mantenimento di un ambiente di crescita umido. Nei giorni successivi si è provveduto ad annaffiare periodicamente le piante con terreno liquido Long Ashton povero di fosfato (20 µM) in modo da favorire l'instaurarsi della simbiosi AM.

2.14 Quantificazione di massa ed estensione dell'apparato radicale

Dopo 17 e 20 giorni dall'inoculo con *R. irregularis*, le piante sono state svasate e ripulite da eventuali detriti sabbiosi. In seguito, sono stati pesati separatamente i fusti e gli apparati radicali delle singole piante. Sono state eseguite delle scansioni (300 dpi) delle radici delle piante destinate al test Trouvelot. Infine, tramite queste scansioni è stata eseguita un'analisi dell'apparato radicale considerando i seguenti parametri: numero di radici laterali, lunghezza totale e area dell'apparato radicale. Le misurazioni sono state effettuate mediante RhizoVision Explorer (Seethepalli e York 2020). Per ottimizzare i risultati, dalla voce *Image pre-processing* sono state selezionate le seguenti opzioni:

- Image threshold level = 170
- Filter non-root object →Maximum size = 5 mm^2
- Root pruning threshold = 5

2.15 Colorazione delle radici con inchiostro per il test Trouvelot

Per stimare la colonizzazione micorrizica, è stato effettuato il test Trouvelot (Trouvelot, Kough e Gianinazzi-Pearson 1986). Inizialmente le radici micorrizate sono state colorate con inchiostro secondo il seguente protocollo di colorazione. Le radici sono state poste in tubi da 1.5 ml a cui è stato aggiunto KOH 10%. Dopo 6 minuti a 96°C, è stato eliminato KOH e sono stati eseguiti due lavaggi con acido lattico 5%. Terminati i lavaggi ed eliminato l'acido lattico, sono stati aggiunti 1.5 ml di colorante composto da acido acetico 5% ed inchiostro 5%. Le radici sono state poi rimesse a 96°C per 10 minuti e sono stati eseguiti ulteriori lavaggi con acido lattico 5% per eliminare l'inchiostro in eccesso. Terminati i lavaggi, sono stati preparati i vetrini per l'osservazione al microscopio ottico. Le radici sono state tagliate in frammenti di circa un centimetro, posti nei vetrini in modo da formare quattro colonne ciascuna composta da cinque righe. Ogni frammento è stato poi classificato in sei classi diverse, in base al grado di micorrizazione, attribuendo un punteggio da 0 a 5 ed in quattro categorie diverse, in base al numero di arbuscoli presenti, conferendo una valutazione da A0 ad A3. Quindi, questa classificazione permette di fornire una rapida stima del livello di colonizzazione micorrizica ed abbondanza di arbuscoli per ciascun frammento di radice. I punteggi attribuiti hanno permesso di calcolare il valore per i seguenti parametri: %F, %M, %m, %a e %A. Dove %F indica la frequenza di micorriza nell'apparato radicale ed è ricavato dalla formula %F = $\frac{\text{numero di frammenti micorrizati}}{\text{numero di frammenti totali}} \times 100$; %M indica l'intensità della colonizzazione micorrizica nell'apparato radicale ed è ricavato dalla formula %M = $\frac{95n5 + 70n4 + 30n3 + 5n2 + n1}{\text{numero di frammenti totali}}$, dove n5 è il numero di frammenti classificato 5, n4 il numero di frammenti classificato 4, ecc.; %m indica l'intensità della colonizzazione micorrizica nei frammenti di radice colonizzati ed è ricavato dalla formula %m = $M \times \frac{\text{numero di frammenti totali}}{\text{numero di frammenti micorrizati}}$; %a indica l'abbondanza di arbuscoli nei

frammenti di radice colonizzati ed è ricavato dalla formula %a = $\frac{100mA3 + 50mA2 + 10mA1}{100}$, dove mA3, mA2 e mA1 rappresentano la percentuale di micorriza classificata come A3, A2 ed A1; %A indica l'abbondanza di arbuscoli nell'apparato radicale ed è ricavato dalla formula %A = $A \times \frac{M}{100}$. Le analisi sono state eseguite 17 giorni dopo l'inoculo (dpi) con il fungo.

2.16 Estrazione di RNA dalle radici, sintesi di cDNA e RT-qPCR

L'estrazione di RNA dalle radici è stata effettuata per ottenere la quantificazione del gene *PT4*, considerato un gene marker per la simbiosi micorrizica in quanto coinvolto nell'acquisizione di fosfato rilasciato dai funghi AM. Per l'estrazione è stato utilizzato RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Prima di procedere con l'estrazione, è stato accertato che la massa dell'apparato radicale non superasse 100 mg per ottenere una resa e purezza ottimale dell'RNA estratto. Il materiale di partenza, contenuto in tubi Eppendorf da 2 ml, è stato posto in azoto liquido e successivamente omogeneizzato tramite TissueLyser facendo uso di tre *beads* metalliche con diametro di 3 mm . Una volta ottenuto un tessuto omogeneo, sono stati aggiunti 450 µl di Buffer RLT, addizionato con β-mercaptoetanolo, che consente di frammentare le cellule e denaturare il DNA. Dopo aver utilizzato il vortex per circa un minuto, i campioni sono stati addizionati con pari volume di cloroformio:alcol isoamilico (24:1) che permette l'eliminazione dell'enzima RNasi A e di altre impurità. I campioni sono stati mescolati tramite vortex e centrifugati per 10 minuti a 10000 rpm. Successivamente, è stata prelevata la fase liquida (circa 400 µl) trasferita in colonna QIAshredder, collocata in un tubo da 2 ml, posta in centrifuga per 2 minuti alla velocità massima. Al supernatante è stato poi aggiunto mezzo volume di etanolo 100%, mescolando con la pipetta. Il volume viene poi trasferito in una colonna RNeasy Mini Spin, centrifugata per 15 secondi ad almeno 10000 rpm. Seguono un lavaggio con 700 µl di Buffer RW1 e due lavaggi con 500 µl di Buffer RPE, al termine dei quali alla colonna RNeasy Mini Spin, collocata in un nuovo tubo Eppendorf 1.5 ml, vengono addizionati 30 µl di H_2O RNasi-Free. Una volta terminata l'ultima centrifuga (1 minuto ad almeno 10000 rpm) si è proceduto alla quantificazione dell'RNA estratto tramite NanoDrop ND-1000. La sintesi di cDNA è stata effettuata mediante RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) ed è stato testato il successo del processo di sintesi tramite PCR. La reazione di qPCR è stata eseguita in una piastra con 94 pozzetti nel seguente modo: 2 µl di Buffer 5x, 0.2 di primer forward, 0.2 µl di primer reverse, 1 µl di cDNA, 6.6 µl di H_2O. La reazione è stata eseguita come segue: 2' a 50°C, 3' a 95°C, (10" a 95°C, 20" a 55°C, 30"a 72°C)x45, 1' a 50°C, 1' a 95°C.

2.17 Colorazione gus

Per la colorazione gus sono state selezionate le radici caratterizzate dalla presenza di strutture fungine grazie ad osservazione al microscopio. Per la mix di reazione sono stati utilizzati: 50 nM di $C_6N_6FeK_3$, 50 nM di $C_6FeK_4N_6$, 0.2 M di buffer Na_3PO_4

(pH 7; ottenuto mescolando 32 ml di stock monobasico 0.2M NaH_2PO_4 con 68 ml di stock dibasico 0.2 M $NaHPO_4$), 0.5M di Na_2EDTA, 10% Triton X, 67 µl/ml di X-Gluc (5-Bromo-4-Cloro-3-Indoyl-Beta-D-Glucoronide) e ddH_2O per portare al volume desiderato. Le radici sono state lasciate immerse nella mix di reazione (circa 2 ml) *overnight*, al buio, a 37°C. Trascorso il tempo di incubazione, è stato eseguito un passaggio di decolorazione con 2 ml di EtOH 70% e due lavaggi con H_2O. Nel caso in cui dopo il periodo di incubazione *overnight* le radici non risultassero ancora colorate, sono state lasciate in immersione nella mix di reazione per 24 ore.

2.17.1 Contro-colorazione con fucsina

Per accertarsi della co-localizzazione delle strutture fungine e della colorazione gus, è stata eseguita una contro-colorazione con acido fucsina, colorante magenta che permette di visualizzare le strutture fungine. Protocollo di colorazione: alle radici, contenute in tubi Eppendorf da 2 ml, sono stati aggiunti 2 ml di KOH 10% e sono state messe a 96°C per 6 minuti. In seguito, sono stati eseguiti due lavaggi con acido lattico 5%. Dopo aver eliminato l'acido lattico, è stato aggiunto il colorante fucsina (sono state eseguite colorazioni con differenti concentrazioni di acido fucsina: 0.1% oppure 0.2%) e le radici sono state poste a 96°C per 20 minuti. Infine, è stato eliminato il colorante e sono stati eseguiti due risciacqui con acido lattico 5%.

2.17.2 Colorazione con fluorofori coniugati a Whear Germ Agglutinin

L'uso della *Wheat Germ Agglutinin* (WGA) coniugata con un fluoroforo offre un'alternativa molto efficiente per evidenziare le strutture fungine. WGA è una lectina che si lega in modo specifico alla chitina, la principale componente della parete fungina. Si lega, infatti, ai residui di acido sialico e N-acetilglucosamina. WGA può essere associata con un numero elevato di fluorofori diversi, il che rende questo sistema estremamente plastico (Carotenuto e Genre 2020).
Sono stati utilizzati due differenti coniugati della WGA: Alexa Fluor® 350
e tetrametilrodamina (Invitrogen by ThermoFisher Scientific). Il fluoroforo Alexa 350 è un colorante fluorescente blu caratterizzato da eccitazione massima a 346 nm ed emissione massima a 442 nm. La tetrametilrodamina è un colorante fluorescente rosso caratterizzato da eccitazione massima a 555 nm ed emissione massima a 580 nm. Per la colorazione, alle radici poste in 1 ml di PBS 1x, è stato addizionato WGA-Tetrametilrodamina oppure di WGA- Alexa Fluor® 350, entrambi in concentrazione 0.1% (%v/v).

2.18 Analisi della risposta gravitropica delle radici

In seguito alla sterilizzazione, i semi sono stati trasferiti in piastre ½ B5 con Agar 0.8%, 8 per piastra equidistanti l'uno con l'altro. Trascorse 72 ore, per permettere alle piante di crescere a sufficienza, le piastre sono state ruotate di 90° verso sinistra. Per monitorare la risposta gravitropica delle radici, sono state eseguite delle scansioni (1200 dpi) alle piastre a cinque *time-point* differenti (dopo 4, 8, 24

e 48). È stata eseguita una scansione anche precedentemente la rotazione. Per quantificare la risposta nella direzione di crescita dell'apice radicale, è stato misurato l'angolo formato da quest'ultimo rispetto alla direzione di crescita della radice. Le misurazioni sono state effettuate utilizzando il software ImageJ.

2.19 Analisi della crescita delle radici laterali

In seguito alla sterilizzazione, i semi germinati sono stati posti in piastre quadrate con L.A. (PO_4 200 µM) addizionato con Agar 0.8% per permetterne la crescita. Successivamente, alcune piante sono state lasciate in immersione per un ora in medium L.A. (PO_4 200 µM) liquido con il corrispondente trattamento (CO4 10^{-7} M, Myc-LCO 10^{-7} M, CO8 10^{-7} M e, come controllo, EtOH 10^{-7} M oppure DMSO 10^{-7} M). Terminato il periodo di ammollo, sono state trasferite, equidistanti tra loro in numero di otto, in piastre quadrate con 60 ml di L.A. (PO_4 200 µM) addizionato con Agar 0.8%. Altre piante, invece, sono state subito trasferite in numero di otto in piastre quadrate con 60 ml di L.A. (PO_4 200 µM) e Agar 0.8%, addizionate con lo specifico trattamento (CO4 10^{-6} M, CO4 10^{-7} M, Myc-LCO 10^{-6} M, Myc-LCO 10^{-7} M e, come controllo, DMSO 10^{-7} M). Per ogni trattamento, sono state utilizzate 24 piante totali. La crescita delle radici laterali è stata monitorata, a giorni alterni, effettuando delle scansioni (300 dpi) delle piastre. Le analisi sono state effettuate utilizzando RhizoVision Explorer (Seethepalli e York 2020).

2.20 Trasformazione mediante *Agrobacterium rhizogenes*

La trasformazione con *Agrobacterium rhizogenes*, agente eziologico delle *hairy roots*, rappresenta uno dei metodi più semplici per generare piante composite. *A. rhizogenes* trasferisce il proprio T-DNA endogeno dal replicone extracromosomiale, chiamato plasmide *root-inducing* (Ri), all'interno del DNA genomico della pianta. Affinché si verifichi la formazione di *hairy roots*, il T-DNA del batterio deve integrarsi con il DNA genomico dell'ospite. Le cellule batteriche di *A. rhizogenes*, utilizzate per trasformare *L. japonicus* mediante metodo di clonaggio GreenGate, sono caratterizzate dalla presenza di GFP citosolica come *marker* di trasformazione in modulo F. Questo facilita l'identificazione delle radici trasformate in quanto è stato sufficiente osservarle tramite microscopio a fluorescenza utilizzando il filtro per la GFP. Per effettuare la trasformazione con *A. rhizogenes* mediante siringa, la cui punta è stata prima posta a contatto con il tappeto batterico, sono state effettuate piccoli fori in corrispondenza del nodo cotiledonare. Alternativamente, con il bisturi, è stato effettuato un taglio trasversale all'altezza dell'ipocotile, rimuovendo la radice. La pianta è stata quindi posta a contatto con la coltura batterica in corrispondenza della sezione recisa. Inizialmente, le piante sono state collocate in piastre quadrate ½ B5 con Agar 0.8% e lasciate al buio *overnight*. Dopo circa due-tre settimane, è stato possibile osservare lo sviluppo di *hairy roots* a partire dal sito di infezione.

2.21 Preparazione e trasformazione dei protoplasti

Per l'estrazione dei protoplasti, si è partiti da 20 ml di cellule WT di *Arabidopsis thaliana* lasciate in coltura in una beuta per 5 giorni in medium liquido ½ Murashige & Skoog (Duchefa) addizionato con saccarosio 3%. Il contenuto della beuta è stato poi versato in una Falcon da 50 ml e centrifugato per 30 secondi a 1000 rpm. Dopo aver rimosso il surnatante, le cellule sono state risospese in 8 ml di soluzione enzimatica (per preparare la soluzione enzimatica: 0.073 g/ml di mannitolo, 0.01 g/ml di cellulasi R-10 (Yakult), 0.005 g/ml di macerozima R-10 (Yakult), 0.001 g/ml di BSA, KCl 20 mM 2% (%v/v), MES 20 mM 4% (%v/v), 2.5 ml di $CaCl_2$ 200 mM 5% (%v/v); portare a volume con ddH_2O). Sono state poi incubate al buio per 3 ore, a 25°C, sullo *shaker* a circa 80 rpm. Le cellule sono state filtrate su nylon con porosità 55 µm in becker da 50 ml, centrifugate 5 minuti a 500 rpm e lavate 3 volte con 8 ml di soluzione W5 preparata al momento (per preparare la soluzione W5: 3% (%v/v) di NaCl concentrazione finale 154 mM, 2.5% (%v/v) di $CaCl_2$ concentrazione finale 125 mM, 0.5% (%v/v) di KCl concentrazione finale 5 mM, 0.4% (%v/v) di MES concentrazione finale 2 mM; portare a volume con ddH_2O). Infine, i protoplasti sono stati risospesi in 1 ml di MaCa (per preparare la soluzione MaCa: 0.09 g/ml di mannitolo 0.5 M, 10% (%v/v) di $CaCl_2$ da stock 200 mM, 0.001 g/ml di MES; portare a volume con ddH_2O, pH finale 5.8).
Per la trasformazione sono stati aliquotati 10 µl del plasmide di interesse (pari a circa 10-20 ng) in una Eppendorf da 2 ml. Utilizzando punte tagliate, sono stati aliquotati 300 µl di protoplasti nel tubo Eppendorf contenente il DNA. È stato poi aggiunto un pari volume di PEG (per preparare la soluzione PEG: 0.07 g/ml di mannitolo, 0.005% (%v/v) di $CaCl_2$ 100 mM, 0.4 g/ml di PEG4000; portare a volume con H_2O MilliQ. Mescolare sullo *stirrer* per due ore e portare a pH 8.0 con KOH). I protoplasti sono poi stati incubati a temperatura ambiente con le soluzioni per 30 minuti, mescolando delicatamente ogni 5 minuti. Sono stati aggiunti 1.2 ml di soluzione W5 in ciascun tubo, mescolando delicatamente. È stata eseguita una centrifuga di 5 minuti a 500 rpm, eliminato il surnatante e risospeso in 1 ml di MaCa. Infine, i protoplasti sono stati incubati al buio a 25°C *overnight,* 80 rpm. Il giorno seguente, i protoplasti sono stati osservati al microscopio confocale SP5.

2.22 Misurazione della variazione della concentrazione di calcio con aequorina

Le variazioni nella concentrazione di calcio intracellulare sono state misurate mediante sonda bioluminescente aequorina. Piante di *Lotus japonicus* sono state trasformate mediante *A. rhizogenes* contenente il costrutto GG60 o GG62. Per verificare quali radici sono trasformate, si è proceduto all'osservazione tramite microscopio a fluorescenza. Le radici trasformate sono state poste in una piastra a 24 pozzetti in cui ogni pozzetto contiene 500 µl di ddH_2O. Dopo essere state tagliate in segmenti di circa 5 mm, le radici vengono lasciate in acqua per 15-20 minuti. In seguito, vengono aggiunti 5 µl di celenterazina, gruppo prostetico dell'aequorina, per ricostituire l'oloproteina. La piastra è stata lasciata al buio

overnight. La mattina seguente, le radici sono state trasferite in un pozzetto con 500 µl di ddH_2O per eliminare la coelenterazina in eccesso. Il campione è stato poi posto all'interno di una cameretta contenente 50 µl di ddH_2O. Lo stimolo (50 µl di CO_4 10^{-7}M o CO_8 10^{-7}M) viene inoculato tramite siringa all'interno della cameretta, dopo 100 secondi dall'inizio della conta fotonica. La cameretta viene posta all'interno di un luminometro, strumento che permette di misurare le emissioni di luce visibile, anche molto deboli, grazie alla presenza di un tubo fotomoltiplicatore (PMT). La corsa prosegue per 30 minuti, al termine dei quali vengono iniettati 100 µl di soluzione *discharge* (30% etanolo, $CaCl_2$ 5 mM) che permette di quantificare la quantità totale di aequorina presente. I dati di luminescenza vengono poi trasformati in concentrazione di calcio tramite una curva di calibrazione (Brini et al, 1995).

2.23 Microscopia

Per la quantificazione della colonizzazione AM nelle radici di *L. japonicus*, è stato utilizzato il microscopio ottico Leica DM 1000 con un ingrandimento 10x e 20x. Per osservare le radici sottoposte a colorazione GUS, è stato utilizzato un microscopio ottico (Leica DMR) con un ingrandimento 20x e 40x. L'identificazione delle radici trasformate *hairy roots* è stata effettuata mediante stereomicroscopio a fluorescenza Leica MZ16 utilizzando come *marker* di trasformazione la GFP citosolica. Il microscopio confocale (Leica SP5) è stato utilizzato per osservare i protoplasti trasformati mediante ingrandimento 20x e 63x. I protoplasti (50 µl) sono stati collocati in una cameretta chiusa con un vetrino coprioggetti ed immediatamente osservati. Le scansioni per la GFP e la RFP (Red Fluorescent Protein) sono state eseguite contemporaneamente all'acquisizione dell'immagine nel campo visibile. Per eccitare la GFP è stato utilizzato il laser Argon 488 e la fluorescenza emessa è stata rilevata tra 500 e 535 nm; per eccitare la RFP è stato utilizzato il laser HeNe 543 e la fluorescenza emessa è stata rilevata tra 580 e 670 nm; dicroico TD 488/543/633. Per alcuni protoplasti trasformati di interesse sono state catturate molteplici immagini sull'asse z ed assemblate assieme a formare uno Z-stack.

