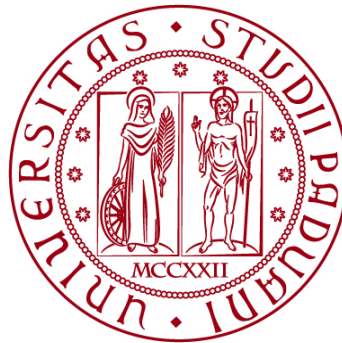


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea magistrale in Biologia Evoluzionistica



TESI DI LAUREA

**Ruolo dei geni *MILDEW LOCUS O (MLO)* nella
simbiosi micorrizica arbuscolare in *Lotus
japonicus***

**Relatore: Dott. Marco Giovannetti
Dipartimento di Biologia**

**Correlatore: Dott. Filippo Binci
Dipartimento di Biologia**

Laureando: Edoardo Di Nuzzo

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Indice

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 Storia evolutiva della simbiosi micorrizica.....	3
1.2 Ecologia delle simbiosi micorriziche.....	6
1.3 La simbiosi micorrizica arbuscolare.....	7
1.3.1 Comunicazione presimbiotica.....	8
1.3.2 Contatto e penetrazione.....	8
1.3.3 Sviluppo dell'arbuscolo.....	9
1.3.4 Formazione di vescicole e spore.....	10
1.3.5 Scambio di nutrienti.....	11
1.4 I geni <i>Mildew Locus O (MLO)</i>.....	13
1.4.1 Filogenesi dei geni <i>MLO</i>	16
1.4.2 <i>MLO</i> e tigmomorfogenesi radicale.....	17
1.4.3 <i>MLO</i> e sviluppo del tubetto pollinico nel fiore.....	18
1.4.4 <i>MLO</i> nella simbiosi micorrizica arbuscolare.....	19
1.5 Organismo modello <i>Lotus japonicus</i>.....	19
1.6 Scopo della tesi.....	22
2. MATERIALI E METODI.....	23
2.1. Linee vegetali utilizzate.....	23
2.2. Sterilizzazione dei semi e germinazione.....	23
2.3. Terreni di coltura vegetale.....	23
2.4. Terreni di coltura batterica.....	24
2.5. Estrazione di DNA genomico da <i>Lotus japonicus</i> e genotipizzazione tramite PCR.....	24
2.6. Trasformazione di <i>Agrobacterium rhizogenes</i>.....	26
2.7. Metodo di clonaggio Green Gate.....	27
2.8. Trasformazione di <i>Escherichia coli</i> e clonaggio.....	27
2.9. Trasformazione hairy roots di <i>Lotus japonicus</i>.....	28
2.10. Test di micorrizzazione in vaso.....	29
2.11. Estrazione dell'RNA totale e caratterizzazione dei trascritti mutanti	29
2.12. Colorazione delle radici con inchiostro e metodo Trouvelot....	30
2.13. Colorazione delle radici con Wheat Germ Agglutinin (WGA) e analisi al microscopio confocale.....	32
2.14. Estrazione e quantificazione del fosfato solubile da tessuti vegetali	33
2.15. Misurazione delle variazioni di calcio intracellulare in risposta a stimoli biotici e abiotici.....	34
2.16. Saggio biochimico GUS	34

2.17. Trattamento con auxina (IAA) e analisi delle radici laterali.....	35
2.18. Analisi statistica.....	35
2.19. Lista primer e plasmidi.....	36
3. RISULTATI.....	39
3.1. Identificazione di piante <i>mlo4-3</i> di <i>L. japonicus</i> omozigoti per la presenza o assenza dell'inserzione <i>LORE1</i>	39
3.2. Analisi dell'mRNA prodotto dal locus <i>MLO4</i> nelle diverse linee mutanti di <i>L. japonicus</i>	41
3.3. Diverse linee di <i>L. japonicus</i> mutanti per il gene <i>MLO4</i> presentano una ridotta biomassa dell'apparato radicale.....	43
3.4. Quantificazione della colonizzazione micorrizica in piante WT e mutanti <i>mlo4</i> tramite metodo Trouvelot.....	45
3.5. L'accumulo di fosfato in triplette fogliari mostra una tendenza positiva in <i>mlo4-1</i> LORE e <i>mlo4-3</i> LORE rispetto al WT.....	47
3.6. La struttura dell'arbuscolo non mostra differenze tra i genotipi esaminati.....	49
3.7. Il promotore endogeno di <i>MLO4</i> è fortemente attivo in cellule della corteccia che ospitano gli arbuscoli e negli abbozzi radicali.....	50
3.8. Analisi della variazione di concentrazione citosolica di Ca ²⁺ in risposta a stress salino e a stimoli biotici nei mutanti <i>mlo4</i>	55
3.9. Mutanti <i>mlo4-1</i> LORE mostrano una minor produzione di radici laterali anche in risposta ad auxina esogena.....	60
4. DISCUSSIONE.....	65
4.1. L'inattivazione di <i>MLO4</i> aumenta la colonizzazione nelle fasi finali della simbiosi?.....	66
4.2. <i>MLO4</i> modula i flussi della concentrazione intracellulare di Ca ²⁺ coinvolti nella trasduzione di molecole simbiotiche?.....	68
4.3. <i>MLO4</i> influenza lo sviluppo radicale in <i>L. japonicus</i>	69
5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE.....	71
6. BIBLIOGRAFIA	73

ABSTRACT

La simbiosi micorrizica arbuscolare è una simbiosi mutualistica che coinvolge la grande maggioranza delle piante conosciute e i funghi appartenenti al sub-phylum Glomeromycotina. Con questa interazione il fungo fornisce nutrienti alla pianta, soprattutto fosfato, e la pianta fornisce carboidrati e lipidi. È una simbiosi molto antica, la cui formazione necessita diversi step e una complessa comunicazione chimica tra i due organismi. I geni *MLO* (*Mildew Locus O*) sono stati scoperti per la prima volta come geni di suscettibilità all'infezione da funghi biotrofi, ma sono coinvolti in numerosi processi: sviluppo del tubetto pollinico, tigmotropismo radicale e colonizzazione da funghi micorrizici arbuscolari. I geni *MLO* codificano una proteina transmembrana coinvolta nella segnalazione intracellulare di Ca^{2+} . L'obiettivo della mia tesi si incentra sullo studio del ruolo del gene *MLO4* nella simbiosi micorrizica arbuscolare in *Lotus japonicus*, una leguminosa modello utilizzata nello studio delle interazioni con microrganismi del suolo. Sfruttando linee mutanti inserzionali per il gene *MLO4* (*mlo4-1*, *mlo4-2*), ho studiato le variazioni fenotipiche che sono causate dall'inattivazione funzionale del gene, la localizzazione dell'attività del suo promotore nella radice e l'attività della proteina come canale coinvolto nella segnalazione del calcio. Inoltre, è stata isolata la linea mutante *mlo4-3* (con inserzione all'interno della sequenza) grazie alla genotipizzazione di una popolazione segregante. I risultati ottenuti indicano che piante mutanti *mlo4* presentano un maggior livello di colonizzazione e di accumulo di fosfato in fase avanzata della simbiosi. La risposta a segnali biotici e abiotici in termini di variazioni citosoliche dello ione Ca^{2+} risulta anch'essa differente, suggerendo che *MLO4* sia coinvolto nella via di segnalazione che regola la colonizzazione della radice. Studi sul promotore indicano che *MLO4* non è solamente espresso in cellule radicali che ospitano il fungo micorrizico, ma anche in prossimità delle radici laterali. Infatti, piante mutanti *MLO4* presentano una ridotta formazione di radici laterali. Sulla base di questi risultati si può affermare che il gene *MLO4* è alla base di numerosi processi coinvolti nello sviluppo radicale e nella simbiosi micorrizica arbuscolare e che media il passaggio di calcio transmembrana.

1. INTRODUZIONE

Il termine micorriza deriva dall'unione delle due parole "Mycos" e "Rhiza", che, in greco antico, significano rispettivamente "fungo" e "radice". Le micorrize sono l'interazione simbiotica che si stabilisce, a livello radicale, tra le piante e i funghi. Si tratta di una relazione in cui la pianta fornisce fotosintati, soprattutto zuccheri e lipidi, mentre il fungo fornisce nutrienti minerali, tra cui fosforo e azoto, e acqua. Solitamente entrambi gli organismi ricevono un vantaggio, stabilendo così una simbiosi di tipo mutualistico; tuttavia, in natura esiste un ampio spettro di variazioni in cui lo scambio di sostanze può non essere equo (van der Heijden *et al.*, 2014).

Benché note già da molti anni, il primo scienziato a interpretare correttamente la funzione delle micorrize fu il botanico e micologo tedesco Albert Bernhard Frank (1839-1900). Egli coniò il termine micorriza e nel 1885 ipotizzò che questa interazione fosse una simbiosi mutualistica in cui pianta e fungo si scambiano reciprocamente sostanze nutritive e minerali (Trappe *et al.*, 2005).

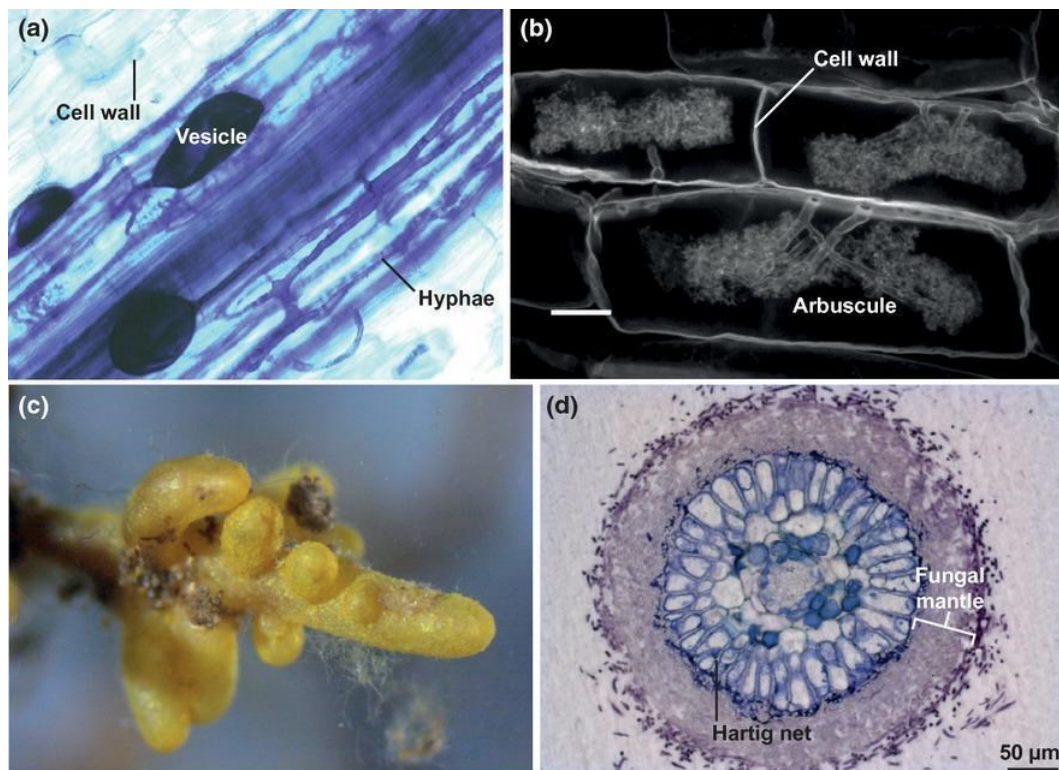


Figura 1.1: Le tipiche strutture delle micorrize arbuscolari (a,b) e delle ectomicorrize (c,d) (van der Heijden *et al.*, 2014).

Esistono diversi tipi di micorrize, i quali variano per caratteristiche anatomiche, morfologiche ed ecologiche. La più antica e diffusa è la simbiosi micorrizica arbuscolare, che prende il nome dalle strutture in cui avviene lo scambio di nutrienti, gli arbuscoli. Essi sono una ramificazione dell'ifa fungina all'interno della cellula corticale radicale che ricorda appunto

un piccolo alberello. La simbiosi micorrizica arbuscolare è la micorriza con la più bassa specificità dal momento che si stabilisce tra la grande maggioranza delle piante terrestri e i funghi del sub-phylum Glomeromycotina. Esistono poi le ectomicorrize, in cui l'ifa fungina entra nella radice ma non penetra la cellula vegetale radicale, rimanendo circoscritta all'esterno. Questo fa sì che l'ifa ramifichi negli interstizi tra una cellula radicale e l'altra, formando il tipico reticolo di Hartig. Le ectomicorrize si instaurano prevalentemente tra angiosperme ad alto fusto (per esempio *Eucalyptus*, *Betula*, *Populus*, *Fagus*) o gimnosperme (per esempio Pinaceae) e funghi Basidiomiceti o Ascomiceti. Altri tipi di micorrize sono infine le micorrize ericoidi, le micorrize delle orchidee e le ectoendomicorrize. Le prime due sono caratterizzate da un'alta specificità dal momento che si stabiliscono solamente per alcuni precisi gruppi tassonomici (Ericaceae e Orchidaceae appunto), e contribuiscono per di più allo sviluppo della plantula. Le ectoendomicorrize sono perlopiù una categoria basata sulla classificazione del fungo, il quale può stabilire allo stesso momento più tipi di micorrize con piante diverse (Brundrett *et al.*, 2004, Brundrett *et al.*, 2018, van der Heijden *et al.*, 2014).

L'interazione micorrizica per alcuni gruppi tassonomici (per esempio la famiglia delle Orchidaceae) può essere talmente importante da essere necessaria per le fasi iniziali di sviluppo della plantula. Il fungo infatti provvede alla nutrizione di essa durante la transizione da micoterotrofia, in cui la pianta risulta non fotosintetica e si affida al fungo per il rifornimento di carbonio, ad autotrofia, in cui la pianta pressoché adulta diventa fotosintetica e usufruisce del simbionte solamente per la nutrizione minerale; questa transizione rappresenta il passaggio da uno scambio impari a uno equo per entrambi gli organismi (Jacquemyn *et al.*, 2019).

L'importanza delle micorrize inoltre è nota anche in campo agroecologico e il loro ruolo nei servizi ecosistemici è più che vitale. In primo luogo, la sola presenza di comunità fungine porta a una maggiore stabilità del suolo. Le complesse reti fungine infatti possono ramificarsi a tal punto da raggiungere i 30 metri di ife fungine per grammo di suolo, esercitando un effetto legante sulle sue particelle. Questo aspetto può essere ulteriormente accentuato dalla tipica secrezione di glomalina, una sostanza glicoproteica idrofobica normalmente prodotta dalle pareti cellulari fungine. La combinazione di queste due caratteristiche promuove inoltre la ritenzione idrica nel suolo e la riduzione dell'erosione di esso da parte di acque superficiali durante le precipitazioni ed altri eventi meteorologici. La presenza di simbiosi micorriziche inoltre apporta un migliore approvvigionamento di fosfato. Le ife fungine di fatto sono di gran lunga più sottili e abbondanti dei peli radicali vegetali, perciò più abili a scandagliare le particelle di terreno e a estrarre nutrienti minerali come il fosfato. Agricolture in cui sono presenti micorrize funzionali, di conseguenza, richiedono un quantitativo minore di fertilizzanti (stime indicano una riduzione fino all'80%), con una sensibile diminuzione

della dispersione del loro eccesso, principale causa dell'eutrofizzazione delle acque. A una migliore nutrizione minerale si aggiunge una maggior resistenza a stress abiotici e biotici. Studi rivelano che le piante micorrizzate hanno una maggior resistenza a siccità, inquinamento del suolo da metalli pesanti e salinità, rendendo le colture più tolleranti in ambienti afflitti da queste problematiche. Un'ulteriore problematica è data dagli organismi patogeni e dai pesticidi utilizzati per eradicarli. Recenti indagini rivelano che i funghi simbiotici possono diminuire considerevolmente la gravità delle infezioni da parte di funghi patogeni (per esempio Oomiceti) e nematodi, con un maggiore preso fresco rispetto a piante infette e non micorrizzate. Tutti i vantaggi apportati si traducono inevitabilmente in una riduzione dei costi associati alla risoluzione delle problematiche che spesso affliggono l'agricoltura, designando le simbiosi tra piante e funghi del suolo come una possibile soluzione per agricolture più sostenibili (Gianinazzi *et al.*, 2010, Bagyaraj *et al.*, 2022).

1.1 Storia evolutiva della simbiosi micorrizica

La simbiosi micorrizica è una delle interazioni più antiche della storia della Terra ed è stata di fondamentale importanza per la colonizzazione della terraferma da parte delle prime piante terrestri.

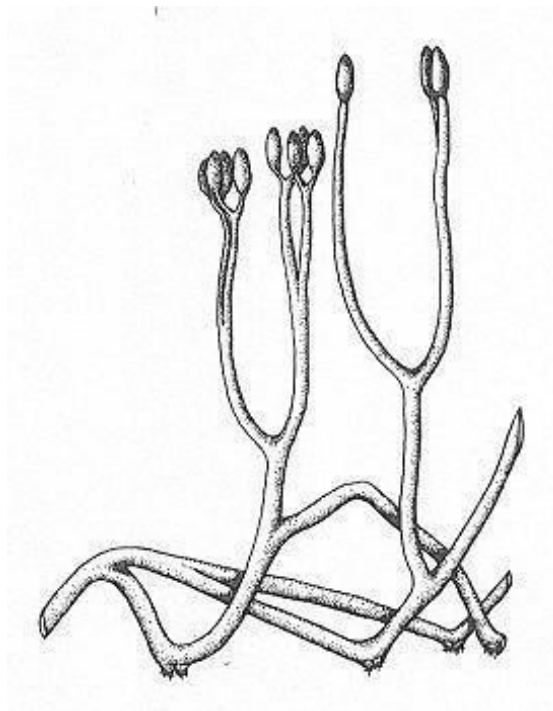


Figura 1.2: Ricostruzione di *Aglaophyton major* (D.S.Edwards, 1986). Questa sporofita raggiungeva un'altezza di circa 18 cm, con un diametro del fusto compreso tra 1,5 e 6 mm.

La più antica documentazione fossile che riporta la simbiosi micorrizica riguarda un esemplare di *Aglaophyton major* risalente a circa 407 milioni di anni fa (periodo Devoniano inferiore) ritrovato nel sito Rhynie chert. Questa primitiva pianta terrestre con caratteristiche molto simili alle briofite presenta arbuscoli intracellulari del tutto simili a quelli osservabili nelle micorrize arbuscolari odierne. Tuttavia, nel caso dell'*Aglaophyton* non è propriamente corretto parlare di micorrize. Questo è dovuto al fatto che questo tipo di piante non disponevano di un vero e proprio apparato radicale, quanto più un insieme di rizoidi con la funzione di ancoraggio al terreno. L'infezione da parte del fungo simbionte (presumibilmente appartenente al sub-phylum Glomeromycotina) riguarda in realtà le porzioni aeree, prendendo il nome di "Paramicorriza" (Remy *et al.*, 1994, Strullu-Derrien *et al.*, 2018).

In tempi geologici precedenti a questa testimonianza fossile, le prove riguardanti l'interazione tra piante e funghi sono praticamente inesistenti, anche se alcuni studi genetici sembrano suggerire una prima interazione tra funghi primitivi e le alghe antenate delle piante. In base alla documentazione fossile successiva al ritrovamento di *Aglaophyton*, si può affermare che l'origine delle micorrize intese come simbiosi mutualistica a livello radicale si siano formate con l'antenato comune dei gruppi fungini Glomeromycotina e Mucoromycotina. L'antichità di questa interazione è confermata da studi genomici sui funghi simbionti. Molti di essi presentano un genoma molto più esteso della norma (più di 25000 geni), in cui tuttavia sono mancanti i geni per la degradazione della lignocellulosa e la sintesi di acidi grassi. In compenso si assiste a un elevato numero di geni codificanti proteine coinvolte nelle vie di segnalazione e nel controllo dell'immunità e dello sviluppo della pianta. Da allora la biodiversità di simbiosi micorriziche arbuscolari è aumentata, anche se le testimonianze fossili sono poco numerose.



Figura 1.3: Ricostruzione di una foresta del Cretacico (120 Ma) della penisola Antartica (J. Howe, R. Nichols 2003, GEACEP 2005-2010).

Resti fossili silicizzati risalenti ai periodi dal Permiano al Cretaceo (da 250 Ma a 66 Ma) trovati in Antartide testimoniano la presenza di ecosistemi fiorenti. In essi, sono state osservate micorrize arbuscolari nell'estinta Pteridosperma *Glossopteris* (Permiano Superiore, 251-259 Ma) e micorrize multiple nell'estinta Cicadofita *Antarcticycas* (Triassico Medio, 237-247 Ma). Ben più recenti sono i fossili di ectomicorrize, i quali risalgono all'Eocene (34-56 Ma) e riguardano soprattutto conifere del genere *Pinus* con funghi Basidiomycota. Ciò ha portato alcuni autori ad ipotizzare che questo tipo di micorrizza si sia evoluta con la radiazione delle Pinaceae circa 174 Ma (Giurassico). L'ipotesi di origine per le angiosperme risale invece a circa 100 Ma (Cretacico), datazione coerente con la radiazione dei Rosidi. È importante tener presente che le ectomicorrize si sono evolute indipendentemente più di 18 volte nelle angiosperme e circa 80 volte nei funghi in un arco geologico molto lungo, suggerendo anche che probabilmente alcuni funghi possano convertirsi a questo tipo di relazione. Le micorrize riguardanti le Ericaceae e Orchidaceae con Basidiomycota e Ascomycota sono le più recenti, dal momento che riguardano famiglie di piante la cui radiazione è avvenuta soprattutto nel Cenozoico. Come possibile origine è stato ipotizzato che i funghi simbiotici fossero dapprima endosimbionti e che successivamente abbiano sviluppato la capacità di stabilire ectomicorrize e, secondariamente, micorrize ericoidi ed orchidoidi (Strullu-Derrien *et al.*, 2018).

Secondo alcuni autori, nella storia evolutiva delle micorrize si riconoscono tre ondate. La prima ondata risale a circa 450 Ma (Ordoviciano Superiore) con l'origine delle simbiosi micorriziche arbuscolari e la loro diversificazione, la seconda risale al Cretacico (66-145 Ma) con numerose evoluzioni indipendenti che segnano la comparsa delle ectomicorrize in molte famiglie di piante, e la terza risale all'inizio del Paleogene (65 Ma), è tutt'ora in atto e segna un'ampia diversificazione delle ectomicorrize, in cui le piante sviluppano interazioni radicali ben più complesse, che prevedono transizioni da un tipo all'altro (Brundrett *et al.*, 2017).

L'antichità di questa simbiosi è evidente anche a livello genomico in molte piante terrestri. Un recente studio filogenomico ha rivelato che esiste una via cellulare di segnalazione simbiotica comune conservata in tutte le piante terrestri che stabiliscono sia simbiosi micorriziche sia altri tipi di endosimbiosi. A conferma di questo fatto, piante che hanno perduto nel tempo la capacità di stabilire simbiosi micorriziche arbuscolari hanno perduto anche i geni coinvolti nelle vie di segnale per stabilirle. I geni coinvolti sono prevalentemente legati al ruolo di riconoscimento dei segnali del simbionte (*SYMRK*, *CCaMK* e *CYCLOPS*), e al trasferimento di lipidi, meccanismo essenziale per la funzione della simbiosi micorrizica arbuscolare (Radhakrishnan *et al.*, 2020).

1.2 Ecologia delle simbiosi micorriziche

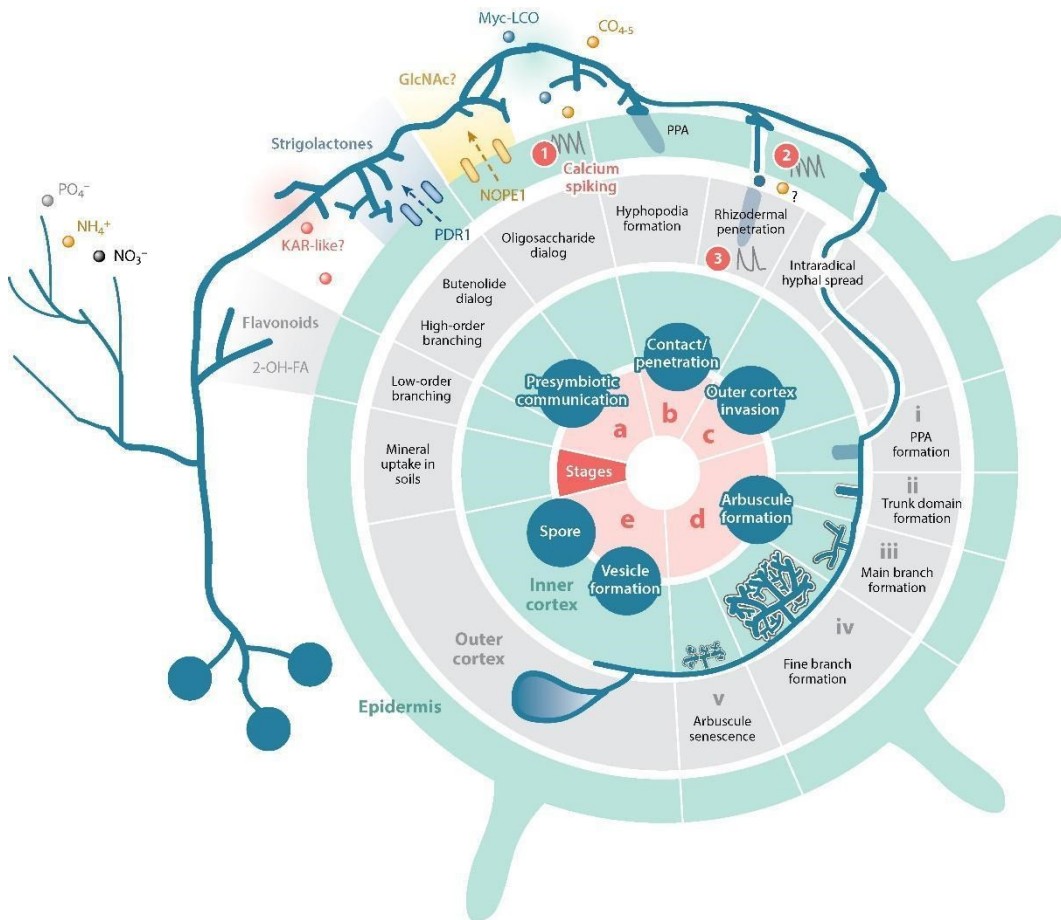
Si stima che esistano quasi 50000 specie di funghi che formano micorrize, ovvero circa il 10% della totalità sul pianeta. Il numero di specie coinvolte nelle micorrize arbuscolari è di circa 1600, ed esse si associano con circa 200000 specie di piante, mostrando una specificità estremamente bassa. Inoltre, in natura accade che la pianta ospite interagisca con più funghi contemporaneamente (fino a 75) e sono stati osservati diversi gradi di selettività e preferenze per i vari simbionti. Ciò si traduce in una elevata ricchezza di specie a livello locale, dipendendo in aggiunta dal tipo di ospite, suolo e clima. Per le ectomicorrize circa 20000 funghi si associano con 6000 specie di piante. Questo rapporto è dovuto al fatto che molte specie di funghi conducono una vita in parte saprotrofica, ma la mancanza di enzimi per la degradazione della lignocellulosa fa sì che siano dipendenti dall'interazione con le piante, un risultato riscontrato anche per i funghi coinvolti nelle simbiosi ericoidi ed orchidoidi. Le piante ospiti destinano fino al 20% dei fotosintati al simbionte nel caso delle micorrize arbuscolari, una percentuale che può raggiungere il 50% nel caso delle ectomicorrize. Insieme al fatto che la quasi totalità degli ecosistemi terrestri dispone di interazioni micorriziche, questo testimonia che i funghi micorrizici svolgono una funzione chiave nella ciclizzazione del carbonio. Dall'altra parte i simbionti provvedono fino all' 80% del nitrato e del fosfato di cui la pianta necessita, ed evitano perdite di nutrienti minerali per denitrificazione o lisciviazione negli ecosistemi in cui operano. L'effetto generale è un notevole aumento della produttività vegetale e una maggior robustezza dell'ecosistema da perturbazioni esterne. È stato anche ipotizzato che le micorrize estendano la nicchia ecologica e riducano la competizione con le altre piante, con il risultato che senza queste simbiosi alcune di esse non potrebbero coesistere. Un fenomeno interessante è l'instaurarsi delle cosiddette reti micorriziche (Common Mycorrhizal Network CMN, anche detto Wood Wide Web, WWW). Come alcune piante si associano a più partner fungini, allo stesso modo alcuni funghi si associano a più partner vegetali. Il risultato è che più partner vegetali risultano interconnessi tramite il fungo micorrizico, in cui sono stati osservati trasferimenti di carbonio e molecole di segnalazione da una pianta ad un'altra. In alcune foreste boreali è stato persino riscontrato un trasferimento di fotosintati agli alberelli in ombra da parte degli alberi vicini posti alla luce, mostrando come la rete micorrizica favorisca l'affermarsi di nuove piantine in una vegetazione perenne (van der Heijden *et al.*, 2014). Il funzionamento delle CMN e i presunti vantaggi apportati rimangono tuttavia ampiamente controversi e sono stati messi recentemente in discussione. Gli studi che riportano l'effettivo trasferimento di sostanze tra piante sarebbero infatti limitati ed effettuati prevalentemente sul campo e in uno scarso numero di habitat. Esisterebbe quindi un bias di

citazione positivo nei confronti delle reti micorriziche, che però non rispecchia l'evidenza dei fatti (Karst *et al.*, 2023).

1.3 La simbiosi micorrizica arbuscolare

La simbiosi micorrizica arbuscolare riguarda membri del sub-phylum Glomeromycotina e la grande maggioranza delle piante esistenti, incluse numerose specie coltivate dall'uomo. È chiamata in questo modo per via della struttura che si forma a livello intracellulare in seguito alla ramificazione dell'ifa: l'arbuscolo. Quest'ultimo, tuttavia, non entra mai in contatto diretto con il citoplasma della cellula vegetale, poiché lo sviluppo dell'arbuscolo è accompagnato dalla formazione di una nuova membrana cellulare chiamata membrana periarbuscolare.

Per stabilire questo tipo di simbiosi è necessaria una complessa comunicazione biochimica seguita da numerosi step: comunicazione presimbiotica, contatto e penetrazione, sviluppo dell'arbuscolo e formazione di vescicole e spore.



Choi J, et al. 2018. *Annu. Rev. Phytopathol.* 56:135–60

Figura 1.4: Fasi dello sviluppo della simbiosi micorrizica arbuscolare, con i principali passi che portano alla sua formazione (Choi *et al.*, 2018).

