

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**

DOTTORATO DI RICERCA

IN

BIOLOGIA AVANZATA

Indirizzo: Sistematica Molecolare

(XIX ciclo)

Caratterizzazione di tre trasportatori dell'ammonio ad alta affinità (AMT1) nella pianta leguminosa modello *Lotus japonicus* e analisi del loro possibile ruolo nel processo di simbiosi con *Mesorhizobium loti*.

Coordinatore:

CH.MA PROF. SSA SILVANA FILOSA

Candidata:

ALESSANDRA ROGATO

Relatore:

CH.MA Prof.ssa SERENA ACETO

Correlatore:

Dott. MAURIZIO CHIURAZZI

ANNO ACCADEMICO 2005-2006

## INDICE

<b>1. Introduzione .....</b>	<b>6</b>
1.1 Ciclo dell'azoto e fissazione biologica dell'azoto	6
1.2 Trasporto dell'ammonio.	8
1.3 Struttura dei trasportatori dell'ammonio	10
1.4 Caratteristiche biochimiche dei trasportatori dell'ammonio	15
1.5 Flussi azotati nelle piante	18
1.6 Sistemi di trasporto dell'ammonio nelle piante	20
1.7 La classe di trasportatori aMT2 e analisi evolutive	26
1.8 L'azoto esterno come segnale regolativo	28
1.9 Regolazione trascrizionale dei trasportatori dell'ammonio	29
1.10 Meccanismi di regolazione post-trascrizionale delle proteine AMT	31
1.11 Il processo di simbiosi azoto fissativa	33
1.12 Riconoscimento, infezione, invasione e formazione del nodulo azoto-fissatore	35
1.13 Eventi precoci e <i>pathway</i> di trasduzione dei fattori nod	43
1.14 Noduli determinati e indeterminati	48
1.15 La nitrogenasi e il metabolismo azotato nel nodulo	51
1.16 Il meccanismo di autoregolazione	53
<b>Scopo del progetto di dottorato</b>	<b>55</b>
<b><i>Lotus japonicus</i> come sistema modello</b>	<b>58</b>

<b>2.Materiali e Metodi.....</b>	<b>60</b>
2.1 Serilizzazione dei semi di <i>Lotus japonicus</i>	60
2.2 Preparazione mezzi di coltura e condizioni di crescita	60
2.3 Composizione dei mezzi di crescita	61
2.4 Procedura di trasformazione-rigenerazione di <i>Lotus japonicus</i> mediata da <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	64
2.4.1 Procedura di trasformazione	66
2.4.2 Mezzi di crescita per la procedura di trasformazione-rigenerazione	68
2.5 Procedura di nodulazione <i>in vitro</i>	68
3.5.1 Preparazione dei batteri	68
3.5.2 Infezione	69
2.6 Trattamento delle cellule batteriche	69
2.6.1 Preparazione delle cellule competenti di <i>E.coli</i>	69
2.6.2 Trasformazione per shock termico di cellule competenti di <i>E.coli</i>	69
2.6.3 Elettroporazione	70
2.7 Descrizione dei plasmidi	71
2.7.1 Vettore PCR2.1	71
2.7.2 Vettore p-CAMBIA	72
2.7.3 plasmidi per la complementazione un lievito	75
2.8 Analisi del DNA di pianta	76
2.8.1 Estrazione del DNA da tessuto vegetale	76
2.8.2 Elettroforesi e trasferimento del DNA su filtri di nylon (Southern blot)	76
2.8.3 Preparazione di sonde radioattive	77
2.8.4 Ibridazione di DNA legati a filtri di nylon	78
2.9 RACE PCR 5' E 3'	79
2.10 REAL TIME PCR	81
2.10.1 Saggio quantitativo con la PCR REAL-TIME	81
2.10.2 Quantificazione	82
2.10.3 Sequenze dei primers utilizzate per gli esperimenti di Real Time PCR	83
2.11 Estrazione dell'RNA dal tessuto vegetale	83

2.12 Colture cellulari di pianta	84
3.12.1 Saggio di uptake del <sup>14</sup> C- Methylammonio	85
2.13 Cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC)	85
2.13.1 Protocollo per l'estrazione degli amminoacidi liberi per l'analisi HPLC	86
2.14 Saggio dell'attività nitrogenasica	87
<b>3. Risultati .....</b>	<b>88</b>
3.1 Isolamento e analisi strutturale dei geni <i>LjAMT1;2</i> e <i>LjAMT1;3</i>	88
3.2 Complementazione funzionale del mutante di lievito <i>Saccaromyces cerevisiae Δmep</i> con le sequenze <i>LjAMt1;2</i> e <i>LjAMT1;3</i>	94
3.3 Espressione differenziale dei trasportatori dell'ammonio nei maggiori organi della pianta	98
3.4 Messa a punto delle condizioni sperimentali per l'analisi di geni del metabolismo azotato in condizioni di carenza di azoto. Analisi all'HPLC di estratti proteici	100
3.5 Effetto dei nutrienti azotati sulla regolazione dei geni <i>LjAMT1</i>	103
3.6 Analisi funzionale in colture cellulari di <i>Lotus</i> del ruolo svolto dal gene <i>LjAMT1;1</i> nel trasporto dell'ammonio dal mezzo esterno	105
3.7 Regolazione localizzata o sistemica del gene <i>LjAMT1;1</i>	107
3.8 Coinvolgimento delle proteine AMT1 nel trasporto dell'ammonio prodotto dalle diverse vie metaboliche	110
3.9 Analisi del ruolo svolto tardivamente dal gene <i>LjAMT1;1</i> nel processo simbiotico	112
3.10 Saggio dell'attività della nitrogenasi	118
3.11 Ottenimento di piante esprimenti il gene <i>LjAMT1;1</i> sotto il controllo di promotori specifici delle noduline precoci <i>ENOD12</i> e <i>ENOD40</i>	120

<b>4.Discussione .....</b>	<b>124</b>
<b>5.Bibliografia .....</b>	<b>140</b>

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 CICLO DELL'AZOTO E FISSAZIONE BIOLOGICA DELL'AZOTO

L'azoto, presente in numerosi composti inorganici e organici, risulta essere un elemento fondamentale nella biochimica dei viventi oltre a costituire uno dei principali componenti delle proteine, acidi nucleici, co-enzimi e altri costituenti cellulari. Pertanto, la capacità delle cellule di un qualsiasi organismo di acquisire e assimilare azoto, è di fondamentale importanza. L'atmosfera terrestre è costituita per circa il 78% da azoto,  $N_2$ , non chimicamente reattivo e quindi utilizzabile dalla maggior parte degli esseri viventi solo dopo essere stato trasformato (fissato) in composti inorganici (per esempio, in forma di ammoniaca o di ione ammonio, di nitrati e di nitriti). Tale processo avviene in natura ad opera di micro-organismi specializzati, definiti *azotofissatori*.

I vegetali utilizzano i composti inorganici dell'azoto per produrre le molecole organiche che compongono le loro strutture ed infatti nelle piante, in un ambiente con un clima e una disponibilità di acqua che siano compatibili con la vita, l'azoto è molto spesso il fattore limitante della loro crescita e produttività.

Gli animali, invece, incapaci di utilizzare l'azoto minerale, si nutrono delle sostanze organiche azotate sintetizzate dai vegetali, soprattutto proteine. Parte dell'azoto alimentare viene da questi eliminato sotto forma di urea, acido urico o ammoniaca nelle urine e come composto semplice nelle feci. Quando gli organismi animali e vegetali muoiono, la materia organica che li compone viene distrutta da microrganismi demolitori che riportano in forma minerale le componenti azotate. L'insieme degli scambi continui che avvengono tra l'atmosfera, l'acqua, il suolo e gli organismi viventi costituisce il ciclo dell'azoto. Il ruolo svolto da alcuni batteri (nitrificanti) nel ciclo dell'azoto è quello di ossidare l'ammoniaca a nitriti (*Nitrosomonas*) e i nitriti a nitrati (*Nitrobacter*), mentre altri batteri (denitrificanti)

operano in senso opposto con la riduzione dei nitrati ad ammoniaca e in parte ad azoto molecolare (es. *Pseudomonas denitrificans*).

Come accennato precedentemente, un ruolo fondamentale, durante questo ciclo, è svolto da microrganismi specializzati, gli azoto-fissatori in grado di convertire l'azoto atmosferico ad ammonio in un processo chiamato appunto fissazione dell'azoto. Tutti gli organismi azoto-fissatori sono procarioti (es. alghe *cianofitiche* o batteri) ma le modalità di fissazione dell'azoto possono essere varie in quanto alcuni di loro vivono in forma libera mentre altri stabiliscono una intima simbiosi con piante o altri organismi.

Alcuni dei batteri "free living" in grado di fissare l'azoto atmosferico vivono comunque in stretta associazione con le radici di piante anche se non stabiliscono con esse un intimo rapporto di tipo simbiotico. E' il caso ad esempio di *Azotobacter* e *Azospirillum* che sono in grado di fissare l'azoto quando crescono nella rizosfera di diverse piante. In entrambi questi casi i batteri utilizzano per la loro crescita zuccheri o altri nutrienti che vengono liberati nel terreno dalle radici. Recentemente, è stato anche dimostrato che l'azoto fissato da questi organismi può essere trasportato all'interno della pianta che quindi può trarre un certo vantaggio da questo processo fissativo. In questi casi comunque, il contributo che questi batteri riescono a dare al soddisfacimento dei bisogni nutrizionali azotati di una pianta è estremamente ridotto, perchè la fissazione dell'azoto è un processo molto dispendioso e solo una piccola parte di nutrienti organici sono disponibili continuamente per i batteri della rizosfera. Questo tipo di limitazione viene superato nei batteri che vivono in associazione endosimbiotica con le piante come nel caso delle associazioni simbiotiche fra leguminose e *rizobi*. E' stato infatti stimato che per il normale svolgimento della fissazione dell'azoto da parte di un microorganismo, circa il 20% del fotosintato totale di una pianta leguminosa viene utilizzato per tale processo. Mediante tale associazione vengono resi disponibili 90 milioni di tonnellate di azoto organico l'anno, quasi il doppio della concentrazione di azoto derivante da sintesi e metà di tutta la fissazione biologica. L'importanza di tale processo può essere apprezzata se si pensa che il

processo industriale Haber-Bosch per sintetizzare ammonio usa circa 680 kJ mole per 1 molecola di  $\text{NH}_3$ . In confronto il complesso multienzimatico della nitrogenasi di rizobio usa *in vitro* 210 kJ mole per 1 molecola di  $\text{NH}_3$  prodotta. Questo tipo di simbiosi diminuisce quindi la necessità di aggiunta di fertilizzanti azotati al suolo, riducendo di conseguenza gli enormi costi richiesti per la loro sintesi ed i rischi ambientali legati al loro utilizzo.

## 1.2 TRASPORTO DELL'AMMONIO

Una volta che l'azoto molecolare è stato ridotto ad ammoniaca e convertito in ammonio per protonazione, diviene disponibile per essere incorporato nei composti organici.

Gli organismi viventi, hanno sviluppato sistemi finemente regolati, deputati al trasporto dell'ammonio dall'esterno all'interno delle cellula e dei diversi compartimenti cellulari. Questo tipo di funzione è svolta dai trasportatori dell'ammonio (AMT) appartenenti ad una famiglia di proteine transmembrana, evolutivamente conservate, ubiquitarie presenti nei batteri, nei funghi, nelle piante e negli animali, compreso l'uomo.

In molti organismi, in particolare batteri e microrganismi eucariotici, oltre al trasporto dell'ammonio dal mezzo esterno, le proteine AMT sono anche coinvolte nel recupero dell'ammonio perso dalle cellule per diffusione attraverso le membrane cellulari. Inoltre, tali proteine possono giocare un ruolo cruciale anche in altre funzioni come ad esempio il sensing delle condizioni azotate di un mezzo di crescita. Sono noti casi in cui i micro-organismi manifestano un chemio attrattismo nei confronti dei componenti azotati, la cui concentrazione è in grado di influenzare e controllare processi di organogenesi, come ad esempio lo sviluppo delle pseudoife in *Saccharomyces cerevisiae* (Marini *et al.* 1999). Questa risposta di tipo morfologico è controllata da due segnali tra loro collegati, in uno dei quali sono coinvolti il trasportatore Mep2 di lievito e la subunità  $\alpha$ - della proteina G, GPA2.

In condizioni di crescita in carenza di azoto, il mutante *mep2* non è in grado di formare le pseudoife e la proteina GPA2 non è attiva; riattivando la proteina G comunque non si osserva un recupero del fenotipo di crescita e questo dimostra che *mep2* agisce a monte di GPA2 e svolge una funzione di sensore delle condizioni limitanti di crescita, con conseguente effetto sulla formazione delle pseudoife.

Nelle piante, i trasportatori contribuiscono attivamente alla nutrizione azotata, e come nei batteri, sono presumibilmente implicati nel trasporto dell'ammonio dal mezzo esterno all'interno delle cellule e attraverso le membrane dei diversi organelli cellulari (Merrick 2004).

Negli animali, i trasportatori AMT sono rappresentati dalle proteine Rhesus (Rh) (Marini *et al.* 2000), e negli esseri umani gli omologhi delle proteine Rh sono espresse sulla membrana degli eritrociti (Eyers *et al.* 1994), dei reni, del fegato e della pelle (Quentin *et al.* 2003).

La prima ipotesi dell'esistenza di trasportatori attivi dell'ammonio fu avanzata nel 1970 nel fungo *Penicillium chrysogenum* e da allora l'evidenza dell'esistenza di *carriers* dell'ammonio è stata riportata in una vasta gamma di organismi, soprattutto batteri.

Studi successivi, effettuati su numerosi organismi, hanno suggerito la presenza di più di un sistema deputato al trasporto dell' $\text{NH}_4^+$ , ma solo nel 1994 furono effettivamente isolati i primi due geni codificanti per proteine in grado di trasportare l' $\text{NH}_4^+$ /Metilammonio. Il primo nel lievito *Saccharomyces cerevisiae*, denominato *mep1* (methilammonium permease), l'altro nella pianta modello *Arabidopsis thaliana*, *AtAMT1*.

L'identificazione di questi primi geni fu facilitata dalla possibilità di complementare un mutante di *S. cerevisiae*, difettivo nel trasporto dell'ammonio, con crescita molto lenta in un mezzo minimo contenente come unica fonte di azoto 1mM  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ .

Gli studi effettuati nell'ultimo decennio hanno consentito l'isolamento di molti altri geni codificanti per altre proteine AMT in lieviti, piante e animali.

Tutte queste proteine, caratterizzate per la loro specificità nel trasporto dell'ammonio/metilammonio, sono state raggruppate in un'unica famiglia denominata AMT1.