2.24 Analisi statistica

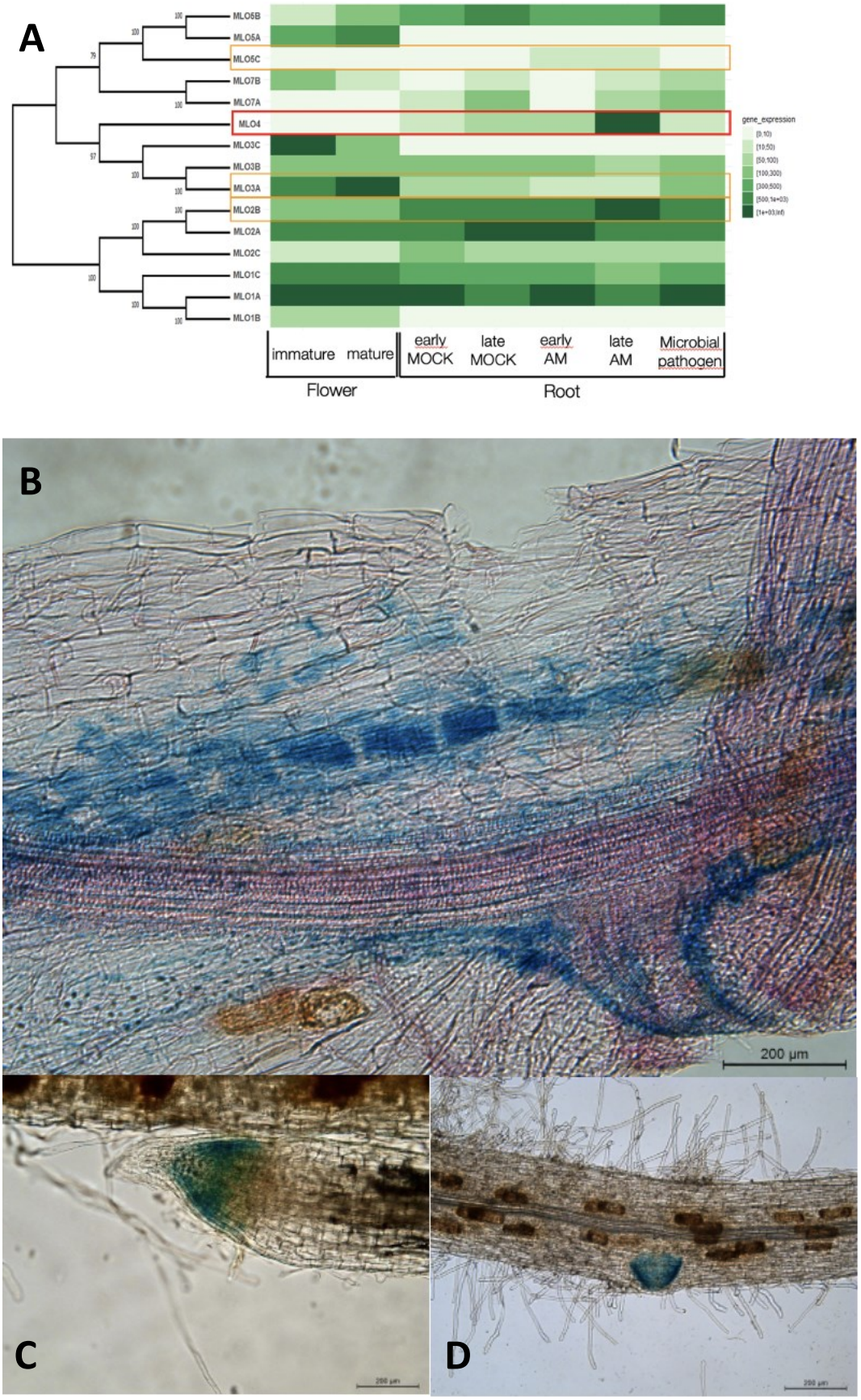
L'analisi statistica è stata effettuata tramite il software R-Studio, utilizzando i pacchetti: tidyverse, multcomp, ggpubr, rstatix, patchwork e ggplot2. Dopo aver verificato che i dati presentassero distribuzione normale ed omogeneità delle varianze, è stata eseguita una ANOVA, seguita dal test post-hoc Tukey's HDS (*Honestly Significant Difference*). Nel caso in cui i dati non presentassero distribuzione normale, è stato eseguito il test non-parametrico di Kruskal-Wallis, seguito dal test post-hoc di Dunn. I test statistici utilizzati ed i livelli di significatività (p-value > 0.05 non significativo; p-value ≤ 0.05 indicato con *; p-value ≤ 0.01 indicato con **; p-value ≤ 0.001 indicato con ***) sono riportati in corrispondenza di ciascuna figura.

3 RISULTATI

3.1 Il promotore di *MLO4* si attiva in cellule colonizzate dal fungo AM in *L. japonicus*

In *L. japonicus*, la famiglia multigenica *MLO* è costituita da 15 geni differenti. In base al profilo di espressione genico ricavato da database pubblici consultabili online (Lotus Base; https://lotus.au.dk (Mun, et al. 2016)) (Fig. 8A) nella radice di piante utilizzate come *mock* (non inoculate con il fungo AM) e piante inoculate con il fungo AM, sia in fase precoce che in fase tardiva della micorrizazione, è stato deciso di analizzare l'attività promotoriale dei geni *MLO2B*, *MLO3A* e *MLO5C*, oltre che del gene *MLO4*, poiché risultano essere i geni la cui espressione è maggiormente indotta dalla presenza del fungo micorrizico. Per fare ciò è stato eseguito un saggio istochimico con il gene *reporter GUS* (β-glucoronidasi) (modulo C) posto sotto il controllo del promotore di interesse (modulo A). Questi due moduli, già presenti in laboratorio, sono stati assemblati mediante sistema di clonaggio GreenGate. Il vettore di espressione così ottenuto è stato utilizzato per trasformare l'apparato radicale di piante di *L. japonicus* mediante il sistema *hairy roots*. La trasformazione è stata effettuata facendo uso dei seguenti costrutti: p*MLO4*:GUS (GG88), p*MLO2B*:GUS (GG90), p*MLO3A*:GUS (GG91) e p*MLO5C*:GUS (GG89). Le piante composite ottenute sono poi state controllate tramite stereomicroscopio a fluorescenza Leica MZ16 utilizzando come *marker* di trasformazione la GFP citosolica. Per verificare l'attività del promotore di *MLO4* in presenza del fungo AM, le piante sono state poste in vasi riempiti di sabbia in cui sono state inoculate 3000 spore di *R. irregularis.* Le piante sono state periodicamente annaffiate con L.A. (PO_4 20 µM) e raccolte dopo cinque settimane dalla somministrazione dell'inoculo. Successivamente è stato eseguito il saggio GUS, come descritto al capitolo *2.16*, e le radici sono state analizzate con il microscopio ottico Leica DM 4000. Si è visto che solo le radici trasformate con p*MLO4*:GUS presentano colorazione blu in corrispondenza delle cellule arbuscolate e che ospitano strutture fungine in generale (Fig. 8B). Questo implica che unicamente p*MLO4* è attivo durante la simbiosi AM. Incrementando il livello di colonizzazione (ad esempio, osservando radici in fase tardiva della simbiosi), aumenta anche l'attività del promotore. È stato inoltre osservato che le radici trasformate con p*MLO3A*:GUS presentano colorazione GUS a livello di apici ed abbozzi radicali, in modo totalmente indipendente dalla presenza del fungo AM (Fig. 8C-D). La causa dell'attività di *MLO3A* in queste zone di accrescimento primario dell'organo radicale deve essere ulteriormente investigata. Invece, i promotori di *MLO2B* e *MLO5C* non risultano attivi in presenza del fungo AM. In breve, i risultati ottenuti tramite saggio GUS suggeriscono, dunque, che solo il gene *MLO4* è espresso nel tessuto radicale in presenza di fungo AM, mentre l'espressione di *MLO2B*, *MLO3A* e *MLO5C* non dipende dalla colonizzazione fungina. A conferma dei risultati ottenuti, è necessario accertarsi della co-localizzazione del fungo AM e dell'attività di p*MLO4*. Per ottenere ciò, in un primo momento è stata eseguita una contro-colorazione con la fucsina, colorante

magenta che si lega alla chitina, polisaccaride che compone la parete cellulare dei funghi, permettendo di metterne in evidenza le strutture. Come osservabile in Fig. 8B, però, la colorazione con acido fucsina non ha permesso di ottenere i risultati desiderati. La radice, infatti, appare essersi colorata in modo diffuso, in particolar modo nell'area attorno ai tessuti conduttori della pianta (xilema e floema), non evidenziando, come atteso, le ife fungine. Successivamente, con il medesimo obiettivo, è stata effettuata una colorazione con i fluorofori coniugati alla Wheat Germ Agglutinin (WGA), lectina che si lega in modo specifico alla chitina. La presenza di un numero elevato di coniugati fluorescenti differenti rende il sistema estremamente versatile, permettendo di utilizzare coloranti fluorescenti addizionali. In questo caso, infatti, per identificare le radici trasformate, è stato utilizzato il *marker* GFP citosolico (fluorescenza nel verde). Di conseguenza, come coniugato fluorescente alla WGA è stata usata la tetrametilrodamina in grado di emettere fluorescenza nel rosso. Si può apprezzare (Fig. 8G) come nelle cellule caratterizzate da un'abbondante presenza di arbuscoli, oltre ad attivarsi il promotore di *MLO4*, viene evidenziata la presenza di un complesso ifale intraradicale che penetra all'interno delle singole cellule per poi costituire ramificazioni progressivamente più sottili fino a formare gli arbuscoli. Quindi, grazie all'utilizzo dei fluorofori coniugati con la WGA è stato possibile co-localizzare la presenza del fungo AM e l'espressione di p*MLO4* rilevata mediante saggio istochimico GUS, confermando quindi l'attività del gene *MLO4* durante la simbiosi AM.


A
MLO5B
MLO5A
MLO6C
MLO7B
MLO7A
MLO4
MLO3C
MLO3B
MLO3A
MLO2B
MLO2A
MLO2C
MLO1C
MLO1A
MLO1B
gene_expression
immature
mature
early MOCK
late MOCK
early AM
late AM
Microbial pathogen
Flower
Root
B
200 µm
C
D

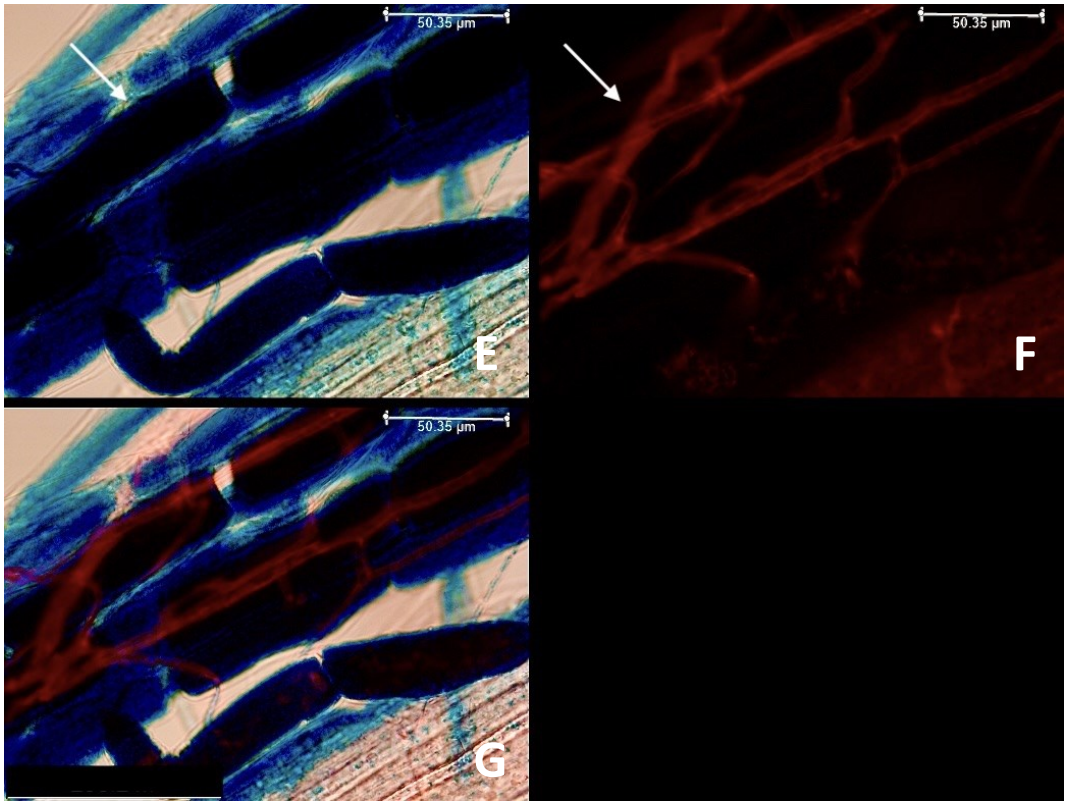


Figura 8. ***Il promotore del gene MLO4* si attiva in presenza del fungo AM**. A) Tabella in cui vengono mostrati i livelli di espressione dei 15 geni appartenenti alla famiglia *MLO* di *L. japonicus*. Nel rettangolo rosso, viene evidenziato il livello di espressione di *MLO4* in fiore e radice in differenti condizioni. Nei quadrati arancioni, invece, vengono mostrati i livelli di espressione dei geni *MLO5C*, *MLO3A* e *MLO2B*. Le immagini successive mostrano frammenti di radice di piante composite di *L. japonicus* ecotipo Gifu, esprimenti il gene reporter GUS sotto il controllo di diversi promotori, ottenute mediante microscopio a fluorescenza Leica DMR (B, C e D) oppure attraverso il microscopio confocale Leica SP5 (E, F, G). B) Segmento di radice in cui è stato espresso il gene GUS sotto il controllo di p*MLO4*. Si possono distinguere in azzurro scuro le cellule contenenti arbuscoli. La radice è stata contro-colorata con fucsina per mettere in evidenza le strutture fungine. C) e D) Segmenti di radice in cui è stato espresso il gene GUS sotto il controllo di p*MLO3A*. In C) si può osservare la colorazione dell'apice radicale mentre in D) quella di un abbozzo radicale. E) Mostra cellule di radice sottoposte a colorazione istochimica GUS (indicato dalla freccia bianca). F) Grazie all'uso del fluoroforo tetrametilrodamina associato a WGA, vengono evidenziate (nell'immagine in rosso, indicate con la freccia bianca) le ife intraradicali. In G) si può apprezzare la co-localizzazione delle strutture fungine con la colorazione GUS.

3.2 Analisi del ruolo delle sequenze regolatorie AW-box e P1BS per l'attività di p*MLO4*

Considerando i risultati descritti al *Capitolo 3.1*, si è deciso di approfondire l'analisi del promotore di *MLO4*. Partendo da conoscenza pregresse sul ruolo svolto da P1BS e AW-box, sequenze *cis* note per regolare l'espressione di geni specifici per la simbiosi AM (Pimprikar e Gutjahr 2018), è stata eseguita un'analisi sulla sequenza di p*MLO4* (sono state considerate 2000 bp a monte del codone di inizio del gene). Questo studio ha permesso di identificare le due sequenze regolatrici in *cis* P1BS e AW-box presenti in tandem rispettivamente in posizione -186 -194 bp e -195 – 208 bp (rispetto a codone di inizio). Gli AW-box [CnTnG$(n)_7$GC] sono

sequenze presenti nel promotore di *L. japonicus* che codificano per un trasportatore ABC, localizzato a livello della membrana periarbuscolare, necessario per il trasporto di lipidi dalla pianta al fungo AM. Inoltre, fungono da sito di legame per i fattori di trascrizione WRINKLED, appartenenti alla famiglia APETALA2 (AP2), considerati dei regolatori chiave nella biosintesi dei lipidi nelle piante (Kong e Ma 2018). *P1BS* (*PHR1 binding site*, sequenza GNATATNC) è un motivo presente nei promotori di geni che svolgono un ruolo cruciale nella risposta a cambiamenti della concentrazione di Pi (Das, et al. 2022). Come visto in uno studio di Chen, et al. 2011, mutazioni o delezioni di questo motivo risultano in una considerevole diminuzione, o addirittura assenza totale, di espressione di geni codificanti per trasportatori di Pi micorriza-specifici. Per analizzare il potenziale ruolo svolto da questi due motivi nell'attività del promotore di *MLO4*, sono stati creati dei promotori mutati tramite il sistema di clonaggio GreenGate a partire da quattro moduli che combinati tra loro in coppia permettevano di escludere una o entrambe le sequenze di interesse. Sono stati quindi ottenuti tre promotori mutati: p*MLO4*ΔAW-box, p*MLO4*ΔP1BS e p*MLO4*ΔAW-boxΔP1BS (Fig. 9A).
Di seguito, le coordinate dei quattro diversi moduli utilizzati per formare i tre promotori mutati:

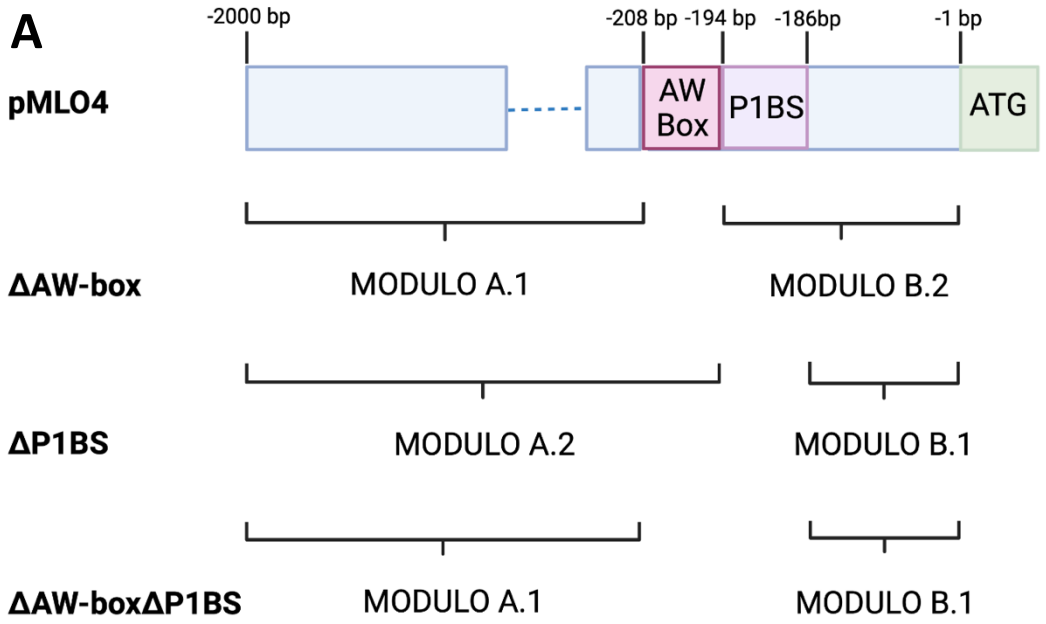
- **Modulo A.1**: da -2000 bp a -208 bp; vengono esclusi sia P1BS che AW-box
- **Modulo A.2**: da -2000 bp a -194 bp; include solo AW-box
- **Modulo B.1**: da -186 bp a -1 bp; vengono esclusi sia P1BS che AW-box
- **Modulo B.2:** da -194 bp a -1 bp; include solo P1BS