1.3.1 Comunicazione presimbiotica

Entrambi gli organismi rilasciano nel suolo un insieme di molecole in grado di diffondere, essere percepite dal recettore del futuro partner ed attrarlo. Le sostanze rilasciate dalla radice attivano le vie metaboliche dell'ifa che promuovono la sua ramificazione (e per questo chiamati *branching factors*) e la produzione di fattori di micorrizzazione (Myc-factors). Le molecole vegetali responsabili sono gli strigolattoni (SL), fitormoni lattoni terpenoidi prodotti a partire dai carotenoidi tramite una via metabolica in cui il carlattone è il precursore, e che di norma modulano la crescita del fusto e della radice. Gli strigolattoni sono percepiti dal fungo anche a basse concentrazioni (10 nM) e la loro sintesi è aumentata dalla pianta sotto condizioni di carenza di fosfato. Dall'altra parte, il fungo rilascia i fattori di micorrizzazione (Myc-factors), una classe di molecole di natura oligosaccaridica. Più precisamente si tratta di lipochitooligosaccaridi micorrizici (Myc-LCO), e chitooligosaccaridi a catena corta (CO) nella forma di CO4 (tetrameri) e CO5 (pentameri). Queste molecole sono prodotte attivamente dal fungo, distinguendosi così dai chitooligosaccaridi a catena lunga (CO8), tipici frammenti della parete cellulare di funghi patogeni. Diversi studi concordano sul fatto che la percezione delle molecole fungine avviene grazie a recettori chinasi (RKs) in grado di legarle selettivamente, con la conseguente attivazione del cosiddetto *common symbiotic signalling pathway*. Una componente fondamentale di questa via di segnale è l'attivazione di frequenti oscillazioni della concentrazione di Ca^{2+} nucleare e perinucleare (*Ca²⁺ spiking*) rilascio di calcio intracellulare di segnalazione per l'attivazione delle vie metaboliche per la simbiosi (Choi *et al.*, 2018).

1.3.2 Contatto e penetrazione

Una volta avvenuto il contatto, il fungo micorrizico arbuscolare forma una sottile struttura discoidale, detta ifopodio, sulla superficie dell'epidermide della radice. Questo passo rappresenta un riconoscimento fisico tra i due organismi, dipendente dalle caratteristiche fisiche dello strato superficiale di rizoderma. La pianta ospite, intanto, si prepara ad accogliere il fungo creando una struttura intracellulare di forma tubulare detta apparato di pre-penetrazione (Pre-Penetration Apparatus, PPA, Genre *et al.*, 2008). Lo sviluppo di questa struttura richiede l'espressione di specifici geni che portano a una riorganizzazione cellulare nel sito dell'infezione. Questa invaginazione avviene grazie al supporto del reticolo endoplasmatico e degli elementi del citoscheletro. Contemporaneamente, la composizione biochimica della parete cellulare viene localmente modificata per permettere all'ifa di penetrare la cellula più agevolmente. In questo senso l'ifa si allunga seguendo la traiettoria definita dai cambiamenti citologici attuati dalle cellule radicali. L'allungamento dell'ifa a livello radicale segue

un andamento radiale fino a che non raggiunge la regione corticale, in cui inizia a svilupparsi in senso longitudinale (Choi *et al.*, 2018).

1.3.3 Sviluppo dell'arbuscolo

Una volta entrata nella cellula, l'ifa inizia a proliferare sia intercellularmente che intracellularmente, preceduta dalla formazione dell'apparato di pre-penetrazione. Raggiunte le cellule della regione corticale, il fungo inizia a ramificare ampiamente e nelle cellule vegetali si assiste a una endoduplicazione del nucleo, in accordo con l'aumentato bisogno di trascrizione per ospitare le future strutture fungine. L'ifa ramifica intracellularmente in modo dicotomico e ogni singolo "ramo" dell'arbuscolo è seguito da un'invaginazione della membrana plasmatica, che forma così la membrana periarbuscolare (*Periarbuscular Membrane*, PAM). Grazie ad essa i due organismi non entrano mai in contatto e si delinea uno spazio tra la membrana cellulare vegetale e quella fungina che prende il nome di interfaccia periarbuscolare. Il processo di ramificazione dicotomica continua fino a occupare tutto lo spazio intracellulare della cellula corticale. Nel processo il vacuolo viene ridotto in maniera consistente per ospitare l'arbuscolo e gli organelli sono compattati a ridosso della parete cellulare. La membrana periarbuscolare, seguendo ogni ramificazione, aumenta notevolmente la propria superficie di scambio per i nutrienti e i fotosintati. In questo processo risulta fondamentale l'aumentata esocitosi verso i rami più sottili dell'arbuscolo, la quale permette lo sviluppo e il mantenimento della simbiosi. I principali trasportatori per il fosfato localizzano nelle porzioni di membrana periarbuscolare che circondano i rami più sottili, nei quali avviene lo scambio di sostanze tra i due organismi (Choi *et al.*, 2018).

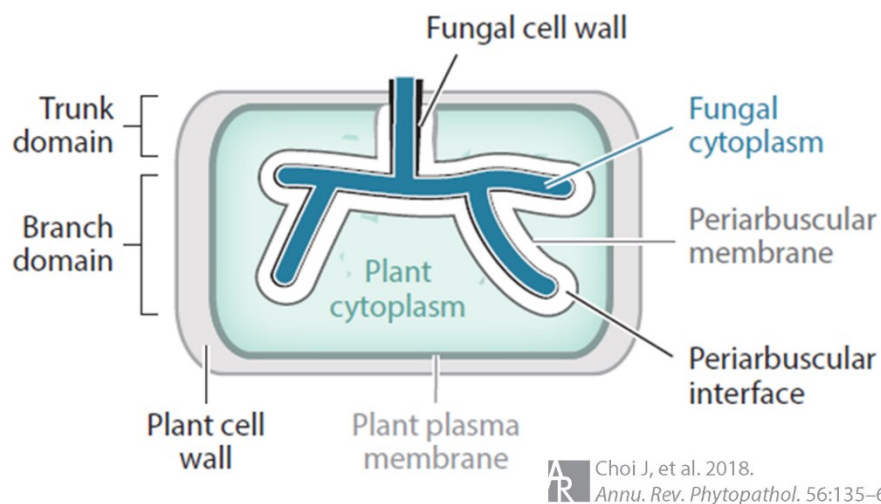


Figura 1.5: Struttura dell'arbuscolo e i principali elementi che lo compongono (Choi *et al.*, 2018).

Esistono due tipi di arbuscoli: arbuscoli del tipo *Arum* e arbuscoli del tipo *Paris*. Gli *Arum* sono arbuscoli che, quando completamente sviluppati, mostrano la forma sopra descritta e che si sviluppano perpendicolarmente dall'ifa extracellulare. Nei *Paris* invece l'ifa transita da una cellula alla successiva, e formano un fitto groviglio intracellulare. La distinzione tra queste due categorie non è netta visto che in natura si possono assistere a situazioni intermedie, suggerendo che i due tipi siano gli estremi di un continuum da un tipo all'altro (Gutjahr *et al.*, 2013).

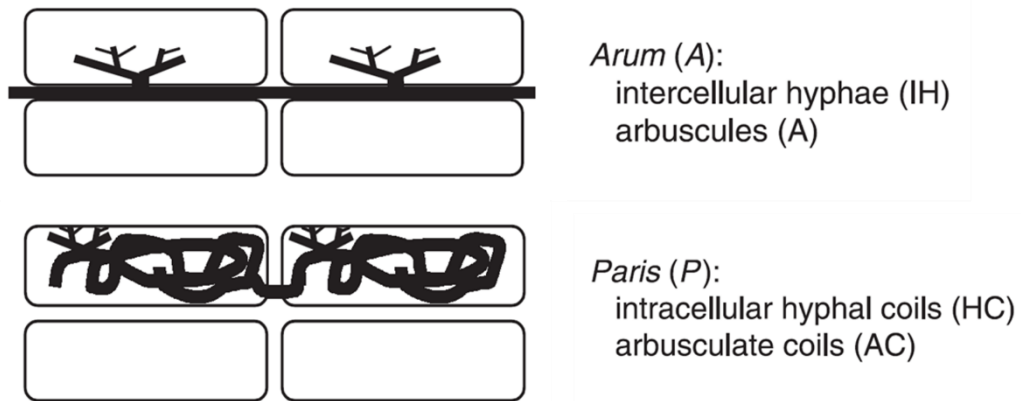


Figura 1.6: Le due tipologie di arbuscoli (Dickson *et al.*, 2004).

Nonostante i notevoli sforzi dal punto di vista anatomico e citologico per lo sviluppo, gli arbuscoli sono strutture effimere, che hanno una durata di alcuni giorni. Alla fine di questo periodo di tempo gli arbuscoli vanno incontro a un collasso che inizia dalle ramificazioni più sottili fino a raggiungere il tronco basale. Il collasso, tuttavia, è preceduto dalla contrazione del citoplasma dell'ifa fungina e un aumento della produzione di setti. Secondo alcuni autori la degenerazione dell'arbuscolo è collegata all'omeostasi del carbonio e del fosfato per entrambi i simbionti, ma sono necessari ulteriori studi a riguardo (Choi *et al.*, 2018).

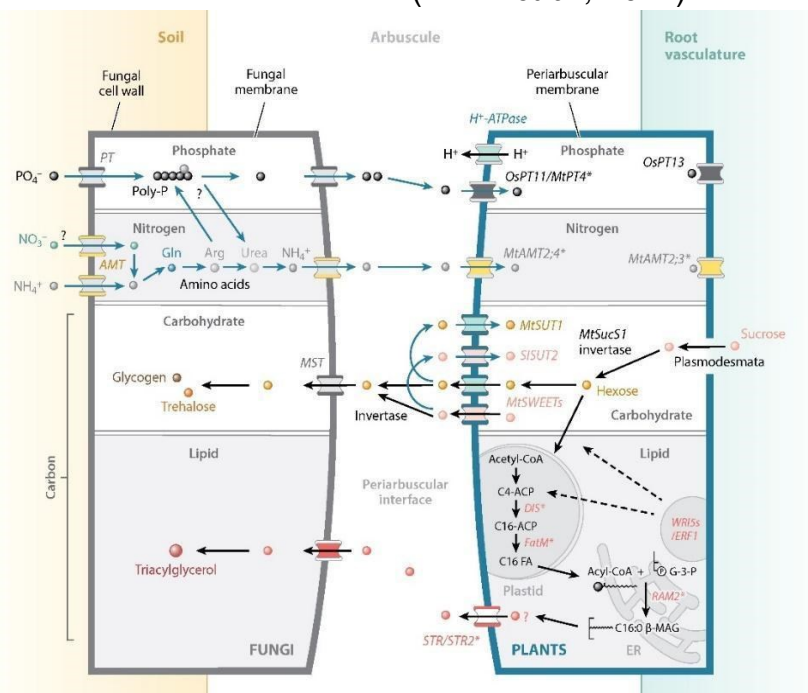
1.3.4 Formazione di vescicole e spore

Dopo aver stabilito la simbiosi, il fungo produce delle vescicole intracellulari per lo stoccaggio di lipidi. Si tratta di lobi irregolari con una parete cellulare spessa che si formano all'interno delle cellule ospiti, sviluppati da gran parte degli ordini appartenenti al sub-phylum Glomeromycotina. In aggiunta, il fungo produce spore asessuali in cui sono presenti lipidi nella forma di triacilgliceroli, utilizzati per la germinazione della spora e la crescita asimbiotica del tubo germinale (Choi *et al.*, 2018).

1.3.5 Scambio di nutrienti

La simbiosi micorrizica arbuscolare è un'interazione mutualistica basata sullo scambio di sostanze nutritive del quale beneficiano entrambi gli organismi. Il fungo fornisce alla pianta nutrienti minerali (prevalentemente fosfato inorganico e azoto) e acqua in cambio di carbonio organico, nelle forme di zuccheri e lipidi. Si stima che la pianta investa fino al 20% dei propri fotosintati nella simbiosi, e il fungo soddisfi fino al 100% della richiesta di nutrienti minerali della pianta (Choi *et al.*, 2018).

Il fosfato è uno dei nutrienti minerali più difficili da acquisire da parte della pianta, principalmente a causa della sua scarsa solubilità. Nei suoli in cui è abbondante, nonostante sia inizialmente più facile da assimilare, possono formarsi le "depletion zones", ovvero porzioni di suolo depauperate di questo elemento. L'uptake di fosfato da parte dell'apparato radicale infatti impoverisce localmente il suolo poiché il tasso di assorbimento è maggiore di quello di sostituzione, e l'assimilazione da parte dei trasportatori di membrana diventa metabolicamente sempre più dispendiosa, considerando anche che la concentrazione intracellulare dello ione $H_2PO_4^-$ è mille volte più alta di quella nel suolo. Il fungo micorrizico arbuscolare è in grado di scandagliare volumi di suolo di gran lunga più abbondanti, mobilitare il fosfato e consegnarlo direttamente alle cellule corticali radicali, rendendo la simbiosi micorrizica arbuscolare molto vantaggiosa nell'acquisizione dei nutrienti minerali (Smith *et al.*, 2011).



Choi J, et al. 2018. *Annu. Rev. Phytopathol.* 56:135-60

Figura 1.7: Schema riassuntivo dello scambio bidirezionale di nutrienti. Da sinistra a destra: suolo, fungo, arbuscolo, cellula vegetale e tessuti vascolari radicali (Choi *et al.*, 2018).

Il fosfato inorganico è prelevato dal suolo dai trasportatori ad alta affinità posseduti dal micelio fungino extraradicale ed è accumulato come polifosfati. Essi sono trasportati fino al micelio intraradicale, dove, in seguito a idrolizzazione, i gruppi fosfato sono rilasciati nell'interfaccia periarbuscolare. Qui sono prelevati dai trasportatori intrinseci alla membrana periarbuscolare della cellula corticale. Al contrario, la cellula vegetale rilascia nell'interfaccia periarbuscolare glucosio, che è prelevato dal trasportatore ad alta affinità per i monosaccaridi del fungo. Dopodiché è convertito in glicogeno e trealosio, che sono trasportati al resto del micelio fungino. Per l'endosimbionte è altrettanto importante la fornitura di lipidi, nella forma di acidi grassi saturi a 16 atomi di carbonio (C16:0 β -MAG). Studi genomici hanno mostrato che i funghi micorrizici arbuscolari non presentano la sintasi eucariotica per gli acidi grassi (*Fatty Acids Synthase*, FAS), indicando che siano dipendenti dalla simbiosi con la pianta per il rifornimento di essi. Presentano tuttavia enzimi per la desaturazione e l'elongazione di acidi grassi, suggerendo che gli acidi grassi forniti dalla pianta siano utilizzati per la crescita, sviluppo, e soprattutto per la produzione di spore. In questo senso i funghi micorrizici arbuscolari sono definiti simbiotici "obbligati", poiché devono necessariamente stabilire la simbiosi per completare il proprio ciclo vitale (Choi *et al.*, 2018).

La simbiosi micorrizica arbuscolare assicura anche un miglior uptake di azoto. I funghi sono in grado di velocizzare la decomposizione di materiale organico e prelevare l'ammonio rilasciato mediante specifici trasportatori la cui espressione è indotta da basse concentrazioni di questo ione. L'azoto inorganico assorbito dal micelio extraradicale viene convertito in amminoacidi grazie alla via della glutammina sintetasi e la glutammina ossoglutarato amminotrasferasi (GS/GOGAT). La forma principale trasferita dal micelio extraradicale al micelio intraradicale è l'arginina, la quale in seguito è scissa in urea e ornitina a livello dell'ifa intraradicale. L'urea a questo punto è idrolizzata, rilasciata nell'interfaccia periarbuscolare nella forma di ammonio e assorbita dalla cellula corticale vegetale (Wang *et al.*, 2017).

La regolazione dello scambio di nutrienti durante la simbiosi micorrizica arbuscolare segue la "teoria del mercato" (Kiers *et al.*, 2011), in cui entrambi gli organismi possono esercitare un controllo sulla propria fornitura di molecole. Le piante infatti sono in grado di selezionare i partner fungini più efficienti e ricompensarli con più carboidrati e, allo stesso modo, i funghi assicurano più nutrienti minerali alle radici che scambiano più carboidrati. Ciò implica che le piante sono in grado di percepire un maggior flusso di fosfato inorganico e in risposta possono aumentare il rilascio di carboidrati nella regione corticale micorrizzata specifica, anche se non sono ancora stati chiariti i meccanismi alla base. Queste condizioni per la regolazione dello scambio di nutrienti fungono da protezione contro potenziali partner che non

forniscono fosfato, dato che la pianta fornisce zuccheri solo in cambio di questo ione (Wang *et al.*, 2017).

Sulla “teoria del mercato” tuttavia sono state avanzate alcune osservazioni. In alcuni casi (circa il 10% degli studi) l'interazione con il fungo micorrizico arbuscolare riduce la crescita della pianta, indicando che non necessariamente le piante sono avvantaggiate da questa interazione e che non sempre sono in grado di escludere il partner in condizioni svantaggiose. In aggiunta, in suoli con nutrienti limitati ma produzione abbondante di fotosintati, non c'è una forte pressione selettiva per ricompensare funghi benefici o sviluppare difese contro quelli meno efficienti, dal momento che il carbonio organico non è una risorsa limitante in questo tipo di situazioni. Queste osservazioni mostrano che esistono fattori per la regolazione della simbiosi che vanno oltre il solo scambio di risorse, ma sono necessari ulteriori indagini per una migliore comprensione (van der Heijden *et al.*, 2014).

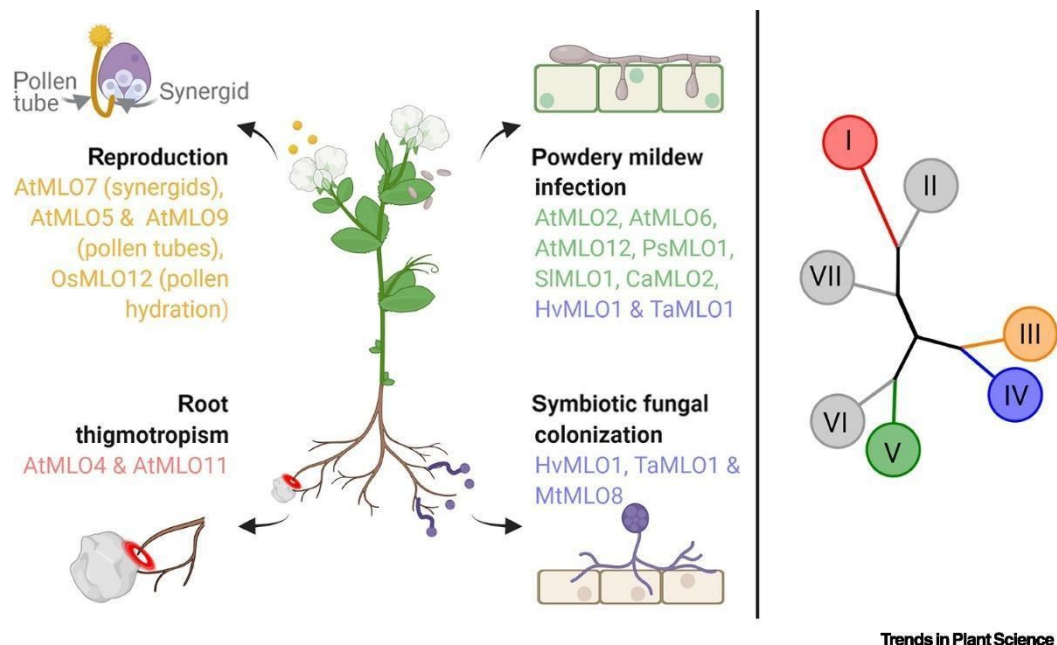
I meccanismi molecolari che regolano la simbiosi sono studiati da decenni, tuttavia la ricerca non ha ancora identificato gli attori che determinano questo delicato continuum tra simbiosi benefica per entrambi gli organismi e simbiosi in cui solo uno dei due organismi trae un vantaggio.

1.4 I geni *Mildew Locus O* (MLO)

I geni *Mildew Locus O* (MLO) sono stati identificati per la prima volta in orzo (*Hordeum vulgare* L.), in cui individui mutanti per questo gene sono resistenti all'infezione del fungo patogeno *Blumeria graminis*, conosciuto come “mal bianco” o con il nome inglese “*powdery mildew*”. L'infezione da questo fungo provoca la formazione di una patina biancastra sulla superficie delle foglie e individui resistenti sono stati selezionati e impiegati nelle colture agricole (Buschges *et al.*, 1997).

I geni MLO sono detti geni di suscettibilità e sono diversi dai geni di resistenza, in quanto facilitano l'infezione da parte di altri organismi e supportano la compatibilità con essi. Infatti, i geni di resistenza costituiscono le specifiche difese immunitarie che si sono sviluppate nelle piante nel corso dell'evoluzione e sono collegati al riconoscimento precoce dei patogeni. Le piante possiedono infatti alcuni recettori (*Pattern Recognition Receptors*, PRR) che riconoscono specifiche molecole del patogeno, derivanti direttamente da esso (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMP) o dalle strutture vegetali danneggiate (*Damage-Associated Molecular Patterns*, DAMP). Il riconoscimento di queste molecole attiva una risposta difensiva detta *PAMP-triggered immunity* (PTI), che induce l'influsso di Ca^{2+} nel citoplasma, la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), la secrezione di composti antimicrobici ed enzimi idrolitici per la parete cellulare del microrganismo. Dall'altra parte gli organismi patogeni sono in grado di aggirare i meccanismi di difesa della pianta, modificando la risposta

immunitaria o sfruttando a proprio vantaggio altre vie. Organismi biotrofi, contrariamente a molti altri patogeni, richiedono una “cooperazione” da parte della pianta per attuare l’infezione, dato che alcune strutture trofiche devono crescere all’interno della cellula vegetale per ottenere i nutrienti (per esempio gli austori). Questi organismi, in seguito alla coevoluzione con la pianta ospite, hanno sfruttato a proprio vantaggio i geni di suscettibilità, solitamente coinvolti in processi fisiologici o di sviluppo, e la perdita o mutazione di questi conferisce alla pianta la resistenza all’infezione (van Schie *et al.*, 2014).



Trends in Plant Science

Figura 1.8: Schema riassuntivo dei processi in cui sono coinvolti i geni *MLO* e la loro distribuzione nei cladi (Jacott *et al.*, 2021).

I geni *MLO* sono una famiglia di geni diversificati in sette cladi e sono coinvolti nella crescita del tubetto pollinico per la fecondazione della cellula uovo (clade III), nella tigmomorfogenesi radicale (crescita differenziale della radice in seguito a uno stimolo meccanico, clade I), nell’infezione da *powdery mildew* (clade V) e nella simbiosi micorrizica arbuscolare (clade IV). Tutti questi processi hanno in comune la percezione di uno stimolo fisico esterno, che sia un tipo di cellula differente (tubetto pollinico), un organismo (ifa fungina) o una superficie solida. I geni codificano una proteina integrale di membrana con sette eliche transmembrana e un dominio legante la calmodulina (CaM) nel C-terminale sul versante citoplasmatico, mentre nelle regioni *loop* dell’N-terminale sono presenti residui di cisteina, coinvolti nella regolazione dell’attività della proteina probabilmente attraverso lo stato di riduzione (Jacott *et al.*, 2021).

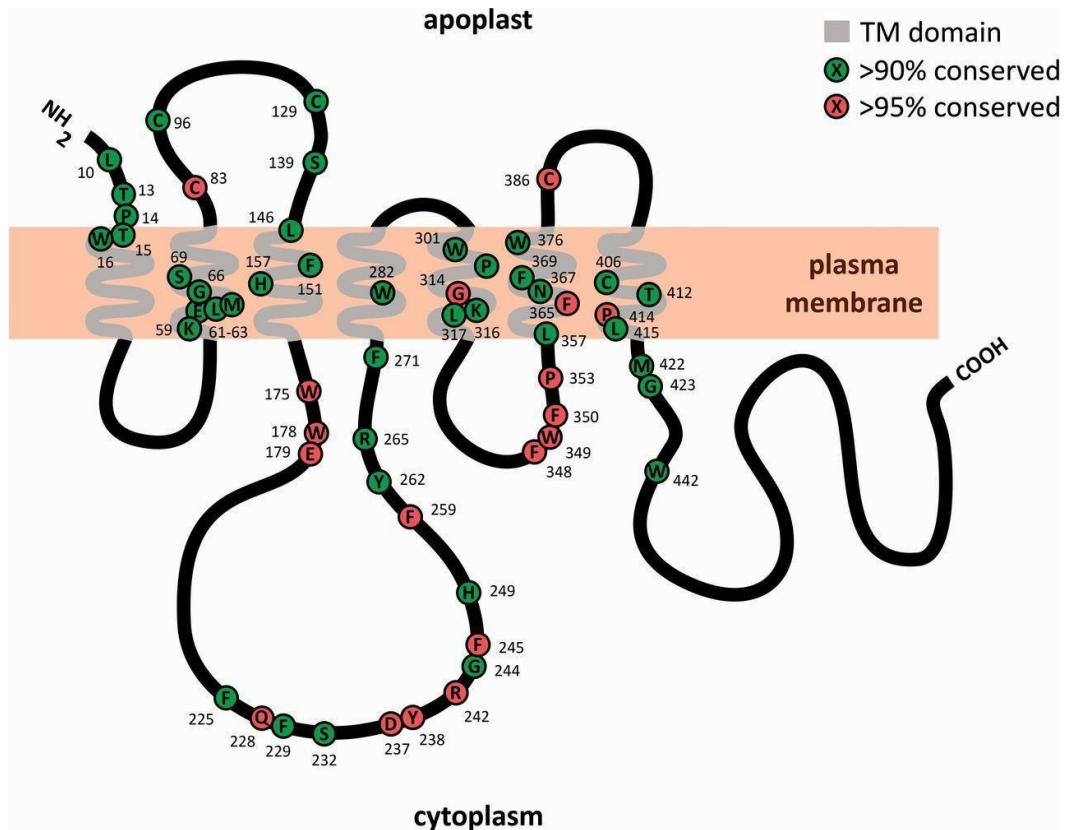


Figura 1.9: Topologia della proteina MLO, in cui sono evidenziati i residui conservati (Kusch *et al.*, 2016).

Il dominio legante la calmodulina della proteina MLO suggerisce che sia coinvolta nella via di segnalazione del calcio intracellulare (*calcium signaling*). Lo ione calcio (Ca^{2+}) funge da secondo messaggero nella cellula vegetale e si lega a specifici recettori che decodificando la firma del calcio (*calcium signature*), ovvero la conseguente variazione della concentrazione intracellulare in risposta allo stimolo, attuano risposte cellulari specifiche. Esistono quattro classi di sensori per lo ione calcio nelle piante: le proteine calmodulina (CaM) o Cam-like (CMLs), proteine calcineurine B-like (CBLs), le proteine CBL che interagiscono con proteine chinasi (CIPKs) e le chinasi calcio-dipendenti (CPKs). Questo tipo di segnalazione è fondamentale per molti processi fisiologici della pianta, come la riproduzione, lo sviluppo e le risposte a stress biotici e abiotici. La calmodulina, un sensore citoplasmatico per il calcio, interagisce e regola positivamente l'attività di MLO. Ad esempio, il dominio di legame alla calmodulina è necessario per la suscettibilità a *powdery mildew* (Jacott *et al.*, 2021). Uno studio recente ha mostrato che non solo l'attività delle proteine MLO sia regolata dal Ca^{2+} tramite il legame della calmodulina, ma anche che la funzione biochimica delle proteine MLO è quella di costituire un poro permeabile a cationi bivalenti (Gao *et al.*, 2022).

1.4.1 Filogenesi dei geni MLO

I geni *MLO* sono diffusi in tutte le piante terrestri superiori e la loro origine è molto antica. Sulla base di analisi filogenetiche, proteine simili a quelle espresse dai geni *MLO* erano già presenti in alcune alghe verdi (Chlorophyta) in diverse forme, suggerendo che fossero presenti nell'antenato comune tra alghe verdi e piante terrestri. Proteine MLO-like, strutturalmente molto affini, sono presenti anche in altri gruppi, come in alghe rosse, in membri degli Alveolata, Oomicota e Stramenopili e gruppi più affini al regno animale (Apusozoa e Amoebozoa). L'origine delle proteine MLO-Like, quindi, può essere datata ben prima della comparsa delle proteine MLO e delle prime piante terrestri e da allora è avvenuta una notevole diversificazione che ha portato alla comparsa di sette cladi differenti (Kusch *et al.*, 2016).

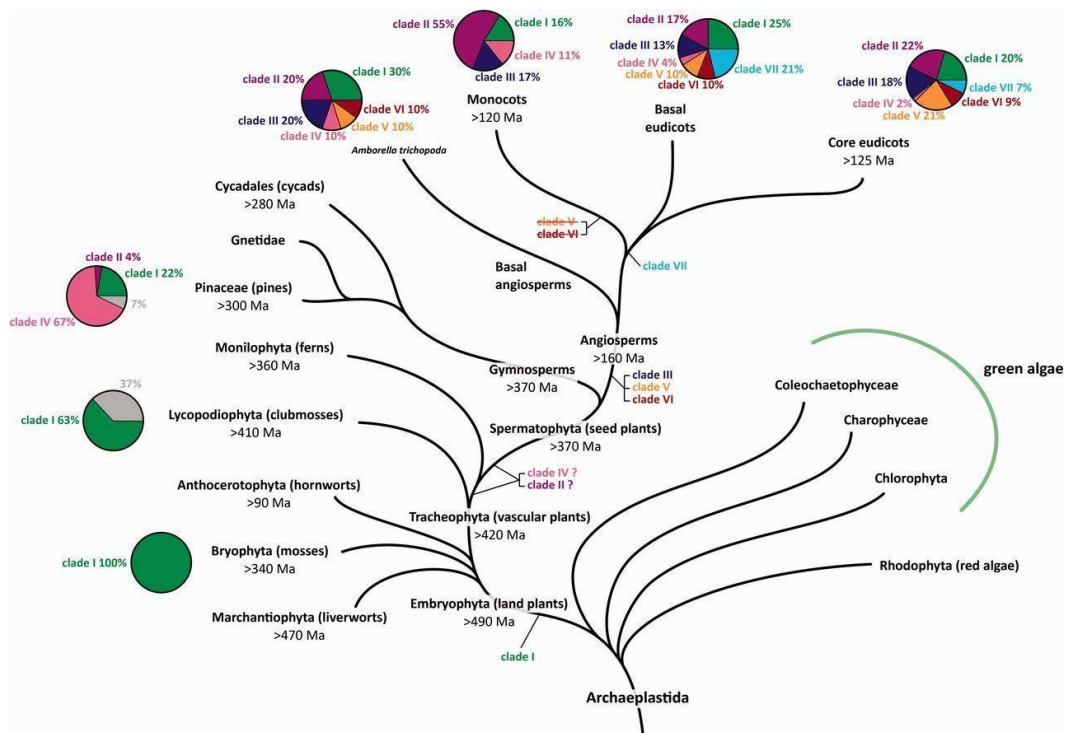


Figura 1.10: Filogenesi semplificata delle principali piante terrestri e comparsa dei cladi dei geni *MLO* (Kusch *et al.*, 2016).