### 1.3 STRUTTURA DEI TRASPORTATORI DELL'AMMONIO

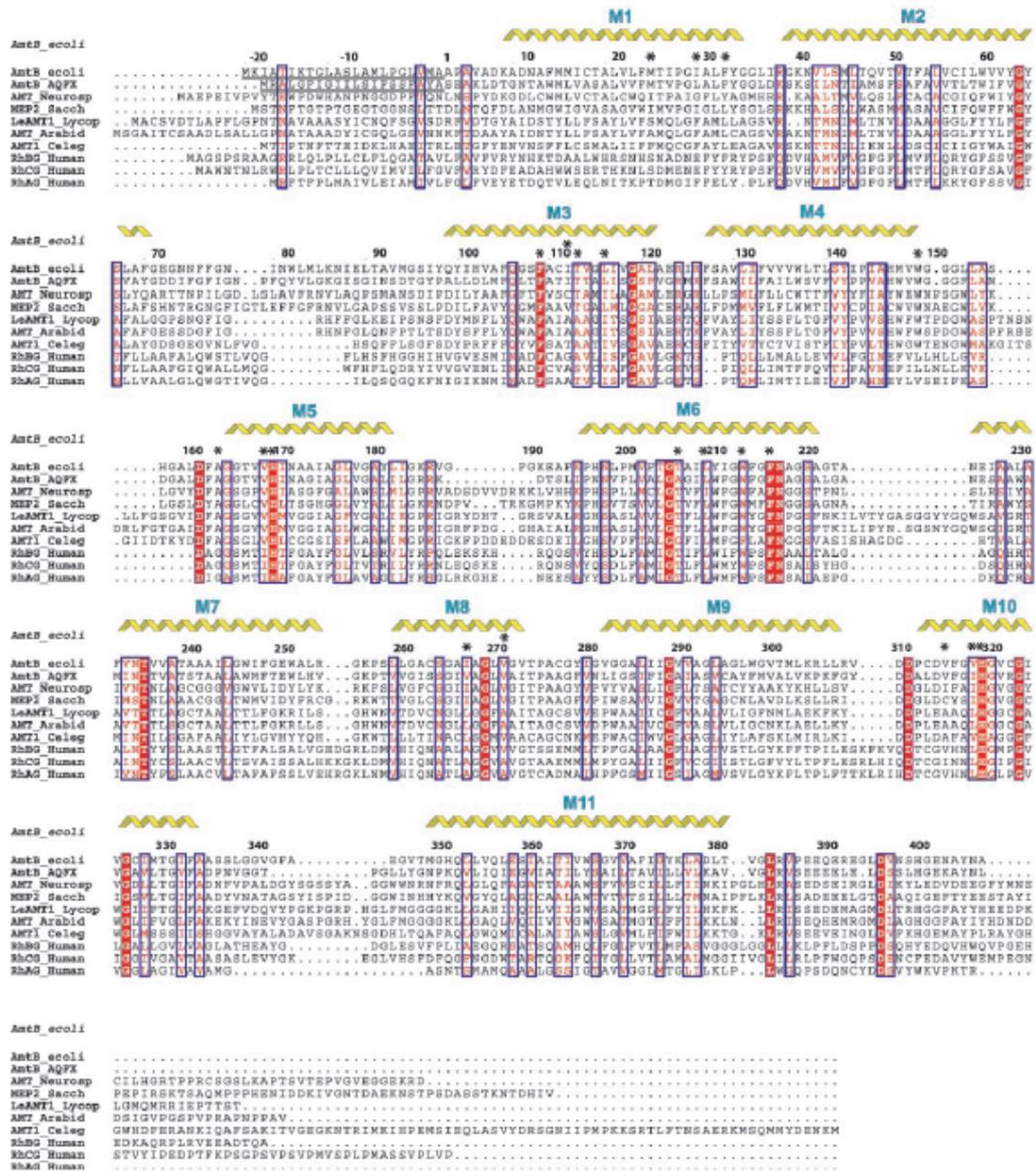
Analisi informatiche sulle prime sequenze clonate hanno rivelato che i trasportatori dell'ammonio sono proteine integrali di membrana altamente idrofobiche con massa molecolare compresa tra i 50-55 kDa.

Inoltre, tali analisi rivelarono la presenza di 9-12 putative regioni trans-membrana. Un dettagliato studio di AmtB di *E. coli*, attraverso fusioni tra la proteina AmtB e le proteine reporter, fosfatasi alcalina (attiva nel periplasma) e  $\beta$ -galattosidasi (attiva nel citoplasma) ha consentito di concludere che la proteina contiene 12 eliche trans-membrana con le estremità amino e carbossi terminali, entrambe localizzate nel citoplasma (Thomas *et al.* 2000).

Molteplici allineamenti di sequenza, sulle sequenze di altre proteine AMT, hanno invece rilevato come molte di queste, ad esempio, Mep2 di *S. cerevisiae* o AMT1;1 di *A. thaliana*, siano formate da 11 domini transmembrana con l'estremità N terminale extra-citoplasmatica.

Le apparenti differenze tra le proteine AMT isolate nelle diverse specie sono state chiarite recentemente grazie alla purificazione della proteina AmtB di *E.coli*.

I recenti lavori infatti dimostrano come la prima elica transmembrana di AmtB sia una sequenza segnale, che viene successivamente tagliata, formando così una proteina matura con 11 eliche trans-membrana, l'estremità amino terminale extra-citoplasmatica e quella carbossilica citoplasmatica (Von Wirén and Merrick, 2004). Questa struttura a 11 eliche è perciò caratteristica delle proteine Amt di batteri, funghi e piante, mentre le proteine Rh degli animali, sono costituite da 12 eliche (Eyers *et al.* 1994). Gli allineamenti delle sequenze, mostrano come queste proteine conservino comunque un'elevata identità amminoacidica nei diversi regni (Figura 1) (Merrick *et al.* 2004).



**Figura 1** Allineamenti delle sequenze amminoacidiche di AMT, Mep, Rh. Gli amminoacidi conservati sono in bianco evidenziati in rosso, quelli simili sono scritti in rosso nel rettangolo blu. Le undici eliche transmembrana sono evidenziate e numerate da M1 a M11. Le sequenze segnale di *E. coli* e *A. aeolicus* sono sottolineate (Stroud *et al.* Science 2004).

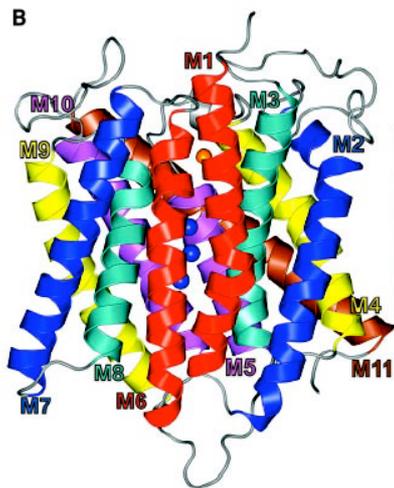
La proteina AmtB, purificata in soluzione detergente, è un complesso omotrimerico con peso molecolare di 135 kDa (Blakey *et al.* 2002, Zengh *et al.* 2004), come mostrato nelle figure 2 e 3.

Evidenze biochimiche e genetiche indicano che anche le proteine AMT1 di funghi e piante formano complessi oligomerici (Marini and Andre 2000, Monahan *et al.* 2002; Ludewig *et al.* 2003). Queste evidenze sono date dall'analisi di mutanti Amt, nell'estremità carbossi-terminale. L'estremità può contenere da un minimo di 30 a un massimo di 150 residui altamente conservati, a seconda delle diverse specie. In *S. cerevisiae* sono stati analizzati mutanti con una completa delezione del gene *MEP2*, una copia *wild type* del gene *MEP3* e una singola mutazione puntiforme dell'estremità carbossilica nel gene *MEP1* che converte la glicina in posizione 412 in aspartato. Questa mutazione è trans-dominante ed è in grado di inibire l'attività di *MEP3*, causando un difetto nel trasporto dell'ammonio (Marini *et al.* 2000). Una mutazione equivalente è stata anche indotta in un gene per il trasporto dell'ammonio di *A. nidulans*, *MeaA*; anche in questo caso, la mutazione trans-dominante inibisce il funzionamento della copia *wild type* (Monahan *et al.* 2002). I risultati suggeriscono quindi, che tra i monomeri delle proteine Amt di questi organismi ci sia un'interazione mediata proprio dall'estremità carbossi terminale. Un equivalente scambio di amminoacidi, dato dalla mutazione della glicina G458D, nel trasportatore di pomodoro *LeAMT1;1*, causa perdita di funzione quando il gene viene espresso in sistemi eterologhi quali lievito e oociti di *Xenopus* (Ludewig *et al.* 2003).

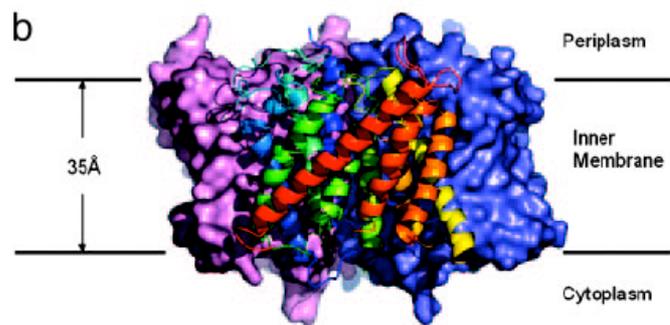
La co-espressione in oociti della proteina mutata con la copia *wild type*, provoca un'inibizione di tipo dominante negativo del trasporto dell'ammonio, evidenziando come anche le proteine di pianta siano in grado di etero-dimerizzare. Resta comunque ancora da dimostrare se tale etero-dimerizzazione avviene *in vivo* nella pianta e se tale proprietà riflette un meccanismo di regolazione dell'attività dei trasportatori.

Gli esperimenti fatti in *E. coli* e *Aquifex aeolicus*, in cui la regione citoplasmatica viene tagliata, mostrano che in entrambi i casi le proteine riducono

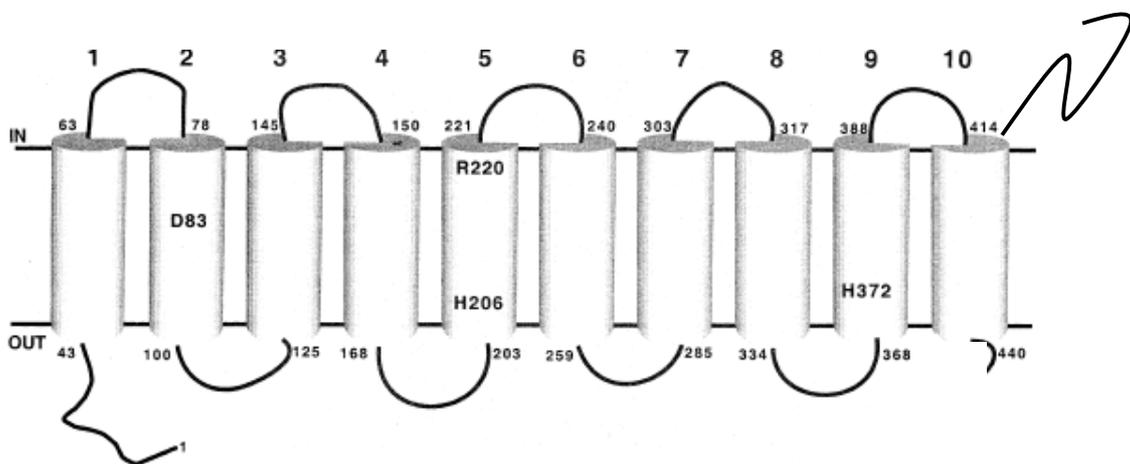
solo del 25% la loro capacità di trasporto del metilammonio, dato che dimostra come l'estremità carbossi-terminale non è essenziale per la funzione di trasporto attivo (Coutts *et al.* 2002, Soupene *et al.* 2002). Altri residui amminoacidici conservati in specifiche posizioni nelle diverse proteine AMT (Figura 4), potrebbero svolgere un importante ruolo nel funzionamento stesso della proteina. Ad esempio, nella regione maggiormente conservata, tra l'elica 5 e la 6 sono stati localizzati due residui amminoacidici carichi, H206 e R220, che potrebbero risultare importanti per la struttura ed il funzionamento della proteina. Tra i membri della famiglia AMT1 di pianta sono stati individuati altri due amminoacidi molto conservati, D83 e H372, probabilmente anch'essi importanti per il funzionamento. L'amminoacido Q137 risulta essere conservato in tutti i membri della famiglia AMT1 e potrebbe essere coinvolto nelle interazioni spaziali tra le eliche transmembrana. In letteratura sono riportati alcuni esempi in cui si dimostra come singole mutazioni puntiformi siano in grado di alterare il corretto funzionamento dei trasportatori dell'ammonio, come ad esempio in MeaA di *A. nidulans* e in *LjAMT1;1* di *Lotus japonicus* (Monahan *et al.* 2002, Salvemini *et al.* 2001).



**Figura 2.** Visione tridimensionale del monomero di AmtB di *E. coli*  
Khademi *et al.*, Science 2004



**Figura 3:** Visione frontale della struttura dell'omotrimerico AmB di *E. coli*  
Zheng *et al.*, PNAS 2004



**Figura 4.** Struttura dei trasportatori dell'ammonio di pianta in cui sono evidenziati i residui amminoacidici conservati (Udvardi *et al.* Elsevier Science, 2000).

## 1.4 CARATTERISTICHE BIOCHIMICHE DEI TRASPORTATORI DELL'AMMONIO E MECCANISMO DI TRASPORTO

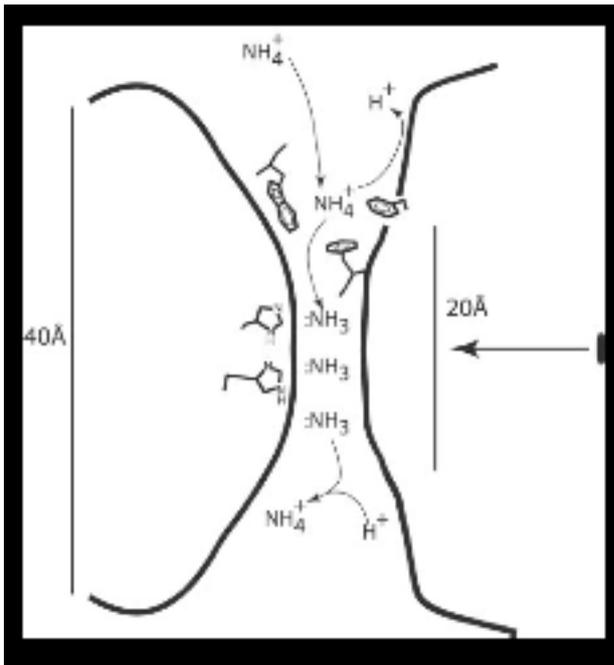
La verifica che una determinata sequenza funzioni effettivamente come un trasportatore dell'ammonio può essere fatta mediante un esperimento di complementazione eterologa in ceppi di lievito *S. cerevisiae*, mutati nei geni per il trasporto dell'ammonio. Il ceppo di lievito trasformato con sequenze trasportatrici guidate da promotori costitutivi o inducibili riacquista la capacità di crescere anche in terreni minimi contenenti concentrazioni di ammonio inferiori a 1mM.

Inoltre, la capacità di trasporto delle proteine AMT e metilammonio permeasi (MEP) è convenzionalmente misurata attraverso il trasporto di un analogo dell'ammonio, il metilammonio marcato radioattivamente ( $^{14}\text{C}$ -MA).

Il metilammonio all'interno delle cellule non viene metabolizzato, il che consente di misurare la quantità trasportata all'interno della cellula nel tempo e stabilire, per i diversi trasportatori, parametri quali costante di affinità ( $K_m$ , costante di Michaelis-Menten) e velocità massima ( $V_{max}$ ). La costante di affinità, corrisponde al valore della concentrazione di substrato richiesta dall'enzima per operare alla metà della velocità massima mentre la velocità massima è la velocità di reazione in funzione della concentrazione del substrato ed è quindi una misura della capacità di trasporto. Se non si conosce perfettamente il valore della velocità massima, non può essere determinato con esattezza quello della costante di affinità. Per i trasportatori dell'ammonio di piante, la costante di affinità per il metilammonio non riflette necessariamente l'affinità per l'ammonio (Venegoni *et al.*, 1997), e questo può essere verificato attraverso il calcolo della costante di inibizione del trasporto del metilammonio ( $K_i$ ) dovuto all'aggiunta di concentrazioni crescenti di ammonio.