Il sistema di clonaggio GreenGate è stato utilizzato per formare i promotori mutati, a partire dai moduli A e B, ottenendo i seguenti costrutti:

- **Vettore di espressione GG144**: sono stati ligati tra loro i moduli A.1 e B.2
- **Vettore di espressione GG143**: sono stati ligati tra loro i moduli A.2 e B.1
- **Vettore di espressione GG142**: sono stati ligati tra loro i moduli A.1 e B.1

Gli altri moduli del sistema GreenGate comprendono: CDS GUS (modulo C; GG20), D-dummy (modulo D; GG22), terminatore UBQ10 (modulo E; GG29) e, come *marker* di trasformazione, GFP citosolica (modulo F; GG69). I sei moduli A-F sono stati inseriti all'interno del vettore *backbone* GG108. I costrutti ottenuti sono stati utilizzati per trasformare gli apparati radicali di piante di *L. japonicus* (background *wild-type*). Analizzando globalmente gli apparati radicali, si è visto che solo le radici trasformate con p*MLO4*:GUS e p*MLO4*ΔP1BS:GUS presentano colorazione blu (Fig. 9B-E). Nello specifico, tramite analisi al microscopio ottico, si è visto che oltre a colorarsi le cellule arbuscolate, si è inoltre colorata in modo aspecifico la regione attorno ai vasi centrali. Nelle radici trasformate con p*MLO4*ΔAW-box:GUS e p*MLO4*ΔAW-boxΔP1BS:GUS, invece, non sono stati osservati arbuscociti colorati. In base a questi risultati, nonostante il numero di osservazioni fatte sia limitato a causa di carenza di tempo, sembrerebbe che la sequenza regolatoria P1BS non sia

essenziale per l'attività di p*MLO4* negli arbuscociti in quanto anche in mancanza di tale sequenza è stato possibile individuare cellule arbuscolate colorate di blu a sequito di colorazione istochimica GUS. Per quanto P1BS sia risultata accessoria per l'espressione di p*MLO4* in presenza di fungo AM, potrebbe risultare essenziale per altre funzioni regolatorie. Al contrario, la sequenza AW-box risulta essenziale. Infatti, radici trasformate con p*MLO4*ΔAW-box:GUS (Fig. 9D) non presentano colorazione blu. Sicuramente, per confermare questi primi risultati ottenuti, è necessario eseguire ulteriori colorazioni istochimiche GUS, in particolare in luce delle difficoltà riscontrate nella simbiosi AM a seguito del cambiamento delle camere di crescita in cui sono state poste le piante (vedi *Capitolo 3.3*). Per confermare la co-localizzazione dell'attività del promotore in cellule colonizzate dal fungo AM, è stata eseguita una contro-colorazione con la tetrametilrodamina coniugata a WGA. Una colonizzazione diffusa ed aspecifica a causa, probabilmente, di un protocollo ancora da affinare hanno però reso impossibile accertarsene con sicurezza.
Durante le osservazioni al microscopio, si è inoltre visto che, mentre nel caso delle radici trasformate con p*MLO4*:GUS gli apici e gli abbozzi radicali risultavano spesso colorati di blu, nelle radici trasformate con p*MLO4*ΔAW-box:GUS e p*MLO4*ΔAW-boxΔP1BS:GUS, invece, questo non avveniva. Piante trasformate con p*MLO4* ΔP1BS:GUS mostrano un fenotipo intermedio. Le cause di questa differente colorazione devono ancora essere indagate. Si potrebbe, però, speculare un possibile coinvolgimento del motivo AW-box nella trascrizione del gene in corrispondenza delle radici laterali. Ovviamente, questa rimane solo una prima ipotesi e sono necessari ulteriori studi.



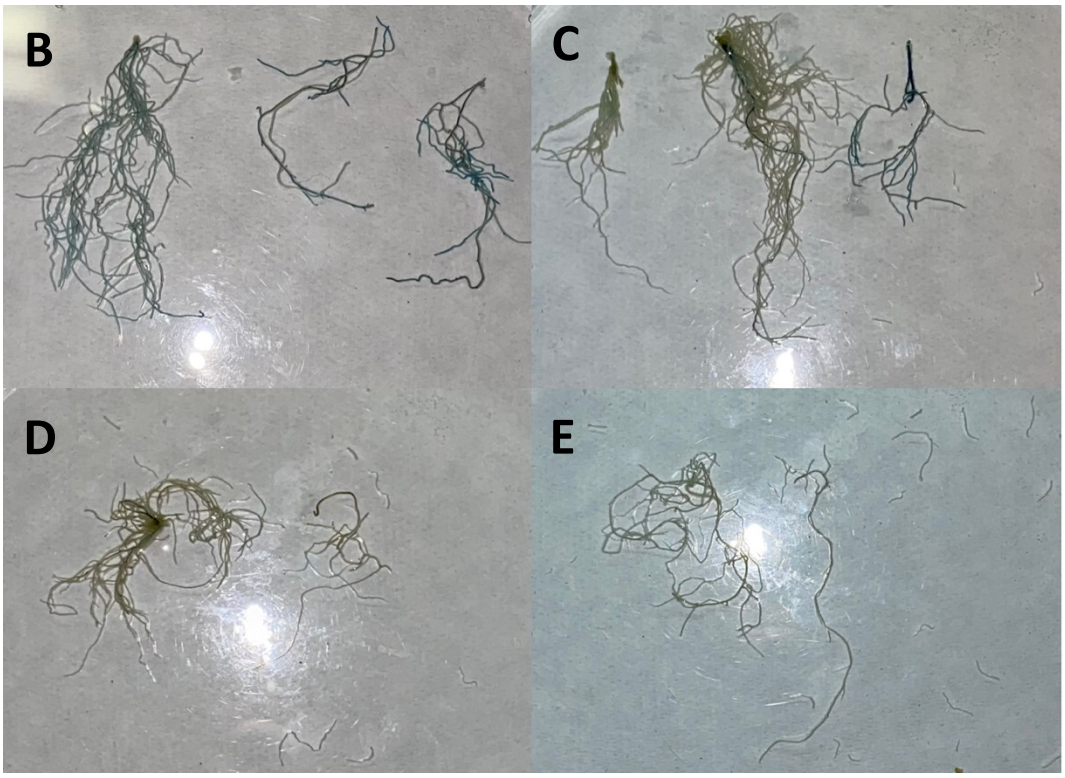


Figura 9. A) Rappresentazione schematica dei motivi regolatori in cis AW-box e P1BS e del promotore di *MLO4* in *L. japonicus*. Figura realizzata con Biorender. Le immagini seguenti sono fotografie dell'apparato radicale di piante di *L. japonicus* trasformate mediante il sistema *hairy roots* e sottoposte a colorazione istochimica GUS. In ordine, piante trasformate con: B) p*MLO4*:GUS, C) p*MLO4*ΔP1BS:GUS, D) p*MLO4*ΔAW-box:GUS ed E) con p*MLO4*ΔAW-boxΔP1BS:GUS.

3.3 Quantificazione della colonizzazione fungina: confronto tra WT e mutanti mediante Trouvelot e RT-qPCR

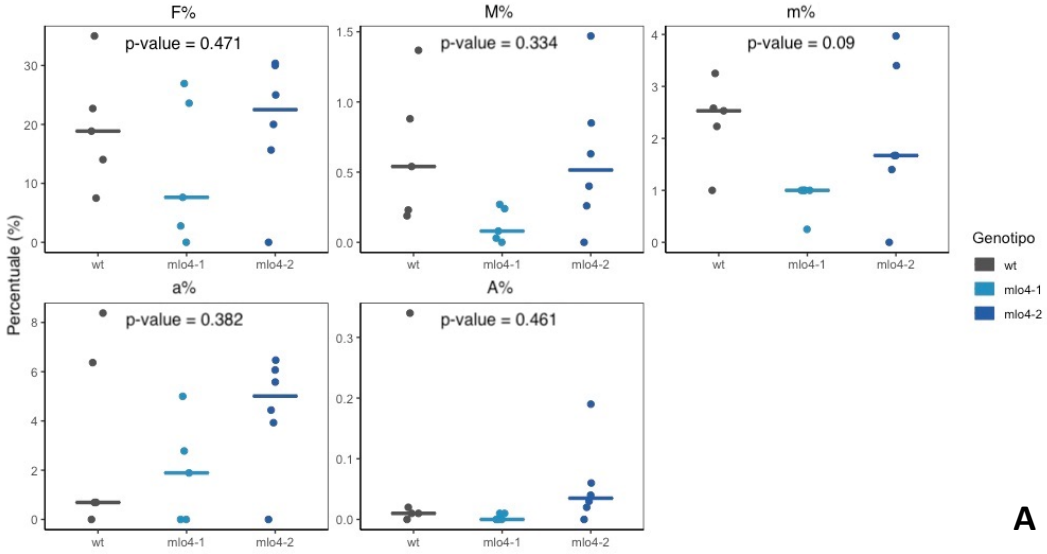
Uno studio recente svolto su orzo (Hordeum vulgare), frumento (*Triticum aestivum*) e *Medicago truncatula*, ha dimostrato che mutanti *mlo* (*Hvmlo1*, *Tamlo1* e *Mtmlo8*) sono caratterizzati da una riduzione della colonizzazione nelle fasi precoci della simbiosi. Tali risultati sono stati ottenuti stimando la presenza (in %) di strutture fungine ed eseguendo estrazione di RNA dalle radici e RT-qPCR (Jacott, et al. 2020). In un altro studio svolto su orzo si è arrivati, invece, a risultati opposti osservando dopo sei settimane dall'inoculo con il fungo AM un incremento nella micorrizazione nel mutante *mlo-5* rispetto al WT (Hilbert, et al. 2020). Con l'obiettivo di confermare il medesimo fenotipo anche in *L. japonicus*, sono stati considerati due mutanti inserzionali della linea *LORE1*: *mlo4-1* e *mlo4-2* (il trasposone si è inserito, rispettivamente, in corrispondenza del primo e del quattordicesimo esone). Inizialmente è stata effettuata una colorazione con inchiostro blu e test Trouvelot su radici di piante inoculate con il fungo da 17 giorni (*time-point* precoce nella colonizzazione). Per le analisi sono state utilizzate cinque

repliche biologiche per ciascun genotipo. I dati sono stati analizzati mediante test ANOVA. Per nessuno dei parametri considerati sono stati ottenuti valori di p-value significativi (≤0.05). Come osservabile in Fig. 10A, i valori di intensità di colonizzazione micorrizica (%M e %m) e di abbondanza di arbuscoli (%A e %a) risultano essere particolarmente bassi e considerevolmente minori rispetto a quelli trovati da Jacott, et al. Nello specifico, gli apparati radicali delle piante analizzate sembrano essere virtualmente prive di cellule arbuscolate (il valore medio sia per WT che per i mutanti è minore di 0.1%; nel WT, addirittura, nella maggior parte dei campioni considerati gli arbuscoli erano completamente assenti). Questo esperimento, quindi, non sembrerebbe confermare in *L. japonicus* il fenotipo individuato da Jacott, et al. e da Hilbert, et al. Infatti, i mutanti *mlo4-1* e *mlo4-2* non presentano differenze significative rispetto al WT nella colonizzazione da parte del fungo AM. I risultati ottenuti, essendo contrastanti da quelli presenti in letteratura, sono probabilmente frutto di un diverso *set-up* sperimentale. Per questo motivo è stato deciso di ripetere l'esperimento considerando due *time-point* (17 e 20 dpi) e tre genotipi diversi (WT, *mlo4-1* e *mlo4-3*). In questa replica, il mutante *mlo4-2* non è stato utilizzato in quanto l'inserzione del retrotrasposone è avvenuta in corrispondenza del quattordicesimo esone, vicino al 3'-UTR, il che potrebbe determinare un mancato *knock-out* del gene. Per entrambi i *time-point* selezionati, è stata effettuata la colorazione con inchiostro blu per effettuare la quantificazione della micorrizazione tramite test Trouvelot. L'analisi non è però andata a buon fine in quanto nessun segmento di radice analizzato presenta strutture fungine. Non è stato, infatti, possibile individuare cellule arbuscolate o ife intraradicali. La pressoché totale assenza di fungo AM, per quanto anomala, può essere spiegata da diversi fattori tra cui, *in primis*, il cambiamento delle condizioni di crescita a causa della sostituzione delle camere di crescita in cui è stata modificata l'intensità luminosa e l'umidità. Non è stato però possibile misurare l'intensità luminosa prima della sostituzione delle camere di crescita e quindi determinare con sicurezza se uno o entrambi questi fattori siano effettivamente responsabili. Un'altra causa può essere l'inoculo difettato, fattore però escluso dalla ditta produttrice che ha garantito l'assenza di segnalazioni per il lotto di produzione. Il *medium* liquido utilizzato per annaffiare le piante (Long Ashton a bassa concentrazione di fosfato 20 µM) è, invece, il medesimo utilizzato nel precedente esperimento, quindi difficilmente imputabile come elemento causale dell'insuccesso della micorrizazione. Non si può poi escludere la presenza di organismi patogeni fungini che sono stati in grado di prevaricare o porre freno alla simbiosi AM. Bisogna inoltre considerare le difficoltà intrinseche presenti in un sistema considerevolmente dinamico e complesso in cui non è sufficiente trovare le condizioni di crescita e sviluppo ideale per un singolo organismo ma per due organismi differenti (pianta e fungo AM) che interagiscono e sono interdipendenti tra loro, il che incrementa in modo considerevole il numero di variabili in gioco.

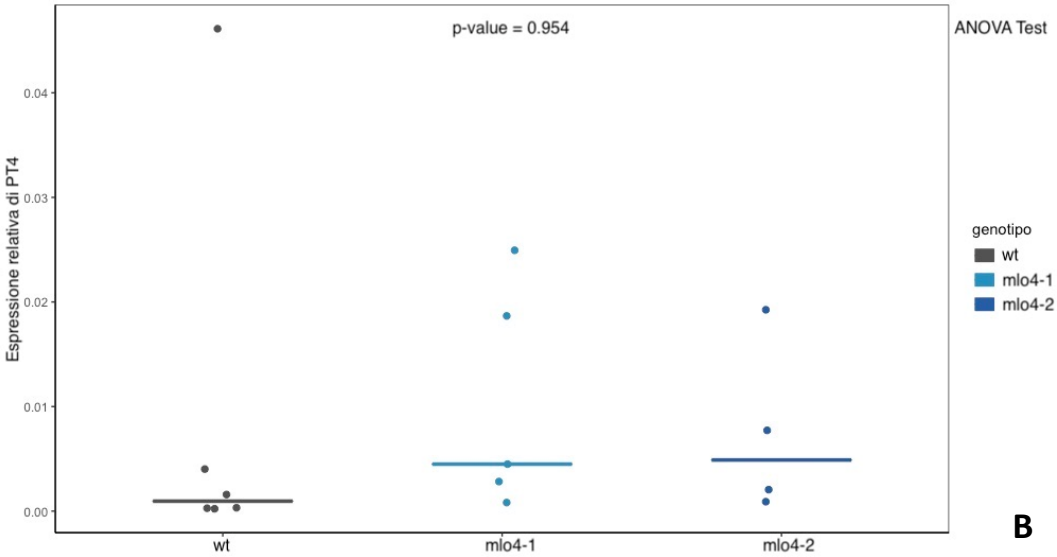
Parallelamente al test Trouvelot, a seguito dell'estrazione di RNA dalle radici di piante di *L. japonicus* WT e mutanti *mlo4-1* e *mlo4-2*, è stata eseguita una RT-qPCR per misurare il livello di espressione di *PT4* e quindi verificare se ci fossero delle

differenze tra WT e mutanti. PT4 è un trasportatore di Pi localizzato a livello della membrana periarbuscolare, specifico per la simbiosi AM, ed appartenente alla sottofamiglia I di Pht1. Viene considerato un gene *marker* per la simbiosi. È stato visto in *Medicago* che la perdita di funzione di PT4 determina anomalie nello sviluppo della simbiosi AM, comportando la presenza di un numero estremamente ridotto di arbuscoli e la formazione di setti nelle ife intercellulari, indice di morte cellulare del fungo AM (Javot, Penmetsa, et al. 2007). Per le analisi è stato considerato il valore di $2^{-\Delta Ct}$ dato dalla differenza tra la media del valore soglia del gene di interesse e la media del valore soglia del gene *housekeeping* (in questo caso Ubiquitina), utilizzata per normalizzare i livelli di mRNA tra campioni differenti. È stato poi eseguito un test ANOVA per verificare se il genotipo influenzasse il valore di $2^{-\Delta Ct}$ e quindi per determinare se i mutanti *mlo*, che dalla letteratura ci si aspettava fossero caratterizzati da un livello di micorizzazione ridotto rispetto al WT nelle fasi precoci della simbiosi, presentassero anche livelli ridotti di espressione di *PT4*. In realtà, si è visto che il genotipo non sembra avere alcuna influenza sul livello di espressione di *PT4*. I mutanti *mlo*, quindi, presentano un'espressione di questo gene *marker* per la simbiosi paragonabile a quella del WT. I risultati ottenuti, per quanto contrastanti con quelli descritti in letteratura, risultano in realtà coerenti con le conclusioni sul livello di micorrizazione tratte a seguito di test Trouvelot. Misurando le masse di apparato radicale e fusto, si è visto esserci una forte correlazione tra la posizione in cui le piante erano poste all'interno della camera di crescita (quella precedente al cambio con una versione più moderna caratterizzata da un sistema di illuminazione maggiormente uniforme) e la loro dimensione. Le piante erano poste su uno scaffale a tre ripiani e sembrerebbe che la posizione (erano posizionate sul ripiano più in alto oppure in quello centrale) e quindi, probabilmente, il livello di intensità luminosa, abbia avuto considerevole influenza sul potenziale di crescita. Come visibile in Fig. 10C, infatti, piante cresciute su ripiani diversi presentano valori di massa del fusto e dell'apparato radicale significativamente differenti. Nello specifico, piante cresciute sulla parte più alta dello scaffale (ripiano 1) sono caratterizzate da una crescita significativamente maggiore rispetto a piante cresciute nel ripiano centrale (ripiano 2). Inoltre, come si può osservare dai risultati del test ANOVA, il diverso genotipo non risulta significativo nello spiegare le differenze osservate, mentre l'interazione tra i fattori ripiano e genotipo appare essere altamente significativa. In base a queste osservazioni, si è voluto indagare se la differente crescita delle piante potesse avere ripercussioni anche sull'espressione di *PT4*. Sembra, infatti, coerente supporre che ad una crescita radicale ridotta sia associata una bassa colonizzazione da parte del fungo AM (apparati radicali più estesi incrementano la probabilità di incontrare il fungo) e quindi una diminuzione dell'espressione di *PT4*. Volendo meglio approfondire queste osservazioni, considerando l'effetto che la posizione ha avuto sulla crescita, il valore di $2^{-\Delta Ct}$ è stato correlato con la massa dell'apparato radicale. In Fig. 10D, è possibile osservare una correlazione positiva (R = 0.65) tra il valore di $2^{-\Delta Ct}$ (quindi dell'espressione di *PT4*) e la massa dell'apparato radicale (p-value = 0.0089 **). L'incremento dell'espressione di *PT4* in relazione alla massa non è determinato dall'aumento della massa radicale in sé, ma dal fatto che, come visto, ad una

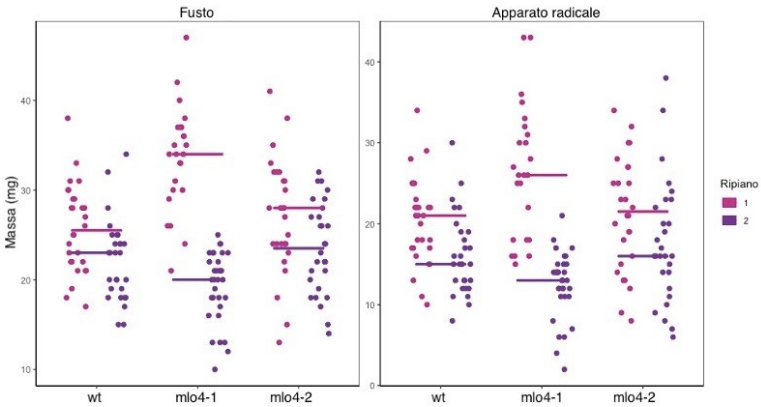
maggiore estensione dell'apparato è associata una maggiore probabilità di incontrare il fungo. Questa correlazione osservata risulta particolarmente apprezzabile nel caso di piante WT (potrebbe essere dovuto proprio al fatto che il mutante dovrebbe presentare livelli di colonizzazione AM inferiori).