Il più antico di essi è il clade I, la cui comparsa può essere rintracciata a circa 490 Ma nelle più antiche piante terrestri conosciute. I geni *MLO* presenti nelle gimnosperme sembrano appartenere al clade II e al clade IV, anche se le famiglie di gimnosperme prese in considerazione dallo studio risultano molto scarse. I cladi III, V e VI sono comparsi nelle prime fasi dell'evoluzione delle Angiosperme circa 160 Ma, prima della divisione tra Eudicotiledoni e Monocotiledoni (120 Ma). Nelle Eudicotiledoni sono presenti *MLO* appartenenti a tutti i sette cladi (anche se in alcuni lineages i

cladi IV e VII sono andati perduti) mentre nelle Monocotiledoni sono andati perduti i cladi V e VI. Nelle Eudicotiledoni per di più si registra un numero di MLO di gran lunga superiore a quello degli altri raggruppamenti e cladi V, VI e VII sono presenti solamente in questo gruppo. È stata osservata una forte correlazione positiva tra numero di geni *MLO* e numero di geni e cromosomi, anche se l'aumento dei geni *MLO* non è da ricercare nella duplicazione genomica avvenuta in questo gruppo ma nell'evoluzione di questi cladi. Si ritiene che la divisione in cladi dei geni *MLO* rispecchi le differenti funzioni che questi geni ricoprono nei gruppi tassonomici in cui sono presenti. Il clade I è collegato alla regolazione dei pattern di crescita della radice e alla tigmomorfogenesi, seguito dalla comparsa dei cladi II e IV, i quali sono associati all'evoluzione del seme nelle gimnosperme. I cladi III, V e VI risultano i più recenti, con la loro apparizione nelle prime angiosperme in corrispondenza con l'evoluzione del fiore. In esse, si è assistito successivamente alla perdita del clade IV, surclassato dai cladi V e VI, mentre il clade III, essendo coinvolto nei processi riproduttivi che portano alla fecondazione, svolge un ruolo di primaria importanza. Infine, il clade VII è presente solamente nelle eudicotiledoni, sebbene non sia ancora chiara la funzione fisiologica di competenza (Kusch *et al.*, 2016).

1.4.2 *MLO* e tigmomorfogenesi radicale

L'apparato radicale vegetale è un organo molto plastico che circumnaviga le barriere date dalle particelle del suolo alla ricerca di zone ricche di nutrienti. In questo processo, l'ottimizzazione della crescita e dell'architettura radicale è fondamentale ed è il risultato di divisione ed espansione cellulare, formazione di radici laterali e differenziazione cellulare. Le radici possono seguire pattern di crescita complessi in risposta a stimoli ambientali, con lo sviluppo di forme ondulate o spirali nel caso di superfici impenetrabili. I due principali stimoli ambientali che influenzano la crescita e direzionalità della radice sono gravità e stimoli meccanici, che rispettivamente inducono gravitropismo (crescita in direzione della gravità terrestre) e tigmomorfogenesi. Quest'ultima viene generalmente definita come l'insieme delle risposte di crescita di un organo vegetale in seguito a uno stimolo di tipo meccanico. La percezione degli stimoli meccanici e gravitropici è integrata e guida la radice intorno ad eventuali barriere nel suolo, dispendiose da attraversare. Recenti studi su *Arabidopsis thaliana* dimostrano che la tigmomorfogenesi è coordinata dall'attività di due proteine MLO appartenenti al clade I. Individui mutanti per questi due geni (*AtMLO4* e *AtMLO11*) infatti presentano pattern di crescita spirali in seguito a stimolo tattile, in contrasto con il pattern casuale e imprevedibile che si osserva in individui wild type nella stessa situazione. Gli autori ipotizzano che nelle linee mutanti venga meno il reset della machinery cellulare per la corretta percezione e interpretazione degli stimoli meccanici,

in cui *AtMLO4* e *AtMLO11* sarebbero coinvolti nella trasduzione dei segnali dati dai meccanorecettori localizzati nella membrana plasmatica (Chen *et al.*, 2009).

Nella via di segnalazione attivata da stimoli fisici, altri autori hanno dimostrato che il ruolo di MLO è legato alla sua funzione di canale transmembrana permeabile al Ca^{2+} . È stato osservato infatti che l'applicazione esogena di Ca^{2+} sopprime la crescita aberrante della radice osservata nelle linee mutanti, inducendo lo sviluppo di pattern radicali simili a quelli dei wild type (Bidzinski *et al.*, 2014). Ulteriori analisi sull'attività elettrica della proteina (mediante *Two-Electrode-Voltage-Clamp*, TEVC) hanno confermato il coinvolgimento di questa proteina nel modulare i flussi di Ca^{2+} , dal momento che la stessa attività elettrica non è riscontrabile con la perfusione di altri ioni, come ad esempio il Mg^{2+} (Zhang *et al.*, 2022).

1.4.3 MLO e sviluppo del tubetto pollinico nel fiore

Il processo fondamentale che precede la fecondazione della cellula uovo da parte di una delle due cellule spermatiche maschili è lo sviluppo del tubetto pollinico. Una volta che il granulo pollinico si poggia sullo stigma femminile sviluppa infatti questa struttura che allungandosi attraversa il pistillo e trasporta i gameti fino all'ovario femminile. L'allungamento del tubetto è guidato dalla secrezione di peptidi ricchi di cisteine (famiglia delle defensine) da parte delle cellule sinergidi, le quali sono percepite da recettori chinasi (*receptor-like kinases*) del tubetto con conseguente incremento della concentrazione citosolica di Ca^{2+} . Uno studio recente ha mostrato che in *A. thaliana* MLO5 e MLO9 (clade III) regolano la direzione del tubetto facendo da tramite tra la percezione dei segnali rilasciati dall'ovario e l'entrata di Ca^{2+} , processo in cui è reclutato anche il trasportatore di Ca^{2+} CNGC18 (*Cyclic Nucleotide-Gated Channel 18*). Mutanti *mlo5* e *mlo9* presentano una crescita e orientazione del tubetto anomali, frutto della mancata interpretazione dei segnali rilasciati dall'ovulo. Questo risultato lascia intendere che le proteine MLO siano coinvolte nelle risposte cellulari in termini di variazioni della concentrazione di Ca^{2+} a stimoli extracellulari (Meng *et al.*, 2020).

Come introdotto in precedenza, in supporto di questa tesi un recente studio ha mostrato come le proteine MLO siano esse stesse canali permeabili al Ca^{2+} . Più precisamente è stato osservato che MLO fa parte della via di segnalazione attivata dalla secrezione di peptidi RALF e che regola il mantenimento dell'integrità del tubetto pollinico. I RALF (Rapid Alkalinization Factor Peptides) sono una classe di piccoli peptidi con varie funzioni legate allo sviluppo e alla fisiologia delle piante, nonché per la segnalazione di stimoli ambientali. Nello specifico, gli autori osservano che nel tubetto pollinico la percezione del peptide RALF4 da parte del recettore FERONIA porta all'attivazione di MLO7 che causa la generazione di

oscillazioni della concentrazione intracellulare di Ca²⁺ nell'apice del tubetto pollinico. Inoltre, gli autori mostrano che il legame della calmodulina a MLO7 regola la periodicità delle oscillazioni regolando negativamente il canale stesso (Gao *et al.*, 2022). Un ulteriore lavoro dello stesso gruppo di ricerca ha caratterizzato anche il ruolo di MLO come canale Ca²⁺ cruciale nella ricezione di peptidi RALF anche da parte delle cellule sinergidi (Gao *et al.*, 2023).

1.4.4 MLO nella simbiosi micorrizica arbuscolare

Un recente studio ha mostrato che i geni *MLO* sono coinvolti anche nella simbiosi micorrizica arbuscolare. Piante di orzo (*Hordeum vulgare* L.) mutanti per *MLO* e posti in coltivazione insieme al fungo micorrizico arbuscolare *Rhizophagus irregularis* mostrano, a 22 giorni dall'inoculo del microorganismo e quindi nelle fasi iniziali della micorrizzazione, una riduzione significativa del numero di arbuscoli e di vescicole rispetto agli individui wild type. Questa differenza è osservabile fino a 29 giorni dopo l'inoculo, dopodiché gli individui mutanti si conformano ai livelli del wild type a 36 giorni. Questo suggerisce che i geni *MLO* siano necessari per attuare completamente i processi di micorrizzazione nelle sue fasi iniziali e senza di essi avviene un rallentamento dello sviluppo iniziale della simbiosi, nonostante il funzionamento di essa non venga compromesso. Gli stessi risultati sono stati osservati anche in *Medicago truncatula* e grano tenero (*Triticum aestivum* L.) (Jacott *et al.*, 2020).

Riguardo agli stadi finali, un altro studio ha mostrato risultati apparentemente opposti. Effettuando una co-coltivazione di orzo e fungo micorrizico *Funneliformis mossae* per due mesi, è stato riscontrato un aumento della quantità di arbuscoli e vescicole rispetto al wild type, nonostante non ci siano differenze nella struttura degli arbuscoli. Ciò significa che i geni *MLO* non sono essenziali per stabilire micorrize arbuscolari funzionali e per la percezione delle molecole di segnalazione per il riconoscimento del fungo simbionte, ma sono evidentemente coinvolti in alcuni dei processi funzionali che regolano la simbiosi (Hilbert *et al.*, 2020).

Sulla base dei risultati ambivalenti forniti dalla ricerca, attualmente non sono chiari i processi regolati da *MLO* che rendono le fasi iniziali più lente e una maggior colonizzazione nelle fasi finali.

1.5 Organismo modello *Lotus japonicus*

Lotus japonicus (Regel) K. Larsen appartiene alla famiglia delle Leguminosae (Fabaceae), ed è stata scoperta per la prima volta a Kyoto (Giappone). Si tratta di una piccola pianta perenne di dimensioni generalmente comprese tra i 20 e i 60 cm e con fusto prostrato, che

presenta una fillotassi alterna-spiralata con foglie trifogliate di circa 1-1.5 cm (lamina obovata a margine intero). Presenta fiori di colore giallo di 8-12 mm, con simmetria bilaterale e di norma 1-2 per pedicello. Sono ermafroditi e la pianta è capace di autofecondazione, con produzione di piccoli legumi di 3-5 cm contenenti una ventina di semi (ogni seme ha una massa di circa 1 mg). Il ciclo vitale dura circa tre mesi in serra e la formazione dei semi avviene senza la manipolazione dei fiori, i quali possono svilupparsi continuamente se le condizioni ambientali sono adeguate. Ha un optimum di temperatura compreso tra i 18 e i 22 °C, richiede 16 ore di luce e 8 di buio ed è sensibile all'eccesso d'acqua, motivo per cui è bene irrigare gli esemplari immettendo l'acqua alla base del vaso (Pajuelo *et al.*, 2005).



Figura 1.11: Alcuni esemplari di *Lotus japonicus* nella serra del Dipartimento di Biologia.

Il suo areale è principalmente il Giappone, anche se è possibile trovarla in alcune regioni della Corea e della Cina meridionale, ed è localizzata solitamente in prati erbosi, terreni aperti e rurali, in zone spesso disturbate dall'uomo. Come molte altre Leguminosae è in grado di stabilire interazioni biotiche con microrganismi del suolo quali batteri azotofissatori e funghi micorrizici, e quindi risulta in grado di sviluppare noduli radicali e micorrize. È un organismo diploide ($2n=12$), con un genoma compatto (circa 472,1 Mb), e può essere facilmente trasformato per mezzo di *Agrobacterium rhizogenes* o *Agrobacterium tumefaciens*, introducendo costrutti di interesse nel genoma della pianta che possono persistere nelle generazioni successive (Udvardi *et al.*, 2005).

Per *Lotus japonicus* è disponibile, inoltre, un portale online chiamato Lotus Base (lotus.au.dk/), nel quale sono presenti grandi quantità di informazioni genomiche, trascrittomiche e profili di espressione. È un portale integrato che riunisce le informazioni più aggiornate riguardo a questo organismo modello, agevolando la ricerca di sequenze di geni e trascritti (Mun *et al.*, 2016).

Crescita	Pianta perenne
	Ciclo vitale breve (3-4 mesi)
	Pianta di taglia piccola, ramificata, con habitus cespitoso
	Fioritura indeterminata
	Formazione di legumi con semi piccoli (≈ 1 mg per seme)
Propagazione	Autofecondazione
	Fiori abbondanti
	Abbondante produzione di semi (fino a 2000 semi per pianta)
	Facile impollinazione
	Propagazione vegetativa da sezioni nodali
Caratteristiche genomiche	Genoma compatto (≈ 450 Mbp)
	Diploide ($2n = 12$)
	Linee di mutanti inserzionali disponibili
Transgenesi	Suscettibile alla trasformazione con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e <i>Agrobacterium rhizogenes</i>
	Inseriti stabili nelle generazioni successive
Simbiosi e interazioni	Simbiosi micorriziche e rizobiche
Analisi bioinformatica	Portale Lotus Base

Tabella 1: Le caratteristiche di *Lotus japonicus*.

Di *Lotus japonicus* sono disponibili numerose linee di mutanti inserzionali. L'inserzione LORE1 (LOTus Retrotransposable Element 1) è un retrotrasposone LTR (Long Terminal Repeat), lungo varie migliaia di nucleotidi, solitamente presente a basso numero di copie e in grado di interrompere la normale sequenza del gene in cui è inserito. La sequenza alterata determina solitamente un'assenza del trascritto o la presenza di un trascritto anomalo che con molta probabilità non si traduce in una proteina funzionale, quindi, in altre parole, l'inserzione LORE1 è in grado di disattivare la funzione della sequenza (Małolepszy *et al.*, 2016).

1.6 Scopo della tesi

L'obiettivo di questo lavoro di tesi si incentra sullo studio del ruolo del gene *MLO4* nei processi coinvolti nella simbiosi micorrizica arbuscolare tra *Lotus japonicus* e *Rhizophagus irregularis*. Più precisamente, la mia tesi cerca di indagare tre aspetti biologici riguardo a questo gene. Il primo riguarda la funzione specifica di *MLO4* nello sviluppo degli arbuscoli della simbiosi micorrizica arbuscolare. Per indagare questo aspetto è stata eseguita un'analisi fenotipica di mutanti *mlo4* LORE, così da individuare gli effetti dell'inattivazione del gene in punti differenti in termini sia quantitativi (peso fresco, colonizzazione, accumulo di nutrienti minerali) che qualitativi (struttura dell'arbuscolo per linee mutanti) e comprendere le caratteristiche precise dipendenti da *MLO4*. Il secondo riguarda la localizzazione dell'espressione di *MLO4* nell'apparato radicale, in modo da identificare spazialmente l'attivazione del gene in relazione all'interazione e anche in assenza di essa. Il terzo aspetto riguarda l'attività della proteina *MLO4* come canale del calcio per la segnalazione cellulare. Più in dettaglio si vuole comprendere se *MLO4* possiede la capacità di trasportare il calcio oppure se si occupa di mediare indirettamente questo trasporto. In quest'ottica, abbiamo cercato di capire se le vie di segnalazione siano direttamente riconducibili a processi di interazione con funghi micorrizici, a stress abiotici oppure a processi di sviluppo della radice.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Linee vegetali utilizzate

In questo lavoro sono stati utilizzati semi della leguminosa modello *Lotus japonicus*, ecotipo *Gifu*, utilizzato come genotipo wild-type (WT). Per il gene *MLO4* (*LotjaGi1g1v0568000*) sono state utilizzate tre linee indipendenti di mutanti inserzionali LORE1 (Malolepszy *et al.*, 2016): *mlo4-1* (30015501), *mlo4-2* (30010345), *mlo4-3* (30107425).

2.2 Sterilizzazione dei semi e germinazione

La sterilizzazione dei semi permette di ottenere semi privi di qualsiasi contaminazione da parte di altri microrganismi.

Una volta stabilita la quantità adeguata, i semi sono stati controllati in modo tale che non presentassero colorazioni verdognole o possibili macchie biancastre. In tal caso, infatti, potrebbero essere portatori di contaminazioni fungine difficilmente eliminabili, di conseguenza semi con queste caratteristiche sono stati scartati.

Successivamente i semi hanno subito una scarificazione del tegumento mediante l'uso di una carta abrasiva e di un mortaio, evitando tuttavia la rottura di esso. In condizioni di sterilità, i semi sono stati incubati per 11 minuti in 2 mL di ipoclorito di sodio (NaClO) 0.5% (v/v). Al termine di questo passaggio sono stati effettuati due lavaggi consecutivi usando acqua deionizzata sterile e sono stati lasciati idratare. In questa fase i semi si gonfiano e aumentano di dimensioni. Infine, essi sono stati posizionati in file in piastre Petri quadrate (12 x 12 cm) contenenti terreno di crescita Gamborg ½ B5 pH 5.5 oppure Long Ashton addizionato con 1% (m/v) di Plant Agar. Queste ultime sono state sigillate utilizzando Parafilm e poi avvolte in un foglio di alluminio, così che i semi fossero in condizione di buio, e posizionate verticalmente in modo da suscitare la risposta gravitropica delle radici, con crescita di radici parallele tra gli individui. I semi sono stati incubati in una cella di crescita (23°C, 60% umidità, 16h luce/8h buio). Il foglio di alluminio è stato rimosso tre giorni dopo il completamento della sterilizzazione, con la comparsa dei cotiledoni e della radichetta delle plantule.

2.3 Terreni di coltura vegetale

I terreni di coltura utilizzati per le piante sono stati: Gamborg B5 medium e Long Ashton modificata.

Il terreno B5 è stato utilizzato per la crescita delle plantule in piastre Petri quadrate con un dosaggio dimezzato (½ B5). Per la preparazione di 1L di questo terreno di crescita sono stati sciolti 1.55 g di polvere B5 in acqua deionizzata, pH di 5.5 con l'aggiunta di Plant Agar 1%.

Per la trasformazione delle piante tramite *Agrobacterium rhizogenes* al terreno, in seguito, è stato aggiunto l'antibiotico Cefotaxime 300 µg/mL. Il terreno Long Ashton ((Ca(NO₃)₂ x 4H₂O 1.5 mM, KNO₃ 1 mM, MgSO₄ x 7H₂O 0.75 mM, Fe-EDTA 0.1 mM, MnCl₂ x 4H₂O 10 µM, H₃BO₃ 50 µM, ZnCl₂ 1.75 µM, CuCl₂ 0.5 µM, Na₂MoO₄ 0.8 µM, KI 1 µM, CoCl₂ x 6H₂O 0.1 µM) è stato utilizzato in forma liquida per l'irrigazione delle piante in vaso e in forma solida (con l'aggiunta di MES hydrate 0.8 g/L, 1% plant agar, pH 5.7) in piastre Petri quadrate. La concentrazione di fosfato (KH₂PO₄) è stata regolata in base alle necessità: 20 micromolare KH₂PO₄ (bassa concentrazione per favorire l'instaurarsi della simbiosi AM), 200 micromolare (media concentrazione, per la crescita in piastra). Le piante poste in vaso sono state posizionate in sabbia del fiume Piave di granulometria tra 0.075 mm e 2 mm, lavata due volte con acqua deionizzata e autoclavata due volte, scartando all'occorrenza la componente più argillosa.

2.4 Terreni di coltura batterica

Il terreno di coltura utilizzato per la crescita di colonie batteriche (*Escherichia coli* e *Agrobacterium rhizogenes*) è il terreno Luria-Bertani (LB). La preparazione di 1L questo mezzo prevede l'aggiunta di 10 g di NaCl, 10 g di Triptone e 5 g di estratto di lievito, soluzione che deve essere portata ad un pH di 7 immettendo idrossido di sodio (NaOH) e servendosi di pHmetro. A seconda delle esigenze, si aggiunge Bacto-Agar in polvere per avere una concentrazione di 1% (5g per bottiglia da 500mL). Al terreno sono stati aggiunti antibiotici per la selezione delle colonie positive, in base al plasmide di interesse: Kanamicina 50 µg/mL (in colture di *Escherichia coli*) oppure Rifampicina 50 µg/mL, Ampicillina 100 µg/mL e Kanamicina 50 µg/mL (per le colture di *Agrobacterium rhizogenes*).

2.5 Estrazione di DNA genomico da *Lotus japonicus* e genotipizzazione tramite PCR

L'estrazione del DNA genomico a partire da un cotiledone degli esemplari seminati è stato un passo necessario per la successiva genotipizzazione dei mutanti *mlo4-3*, al fine di individuare i mutanti omozigoti all'interno di una popolazione segregante.

Il cotiledone è stato prelevato dalle plantule dopo 7-10 giorni dalla semina e posto in una provetta da 1.5 mL, effettuando l'operazione in sterilità. Alla foglia poi sono stati aggiunti 300 µL di DNA extraction buffer (0.2 M TrisHCl pH 9.0, 0.4 M LiCl, 25 mM EDTA, 1% SDS) e il tessuto è stato omogeneizzato servendosi di un pestello automatico finché la colorazione del buffer non fosse divenuta verdastra. Il campione poi è stato centrifugato (13200 rpm, 5') per fare depositare sul fondo i detriti vegetali. 200 µL della

soluzione surnatante sono stati trasferiti in un nuovo tubino con 200 μ L di isopropanolo freddo, tenendo il campione in ghiaccio. Dopo aver eseguito una centrifuga alla massima velocità a 4 °C per 10 minuti, il surnatante è

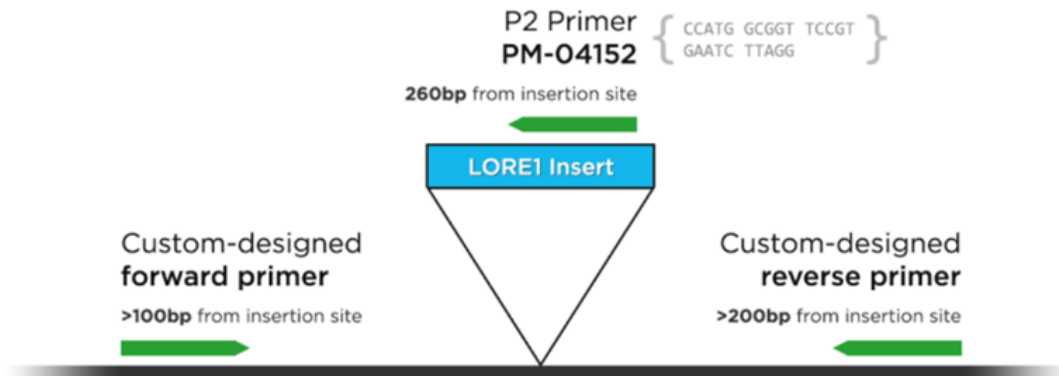


Figura 2. SEQ Figura 1* ARABIC 1: Siti di appaiamento dei primer. Il primer G01 (P2) si appaia sull'inserzione LORE1, consentendo di amplificare agevolmente l'allele mutante.

stato eliminato e il pellet è stato lavato con etanolo 70%. È stata effettuata un'altra centrifuga al massimo della velocità a 4 °C per 5 minuti e surnatante e suoi residui sono stati eliminati servendosi anche di uno step al termoblock a 50 °C. Infine il DNA estratto è stato risospeso in 100 μ L di H₂O milliQ e conservato a -20 °C. La successiva genotipizzazione è avvenuta tramite amplificazione PCR usando l'enzima PCR Bio Classic Taq. La mix di reazione per questo enzima prevede 0.1 μ L di enzima (5u/ μ L), 2 μ L di 10x PCR BIO Classic Buffer +30 mM MgCl₂, 1 μ L di DNA template, 0.8 μ L di dNTPs (10 mM), 0.8 μ L di forward primer e 0.8 μ L di reverse primer, per un totale di 20 μ L di reazione. Il protocollo utilizzato per il termociclatore prevede 30 cicli in cui in ognuno di essi si hanno 3 min e 15 sec a 95 °C per la fase di denaturazione, 30 sec a 58-62 °C (a seconda dei primer utilizzati) per la fase di annealing, 20 sec a 72 °C per la fase di estensione.

L'amplificazione PCR ha reso possibile distinguere gli individui mutanti omozigoti per il sito *mlo4-3*, quelli eterozigoti e quelli WT. Il primer G01 (P2), utilizzato come reverse primer, ha come sito di appaiamento una regione situata nell'inserzione LORE e in questo modo l'amplificazione per i mutanti provoca la sintesi di un amplicone di lunghezza diversa da quella wild type. Questo aspetto permette di distinguere agevolmente individui mutanti, che presentano quindi l'inserzione LORE, dagli individui wild type, che non la presentano. La visualizzazione di questa differenza è avvenuta con l'elettroforesi su gel. Per essa è stato usato gel di agarosio (0,7 g di Agarosio LE in 70 mL di TAE 1x, al quale sono stati aggiunti 3,5 μ L di intercalante Orange Red 20000x). Alla mix di PCR sono stati aggiunti 3 μ L di 6x DNA Loading Dye ThermoFisher. Il ladder utilizzato è stato il Quick-Load Purple 1 kb (New Biolabs). Il gel è stato sottoposto a un voltaggio di 110 V per circa 25-30 minuti, al termine dei quali le bande di DNA sono state visualizzate

usando luce UV al BioRad Gel Doc XR usando Quantity One 1-D Analysis Software (Biorad).

Per ogni individuo sono state usate due coppie di primer: la prima per l'amplificazione della sequenza wild type (primers G67 e G81), la seconda per l'amplificazione della sequenza mutante (primers G67 e G01). Ciò si traduce nella visualizzazione di due bande nel caso di individui eterozigoti (amplificazione in entrambe le mix), una banda nell'amplificazione wild type nel caso di un omozigote wild type e una banda nell'amplificazione mutante per gli omozigoti mutanti.

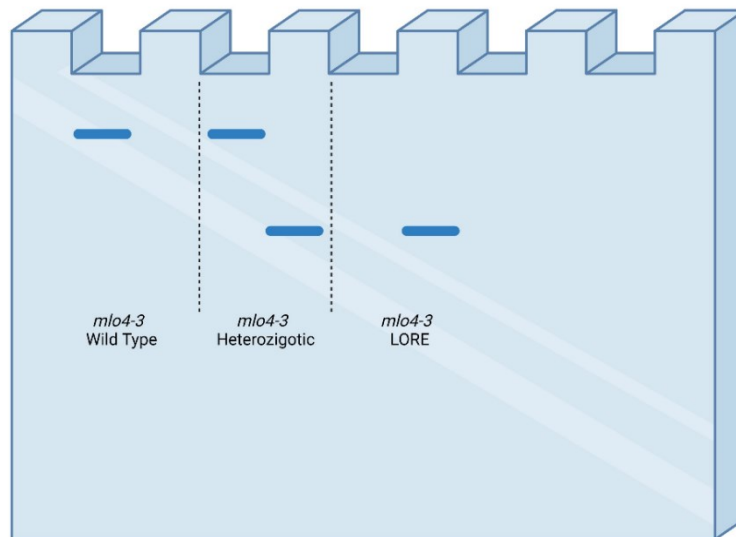


Figura 2.2: Schema delle possibili bande osservabili per i vari genotipi dopo elettroforesi su gel di agarosio.

2.6 Trasformazione di *Agrobacterium rhizogenes*

Cellule di *Agrobacterium rhizogenes* AR1193 e sono state trasformate utilizzando il protocollo Freeze&Thaw.

Si parte da un'aliquota da 100 μ L di batteri. Le aliquote sono conservate a -80 $^{\circ}$ C, perciò sono lasciate a sciogliere in ghiaccio. Si aggiunge 1 μ g del plasmide di interesse mescolando delicatamente con la punta della micropipetta e poi si trasferisce il tubino in azoto liquido per 5 minuti. Al termine si estrae il tubino e lo si lascia a temperatura ambiente per 10 minuti, al termine dei quali si aggiunge 1 mL di LB liquido senza antibiotici e si lascia in incubazione a 28 $^{\circ}$ C in agitazione (150-200 rpm) per 2 ore. Dopodiché i batteri vengono pellettati (4000 rpm per 5 minuti) e risospesi in 200 μ L della stessa soluzione. Si procede quindi a piastrare i batteri in LB solido con il mix di antibiotici Rifampicina-Ampicillina-Kanamicina, sigillando la piastra con Parafilm. I batteri sono stati posti infine a 28 $^{\circ}$ C al buio per 2-3 giorni.

Per verificare se esse hanno integrato il plasmide si effettua una colony PCR.

2.7 Metodo di clonaggio Green Gate

Il clonaggio Green Gate sfrutta lo stesso principio del sistema di clonaggio Golden Gate ma adattato per l'assemblaggio di costrutti volti alla transgenesi vegetale (Lampropoulos et al. 2013).

Questo sistema utilizza sei entry vector di tipo pUC19, contenenti i moduli che costituiranno la cassetta di espressione finale, e un destination vector, in cui sarà situato il costrutto al termine dell'operazione. I moduli previsti sono: promotore, N-tag terminale, gene di interesse, C-tag terminale, terminatore e resistenza. Il GreenGate prevede l'impiego di endonucleasi di restrizione di tipo IIs (per esempio BsaI), le quali identificano una sequenza di riconoscimento non palindroma e operano un taglio nella sequenza a una distanza nota. Tutti i moduli presenti negli entry vectors sono fiancheggiati da sequenze di riconoscimento per l'enzima, che effettua tagli nella sequenza formando estremità complementari ("sticky ends") tra moduli che saranno adiacenti nel destination vector, ma non complementari ad altri moduli non adiacenti, ragion per cui l'ordine di essi deve essere predefinito e non può essere modificato. In aggiunta, il destination vector al termine del processo sarà privo di siti di taglio e quindi non più processato dall'enzima. Per facilitare la ligazione di moduli con estremità appaiate si utilizza una ligasi, la quale opera a una temperatura diversa da quella dell'endonucleasi, aspetto sfruttato per alternare l'attività dei due enzimi e favorire l'assemblaggio dei moduli con estremità complementari già appaiate.

La mix per l'assemblaggio del destination vector prevede 0.8 µL di vettore backbone, 1 µL di ognuno dei sei entry vector, 1.5 µL di T4 DNA Ligase buffer 10x (NEB), 0.8 µL di T4 DNA Ligase, 0.5 µL di BsaI-HF v2 (NEB), e 5.4 µL di ddH₂O milliQ per un volume di reazione totale di 15 µL. Il profilo utilizzato al termociclatore è di 2 minuti a 37 °C, 2 minuti a 16 °C, per 50 cicli.

2.8 Trasformazione di *Escherichia coli* e clonaggio

La trasformazione di cellule *Escherichia coli* DH5 α è stata effettuata tramite il protocollo Heat-Shock. Il seguente protocollo si avvale di uno sbalzo termico per far integrare nelle cellule batteriche il plasmide di interesse.