Con la costante d'inibizione, infatti è possibile valutare la specificità del substrato, inibendolo in maniera reversibile, con un competitore specifico. Il valore della costante d'inibizione non è altro quindi che la costante di dissociazione del complesso enzima-inibitore.

Per quanto riguarda il meccanismo di trasporto ed in particolare, se ad essere trasportata sia una molecola carica come l'  $\text{NH}_4^+$  oppure una non carica come l'  $\text{NH}_3$  questo è ancora oggetto di controversia. Ludewig e collaboratori nel 2002, attraverso studi di elettrofisiologia su oociti di *Xenopus*, trasformati con il gene *Amt1;1* di *Lycopersicum esculentum*, evidenziarono che in seguito all'aggiunta di ammonio a concentrazioni micromolari nel mezzo esterno veniva indotta una corrente verso l'interno degli oociti che era dipendente da AMT1 ed il cui valore era indipendente da cambiamenti di pH da 5.5 a 8.5. Quest'ultimo dato suggerisce fortemente che è specificamente lo ione ammonio ad essere trasportato all'interno della cellula, con un meccanismo di uniporto perché ad ogni incremento di un'unità di valore di pH dovrebbe corrispondere un aumento della concentrazione di  $\text{NH}_3$  di circa 10 volte e quindi il voltaggio riscontrato dovrebbe essere largamente influenzato dal cambiamento di pH. L'analisi del cristallo di AmtB di *E. coli* ha in qualche modo consentito di risolvere le apparenti contraddizioni in letteratura indicando che la struttura dell'omo-trimero è consistente con un meccanismo di raccolta degli ioni  $\text{NH}_4^+$  nella parte esterna del canale, successiva riduzione della sua  $\text{pK}_a$  e conseguente conduzione e trasporto di  $\text{NH}_3$  all'interno del canale. Quest'ultima viene poi presumibilmente riprotonata all'interno della cellula a contatto con l' $\text{H}_2\text{O}$  (Figura 5).



**Figura 5.** Meccanismo di trasporto dell'ammonio e struttura del canale proposto da Khademi *et al.* 2004.

Inoltre il trasporto dell'ammonio richiede energia sotto forma di ATP, che sembra sia fornita da una pompa  $H^+$ -ATPase presente sulla membrana plasmatica (Pena *et al.* 1987). Infatti, è stato osservato come inibitori della pompa riducano la capacità di trasporto del metilammonio (Ninnmann and Frommer 1994), anche se non è stato trovato nessun dominio in grado di legare direttamente l'ATP e potrebbe pertanto trattarsi di un trasporto secondario.

E' stata infine dimostrata la presenza, sulla membrana di cellule di pianta, di canali per il  $K^+$  che sembrano essere in grado di trasportare anche l'ammonio, ma con capacità inferiore. Considerando ciò, si pensa che l'ammonio entri nella cellula anche attraverso i canali cationici del  $K^+$  ed esca sotto forma di  $NH_3$  per semplice diffusione (Udvardi *et al.* 2000). Questo provocherebbe un accumulo di cariche positive che depolarizzano la membrana determinando quindi un'attivazione di una pompa  $H^+$ -ATPasi che pompa protoni all'esterno compensando tale effetto.

## 1.5 FLUSSI AZOTATI NELLE PIANTE

Per le piante, l'azoto, tra tutti gli elementi, è quello maggiormente necessario per lo sviluppo. E' un componente della clorofilla e di molti ormoni vegetali e carenze di azoto provocano riduzione della crescita, graduale clorosi delle foglie con conseguente abscissione e un eccessivo accumulo di carboidrati che inducono la sintesi di antocianine nelle foglie e negli steli della pianta. Considerando dunque l'importanza dell'azoto nel mondo vegetale, l'acquisizione e la dislocazione dei composti azotati risulta essenziale per la crescita e lo sviluppo delle piante (Figura 6).

Le piante sono in grado di estrarre ed utilizzare varie fonti di azoto dal suolo ed in molti terreni, l' $\text{NH}_4^+$  e il  $\text{NO}_3^-$  rappresentano le sorgenti principali di azoto disponibile. Sebbene la concentrazione dell' $\text{NH}_4^+$  nel suolo è mediamente 100-1000 volte più bassa di quella del  $\text{NO}_3^-$ , questa differenza non si riflette necessariamente in una diversa utilizzazione delle due sorgenti azotate da parte delle piante. Infatti, alcune osservazioni indicano chiaramente che il ruolo dell' $\text{NH}_4^+$  nella nutrizione delle piante e nel soddisfacimento del fabbisogno di azoto è stato largamente sottostimato. Ad esempio, dati ottenuti in pomodoro dimostrano che il 50% dell'azoto, quando entrambe le sorgenti sono presenti, viene assorbito dalle piante sottoforma di  $\text{NH}_4^+$  anche se questo è presente a concentrazioni più basse di quelle del  $\text{NO}_3^-$ . Una ragione fondamentale di questa preferenza può essere dovuta al fatto che l' $\text{NH}_4^+$  richiede meno energia per l'assimilazione rispetto al  $\text{NO}_3^-$  che, invece, per poter essere assimilato dalla pianta deve essere prima ridotto a nitrito e successivamente ad  $\text{NH}_4^+$ , ad opera di due enzimi, la nitrato reduttasi (NR) e la nitrito reduttasi (NiR).

L'ammonio, una volta trasportato all'interno delle piante, è certamente rapidamente convertito in amminoacidi poichè elevate concentrazioni risultano essere tossiche per la pianta stessa. Questa tossicità può essere associata a diversi fattori, ad esempio il trasporto dell'ammonio legato al rilascio di protoni, provoca una diminuzione del pH e quindi un'acidificazione intracellulare con conseguente stress

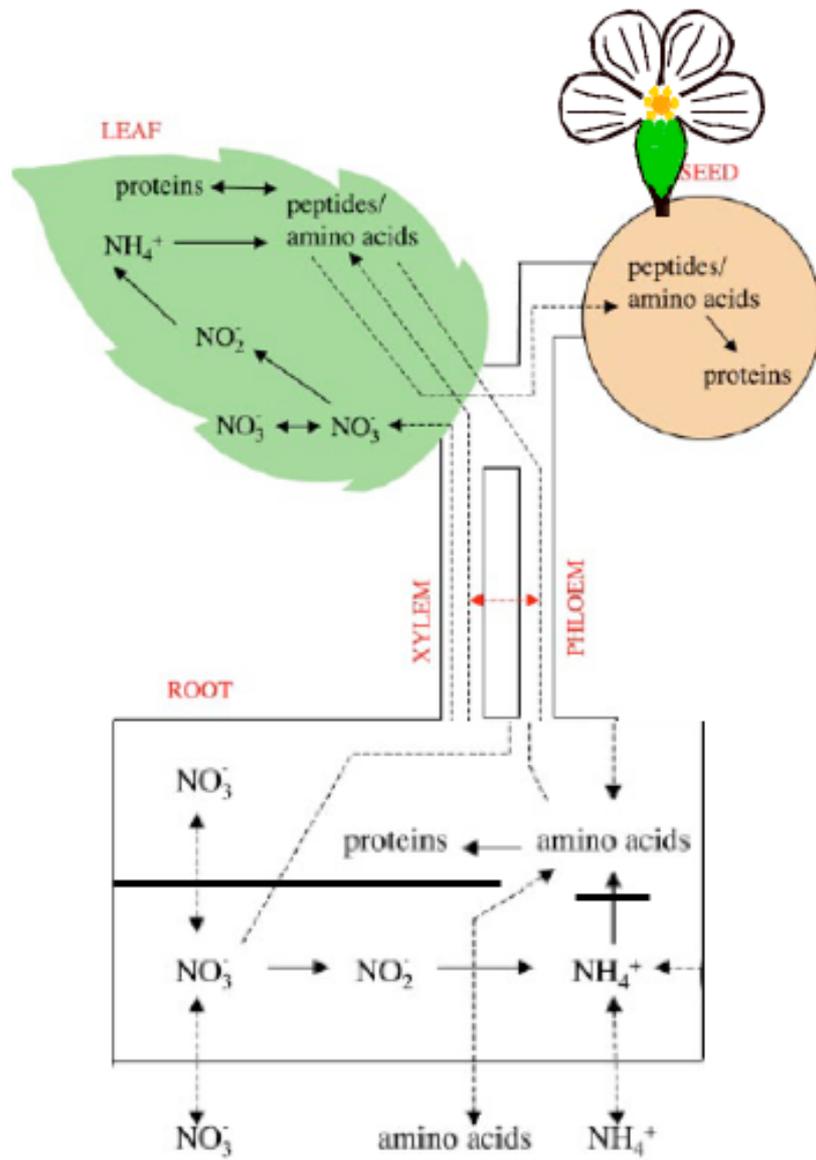
per la pianta. Sintomi di tossicità da eccesso di  $\text{NH}_4^+$  possono anche essere dovuti ad una diminuzione nella disponibilità di carboidrati. In alcuni casi infatti, è stato dimostrato che la maggior parte dell'  $\text{NH}_4^+$  non viene traslocato come tale nella zona apicale della pianta e tutti gli scheletri carboniosi necessari per l'assimilazione dell'azoto vengono traslocati nelle radici provocando sintomi da carenza di carboidrati nella parte aerea della pianta. Questa evidenza è anche dimostrata da esperimenti in cui, fornendo dall'esterno  $\alpha$ -chetoglutarato, necessario per l'assimilazione dell'azoto, si osserva una riduzione dei sintomi provocati dalla tossicità dovuta all'eccessiva concentrazione di  $\text{NH}_4^+$  intracellulare. (Britto *et al.* 2001). Comunque, recentemente è stato possibile verificare che le concentrazioni intracellulari riscontrabili nelle cellule di radici sono molto più alte di quello che si poteva immaginare suggerendo una elevata capacità di stoccaggio di queste molecole. Inoltre, la presenza di ammonio è stata anche riscontrata in misura significativa nei vasi xilematici ed è quindi probabile che anche come tale venga trasferito alla parte aerea della pianta e non completamente assimilato nelle radici.

In definitiva è probabile che le capacità di assimilazione radicale e/o di trasporto dell'ammonio alla parte aerea delle piante rifletta un diverso adattamento a diverse condizioni ambientali e quindi alla presenza di diverse concentrazioni di ammonio nel terreno oltre che presumibilmente una diversa capacità di trasportare verso l'esterno (efflux) l'ammonio in eccesso.

L'assimilazione dell' $\text{NH}_4^+$  avviene principalmente ad opera del sistema enzimatico della glutammina sintetasi (GS) e glutammato sintasi (NADH-GOGAT) e gli aminoacidi ottenuti vengono poi trasportati nei vari tessuti e organi della pianta. In genere tale trasporto avviene dalle radici alle foglie attraverso i vasi xilematici. In alcune particolari condizioni di crescita, l'azoto può anche essere assimilato nelle foglie e da queste, soprattutto sotto forma di aminoacidi, trasferito alle radici attraverso i vasi floematici (Marshner *et al.* 1997). L'assimilazione dell'ammonio prodotto nelle cellule delle foglie durante la fotorespirazione avviene anche ad opera di un altro enzima presente nei mitocondri, la GDH, anche se comunque la maggior

parte di quest'ammonio viene trasportato al cloroplasto dove è assimilato dalla GS (Udvardi 2000). Diverse isoforme enzimatiche della GS sono presenti nei diversi organi, cellule e compartimenti cellulari (Lam *et al.* 1996). Nelle piante superiori la GS è un ottamero le cui subunità di 38-45 kDa sono codificate da una famiglia multigenica. Nelle foglie sono state identificate entrambe le isoforme della GS, citosolica e cloroplastica. La subunità cloroplastica risulta essere leggermente più grande, 43-45 kDa, rispetto a quella citosolica, 37-43 kDa. Il rapporto tra i due isoenzimi varia a seconda della specie vegetale, dello stadio di sviluppo e di diversi fattori ambientali, quali la luce o la concentrazione di CO<sub>2</sub> (Orea *et al.* 2002). Nelle radici, normalmente, è presente solo la forma citosolica, ma la presenza dell'isoforma plastidiale è stata comunque rilevata nei legumi temperati.

La diretta risposta morfologica e fisiologica delle piante in funzione dello stato nutrizionale, richiede la presenza di un sistema di trasporto altamente flessibile, in grado di rispondere alla richiesta interna di nutrienti, e in grado inoltre di distribuirli spazialmente all'interno della pianta. Le necessità nutrizionali di una pianta possono essere condizionate ai cambiamenti, anche repentini delle condizioni ambientali e le piante necessitano quindi anche di un sistema estremamente efficiente per "avvertire" nel mezzo esterno la presenza dei nutrienti necessari. Inoltre anche la varietà di processi metabolici che possono portare alla produzione di ammonio nelle piante (es. fotorespirazione, degradazione delle proteine indotta da condizioni di stress) determinano la necessità di sistemi di trasporto altamente flessibili e presumibilmente sincronizzati con tali attività.



**Figura 6.** Flussi azotati in pianta.

## 1.6 SISTEMI DI TRASPORTO DELL'AMMONIO NELLE PIANTE

La notevole complessità della rete di flussi azotati tra terreno e piante, e all'interno di queste ultime, fra i vari compartimenti cellulari, fra cellule, tessuti ed organi diversi, ha fatto sì che le piante sviluppassero due diversi sistemi deputati al trasporto dell'ammonio con caratteristiche completamente differenti. Tali sistemi di trasporto sono presumibilmente in grado di rispondere alle varie condizioni ambientali in cui può venire a trovarsi una pianta, oltre che capaci di soddisfare le diverse esigenze dei diversi tessuti nel corso delle varie fasi di sviluppo.

Il primo sistema di trasporto risulta essere a bassa affinità (LATS: *Low Affinity Transport System*), non saturabile e attivo quando la concentrazione esterna è dell'ordine delle millimoli (a partire da 1mM); il secondo, al contrario, è un sistema ad alta affinità (HATS: *High Affinity Transport System*) che opera quando le concentrazioni nel mezzo esterno sono più basse (fino a 1 mM) e non è saturabile (Clarkson, 1986).

I trasportatori dell'ammonio ad alta affinità, sono largamente presenti nel regno vegetale e le proteine appartenenti alla famiglia sono state isolate sia nelle monocotiledoni che nelle dicotiledoni. I geni sono stati isolati in diverse specie, prima tra tutte *Arabidopsis thaliana*, successivamente in un'altra pianta modello, *Lycopersicon esculentum* (*LeAMT1;1-1;2-1;3*) (Lauter *et al.*, 1996; Von Wiren *et al.*, 2000), in riso (*OsAMT1;1-1;2-1;3*), nelle piante leguminose *Lotus japonicus* (*LjAMT1;1-1;2-1;3-2;1*) (Salvemini *et al.* 2001; D'Apuzzo *et al.* 2004; Simon-Rosin 2003) e *Glycine max* e in *Brassica napus* (*BnAMT1;1-1;2*) (Schjoerring *et al.* 2002) (Figura 7).