A



B



Test ANOVA

Fusto:
Genotipo p-value = 0.209
Ripiano **p-value = 9.12e-16 *****
Genotipo*Ripiano **p-value = 2.00e-8 *****

Apparato radicale:
Genotipo p-value = 0.475
Ripiano **p-value = 8.07e-12 *****
Genotipo*Ripiano **p-value = 1.56e-5 *****

C

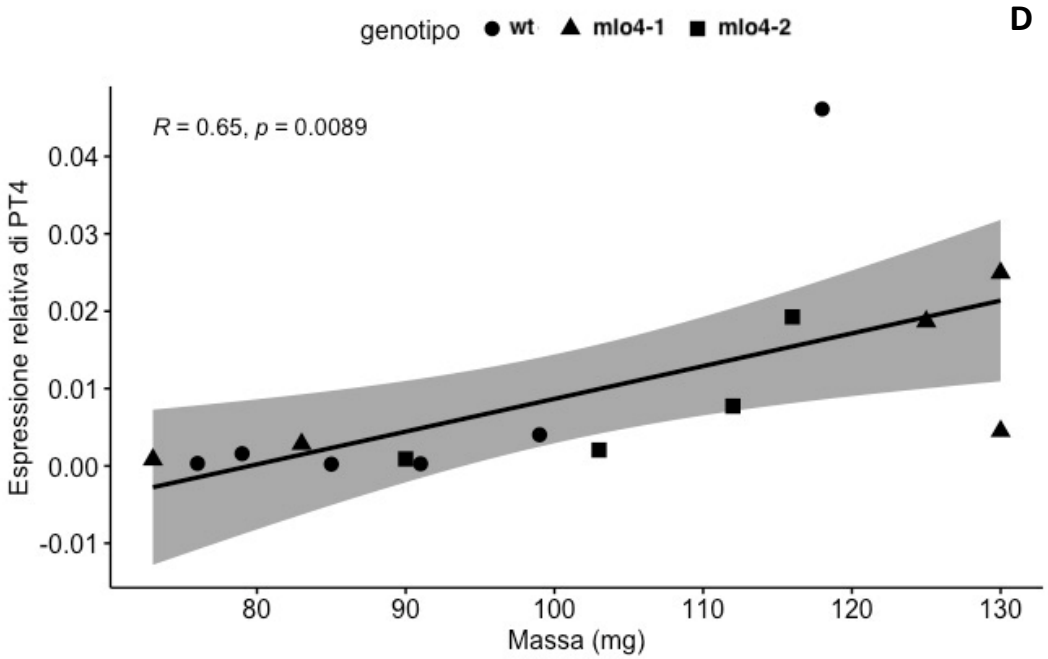


Figura 10 Risultati della quantificazione della colonizzazione fungina ottenuti mediante test Trouvelot e RT-qPCR . A) I grafici illustrano i valori di (a partire dall'alto a sinistra): %F (frequenza di micorriza nell'apparato radicale), %M (intensità della colonizzazione micorrizica nell'apparato radicale), %m (intensità relativa della colonizzazione micorrizica), %a (abbondanza relativa di arbuscoli) e %A (abbondanza di arbuscoli nell'apparato radicale). Le analisi statistiche sono state svolte mediante test ANOVA e correzione post-hoc di Tuckey. B) Grafico in cui viene mostrata l'espressione relativa di *PT4* (valore di $2^{-\Delta Ct}$) di piante WT e mutanti. In C) sono rappresentati in colori diversi i dati di massa di fusto ed apparato radicale in base alla posizione di crescita. D) Raffigura una curva di crescita in cui si può apprezzare la correlazione positiva massa dell'apparato radicale – espressione relativa di *PT4*.

3.4 I mutanti *mlo4-1* sono caratterizzati da crescita rallentata

Oltre a quantificare il livello di micorrizazione tramite test Trouvelot, è stata effettuata la misurazione della massa di apparato radicale e fusto, il calcolo della lunghezza dell'apparato radicale e la conta del numero totale di radici. I dati sono stati analizzati mediante test ANOVA per verificare se il genotipo avesse una qualche influenza sul parametro considerato. Nel caso della massa, sia per quanto riguarda fusto che radice, è possibile osservare che, in entrambi i *time-point*, la differenza risulta essere significativa o altamente significativa (Fig. 11A). Effettuando il confronto a coppie mediante test post-hoc di Tuckey si evince che i mutanti *mlo4-1* sono caratterizzati da una crescita rallentata rispetto a WT ed ai mutanti *mlo4-3*. Inoltre, mentre questa differenza nei confronti del WT è significativa fin dal primo *time-point*, quella con *mlo4-3* lo diventa a 20 dpi. Questo potrebbe essere indice del fatto che, sebbene anche la mutazione a livello del settimo esone di *MLO4* possa determinare un lieve rallentamento nella crescita, questi mutanti recuperano rapidamente raggiungendo i livelli del WT a *time-point* successivi. A 20 dpi, infatti, la massa dell'apparato radicale e del fusto di WT e mutanti *mlo4-3* non appaiono essere significativamente differenti. La lunghezza dell'apparato radicale e la conta del numero di radici è stata effettuata mediante

RhizoVision Explorer. Per quanto concerne la lunghezza dell'apparato radicale, a 17 dpi non risultano esserci differenze significative mentre a 20 dpi piante WT e mutanti *mlo4-1* sono significativamente diversi (p-value = 0.0249), mentre i mutanti *mlo4-3* non risultano essere differenti né rispetto al WT né rispetto ai mutanti *mlo4-1* (Fig. 11B). Anche la misurazione della lunghezza delle radici confermerebbe quindi il fatto che i mutanti *mlo4-1* sono caratterizzati da una crescita minore, mentre i mutanti *mlo4-3* presentano un livello di sviluppo intermedio, leggermente inferiore o paragonabile a quello delle piante WT. Infine, per quanto riguarda il numero di radici che compongono l'apparato radicale non risultano esserci differenze significative tra WT e mutanti, né a 17 dpi né a 20 dpi (Fig. 11C). In conclusione, i dati e le analisi svolte permettono di affermare con una certa sicurezza che i mutanti *mlo4-1* sono caratterizzati da una crescita rallentata sia per quanto riguarda l'apparato radicale che per la parte vegetativa della pianta. Il numero totale di radici, invece, non sembra essere dissimile. Quindi, ragionevolmente, i mutanti *mlo4-1* producono un numero di radici paragonabile a quello delle piante WT ma di estensione inferiore. Questo può avere ripercussioni sullo stato di salute e nutrizione della pianta. Ad esempio, un apparato radicale meno sviluppato può determinare una minore capacità di approvvigionamento di acqua e nutrienti da parte della pianta, il che spiegherebbe anche i valori di massa del fusto che risultano inferiori nel mutante in questione.
Come detto in precedenza, le piante utilizzate derivano da una collezione di mutanti *LORE1*, trasposone endogeno di circa 5 kb che si inserisce nel gene determinandone perdita di funzione (porta alla formazione di codoni di stop o *shift* dell'*open reading frame*). Presentano numerosi vantaggi, tra cui il fatto che i mutanti sono stabili, le piante non sono transgeniche, le mutazioni sono ereditabili e i fenotipi derivati vengono mantenuti nel corso delle generazioni (Małolepszy, et al. 2016). In realtà, il fenotipo individuato per *mlo4-1* potrebbe non essere determinato dall'inserzione del trasposone in corrispondenza del primo esone del gene *MLO*, ma da altre mutazioni in *background*. È stato però visto che, in generale, il numero di mutazioni di *background* in popolazioni di mutanti *LORE1* è basso (Małolepszy, et al. 2016). Questo significa che i mutanti *mlo4-1* e *mlo4-3* potrebbero essere fenotipicamente identici solo che nel caso di mlo4-1 agiscono altre mutazioni che determinano la formazione di un fenotipo accentuato. Ad esempio, si è visto che il gene Lj0g3v03036 presenta livelli di espressione elevati nella radice. Questo gene codifica per un fattore di trascrizione trielica GT-2, la cui funzione predetta consiste nell'incrementare la risposta di difesa delle piante contro infezioni patogene e nella *down*-regolazione di geni coinvolti nella crescita della pianta. Una mutazione che porta al silenziamento di questo gene potrebbe quindi determinare un minore sviluppo dell'apparato radicale. Per accertarsi che il fenotipo sia effettivamente determinato dal *knock-out* di MLO4, si potrebbe effettuare un test di complementazione e verificare se il fenotipo mutato viene confermato o meno.

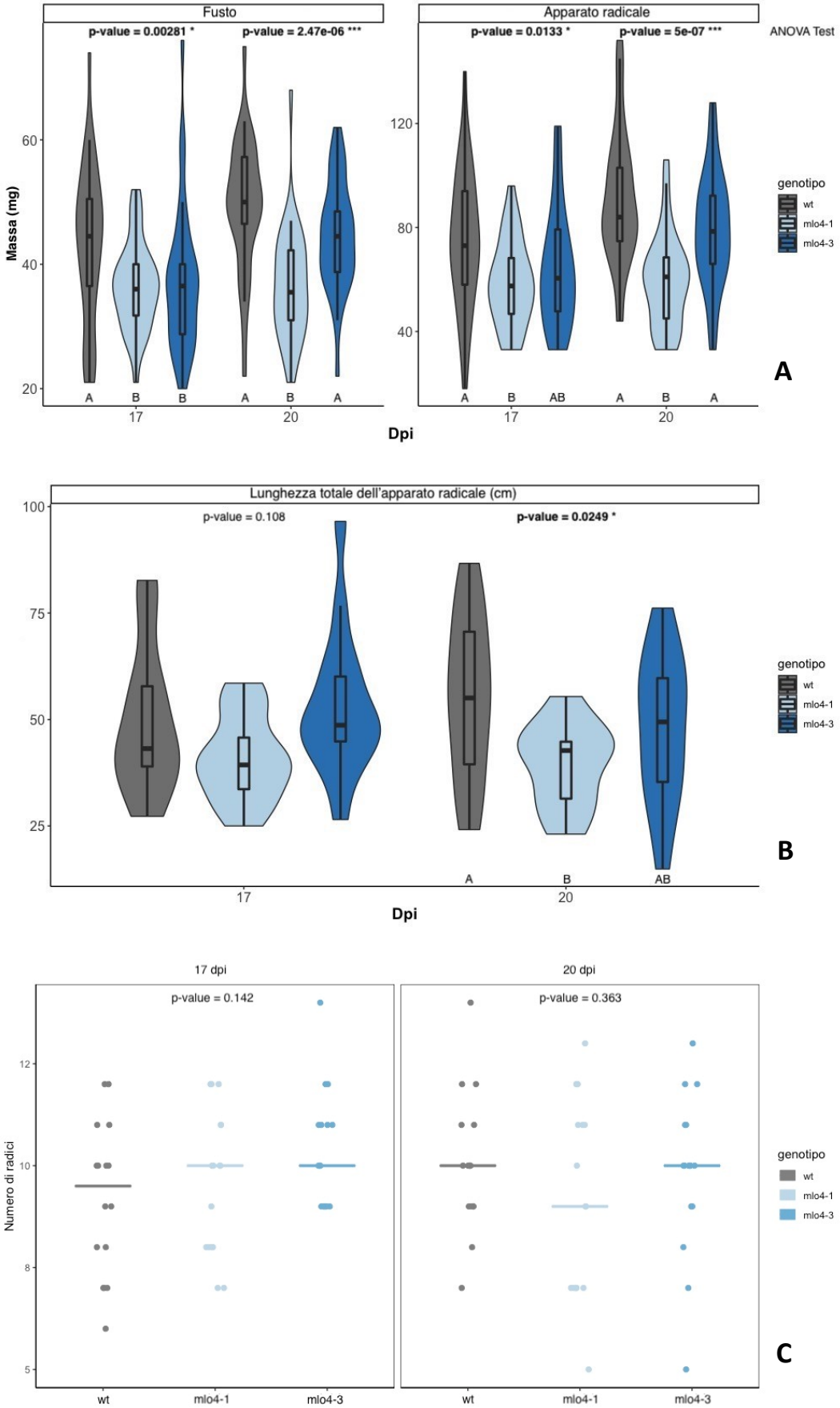


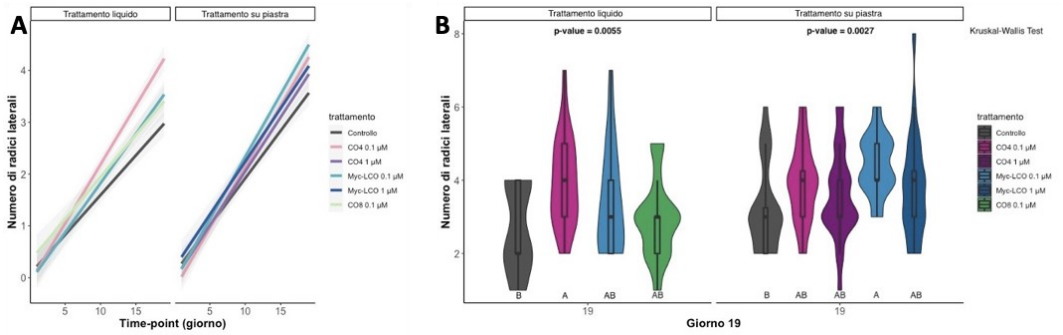
Figura 11. Mutanti *mlo4-1* crescono meno rispetto a piante WT e *mlo4-3*. A) Violin plot in cui vengono mostrati i valori di massa (mg) di fusto ed apparato radicale. In B), invece, vengono

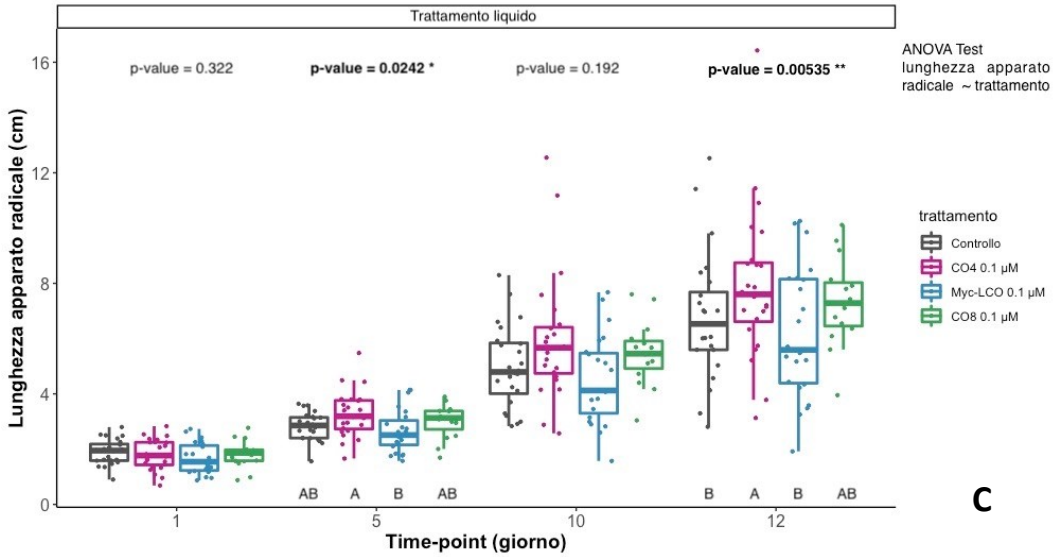
presentati i dati di lunghezza totale dell'apparato radicale. Infine, C) illustra il numero totale di radici che compongono l'apparato radicale di ciascuna pianta. Confronto effettuato tra piante *WT*, *mlo4-1* e *mlo4-3*. Analisi statistiche svolte mediante test ANOVA. Le lettere indicano differenze statisticamente significative tra i vari gruppi (p-value ≤ 0.05) a seguito di test post-hoc di Dunn.

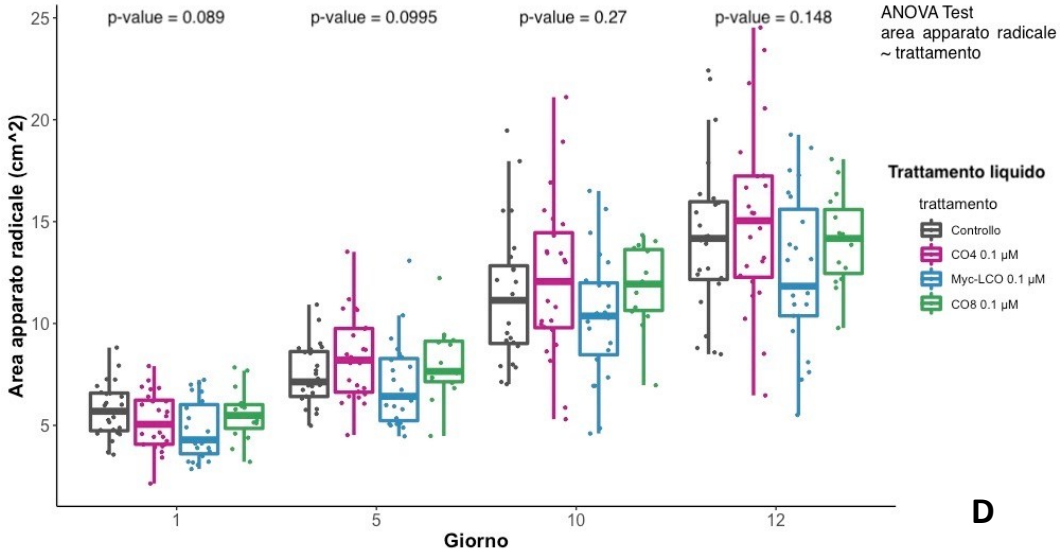
3.5 I trattamenti con CO4 10^{-7} M e Myc-LCO 10^{-7} M inducono la formazione di radici laterali nel WT