Si utilizza un'aliquota da 50 µL di batteri resi chemocompetenti (tramite RbCl₂), conservata in freezer a -80 °C, quindi essi sono lasciati sciogliere in ghiaccio per un massimo di 15 minuti. Si immettono poi 1-10 ng di plasmide purificato (oppure metà volume di reazione nel caso in cui il plasmide sia il risultato di una ligazione), dopodiché i batteri sono stati incubati in ghiaccio per 20 minuti. In seguito, sono spostati in un bagnetto termostato a 42 °C per 45 secondi e subito dopo sono stati ritrasferiti nuovamente in ghiaccio

per 2 minuti. Dopo aver aggiunto 400 μ L di LB liquido privo di antibiotici, sono stati incubati per 1 ora a 37 °C con una agitazione di 250 rpm. Infine, i batteri sono stati piastrati in terreno LB solido (1% Agar) con antibiotico e incubati a 37°C overnight. L'integrazione del plasmide nelle colonie è stata effettuata con colony PCR, dopo aver risospeso i batteri in 10 μ L ddH₂O milliQ. Quest'ultima è stata eseguita con la mix PCR Bio Classic e sottoposta a 30 cicli nel termociclatore seguendo il profilo già spiegato nel paragrafo 2.5; gli amplificati sono stati fatti correre in gel di agarosio 1%. Le colonie che dimostrano di aver integrato il plasmide sono inoculate in 5 mL di LB liquido con antibiotico e messe in incubazione overnight a 37 °C a 250 rpm. Il giorno seguente è effettuata l'estrazione dei plasmidi tramite il kit commerciale EasyPure Plasmid MiniPrep Kit (Transgen Biotech) ed eluiti in 50 μ L di ddH₂O milliQ. La concentrazione e la qualità dei campioni sono state misurate tramite spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher) e conservati a -20 °C. I plasmidi di nuova sintesi sono stati spediti per il sequenziamento grazie al servizio Whole Plasmid Sequencing offerto da Plasmidsaurus (www.plasmidsaurus.com).

2.9 Trasformazione hairy roots di *Lotus japonicus*

La trasformazione dell'apparato radicale degli esemplari sperimentali di *L. japonicus* è avvenuta tramite *A. rhizogenes*, batterio in grado di infettare la pianta trasmettendo T-DNA che riesce ad integrarsi con il genoma vegetale. Questo segmento è contenuto nel plasmide *Ri* (root-inducing) e in natura induce la formazione incontrollata di radici con peli radicali. Questa capacità è stata sfruttata per trasferire sequenze esogene di DNA nel genoma della pianta.

Per questa operazione è necessario disporre di piastre rotonde Petri ricche di batteri del ceppo di interesse, cresciute a 28°C per tre giorni, e di plantule di *L. japonicus* di 7 giorni. In sterilità, operando sotto cappa batterica, si recidono gli esemplari all'altezza dell'ipocotile (regione tra fusto e radici) tramite lama sterile, e si intinge l'estremità appena tagliata del fusto nella piastra batterica. La pianta poi viene adagiata in un'altra piastra Petri quadrata contenente ½ B5 e coperta con un foglio di alluminio e incubata in una cella di crescita (23°C, 60% umidità, 16h luce/8h buio). Dopo 3 giorni di buio il foglio di alluminio viene rimosso e le piante sono lasciate crescere per altri tre giorni insieme al batterio. Al termine del tempo esse sono trasferite in nuove piastre contenenti ½ B5 solido (1% Plant agar m/v) e Cefotaxime 300 μ g/ml. Dopo tre settimane, si verifica che l'infezione sia andata a buon termine e il costrutto di interesse si sia inserito nel genoma della pianta controllando l'espressione del marker fluorescente con uno stereomicroscopio a fluorescenza MZ16f (Leica).

2.10 Test di micorrizzazione in vaso

Gli esemplari di *L. japonicus* utilizzati per il test di micorrizzazione sono stati sterilizzati e lasciati crescere in piastra con terreno di coltura solido (1% Agar) ½ B5 o L.A. 200 µM Pi per 2 settimane.

In ogni vaso (circa 9 cm di diametro) sul fondo è stato posto un filtro per evitare che le radici crescano all'esterno del vaso e riempito per metà da sabbia. A questa altezza, infatti, sono inoculate le spore del fungo *Rhizophagus irregularis*. Esse sono conservate a 4 °C in una soluzione che ne inibisce la germinazione; perciò, una volta prelevata l'aliquota necessaria per il test le spore sono pellettate tramite centrifuga per 15 minuti a 1000 rpm. Il liquido surnatante viene dunque rimosso e le spore sono risospese in un mix di acqua di rubinetto e acqua deionizzata (1:1). Per ogni vaso dovranno essere aggiunte 3000 spore. Il vaso è stato riempito fino all'orlo con altra sabbia (evitando un'eccessiva compattazione e scartando la componente più argillosa) e dopodiché sono stati effettuati quattro fori, all'interno dei quali sono state collocate quattro piante. Ogni vaso è stato irrigato con 20 ml di soluzione liquida Long Ashton a basso contenuto di Pi (20 µM) e coperto con pellicola trasparente per garantire condizioni ottimali di umidità. I vasi sono stati posizionati in una cella di crescita con luce che mima lo spettro solare (ciclo luce/buio 16h/8h) e condizioni controllate di temperatura e umidità (23°C, 50%). La pellicola è stata progressivamente rimossa nei giorni successivi

A partire dalla seconda settimana ogni vaso è stato regolarmente irrigato due volte a settimana con 20 mL Long Ashton 20 µM Pi.

Al termine della co-coltivazione le piante sono state delicatamente svasate e la sabbia lavata via. Di ogni pianta è stata misurata la massa fresca dell'apparato radicale, del fusto e delle prime due triplette fogliari. Più nel dettaglio alcune radici sono state destinate alla colorazione con i metodi Trouvelot e WGA, mentre altre sono state congelate usando azoto liquido per la successiva estrazione di RNA, mentre le triplette fogliari, anch'esse congelate, sono state destinate all'estrazione e quantificazione di fosfato.

2.11 Estrazione dell'RNA totale e caratterizzazione dei trascritti mutanti

Parte degli apparati radicali raccolti al termine della co-coltivazione con il fungo AM, è stata destinata all'estrazione di RNA, così da eseguire una reazione di trascrittasi inversa. Lo scopo di queste procedure è di esaminare e caratterizzare i trascritti di individui wild type, *mlo4-1* LORE, *mlo4-2* LORE e *mlo4-3* LORE.

Durante la raccolta le radici sono state congelate in azoto liquido in provette da 1,5 mL contenenti due sfere metalliche di diametro circa 2 mm. Queste hanno consentito di polverizzare le radici utilizzando l'omogeneizzatore

TissueLyser II (invertendo la disposizione dei tubini tra le due agitazioni), mantenendo congelato il materiale. L'estrazione dell'RNA totale è stata eseguita grazie al kit commerciale Nucleospin RNA Plant and Fungi (Macherey-Nagel), e quantità e qualità dei campioni sono state verificate utilizzando lo spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher). La qualità dell'RNA estratto è stata verificata anche con elettroforesi su gel d'agarosio 1% (m/v). In base alla concentrazione, tutti i campioni sono stati poi diluiti con ddH₂O RNAasi-free, così che per ogni campione fossero presenti 2 µg di RNA in un volume di 20 µL.

Su di essi è stato effettuato un trattamento con DNAasi per rimuovere eventuali tracce di DNA genomico non desiderato. La totale assenza di contaminazioni da DNA genomico è stata verificata con un'amplificazione PCR utilizzando i primer UBI_F e UBI_R, in cui non era attesa alcuna amplificazione. terminate le dovute verifiche, 800 ng di RNA sono stati retrotrascritti seguendo le indicazioni del kit commerciale RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific).

2.12 Colorazione delle radici con inchiostro e metodo Trouvelot

Dopo la co-coltivazione delle piante insieme al fungo simbionte (*R. irregularis*), le radici sono state raccolte così da effettuare la quantificazione della micorrizzazione al microscopio ottico. Lo scopo di questa procedura è quantificare il grado di micorrizzazione dell'apparato radicale della pianta.

Le piante sono state delicatamente svasate e lavate per eliminare possibili residui della sabbia in cui erano poste. Una volta prelevato l'intero sistema radicale si procede con la colorazione delle strutture fungine presenti. In una provetta da 2 mL si immettono le radici e 1.5 mL di idrossido di potassio (KOH) 10% (m/v) e si lascia in incubazione a 96 °C per 6 minuti utilizzando il termoblocco. Si rimuove il KOH e senza danneggiare le radici e si effettuano due lavaggi consecutivi usando una Washing Solution, formata da acido lattico al 5% (v/v). A questo punto si aggiungono 1.5 mL di Staining Solution (5% inchiostro (v/v), 5% acido lattico (v/v)) e si lascia in incubazione a 96 °C per 10 minuti, al termine dei quali si elimina la soluzione. Si effettuano due lavaggi con Washing Solution e un lavaggio finale usando acqua deionizzata.

Le radici, quindi, vengono poste in acqua su una piastra Petri di vetro sufficientemente ampia da permettere la distensione dell'intero apparato radicale. Avvalendosi di lame e pinzette si effettuano delle sezioni di radici lunghe circa 1 cm, poi posizionate su un vetrino da microscopia. Per ogni vetrino si posizionano un totale di 20 sezioni (5 sezioni per 4 colonne). Si aggiunge infine una goccia di glicerolo 50% e si posiziona un vetrino portaoggetti al di sopra.

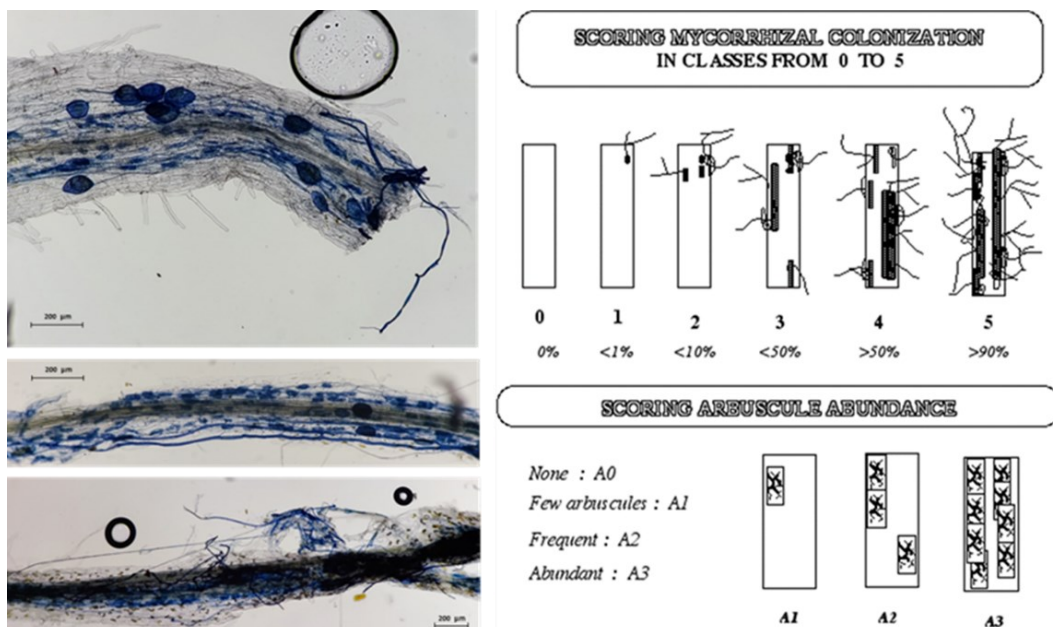


Figura 2.3: Alcune sezioni di radici micorrizate osservate al microscopio (a sinistra) e la tabella di riferimento per quantificare la colonizzazione della radice (a destra)

I campioni preparati in questo modo vengono osservati al microscopio ottico, in cui i tessuti della radice appaiono trasparenti e le strutture fungine presentano una colorazione blu molto nitida, e valutati seguendo le indicazioni del metodo Trouvelot (Trouvelot et al. 1986).

Questo ultimo prevede una valutazione della percentuale di colonizzazione della radice da parte del fungo e della percentuale di arbuscoli presenti nella radice, i quali indicano che la simbiosi è funzionalmente attiva e funzionale. Queste caratteristiche vengono codificate in una sigla in riferimento alla Figura 1. Le sigle ricavate infine sono trascritte in un foglio di calcolo Excel in cui sono calcolate le seguenti percentuali.

Tabella 2.8.1

Sigla	Descrizione	Formula
F%	Frequenza di micorrize nel sistema radicale	$\left(\frac{\text{Numero di frammenti micorrizzati}}{\text{Numero totale di frammenti}} \right) 100$
M%	Intensità della colonizzazione nel sistema radicale	$\left(\frac{95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1}{\text{Numero totale di frammenti}} \right)$ Dove: n ₅ = n° frammenti di categoria 5 n ₄ = n° frammenti di categoria 4 n ₃ = n° frammenti di categoria 3

		n2= n° frammenti di categoria 2 n1= n° frammenti di categoria 1
m%	Intensità della colonizzazione nei frammenti di radice	$\left(\frac{M(\text{numero totale frammenti})}{\text{numero totale di frammenti micorrizzati}} \right)$
a%	Abbondanza di arbuscoli nelle porzioni micorrizzate dei frammenti di radice	$\left(\frac{100m_{A3} + 50m_{A2} + 10m_{A1}}{100} \right)$ <p style="text-align: center;">Dove:</p> $m_{A3} = \left(\frac{(95n^\circ(5A3) + 70n^\circ(4A3) + 30n^\circ(3A3) + 5n^\circ(2A3) + n^\circ(1A3)) \times 100}{m} \right)$ $m_{A2} = \left(\frac{(95n^\circ(5A2) + 70n^\circ(4A2) + 30n^\circ(3A2) + 5n^\circ(2A2) + n^\circ(1A2)) \times 100}{m} \right)$ $m_{A1} = \left(\frac{(95n^\circ(5A1) + 70n^\circ(4A1) + 30n^\circ(3A1) + 5n^\circ(2A1) + n^\circ(1A1)) \times 100}{m} \right)$
A%	Abbondanza di arbuscoli nel sistema radicale	$\left(a \left(\frac{M}{100} \right) \right)$

2.13 Colorazione delle radici con Wheat Germ Agglutinin (WGA) e analisi al microscopio confocale

La colorazione tramite WGA (agglutinina del germe di grano) permette di visualizzare specificamente strutture fungine. Il WGA, infatti, è in grado di legarsi selettivamente alla componente chitinosa delle pareti cellulari fungine, e più precisamente ai residui di N-acetilglucosammina e acido N-acetilneuraminico. Ad esso successivamente possono essere coniugati alcuni fluorofori in grado di emettere fluorescenza se adeguatamente eccitati, principio sfruttato in microscopia a fluorescenza e confocale (Carotenuto et al. 2020).

Una volta ottenute e pulite le radici, esse devono essere chiarificate e permeabilizzate tramite l'utilizzo di KOH 10% (w/v), e mantenute in tale soluzione per sette giorni a temperatura ambiente. Al termine di essi, le radici subiscono due risciacqui in acqua deionizzata e sono messe in incubazione per due ore in una soluzione di acido cloridrico (HCl) 0,1 M e in seguito risciacquate due volte con tampone fosfato salino (PBS).

A questo punto si aggiunge il colorante WGA (concentrazione finale 1 µg/ml) coniugato con il fluoroforo OregonGreen di Thermo Fisher Scientific (stock 1 mg/mL in PBS 1x) e si lascia in incubazione overnight a 4 °C al

buio. I campioni sono stati osservati al microscopio confocale (Zeiss LSM700) eccitando i campioni con laser Argon 488. La luce emessa è stata raccolta tra 495 a 530 nm di lunghezza d'onda. Per ogni campione sono state salvate immagini multiple e di più piani di sezione, in seguito assemblate in uno Z-stack.

2.14 Estrazione e quantificazione del fosfato solubile da tessuti vegetali

Dopo aver raccolto le piante co-coltivate con *R. irregularis*, per ogni individuo è stata prelevata la prima tripletta fogliare e immessa in una provetta da 1,5 mL insieme alle altre triplette fogliari delle altre tre piante nello stesso vaso. Il contenuto è stato pesato in una bilancia analitica ultraprecisa (0.1 mg), sono state aggiunte due sfere metalliche del diametro di circa 2 mm e successivamente il tubino è stato congelato in azoto liquido e conservato a -80 °C.

L'aggiunta delle sfere metalliche è stata necessaria per procedere alla disgregazione delle triplette fogliari grazie all'omogeneizzatore TissueLyser II (Qiagen). I campioni ancora congelati sono stati posizionati in esso e disintegrati in due step da 20 secondi a 30 Hz, invertendo la disposizione da uno step all'altro così da ottenere una polvere omogenea. Dopodiché è stato aggiunto 1 mL di ddH₂O milliQ sterile e la polvere è stata risospesa con l'aiuto di un vortex. I campioni sono stati posizionati in termoblocco a 100 °C per un'ora e centrifugati a 13200 rpm a 4°C. Terminata la centrifuga sono stati messi a 4°C per dieci minuti e successivamente la concentrazione di fosfato solubile è stata analizzata con il kit commerciale Phosphate Assay Kit (Merck), seguendone il protocollo. In breve, questo kit sfrutta delle concentrazioni crescenti note di fosfato per la costruzione di una retta di taratura necessaria per stimare il contenuto di questo ione nei campioni in esame e sfrutta una soluzione a base di malachite in grado di legare selettivamente il fosfato solubile presente in soluzione. L'assorbanza dei campioni è stata letta a 620 nm con un lettore di piastra Tecan. I campioni i cui valori di assorbanza superavano quelli della retta di taratura sono stati diluiti in rapporto 1:4. Le misure di assorbanza sono restituite come file in formato csv, in cui è possibile calcolare la retta di taratura, permettendo di stimare la concentrazione di fosfato (nmol/mg); le misure sono state standardizzate sulla massa del campione per una migliore confrontabilità.

2.15 Misurazione delle variazioni di calcio intracellulare in risposta a stimoli biotici e abiotici

La misurazione delle variazioni di concentrazione di calcio intracellulare è stata effettuata con la sonda bioluminescente equorina.

La sonda equorina è una proteina fotosensibile in grado di legare reversibilmente gli ioni Ca^{2+} emettendo fotoni di luce. Più nel dettaglio, quando l'equorina lega gli ioni calcio essa reagisce con l'ossigeno presente nell'ambiente circostante, il quale ossida la molecola di celenterazina legata all'equorina (diventando celenteramide). L'ossidazione della celenterazina è il processo che innesca l'emissione di luce.

Questo fenomeno può essere sfruttato di conseguenza per misurare le variazioni di calcio intracellulare dal momento che a variazioni di luce emessa corrispondono variazioni della concentrazione dello ione.

Le piante trasformate, prima di essere utilizzabili per la misurazione, devono essere "ricostituite" immettendo celenterazina nel giorno precedente alla misurazione. Dopo essersi accertati dell'effettiva trasformazione della radice tramite microscopia a fluorescenza, sono state sezionate porzioni di radice (di dimensioni 3-4 mm), poi immerse in 500 μL di H_2O deionizzata sterile. Ad esse sono stati aggiunti 5 μL di celenterazina 500 μM operando al buio e incubando overnight in cella di crescita (23°C, 60% umidità, al buio).

Il giorno seguente le radici sono state trasferite in 500 μL di acqua deionizzata, così da eliminare l'eccesso di celenterazina. Di seguito ogni sezione di radice è stata trasferita nella cameretta del luminometro insieme a 50 μL di dd H_2O , dove si inizializza una prima misurazione in tempo reale dell'emissione di fotoni, in attesa della stabilizzazione del valore basale di Ca^{2+} . Una volta stabilizzata, la lettura è stata riavviata e lo stimolo è stato iniettato tramite siringa a cento secondi dall'inizio. Il volume iniettato è stato di 50 μL e sono stati utilizzati diversi stimoli: H_2O , NaCl (0.1 M), CO_4 (10^{-7} M), flagellina (10^{-7} M). La durata della corsa è di 10 minuti per acqua e NaCl e di 30 minuti per CO_4 e flagellina. Al termine di essa si iniettano 100 μL di soluzione di discharge composta da 30% etanolo e 5 mM di CaCl_2 ; questo step permette di andare a stabilire la quantità totale di equorina presente nel campione al fine di standardizzare i risultati ottenuti. Il segnale luminoso è stato poi convertito in valori di concentrazione di Ca^{2+} intracellulare, tramite uno script precedentemente sviluppato (Binci et al, 2023).

2.16 Saggio biochimico GUS

La colorazione GUS è stata eseguita per radici la cui trasformazione con il costrutto di interesse è stata prima accertata allo stereomicroscopio a fluorescenza. La mix di reazione consiste di: 50 nM di $(\text{CN})_6\text{FeK}_3$, 50 nM di $\text{FeK}_4(\text{CN})_6$, 0.2 M di buffer Na_3PO_4 (pH=7, a partire da 32 mL di di stock

monobasico 0.2 M NaHPO), 0.5 M di Na₂EDTA, 0.2% Triton X-100, 3 mg/mL di X-Gluc (5-Bromo-4-Cloro-3-Indoyl-Beta-D-Glucoronide) e H₂O milliq per il raggiungimento del volume di reazione adeguato.

In seguito, le radici sono state immerse nella mix e lasciate in incubazione al buio a 37 °C per 16 ore. Infine, la reazione è stata bloccata con l'aggiunta di alcol etilico 70% (v/v) e due lavaggi consecutivi con acqua deionizzata. Successivamente è stata eseguita una controcolorazione con WGA-OregonGreen, come descritto al paragrafo 2.13. L'obiettivo è di accertare la co-localizzazione delle strutture fungine e della colorazione GUS. Le radici sono poi state osservate al microscopio a fluorescenza Leica DM6b.

2.17 Trattamento con auxina (IAA) e analisi delle radici laterali

È stata seguita la crescita di radici laterali in piante posizionate in un terreno contenente l'ormone auxina (IAA, acido indol-3-acetico). I semi sono stati precedentemente sterilizzati e, una volta germinate le plantule (genotipi: wild type, *mlo4-1* LORE e *mlo4-2* LORE), sono state trasferite in nuove piastre Petri quadrate 12x12 cm contenenti 60 mL di terreno Long Ashton solido (1% Agar) con livelli di fosfato equivalenti a 200 µM, al quale è stato aggiunto IAA (5 µM). In ogni piastra sono state posizionate un totale di otto piante disposte in riga, assicurandosi di non danneggiare l'apice radicale. Le piastre sono state chiuse con nastro adesivo Leukopore e incubate in cella di crescita (23°C, 60%umidità, luce/buio 16h/8h). La crescita delle radici laterali è stata monitorata per 21 giorni eseguendo fotografie delle piastre poste su un pannello retroilluminato dotato di scala centimetrica. Le scansioni infine sono state analizzate con il plugin Root Image Analysis e SmartRoot sul software (Fiji Is Just) ImageJ versione 1.54f (settembre 2023) (Lobet *et al.*, 2011, Lobet *et al.*, 2017).

2.18 Analisi statistica

I dati sono stati analizzati statisticamente utilizzando il software R-Studio versione 4.1.1 (agosto 2021), con il quale sono stati usati i pacchetti ggExtra, tidyverse, multcomp, ggpubr, rstatix, patchwork, ggplot2.

Nelle analisi è stata verificata la normalità dei dati e l'omogeneità delle varianze, effettuando i dovuti test nel caso in cui queste condizioni non fossero verificate (test non parametrico Kruskal-Wallis, test post-hoc di Dunn). Sono stati eseguiti ANOVA e test post-hoc Tukey's HSD, e i grafici riportati sono stati prodotti tramite le funzionalità dei suddetti pacchetti, modificandone le impostazioni grafiche all'occorrenza.

2.19 Lista primer e plasmidi

Primers utilizzati per il clonaggio		
C36	Promotore AtUBQ10 - forward	TCGTTTCGATCCCAATTTTCGT
C39	mCherry- reverse	CAAGTAGTCGGGGATGTTCG
C61	EGFP_reverse (N-term)	TTTACGTCGCCGTCCAGC
C62	GUS_reverse (N-term)	TTCCACAGTTTTTCGCGATC
C63	GUS_forward (C-term)	TGGACTGGCATGAACTTC
C73	tAtUBI_forward	TGAGCTGTTGGGTTCTAAGG
C74	tAtUBI_reverse	ATGCTTGGACAAAGGTACGA
LB T DNA	LB_T-DNA_forward Destination Vectors Z001, Z003, Y001, Y003	TGGCAGGATATATTGTGGTG
RB TDNA	RB_T-DNA_forward Destination Vectors Z001, Z003, Y001, Y004	CCGCCAATATATCCTGTC
Primers utilizzati per genotipizzazione e caratterizzazione dei trascritti		
G01	Common LORE1 reverse (P2 primer)	CCATGGCGGTTCCGTGAATCTTAGG
G26	genotyping_cDNA_Lotja Gi1g1v056800_mlo4-2_F	GGTGCGTCCCCTAGTTTGATCGGG
G28	genotyping_cDNA_Lotja Gi1g1v056800_mlo4-1_F	TTCGCTCATGGCCTTCTTATGGCG
G64	genotyping_cDNA_Lotja Gi1g1v056800_mlo4-1_R	AGCTTGCAAGAACTCCCACATGG
G65	genotyping_cDNA_Lotja Gi1g1v056800_mlo4-2_R	TGTGAGTTTCTTCCTTCTTGGGAGG
G67	30107425_LORE1_mlo4-3_F	TCGTTAGGCGTCACTCAGGCTGGA
G81	Usato con G67 per genotyping mlo4-3 (allele wt)	TGCTATCAGGATTAATGTGCC TGCAT
pUBI_F		TTCACCTTGTGCTCCGTCTTC
pUBI_R		AACAACAGAACACACAGACAATCC

Plasmidi Green Gate	
GG9	Modulo B del clonaggio Green Gate, B-Dummy. Gene per resistenza all'ampicillina.
GG20	Modulo C del clonaggio Green Gate. Vettore di clonaggio con gene <i>gus</i> (1814 bp). Vettore <i>backbone</i> pUC19. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG22	Modulo D del clonaggio Green Gate, D-Dummy. Vettore <i>backbone</i> pUC19. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG29	Modulo E del clonaggio Green Gate. Vettore di clonaggio contenente terminatore UBQ10. Vettore <i>backbone</i> pUC19. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG60	Vettore di espressione contenente <i>yellow fluorescent protein</i> (YFP) fusa ad <i>equorina</i> nucleare (NLS-YFP). Marcatore di trasformazione: <i>mCherry</i> sotto il controllo di pLjUBI. Vettore <i>backbone</i> GG108. Prodotto mediante il taglio e ligazione dei siti Bsal. Gene per la resistenza alla kanamicina.
GG62	Vettore di espressione contenente <i>yellow fluorescent protein</i> (YFP) fusa ad <i>equorina</i> citosolica (CYA). Marcatore di trasformazione: <i>mCherry</i> sotto il controllo di pLjUBI. Vettore <i>backbone</i> GG108. Gene per la resistenza alla kanamicina.
GG78	<i>Entry vector</i> contenente la cassetta di resistenza costituita da tUBI e tripla <i>mCherry</i> nucleare. Vettore <i>backbone</i> GG48. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG83	<i>Entry vector</i> contenente il promotore di LjMLO4 (\approx 1900 bp). Vettore <i>backbone</i> GG43. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG108	Vettore di destinazione ppGGsun-GA, con cassetta di selezione <i>ccdB</i> fiancheggiata da siti di riconoscimento per <i>Bsal</i> . Gene per la resistenza alla kanamicina.
GG142	Vettore di espressione contenente il gene <i>gus</i> sotto il controllo di pMLO4_ΔAWbox_ΔP1BS. Vettore <i>backbone</i> GG108. Prodotto ottenuto mediante taglio e ligazione dei siti Bsal; 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 <i>gus</i> sotto il controllo di pMLO4_ΔP1BS. Vettore <i>backbone</i> GG108. Prodotto ottenuto mediante taglio e ligazione dei siti Bsal; 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 <i>gus</i> sotto il controllo di pMLO4_ΔAWbox. Vettore <i>backbone</i> GG108. Prodotto ottenuto mediante taglio e ligazione dei siti Bsal; fusione di GG147 e GG145 come moduli A e B nel protocollo di clonaggio Green Gate. Gene per la resistenza alla kanamicina.

GG145	<i>Entry vector</i> contenente pMLO4- Δ AWbox (modulo B; dalla posizione -1 alla posizione -224). Vettore <i>backbone</i> GG44. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG146	<i>Entry vector</i> contenente pMLO4- Δ AWbox- Δ P1BS (modulo B; dalla posizione -1 alla posizione -208). Vettore <i>backbone</i> GG44. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG147	<i>Entry vector</i> contenente pMLO4- Δ AWbox (modulo A; dalla posizione -2000 alla posizione -208). Vettore <i>backbone</i> GG43. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG148	<i>Entry vector</i> contenente pMLO4 (modulo A; dalla posizione -2000 alla posizione -208). Vettore <i>backbone</i> GG43. Gene per la resistenza all'ampicillina.
GG193	Vettore di espressione contenente pMLO4, sequenza genomica MLO4 e <i>yellow fluorescent protein</i> (YFP) fusa ad <i>equorina</i> citosolica (CYA). Vettore <i>backbone</i> GG108. Gene per la resistenza alla kanamicina.
GG194	Vettore di espressione contenente pUBI, sequenza genomica di MLO4 e <i>yellow fluorescent protein</i> (YFP) fusa ad <i>equorina</i> citosolica (CYA). Vettore <i>backbone</i> GG108. Gene per la resistenza alla kanamicina.
GG205	Vettore di espressione contenente pMLO4- Δ AWbox- Δ P1BS, sequenza codificante GUS con terminatore tUBI. Marcatore di trasformazione pLjUBI + tripla <i>mCherry</i> nucleare. Vettore <i>backbone</i> GG108. Gene per la resistenza alla kanamicina.
GG206	Vettore di espressione contenente pMLO4- Δ AWbox, sequenza codificante GUS con terminatore tUBI. Marcatore di trasformazione pLjUBI + tripla <i>mCherry</i> nucleare. Vettore <i>backbone</i> GG108. Gene per la resistenza alla kanamicina.
GG207	Vettore di espressione contenente pMLO4- Δ P1BS, sequenza codificante GUS con terminatore tUBI. Marcatore di trasformazione pLjUBI + tripla <i>mCherry</i> nucleare. Vettore <i>backbone</i> GG108. Gene per la resistenza alla kanamicina.
GG208	Vettore di espressione contenente pMLO4, sequenza codificante di MLO4 e GUS con terminatore tUBI. Marcatore di trasformazione pLjUBI + tripla <i>mCherry</i> nucleare. Vettore <i>backbone</i> GG108. Gene per la resistenza alla kanamicina.

3. RISULTATI

3.1 Identificazione di piante *mlo4-3* di *L. japonicus* omozigoti per la presenza o assenza dell'inserzione *LORE1*

Gli individui mutanti *mlo4-3* presentano l'inserzione *LORE1* nell'esone X del locus *MLO4* sono stati selezionati all'interno di una popolazione segregante. Allo scopo di individuare tutti gli individui mutanti omozigoti è stato estratto il DNA genomico a partire da un cotiledone in esemplari 10 giorni dopo la germinazione. La regione di interesse è stata amplificata tramite PCR utilizzando due coppie di primer fornite dal database LotusBase.org, una per l'allele wild type e una per l'allele mutante. L'individuazione degli individui mutanti è avvenuta tramite elettroforesi su gel di agarosio del DNA amplificato. La presenza della sola banda presente nell'amplificazione con primers wild type è stata interpretata come individuo wild type omozigote, due bande sono state interpretate come individuo eterozigote e una singola banda *LORE1* come mutante omozigote.