La conferma che si tratti effettivamente di proteine implicate nel trasporto dell' $\text{NH}_4^+$  è stata anche in questo caso ottenuta mediante esperimenti di complementazione eterologa in un ceppo di *Saccharomyces cerevisiae*, triplo mutante, "difettivo" nei geni *mep1,2,3* deputati al trasporto dell' $\text{NH}_4^+$ , e incapace perciò di crescere in un terreno contenente concentrazioni di ammonio inferiori a

10mM (Ninnemann *et al.*,1994; Marini *et al.*1997). Il ceppo di lievito mutato, quando viene trasformato con una sequenza di cDNA, che codifica putativamente per un gene appartenente alla famiglia AMT, riacquista la capacità di crescere in un mezzo contenente ammonio in concentrazioni minime, inferiori a 1mM. Inoltre esperimenti in *S. cerevisiae* hanno consentito anche di definire le caratteristiche biochimiche delle sequenze in esame (vedi Par. 1.4).

L'analisi completa della sequenza del genoma di *Arabidopsis* ha rivelato la presenza di sei geni appartenenti alla famiglia AMT1 le cui sequenze conservano un'elevata identità amminoacidica (Udvardi 2000).

In riso, che rappresenta l'altra pianta in cui il sequenziamento del genoma è stato completato, il numero dei geni AMT1 è molto più alto che in *Arabidopsis* e pomodoro. E' presumibile pensare che in piante differenti, evolute in condizioni ambientali molto diverse, il numero dei trasportatori dell'ammonio sia notevolmente diverso. Tra l'altro, il riso si è adattato a crescere in terreni molto più ricchi di ammonio di quanto non lo siano quelli in cui normalmente vengono a trovarsi *Arabidopsis* o pomodoro.

Per quanto riguarda la localizzazione dei trasportatori dell'ammonio di pianta, questa è stata riportata in alcuni casi, tramite l'utilizzazione di proteine di fusione con la *Green Fluorescent Protein* (GFP) ed in questi casi la localizzazione risulta essere sulla membrana plasmatica. Ad esempio, questo è stato dimostrato da Ludewig e collaboratori nel 2003, per il trasportatore AMT1;1 di pomodoro. Infatti, la fusione tra la proteina e la GFP mostra una localizzazione sulla membrana plasmatica sia nel ceppo 31019 di *Saccharomyces cerevisiae*, che nelle cellule di protoplasti di pomodoro trasformati (Ludewig *et al.*, 2003). Tale localizzazione è in accordo con una funzione di trasporto all'interno delle cellule che può anche essere legato a dei flussi secondari legati alla necessità di recupero dell'ammonio non completamente assimilato e perso nell'apoplasto (Simon-Rosin *et al.* 2003).

Per quanto riguarda i profili di espressione, i membri della famiglia AMT1 in generale, sono preferenzialmente espressi nelle radici della pianta.

In alcuni casi l'espressione nelle radici è regolata dall'azoto presente nel mezzo. Il gene *AtAMT1;1* e quello *LeAMT1;1* sono ad esempio fortemente indotti dalle condizioni di carenza di azoto in cui si trovano le radici della pianta (Gazzarrini *et al.*, 1999, Von Wirèn *et al.*, 2000). In particolare, in *A. thaliana* l'induzione dell'espressione del gene è strettamente dipendente dallo stato di carenza di azoto in cui si trovano le radici della pianta (Gansel *et al.*, 2001).

L'unica evidenza diretta del ruolo svolto dai geni AMT1 e di come questi possano essere direttamente coinvolti nel trasporto dell'ammonio dal mezzo esterno alle cellule delle radici della pianta viene dall'analisi del mutante *knock-out* del gene *AtAMT1;1*, effettuata da Kaiser e collaboratori nel 2002. Questo mutante mostra una riduzione della capacità da parte della pianta nel trasporto dell'ammonio all'interno delle radici pari al 30% rispetto alle piante *wild-type* utilizzate come controllo. In quel *background* genetico, inoltre, l'analisi del livello di espressione di altri due trasportatori, *AtAMT1;2* e *AtAMT1;3*, mostra un incremento dell'espressione dei due geni, se confrontata a quella delle piante *wild-type*, e questo potrebbe spiegare una efficienza di trasporto dell'ammonio ridotta del 30% a fronte dell'espressione molto più alta di *AtAMT1;1* nelle radici rispetto agli altri membri della famiglia. Questi risultati forniscono un'interessante informazione sulla capacità dei trasportatori dell'ammonio di svolgere anche un'azione di tipo sinergico. L'espressione dei trasportatori è stata anche rilevata nelle foglie, e questo potrebbe essere correlato al trasporto dell'ammonio, che viene rilasciato dalle foglie durante la fotorespirazione, tra i vari organelli (Ninneman, *et al.* 1994). In particolare, il gene *LjAMT1;3* è l'unico ad essere preferenzialmente espresso nelle foglie. *LeAMT1;3* mostra una bassa identità con gli altri membri della famiglia, inferiore al 63%, e possiede una sequenza ammino-terminale molto corta, costituita da 14 amminoacidi, contro i 35-54 degli altri membri AMT.

Queste differenze fanno ipotizzare, che il gene abbia una diversa regolazione post-trascrizionale e una conseguente diversa funzione fisiologica (Von Wirèn *et al.* 2000).



## 1.7 LA CLASSE DI TRASPORTATORI AMT2 E ANALISI EVOLUTIVE

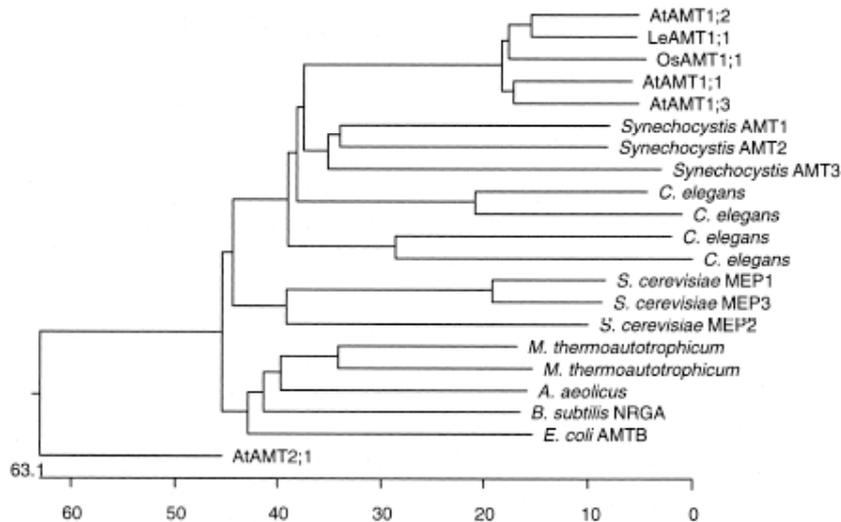
In *Arabidopsis*, riso e *Lotus japonicus*, sono state isolate altre proteine che evidenziano un'identità inferiore al 25% con i membri appartenenti alla superfamiglia AMT1 ma che risultano comunque in grado di trasportare l'ammonio, così come dimostrato dagli esperimenti di complementazione eterologa in lievito (Sohlenkamp *et al.*, 2000; Simon-Rosin *et al.*, 2003; Suenaga *et al.*, 2003). Le proteine mostrano diverse caratteristiche biochimiche e, a differenza delle AMT1, non sono in grado di trasportare il metilammonio. Queste proteine presentano una maggiore somiglianza con quelle isolate nei procarioti come *Aquifex aeolicus*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e sono state perciò raggruppate in un'altra famiglia denominata AMT2. L'analisi filogenetica dei geni *AMT* indica che entrambe le famiglie AMT1 e AMT2 probabilmente provengono da un comune antenato. L'analisi delle sequenze dei trasportatori isolati fornisce informazioni sull'evoluzione delle sequenze, ma può anche suggerire la possibile funzione o meccanismo di azione delle proteine.

In base a questa analisi è possibile costruire alberi filogenetici che generalmente sono alberi di specie o di popolazioni. In genere questi sono costruiti confrontando geni e per questo si parla sia di alberi di specie che di alberi di geni in genere, la divergenza genica precede la divergenza delle specie.

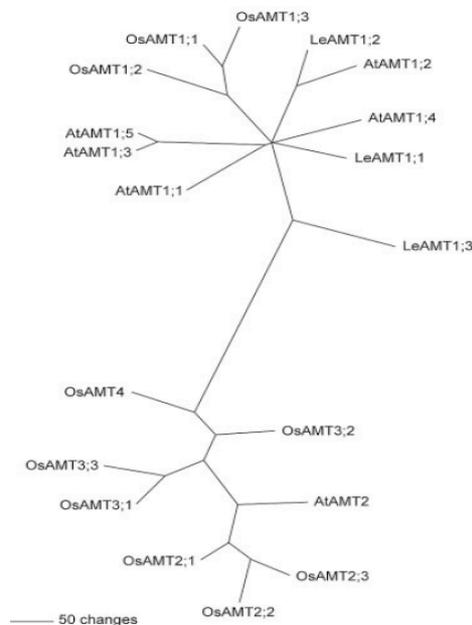
Nella figura 8 è mostrato l'albero delle proteine AMT isolate negli eucarioti e in alcuni procarioti, mentre nella figura 9 più in dettaglio è mostrato l'albero filogenetico delle proteine AMT di *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum* e *Oryza sativa*.

Dalle analisi molecolari sembra che l'espressione dei geni *AMT2* non sia organo dipendente e sembra inoltre che la proteina sia localizzata sulla membrana plasmatica delle cellule, come dimostrano analisi di fusioni tra AMT2;1 di *Lotus japonicus* e la proteina GFP (Simon-Rosin *et al.*, 2003). L'analisi biochimica, comunque, rivela che la struttura terziaria delle proteine appartenenti alla famiglia

AMT2 di pianta e i loro meccanismi molecolari sono simili a quelli degli altri membri AMT1. Quindi si può affermare che le sostanziali differenze tra le proteine appartenenti alle due famiglie riguardino la loro struttura primaria (Howitt *et al.*, 2000). Sembrerebbe che le specie vegetali ad oggi analizzate contengano un singolo gene che codifica per la proteina AMT2.



**Figura 8.** Albero filogenetico delle proteine AMT isolate negli eucarioti e in alcuni procarioti, ottenuto utilizzando il programma Clustal W. La scala indica la percentuale di divergenza.



**Figura 9.** Albero filogenetico dei trasportatori dell'ammonio di *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum* e *Oryza sativa*. Le sequenze sono state allineate utilizzando il programma CLUSTAL W (Loquè *et al.* Journal of Experimental Botany, 2004).

## 1.8 L'AZOTO ESTERNO COME SEGNALE REGOLATIVO

Le piante, a differenza degli altri organismi viventi, non sono in grado di muoversi e sono costrette nel loro ambiente; questa condizione, quando i nutrienti cominciano a scarseggiare, diventa molto limitante per la loro sopravvivenza. Per questo motivo, le piante superiori hanno sviluppato dei sistemi in grado di rispondere alle esigenze nutrizionali interne anche in condizioni di crescita limitanti, che inducono cambiamenti morfologici e alterazioni nei meccanismi di trasporto. (Marschner, 1995). Una risposta evidente che si osserva in condizioni di carenza di azoto è la modifica dell'architettura delle radici e l'aumento della loro superficie di assorbimento. Questi cambiamenti rappresentano la risposta primaria alla condizione di carenza, consentendo un primo immediato adattamento. Sensori o segnali di trasduzione a cascata collegano lo status nutrizionale della pianta alle rispettive risposte fisiologiche. I geni che codificano per i trasportatori dell'ammonio e del nitrato potrebbero costituire un importante *target* molecolare in grado di regolare la risposta da stress in conseguenza della condizione di carenza di azoto. Infatti, come immediata risposta a queste condizioni di crescita si osserva in alcuni casi una rapida induzione del loro livello di espressione. Nel caso dei trasportatori del nitrato ad alta affinità è stato recentemente riportato il loro coinvolgimento non solo nel trasporto del nitrato dal mezzo esterno, ma anche il loro ruolo di sensori della concentrazione di questo, regolando con la loro attività l'architettura del sistema radicale ed in particolare la formazione e l'allungamento delle radici secondarie (Little *et al.*, 2005; Remans *et al.*, 2006).

## 1.9 REGOLAZIONE TRASCRIZIONALE DEI TRASPORTATORI DELL'AMMONIO

Considerato l'elevato numero di proteine AMT sintetizzate dai diversi organismi e le loro differenti caratteristiche, non è sorprendente scoprire come la regolazione di questi geni sia altamente complessa.

Le due componenti che maggiormente regolano la trascrizione dei geni AMT di pianta sono lo stato nutrizionale in cui si trova la pianta e la disponibilità di ammonio nel mezzo esterno.

La regolazione trascrizionale dei geni AMT1 è stata studiata in dettaglio in *Arabidopsis thaliana* mostrando delle analogie e delle specificità fra i diversi membri. Uno dei geni, *AtAMT1;1*, è fortemente indotto in condizioni di carenza di azoto e tale induzione è transiente in quanto l'espressione torna ai livelli basali dopo un periodo variabile di ore o giorni (dipendentemente dalle condizioni sperimentali). Un forte suggerimento sul ruolo giocato da questo trasportatore nel trasporto dell'ammonio dal mezzo esterno in condizioni di carenza di azoto viene dai dati che correlano l'aumento di espressione con un aumento dell'influsso di ammonio nelle radici (Gazzarrini *et al.*, 1999, Rawat *et al.* 1999; von Wirén *et al.* 2000) oltre che dall'analisi del mutante *knock-out* (vedi Par. 1.6). L'espressione di *AtAMT1,1* ed in particolare la sua induzione in condizioni di carenza azotata è regolata in maniera localizzata in risposta alla concentrazione locale di azoto nella rizosfera. Questo è stato dimostrato in esperimenti di "*split roots system*", in cui il sistema radicale di piante selvatiche di *Arabidopsis* viene diviso in due parti di superficie simile e le due zone vengono mantenute in condizioni azotate diverse (eccesso e carenza). L'aumento del livello del trascritto del trasportatore si osserva solo nelle radici cresciute in carenza di azoto ed il segnale carenza di azoto non è quindi trasmesso al resto della pianta tramite la sua parte aerea (Gansel *et al.* 2001). Il gene risponde rapidamente anche al nitrato; infatti si osserva una diminuzione della sua espressione quando questo viene aggiunto al mezzo.

Il risultato indica quindi che anche il nitrato è un segnale in grado di influenzare l'espressione di *AtAMT1;1*. Inoltre l'espressione di *AtAMT1;1* è inibita quando nel mezzo è presente la metionina sulfoximine (MSX), un inibitore della GS, che impedisce la conversione dell'ammonio a glutammina (Becker *et al.* 2002) indicando quindi un controllo di tipo *feedback* negativo provocato dalla concentrazione del prodotto di assimilazione dell'ammonio, la glutammina. Dal punto di vista spaziale, *AtAMT1;1* è espresso in tutti i maggiori organi della pianta, mentre *AtAMT1;2* e *AMT1;3* sono espressi esclusivamente nelle radici.

In pomodoro i geni *LeAMT1;1* e *LeAMT1;2* sono soprattutto espressi nelle radici, e in particolare nei peli radicali; al contrario, *LeAMT1;3* risulta essere maggiormente espresso nelle foglie. Il gene *LeAMT1;1* è fortemente indotto in carenza di azoto, mentre il livello del trascritto di *LeAMT1;2* è basso in condizioni di crescita in carenza di azoto, ma aumenta lievemente con l'aggiunta di ammonio (Lauter *et al.* 1996, Von Wirén *et al.* 2000).

Nelle radici di riso, il gene *OsAMT1;1* è costitutivamente espresso, *OsAMT1;3* è indotto in condizioni di carenza di azoto e *OsAMT1;2* è indotto quando al mezzo viene aggiunto l'ammonio (Udvardi *et al.* 2000).