Le molecole derivate dalla chitina, oltre a promuovere la risposta immunologica della pianta, sono anche coinvolte nella formazione di interazioni benefiche. I funghi AM producono, infatti, CO a catena corta (CO4 e CO5) e LCO, molecole che possiedono un residuo *N-acetilico* sullo zucchero terminale non-riducente della catena di chitina. Oltre a promuovere la simbiosi, sembrano anche essere coinvolte nella crescita radicale e nella produzione di radici laterali. È stato infatti visto che, in riso, entrambe queste molecole sono coinvolte nel processo di accrescimento radicale, mentre *Medicago truncatula* sembra rispondere solo a LCO (Sun, Miller, et al. 2015). Per verificare se queste molecole svolgono una funzione analoga anche in *L. japonicus*, piante WT sono state sottoposte a diversi trattamenti direttamente in piastra oppure in liquido. Sono state selezionate 24 piante per trattamento ponendo, equidistanti tra loro, 8 piante in ciascuna piastra quadrata riempita con 60 ml di L.A. (PO_4 200 µM) addizionato con Agar 0.8%. Nel caso in cui il trattamento sia stato svolto direttamente in piastra, il terreno è stato addizionato con la molecola di interesse in due possibili diverse concentrazioni (10^{-7} oppure 10^{-6} M). Invece, nel caso di trattamento liquido, le piante sono state lasciate in immersione per un'ora in medium L.A. (PO_4 200 µM) con la molecola di interesse e successivamente trasferite in piastre quadrate (60 ml di L.A. + Agar). Lo sviluppo radicale è stato monitorato fino al diciannovesimo giorno di crescita, *time-point* su cui sono state eseguite le analisi statistiche (Fig. 12B). Monitorando la curva di crescita che rappresenta il numero di radici laterali presenti nei differenti giorni considerati, è possibile osservare che le piante che sono state sottoposte a trattamento liquido con CO4 10^{-7} M sono caratterizzate da un numero di radici laterali mediamente più elevato rispetto alle piante utilizzate come controllo (Fig. 12A). Gli altri trattamenti (Myc-LCO 10^{-7} M e CO8 10^{-7} M) non determinano, invece, differenze significative rispetto al controllo. Inoltre, non risultano significativamente differenti nemmeno rispetto alle piante trattate con CO4 10^{-7} M. Si noti, inoltre, che solamente per il controllo e per il trattamento con CO8 10^{-7} M si sono sviluppate piante con unicamente la radice principale a fittone, prive di sviluppo radicale laterale. Considerando, invece, le piante sottoposte a trattamento su piastra, Myc-LCO 10^{-7} M sembra essere responsabile della maggiore produzione di radici laterali. Gli altri trattamenti, invece, non sembrano produrre nessuna differenza significativa rispetto al controllo. Come ulteriore analisi, è stato preso in considerazione lo sviluppo dell'intero apparato radicale ed è stata misurata la sua lunghezza ed area tramite il software RhizoVision Explorer (Seethepalli e York 2020), prendendo in considerazione i parametri '*Total Root Lenght*' e '*Convex Area*'. Per quest'analisi sono state misurate le piante fino al dodicesimo giorno. Successivamente, infatti, le radici di piante diverse tendono a

sovrapporsi, rendendo impossibile la misurazione tramite RhizoVision Explorer. È stato eseguito un test ANOVA ad una via (oppure Kruskal-Wallis nel caso in cui i dati non presentassero le condizioni necessarie per l'utilizzo dell'ANOVA) per verificare se le variazioni nella lunghezza e nell'area dell'apparato radicale dipendessero dal trattamento a cui le piante sono state sottoposte. Considerando separatamente le due tipologie di trattamento, è possibile osservare che al quinto giorno la lunghezza dell'apparato radicale di piante sottoposte a trattamento liquido risulta significativamente differente ($p\text{-value} < 0.05$). Nello specifico, piante sottoposte a trattamento con CO4 10^{-7} M presentano un apparato radicale maggiormente sviluppato rispetto a piante trattate con Myc-LCO 10^{-7} M. Questa differenza sembra però perdersi al decimo giorno. Al dodicesimo giorno, l'apparato radicale di piante trattate con CO4 10^{-7} M risulta essere più sviluppato rispetto al controllo ed a piante trattate con Myc-LCO 10^{-7} M. CO8 10^{-7} M sembra determinare una crescita intermedia tra gli altri trattamenti (Fig. 12C). Per quanto riguarda le piante che hanno subito trattamento direttamente su piastra, invece, non risultano esserci differenze significative tra le diverse molecole di chitina utilizzate (ed alle diverse concentrazioni) nei quattro *time-point* considerati (Fig. 12E). Infine, prendendo in considerazione i valori di area dell'apparato radicale non risultano esserci differenze significative tra le diverse molecole, sia in caso di trattamento liquido (Fig. 12D) che in caso di trattamento su piastra (Fig. 12F). Riassumendo, si è visto che il trattamento in liquido con CO4 10^{-7} M stimola la crescita di radici laterali determinando parallelamente anche una maggiore lunghezza totale dell'apparato rispetto al WT. Le differenze con le altre tipologie di trattamenti (Myc-LCO 10^{-7} M e CO8 10^{-7}) non sembra, invece, essere significativa.




Trattamento liquido
p-value = 0.322
p-value = 0.0242 *
p-value = 0.192
p-value = 0.00535 **
ANOVA Test
lunghezza apparato radicale ~ trattamento
Lunghezza apparato radicale (cm)
Time-point (giorno)
AB A B AB
B A B AB
trattamento
Controllo
CO4 0.1 µM
Myc-LCO 0.1 µM
CO8 0.1 µM
C


p-value = 0.089
p-value = 0.0995
p-value = 0.27
p-value = 0.148
ANOVA Test
area apparato radicale ~ trattamento
Area apparato radicale (cm^2)
Giorno
Trattamento liquido
trattamento
Controllo
CO4 0.1 µM
Myc-LCO 0.1 µM
CO8 0.1 µM
D

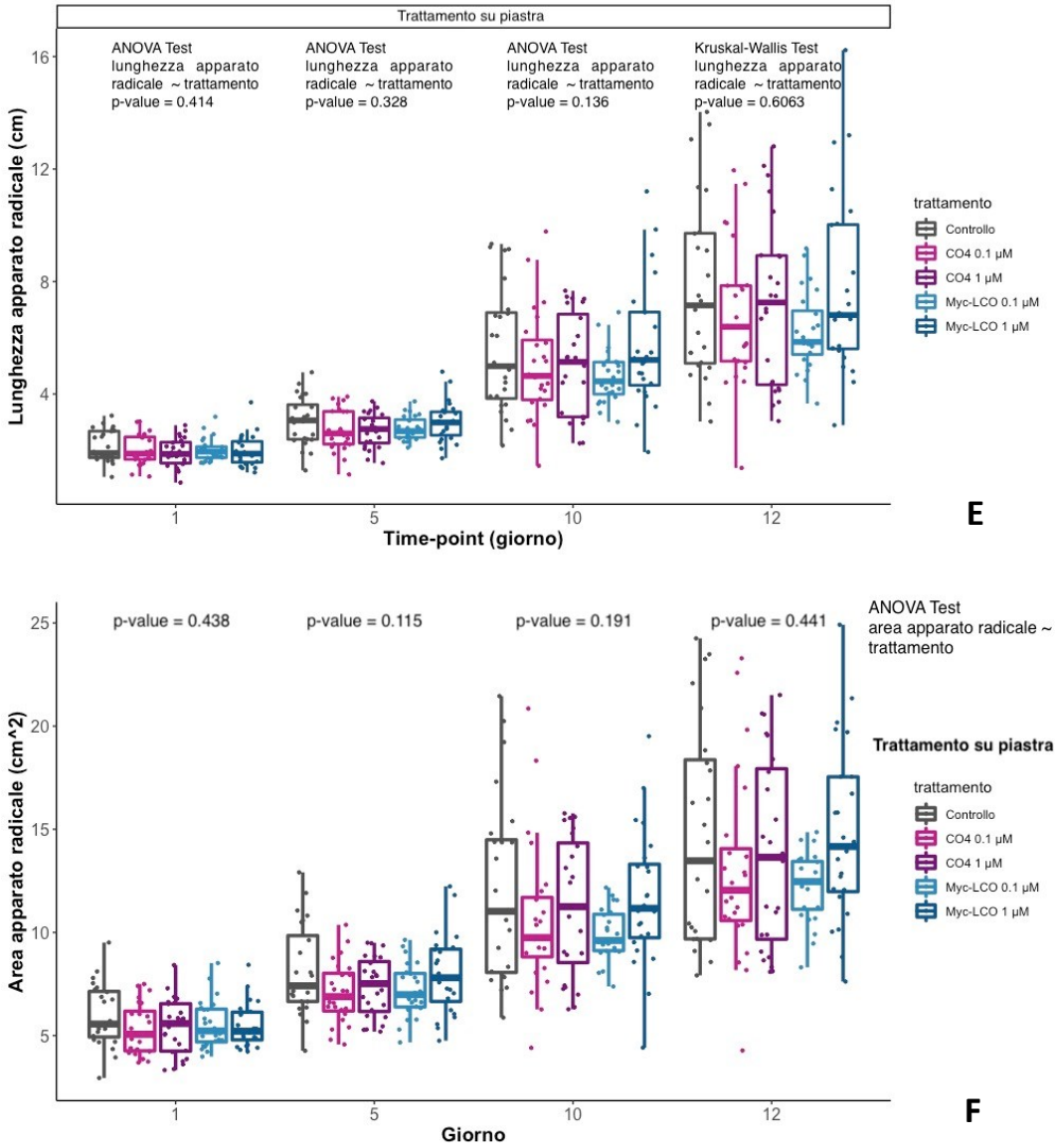


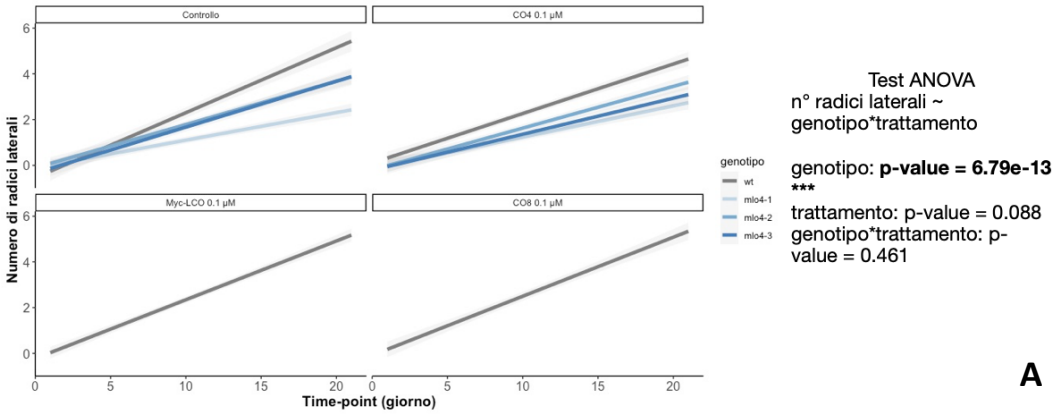
Figura 12. CO4 10^{-7} M e Myc-LCO 10^{-7} M sono responsabili della formazione di un numero maggiore di radici laterali in WT. A) Curva di crescita del numero di radici laterali in *L. japonicus* nei diversi time-point per i due trattamenti (liquido o su piastra) con le diverse molecole di chitina. B) Grafico a violino con box-plot in cui viene mostrato il numero di radici laterali all'ultimo time-point considerato (giorno 19). Le lettere indicano differenze statisticamente significative tra i vari gruppi (p-value < 0.05) a seguito di test Kruskal-Wallis e test post-hoc di Dunn. C) Box-plot in cui viene illustrato l'aumento della lunghezza totale e D) dell'area dell'apparato radicale in quattro diversi time-point per le piante sottoposte a trattamento liquido; E) e F) rappresentano sempre box-plot in cui viene illustrato rispettivamente l'aumento della lunghezza totale e dell'area dell'apparato radicale per le piante sottoposte a trattamento in piastra. Le lettere indicano differenze statisticamente significative tra i vari gruppi (*p≤ 0.05; ** p≤ 0.01; ***p≤ 0.001) a seguito di test ANOVA e correzione post-hoc di Tuckey oppure test di Kruskal-Wallis e post-hoc di Dunn.

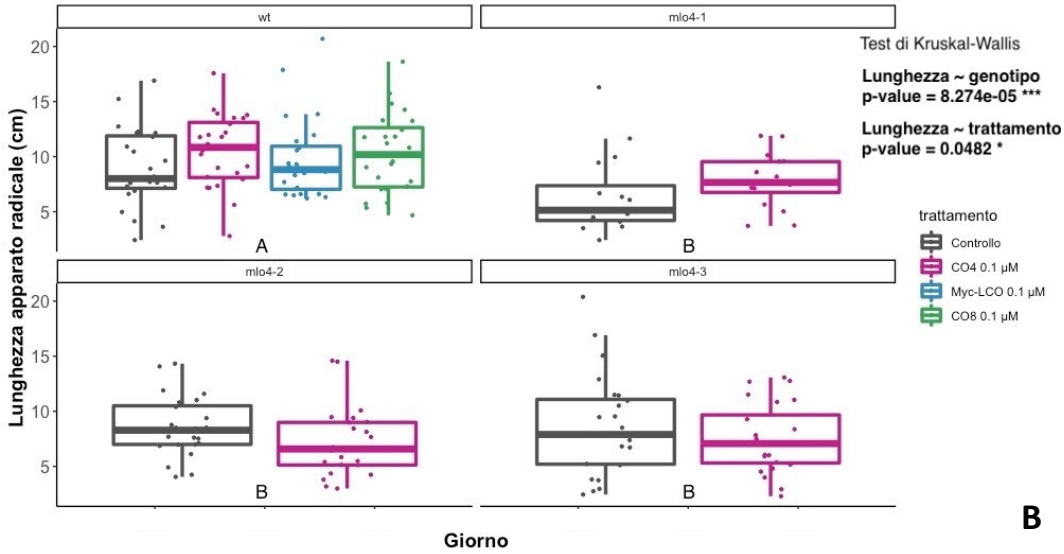
3.6 I mutanti *mlo4* producono un numero minore di radici laterali rispetto al WT

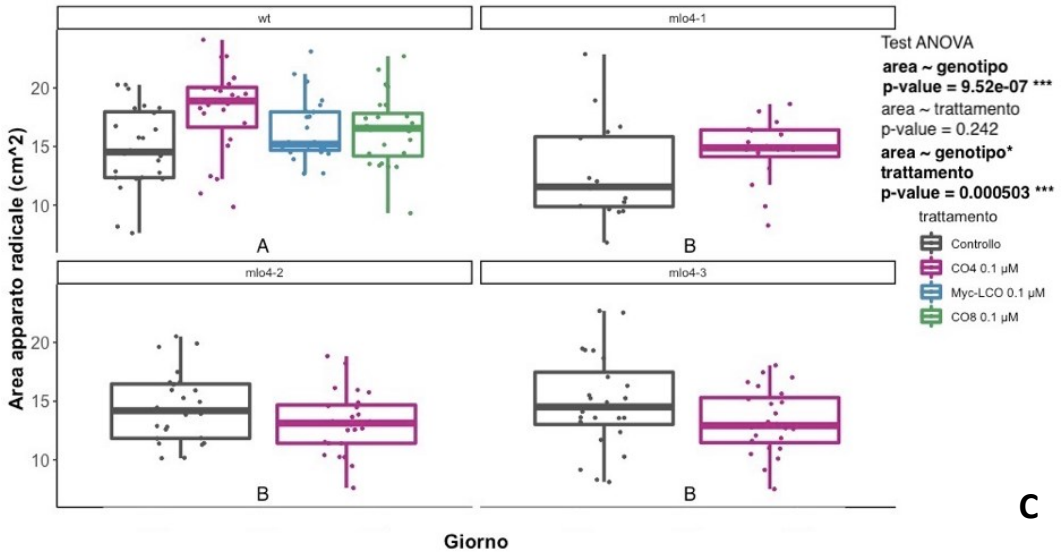
L'esperimento descritto al *Capitolo 3.5* è stato utilizzato come *set-up* di partenza per verificare se molecole differenti potessero avere effetti diversi sulla crescita laterale delle radici in piante WT. In base ai risultati ottenuti, l'esperimento è stato ripetuto effettuando esclusivamente trattamento liquido con stimoli diversi (CO4 10^{-7} M, Myc-LCO 10^{-7} M e CO8 10^{-7} M) non solo per piante WT ma anche mutanti *mlo* (*mlo4-1, mlo4-2* e *mlo4-3*). A causa della mancanza di semi per le linee mutanti, unicamente piante WT sono state trattate con Myc-LCO 10^{-7} M e CO8 10^{-7} M. Come si può osservare in Fig. 13A, le piante WT producono un numero maggiore di radici laterali rispetto ai mutanti, indipendentemente dal trattamento a cui sono state sottoposte. Eseguendo un'analisi della varianza (ANOVA) a due vie per evidenziare la significatività dell'interazione tra genotipo e trattamento sul numero totale di radici laterali, si è visto che il genotipo è altamente significativo (p-value = $6.79e^{-13}$), mentre il trattamento e l'interazione tra i due fattori genotipo e trattamento non risultano statisticamente significativi (rispettivamente, p-value 0.088 e 0.461). in realtà, considerando che la soglia di significatività (p-value ≤ 0.05) è puramente arbitraria e che il valore di p-value per il fattore trattamento non risulta essere troppo distante da questa soglia, sarebbe perlomeno riduttivo concludere che il trattamento non ha alcuna influenza sullo sviluppo di radici laterali. Si consideri, inoltre, che nell'esperimento pilota descritto al paragrafo precedente il trattamento risultava significativo (nello specifico, piante trattate con CO4 10^{-7} M in liquido presentavano un maggiore sviluppo radicale laterale). Successivamente, sono state eseguite ulteriori analisi prendendo in considerazione la lunghezza totale dell'apparato radicale e l'area da esso occupata dopo 12 giorni. Queste misurazioni sono state effettuate mediante RhizoVision Explorer. Il test ANOVA (o Kruskal-Wallis) ha permesso di testare l'effetto del genotipo sulla variabile considerata. Analizzando la lunghezza dell'apparato radicale, sia il genotipo che il trattamento sono significativi (Fig. 13B). Per quanto riguarda l'area, il fattore 'trattamento' considerato singolarmente non risulta significativo (p-value = 0.242), ma l'associazione genotipo*trattamento lo è (p-value = 0.000503 ***) (Fig. 13C). In entrambi i casi, sia per quanto riguarda la lunghezza totale dell'apparato radicale che per l'area, il genotipo risulta essere altamente significativo (p-value < 0.001). Questi risultati sembrano quindi confermare che il genotipo delle piante risulta fondamentale nel determinare non solo il numero di radici radicali che la pianta produce, ma anche l'estensione totale del suo apparato radicale. Considerando, però, il numero limitato di piante mutanti a disposizione, risulta necessario replicare l'esperimento per poter confermare con maggiore sicurezza i risultati ottenuti.

Figura 13 (pagina seguente). Il genotipo ha un effetto maggiore rispetto al trattamento sul numero di radici laterali prodotte. A) Curve di crescita del numero di radici laterali in piante WT e mutanti di *L. japonicus* nei diversi time-point divise in base al trattamento somministrato. B) e C) Box-plot in cui vengono illustrati i dati di lunghezza e area dell'apparato radicale (giorno 12) divisi in base al genotipo. Le lettere indicano differenze statisticamente significative tra i vari genotipi. In B) è stato eseguito il test non-parametrico di Kruskal-Wallis (distribuzione dei dati non normale)

per verificare se c'è un effetto del genotipo (o del trattamento) sulla lunghezza dell'apparato radicale). In C) è stato seguito un test ANOVA a due vie (si è verificato l'effetto dell'interazione genotipo*trattamento sulla lunghezza dell'apparato radicale).