Il primo tentativo di genotipizzazione ha rivelato che molti campioni (58 su 181) non erano stati amplificati o presentavano una banda di amplificazione dubbia e di difficile interpretazione, specialmente per quanto riguarda l'allele wt (Fig. 3.1). Avendo utilizzato in prima battuta un rapido protocollo di purificazione, lo scarso successo delle PCR può essere imputato alla presenza di inibitori di PCR nell'estratto. Per questo, si è deciso di procedere con un secondo giro di estrazione del DNA genomico dai campioni dubbi, utilizzando un protocollo con separazione di fase in modo da ottenere un estratto più pulito e privo di inibitori. Come si può osservare in figura 3.2, per gli individui che nel primo tentativo risultavano dubbi è stato possibile identificare il genotipo esatto, seppur in alcuni casi una coppia di primers sembra funzionare meno bene dell'altra, specialmente nel caso dei primer wt. Tra questi individui sono stati individuati i mutanti omozigoti che presentano l'inserzione *LORE1* nell'esone X del locus *MLO4-3*. Alcuni degli individui omozigoti individuati sono stati quindi destinati alla crescita in serra al fine di ricavarne i semi, rendendo possibili studi futuri su questa di linea di mutanti. Gli altri individui sono stati utilizzati nell'esperimento di micorrizzazione con le diverse linee mutanti *mlo4* descritto nei prossimi paragrafi.

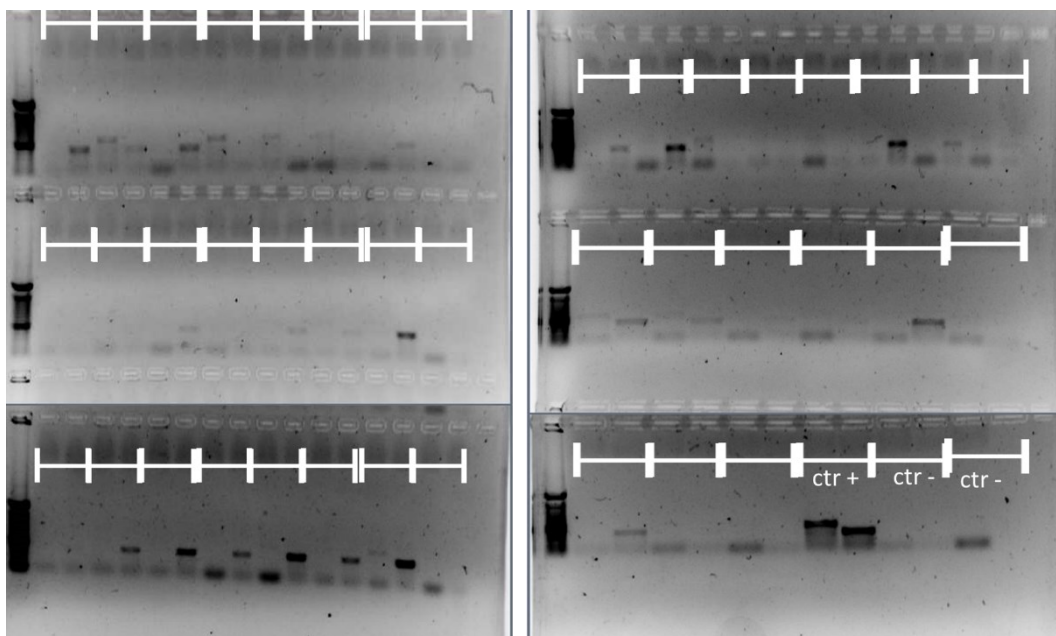


Figura 3.1: Gel di agarosio rappresentativi del primo round di genotipizzazione. Il prodotto di PCR è stato caricato in gel d'agarosio 1% (m/V) e la corsa elettroforetica svolta per 30 minuti a 120V. Per ogni campione è stato caricato prima l'amplificato con primer wild type e poi quello mutante. Sulla prima colonna di ogni gel è visibile il marcatore molecolare 1 Kb+, utilizzato per discernere la lunghezza degli ampliconi ottenuti. "ctr+" indica un DNA genomico precedentemente individuato come mutante omozigote *mlo4-3*. "ctr -" indica la mix di pcr in cui non è stato aggiunto DNA. È possibile notare che molti campioni non è avvenuta alcuna amplificazione oppure le bande sono di difficile interpretazione. Si notano inoltre numerosi dimeri di primer.

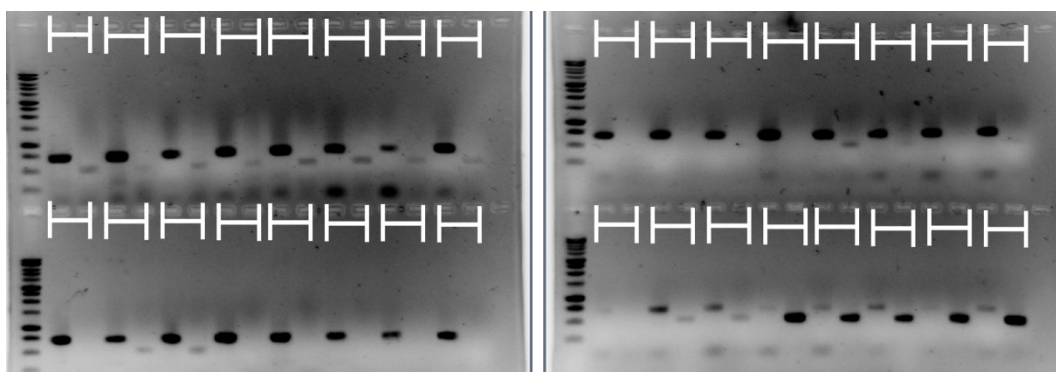


Figura 3.2: Gel di agarosio rappresentativi del secondo round di genotipizzazione. Il prodotto di PCR è stato caricato in gel d'agarosio 1% (m/V) e la corsa elettroforetica svolta per 30 minuti a 120V. Per ogni campione è stato caricato prima l'amplificato con primer wild type e poi quello mutante. Sulla prima colonna di ogni gel è visibile il marcatore molecolare 1 Kb+, utilizzato per discernere la lunghezza degli ampliconi ottenuti. È possibile notare che la banda del wild type è chiaramente visibile, permettendo una migliore interpretazione. Nonostante ciò, è ancora presente qualche campione di difficile interpretazione, ma la resa di questo secondo tentativo è di gran lunga maggiore alla prima.

3.2 Analisi dell'mRNA prodotto dal locus *MLO4* nelle diverse linee mutanti di *L. japonicus*

Al fine di caratterizzare il ruolo del gene *MLO4* di *L. japonicus* nella simbiosi micorrizica arbuscolare, le linee wild-type e mutanti *mlo4-1* LORE1, *mlo4-2* LORE1, *mlo4-3* LORE1 sono state co-coltivate con il fungo micorrizico *Rhizophagus irregularis*. Parallelamente, sono state coltivate piante nelle condizioni, ma in assenza del fungo micorrizico. Durante la coltivazione le piante sono state annaffiate con soluzione Long Ashton a bassa concentrazione di fosfato (20 μ M), così da promuovere la formazione della simbiosi nei vasi in cui è stato effettuato l'inoculo del fungo. Al fine di ottenere un buon livello di micorrizzazione, le piante sono state raccolte dopo sette settimane.

Come prima cosa è stata analizzata l'eventuale presenza del trascritto nelle linee mutanti *mlo4*. Dal momento che il gene *MLO4* è fortemente indotto in radici micorrizzate, l'RNA è stato estratto da radici co-coltivate con il fungo micorrizico.

L'RNA estratto dai campioni è stato sottoposto prima a trattamento con DNAasi, per eliminare tracce di DNA non desiderate, ed è stato poi retrotrascritto. Il cDNA così ottenuto è stato diluito 1:5 con H₂O milliQ e amplificato tramite PCR utilizzando coppie di primers fiancheggianti punti di interesse nel gene *MLO4*, così da accertare che le linee mutanti non presentassero trascritti funzionali per i punti in cui è attesa l'inserzione LORE1. La prima coppia (F1 e R1, segnalati in verde) fiancheggia l'inizio della sequenza *MLO4*, in cui l'elemento LORE è atteso per la linea mutante *mlo4-1*; la seconda coppia (F2 e R2, in blu) corrisponde al punto di inserzione per i *mlo4-3*; la terza coppia (F3 e R3, in rosso) coincide con la fine della sequenza, in cui è attesa l'inserzione per i *mlo4-2*. Come controllo positivo è stata usata la coppia di primer per l'amplificazione dell'ubiquitina (UBI_F e UBI_R).

In figura 3.3B sono riportate le bande risultate dall'amplificazione del cDNA. L'amplificazione dei campioni wild type conferma che in essi sono presenti i trascritti di *MLO4* per tutti e tre i siti di inserzione dei mutanti, confermando che LORE1 non è presente nel wild type. In altre parole, l'amplificazione del wild type funge da controllo positivo per la trascrizione completa e funzionale di *MLO4*. Nel profilo di *mlo4-1* LORE, non è visibile alcuna banda in nessuno dei 3 siti di amplificazione, risultato in accordo con la posizione dell'inserzione in questa linea mutante. La posizione dell'inserzione all'inizio della sequenza, infatti, impedisce la trascrizione dell'intero gene, e quindi non è avvenuta alcuna amplificazione per nessuna delle tre regioni di interesse. Nel profilo per i *mlo4-2* LORE si notano invece delle bande a livello del primo sito (inizio della sequenza) e del secondo sito (posizione intermedia), ma nessuna banda nel terzo sito alla fine della sequenza. L'inserzione in questa linea mutante è posta alla fine della sequenza, di

conseguenza è probabile che venga prodotto un trascritto funzionale per la quasi totalità della lunghezza del gene. I campioni *mlo4-3* LORE presentano l'amplificazione del primo sito mentre nel terzo non è presente alcuna banda. Nel sito intermedio invece è visibile una banda (indicando che la sequenza è trascritta fino a quel punto) ma la dimensione del trascritto è inferiore a quelli riscontrati per lo stesso sito. Questo suggerisce che l'inserzione LORE1 nell'esone XX del gene *MLO4* produca un trascritto tronco per la parte successiva del gene. Inoltre, la presenza di una banda di ridotta lunghezza rispetto all'atteso suggerisce che possano verificarsi eventi di splicing aberrante. Infine, negli individui *mlo4-3* wild type, in cui non è attesa l'inserzione e quindi il trascritto dovrebbe essere del tutto simile a quello del wild type, tutte le porzioni testate del trascritto sono presenti come avviene nelle piante Gifu wild type. Questa caratterizzazione dei trascritti ha permesso di verificare che ogni linea mutante posseduta produca trascritti aberranti, verosimilmente non funzionali. Questa verifica è stata tanto utile quanto necessaria per i mutanti *mlo4-3* LORE, i quali sono stati ottenuti per la prima volta ed era necessario confermare che disponessero dell'inserzione LORE1 nel sito desiderato.

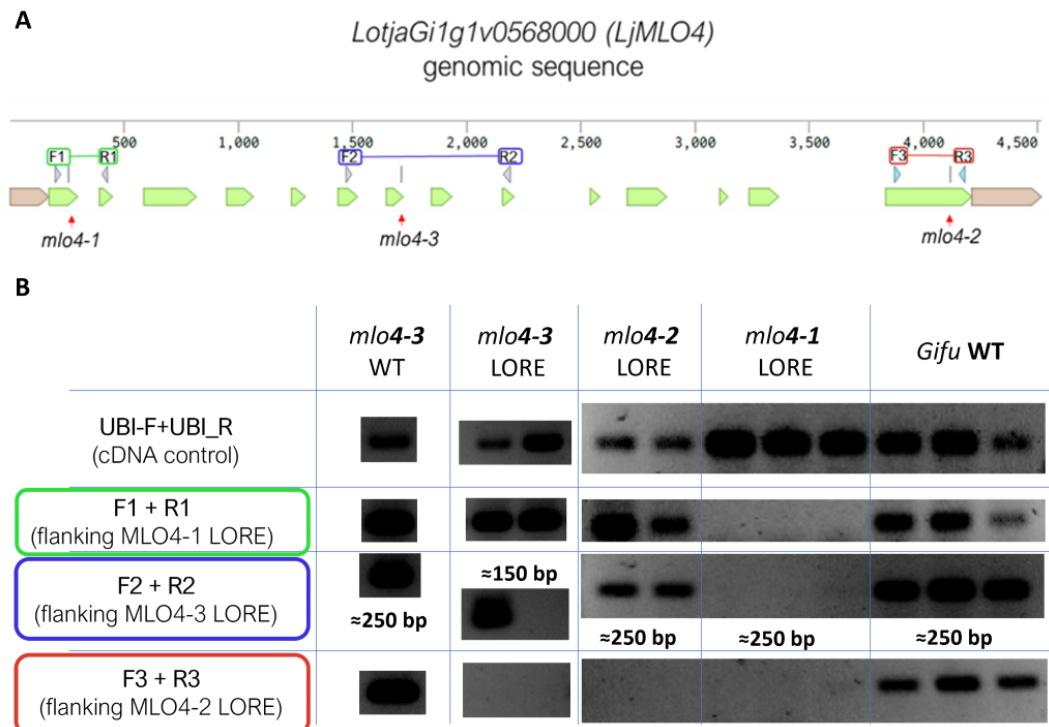


Figura 3.3: A) Siti di appaiamento dei primer utilizzati. La prima coppia F1-R1 (in verde) fiancheggia l'inizio della sequenza, in cui è attesa l'inserzione LORE1 per i *mlo4-1*. La coppia F2-R2 (in blu) fiancheggia la porzione intermedia della sequenza, in cui è attesa l'inserzione per i *mlo4-3* LORE. Infine, l'ultima coppia F3-R3 fiancheggia la parte finale della sequenza, dove è atteso LORE1 per i *mlo4-2* LORE. **B) Profili di amplificazione del cDNA delle varie linee mutanti.** *mlo4-1* LORE non presenta trascritti, *mlo4-2* LORE trascrive il gene per i primi due siti ma non per l'ultimo, *mlo4-3* LORE mostra un trascritto di lunghezza anomala a livello del secondo sito e *mlo4-3* WT mostra un profilo simile a quello di *mlo4-2* LORE.

3.3 Diverse linee di *L. japonicus* mutanti per il gene *MLO4* presentano una ridotta biomassa dell'apparato radicale

In seguito alla raccolta, l'apparato radicale e il fusto delle piante sono stati pesati con una bilancia analitica.

È stato riscontrato che la simbiosi con il fungo ha promosso un maggiore accumulo di biomassa nel fusto ($p < 0.01$), e, inoltre, è presente un effetto genotipo ($p < 0.05$) per la biomassa dell'apparato radicale, anche se per quest'ultimo sembrano non esserci differenze rispetto alla coltivazione con il fungo. Riguardo all'interazione tra genotipo e simbiosi con il fungo, tuttavia, non sono state trovate differenze significative tra individui mutanti (*mlo4-1* LORE, *mlo4-2* LORE, *mlo4-3* LORE) e individui wild type. Questo risultato è in disaccordo con le osservazioni precedentemente ottenute, anche se ottenute in time points precedenti. La causa dietro all'assenza di differenze significative è da imputare al lungo tempo di coltivazione con il fungo simbiote. Le piante sono state raccolte dopo sette settimane, quindi nelle fasi finali del processo di micorrizzazione. Dal momento che l'inattivazione di *MLO* non compromette la riuscita della simbiosi (Hillbert *et al.*, 2020), il lungo periodo di co-coltivazione in vaso può aver assottigliato le eventuali differenze presenti tra le linee mutanti e il wild type e aver comportato una standardizzazione dei risultati.

È possibile osservare tuttavia una tendenza per i mutanti *mlo4-3* (wild type, eterozigoti e omozigoti mutanti), in cui si osserva una massa minore sia del fusto che delle radici. In media la massa più bassa, sia per le radici sia per i fusti, è stata riscontrata negli omozigoti mutanti. Questo potrebbe suggerire che il silenziamento di *MLO4* nel sito 3 sta influenzando negativamente la simbiosi e, dipendentemente da essa, l'accumulo di biomassa complessiva della pianta. Si osserva inoltre che è presente una leggera differenza nella media anche per i mutanti *mlo4-1* LORE.

In base alla coltivazione insieme al fungo simbiote sono state osservate delle differenze sia nella biomassa del fusto che in quella della radice. Questa differenza non risulta significativa per l'accumulo di biomassa nelle radici ($p = 0.17$), mentre nei fusti emerge una differenza significativa ($p < 0.001$). Queste differenze indicano che i campioni, grazie alla simbiosi con il fungo micorrizico, accumulano maggiore biomassa, e questo aumento è di gran lunga più evidente per il fusto piuttosto che per la radice. Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che le piante sprovviste della simbiosi con il fungo, essendo poste in condizioni di bassa concentrazione di fosfato, aumentano l'estensione dell'apparato radicale alla ricerca del simbiote, con un aumento della biomassa dell'organo. In questo modo la differenza di biomassa tra piante micorrizzate e quelle non micorrizzate potrebbe essere stata assottigliata.

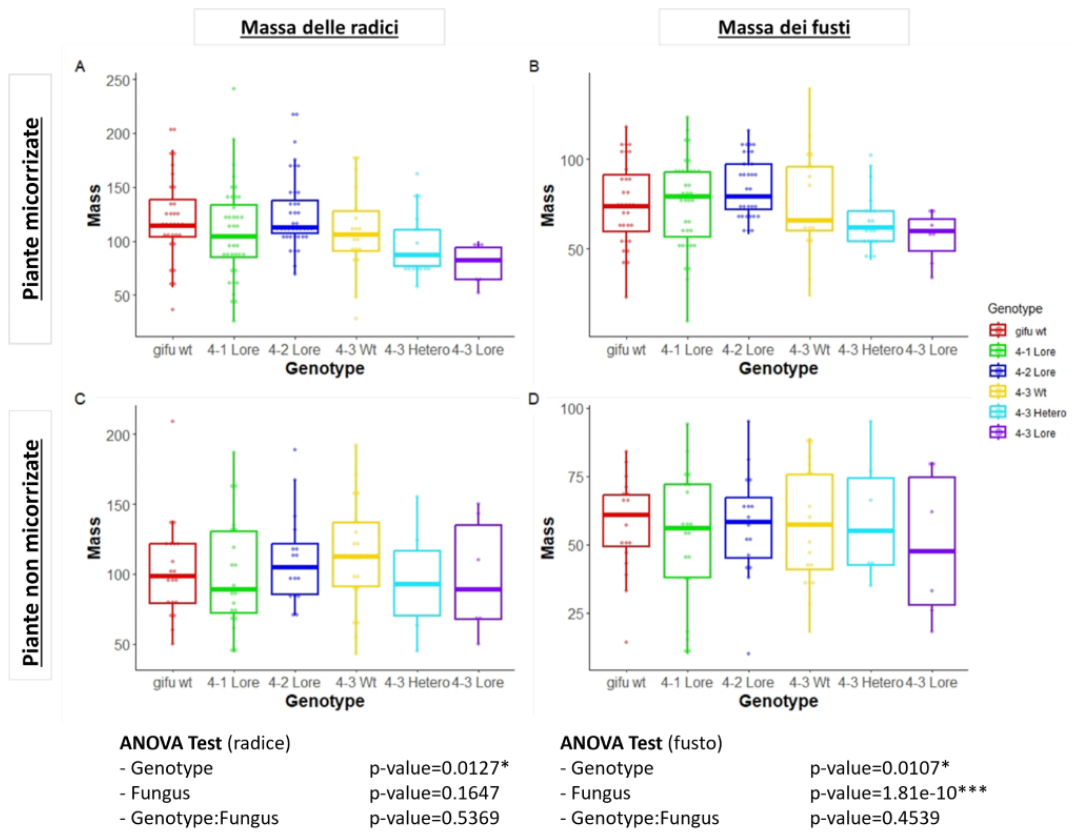


Figura 3.4: Biomassa (in mg) di fusti e di radici per le varie linee mutanti coltivate in presenza o assenza del fungo. A) Massa dell'apparato radicale in coltivazione con il fungo micorrizico arbuscolare *R. irregularis*. B) Massa dei fusti in coltivazione con il fungo. Anche in questo caso mutanti mlo4-3 LORE presentano minor biomassa. C) Massa delle radici in coltivazione senza il fungo. D) Massa dei fusti in coltivazione senza il fungo. La distribuzione dei dati è presentata sotto forma di *box-plot*, ogni punto rappresenta l'apparato radicale o il fusto di una singola pianta. L'analisi statistica è stata effettuata con test ANOVA seguito da correzione Tukey per il confronto a coppie.

3.4 Quantificazione della colonizzazione micorrizica in piante WT e mutanti *mlo4* tramite metodo Trouvelot

Il metodo Trouvelot permette di quantificare la colonizzazione fungina dell'apparato radicale della pianta in base alle percentuali di ife e di arbuscoli. Seguendo questa metodica sono stati analizzati campioni di radice provenienti dalle linee wild type, *mlo4-1* LORE e *mlo4-2* LORE. Non sono stati analizzati mutanti *mlo4-3* LORE dal momento che il numero di campioni ottenuto dalla genotipizzazione è risultato troppo basso per un'analisi esaustiva della colonizzazione radicale. Gli apparati radicali ricavati sono stati colorati tramite inchiostro blu e per ogni linea è stato quantificato circa un metro di radice per ogni campione (cinque vetrini da 20 sezioni di radice da 1 cm), e per ogni genotipo sono stati osservati 8 campioni.

La frequenza di strutture micorriziche nel sistema radicale (F%) è molto vicina al 100% per tutti i campioni osservati. Questo perché la raccolta delle radici è avvenuta dopo sette settimane di coltivazione con il fungo micorrizico, in cui si è raggiunto il picco massimo della colonizzazione. Non emergono differenze significative per quanto riguarda l'intensità della colonizzazione nei frammenti di radice (m%) e nell'apparato radicale in generale (M%) in individui mutanti rispetto a individui wild type; l'intensità della simbiosi nei mutanti è infatti statisticamente comparabile a quella del wild type, nonostante si possa notare una lieve differenza in eccesso per questi parametri nei mutanti. Riguardo all'abbondanza di arbuscoli nei frammenti di radice (a%) e l'abbondanza di arbuscoli nell'apparato radicale (A%), è possibile notare delle differenze marcate tra individui mutanti *mlo4-1* LORE e wild type, per entrambi i parametri. Queste differenze non sono significative ($p > 0.1$), nonostante sia possibile notare una tendenza all'aumento della quantità di arbuscoli nei mutanti *mlo4-1* LORE.

I risultati ottenuti sono in parziale accordo con quelli osservati da Hilbert *et al.*, 2020. Lo studio riporta un significativo aumento della micorrizzazione nei mutanti *mlo* di orzo (*Oryza sativa*) in termini di abbondanza di arbuscoli e di intensità di colonizzazione rispetto al wild type dopo 8 settimane di co-coltivazione con il fungo micorrizico. Analogamente, una differenza nell'abbondanza di arbuscoli è riscontrabile anche in queste misurazioni, tuttavia non risulta significativa. Il tempo prolungato in cui le piante sono state lasciate crescere con il fungo può aver assottigliato eventuali differenze presenti in fasi precedenti della simbiosi, quindi prima del periodo di sette settimane. Di conseguenza è osservabile solamente una tendenza in cui mutanti *mlo4-1* hanno maggior abbondanza di arbuscoli. Non è invece osservabile alcuna differenza significativa riguardo all'intensità di colonizzazione, come invece era stato riscontrato da Hilbert *et al.*, 2020. Questi parametri risultano del tutto paragonabili a quelli del wild type,

confermando che il prolungato tempo di coltura può aver minimizzato le differenze.

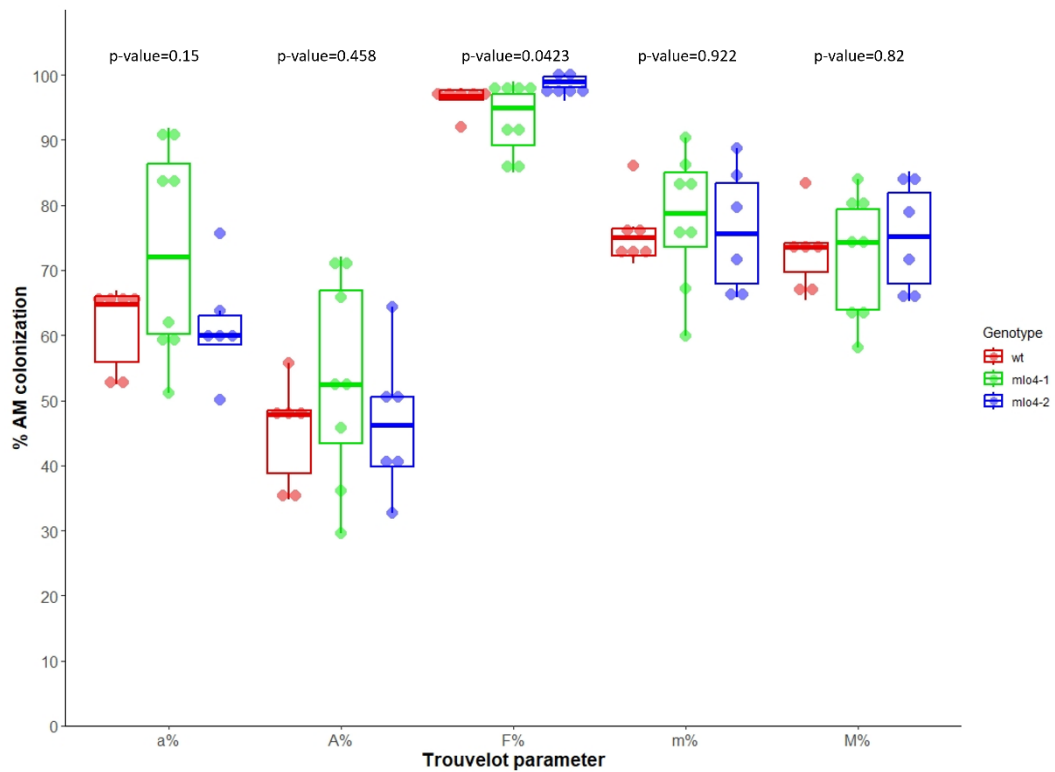


Figura 3.5: Quantificazione della colonizzazione micorrizica in radici di piante Gifu wild type, *mlo4-1* LORE e *mlo4-2* LORE con il metodo Trouvelot. a% indica l'abbondanza di arbuscoli nei frammenti di radice, A% l'abbondanza di arbuscoli nell'apparato radicale, F% la frequenza di micorrize nell'apparato radicale, m% l'intensità della colonizzazione nei frammenti di radice e M% l'intensità di colonizzazione nell'apparato radicale. Ogni punto nel grafico rappresenta un vaso contenente quattro individui con lo stesso genotipo e trattamento. La distribuzione dei dati è riportata come boxplot per ogni parametro considerato ed essi sono stati uniti in un unico piano. L'analisi statistica è stata effettuata tramite test ANOVA, seguito da correzione di Tukey per il confronto a coppie.

3.5 L'accumulo di fosfato in triplette fogliari mostra una tendenza positiva in *mlo4-1* LORE e *mlo4-3* LORE rispetto al WT

Dal momento che la nutrizione minerale rappresenta il beneficio per la pianta che ospita il fungo micorrizico arbuscolare nelle radici, il fosfato totale solubile è stato quantificato dalle foglie delle piante utilizzate nell'esperimento di micorrizzazione. Nello specifico, è stata campionata la prima tripletta fogliare, sia per individui coltivati insieme al fungo sia per individui coltivati senza fungo. L'estrazione e quantificazione del fosfato è stata eseguita come descritto al paragrafo 2.14 e i valori ricavati da ogni campione sono stati normalizzati in base alla massa della tripletta e sono stati espressi in nmol/mg (Fig. 3.6).

Come si può notare dai risultati del Test ANOVA, il genotipo delle piante ha un effetto sull'accumulo di fosfato nella prima tripletta fogliare nelle piante inoculate con il fungo micorrizico, ma non nelle piante mock. Tra gli individui micorrizzati, si osservano livelli maggiori di fosfato nelle linee mutanti *mlo4-1* LORE e *mlo4-3* LORE. Questa differenza rispetto agli individui wild type non è significativa (nonostante sia molto vicina alla soglia) ma rende evidente la tendenza di queste linee mutanti ad accumulare più fosfato. A ulteriore conferma di ciò, i *mlo4-3* wt presentano un accumulo di fosfato del tutto comparabile con i wild type e la loro differenza con i *mlo4-3* LORE si attesta molto vicina alla soglia di significatività ($p=0.067$). Questa tendenza sarebbe coerente con quanto riscontrato con il test Trouvelot. In quest'ultimo si riscontra una maggiore abbondanza di arbuscoli per i mutanti *mlo4-1* LORE, traducendosi in un maggiore scambio di sostanze tra i due organismi e, conseguentemente, in un maggior accumulo di fosfato nella parte aerea della pianta. Seguendo questo ragionamento al contrario, poiché gli *mlo4-3* LORE presentano maggior accumulo di fosfato, sarebbe plausibile una maggiore abbondanza di arbuscoli nella radice, ma servirebbero studi su questa linea mutante. Ancora una volta, il tempo prolungato di coltivazione con il fungo simbionte potrebbe aver assottigliato eventuali differenze tra mutanti e wild type in fasi precedenti della simbiosi, con il risultato che le differenze attualmente osservabili sono prive di significatività.

I mutanti *mlo4-2* LORE riportano invece livelli di fosfato comparabili con quelli del wild type, nonostante un lievissimo incremento.

Stando ai risultati ottenuti, *MLO4* sembra essere coinvolto nelle fasi finali della simbiosi e nella senescenza degli arbuscoli, e la sua inattivazione potrebbe causare un allungamento della vita media di un arbuscolo con il conseguente aumento della concentrazione di fosfato nei tessuti vegetali.