Un altro livello di regolazione trascrizionale riportato per i geni AMT1 è quello che riguarda la risposta al ciclo giorno-notte. Ad esempio, fra i tre trasportatori dell'ammonio di *A. thaliana*, *AtAMT1;3*, mostra un forte aumento nel livello del trascritto alla fine del periodo di luce, seguito da un netto declino al buio (Gazzarrini *et al.* 1999). Ulteriori studi hanno successivamente dimostrato che tale regolazione in *Arabidopsis* come in pomodoro è legata al diverso apporto di fotosintato disponibile durante le varie fasi di luce e buio ed infatti l'aggiunta di saccarosio nel mezzo di crescita previene la *down*-regolazione osservata al buio. A conferma di questo, altri zuccheri, quali il malato o il glutarato non sono in grado di influenzare l'espressione di questi geni.

La concentrazione di CO<sub>2</sub> è ugualmente in grado di regolare l'espressione dei geni *AMT1* soprattutto nelle foglie, infatti è stato dimostrato che in piante di

pomodoro cresciute in presenza di alte concentrazioni di CO<sub>2</sub> nell'atmosfera (0,7%), in cui viene inibito il processo di fotorespirazione, il livello dell'mRNA dei geni *LeAMT1;2* e *LeAMT1;3* diminuisce. Il dato suggerisce un coinvolgimento di entrambi i trasportatori nel trasporto e/o nel recupero dell'NH<sub>3</sub> prodotto dalla fotorespirazione, rilasciato dai mitocondri e riprotonato nel citoplasma.

## **1.10 MECCANISMI DI REGOLAZIONE POST-TRASCRIZIONALE DELLE PROTEINE AMT**

Nei batteri enterici è stato da tempo identificato un sistema di regolazione da azoto (NTR) composto da 4 proteine: il complesso uridilil transferasi/deuridililasi (Utase/UR) codificato dal gene *glnD*, la proteina PII, la proteina (istidina) chinasi NtrB e l'attivatore trascrizionale NtrC. In condizioni di carenza di azoto, la proteina PII che funge da sensore, viene uridililata da parte dell'uridililasi GlnD e quindi trasferisce questa informazione alla chinasi NtrB che fosforila l'attivatore trascrizionale NtrC, consentendo l'attivazione della trascrizione dei geni implicati nell'acquisizione e utilizzo dell'azoto, incluso *AmtB*. Questo meccanismo e questi fattori sono stati molto ben caratterizzati fra gli altri in *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Azospirillum brasilense* e *Azorhizobium caulinodans*. Le proteine PII fungono quindi da sensori e trasduttori dello status nutrizionale azotato cellulare.

In *E. coli*, sono state isolate due proteine omologhe appartenenti alla famiglia PII, GlnK e GlnB, con struttura terziaria e quaternaria simile (Xu *et al.* 1998). E' stato osservato che in carenza di azoto, PII viene covalentemente modificata attraverso l'uridilazione di un residuo di tirosina (Y51), e deuridilata quando le concentrazioni nel mezzo esterno di azoto aumentano.

Nel caso di *glnk* e *amtB* i due geni sono localizzati sullo stesso locus genomico, ed i rispettivi prodotti genici interagiscono fisicamente tra loro (Dandekar *et al.* 1998). GlnK funge da regolatore post-traduzionale dell'attività di trasporto di AmtB.

In particolare, in condizioni di basse concentrazioni di azoto GlnK è uridilata e non è fortemente associata alla membrana, AmtB è perciò attivo e in grado di

trasportare l'ammonio dal mezzo esterno. Quando le concentrazioni di azoto extracellulare aumentano, la trascrizione di GlnK viene fortemente indotta e la proteina deurdilata, si associa alla membrana e ad AmtB che non è più in grado di trasportare l'ammonio (Merrik *et al.* 2004). Meccanismi simili di regolazione sono stati anche identificati in altri procarioti quali *Azoarcus* (Martin and Reinhold-Hurek 2002) e *Klebsiella pneumoniae* (Klopprogge *et al.* 2002).

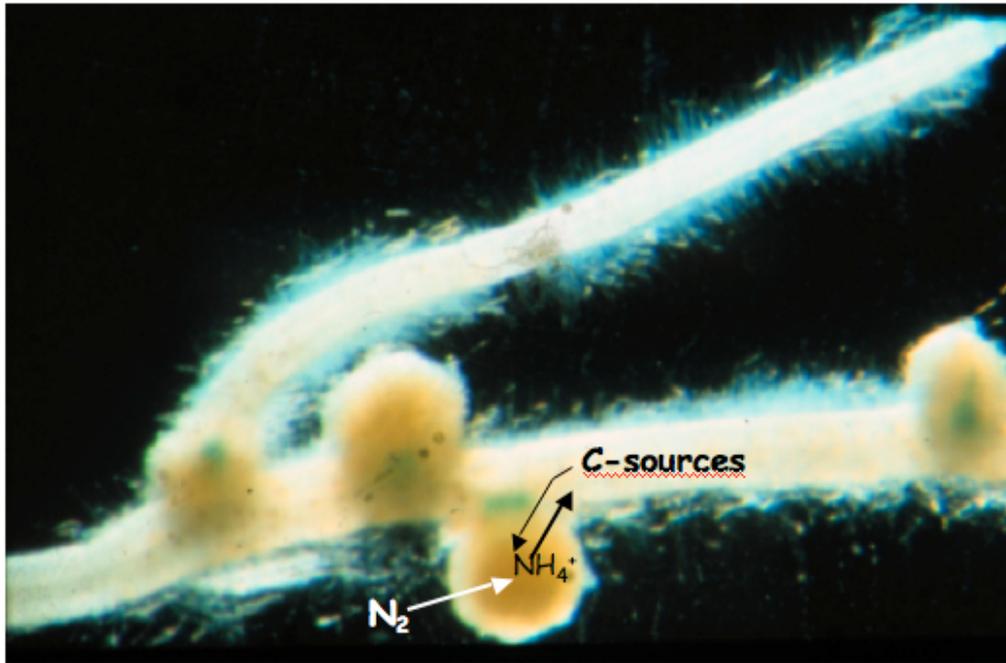
In diverse specie vegetali, quali *A. thaliana*, *Oryza sativa*, *Ricinus communis* e *Lotus japonicus*, sono state isolate sequenze che mostrano un'elevata identità amminoacidica con la proteina PII di *E.coli* (50%). In pianta, PII ha una localizzazione plastidiale (Arcondèguy *et al.* 2001), la sua regolazione avviene a livello trascrizionale ed è influenzata dalla luce e dalla concentrazione dei metaboliti, in particolare dal rapporto tra carbonio e azoto. E' possibile che PII anche in pianta sia in grado di regolare, a livello trascrizionale, geni coinvolti nel metabolismo azotato, (Coruzzi *et al.* 1998, Sugiyama *et al.* 2004). E' infatti noto che piante over-esprimenti la proteina PII in *Arabidopsis* reagiscono in maniera alterata al cambiamento del rapporto C/N nel mezzo di crescita suggerendo un ruolo di sensore di queste condizioni anche negli organismi vegetali. Quindi, è possibile ipotizzare che anche i geni *AMT* di pianta, come quelli procariotici, possano essere soggetti alla regolazione da parte di questa proteina.

Inoltre, le sequenze clonate delle proteine AMT di pianta presentano potenziali siti per la fosforilazione che rappresentano anch'essi un indizio di possibile regolazione post-trascrizionale. Infatti, nelle proteine AtAMT1;2 e LeAMT1;1, entrambe costitutivamente espresse nelle radici, è stata evidenziata la presenza di un sito di legame per la chinasi C nel loop intracellulare tra la elica 5 e la 6. Infine, nelle proteine AtAMT1;1 e OsAMT1;1 è stata osservata la presenza di un sito di legame per una proteina cAMP-chinasi-dipendente nel *loop* intracellulare tra l'elica sette e l'elica otto (Udvardi *et al.* 2000).

## 1.11 IL PROCESSO DI SIMBIOSI AZOTO FISSATIVA

E' stato stimato che la produzione di circa un terzo del cibo necessario a sostenere le esigenze nutrizionali dell'intera popolazione mondiale dipende dai fertilizzanti azotati prodotti industrialmente, e questo perchè la crescita della maggior parte dei vegetali dipende dalle disponibilità di azoto. Le piante leguminose, a differenza delle altre specie vegetali, possono disporre di una fonte aggiuntiva di azoto, grazie alla loro capacità di intraprendere, in condizioni di crescita in carenza di azoto, con i batteri gram-negativi del suolo appartenenti alla famiglia delle *Rhizobiaceae*, un processo di tipo mutualistico-simbiotico (Downie *et al.* 2004). Il risultato finale di questa interazione simbiotica è rappresentato dalla formazione di un nuovo organo, il nodulo radicale, all'interno del quale *Rhizobio* trova il microambiente ideale per lo svolgimento di quella che, una volta penetrato all'interno del primordio nodulare, diventa il suo principale ruolo e cioè la fissazione dell'azoto atmosferico. Questi batteri sono degli endosimbionti intracellulari che all'interno di questi organi differenziano sia morfologicamente che fisiologicamente in batteroidi, capaci di trasformare l'azoto atmosferico in ammonio che è successivamente assimilato dalla pianta. Trattandosi di una simbiosi mutualistica, la pianta, in cambio dell'azoto, fornisce ai batteri i prodotti carboniosi della fotosintesi, necessari al soddisfacimento delle richieste energetiche necessarie allo svolgimento di questo processo estremamente dispendioso (Figura 10).

Tale simbiosi rende le piante leguminose quasi indipendenti (70-80%) dall'azoto presente nel suolo.



**Figura 10.** Scambio di metaboliti tra la pianta leguminosa *L. japonicus* e il batterio simbiote *M. loti*, all'interno di un nodulo radicale maturo.

L'importanza ecologica e agronomica di questa interazione pianta-batterio e la potenziale ottimizzazione di un processo che rappresenta un esempio di fertilizzazione biologica del suolo non legato ai dispendiosissimi processi industriali per la produzione di fertilizzanti azotati, con i notevolissimi rischi per l'ambiente dovuti all'uso massivo di tali prodotti, ha determinato un'enorme interesse nel mondo scientifico a partire dagli ultimi 50 anni.

Inoltre i noduli radicali rappresentano anche un interessante modello di studio dei processi di organogenesi nelle piante. Il nodulo infatti, così come altri organi laterali quali ad esempio le radici secondary, si forma a partire da cellule già differenziate che in seguito a vari segnali di tipo biotico e abiotico rientrano nel ciclo cellulare e tornano a dividersi per dare origine ad un nuovo organo.

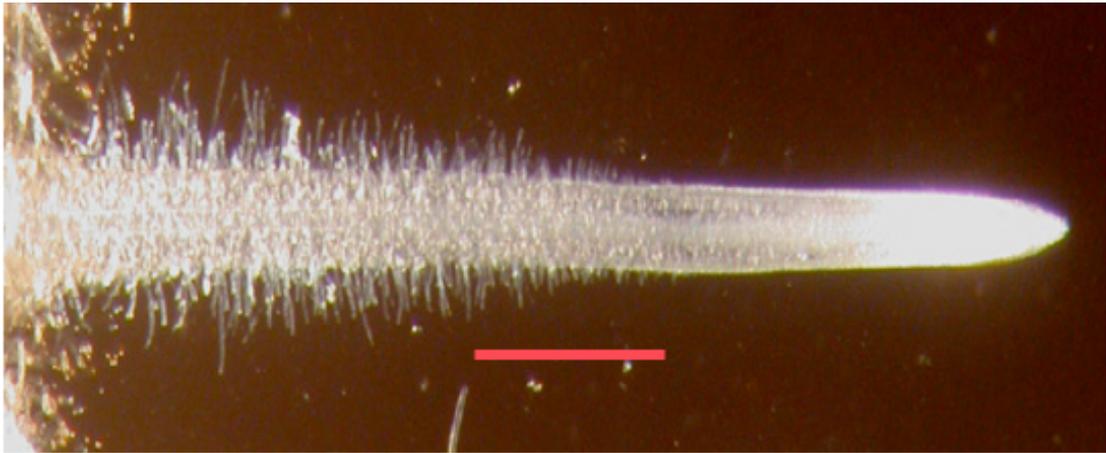
E' verosimile quindi che, date queste analogie fisiologiche e strutturali, i meccanismi e fattori coinvolti in questi processi di organogenesi siano anch'essi simili.

## 1.12 RICONOSCIMENTO, INFEZIONE, INVASIONE E FORMAZIONE DEL NODULO AZOTO-FISSATORE

L'intero processo che porta alla formazione del nodulo prevede che si verifichino tre eventi fondamentali: il riconoscimento pianta-batterio; lo sviluppo dei noduli radicali e la fissazione dell'azoto atmosferico. Affinché ciascuno di tali eventi possa verificarsi, sia la pianta che il batterio devono subire un processo di differenziamento concertato che richiede variazioni specifiche nell'espressione genica di entrambi i simbionti. In particolare, la formazione dei noduli radicali comporta l'espressione di specifici geni eucariotici chiamati noduline. Queste sono classificate come precoci o tardive a seconda del momento in cui vengono espresse durante lo sviluppo del nodulo. Le noduline precoci sono coinvolte nel processo di infezione e nell'organogenesi del nodulo, mentre le noduline tardive sono associate con la fissazione dell'azoto e gli scambi metabolici tra i simbionti.

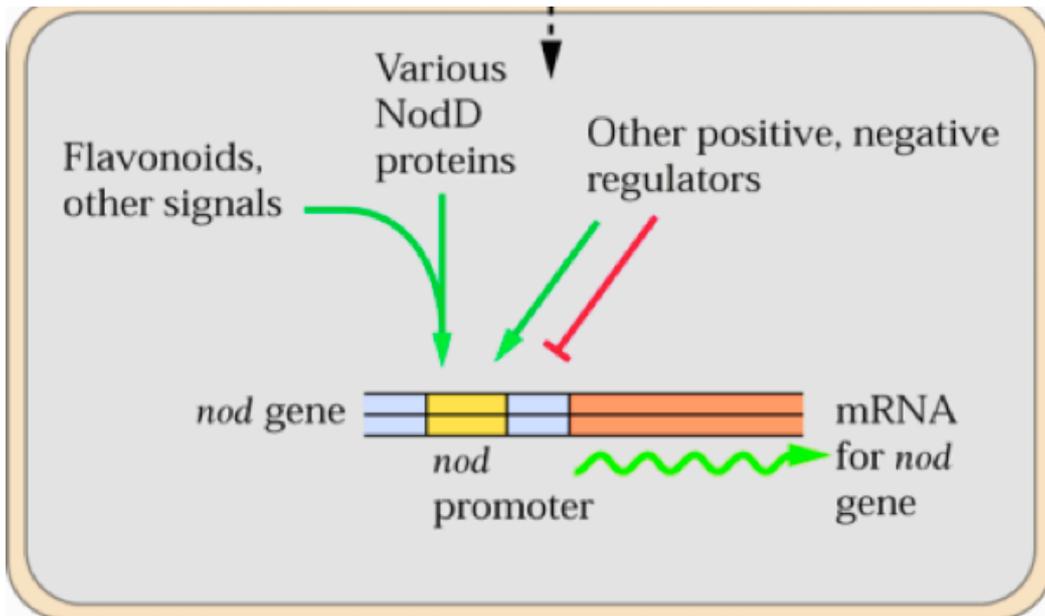
Per quanto riguarda i geni batterici coinvolti nelle fasi precoci della simbiosi, questi includono i geni per la nodulazione (geni *nod*), codificanti per i cosiddetti Fattori di Nodulazione (Nod) e diversi gruppi di geni codificanti per le strutture di superficie lipo-polisaccaridiche del batterio (geni *eps*, *lps*) che sono importanti per l'iniziale attacco del batterio alla superficie della radice. Sono invece espressi più tardivamente i geni *nif* e *fix*, coinvolti nel processo di fissazione dell'azoto.