3.7 I mutanti *mlo1A-1* mostrano una risposta accelerata al gravitropismo

I mutanti MLO (clade I), oltre a mostrare una crescita aberrante dell'apparato radicale in seguito a percezione di ostacoli fisici nel terreno, sono caratterizzati da una risposta al gravitropismo accelerata (*vedi capitolo 1.3.2*). Per analizzare la risposta gravitropica, semi WT e mutanti sono stati fatti crescere in piastre quadrate con terreno ½ L.A. + Agar 0.8% per tre giorni (16 h luce/ 8 h buio); successivamente, le piastre sono state ruotate di 90° in direzione oraria. In risposta alla gravità, le radici si piegano finché l'apice radicale non diventa parallelo al nuovo vettore gravitazionale. L'angolo di curvatura della radice è stato misurato con il software ImageJ dopo 4, 8 e 24 ore. Dal momento che i dati non presentano distribuzione normale, per l'analisi statistica è stato utilizzato il test non-parametrico di Kruskal-Wallis. In fase precoce (4 ore dopo) non si osservano differenze significative tra WT e mutanti (p-value > 0.05). Dopo 8 ore, dal confronto a coppie effettuato mediante test di Dunn, si evince che i mutanti *mlo1A-1* e *mlo4-1* sono significativamente differenti tra loro (p-value = 0.0042), ma non rispetto al WT ed agli altri due mutanti *mlo4-2* e *mlo4-3*. L'angolo di curvatura medio dell'apice delle piante WT, infatti, è pari a 51.15°, mentre quello dei mutanti *mlo1A-1* è 61.86°. Dopo 24 ore, *mlo1A-1* risulta significativamente differente rispetto al WT (p-value = 0.00404) e ai mutanti *mlo4-1* (p-value < 0.001) e *mlo4-2* (p-value = 0.0112), ma non a *mlo4-3*. *Mlo4-1* e *mlo4-3* risultano significativamente diversi tra loro (p-value < 0.001). Inoltre, il valore medio di curvatura delle radici nel WT a questo *time-point* non ha ancora raggiunto i 90° (70.28°), quindi non risulta parallelo al nuovo vettore gravitazionale, contrariamente a *mlo4-1* il cui angolo medio di curvatura dopo 24 ore è pari a 87.63°. Dunque, sembrerebbe che il gene *MLO1A.1* sia coinvolto nella risposta gravitropica in *L. japonicus*. Il mutante per questo gene, infatti, causa una curvatura dell'apice più rapida rispetto al WT. Come osservato, questa differenza sarebbe visibile almeno dopo quattro ore dal cambiamento del vettore gravitazionale. I mutanti *mlo4* apparentemente mostrerebbero invece una risposta piuttosto eterogenea, soprattutto in *time-point* tardivi (24 ore dopo la rotazione delle piastre). Infatti, dopo 4 e 8 ore non manifestano nessuna differenza significativa, mentre nell'ultimo time-point considerato, *mlo4-3* manifesta una variazione significativa nella curvatura dell'apice, sia in confronto al time-point precedente, sia rispetto agli altri mutanti *mlo4*. Le conclusioni a cui si è giunti non possono essere considerate definitive in quanto non è stato possibile effettuare una replica biologica a causa della mancanza di semi per le linee mutanti. Inoltre, la variabilità riscontrata nel caso delle linee mutanti *mlo4* può essere giustificata dalla presenza di mutazioni di *background* che possono amplificare il fenotipo osservato.

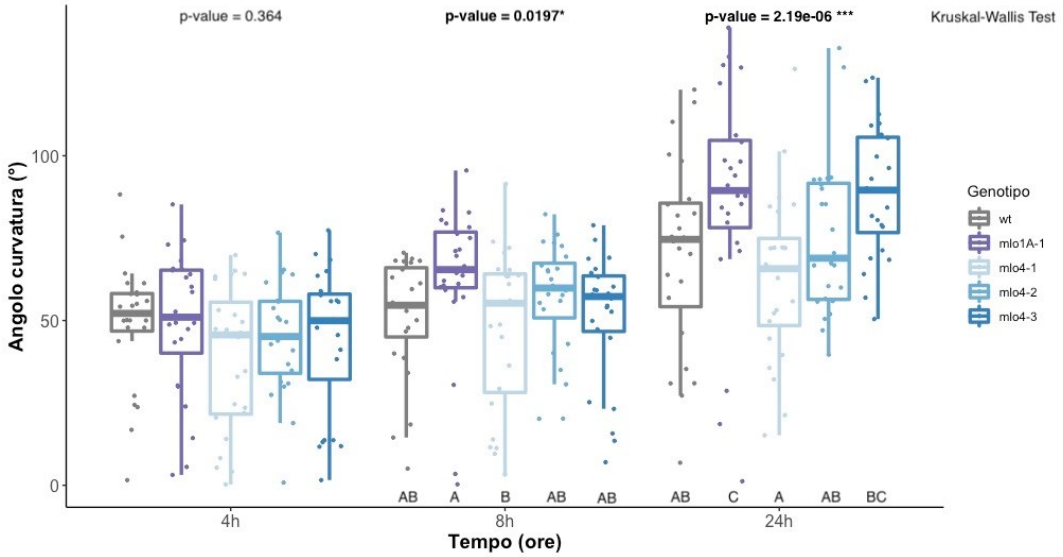


Figura 14. Quantificazione della risposta al gravitropismo per diversi mutanti *MLO* di L. japonicus. I boxplot rappresentano il primo e terzo quartile dei valori. La linea spessa rappresenta la mediana. Le lettere indicano differenze statisticamente significative tra i vari gruppi (p-value < 0.05) a seguito di test Kruskal-Wallis e test post-hoc di Dunn.

3.8 Quantificazione dei segnali Ca^{2+} in risposta a stimoli simbiotici

Il cambiamento nella concentrazione di Ca^{2+} intracellulare in radici di *L. japonicus* è stato monitorato grazie al reporter aequorina con localizzazione specifica solamente per il nucleo oppure per il citosol (Mehlmer, et al. 2012; Binci, et al. 2021) sotto il controllo del promotore costitutivo *UBIQUITIN10* di *L. japonicus*. Questi costrutti sono stati utilizzati per trasformare *L. japonicus* Gifu tramite il sistema *hairy roots*. La corretta localizzazione delle sonde del Ca^{2+} è stata verificata in studi precedenti grazie ad analisi al microscopio confocale. Una volta ottenuta la pianta composita, segmenti di radice lunghi circa 5 mm sono stati posti in una cameretta oscura all'interno di un luminometro, stimolati con segnali fungini purificati CO4 (frammenti di chitina corti associati ad interazioni benefiche con i funghi AM) e sono stati misurati cambiamenti nella [Ca^{2+}] intracellulare, separatamente a livello di nucleo o di citosol. Come si può osservare in Fig. 15, CO4 è in grado di indurre cambiamenti transienti nella [Ca^{2+}] intracellulare sia a livello del nucleo che a livello del citosol. Analizzando i grafici in cui viene mostrata la variazione della [Ca^{2+}] media derivata da almeno sei tracce (Fig. 15A, D), considerando la [Ca^{2+}] al picco, si può osservare che non c'è una differenza significativa tra WT e mutante *mlo*, sia nel nucleo che nel citosol. Bisogna però considerare che, nel caso del nucleo, il valore di p-value (0.0715) è molto vicino alla soglia di significatività 0.05. Analizzando, invece, l'integrale dell'area sottesa alla curva si può vedere che nel caso del nucleo (Fig. 15B), WT e mutante non presentano differenze significative né considerando la curva totale né esaminando separatamente le due fasi (fase 1: 0-10 minuti dopo lo stimolo; fase 2: 10-30 minuti dopo lo stimolo). Si può però notare che il mutante è caratterizzato da una dinamica temporalmente più lenta rispetto al WT (la seconda gobba in fase 2,

generalmente associata alla simbiosi AM, sembra durare meno nel tempo). Nel caso del citosol (Fig. 15E), considerando il totale dell'integrale dell'area sottesa alla curva, invece, le differenze tra WT e mutante risultano statisticamente significative (lo stesso vale considerando la fase 2). Curiosamente, inoltre, la curva del Ca^{2+} del mutante mostra un andamento opposto nel nucleo (in cui risulta più bassa rispetto al WT) e nel citosol (dove, invece, è più alta, in particolare durante la fase 2 dove la seconda gobba appare maggiormente marcata).

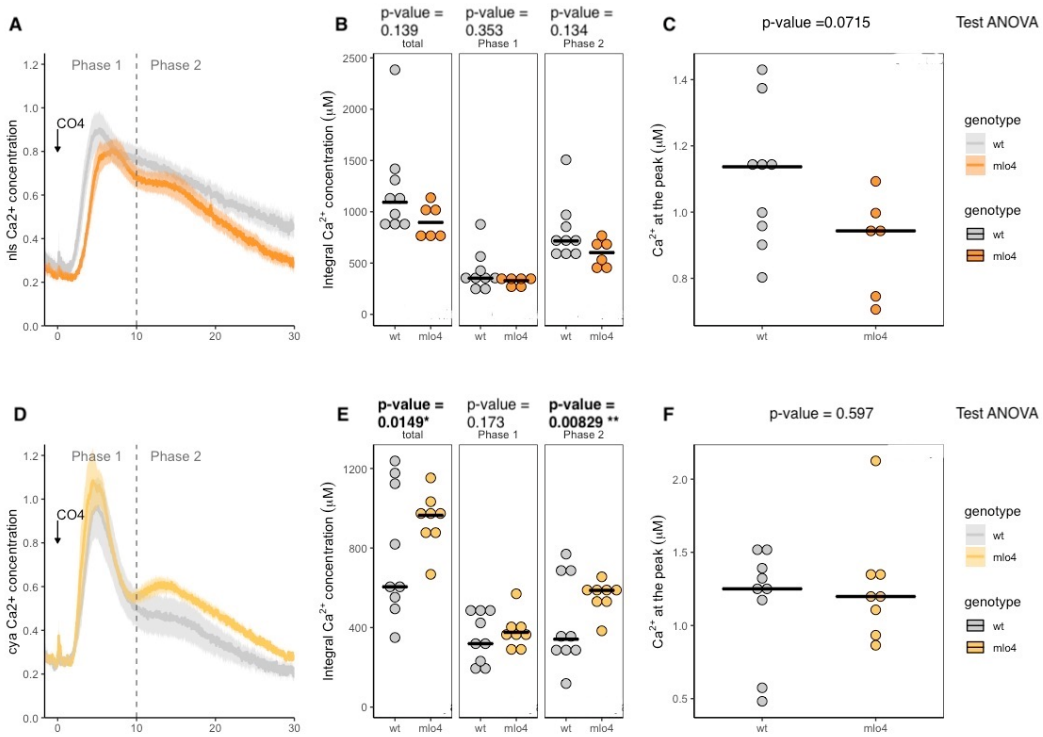


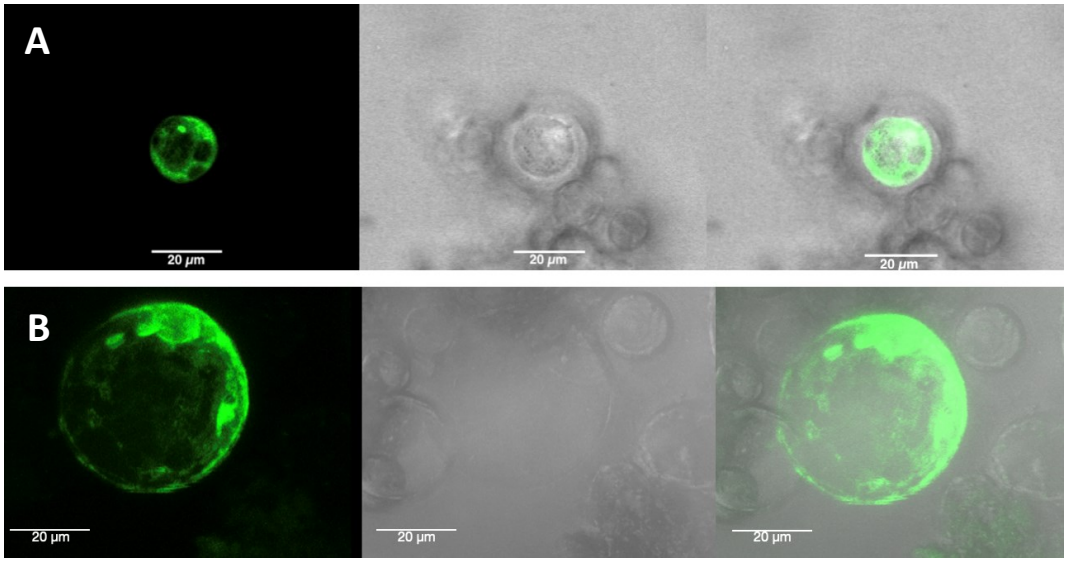
Figura 15. Monitoraggio di [Ca^{2+}] nucleare e citosolico in segmenti di radici di piante composite WT e mutanti *mlo* di *L. japonicus*. Le misurazioni di [Ca^{2+}] sono state effettuate in risposta a 10^{-7} M CO4. In A e D i dati sono presentati come media ± SE (ombreggiatura) di un numero ≥ 6 tracce da almeno 2 diverse piante composite (trasformazione indipendente). Le frecce indicano il tempo di iniezione dello stimolo (tempo 0). La linea tratteggiata separa la fase 1 (0-10 minuti dopo lo stimolo) dalla fase 2 (10-30 minuti dopo lo stimolo). In B) ed E) i punti rappresentano l'integrale di [Ca^{2+}] per ogni traccia in tutta la corsa e nelle due fasi distinte. In C) e F), invece, rappresentano la [Ca^{2+}] massima. La linea nera rappresenta la mediana in ciascun gruppo.

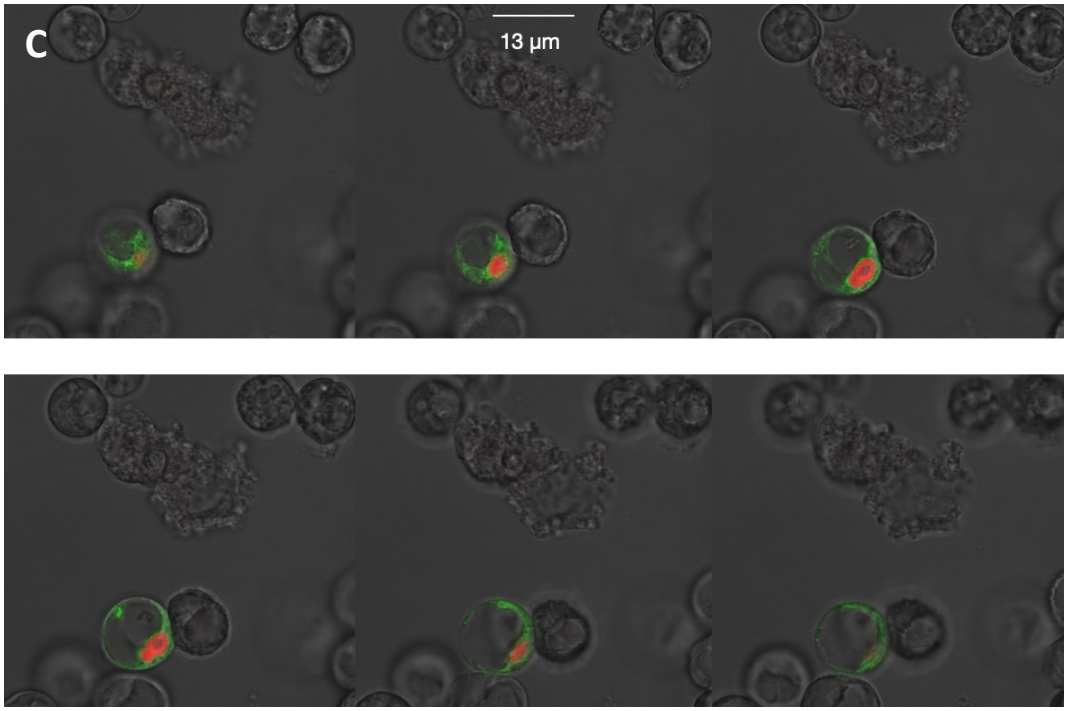
3.9 MLO4 localizza a livello del sistema endomembranoso

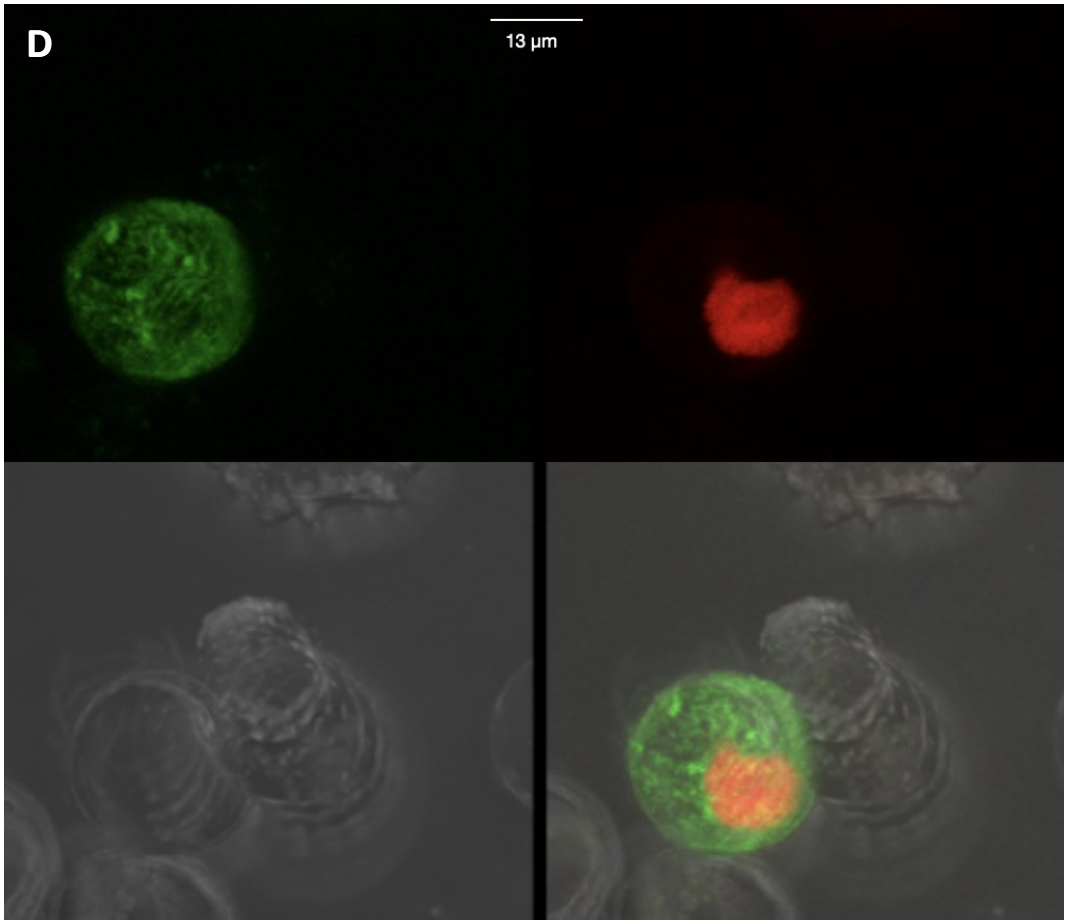
Per determinare la localizzazione di MLO4 a livello cellulare e sub-cellulare sono stati utilizzati come sistema eterologo protoplasti di *Arabidopsis thaliana* La localizzazione *in situ*, oltre a rappresentare un punto di partenza fondamentale nel determinare la funzione della proteina, spesso risulta il metodo migliore in quanto programmi di localizzazione *in silico* si rivelano spesso inconclusivi ed incapaci di localizzare una proteina in siti sub-cellulari multipli (Richly e Leinster 2004; Heazlewood, et al. 2005; Reumann, et al. 2011). L'isolamento dei protoplasti, cellule vegetali prive di parete, fornisce un sistema sperimentale versatile per l'espressione transiente di geni di interesse. I protoplasti sono stati isolati e

trasformati come descritto al *Capitolo 2.21*. Per la trasformazione, sono stati utilizzati i seguenti costrutti: pLjUBI:MLO4-GFP-tUBI (GG125) e pLjUBi:MLO4-linkerGFP-3xmcherry (GG165). I protoplasti sono stati osservati tramite microscopio confocale (Leica SP5; ingrandimento 20x e 63x). Come controllo positivo di trasformazione è stata utilizzata l'aequorina citosolica (Fig. 16A) che garantisce il corretto funzionamento della GFP. Per localizzare la proteina MLO4 a livello sub-cellulare, altri protoplasti sono stati trasformati con il costrutto pLjUBI:MLO4-GFP-tUBI. Contrariamente a quanto precedentemente sospettato, supponendo un ruolo di MLO4 nella percezione dei segnali fungini e quindi nelle fasi inziali della simbiosi, la proteina non sembra localizzare a livello di membrana plasmatica. In Fig. 16B, infatti, è possibile osservare una fluorescenza diffusa che sembra delineare una struttura disposta attorno al nucleo (involucro nucleare) e posta in continuità con esso (reticolo endoplasmatico e apparato del Golgi). Per confermare questa ipotesi, ulteriori protoplasti sono stati trasformati con pLjUBi:MLO4-linkerGFP-3xmcherry, costrutto che permette di mettere in evidenza il nucleo (colorato di rosso) e di distinguerlo dalla regione in cui localizza MLO4. Lo Z-stack mostrato in Fig. 16C sembrerebbe confermare la localizzazione a livello di regione peri-nucleare e reticolo endoplasmatico. In realtà, ciò non esclude una possibile attività di MLO4 a livello della membrana plasmatica dove potrebbe giungere grazie a vescicole di fusione prodotte dall'apparato del Golgi. Bisogna anche tenere in considerazione che questo sistema non permette di garantire la funzionalità della proteina di interesse ma unicamente di accertarne il corretto *folding* della struttura 3D.