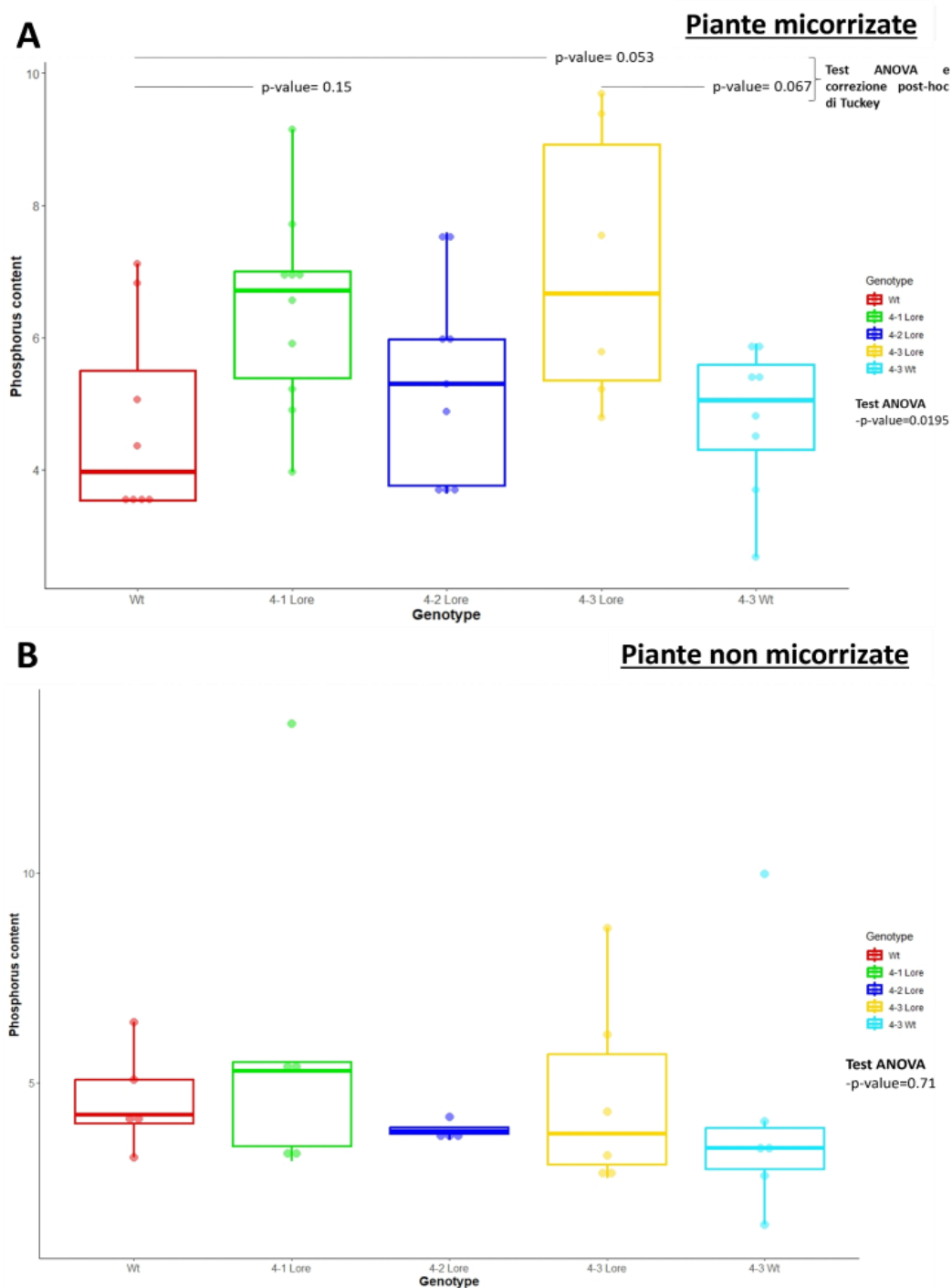


Figura 3.6: A) Quantificazione del fosfato solubile (nmol/mg) in presenza del fungo della prima tripletta fogliare di wild type, *mlo4-1* LORE, *mlo4-2* LORE, *mlo4-3* LORE, *mlo4-3* wild type. Ogni punto nel grafico rappresenta un singolo campione e la distribuzione dei dati è stata rappresentata come boxplot. L'analisi statistica è stata effettuata tramite test ANOVA, seguito da correzione di Tukey per il confronto a coppie. B) Quantificazione del fosfato solubile (nmol/mg) in assenza del fungo della prima tripletta fogliare di wild type, *mlo4-1* LORE, *mlo4-2* LORE, *mlo4-3* LORE, *mlo4-3* wild type. Ogni punto nel grafico rappresenta un singolo campione e la distribuzione dei dati è stata rappresentata come boxplot. L'analisi statistica è stata effettuata tramite test ANOVA, seguito da correzione di Tukey per il confronto a coppie.

3.6 La struttura dell'arbuscolo non mostra differenze tra i genotipi esaminati

Dopo aver quantificato la frequenza e distribuzione delle strutture fungine presenti nelle radici esaminate, una porzione delle radici è stata utilizzata per analizzare il fenotipo della struttura subcellulare dell'arbuscolo. A tal scopo, le radici raccolte sono state dapprima chiarificate con KOH e poi colorate con WGA-OregonGreen, un colorante fluorescente coniugato a una lectina che si lega selettivamente alla chitina della parete cellulare del fungo. Una volta finito il trattamento sono state sezionate e osservate al microscopio confocale (Zeiss LSM700, ingrandimenti 40x e 60x).

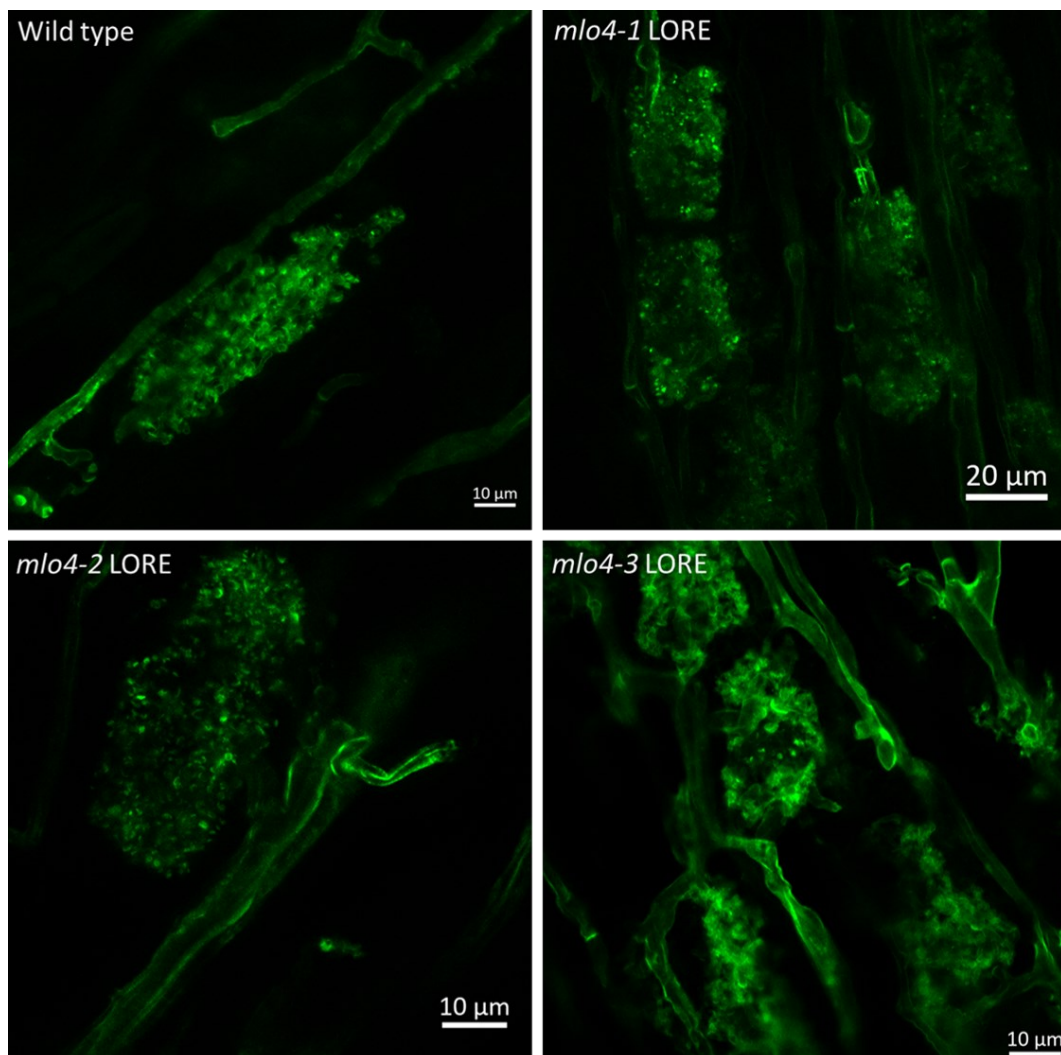


Figura 3.7: Immagini di microscopia confocale di sezioni radicali di wild type, *mlo4-1* LORE, *mlo4-2* LORE e *mlo4-3* LORE contenenti arbuscoli (il colorante WGA coniugato con OregonGreen si lega selettivamente alla chitina delle pareti fungine) a ingrandimento 60x (40x per *mlo4-1* LORE).

Per tutte le linee mutanti osservate, la forma e la struttura degli arbuscoli sono ben sviluppate e visibili. In ogni campione è stato possibile identificare porzioni di apparato radicale in cui erano visibili tutti gli elementi caratteristici dell'arbuscolo: ifa extracellulare, ingresso nella cellula e tronco basale, ramificazioni intracellulari dell'ifa ad occupare l'intero spazio cellulare della cellula. L'inattivazione del gene *MLO4* sembra non influenzare la penetrazione dell'ifa fungina a livello intracellulare e la sua ramificazione, lasciando intatti lo sviluppo e il fenotipo degli arbuscoli. Questo suggerisce che il gene sia coinvolto in altri processi coinvolti nella micorrizzazione arbuscolare, che non sono relativi alla morfologia dell'arbuscolo.

3.7 Il promotore endogeno di *MLO4* è fortemente attivo in cellule della corteccia che ospitano gli arbuscoli e negli abbozzi radicali

Dopo aver osservato il fenotipo simbiotico dei mutanti *mlo4*, l'indagine si è spostata sulla localizzazione dell'attività del promotore di *MLO4* in radici micorrizzate e non. A tale scopo è stato effettuato il saggio istochimico con il gene *reporter GUS* (β -glucuronidasi) posto sotto il controllo del promotore endogeno *pMLO4*. Il modulo contenente il *GUS* e quello contenente il promotore sono stati assemblati, mediante il metodo GreenGate, in un vettore di espressione utilizzato per la trasformazione dell'apparato radicale di piante *L. japonicus* mediante *A. rhizogenes*. I costrutti con cui sono state trasformate le piante sono i seguenti: *pUBI::Cytosolic Aequorin* come controllo negativo (GG62, Tab. 2.19), *pMLO4::GUS* (GG88, Tab. 2.19), *pMLO4- Δ P1BS- Δ AWbox::GUS* (GG142, Tab. 2.19), *pMLO4- Δ P1BS::GUS* (GG143, Tab. 2.19), *pMLO4- Δ AWbox::GUS* (GG144, Tab. 2.19). I costrutti GG142, GG143, GG144 contengono variazioni del promotore *pMLO4* in cui due regioni regolatorie in *cis* di interesse sono state mutate alternativamente o allo stesso tempo per verificarne il ruolo nella regolazione della trascrizione di *MLO4*. Nello specifico, sono state mutate le sequenze *cis* regolatrici P1BS (-186, -194 bp rispetto al codone di inizio) e AWbox (-195, -208 bp rispetto al codone di inizio), presenti in tandem, come mostrato in Fig. 3.8. Queste due sequenze sono note per essere coinvolte nella regolazione dell'espressione di geni noti per avere un ruolo nella simbiosi micorrizica arbuscolare (Pimprikar & Gutjahr 2018). AWbox rappresenta la sequenza regolatrice CNTNG(N)₇GC riconosciuta dai fattori di trascrizione WRINKLED e presente in vari geni che fanno parte del programma genetico simbiotico della pianta (Xue *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2018), mentre P1BS (*PHR1 binding site*, GNATATNC), è una sequenza riscontrabile nelle regioni promotoriali di geni che svolgono una parte essenziale nella risposta a carenza di fosfato mediata dai fattori di trascrizione PHR (Das *et al.*, 2022).

Sono stati utilizzati individui sia wild type sia mutanti *cyclops*, nei quali è mutato il gene *CYCLOPS*, componente essenziale per l'instaurazione di

simbiosi intracellulari. Le radici di mutanti *cyclops* possono essere colonizzate da parte delle ife fungine ma senza formazione di arbuscoli, pertanto la simbiosi non è funzionale (Yano *et al.*, 2008; Choi & Paszkowski, 2018). Le piante trasformate sono poi state verificate tramite stereomicroscopio a fluorescenza Leica MZ16 utilizzando la GFP citosolica come marker di trasformazione. Dopodiché le piante sono state posizionate in vasi riempiti di ghiaia fine in cui in ognuno di essi sono state inoculate circa 3000 spore di *Rhizophagus irregularis*. Le piante sono state lasciate crescere per circa quattro settimane e sono state innaffiate periodicamente con soluzione Long Ashton a bassa concentrazione di fosfato (20 μM PO_4), e successivamente sono state raccolte per effettuare il saggio GUS (Capitolo 2.16), e analizzate al microscopio ottico Leica DM 4000.

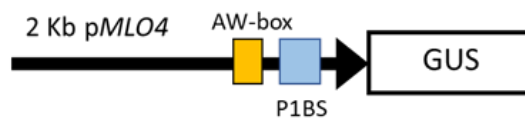


Figura 3.8: Elementi costitutivi e lunghezza del promotore *pLjMLO4*.

In radici micorrizzate, individui wild type presentano un forte segnale blu che indica l'attivazione del promotore di *MLO4* soprattutto in cellule arbuscolate della regione corticale. Osservando l'immagine a fluorescenza, in cui sono visualizzati ife e arbuscoli, e la sovrapposizione con l'immagine a luce visibile, si nota una forte co-localizzazione tra l'espressione del gene e la presenza delle strutture fungine (Fig. 3.9, *pMLO4*). Tuttavia, alcune cellule presentano l'espressione di *MLO4* senza co-localizzare con il fungo. Nei mutanti *cyclops* non sono presenti arbuscoli e le ife fungine sono estremamente rare, e l'espressione del gene è debolmente segnalata solo negli abbozzi radicali (Fig. 3.9, *pMLO4* in *cyclops*). La rimozione delle regioni P1BS e AWbox nel promotore del gene sembra averne diminuito debolmente l'attività dal momento che solamente un debole segnale azzurro è osservabile in corrispondenza di ife e arbuscoli (Fig. 3.9, *pMLO4* ΔP1BS ΔAWbox). Il segnale dato dal saggio GUS rimane invece forte e invariato rispetto al wild type se avviene la rimozione della sola sequenza P1BS; per di più, è possibile osservare che anche in questo caso *MLO4* è espresso negli abbozzi di radici laterali secondarie (Fig. 3.9, *pMLO4* ΔP1BS). Infine, la rimozione della sola sequenza AWbox riduce visibilmente l'attività del promotore anche in presenza di abbondanti ife e arbuscoli (Fig. 3.9, *pMLO4* ΔAWbox). Un logico proseguimento delle analisi potrebbe quindi considerare uno studio più approfondito di questa sequenza del promotore e delle sue interazioni.

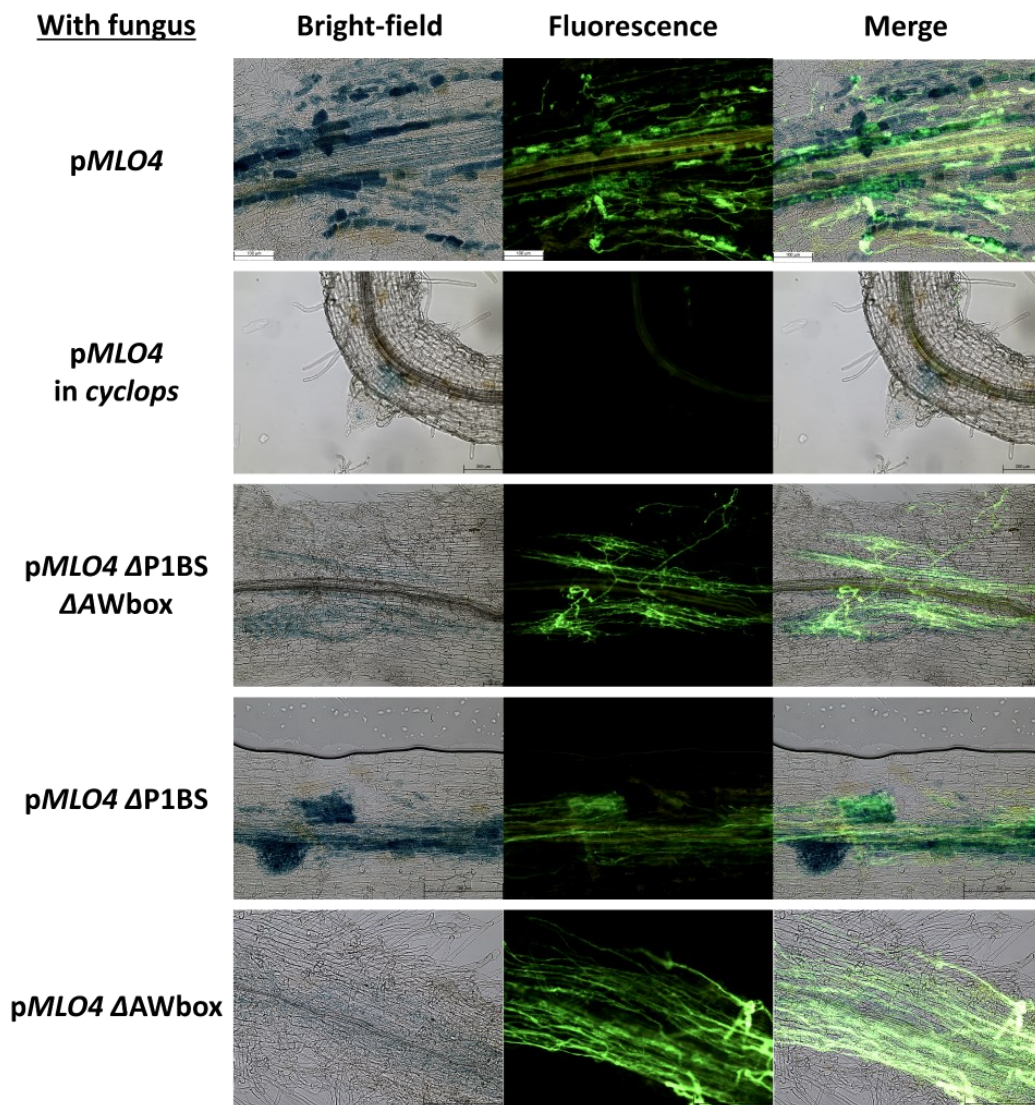


Figura 3.9: Immagini in campo chiaro (colonna sinistra), a fluorescenza (colonna centrale) e loro sovrapposizione (colonna a destra) di radici trasformate con differenti costrutti per l'espressione di GUS sotto il controllo di pMLO4, privato alternativamente delle sequenze P1BS e AWbox o con entrambe le sequenze presenti. La colorazione verde è data dal colorante WGA Oregon Green, e indica la presenza delle strutture simbiotiche fungine. Le piante trasformate sono state cresciute in vaso, in carenza di fosfato e con inoculo del fungo micorrizico *R. irregularis*. I campioni sono stati osservati al microscopio Leica DM6b.

Dopo aver riscontrato più volte che l'espressione non era limitata alle cellule radicali arbuscolate, l'analisi dell'attività di *pMLO4* ha interessato anche campioni trasformati con gli stessi costrutti ma cresciuti in assenza del fungo. In piante wild type, il gene è espresso prevalentemente in concomitanza dello sviluppo di radici laterali, a partire dai primi abbozzi fino all'emergenza dalla radice primaria (Fig. 3.10, *pMLO4*). Nei mutanti *cyclops* si osserva il medesimo pattern di espressione, anch'esso concentrato sullo sviluppo di radici laterali in maniera totalmente simile a quello dei wild type (Fig. 3.10, *pMLO4* in *cyclops*). La rimozione di P1BS e AWbox apparentemente non modifica l'espressione in abbozzi e radici laterali osservata nel wild type (Fig 3.10, *pMLO4* Δ P1BS Δ AWbox), mentre nei campioni privati solamente della sequenza P1BS si può notare un'aumentata espressione anche negli apici radicali (Fig 3.10, *pMLO4* Δ P1BS). Infine, nonostante l'eliminazione di AWbox, il segnale osservato nei campioni rimane intenso ed è osservabile anche in prossimità dei tessuti vascolari. In conclusione, le mutazioni a livello delle sequenze P1BS e AWbox non cambiano l'espressione di *MLO4* in assenza del fungo simbiotico.

Without fungus

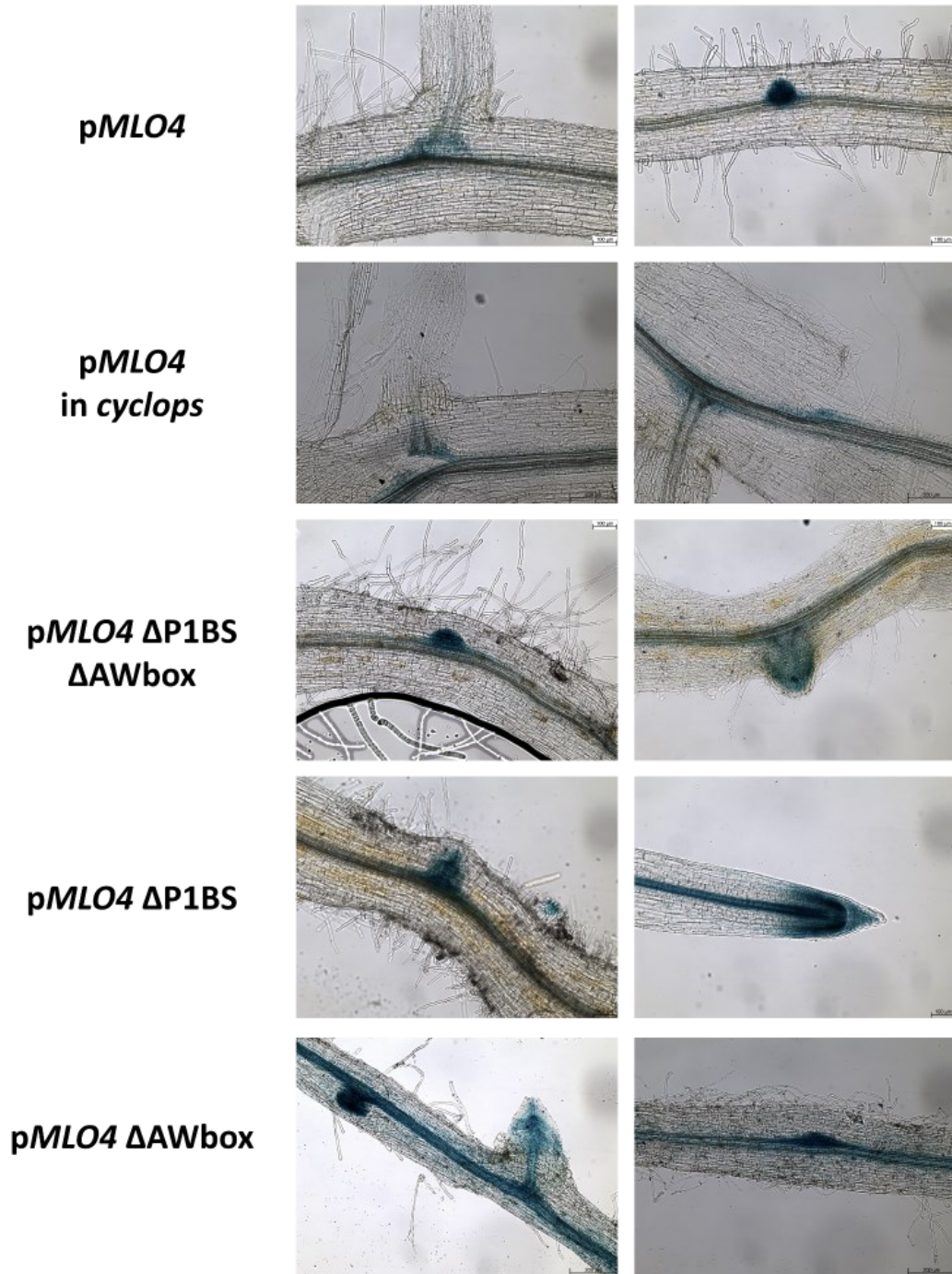


Figura 3.10: Immagini in campo chiaro di radici trasformate con differenti costrutti per l'espressione di GUS sotto il controllo di pMLO4, privato alternativamente delle sequenze P1BS e AWbox o con entrambe le sequenze presenti. Le piante trasformate sono state cresciute in vaso in carenza di fosfato e senza l'inoculo fungino. I campioni sono stati osservati al microscopio ottico DM6b.

3.8 Analisi della variazione di concentrazione citosolica di Ca^{2+} in risposta a stress salino e a stimoli biotici nei mutanti *mlo4*

Il ruolo di MLO come canale permeabile al Ca^{2+} è stato scoperto solo di recente (Gao *et al.*, 2022, Zhang *et al.*, 2022). Lo ione Ca^{2+} è noto per avere un ruolo nella trasduzione intracellulare dei segnali fungini che porta all'attivazione della via di segnale simbiotica o immunitaria. In seguito alla percezione di molecole segnale derivate dalla chitina, infatti, sono state osservate variazioni transienti della concentrazione citosolica di Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]$) che sottendono l'attivazione di una risposta sia immunitaria sia simbiotica (Binci *et al.*, 2023).

Variazioni nella concentrazione citosolica di Ca^{2+} in radici di *L. japonicus* in risposta a stimoli di varia natura sono state monitorate mediante l'utilizzo della sonda equorina. Quest'ultima si localizza nel citosol ed è stata espressa sotto il controllo del promotore costitutivo *UBIQUITIN10* di *L. japonicus* (costrutto GG62, Tabella 2.19). Il costrutto è stato utilizzato per trasformare sia *L. japonicus* wild type sia mutanti *mlo4-1* LORE. In aggiunta a questo, radici di ulteriori piante wild type sono state trasformate con un costrutto che esprima sia l'equorina citosolica sia MLO4 sotto il controllo del promotore *UBIQUITIN10*, in modo da operare una sovraespressione del gene (MLO4ox; costrutto GG194, Tabella 2.19); ulteriori radici di *mlo4-1* LORE sono state trasformate con un costrutto che esprima sia per l'espressione di equorina citosolica sia per MLO4 sotto il controllo del promotore endogeno MLO4, così da operare una complementazione dei mutanti in cui *MLO4* è inattivato (MLO41compl; costrutto GG193, Tabella 2.19).

I campioni sono stati sottoposti a stimoli biotici e abiotici differenti. Come stimolo abiotico è stata utilizzata una soluzione 2×0.1 M NaCl, per simulare lo stress salino. Lo stimolo è stato immesso dopo 100 secondi dall'inizio della misurazione e la durata delle singole corse luminometriche è stata di 10 minuti per lo stimolo salino. I dati sono poi stati trasferiti su foglio di lavoro, sono state costruite delle curve in funzione del tempo per ogni campione ed è stata ricavata la curva media e l'errore standard (Fig. 3.11A). Sono stati poi ottenuti altri parametri come il picco massimo di $[\text{Ca}^{2+}]$ citosolico (Fig. 3.11B), il tempo a cui è raggiunto il picco (Fig. 3.11C) e l'area totale sottesa alla curva, che rappresenta il totale di Ca^{2+} mobilizzato durante la risposta allo stimolo (Fig. 3.11D).

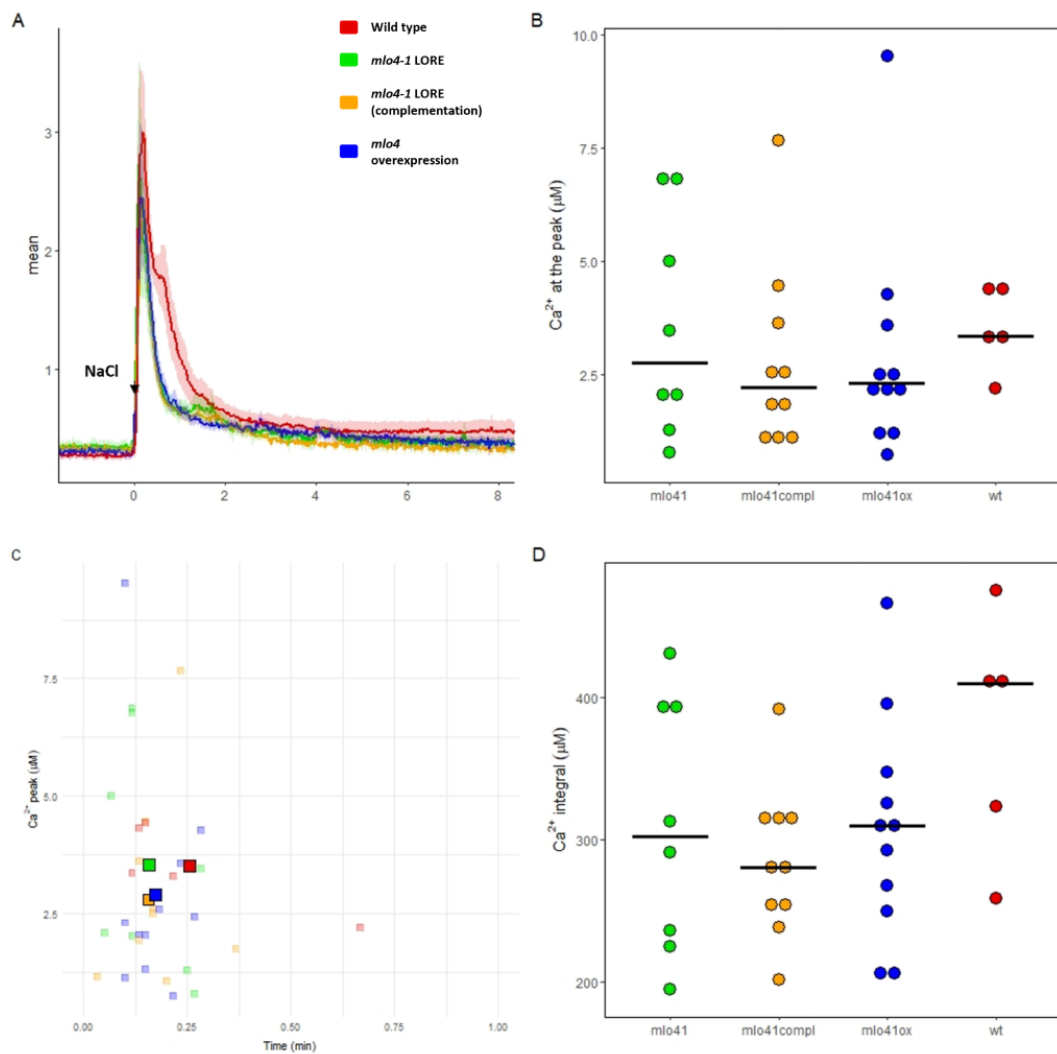


Figura 3.11: Variazioni della concentrazione di Ca^{2+} citosolico in seguito a stimolo con NaCl 0.1 M. A) Curve medie della variazione di Ca^{2+} citosolico. B) Concentrazioni di Ca^{2+} registrate nel picco dei singoli campioni. C) Distribuzione temporale dei picchi massimi. D) Integrali delle curve di variazione.