Il luogo fisico in cui inizia l'interazione pianta-micro-organismo è rappresentato dai peli radicali ed in particolare da quelli che si trovano in una regione molto precisa e circoscritta delle radici in cui i peli radicali stanno completando il loro processo morfogenetico di allungamento (Figura 11). Solo i peli radicali di questa regione e non quelli della parte più giovane della radice né tantomeno quelli della regione più vecchia che hanno già completato il processo di allungamento, sono competenti per rispondere all'infezione di *Rhizobium* con la formazione del nodulo radicale.

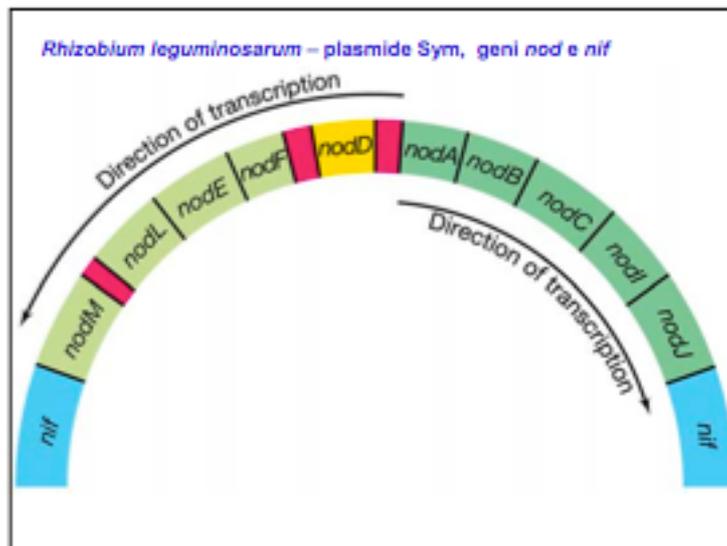


**Figura 11.** Particolare di radice primaria in cui è evidenziata la regione dei peli radicali competenti al processo di infezione da parte di *Rhizobium*.

Negli ultimi anni il meccanismo molecolare dell'interazione tra pianta e batterio è stato oggetto di numerosi studi e ciò ha anche consentito una approfondita caratterizzazione dei diversi eventi che si verificano nel corso dell'interazione che sono facilmente identificabili con tecniche di microscopia ottica. Il primo evento del dialogo molecolare tra pianta e batterio avviene quando la pianta rilascia composti fenolici, i flavonoidi, la cui sintesi può essere indotta da diversi stress biotici, tra i quali la carenza di azoto nel terreno di crescita. Questi flavonoidi vengono escreti nella rizosfera e riconosciuti dalla proteina NodD di *Rhizobium*, un regolatore trascrizionale che si lega direttamente a tali molecole segnale, attivando così l'espressione di diversi geni. NodD si lega alle regioni promotrici dei geni batterici *nod*, inducendone l'espressione. L'operone dei geni *nod* contiene geni comuni, *nodA*, *nodB* e *nodC*, e geni ospite specifici come *nodP* e *nodQ* (Figura 12).



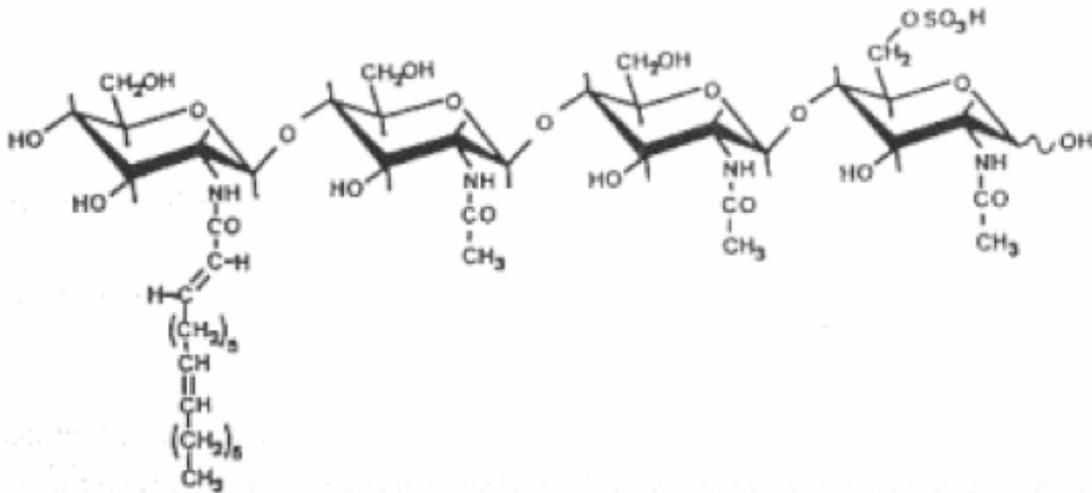
A



B

**Figura 12.** Geni *nod* di *Rhizobium*. A. Meccanismo di attivazione dei geni *nod*. B. Operone geni *nod*.

La struttura dei fattori Nod prodotti dai diversi batteri consiste in uno scheletro composto da 4 o 5 residui di  $\beta$  1-4 N-acetil-glucosammina con una lunga catena acilica legata alla glucosammina terminale (Figura 13).



**Figura 13.** Struttura dei fattori Nod.

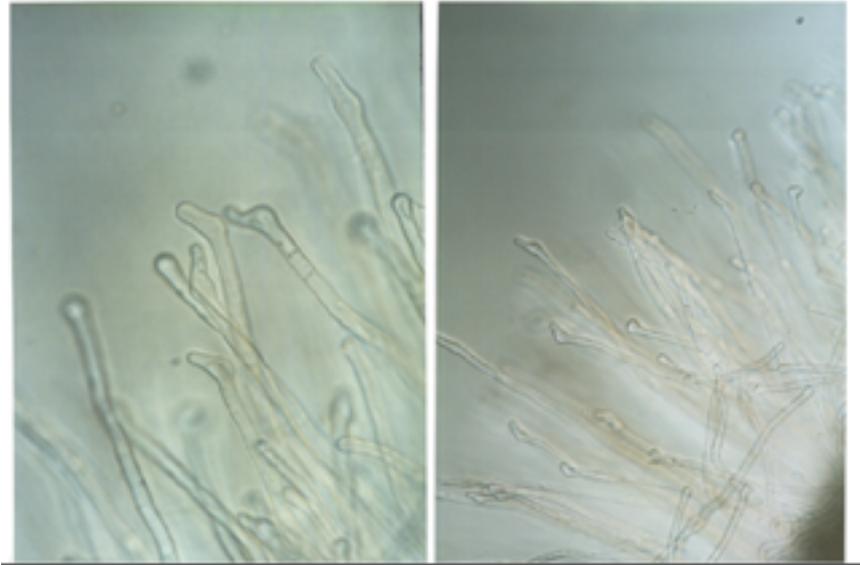
Le differenze tra i vari fattori Nod consistono: nel numero dei residui di glucosammina, nella lunghezza delle catene di acidi grassi saturi legati all'estremità non riducente della catena di zuccheri e nel tipo di sostituito legato all'altra estremità (gruppo sulfatilico, metilico, fucosilico, arabinosilico ecc.). Queste differenze, ed in particolare il tipo di sostituito legato, sono il principale determinante della specificità d'ospite, dovuta al fatto che diversi ceppi di *Rhizobium* sono in grado di sintetizzare diversi tipi di fattori Nod che sono riconosciuti da diversi tipi di leguminose (Figura 14).

indeterminato		<p>S. meliloti</p> <p><b>R. leguminosarum</b></p> <p>bv. trifolii</p> <p>M. loti</p> <p>R. huakuii</p> <p>R. ciceri</p> <p>R. NGR234</p>	<p>Medicago, Melilotus, Trigonella</p> <p><b>Vicia</b>, Pisum, Lathyrus, Lens</p> <p>Trifolium spp.</p> <p>Lotus spp.</p> <p>Astragalus sinicus</p> <p>Cicer arietinum</p>
determinato		<p>R. tropici</p> <p><b>R. etli</b></p> <p>R. galegae</p> <p>R. fredii</p> <p>B. japonicum</p> <p>B. elkanii</p> <p>A. caulinodans</p>	<p>Tropical legumes, Parasponia spp.</p> <p>Macroptilium spp., Leucaena spp.</p> <p><b>Phaseolus vulgaris</b></p> <p>Galega officinalis, G. orientalis</p> <p>Glycine max, G. soja</p> <p>Glycine max, G. soja</p> <p>Glycine max, G. soja</p> <p>Sesbania spp.</p>

**B:** Bradyrhizobium; **M:** Mesorhizobium; **R:** Rhizobium; **S:** Sinorhizobium

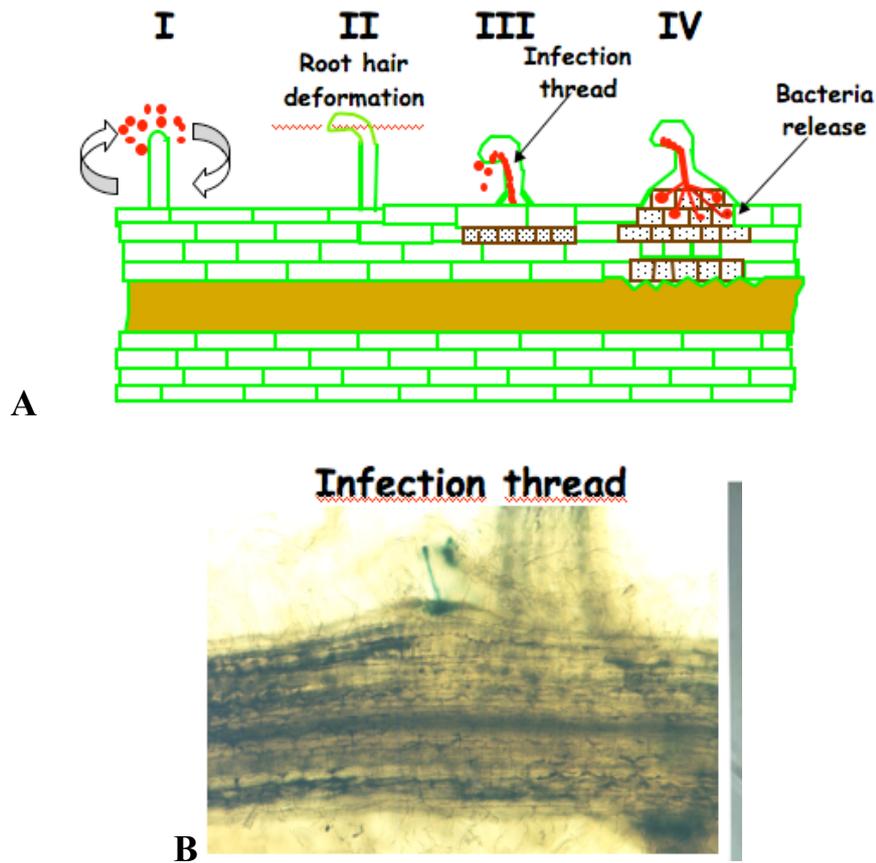
**Figura 14.** Ceppi di *Rhizobium* riconosciuti dalle diverse specie di piante leguminose

La prima evidente risposta delle radici della pianta leguminosa in seguito al contatto con *Rhizobium* è la deformazione e l'arricciamento dei peli radicali (Figura 14; Verma *et al.*, 1992). La deformazione del pelo radicale che, come detto precedentemente, avviene in una precisa regione della radice, è dovuta ad un evento di re-inizio di crescita della punta del pelo radicale ed è preceduta da un rigonfiamento di quest'ultima (figura 15). Infatti, nella regione competente della radice, in seguito ad infezione con *Rizobio* o ad aggiunta di Fattori Nod, si osserva nuovamente la formazione, nel *tip* del pelo, della cosiddetta zona lucida del citoplasma in cui non sono presenti organelli di alcun tipo e che preclude l'inizio dell'allungamento dei peli.



**Figura 15.** Immagine al microscopio della deformazione dei peli radicali *in vivo* in seguito all'aggiunta di *Rhizobium* o dei fattori Nod purificati.

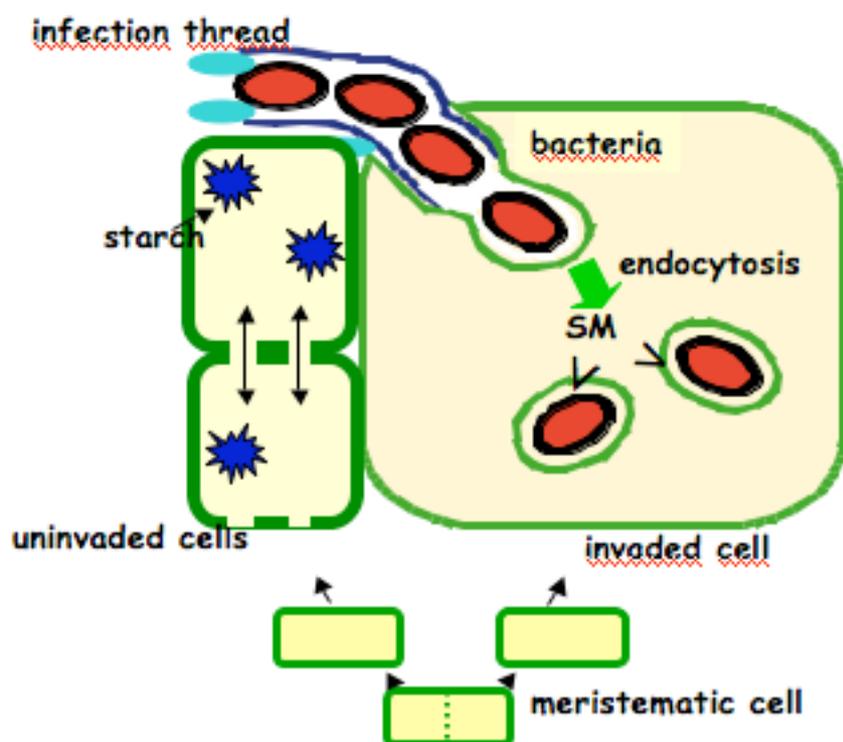
I batteri vengono successivamente intrappolati nella zona arricciata del pelo dove inducono delle lesioni locali nella parete cellulare. Quindi, attorno al batterio infettante viene depositato del materiale simile a quello della parete cellulare vegetale, che andrà a formare una struttura nota come canale d'infezione nel quale i batteri penetrano e proliferano (Figura 14). Questa rappresenta una barriera fisica di separazione fra il micro-organismo infettante e le strutture cellulari vegetali. Questa separazione fisica viene mantenuta anche più tardivamente nelle fasi in cui avviene la fissazione dell'azoto e potrebbe rappresentare un sistema evoluto per consentire il processo d'infezione di *Rhizobium*, distinguendolo da quello di un batterio patogeno. Contemporaneamente all'allungamento del canale d'infezione all'interno del pelo, le cellule della corteccia della radice si dedifferenziano ed iniziano a dividersi per formare il primordio del nodulo (Figura 16). Successivamente, avviene la ramificazione dei tubi di infezione che sono quindi in grado di invadere le cellule del primordio per permettere il rilascio dei batteri dai canali d'infezione (Figura 16).