Figura 16 (pagina seguente). Immagini ottenute tramite microscopio confocale LEICA SP5 (63x). A) e B) mostrano immagini di protoplasti trasformati rispettivamente con la GFP citosolica e con pLjUBI:MLO4-GFP-tUBI (GG125). Le immagini sono divise in tre riquadri: il primo riquadro mostra l'osservazione del campione a fluorescenza, il secondo in campo visibile ed il terzo permette di apprezzare la sovrapposizione dei due campi. In C) è rappresentato uno Z-stack di un protoplasto trasformato pLjUBi:MLO4-linkerGFP-3xmcherry (GG165). Affianco D) la *Maximum Intensity Projection* dello stesso.


A
20 µm
20 µm
20 µm
B
20 µm
20 µm
20 µm


C
13 µm


D
13 µm

4 DISCUSSIONE

La simbiosi AM è una delle più importanti forme di interazione tra piante e microrganismi del suolo in quanto il fungo favorisce l'ospite fornendo acqua e nutrienti altrimenti difficilmente accessibili, permettendo di far fronte a diversi stress abiotici. Il rapporto mutualistico che si viene a creare tra i due organismi è però estremamente complesso in quanto richiede considerevoli cambiamenti a livello trascrizionale e cellulare della pianta ospite. Inoltre, nonostante il crescente interesse manifestato negli ultimi anni, c'è ancora molto da scoprire per quanto riguarda le vie di segnalazione e regolazione genica. Lo studio di questa interazione si è rivelato particolarmente complesso in quanto avendo a che fare con due diversi organismi è stato spesso difficile individuare le condizioni di crescita ideali che permettessero la sopravvivenza e lo sviluppo di entrambi. In generale, diversi fattori possono influenzare l'efficienza della simbiosi AM, definita come la quantità di C ottenuta grazie all'aumentata crescita determinata dalla simbiosi meno il C speso per supportare il fungo (Tinker, et al. 1994). L'efficienza può essere influenzata a livello di comunità da stress abiotici (disponibilità di micronutrienti presenti nel suolo, micro- e macroclima, dunque condizioni luce ed umidità, effetto antropogenico) e biotici (specie di piante e di funghi AM presenti, interazioni con organismi patogeni e parassiti) (Feddermann, et al. 2009). È stato visto, ad esempio, che piante sottoposte a deficit di nutrienti presentano maggiore colonizzazione, mentre condizioni di luce limitante determinano minore sviluppo del fungo AM, probabilmente per l'incapacità di soddisfare la crescente richiesta di C da parte del fungo (Johnson, et al. 1997). Possono poi intervenire fattori a livello di organismo (risposta e dipendenza della pianta dal fungo AM per quanto riguarda l'approvvigionamento di Pi e la capacità di fissazione del C oppure la capacità del fungo AM di assorbire e trasportare nutrienti) e a livello cellulare/molecolare (compatibilità, trasporto ed acquisizione di Pi) (Feddermann, et al. 2009). Come visto, quindi, probabilmente cambiamenti nell'intensità luminosa presenti nella camera di crescita sono stati determinanti nell'inibire, o perlomeno rallentare, la simbiosi. Osservazioni al microscopio hanno infatti mostrato una pressoché totale assenza di strutture fungine intraradicali. In realtà, altri esperimenti condotti in laboratorio hanno mostrato livelli di micorrizazione attesi, quindi nel determinare la ridotta colonizzazione fungina osservata hanno probabilmente agito altri fattori non meglio identificati.

Il lavoro di tesi si è focalizzato sull'analisi dei geni *MLO* in *L. japonicus*, una pianta leguminosa modello. Gli *MLO* sono una famiglia multigenica divisa in sette clade alcuni dei quali caratterizzati da funzioni ben distinte. Si è cercato di delineare il ruolo svolto da *MLO4* tramite l'utilizzo di tre mutanti inserzionali, differenti tra loro per quanto riguarda la localizzazione del trasposone nel gene a livello esonico. Nello specifico, l'obiettivo del lavoro svolto consiste nel definire in quale fase della simbiosi MLO4 è coinvolta. Come visto, lo sviluppo della simbiosi AM è un processo estremamente dinamico che comprende diverse fasi consecutive a livello di singolo punto di infezione, ma asincrone a livello di intero apparato radicale. La colonizzazione ha inizio con una fase di *signaling* in cui il fungo AM e la pianta ospite rilasciano nella rizosfera molecole segnale (rispettivamente fattori Myc e

strigolattoni) per indicare la loro disponibilità per la simbiosi. Successivamente, a seguito della formazione dell'ifopodio, il fungo può penetrare all'interno della radice, processo facilitato dalla pianta stessa mediante la formazione dell'apparato di prepenetrazione (PPA). Una volta entrato nell'ospite, il fungo AM si sviluppa longitudinalmente formando ramificazioni ulteriori che, all'interno delle cellule, si assottigliano sempre di più fino a costituire l'arbuscolo, una struttura che permette di incrementare sensibilmente l'interfaccia fungo AM-pianta (è interamente circondata dalla membrana periarbuscolare (PAM) adibita allo scambio dei nutrienti.
Fino a poco tempo fa, la funzione biochimica di MLO è rimasta largamente sconosciuta. Poche settimane fa, durante la stesura della tesi, è stato pubblicato uno studio condotto su *MLO4* (clade I) in *Arabidopsis thaliana*, in cui stato proposto un suo ruolo come canale Ca^{2+} coinvolto nel tigmomorfismo della radice in risposta a stimoli esterni (variazioni nella concentrazione di agar nel terreno) (Zhang, et al. 2022). Ulteriori studi saranno necessari per accertarsi del ruolo delle proteine della famiglia MLO come canali Ca^{2+} anche in altri processi fisiologici, tra cui la simbiosi AM.

4.1 Ruolo di MLO4: comunicatore simbiotico o facilitatore della colonizzazione?

Lo scopo principale del lavoro di tesi consiste nel determinare in quale fase della simbiosi è coinvolto MLO4. Inizialmente, si supponeva un suo ruolo nella comunicazione iniziale con il partner simbiotico per l'instaurazione della colonizzazione. Dal momento che la membrana plasmatica della cellula vegetale rappresenta la superficie primaria di interazione con il fungo AM, la localizzazione di MLO4 a questo livello avrebbe confermato il suo potenziale ruolo nella fase iniziale del *signaling*. Sulla base di ciò, per verificare la localizzazione sub-cellulare della proteina, è stata effettuata una trasformazione eterologa di protoplasti di *Arabidopsis thaliana*. I risultati ottenuti mostrano, però, che MLO4 localizza a livello di spazio peri-nucleare e di membrane interne, probabilmente in corrispondenza del reticolo endoplasmatico o dell'apparato del Golgi. Tale localizzazione, in realtà, non escluderebbe la membrana plasmatica come destinazione finale della proteina (MLO4 risulta priva di una sequenza di localizzazione specifica, quindi il suo posizionamento a livello sub-cellulare dipende dalle tempistiche di espressione genica). Infatti, grazie ad una complessa *machinery* di trasporto, l'apparato del Golgi è in grado di produrre per gemmazione delle vescicole di fusione che possono essere esportate a livello della membrana plasmatica dove MLO4 potrebbe svolgere la sua funzione, ad esempio, proprio nella percezione dei segnali Myc per favorire la simbiosi. Per accertarsi di ciò, un proseguimento logico delle analisi potrebbe consistere nella localizzazione della proteina in presenza del fungo AM. Questo si potrebbe ottenere facendo uso di proteine fluorescenti fuse alla proteina di interesse e rilevate tramite microscopio a fluorescenza direttamente nel tessuto radicale a seguito di inoculo con il fungo. Il rilascio da parte del fungo AM di fattori Myc potrebbe, infatti,

stimolare la produzione da parte del Golgi di vescicole che mediano il trasporto delle proteine MLO4 a livello della membrana plasmatica.
Il potenziale ruolo delle proteine MLO4 nella fase inziale della simbiosi è stato ulteriormente indagato analizzando le firme del Ca^{2+} a seguito di stimolo con CO4, sia in piante WT che in mutanti *mlo4*. Oltre ad osservare che il valore dell'integrale dell'area sottesa alla curva della [Ca^{2+}] citosolico risulta statisticamente differente tra i due genotipi, si è visto che la dinamica del Ca^{2+} intracellulare a livello del nucleo risulta più lenta nei mutanti rispetto al WT. Inoltre, le due curve, nucleare e citosolica, presentano andamento opposto: nel nucleo, la curva del mutante risulta minore rispetto a quella del WT, nel citosol avviene invece il contrario. Tale differenza è particolarmente apprezzabile durante la seconda fase (10-30 minuti dopo lo stimolo). I risultati ottenuti potrebbero comportare due cose: *in primis*, probabilmente l'utilizzo di sonde citosoliche e nucleari non è stata la scelta migliore. Considerando che, come visto, MLO4 localizza a livello di reticolo endoplasmatico o dell'apparato del Golgi, probabilmente la misurazione delle oscillazioni di Ca^{2+} a livello reticolare mediante l'utilizzo di una sonda che abbia come target il reticolo endoplasmatico risulterebbe più utile. La scelta di utilizzare sonde nucleari e citosoliche è però giustificata dal fatto che sono già state descritte in letteratura (Mehlmer, et al. 2012; Binci, et al. 2021), mentre ancora non è stata analizzata la risposta a livello di reticolo endoplasmatico. *In secundis*, la minor risposta nei mutanti potrebbe essere responsabile di un'attivazione del programma simbiotico ridotta che si manifesta in micorrizazione inferiore rispetto al WT. Inoltre, MLO4 potrebbe avere un ruolo ridondante (più proteine svolgono la medesima funzione) oppure accessorio (MLO4 potrebbe non essere indispensabile per il *signaling* simbiotico). Il fatto che MLO4 abbia funzione accessoria e possa servire per una regolazione più fine (oppure, semplicemente, che nelle condizioni sperimentali usate non risulti fondamentale) sembra coerente in quanto, come visto, la simbiosi AM è un processo estremamente complesso che coinvolge un numero elevato di geni diversi con funzioni differenti e non sempre essenziali.
In alternativa, MLO4 potrebbe essere coinvolto in fasi successive della simbiosi, quali la formazione dell'apparato di prepenetrazione (PPA) che funge da via di ingresso per l'ifa fungina nell'ospite oppure nel favorire la colonizzazione della cellula da parte del fungo AM con conseguente formazione e ramificazione dell'arbuscolo. Per verificare ciò è stata svolta una prima analisi tramite osservazione di vetrini di segmenti di radice colonizzata dal fungo AM in *time-point* precoce (17 dpi) e, in parallelo, quantificazione dell'espressione di *PT4*, gene marker della simbiosi. Come detto in precedenza, i risultati ottenuti mostrano grande variabilità e non possono essere considerati conclusivi. Si è però visto che, sia per quanto riguarda lo sviluppo degli arbuscoli che per l'espressione di *PT4*, WT e mutanti non presentano differenze significative. Nel caso in cui MLO4 fosse coinvolto nella formazione degli arbuscoli, i mutanti potrebbero essere caratterizzati da cellule solo parzialmente colonizzate e da arbuscoli incompleti (ramificazione ridotta). Per osservare nel dettaglio il livello di sviluppo arbuscolare si potrebbe, ad esempio, effettuare delle colorazioni con fluorofori coniugati a WGA che permettano di ottenere una *fine-imaging* dell'arbuscolo e delle sue

ramificazioni e, quindi, di osservare eventuali differenze di morfologia e sviluppo tra WT e mutanti.
Protocolli di colorazione e quantificazione al microscopio da parte dell'operatore prevedono, però, una certa variabilità e soggettività dei risultati. Per permettere maggiore riproducibilità, ricercatori alla Cambridge University hanno sviluppato il software AMFinder che permette l'identificazione e quantificazione automatica delle strutture fungine intraradicali. A seguito di una fase di *training* (facendo analizzare al programma dataset di immagini di radici colonizzate di *M. truncatula*, *L. japonicus*, *O. sativa* e *N. benthamiana*), AMFinder si è rivelato in grado di distinguere con elevata accuratezza 'sezioni di radici colonizzate' (M+), 'sezioni di radici non colonizzate' (M-) e '*background*/non una radice/altro'. Inoltre, nelle sezioni classificate come M+, può distinguere arbuscoli, vescicole, ifopodi e ife intraradicali (Evangelisti, et al. 2021). L'adozione di questo software potrebbe quindi semplificare sensibilmente il processo di quantificazione e, allo stesso tempo, garantire maggiore oggettività alle analisi.

4.2 L'attivazione di p*MLO4* dipende dal fungo AM

Considerando il livello di trascrizione dei vari geni appartenenti alla famiglia *LjMLO*, è stato deciso di studiare l'attività di p*MLO4*, p*MLO2B*, p*MLO3A* e p*MLO5C*. Per fare ciò è stata eseguita un'analisi dell'attività del gene reporter GUS mediante colorazione istochimica. L'analisi ha messo in evidenza che solo p*MLO4* si attiva in presenza del fungo AM, rilevando un possibile ruolo di MLO4 nella simbiosi. p*MLO3A*, invece, è attivo in corrispondenza degli apici e degli abbozzi radicali. Nonostante la causa della colorazione GUS in queste regioni della pianta non sia ancora nota, si potrebbe speculare un potenziale ruolo di MLO3A nella crescita e nello sviluppo radicale.
Analizzando la sequenza di p*MLO4*, sono state identificate due sequenze regolatrici in *cis* (P1BS e AW-box) in tandem che fungono da siti di *binding* per fattori di trascrizione. Per accertarsi del ruolo svolto da questi due motivi in relazione alla simbiosi AM, sono state create tre versioni mutanti del promotore caratterizzate dalla mancanza di solamente una delle due sequenze regolatorie oppure di entrambe. Treamite colorazione istochimica, si è visto che il gene *GUS* è espresso non solo nelle radici trasformate con il costrutto contenente entrambe le sequenze regolatorie, ma anche in quelle difettive di P1BS. Curiosamente, quindi, il motivo P1BS non sembra essere essenziale per l'attività di *MLO4* in presenza del fungo AM. È stato inoltre osservato che unicamente in caso di assenza di AW-box, nella maggior parte dei casi, non si aveva la colorazione degli apici e degli abbozzi radicali. A causa della carenza di tempo, il numero di colorazioni svolte è stato molto ridotto quindi non è stato possibile giungere a conclusioni maggiormente attendibili. Dalla letteratura si sa che i motivi AW-box fungono da sito di legame per i fattori di trascrizione WRINKLED, appartenenti alla famiglia APETALA2 (AP2), considerati dei regolatori chiave nella biosintesi dei lipidi nelle piante (Kong e Ma 2018). Inoltre, recenti studi hanno dimostrato che i lipidi non sono solamente dei *bulding blocks* che costituiscono le membrane plasmatiche delle cellule, ma rappresentano un importante target ormonale, in

particolare dell'auxina, per regolare processi di crescita e sviluppo della pianta. Infatti, cambiamenti nel metabolismo lipidico possono determinare una *down*-regolazione o attivazione di *pathways* di sviluppo (Boutté e Jaillais 2020). Dal momento che, come visto, i fattori di trascrizione WRINKLED si legano in corrispondenza delle sequenze AW-box e sono coinvolti nella biosintesi dei lipidi, in modo puramente speculativo, si potrebbe riconoscere un qualche ruolo di AW-box nello sviluppo ed accrescimento radicale. La mancanza di queste sequenze, quindi, potrebbe determinare una diminuzione dello sviluppo di abbozzi radicali e un rallentamento nella crescita della radice.

4.3 I mutanti *mlo4-1* crescono più lentamente rispetto al WT

La variabilità dei risultati ottenuti dal test Trouvelot e dalla RT-qPCR a seguito di estrazione di RNA dalle radici è verosimilmente imputabile alle condizioni di crescita non uniformi nelle camere di coltura precedentemente alla loro sostituzione. Il cambiamento stesso delle camere, per quanto la loro sostituzione possa garantire maggiore uniformità in particolar modo in relazione all'intensità luminosa, introduce un altro elemento di variabilità che si è manifestato in una mancata, o per lo meno rallentata, micorrizazione a seguito della ripetizione dell'esperimento. Si consideri, inoltre, che la mutevolezza riscontrata deve essere addizionata alla variabilità intrinseca del sistema pianta-fungo AM, il che rende ulteriormente complessa l'analisi di questa simbiosi. Una prima analisi a 17 dpi (sia per quanto riguarda il test Trouvelot che per lo studio dell'espressione di *PT4* tramite RT-qPCR) non mostra differenze significative tra WT e mutanti (*mlo4-1* e *mlo4-2*). È stata però riscontrata ampia variabilità dei dati in relazione alla posizione di crescita delle piante all'interno della camera di coltura, indice di una diversa esposizione luminosa che, oltre ad avere ripercussioni sulle dimensioni e sulla massa delle piante, è probabilmente responsabile dei diversi livelli di colonizzazione riscontrati. L'adozione di condizioni di crescita più omogenee con la sostituzione delle camere di coltura avrebbe dovuto portare ad una diminuzione della variabilità. In realtà, si è visto che, per motivi ancora poco noti, a 17 e 20 dpi si è verificata un'inibizione pressoché totale della simbiosi. Quindi, nonostante il test Trouvelot sia stato in questo caso inconcludente e non fosse sensato ripetere l'estrazione di RNA dalle radici per la quantificazione dell'espressione di *PT4*, è stato deciso di quantificare l'apparato radicale per quanto concerne la massa e la sua estensione ad entrambi i *time-point* considerati. I risultati ottenuti a seguito di questa analisi indicano chiaramente che il mutante inserzionale *mlo4-1* è caratterizzato da un rallentamento nella crescita rispetto al WT. Purtroppo, però, proprio a causa della mancata micorrizazione, non è stato possibile associare la riduzione delle dimensioni della pianta ad un minor livello di colonizzazione fungina. Infatti, se ciò fosse stato possibile, sarebbe stato confermato il fenotipo descritto da Jacott, et al. 2020. Appare comunque coerente pensare che una diminuzione della colonizzazione da parte del fungo AM sia accompagnata da un rallentamento nella crescita considerando che il fungo rappresenta un importante vettore di acqua e nutrienti essenziali per la pianta. Allo stesso tempo, piante con sviluppo radicale ridotto presentano minore colonizzazione in quanto necessitano

di più tempo affinché le radici possano raggiungere lo strato di terreno in cui è stato inoculato il fungo AM.
Oltretutto, come visto al *Capitolo 3.5*, bisogna considerare che anche la posizione dell'inserzione all'interno del gene risulta essere determinante a livello fenotipico. Infatti, i mutanti *mlo4-3* (il trasposone endogeno si è inserito a livello del settimo esone) mostrano un fenotipo intermedio per quanto riguarda massa e dimensioni dell'apparato radicale. Inoltre, possono essersi verificate mutazioni in corrispondenza di altre regioni del genoma che hanno determinato il fenotipo osservato. Per accertarsi di ciò sarebbe necessario effettuare un test di complementazione incrociando tra loro due mutanti indipendenti che manifestano il medesimo fenotipo ed analizzando la generazione F1. Se in F1 viene ripristinato il fenotipo WT significa che è avvenuta complementazione e che la mutazione è su due geni differenti. In questo caso, è quindi necessario determinare quale altro gene è responsabile della mutazione. Se, invece, non si verifica complementazione genica, allora le mutazioni si trovano sullo stesso gene. Questo esperimento risulterebbe però probabilmente troppo lento (richiederebbe diversi mesi) in quanto bisogna attendere che la pianta cresca e produca semi. Un'alternativa più rapida consiste nel metodo di trasformazione *hairy roots* che permette di far esprimere la proteina con il promotore engogeno (p*MLO4*:MLO4) in *background* mutato. Se viene ripristinato il fenotipo wild-type allora si può concludere che è proprio MLO4 a determinare la mutazione.