In seguito allo stimolo salino, gli individui wild type presentano un aumento repentino e improvviso della concentrazione di Ca^{2+} citosolico, con un picco medio che supera i 3 μM nei primi 30 secondi dall'iniezione dello stimolo (Fig. 3.11A), e nei campioni singoli varia da poco meno di 2.5 μM fino a oltre i 7.5 μM (Fig. 3.11B). Dopodiché la concentrazione cala con una velocità decrescente per stabilizzarsi infine intorno ai valori basali iniziali. Gli individui *mlo4-1* LORE presentano anch'essi un andamento della curva simile al wild type; tuttavia, il picco medio raggiunto in seguito all'iniezione dello stimolo risulta più basso (circa 2.10 μM , Fig. 3.11A) e in generale è stata riscontrata una variabilità dei massimi assoluti più ampia del wild type (Fig. 3.11B). Negli individui mutanti complementati (in cui sono stati reintrodotti il promotore e la sequenza codificante di *MLO4*) il picco medio risulta inferiore rispetto ai mutanti con *MLO4* inattivato (Fig. 3.11A), e si attesta a livelli di gran lunga più bassi di quelli registrati per il wild type.

Questo è confermato dai picchi dei singoli campioni, i quali presentano una variabilità paragonabile a quella dei mutanti ma con un range di valori traslati lievemente più in basso (Fig. 3.11B). Nei wild type con sovraespressione del gene si osserva una curva sostanzialmente uguale a quella dei mutanti complementati, con un picco medio che raggiunge il medesimo valore (Fig. 3.11A). Osservando i picchi singoli, tuttavia, è possibile notare che per questi campioni si ha la variabilità più elevata, con il valore massimo più alto registrato (quasi 10 μM , Fig. 3.11B). In generale, nessuna di queste differenze risulta essere significativa in seguito a test statistico e questi dati sembrano poter escludere un ruolo di MLO4 nella risposta allo stress salino.

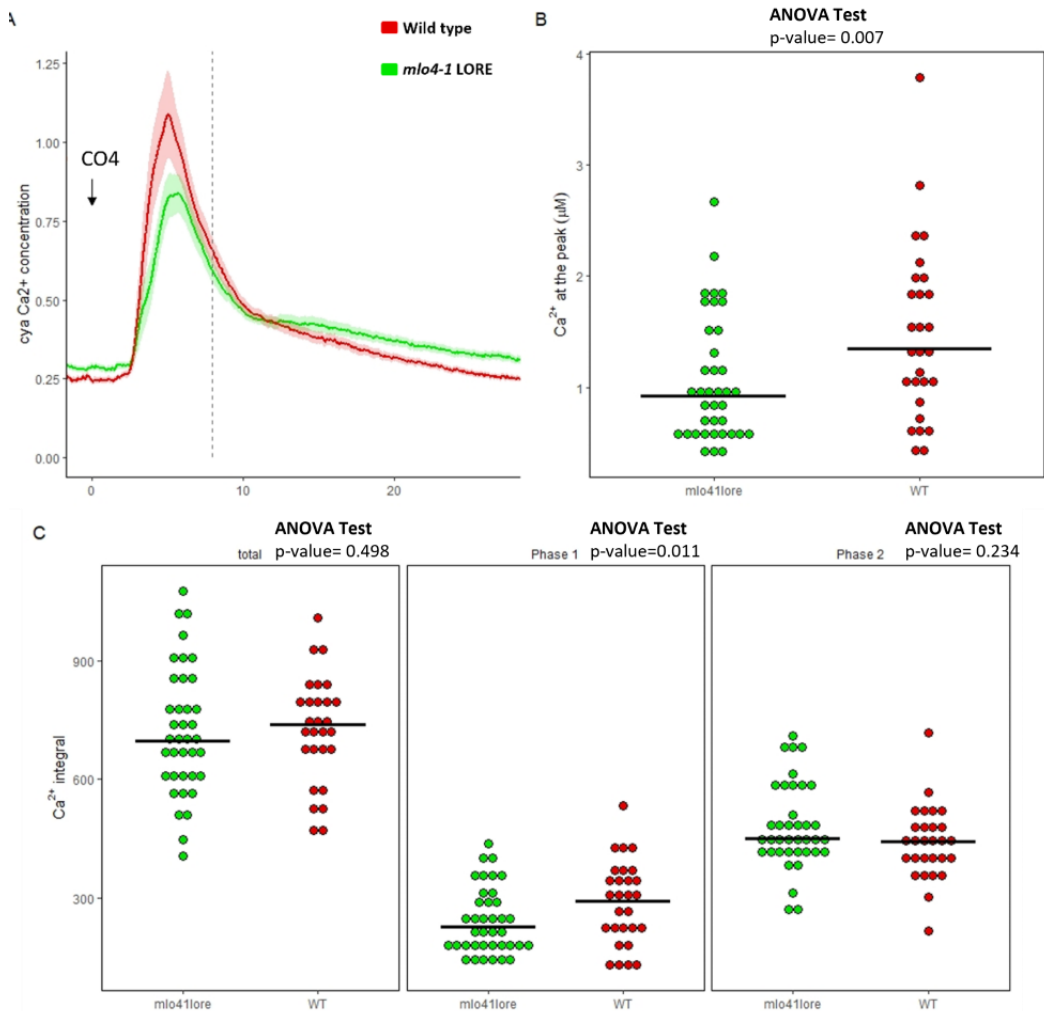


Figura 3.12: Variazioni della concentrazione di Ca²⁺ citosolico in seguito a stimolo con CO4 10⁻⁷ M. A) Curve medie della variazione di Ca²⁺ citosolico. B) Concentrazioni di Ca²⁺ registrate nel picco dei singoli campioni. C) Integrali delle curve di variazione, suddivisi in fase 1 (contenente il picco massimo), fase 2 (porzione successiva al picco) e curva totale.

Come stimoli biotici che simulano segnali simbiotici o patogeni sono stati utilizzati oligomeri di chitina a catena corta (CO₄, solitamente associati a interazioni simbiotiche benefiche) con una concentrazione 10⁻⁷ M e flagellina (10⁻⁷ M, segnale patogeno), dal momento che è il principale costituente dei flagelli batterici. Un precedente studio ha mostrato come CO₄, seppur considerato una molecola che media il riconoscimento di funghi micorrizici arbuscolari da parte della pianta, possa comunque attivare una rapida risposta immunitaria (fase 1) nella pianta se somministrato ad alte concentrazioni (10⁻⁷M).

Riguardo allo stimolo simbiotico benefico CO₄, il tempo impiegato dal wild type per la risposta è ben più lungo, impiegando in media meno di cinque minuti per raggiungere il picco di concentrazione di Ca²⁺ citosolico. Il valore raggiunto è mediamente di circa 1.1 µM, con valori solitamente compresi tra 0.75 e oltre 3 µM (Fig. 3.12A e 3.12B). In seguito, la discesa risulta meno repentina rispetto a quella del sale, comportando un intervallo di tempo più lungo per ritornare a concentrazioni basali. Negli individui mutanti, le curve medie risultano lievemente inferiori a quelle del wild type e mostrano una variabilità minore di concentrazioni al picco (Fig. 3.12A e 3.12B), come anche il picco medio raggiunto nel medesimo intervallo di tempo (1 µM in circa 5 minuti dopo l'immissione dello stimolo). La distribuzione dei valori è più contenuta rispetto a quella del wild type (Fig. 3.12B) e sembrerebbe esserci un lieve ritardo significativo nella risposta (Fig. 3.12C). Queste differenze, seppur lievi, risultano essere significative e sono concentrate prevalentemente nella fase 1 contenente il picco (p= 0.007 per il picco massimo, p= 0.011 per l'integrale della fase 1), mentre nella fase successiva l'andamento delle curve risulta del tutto simile.

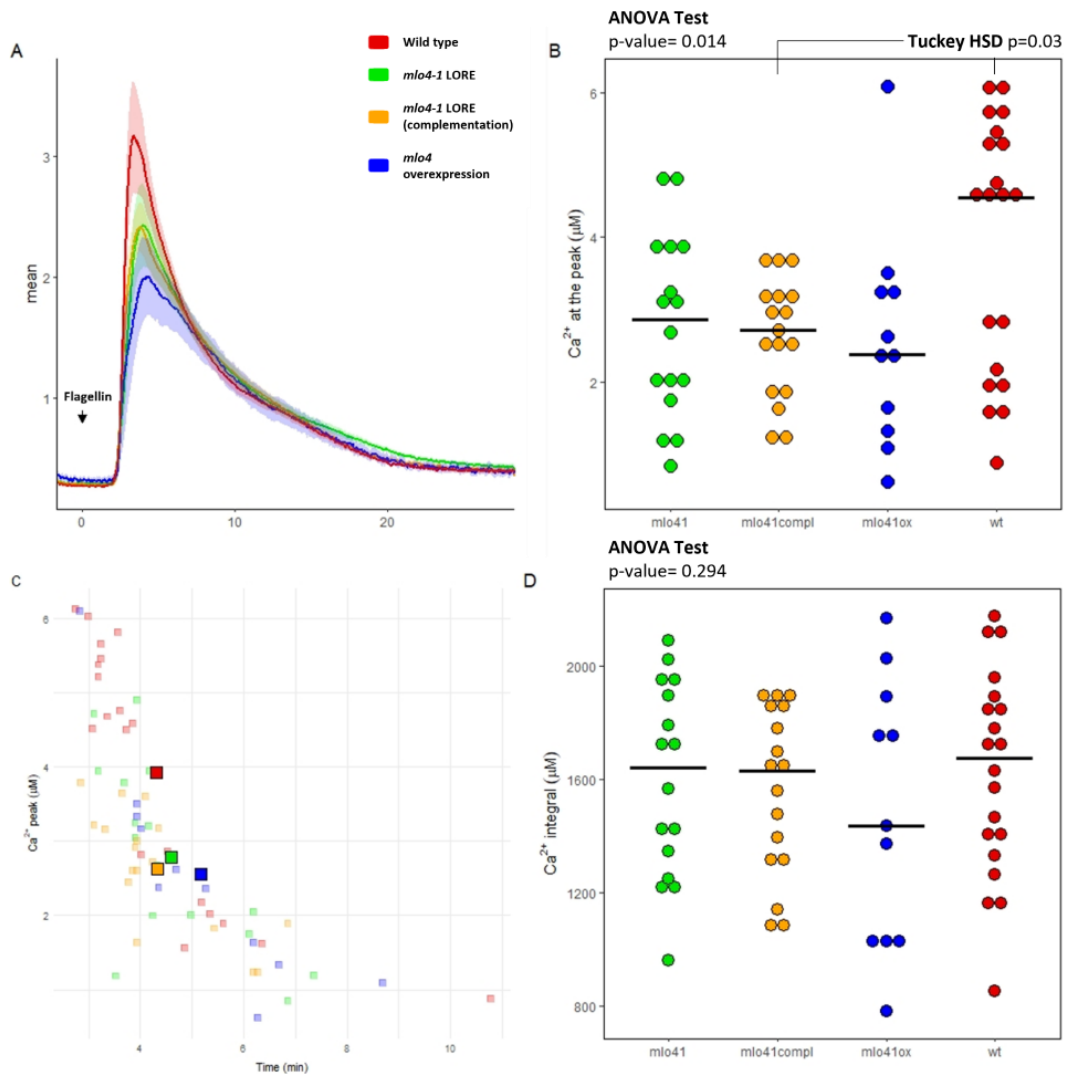


Figura 3.13: Variazioni della concentrazione di Ca²⁺ citosolico in seguito a stimolo con flagellina 10⁻⁷ M. A) Curve medie della variazione di Ca²⁺ citosolico. B) Concentrazioni di Ca²⁺ registrate nel picco dei singoli campioni. C) Distribuzione temporale dei picchi massimi medi e dei singoli campioni. D) Integrali delle curve di variazione.

Analogamente allo stimolo simbiotico benefico, anche per lo stimolo immunitario (flagellina 10⁻⁷ M) la durata delle misurazioni è stata di trenta minuti. Negli individui wild type il picco medio massimo raggiunge 3 µM dopo circa quattro minuti dall'iniezione dello stimolo (Fig. 3.13A), con picchi massimi che spaziano da meno di 1 µM fino a oltre 6 µM (Fig. 3.13B). I mutanti presentano invece un picco medio lievemente più basso (circa 2 µM) raggiunto mediamente dopo 4 minuti e 30 secondi (Fig. 3.13A). I massimi di ogni singola misurazione presentano una variabilità più contenuta in confronto al wild type, pur partendo da circa gli stessi valori minimi (Fig. 3.13B). Mutanti complementati con *MLO4* presentano una curva media pressoché identica a quella dei *mlo4-1* LORE, ma presentano una variabilità del picco massimo ben più limitata rispetto ad essi,

suggerendo che il costrutto per la complementazione potrebbe non essere efficace (Fig. 3.13B). Nella sovraespressione di *MLO4* si osserva il picco medio più basso (poco oltre i 2 μM dopo 4 minuti e 30 secondi, Fig. 3.13C), nonostante sia comunque comparabile a quello delle altre due curve mutanti. La variabilità dei picchi registrati, tuttavia, risulta più ampia di quelli dei wild type, spaziando da meno di 0.5 μM fino a oltre i 6 μM di Ca^{2+} citosolico (Fig. 3.13B). In questo senso la sovraespressione del gene sembra aver indebolito la risposta allo stimolo patogeno. Le differenze osservate tra wild type e mutanti, seppur evidenti, risultano generalmente deboli e non presentano significatività statistica.

Alla luce dei risultati ottenuti, *MLO4* non sembra essere un canale essenziale per la trasduzione degli stimoli abiotici e biotici utilizzati. *MLO4* sembra non essere il componente essenziale del lento pathway di segnalazione simbiotica; tuttavia, potrebbe avere un ruolo modulatorio nella veloce risposta citosolica del Ca^{2+} suscitata da molecole fungine e batteriche che è solitamente associata con la risposta immunitaria della pianta.

3.9 Mutanti *mlo4-1* LORE mostrano una minor produzione di radici laterali anche in risposta ad auxina esogena

Precedenti lavori nel laboratorio dove ho svolto il mio periodo di tesi hanno messo in evidenza che lo sviluppo laterale è aberrante in mutanti *mlo4-1* rispetto a piante wild-type e questo dato sembra anche supportato dall'attivazione del promotore di *MLO4* a livello dei bozzi delle radici laterali (vedi Fig. 3.10). Nello specifico, mutanti *mlo4-1* presentano una ridotta formazione di radici laterali in piastra. Per verificare se questo fenotipo fosse collegato alla via di segnalazione dell'auxina, un fitormone noto per avere un ruolo nella regolazione dello sviluppo radicale (Du *et al.*, 2018). A tale scopo, individui wild type e *mlo4-1* LORE sono stati sottoposti a un trattamento con auxina (10 μM) in piastre quadrate con Long Ashton solido con 200 μM di fosfato e il loro sviluppo radicale è stato monitorato effettuando periodicamente delle scansioni su un pannello retroilluminato. Le scansioni sono poi state convertite in binario e analizzate su Root Image Analysis e SmartRoot (plugins per (Fiji Is Just) ImageJ).

Le radici di *mlo4-1* LORE presentano una ridotta produzione di radici laterali nel tempo rispetto a quello osservato nel wild type (Fig. 3.14). Questo è stato osservato sia nel trattamento di controllo sia nel trattamento con l'auxina.

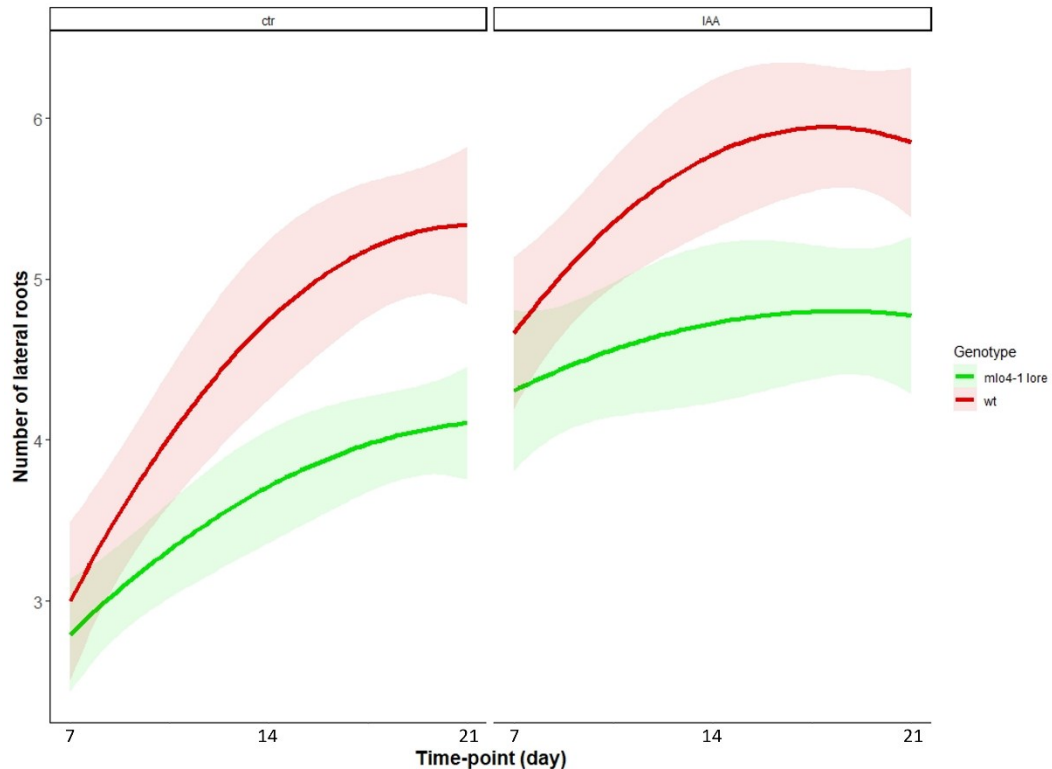


Figura 3.14: Curve di crescita del numero di radici laterali nel tempo. Individui wild type sviluppano un numero di radici laterali più elevato e in minor tempo rispetto ai mutanti e in entrambi i trattamenti. Le differenze non presentano significatività.

Osservando più nel dettaglio, dopo sette giorni di trattamento individui sia wild type che *mlo4-1* LORE trattati con auxina presentano un aumento nel numero di radici laterali rispetto al controllo anche se tra mutanti e wild type non si osservano differenze significative (Fig. 3.15A). Nel time point successivo (14 giorni, Fig. 3.15B) i mutanti presentano una differenza più marcata, supportata statisticamente, rispetto al time point precedente. I mutanti infatti mostrano un minor numero di radici laterali per entrambi i trattamenti e la distribuzione dei dati sembra essere del tutto paragonabile a quella dei wild type sottoposti allo stesso trattamento. Questa differenza risulta significativa per entrambi i trattamenti ($p < 0,05$ per il trattamento di controllo, $p \leq 0.01$ per il trattamento con l'auxina). Risultati simili sono osservabili anche per l'ultimo time point (21 giorni, Fig. 3.15C). Tra wild type e *mlo4-1* LORE esiste ancora una marcata differenza significativa ($p < 0.01$ per il trattamento di controllo e $p < 0.05$ per il trattamento con auxina), in cui gli individui *mlo4-1* LORE formano un minor numero di radici laterali in entrambi i trattamenti, formando uno slittamento tra le due distribuzioni di dati osservate nonostante esse siano simili tra loro.

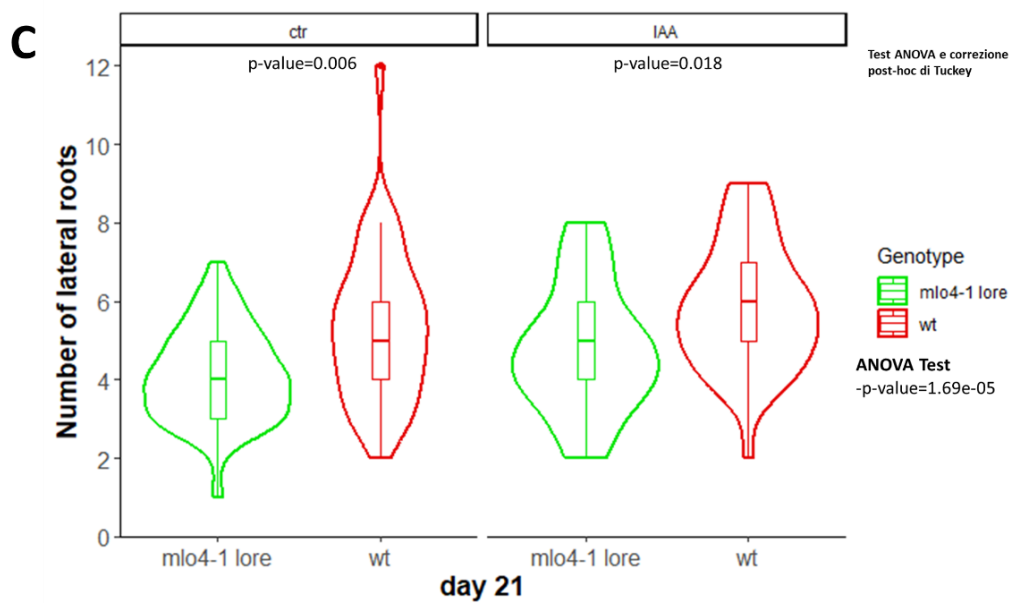
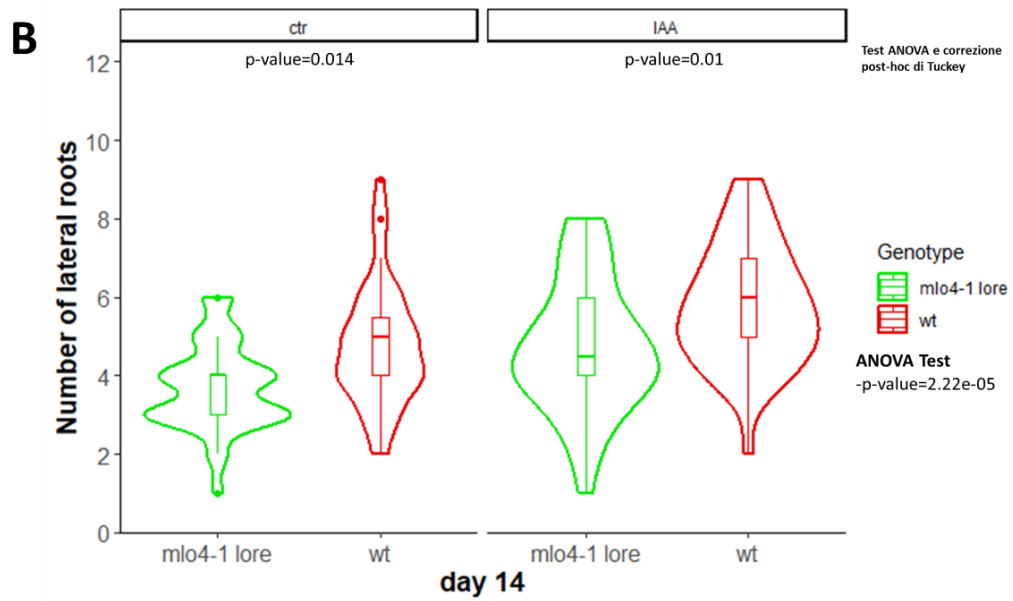
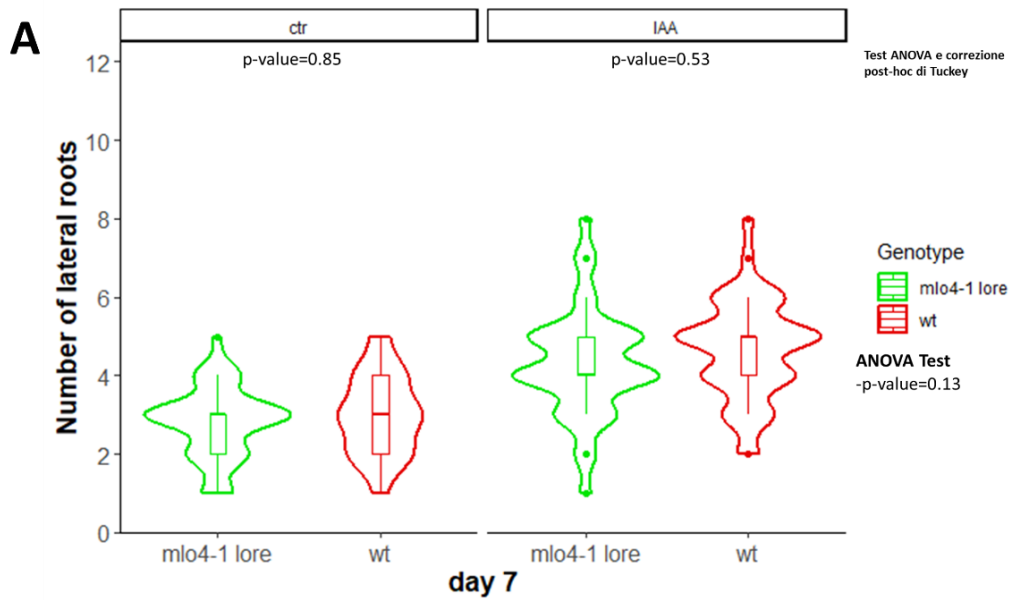


Figura 3.15: **A)** Numero di radici laterali dopo 7 giorni dall'inizio del trattamento. **B)** Numero di radici laterali dopo 14 giorni dall'inizio del trattamento. **C)** Numero di radici laterali dopo 21 giorni dall'inizio del trattamento. Tutte le distribuzioni di dati sono state riportate come boxplot, in cui ogni punto rappresenta un apparato radicale. Per ogni time point l'analisi statistica è stata effettuata tramite test ANOVA, seguito da correzione di Tukey per i confronti a coppie.

È stata eseguita un'analisi ulteriore sulle scansioni con il software SmartRoot e sono state ottenute la lunghezza della radice primaria e il numero delle radici laterali per il primo time point per il trattamento con l'auxina, e il secondo time point per il trattamento con l'auxina e per il trattamento di controllo (lo studio di altri time points per entrambi i trattamenti è attualmente in corso). A partire da questi dati è stato calcolato il rapporto del numero di radici laterali per centimetro di radice primaria.

Nel time point 0 (Fig. 3.16) gli individui *mlo4-1* LORE presentano una lunghezza della radice primaria inferiore in confronto al wild type, come anche il rapporto di radici laterali per cm. Questa differenza risulta significativa per la lunghezza assoluta della radice ($p < 0.01$) e vicina alla soglia di significatività nel caso del rapporto radici laterali per centimetro di radice primaria ($p > 0.05$). Nel time point successivo, nel trattamento con auxina (giorno 7, Fig. 3.16), la differenza nella lunghezza della radice primaria si assottiglia, e i mutanti *mlo4-1* LORE superano gli individui wild type quanto al rapporto radici laterali per centimetro di radice primaria, differenza che tuttavia non è supportata statisticamente. Infine, riguardo al trattamento di controllo per il medesimo time point, i mutanti presentano una lunghezza della radice primaria lievemente maggiore dei wild type, mentre riguardo al rapporto radici laterali per centimetro di radice primaria essi si attestano al di sotto dei wild type in modo non significativo, anche se questa differenza risulta prossima alla soglia di significatività ($p = 0.0686$).

I risultati di questa analisi confermano che *MLO4* ha un ruolo nella regolazione dello sviluppo radicale di piante di *L. japonicus*. Oltre al ruolo nella produzione di radici laterali, questi dati mostrano che anche la lunghezza primaria della radice è influenzata dall'assenza di *MLO4*. Il trattamento con auxina, fitormone che normalmente promuove lo sviluppo di radici laterali, ha mostrato come le radici dei mutanti *mlo4* rispondano al trattamento come le piante wt, ma senza azzerare la differenza tra i due genotipi.

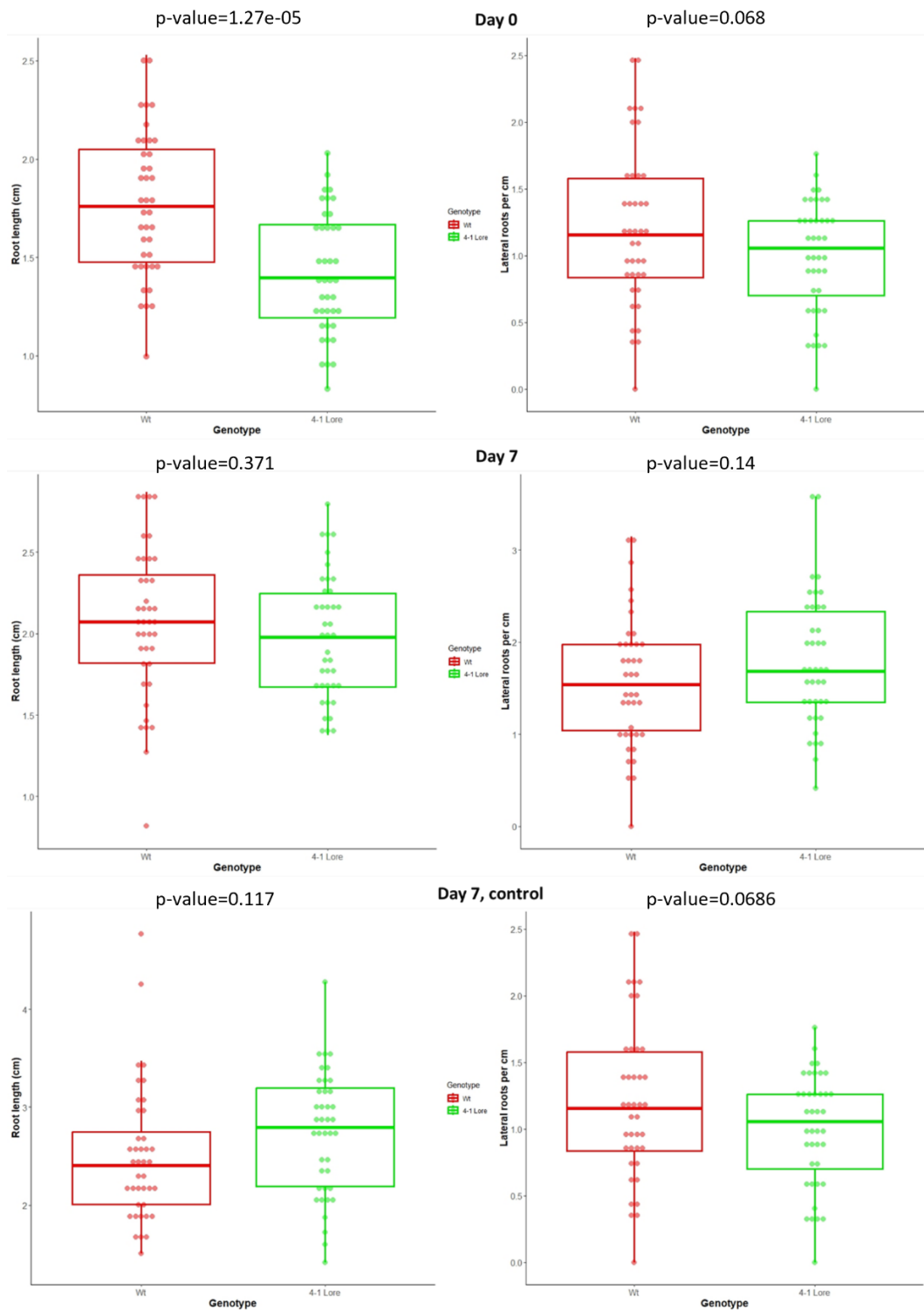


Figura 3.16: Lunghezza della radice primaria (in cm) e numero di radici laterali per centimetro in wild type e *mlo4-1* LORE ai time points 0 (trattamento con auxina esogena) e 7 (sia trattamento con auxina esogena sia trattamento di controllo). Le distribuzioni dei dati sono state riportate come boxplot e l'analisi statistica è stata effettuata mediante test ANOVA seguito da correzione di Tukey per i confronti a coppie.