**Figura 16.** Prima risposta delle radici della pianta leguminosa in seguito al contatto con *Rhizobium*. A. Deformazione e arricciamento dei peli radicali, intrappolamento dei batteri, formazione e allungamento del canale di infezione, divisione delle cellule corticali radicali, ramificazione del tubo di infezione, invasione e rilascio dei batteri. B. Particolare del canale di infezione, ottenuto utilizzando un ceppo di *Rhizobio* trasformato con un costrutto *lacZ* costitutivo.

Questa fase si verifica per endocitosi ed i batteroidi, circondati da una membrana di origine vegetale chiamata peribatteroidale, vengono a trovarsi all'interno di organelli chiamati simbiosomi che occupano gran parte del citoplasma della cellula invasa dove sono ancora separati fisicamente dal citoplasma di queste ultime (Figura 17).

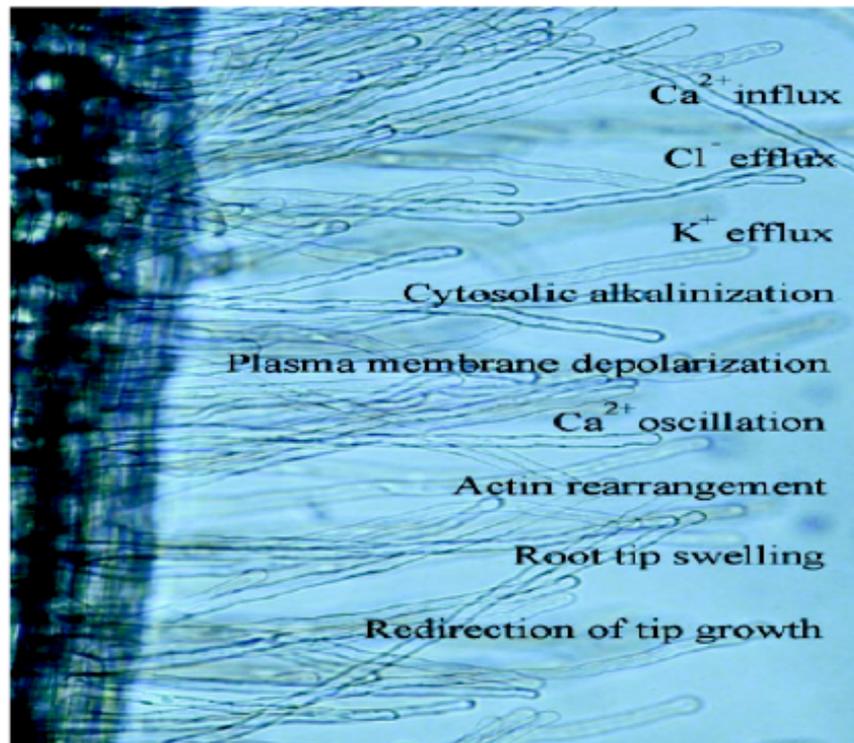
I batteroidi giovani smettono di dividersi e si differenziano nella forma matura capace di fissare l'azoto atmosferico (Nap and Bisseling, 1989). Contemporaneamente all'infezione delle cellule della parte centrale del primordio, tutt'intorno si formano i tessuti periferici: il parenchima con i canali vascolari, l'endoderma e la corteccia.



**Figura 17.** Rilascio dei batteri per endocitosi nelle cellule del primordio, queste cellule, sono circondate da cellule non invase riconoscibili dall'accumulo di amido.

### 1.13 EVENTI PRECOCI E *PATHWAY* DI TRASDUZIONE DEI FATTORI NOD

Le piante sono in grado di percepire i fattori Nod anche a basse concentrazioni,  $10^{-12}$  M, il che suggerisce chiaramente la presenza di recettori specifici di pianta con un'alta affinità di legame. I fattori Nod inducono, in forma purificata ed in assenza di *Rhizobium*, la maggior parte dei cambiamenti che si osservano sulle radici delle piante durante gli stadi precoci dell'infezione, eccetto lo sviluppo del filamento di infezione. Sono in grado di indurre riarrangiamenti nei filamenti di actina e nel citoscheletro del citoplasma dei peli radicali che sono propedeutici all'evento di deformazione e sono anche coinvolti nella formazione di una struttura pre-infettiva che si forma nelle cellule del primordio nodulare che stanno per essere invase dal filamento d'infezione, ma sono necessari i batteri affinché quest'ultima struttura possa svilupparsi in maniera adeguata. Negli ultimi 5 anni, studi combinati di elettrofisiologia e microscopia confocale associata all'uso di coloranti sensibili alla concentrazione ionica, hanno consentito di caratterizzare una serie di eventi che hanno luogo a partire da pochi secondi dall'aggiunta di fattori Nod, che precedono l'evento di deformazione del pelo radicale (il primo evento facilmente identificabile per microscopia ottica) e consistono essenzialmente in due tipi di flussi ionici. Inizialmente, viene indotta una depolarizzazione transiente della membrana, che è il risultato di un influsso di ioni calcio a partire dal mezzo esterno. Questo influsso di  $Ca^{2+}$  è immediatamente seguito da un efflusso di  $Cl^-$  e  $K^+$  con conseguente alcalinizzazione del citoplasma. Successivamente, a distanza di pochi minuti dall'aggiunta di fattori Nod, vengono indotte oscillazioni nelle concentrazioni citosoliche del calcio, nelle vicinanze del nucleo del pelo radicale, fenomeno noto come *Ca<sup>2+</sup> spiking*. Solo a distanza di almeno tre ore avviene il riarrangiamento citoscheletrico associato alla deformazione del pelo radicale, l'induzione di alcune noduline precoci e la divisione delle cellule corticali (Figura 18).



**Figura18.** Immagine al microscopio elettronico di peli radicali di una pianta leguminosa poche ore dopo l'aggiunta di fattori Nod. Sono indicati gli eventi che precedono la deformazione del pelo radicale.

Nella pianta *Lotus japonicus* sono stati isolati numerosi mutanti incapaci di nodulare dopo infezione con *Rhizobium* ed essi sono stati discriminati sulla base dell'analisi dei fenotipi precoci appena descritti. I due mutanti che identificano due geni chiamati rispettivamente *LjNFR1* e *LjNFR5* (*NFR* = *Nod Factor Reception*), ad esempio, svolgono una funzione primaria nella percezione dei fattori Nod, in quanto incapaci di mostrare tutti i fenotipi precoci appena descritti (Figura 17).

Essi vanno quindi posti molto in alto in una ideale cascata di fattori coinvolti nelle varie fasi che si susseguono in seguito all'aggiunta di fattori Nod (Figura 18). In accordo con ciò, *LjNFR1* e *LjNFR5* codificano per recettori di membrana di tipo chinasi, con un dominio extracellulare ricco in lisine. Questi domini sono stati identificati in batteri dove probabilmente sono responsabili dei legami di proteine a polimeri di N-acetilglucosamina che, come abbiamo visto, rappresentano lo

scheletro dei fattori Nod. Gli orologi di *LjNFR5* sono stati isolati in *Pisum sativum*, *PsSYM10* e in *Medicago truncatula*, *MtNFP*, inoltre in *Medicago* sono stati isolati altri due geni *MtLYK3* e *MtLYK4* codificanti per proteine con domini ricchi in residui di lisina ed una elevata similitudine con *LjNFR1*.

Secondo il modello correntemente accettato, l'eterodimero composto dai geni *LjNFR1* e *LjNFR5*, che probabilmente interagiscono attraverso i loro domini chinasici citoplasmatici, rappresenta il sistema recettore dei fattori Nod anche se un'interazione fisica diretta con tali fattori non è ancora stata dimostrata.

In aggiunta a questi recettori, lo *screening* dei mutanti ottenuti in *Medicago truncatula* oltre che in *Lotus japonicus* ha consentito l'identificazione di altri loci, a valle, coinvolti nella trasduzione del segnale dei fattori Nod. Un altro mutante identificato in *Lotus japonicus* è il *SYMRK* (*Symbiosis Receptor Like Kinase*) isolato nel 2002 da Parniske e collaboratori. Anch'esso codifica per un recettore chinasico di membrana ed ha un fenotipo che lo colloca più a valle di *LjNFR1* e *LjNFR5* nel *pathway* di trasduzione dei Fattori Nod (Figura 18) in quanto tale mutante è in grado di recepire questo segnale, esibendo sia l'iniziale influsso di calcio che la deformazione del pelo radicale (Figura 17). In particolare, *SymRK* è costituito da un peptide segnale, un dominio extracellulare, formato da ripetizioni ricche in leucina, un dominio transmembrana e un dominio proteico intracellulare di tipo chinasico.

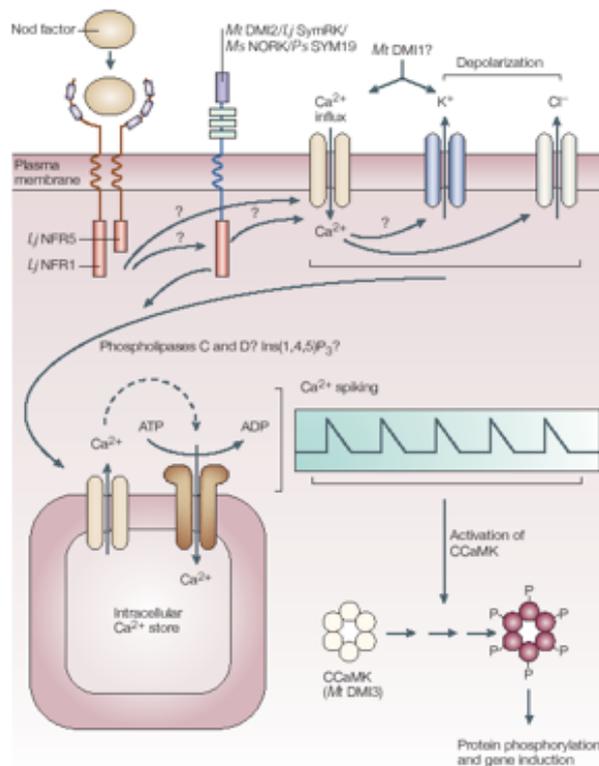
Un fenotipo simile è anche mostrato dai mutanti *Castor*, *Pollux* e *NUP133* (Figura 17) che, come *SymRK* sono evidentemente coinvolti nello stabilirsi dell'evento di *calcium spiking*. Questi 4 geni sono coinvolti anche nel *pathway* di simbiosi micorrizica suggerendo che i due processi di nodulazione e micorrizzazione abbiano evoluto in comune parte dei loro *pathways* e fattori coinvolti. Le proteine codificate da questi geni sono, nel caso di *Castor* e *Pollux*, dei potenziali canali ionici multimerici localizzati sui plastidi dei peli radicali, mentre per quanto riguarda *NUP133*, questa è una *Nucleoporin Protein*. Quindi, due diversi compartimenti cellulari quali plastidi e nucleo sembrano essere coinvolti nelle fasi precoci della

trasduzione del segnale dei fattori Nod ed in particolare sono essenziali per lo svolgimento dell'evento di *calcium spiking* (Figura 20).

Il mutante nel gene *CcaMK* identifica un legame di tipo fisiologico fra l'evento di *calcium spiking* e la successiva attivazione delle noduline e formazione del primordio nodulare. *CcaMK* infatti, codifica per una *calcium-binding calmodulin-binding kinase protein*. Il mutante di questo gene è in grado di svolgere l'evento di *calcium spiking* (Figura 19) e quindi questo sembra essere coinvolto nella decodificazione di questo fenomeno, per trasdurre successivamente il segnale attraverso la sua attività chinasi, a degli attivatori trascrizionali primari che inducono la trascrizione delle noduline precoci (Figura 20). In accordo con questo modello i mutanti, *NSP1* e *NSP2* identificano due tipici Fattori Trascrizionali Primari appartenenti alla famiglia GRAS che hanno un fenotipo simile a quello di *CCaMK*, sono cioè in grado di effettuare il *calcium spiking* ma non di indurre divisione delle cellule corticali (Figura 19). Recentemente il ruolo cruciale di *CCaMK* è stato dimostrato dall'isolamento in *Lotus* di mutanti con una parziale, costitutiva attività fosforilatrice, che presentano un fenotipo di nodulazione spontanea in assenza sia di *Rhizobium* che di fattori Nod (Tirichine *et al.*, 2006). Anche il gene di *Lotus*, *LjNIN* e il suo ortologo in *Pisum PsSYM35*, hanno un ruolo cruciale per l'induzione della divisione cellulare e quindi della formazione del nodulo radicale, come indicato dal fenotipo della linea mutante *nin* (Figura 19). NIN è una proteina transmembrana con un potenziale segnale di localizzazione nucleare e un dominio di legame al DNA (Schauser L. *et al.*, 1999).

	<i>Ca<sup>2+</sup></i> influx	<i>Ca<sup>2+</sup></i> spiking	Deformazione peli radicali	Divisione cellulare
wt	+	+		
<i>NFR1</i>	-	-	-	-
<i>NFR5</i>	-	-	-	-
<i>SYMRK/NFR1</i>	-	-	-	-
<i>SYMRK</i>	+	-		
<i>CASTOR</i>	+	-	-	-
<i>POLLUX</i>	+	-	-	-
<i>NUP133</i>	+	-	-	-
<i>CCoMK</i>	+	+	-	-
<i>NSP1</i>	+	+	-	-
<i>NSP2</i>	+	+	-	-
<i>NIN</i>	+	+	-	-

**Figura 19.** Fenotipi precoci di vari mutanti recentemente caratterizzati in *Lotus japonicus*.



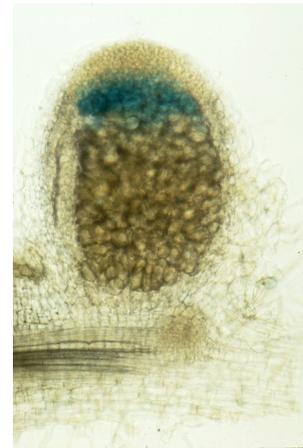
**Figura 20.** Via di trasduzione del segnale Fattori Nod nelle piante leguminose, Oldroyd and Downie, *Nature Mol. Cell Biol*, 2004.

## **1.14 NODULI DETERMINATI E INDETERMINATI**

Sulle radici delle leguminose è possibile osservare la formazione di due tipi di noduli. I noduli indeterminati che si formano sulle radici dei legumi temperati come alfalfa e pisello, ed i noduli determinati che si formano sulle radici di leguminose tropicali come Fagiolo, Lupino e Soia (Figura 21). I primi sono caratterizzati dalla presenza di una zona apicale formata da cellule indifferenziate, cioè da un meristema apicale persistente. Le cellule radicali che rientrano nel ciclo cellulare e si dividono in seguito all'infezione sono quelle degli strati interni del cortex. Queste formano quindi il primordio nodulare prima e successivamente i tessuti centrali del nodulo maturo. Mentre le cellule meristematiche sono spinte verso l'esterno, il canale d'infezione all'interno del quale *Rhizobio* prolifera attivamente penetra il primordio del nodulo, si ramifica ed inverte la direzione di crescita per svilupparsi verso il meristema nodulare apicale. In sezioni longitudinali del nodulo di tipo indeterminato, criteri citologici e molecolari permettono di definire spazialmente e funzionalmente le varie zone tissutali dei noduli maturi: la zona I (meristemica apicale) priva di batteri; la zona II (di invasione) nella quale i canali d'infezione infettano le nuove cellule in divisione; la zona III (zona simbiotica precoce) dove le cellule invase sono piene di batteroidi maturi che fissano azoto; la zona IV (zona simbiotica tardiva) che presenta cellule invase piene di batteroidi in senescenza (Figura 22).