Considerando la considerevole variabilità e le difficoltà riscontrate, è stato deciso di caratterizzare come fenotipo alternativo la risposta delle radici al gravitropismo e la produzione di radici laterali in seguito a somministrazione di diversi stimoli. Dalla letteratura si sa che i geni *MLO* appartenenti al clade I sono coinvolti nelle risposte al tigmomorfismo ed al gravitropismo (Bidzinski, et al. 2014; Zhu, et al. 2021). I risultati ottenuti sembrano confermare quanto visto in letteratura. I mutanti *mlo1A.1*, infatti, mostrano una risposta accelerata al gravitropismo rispetto al WT. I mutanti *mlo4* (*mlo4-1*, *mlo4-2* e *mlo4-3*), invece, presentano risposta largamente eterogenea. Questo potrebbe essere determinato dalla presenza di mutazioni in *background* che possono amplificare o diminure l'effetto fenotipico della mutazione considerata. Sarebbe stato interessante analizzare la risposta a stimoli fisici dati, ad esempio, dalla presenza di superfici di contatto a densità di agar variabili. Esperimenti analoghi sono stati svolti su *A. thaliana* (Cheng, et al. 2009), pianta caratterizzata da un apparato radicale molto più sottile e quindi maggiormente malleabile.
Analizzando, invece, lo sviluppo di radici laterali si è visto che i mutanti *mlo4* tendono a produrre un numero minore di radici rispetto al WT, indipendentemente dalla tipologia di molecola somministrata. L'analisi dello sviluppo di radici laterali deve però essere implementata ed i risultati ottenuti non possono essere considerati pienamente attendibili. Inoltre, le piante sono state fatte crescere in piastre quadrate in terreno solido L.A. (PO_4 200 µM) addizionato con Agar 0.8% il che può aver limitato l'espansione orizzontale dell'apparato radicale. Sembrerebbe ragionevole, dunque, far crescere le piante in vaso con sabbia o terra, permettendo così una maggiore crescita tridimensionale.

5 CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Nonostante a causa di problematiche nel processo di micorrizazione non sia stato possibile confermare il fenotipo mutato descritto da Jacott, et al. 2020, questo lavoro di tesi ha permesso di confermare in *L. japonicus* risultati ottenuti in esperimenti eseguiti su altre piante modello. In primo luogo, benchè non sia stato associato ad una minore micorrizazione, è stato dimostrato che i mutanti *mlo4-1* sono caratterizzati da una crescita ridotta rispetto al WT. Si potrebbe pensare ad una reciprocità di cause: i mutanti crescono meno in quanto sono caratterizzati da una minore micorrizazione e quindi ridotto approvvigionamento di acqua e nutrienti e, dall'altra parte, la minore lunghezza dell'apparato radicale puù essere ritenuta la causa della minore micorrizazione in quanto, semplicemente, le radici non sono in grado di raggiungere la zona dell'inoculo tanto velocemente quanto il WT. Inoltre, è stato confermato il ruolo delle proteine appartenenti al clade I (nello specifico, MLO1A.1) nella risposta della radice al gravitropismo. Mutanti *mlo1A.1*, infatti, presentano una risposta più rapida a seguito del cambiamento del vettore gravitazionale.

Analizzando le dinamiche del Ca^{2+} è stato visto che i mutanti presentano nel nucleo una risposta rallentata agli stimoli con CO4. Si potrebbe ipotizzare che questo può sia associato ad una ridotta micorrizazione dei mutanti che determina a sua volta minore crescita della pianta. Tramite saggio istochimico GUS, è stata poi dimostrata l'attivazione di p*MLO4* in corrispondenza degli arbuscociti ed il ruolo essenziale svolto da AW-box. La sequenza regolatoria P1BS, invece, sembra essere accessoria all'attivazione del promotore. Analisi condotte su protoplasti di *A. thaliana* hanno permesso di ottenere una prospettiva sulla localizzazione sub-cellulare di MLO4, il che rappresenta un punto di partenza fondamentale per definirne la funzione. La proteina sembra localizzare in corrispondenza della regione peri-nucleare, probabilmente a livello del reticolo endoplasmatico o dell'apparato del Golgi. Non possono però essere esclusi dei trasferimenti in altri compartimenti cellulari come ad esempio la membrana plasmatica. Bisogna però considerare che questi risultati sono stati ottenuti in un sistema eterologo e che non si può essere certi della funzionalità della proteina. Risulta quindi necessario confermare questi ritrovamenti utilizzando protoplasti di *L. japonicus*. Inoltre, è importante verificare la localizzazione della proteina in presenza del fungo AM direttamente nel tessuto radicale della pianta ospite. Riassumendo, gli esperimenti fatti confermano un ruolo di MLO4 nella simbiosi AM anche se non è stato possibile determinare con precisione in quale fase è coinvolto e quale sia il fenotipo ad esso associato. In base ai risultati ottenuti da Zhang et al. 2022, è lecito pensare, seppur al momento in maniera puramente speculativa, che anche LjMLO4 lavori come un tipico canale Ca^{2+} determinando oscillazioni della [Ca^{2+}] a livello nucleare e citosolico associate al rilascio da parte del fungo AM di segnali Myc.

L'elevata importanza della simbiosi AM in ambito agricolo ed ecologico ha determinato un incrementato interesse nello svelare i misteri che ancora circondano i *pathway* molecolari coinvolti ed il ruolo svolto dalle proteine MLO. Una limitazione di questi lavori consiste nel fatto che, nella maggior parte dei casi,

vengono svolti in laboratorio in condizioni controllate, limitando la presenza di altri microrganismi del suolo. Per quanto ciò permetta di ottenere dei risultati riproducibili, non permette di rappresentare fedelmente la reale biodiversità della rizosfera e ciò che avviene in natura dove la pianta deve essere in grado di fronteggiare numerosi organismi patogeni differenti e creare interazioni mutualistiche anche con un numero multiplo di funghi AM per garantirsi la sopravvivenza.

Considerata la sua importanza per la pianta in termini di aumentato approvvigionamento di nutrienti e tolleranza agli stress abiotici, tenuti a mente tutti i potenziali limiti e gli ostacoli incontrati, questo lavoro di ricerca rappresenta un passo in avanti in una migliore comprensione del ruolo svolto dai geni *MLO* nella simbiosi AM.

6 BIBLIOGRAFIA

- ACEVEDO-GARCIA, Johanna; KUSCH, Stefan; PANSTRUGA, Ralph. Magical mystery tour: MLO proteins in plant immunity and beyond. *New Phytologist*, 2014, 204.2: 273-281.
- BIDZINSKI, Przemyslaw, et al. Physiological characterization and genetic modifiers of aberrant root thigmomorphogenesis in mutants of A rabidopsis thaliana *MILDEW LOCUS O* genes. *Plant, cell & environment*, 2014, 37.12: 2738-2753.
- BINCI, Filippo, et al. Multiphasic calcium signatures in the cytosol and nucleus of Lotus japonicus roots unlock the early discrimination of fungal signals. *bioRxiv*, 2022.
- BONFANTE, Paola; GENRE, Andrea. Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. *Trends in plant science*, 2008, 13.9: 492-498.
- BOUTTÉ, Yohann; JAILLAIS, Yvon. Metabolic cellular communications: feedback mechanisms between membrane lipid homeostasis and plant development. *Developmental cell*, 2020, 54.2: 171-182.
- BÜSCHGES, Rainer, et al. The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *cell*, 1997, 88.5: 695-705.
- CAROTENUTO, Gennaro; GENRE, Andrea. Fluorescent staining of arbuscular mycorrhizal structures using wheat germ agglutinin (WGA) and propidium iodide. In: *Arbuscular Mycorrhizal Fungi*. Humana, New York, NY, 2020. p. 53-59.
- CHEN, Aiqun, et al. Identification of two conserved cis-acting elements, MYCS and P1BS, involved in the regulation of mycorrhiza-activated phosphate transporters in eudicot species. *New Phytologist*, 2011, 189.4: 1157-1169.
- CHEN, Zhongying, et al. Two seven-transmembrane domain MILDEW RESISTANCE LOCUS O proteins cofunction in Arabidopsis root thigmomorphogenesis. *The Plant Cell*, 2009, 21.7: 1972-1991.
- CHOI, Jeongmin; SUMMERS, William; PASZKOWSKI, Uta. Mechanisms underlying establishment of arbuscular mycorrhizal symbioses. *Annual Review of Phytopathology*, 2018, 56: 135-160.
- DAS, Debatosh, et al. PHOSPHATE STARVATION RESPONSE transcription factors enable arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Nature communications*, 2022, 13.1: 1-12.
- DELAUX, Pierre-Marc; SCHORNACK, Sebastian. Plant evolution driven by interactions with symbiotic and pathogenic microbes. *Science*, 2021, 371.6531: eaba6605.
- DEVOTO, Alessandra, et al. Molecular phylogeny and evolution of the plant-specific seven-transmembrane MLO family. *Journal of molecular evolution*, 2003, 56.1: 77-88.

- EVANGELISTI, Edouard, et al. Artificial intelligence enables the identification and quantification of arbuscular mycorrhizal fungi in plant roots. *bioRxiv*, 2021.
- FEDDERMANN, Nadja, et al. Functional diversity in arbuscular mycorrhiza–the role of gene expression, phosphorous nutrition and symbiotic efficiency. *Fungal ecology*, 2010, 3.1: 1-8.
- FENG, Feng, et al. A combination of chitooligosaccharide and lipochitooligosaccharide recognition promotes arbuscular mycorrhizal associations in Medicago truncatula. *Nature communications*, 2019, 10.1: 1-12.
- FLOSS, Daniela S., et al. A transcriptional program for arbuscule degeneration during AM symbiosis is regulated by MYB1. *Current Biology*, 2017, 27.8: 1206-1212.
- GENRE, Andrea, et al. Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both Medicago truncatula and Daucus carota. *The Plant Cell*, 2008, 20.5: 1407-1420.
- GUETHER, Mike, et al. Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in Lotus japonicus. *New Phytologist*, 2009, 182.1: 200-212.
- GUTJAHR, Caroline; PARNISKE, Martin. Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annual review of cell and developmental biology*, 2013, 29: 593-617.
- HANDBERG, Kurt; STOUGAARD, Jens. Lotus japonicus, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal*, 1992, 2.4: 487-496.
- HILBERT, Magdalena, et al. *MLO* differentially regulates barley root colonization by beneficial endophytic and mycorrhizal fungi. *Frontiers in plant science*, 2020, 10: 1678.
- HUMPHRY, Matt; CONSONNI, Chiara; PANSTRUGA, Ralph. *mlo*-based powdery mildew immunity: silver bullet or simply non-host resistance?. *Molecular plant pathology*, 2006, 7.6: 605-610.
- JACOTT, Catherine N., et al. Mildew Locus O facilitates colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in angiosperms. *New Phytologist*, 2020, 227.2: 343-351.
- JACOTT, Catherine N.; RIDOUT, Christopher J.; MURRAY, Jeremy D. Unmasking *mildew resistance locus O*. *Trends in Plant Science*, 2021, 26.10: 1006-1013.
- JAVOT, Hélène, et al. A Medicago truncatula phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104.5: 1720-1725.

- JAVOT, Helene; PUMPLIN, Nathan; HARRISON, Maria J. Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant, Cell & Environment*, 2007, 30.3: 310-322.
- JUNG, Sabine C., et al. Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of chemical ecology*, 2012, 38.6: 651-664.
- KESSLER, Sharon A., et al. Conserved molecular components for pollen tube reception and fungal invasion. *Science*, 2010, 330.6006: 968-971.
- KEYMER, Andreas, et al. Lipid transfer from plants to arbuscular mycorrhiza fungi. *elife*, 2017, 6: e29107.
- KHOKHANI, Devanshi, et al. Deciphering the chitin code in plant symbiosis, defense, and microbial networks. *Annual Review of Microbiology*, 2021, 75: 583-607.
- KIM, Min C., et al. Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature*, 2002, 416.6879: 447-451.
- KONG, Que; MA, Wei. *WRINKLED1* transcription factor: How much do we know about its regulatory mechanism?. *Plant Science*, 2018, 272: 153-156.
- KRÜGER, Manuela, et al. The genome of Geosiphon pyriformis reveals ancestral traits linked to the emergence of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Biology*, 2021, 31.7: 1570-1577. e4.
- KUSCH, Stefan; PESCH, Lina; PANSTRUGA, Ralph. Comprehensive phylogenetic analysis sheds light on the diversity and origin of the MLO family of integral membrane proteins. *Genome Biology and Evolution*, 2016, 8.3: 878-895.
- LAMPROPOULOS, Athanasios, et al. GreenGate-a novel, versatile, and efficient cloning system for plant transgenesis. *PloS one*, 2013, 8.12: e83043.
- MAŁOLEPSZY, Anna, et al. The *LORE 1* insertion mutant resource. *The Plant Journal*, 2016, 88.2: 306-317.
- MENG, Jiang-Guo, et al. Integration of ovular signals and exocytosis of a Ca^{2+} channel by *MLOs* in pollen tube guidance. *Nature Plants*, 2020, 6.2: 143-153.
- MUN, Terry, et al. Lotus Base: An integrated information portal for the model legume Lotus japonicus. *Scientific reports*, 2016, 6.1: 1-18.
- NUSSAUME, Laurent, et al. Phosphate import in plants: focus on the PHT1 transporters. *Frontiers in plant science*, 2011, 2: 83.
- PAJUELO, Eloisa, e JENS Stougaard. Lotus japonicus's a model system. In *Lotus japonicus Handbook*, 2005 3-24.
- PEÑA VENEGAS, Ricardo Alexander, et al. The phosphate inhibition paradigm: host and fungal genotypes determine

arbuscular mycorrhizal fungal colonization and responsiveness to inoculation in cassava with increasing phosphorus supply. *Frontiers in plant science*, 2021, 1163.

- PIMPRIKAR, Priya, e CAROLINE Gutjahr. Transcriptional Regulation of Arbuscular Mycorrhiza Development. *Plant and Cell Physiology*, 2018, 673-690.
- PIROZYNSKI, K. A.; MALLOCH, D. W. The origin of land plants: a matter of mycotrophism. *Biosystems*, 1975, 6.3: 153-164.
- RICH, Mélanie K., et al. Diet of arbuscular mycorrhizal fungi: bread and butter?. *Trends in Plant Science*, 2017, 22.8: 652-660.
- RICH, Mélanie K., et al. Lipid exchanges drove the evolution of mutualism during plant terrestrialization. *Science*, 2021, 372.6544: 864-868.
- SEETHEPALLI, Anand; YORK, Larry M. RhizoVision Explorer-Interactive software for generalized root image analysis designed for everyone (Version 2.0. 2). *Zenodo. doi*, 2020, 10.
- SEXAUER, Moritz, et al. Visualizing polymeric components that define distinct root barriers across plant lineages. *Development*, 2021, 148.23: dev199820.
- SMITH, Sally E., et al. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant physiology*, 2011, 156.3: 1050-1057.
- SMITH, Sally E.; READ, David J. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press, 2010.
- SPATAFORA, Joseph W., et al. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 2016, 108.5: 1028-1046.
- SUN, Jongho, et al. Activation of symbiosis signaling by arbuscular mycorrhizal fungi in legumes and rice. *The Plant Cell*, 2015, 27.3: 823-838.
- THOMS, David; LIANG, Yan; HANEY, Cara H. Maintaining symbiotic homeostasis: how do plants engage with beneficial microorganisms while at the same time restricting pathogens?. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2021, 34.5: 462-469.
- TIAN, Yongxian, et al. Genome-wide identification and evolutionary analysis of *MLO* gene family in Rosaceae plants. *Horticultural Plant Journal*, 2022, 8.1: 110-122.
- TROUVELOT, A.; KOUGH, J. L.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Estimation of vesicular arbuscular mycorrhizal infection levels. Research for methods having a functional significance. In: *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae= Aspects*

physiologiques et genetiques des mycorhizes: proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae, Dijon, 1-5 July 1985. Paris: Institut national de le recherche agronomique, c1986., 1986.

- UDVARDI, Michael K., et al. Lotus japonicus: legume research in the fast lane. *Trends in plant science*, 2005, 10.5: 222-228.
- VAN DER HEIJDEN, Marcel GA; HORTON, Thomas R. Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *Journal of ecology*, 2009, 97.6: 1139-1150.
- VAN SCHIE, Chris CN; TAKKEN, Frank LW. Susceptibility genes 101: how to be a good host. *Annual review of phytopathology*, 2014, 52: 551-581.
- VOLPE, Veronica, et al. The phosphate transporters LjPT4 and MtPT4 mediate early root responses to phosphate status in non mycorrhizal roots. *Plant, Cell & Environment*, 2016, 39.3: 660-671.
- YANG, Hao, et al. The role of calcium/calcium-dependent protein kinases signal pathway in pollen tube growth. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 633293.
- ZHANG, Zhengli, et al. Arabidopsis MLO4 Functions as a Ca^{2+} Channel Essential for Mechanosensing in Root Tips. *bioRxiv*, 2022.
- ZHU, Lei, et al. The Mildew Resistance Locus O 4 interacts with CaM/CML and is involved in root gravity response. *International journal of molecular sciences*, 2021, 22.11: 5962.

RINGRAZIAMENTI

A conclusione di questo elaborato, vorrei spendere alcune parole per ringraziare tutti coloro che, con pazienza e dedizione, mi hanno supportato nella redazione dello stesso.

Innanzitutto, vorrei ringraziare il mio relatore Marco Giovannetti, per gli utilissimi consigli e spunti di riflessione forniti, oltre che per il corso estensivo sull'utilizzo di R rivelatosi indispensabile per la stesura della tesi e, perché no, un passatempo anche gradito (solo nel caso, però, in cui ottengo i risultati attesi ed a condizione che non comparissero i soliti errori!).

Un grandissimo ringraziamento va anche a Filippo, per tutti i consigli e l'aiuto fornito e per avermi sostenuto nel mio progetto dal primo all'ultimo giorno. Un sentito grazie anche a tutti i membri del Plant Cell Biology Lab: Prof. Lorella Navazio, Prof. Barbara Baldan, dott. Enrico Cortese, dott.ssa Arianna Capparotto, Stefania Marcato ed ai miei due compagni di avventura al V piano sud del Vallisneri, Daniele Castelli ed Elisabetta Offer.

Un pensiero speciale va ad i miei compagni del liceo, ai miei colleghi ed amici dell'università ed, ovviamente, ai miei 朋友 incontrati dall'altra parte del mondo ma più vicini che mai.

Il più grande dei ringraziamenti va sicuramente ai miei genitori che mi hanno sempre sostenuto ed appoggiato e, senza i quali, non avrei potuto intraprendere questo percorso di studi. Grazie ad Agnese, Matteo, ai nonni, a tutti i parenti e, come potrei mai dimenticarmi, a Kai, il mio personale supporto psicologico a quattro zampe, sempre capace di farmi sorridere e distrarmi.