4. DISCUSSIONE

La simbiosi micorrizica arbuscolare è una delle interazioni simbiotiche più antiche del pianeta Terra e riguarda la quasi totalità delle piante conosciute e funghi appartenenti al sub-phylum Glomeromycotina. È una simbiosi mutualistica incredibilmente importante sia per la pianta che per il fungo, poiché ognuno dei due organismi fornisce all'altro sostanze di primaria importanza per la sopravvivenza e per la crescita. La pianta riceve dal partner fungino l'approvvigionamento di nutrienti minerali (prevalentemente dello ione fosfato), ricavati dal suolo dalle ife fungine extraradicali e consegnato direttamente alla cellula vegetale tramite la tipica struttura intracellulare che prende il nome di arbuscolo. In cambio la pianta assicura al fungo simbiote una parte consistente dei suoi fotosintati, quali zuccheri semplici e lipidi, che sono fondamentali per il suo sviluppo, essendo i funghi micorrizici arbuscolari degli endosimbionti obbligati. Stabilire una simbiosi di questo tipo è un compito complesso, che richiede numerosi passaggi sia per il riconoscimento dei due organismi sia per lo sviluppo di strutture morfologiche specifiche, frutto della coevoluzione durata milioni di anni tra ospite e simbiote. In questo processo, si è delineato un insieme di geni fondamentali per l'instaurazione di simbiosi con microrganismi del suolo e, nello stesso tempo, dei sistemi di difesa contro organismi patogeni. Alcuni di questi patogeni, tuttavia, hanno sviluppato strategie per aggirare le difese dell'ospite e sfruttare a proprio vantaggio gli stessi processi necessari per la crescita del simbiote benefico all'interno dell'ospite. Il silenziamento o l'assenza di geni di questo tipo, detti geni di suscettibilità, da una parte portano alla resistenza ai microrganismi patogeni che sfruttano questa strategia per l'infezione ma dall'altra possono portare a una compromissione di processi fisiologici nella pianta o dell'instaurarsi delle simbiosi mutualistiche. I geni *MLO* (*Mildew Locus O*) sono stati scoperti per la prima volta in varietà di orzo resistenti all'infezione di *Blumeria graminis*, fungo parassita che provoca il cosiddetto "mal bianco". Queste varietà di orzo, non disponendo più del gene di suscettibilità, risultano infatti resistenti all'infezione, al prezzo di una ridimensionata crescita della pianta e dell'alterazione non ben definita della simbiosi micorrizica arbuscolare. La famiglia di geni *MLO* è diversificata in sette cladi differenti in cui ognuno di essi è deputato a una funzione differente. Questi geni sono infatti coinvolti anche nello sviluppo del tubetto pollinico e la tigmomorfogenesi radicale, processi che insieme alla micorrizzazione e all'infezione di *Blumeria graminis* condividono la percezione di uno stimolo fisico esterno. È stato visto che la proteina codificata da *MLO* è una proteina dotata di sette eliche transmembrana e un dominio legante la calmodulina (Jacott *et al.*, 2021), caratteristica che suggerisce il coinvolgimento nella segnalazione tramite variazioni transienti di Ca^{2+} (successivamente confermata da Zhang *et al.*, 2022). Questo tipo di segnalazione è un processo fondamentale che permette alla pianta di percepire stress biotici e abiotici e mettere in atto contromisure per far fronte alla perturbazione. Il ruolo svolto da *MLO* nello

sviluppo della simbiosi micorrizica arbuscolare, nonostante gli studi effettuati, non risulta ancora chiaro e ben definito dal momento che lo studio delle fasi precoci e tardive della simbiosi hanno dato risultati ambivalenti (Hilbert *et al.*, 2020, Jacott *et al.*, 2020). La presente tesi si è concentrata sullo studio del gene *MLO4* nella leguminosa modello *Lotus japonicus* nella simbiosi micorrizica arbuscolare, avvalendosi di mutanti dotati di inserzione inattivante LORE1 in punti specifici della sequenza codificante. Lo scopo del lavoro consiste nel delineare a tutto tondo il ruolo del gene, per cui sono state eseguite l'analisi fenotipica dei mutanti in seguito a test di micorrizzazione a tempi lunghi, lo studio dell'attività del promotore del gene e l'attività della proteina espressa nell'ambito della segnalazione cellulare tramite ione Ca^{2+} .

4.1 L'inattivazione di *MLO4* aumenta la colonizzazione nelle fasi avanzate della simbiosi?

Gran parte del lavoro di tesi si è incentrato sull'analisi della micorrizzazione e dei suoi effetti fisiologici in piante wt e mutanti per il gene *MLO4* in seguito a una co-coltivazione con il fungo micorrizico *R. irregularis* per 7 settimane. L'obiettivo di questa procedura è stato di analizzare il fenotipo mutante e di confrontarlo con quello degli individui wild type, in modo tale da identificare eventuali variazioni che potessero dare maggiori informazioni sui processi simbiotici in cui *MLO4* è coinvolto. In letteratura inoltre è stato osservato che *MLO4* è implicato sia nelle fasi iniziali della simbiosi, in cui è stata riscontrata una colonizzazione più lenta rispetto al wild type (Jacott *et al.*, 2020), sia nelle fasi avanzate, in cui è stata osservata una maggior abbondanza di ife e arbuscoli e una maggior intensità (Hilbert *et al.*, 2020). Il test di micorrizzazione a tempi lunghi, quindi, è stato necessario per esaminare attentamente le fasi avanzate dell'interazione. L'analisi ha preso in considerazione numerose caratteristiche fenotipiche quali peso fresco di radici, fusto e foglie, l'accumulo di fosfato in triplette fogliari giovani, la quantificazione della colonizzazione e l'analisi qualitativa della struttura arbuscolare in seguito alla coltivazione insieme al fungo simbiotico dopo oltre tre settimane. Il tempo prolungato di crescita, tuttavia, sembra aver giocato a sfavore nell'individuare differenze marcate tra le linee mutanti. Nell'accumulo di biomassa sono state osservate lievi differenze prive di significatività rispetto al wild type, le quali potrebbero essere imputabili al lungo tempo di crescita insieme al fungo che ha portato ad una colonizzazione pressoché totale dell'apparato radicale, operando quindi una minimizzazione delle possibili differenze.

Un altro aspetto che sembrerebbe dare conferma allo shift nello sviluppo della simbiosi è dato dalla quantificazione della colonizzazione. Il test Trouvelot ha rivelato infatti che mutanti *mlo4-1* LORE, in cui il gene è totalmente silenziato, presentano un leggero aumento nell'abbondanza degli arbuscoli. Questa lieve differenza sembrerebbe essere in accordo con gli esiti di Hilbert *et al.*, 2020 (nello studio è riportata infatti anche una

maggior intensità di micorrizzazione), e sembrerebbe in linea con lo “shift” di sviluppo provocato dall’inattivazione del gene. Queste osservazioni potrebbero essere spiegate da un ritardo nell’inizio della simbiosi e da un’alterazione nel processo di senescenza arbuscolare, il quale normalmente consente alla pianta di controllare in maniera attiva il grado di colonizzazione dell’apparato radicale. *MLO4* potrebbe quindi essere parte integrante dei processi che portano alla senescenza arbuscolare. In questo modo l’inattivazione del gene potrebbe indebolire e ritardare la disgregazione degli arbuscoli, i quali, nelle fasi avanzate della micorrizzazione, sarebbero degradati meno velocemente rispetto al wild type, comportando una loro maggior abbondanza nei mutanti. Coerentemente con questa ipotesi, è stata vista una tendenza ad accumulare maggior fosfato a livello fogliare per gli stessi mutanti che presentavano una maggior micorrizzazione, e questo andrebbe perciò a confermare che la funzionalità dell’arbuscolo in termini di scambio di sostanze nutritive non è influenzata dall’inattivazione di *MLO4*. A supporto di ciò, l’osservazione al microscopio confocale sembra non aver rivelato differenze qualitative nel fenotipo arbuscolare, segno che *MLO4* non è coinvolto nello sviluppo della morfologia tipica dell’arbuscolo.

A supporto del ruolo di *MLO4* nello sviluppo della simbiosi AM, il saggio biochimico GUS ha mostrato come il promotore di *MLO4* sia particolarmente attivo in cellule corticali che ospitano strutture fungine. È stato riscontrato infatti che le cellule contenenti arbuscoli presentano anche una forte espressione di *MLO4*, molto probabilmente indotta dall’instaurazione della simbiosi con il fungo. La rimozione della sequenza AWbox dalla regione promotoriale sembra aver influenzato negativamente l’attività del promotore di *MLO4*, e per giunta solamente in radici micorrizzate (in radici non micorrizzate l’espressione è chiaramente visibile). Questo esito potrebbe essere interpretato come una mancata attivazione del gene da parte dei fattori di trascrizione WRINKLED, che regolano geni coinvolti nella formazione di strutture simbiotiche e nello scambio di nutrienti con il fungo, prevalentemente acidi grassi (Kong *et al.*, 2018), a causa della rimozione del sito di riconoscimento.

In conclusione, *MLO4* svolge chiaramente un ruolo nelle cellule della radice che ospitano strutture fungine, che potrebbe essere legato al processo di senescenza degli arbuscoli. Studi futuri che prendono in considerazione la quantificazione della colonizzazione anche nella linea mutante *mlo4-3* e a diverse tempistiche potrebbero far maggior chiarezza sulla dinamica di micorrizzazione nei mutanti *mlo4* rispetto a piante wt.

4.2 *MLO4* modula i flussi della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} coinvolti nella trasduzione di molecole simbiotiche?

Sono state analizzate le firme del Ca^{2+} in risposta a stimoli abiotici e biotici tramite l'utilizzo della sonda citosolica equorina. Lo scopo di questo tipo di analisi è stato di verificare l'attività della proteina *MLO4* come canale permeabile del Ca^{2+} e le eventuali variazioni delle rispettive firme del Ca^{2+} causate dall'inattivazione di *MLO4* o, al contrario, dalla sua sovraespressione.

È stato possibile osservare solamente lievi differenze significative nel picco del transiente di Ca^{2+} in seguito a stimoli simbiotici benefici o patogenici. Questo esito indica che *MLO4* non è il componente essenziale per la segnalazione intracellulare di stimoli biotici dal momento che l'inattivazione del gene non ha minimizzato del tutto l'incremento di Ca^{2+} citosolico. *MLO4* potrebbe essere piuttosto un modulatore dei flussi di Ca^{2+} che avvengono all'interno della cellula vegetale, e la lieve riduzione dei picchi negli individui *mlo4-1* LORE potrebbe indicare che la presunta attività di modulazione delle rapide risposte di difesa attivate da flagellina o oligomeri di chitina. Secondo questo ragionamento *MLO4* sarebbe coinvolto nella segnalazione intracellulare per gli stimoli di natura biotica, benefici o patogeni, ma svolgerebbe una parte marginale nella trasduzione della percezione di questi segnali biochimici.

Sfortunatamente sia il tentativo di complementazione del mutante, che avrebbe dovuto reintrodurre il promotore e la sequenza codificante di *MLO4*, sia il tentativo di sovraespressione di *MLO4*, che avrebbe dovuto accentuare la risposta agli stimoli, sono stati diversi dall'atteso. Rispetto a wild type e mutanti sono state osservate solamente delle lievi differenze intermedie prive di significatività statistica e, in aggiunta, non sempre è stata ottenuta la modifica attesa nella firma del Ca^{2+} , per esempio con individui wild type in cui la sovraespressione ha diminuito il picco della curva anziché mantenerlo tale o aumentarlo.

È stata riscontrata una notevole varietà nelle risposte tra le diverse repliche biologiche agli stimoli utilizzati. Una spiegazione potrebbe essere ricercata nei differenti tipi cellulari che compongono la radice. Le radici analizzate sono state precedentemente prelevate sezionando le radici in regioni variabili della radice e ricostituite overnight. Una possibile spiegazione dell'ampia variabilità dei segnali Ca^{2+} potrebbe essere dovuta all'utilizzo di porzioni differenti di radici, nelle quali potrebbero essere presenti tipi cellulari differenti che rispondono con intensità differente agli stimoli immessi. Un possibile proseguimento degli studi potrebbe prendere in considerazione l'utilizzo di porzioni simili della radice così da disporre, per quanto possibile, della stessa composizione di tipi cellulari. Ulteriori sviluppi potrebbero inoltre prevedere l'utilizzo di altre sonde per il Ca^{2+} , come le sonde fluorescenti che permettono di osservare la risposta in termini di Ca^{2+} in tempo reale al livello di singola cellula.

4.3 *MLO4* influenza lo sviluppo radicale in *L. japonicus*

Oltre ad avere indagato il fenotipo simbiotico, in questo lavoro è stato caratterizzato il ruolo di *MLO4* anche in assenza del fungo micorrizico arbuscolare. I cladi che compongono la famiglia dei *MLO* sono noti per essere coinvolti in più meccanismi di sviluppo che condividono la percezione di uno stimolo fisico esterno. Ragionevolmente, sperimentazioni in assenza del fungo potrebbero rivelare ulteriori meccanismi modulati da questo gene, che, in aggiunta, potrebbero essere condivisi con la micorrizzazione.

Il monitoraggio della crescita di radici primaria e secondarie nel tempo con trattamenti a base di auxina ha mostrato che l'inattivazione di *MLO4* influenza modestamente la crescita e lo sviluppo dell'apparato radicale e la risposta fisiologica all'auxina. Le differenze che sono state riscontrate rispetto al wild type sono lievi ma statisticamente supportate, e interessano prevalentemente fasi iniziali e fasi più avanzate della crescita. Considerando anche situazioni in cui non è presente alcun partner fungino simbiotico, variazioni sia nella lunghezza assoluta della radice primaria sia nel numero delle radici laterali suggeriscono che *MLO4* sembrerebbe coinvolto in altri processi al di fuori della simbiosi, come nella risposta fisiologica all'auxina e del fenotipo radicale, seppur in misura limitata. D'altro canto, i risultati ottenuti sarebbero coerenti con analisi eseguite precedentemente nel laboratorio in cui ho svolto il mio internato di tesi, le quali avevano rivelato che mutanti *mlo4-1* LORE presentano una ridotta produzione di radici laterali rispetto al wild type. In queste analisi pregresse erano stati vagliati anche *mlo4-2* LORE e *mlo4-3* LORE, mostrando tuttavia che l'inattivazione intermedia del gene e l'inattivazione nella regione finale del gene non assicuravano la stessa variazione.

Il ruolo di *MLO4* nel modulare lo sviluppo della radice primaria e il numero di radici laterali è supportato dalla localizzazione dell'attività del promotore osservata con il saggio biochimico GUS. Nello specifico *MLO4* non è espresso esclusivamente in corrispondenza delle strutture simbiotiche fungine, ma è espresso e attivo anche nei primordi delle radici laterali e nell'apice radicale in cui ife e arbuscoli sono assenti. Campioni non micorrizzati presentano ugualmente l'espressione del gene, attivo in corrispondenza dello sviluppo di radici laterali in ognuno dei suoi stadi. Questo permette di affermare che *MLO4* non solo è indotto dall'interazione con il fungo, ma è anche coinvolto nei processi di sviluppo delle radici laterali, coerentemente con gli esiti ottenuti dal monitoraggio dello sviluppo radicale in trattamento con auxina. Seguendo tale criterio, *MLO4* potrebbe essere interpretato come un regolatore di alcuni processi intracellulari coinvolti nello sviluppo dell'architettura radicale sulla base di stimoli meccanici. Nello specifico, l'attività di *MLO4* potrebbe essere legata al contatto con le cellule della regione corticale da parte di quelle del nuovo apice radicale o al contatto con l'ifa fungina. Un ruolo del genere potrebbe quindi essere molto simile a quello svolto da altri *MLO* per la

tigmomorfogenesi radicale. In base ad essi, infatti, potrebbero avvenire delle variazioni nella segnalazione intracellulare che modificano o mantengono lo sviluppo cellulare, anche nel caso in cui interessi cellule già differenziate, come nel caso delle cellule corticali arbuscolate. L'assenza di AWbox sembra invece non influenzare l'espressione in radici non micorrizzate, suggerendo che in esse l'espressione è regolata da altri fattori, diversi da quelli coinvolti nell'attivazione del pathway simbiotico. Ricerche future potrebbero prendere in considerazione uno studio più approfondito del promotore di MLO4, chiarendone la regolazione da parte di fattori di trascrizione coinvolti nello sviluppo radicale. Alla luce di questo aspetto, *MLO4* potrebbe essere appunto una componente deputata alla percezione fisica del simbionte e alla modifica dello sviluppo per ospitare il simbionte fungino mediante la modulazione delle correnti di Ca^{2+} .

Un'ulteriore ipotesi sul meccanismo molecolare alla base del ruolo di MLO4 nello sviluppo radicale potrebbe considerare anche il coinvolgimento dei peptidi RALF. È noto che questi peptidi siano coinvolti nella regolazione dello sviluppo di radici laterali a livello delle cellule appartenenti al periciclo radicale (Murphy *et al.*, 2016) grazie alla regolazione negativa delle cellule fiancheggianti il primordio radicale. Tenendo inoltre presente è stato dimostrato che le proteine MLO mediano la cascata di segnale intracellulare mediata da Ca^{2+} attivata da peptidi RALF nella regolazione dello sviluppo del tubetto pollinico (Gao *et al.*, 2022), sarebbe plausibile l'interazione tra RALF e MLO4 nello sviluppo di radici laterali. Supponendo che il ruolo di *MLO4* nello sviluppo radicale sia più ancestrale, è plausibile ipotizzare che *MLO4* potrebbe essere stato sfruttato per la formazione della simbiosi micorrizica arbuscolare solo secondariamente, permettendo così di sfruttare una via di segnalazione già presente nella cellula vegetale.

5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

La simbiosi micorrizica arbuscolare è una delle interazioni tra organismi più antiche del pianeta Terra. Centinaia di milioni di anni di coevoluzione tra i due organismi hanno portato alla comparsa di meccanismi quantomai complessi per stabilire questa simbiosi e, nonostante i numerosi sforzi della ricerca, non sono ancora del tutto noti gli attori molecolari coinvolti. *MLO4*, un gene della famiglia dei *Mildew locus O*, noti per essere coinvolti in numerosi processi tra cui la micorrizzazione e l'infezione da parte di alcuni patogeni, sembra essere uno dei componenti chiave per lo sviluppo di questa interazione.

Nel presente lavoro di tesi sono stati indagati diversi aspetti biologici legati alla simbiosi micorrizica arbuscolare, con l'obiettivo di delineare il ruolo che il gene *MLO4* vi svolge.

La quantificazione della percentuale di colonizzazione in piante wt e mutanti *mlo4* suggerisce leggere differenze positive nei mutanti nel lungo termine, confermando parzialmente i risultati osservati in letteratura. I risultati osservati possono essere spiegati con una tardiva, se non indebolita, senescenza degli arbuscoli, mentre né la loro struttura né lo scambio di nutrienti tra i due organismi risultano compromessi. L'aggiunta di ulteriori time points potrebbe fornire maggiori informazioni sulla dinamica di micorrizzazione.

L'analisi dello sviluppo radicale mediante più tecniche ha mostrato un coinvolgimento di *MLO4* nello sviluppo di radici laterali, confermato dall'attività del promotore di *MLO4* negli abbozzi laterali in crescita, anche in assenza del fungo micorrizico. Questi esiti indicano un ruolo al di fuori della simbiosi micorrizica arbuscolare, che potrebbero condurre all'ipotesi di un successivo sfruttamento di *MLO4* per lo sviluppo di questa interazione ma anche possibili effetti indiretti sui primi stadi di colonizzazione dovuti alla crescita rallentata delle piante mutanti. D'altra parte, il promotore di *MLO4* è particolarmente indotto in cellule che ospitano funghi micorrizici e questo pattern di espressione sembra essere regolato dalla sequenza regolatrice *AWbox*, offrendo eventuali sviluppi futuri riguardanti la concatenazione con altri elementi del pathway simbiotico.

Variazioni modeste sono state riscontrate per l'attività di *MLO4* nella segnalazione cellulare con calcio citosolico. *MLO4* potrebbe avere un ruolo nella modulazione dei segnali intracellulari di Ca^{2+} attivati dalla percezione di molecole fungine e batteriche, note per attivare una risposta immunitaria nella cellula vegetale pianta. Tuttavia, a causa della variabilità nelle rilevazioni, un logico proseguimento delle indagini potrebbe prendere in considerazione l'analisi di singoli tipi cellulari radicali.

Infine, è stata ottenuta la linea mutante *mlo4-3* LORE, aprendo le possibilità a ulteriori studi.

La simbiosi micorrizica arbuscolare risulta importante per l'approvvigionamento di nutrienti della pianta e rappresenta solamente una delle molte interazioni stabilite con i microrganismi presenti nel suolo.

Queste interazioni giocano un ruolo di fondamentale importanza in campo agronomico in termini di efficienza delle agricolture e, per questo motivo, costituiscono uno dei settori in maggiore crescita nel mondo agroindustriale. La comprensione dei meccanismi molecolari e cellulari alla base della simbiosi micorrizica arbuscolare è quindi cruciale per spianare la strada ad una agricoltura più sostenibile, dove quindi ci sia un'ottimizzazione delle risorse disponibili e un investimento sulla biodiversità del suolo, per quella che si aspetta che sia una nuova green revolution.

6. BIBLIOGRAFIA

Bagyaraj, D. J., Sridhar, K. R., & Revanna, A. (2022). Arbuscular mycorrhizal fungi influence crop productivity, plant diversity, and ecosystem services. *Fungal diversity, ecology and control management* 16, 345-362.

Bidzinski P, Noir S, Shahi S, Reinstadler A, Gratkowska DM, *et al.* (2014). Physiological characterization and genetic modifiers of aberrant root thigmomorphogenesis in mutants of *Arabidopsis thaliana* MILDEW LOCUS O genes. *Plant Cell Environ* 37, 2738-2753.

Brundrett, M. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological reviews*, 79(3), 473-495.

Brundrett, M. C., & Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*, 220(4), 1108-1115.

Büschges, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, *et al.* (1997). The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *cell*, 88(5), 695-705.

Carotenuto, G., Genre, A. (2020). Fluorescent Staining of Arbuscular Mycorrhizal Structures Using Wheat Germ Agglutinin (WGA) and Propidium Iodide. In: Ferrol, N., Lanfranco, L. (eds) *Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Methods in Molecular Biology*, vol 2146

Chen, Z., Noir, S., Kwaaitaal, M., Hartmann, H. A., Wu, M. J., *et al.* (2009). Two seven-transmembrane domain MILDEW RESISTANCE LOCUS O proteins cofunction in *Arabidopsis* root thigmomorphogenesis. *The Plant Cell*, 21(7), 1972-1991.

Choi, J., Summers, W., & Paszkowski, U. (2018). Mechanisms underlying establishment of arbuscular mycorrhizal symbioses. *Annual Review of Phytopathology*, 56, 135-160.

Das, D., Paries, M., Hobecker, K., Gigl, M., Dawid, C., *et al.* (2022). PHOSPHATE STARVATION RESPONSE transcription factors enable arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Nature Communications*, 13(1), 477.

Dickson, S. (2004). The Arum-Paris continuum of mycorrhizal symbioses. *New phytologist*, 187-200.

Du, Y., & Scheres, B. (2018). Lateral root formation and the multiple roles of auxin. *Journal of Experimental Botany*, 69(2), 155-167.

Genre, A., Chabaud, M., Faccio, A., Barker, D. G., & Bonfante, P. (2008). 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*, 20(5), 1407–1420.

Gianinazzi, S., Gollotte, A., Binet, M. N., van Tuinen, D., Redecker, D., *et al.*, (2010). Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*, 20(8), 519-530.

Gao, Q., Wang, C., Xi, Y., Shao, Q., Li, L., *et al.*, (2022). A receptor–channel trio conducts Ca²⁺ signalling for pollen tube reception. *Nature*, 607(7919), 534-539.

Hilbert, M., Novero, M., Rovenich, H., Mari, S., Grimm, C., *et al.*, (2020). MLO differentially regulates barley root colonization by beneficial endophytic and mycorrhizal fungi. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1678.

Jacott, C. N., Charpentier, M., Murray, J. D., & Ridout, C. J. (2020). *Mildew Locus O* facilitates colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in angiosperms. *New Phytologist*, 227(2), 343-351.

Jacott, C. N., Ridout, C. J., & Murray, J. D. (2021). Unmasking mildew resistance locus O. *Trends in plant science*, 26(10), 1006-1013.

Jacquemyn, H., & Merckx, V. S. (2019). Mycorrhizal symbioses and the evolution of trophic modes in plants. *Journal of Ecology*, 107(4), 1567-1581.

Jiang, Y., Xie, Q., Wang, W., Yang, J., Zhang, X., *et al.*, (2018). Medicago AP2-domain transcription factor WRI5a is a master regulator of lipid biosynthesis and transfer during mycorrhizal symbiosis. *Molecular plant*, 11(11), 1344-1359.

Karst, J., Jones, M. D., & Hoeksema, J. D. (2023). Positive citation bias and overinterpreted results lead to misinformation on common mycorrhizal networks in forests. *Nature Ecology & Evolution*, 7(4), 501-511.

Kiers, E. T., Duhamel, M., Beesetty, Y., Mensah, J. A., Franken, O., *et al.*, (2011). Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science*, 333(6044), 880–882.

- Kong, Q., & Ma, W. (2018). WRINKLED1 transcription factor: How much do we know about its regulatory mechanism? *Plant Science*, 272, 153-156.
- Kusch, S., Pesch, L., & Panstruga, R. (2016). Comprehensive phylogenetic analysis sheds light on the diversity and origin of the MLO family of integral membrane proteins. *Genome Biology and Evolution*, 8(3), 878-895.
- Lampropoulos A, Sutikovic Z, Wenzl C, Maegele I, Lohmann JU, *et al.*, (2013) GreenGate - A Novel, Versatile, and Efficient Cloning System for Plant Transgenesis. *PLoS ONE* 8(12): e83043.
- Lobet, G., Pagès, L., & Draye, X. (2011). A novel image-analysis toolbox enabling quantitative analysis of root system architecture. *Plant physiology*, 157(1), 29-39.
- Lobet G, Koevoets IT, Noll M, Tocquin P, Meyer PE, *et al.*, (2017). Using a structural root system model to evaluate and improve the accuracy of root image analysis pipelines. *Front Plant Sci. Frontiers* 8.
- Małolepszy, A., Mun, T., Sandal, N., Gupta, V., Dubin, M., *et al.*, (2016). The LORE 1 insertion mutant resource. *The Plant Journal*, 88(2), 306-317.
- Meng, J. G., Liang, L., Jia, P. F., Wang, Y. C., *et al.*, (2020). Integration of ovular signals and exocytosis of a Ca²⁺ channel by MLOs in pollen tube guidance. *Nature Plants*, 6(2), 143-153.
- Mun, T., Bachmann, A., Gupta, V., Stougaard, J., & Andersen, S. U. (2016). Lotus Base: An integrated information portal for the model legume *Lotus japonicus*. *Scientific reports*, 6(1), 39447.
- Murphy, E., Vu, L. D., Van den Broeck, L., Lin, Z., Ramakrishna, P., *et al.*, (2016). RALFL34 regulates formative cell divisions in *Arabidopsis* pericycle during lateral root initiation. *Journal of Experimental Botany*, 67(16), 4863-4875.
- Pimprikar, P., & Gutjahr, C. (2018). Transcriptional regulation of arbuscular mycorrhiza development. *Plant and Cell Physiology*, 59(4), 678-695.
- Radhakrishnan, G. V., Keller, J., Rich, M. K., Vernié, T., Mbadanga *et al.*, (2020). An ancestral signalling pathway is conserved in intracellular symbioses-forming plant lineages. *Nature Plants*, 6(3), 280-289.

Remy, W., Taylor, T. N., Hass, H., & Kerp, H. (1994). Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(25), 11841-11843.

Smith, S. E., Jakobsen, I., Grønlund, M., & Smith, F. A. (2011). 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*, *156*(3), 1050-1057.

Strullu-Derrien, C., Selosse, M. A., Kenrick, P., & Martin, F. M. (2018). The origin and evolution of mycorrhizal symbioses: from palaeomycology to phylogenomics. *New Phytologist*, *220*(4), 1012-1030.

Trappe, J. M. (2005). AB Frank and mycorrhizae: the challenge to evolutionary and ecologic theory. *Mycorrhiza*, *15*, 277-281.

Udvardi, M., Parniske, M., Spink, H., Saalbach, G., Webb, J., *et al.*, (2005). *Lotus japonicus* handbook (pp. 349-355).

Udvardi, M. K., Tabata, S., Parniske, M., & Stougaard, J. (2005). *Lotus japonicus*: legume research in the fast lane. *Trends in plant science*, *10*(5), 222-228.

van Der Heijden, M. G., Martin, F. M., Selosse, M. A., & Sanders, I. R. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New phytologist*, *205*(4), 1406-1423.

van Schie, C. C., & Takken, F. L. (2014). Susceptibility genes 101: how to be a good host. *Annual review of phytopathology*, *52*, 551-581.

Wang, W., Shi, J., Xie, Q., Jiang, Y., Yu, N., *et al.*, (2017). Nutrient exchange and regulation in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Molecular plant*, *10*(9), 1147-1158.

Xue, L., Klinnawee, L., Zhou, Y., Saridis, G., Vijayakumar, V., *et al.*, (2018). AP2 transcription factor CBX1 with a specific function in symbiotic exchange of nutrients in mycorrhizal *Lotus japonicus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(39), E9239-E9246.

Zhang, Z., Sun, Y., Lu, P., Feng, C., Niu, Q., *et al.*, (2022). *Arabidopsis* MLO4 Functions as a Ca²⁺ Channel Essential for Mechanosensing in Root Tips. bioRxiv 2022.06.05.494847

www.bas.ac.uk/data/our-data/collections/geological-collections/fossils-from-the-antarctic/

<https://www2.dijon.inrae.fr/mychintec/Protocole/protoframe.html>

<https://www.gbif.org/>

<https://steurh.home.xs4all.nl/engrhyn/eaglao.html>