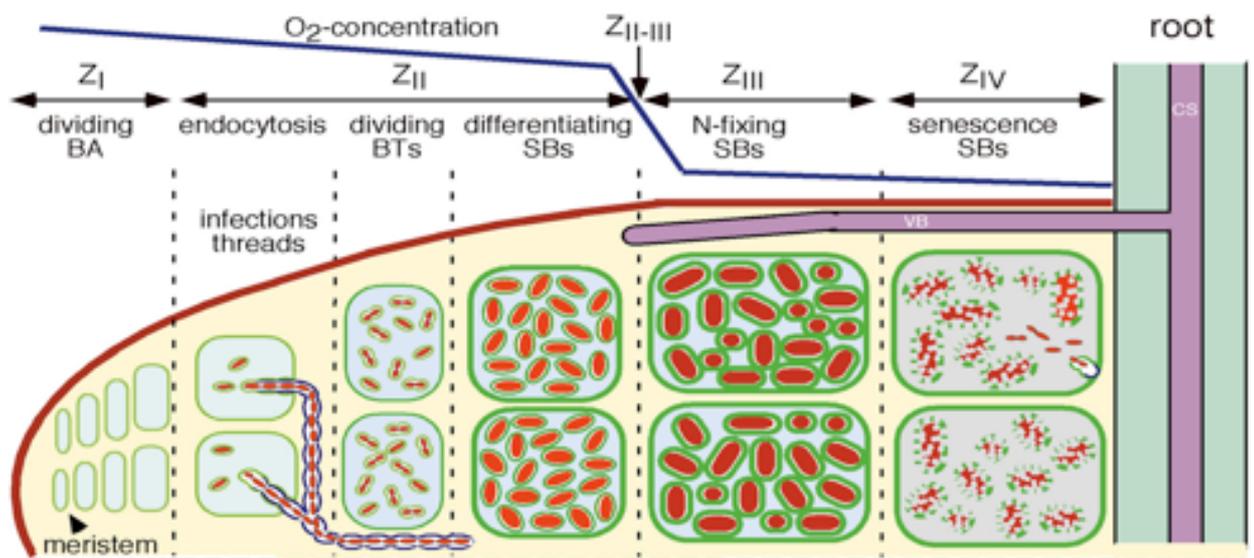


**A**



**B**

**Figura 21.** Sezione longitudinale al vibratomo di noduli, **A.** Nodulo determinato **B.** Nodulo indeterminato



**Figura 22.** Schema di sezione longitudinale di nodulo indeterminato con indicazione delle zone e dei fattori coinvolti (Patriarca *et al.*, 2002).

L'interzona II-III, localizzata tra la zona d'invasione e quella simbiotica, è caratterizzata dalla deposizione di amido negli amiloplasti delle cellule invase e da importanti eventi di modificazione dell'espressione genica (Vasse *et al.*, 1990).

In queste zone è stata osservata l'espressione di specifiche noduline che confermano l'esistenza di un programma di espressione genica spazialmente definito (Franssen *et al.*, 1992). La presenza quindi di un meristema apicale persistente che aggiunge continuamente nuove cellule invase al tessuto centrale caratterizza i noduli di tipo indeterminato, nei quali quindi la crescita del nodulo ed il suo funzionamento avvengono simultaneamente.

Nei noduli radicali determinati invece non è evidente la presenza di un meristema persistente. Il programma di sviluppo dei noduli determinati maturi non è ancora stato completamente chiarito ma questi sono descrivibili come strutture globose formate da tessuti periferici e da un tessuto centrale dove le cellule mostrano un certo livello di sviluppo sincro (Newcomb *et al.*, 1979). Questo modello prevede l'invasione simultanea di alcune cellule del primordio del nodulo che si dividono poche volte e si differenziano aumentando il loro volume. Quindi la crescita del nodulo determinato sarebbe dovuta principalmente ad espansione cellulare e solo in parte all'attività mitotica e non sono visibili zone di sviluppo del tessuto centrale analoghe a quelle dei noduli indeterminati (Franssen *et al.*, 1992). Recentemente comunque anche nel nodulo determinato sono state definite delle zone che si differenziano dal punto di vista dello stadio di sviluppo, del momento in cui subiscono l'invasione del tubo di infezione e dei profili di espressione genica (Tatè *et al.* 2004).

## 1.15 LA NITROGENASI ED IL METABOLISMO AZOTATO NEL NODULO

In condizioni di vita libera, i batteri assimilano l'azoto disponibile nel suolo sotto forma di nitrato, ammonio, amminoacidi, ecc., mentre nel citoplasma delle cellule invase del nodulo, i batteroidi smettono di dividersi, si differenziano e fissano l'azoto atmosferico riducendolo ad ammonio che viene poi esportato alla pianta sotto forma di amminoacidi. I batteri passano quindi da un metabolismo azotato di tipo assimilativo, durante la crescita nel tubo d'infezione, ad uno di tipo fissativo in cui tutto l'ammonio viene rilasciato alla pianta, all'interno dei simbiosomi (vedi Par. 1.13). In accordo con ciò, i geni batterici coinvolti nel trasporto e nell'assimilazione dell'azoto sono *down*-regolati al momento del rilascio per endocitosi nelle cellule del primordio nodulare. E' stato ad esempio dimostrato che i batteroidi non trasportano l'ammonio, infatti non esprimono il gene *amtB*, per il trasporto ad alta affinità.

Il processo di fissazione dell'azoto è catalizzato dalla nitrogenasi e richiede un considerevole dispendio di energia di attivazione in quanto l'azoto è un gas non reattivo con un legame molto forte tra i due singoli atomi. L'enzima è un complesso oligomero, costituito da due componenti proteiche diverse, la ferroproteina, un dimero formato da due subunità identiche che contiene due siti di legame per l'ATP, e la ferro molibdeno proteina, un tetramero. Nel processo di fissazione dell'azoto il NADH, donatore primario di elettroni, li trasferisce alla ferredossina, che così ridotta a sua volta li trasferisce alla ferroproteina della nitrogenasi. La ferroproteina quindi si lega all'ATP, che ne fa aumentare il potere riducente e rende possibile il trasferimento degli elettroni alla ferro molibdeno proteina.

L'ATP viene idrolizzata in ADP-Pi, quando la ferroproteina è ossidata e la proteina ferromolibdeno a questo punto trasferisce gli elettroni all'azoto atmosferico che così si lega alla proteina. Il complesso enzimatico della nitrogenasi è codificato dai geni *nif* che ne controllano il funzionamento e la regolazione. L'enzima nitrogenasi è piuttosto sensibile alle alte concentrazioni di ossigeno e, all'interno della cellula, deve essere protetto dall'inattivazione da parte di questo.

L'O<sub>2</sub> viene legato da una proteina, la leghemoglobina (leg-Hb), una nodulina tardiva che svolge un ruolo analogo all'emoglobina. La proteina si concentra nel citoplasma delle cellule invase del nodulo, lega l'O<sub>2</sub> mantenendo la sua concentrazione bassa, ma assicurandone allo stesso tempo un continuo rifornimento.

L'ammonio, oltre ad essere il prodotto finale della fissazione dell'azoto svolge anche una funzione regolativa, che può agire positivamente o negativamente nei vari stadi della simbiosi (Patriarca *et al.* 2002). A basse concentrazioni, l'azoto combinato sotto forma di ammonio, nitrato o urea può avere un effetto positivo sulla formazione e sviluppo dei noduli. Invece, la presenza eccessiva di fonti di azoto nel terreno, riduce la nodulazione, e in particolare il numero di siti di infezione sulle radici, ed inibisce la formazione la crescita e il funzionamento del nodulo (Zahran, 1999).

L'ammonio è in grado di regolare il processo simbiotico sin dalle prime fasi. Ad esempio, la produzione dei flavonoidi da parte delle piante è indotta da vari fattori di stress tra cui la condizione di crescita in carenza di azoto. I flavonoidi inducono la trascrizione dei geni *nod* che a sua volta è inibita in condizioni di eccesso di ammonio. Inoltre, è stato dimostrato come la struttura di questi fattori possa modificarsi in risposta a cambiamenti di pH del mezzo, fortemente influenzato dalla concentrazione di azoto. L'azoto, sotto forma di NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> risulta essere un potente inibitore del processo di deformazione dei peli radicali, della divisione delle cellule corticali e della formazione del filamento d'infezione. Nelle fasi più tardive l'aggiunta di NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, inibisce anche l'attività della nitrogenasi influenzando l'attività della leghemoglobina. Per i noduli indeterminati l'ammonio è un segnale positivo necessario per il corretto sviluppo. Infatti, questi noduli quando sono indotti da un ceppo di *S. meliloti*, mutato nei geni *nif* delle nitrogenasi, non in grado perciò di fissare l'azoto, mostrano solo inizialmente un normale processo di organogenesi che non viene poi completato, determinando una precoce senescenza.

Questo non vale per i noduli determinati infatti, anche se ottenuti dall'infezione con un mutante della nitrogenasi *nifH*, non mostrano difetti di sviluppo.

In questo caso quindi l'ammonio derivante dal simbiosoma non rappresenta un segnale di regolazione dell'organogenesi.

L'ammonio agisce anche da segnale che regola il numero di noduli, infatti radici infettate con un ceppo *Fix<sup>-</sup>*, non in grado di fissare l'azoto, formano un numero di noduli molto maggiore rispetto a quello che normalmente si forma sulle radici di piante infettate con un ceppo *Fix<sup>+</sup>* (Patriarca *et al.* 2002).

## 1.16 IL MECCANISMO DI AUTOREGOLAZIONE

Le piante leguminose, non solo posseggono un macchinario molecolare finemente regolato deputato allo svolgimento del processo di organogenesi dei noduli, ma ne hanno anche uno, in grado di controllare l'efficienza del processo ed in particolare il numero dei noduli formati.

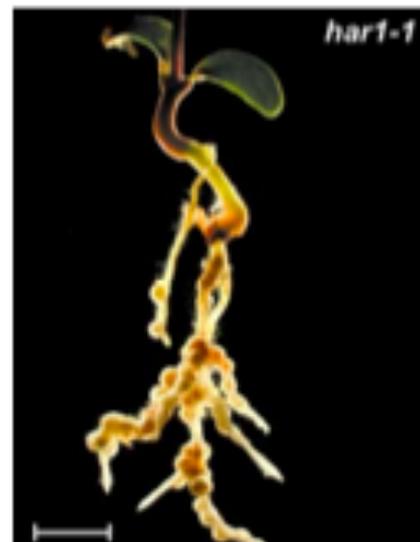
Questo sistema, definito di autoregolazione, è di tipo sistemico a *feedback*. L'autoregolazione controlla il numero di noduli che si formano sulle radici della pianta in seguito all'infezione, la densità e la loro disposizione lungo le radici. Questo processo avviene attraverso un segnale molecolare, codificato dalla parte aerea della pianta, poche ore dopo l'infezione da parte del batterio, e fa sì che solo i primi eventi di infezione siano in grado di arrivare al completamento del processo di organogenesi del nodulo, mentre tutti gli altri eventi di infezione più tardivi abortiscono precocemente. Il gene responsabile del processo di autoregolazione isolato in *Lotus japonicus* nel 2002 da Stougaard e collaboratori è il gene *HARI* (*Hypernodulation aberrant root formation*), che codifica per una proteina di tipo chinasi (RLK) ricca di ripetizioni in leucina (LRRs), con un singolo dominio transmembrana e un dominio di fosforilazione serina/treonina ( Figura 23). Gli ortologhi di *HARI* sono stati isolati in altre leguminose quali soia, *GmNARK* (*Glycine max* Nodule Autoregulation Receptor Kinase), pisello, *PSSym29* (*Pisum sativum* Symbiosis29) e *Medicago truncatula MtSUNN* (*Medicago truncatula* Super Numeric Nodules). Quando questi geni sono mutati è possibile osservare sulle radici della pianta un'iper-formazione di noduli. Questi mutanti, inoltre sono in grado di nodulare

anche in presenza di alte concentrazioni di nitrato nel mezzo esterno. L'omologo di questi geni in *Arabidopsis thaliana* è stato identificato nel gene *CLAVATA1*, che regola negativamente la formazione degli apici meristematici e florali, attraverso una comunicazione cellula-cellula. Questo stesso meccanismo di regolazione, attraverso l'instaurarsi di un meccanismo di comunicazione tra gli organi, è stato analogamente proposto per i geni responsabili dell'autoregolazione nelle leguminose.

In generale, è possibile classificare tre categorie di mutanti ipernodulanti: i mutanti tolleranti all'azoto (*nts*), che formano un elevato numero di noduli lungo tutta la lunghezza della radice, i mutanti insensibili all'etilene, che formano noduli che crescono vicini tra loro in una zona circoscritta della radice, e i mutanti insensibili alla luce. Il numero di noduli che si formano sulle radici di questi ultimi mutanti è il doppio rispetto a quelli delle piante *wild type*, mentre rimane uguale la loro densità e disposizione lungo la radice. Altri segnali implicati nel processo di autoregolazione sono rappresentati dai fitormoni, brassinoteroidi, acido abscissico e acido jasmonato, che sembrano essere i ligandi che agiscono a valle del sistema (Oka-kira *et al.* 2006).



A



B

**Figura 23.** Fenotipo di nodulazione di piante di *Lotus japonicus*: **A.** Piante *wild type* ecotipo Gifu **B.** Piante mutate nel gene *har1*, con fenotipo ipernodulante.

## SCOPO DEL PROGETTO DI DOTTORATO

Nonostante lo sviluppo, soprattutto negli ultimi 15 anni, degli studi mirati alla elucidazione del ruolo svolto dai trasportatori dell'ammonio nella fisiologia del metabolismo azotato delle piante, sono ancora molte le domande rimaste senza risposta. Innanzitutto non è ancora chiaro come le famiglie di trasportatori dell'ammonio, che presentano un numero diverso di membri nelle diverse piante, sia in grado di soddisfare le richieste di nutrienti azotati che possono cambiare continuamente nel corso dello sviluppo di una pianta.

In letteratura, sono solo poche le evidenze dirette sul ruolo svolto dai trasportatori dell'ammonio ad alta affinità nel flusso generale di composti azotati fra l'ambiente e la pianta ed all'interno di quest'ultima. La caratterizzazione quindi di un'intera famiglia di trasportatori può consentire di avere un'idea completa dei vari flussi azotati e risulta propedeutica alla caratterizzazione funzionale tesa all'identificazione dei ruoli, presumibilmente diversi, giocati dai vari membri della famiglia.

Nel corso del Dottorato ho quindi identificato i 3 membri della famiglia *AMT1* di *Lotus japonicus* e analizzato le loro caratteristiche biochimiche in *S. cerevisiae*, definendo i parametri di costante di affinità ( $K_m$ ), velocità massima ( $V_{max}$ ) e costante di inibizione ( $K_i$ ). Inoltre, è stata analizzata la loro espressione sia dal punto di vista spaziale, in tutti gli organi della pianta, che in diverse condizioni di crescita e sviluppo. Questo quadro generale d'informazioni, come ad esempio la forte espressione in foglie, ha suggerito una possibile regolazione dell'espressione legata alla produzione dell'ammonio nel corso della fotorespirazione che è stata investigata in un mutante delle GS plastidica di *Lotus*. Infine sulla base delle informazioni acquisite, ho iniziato un approccio genetico basato su linee cellulari transgeniche di *Lotus japonicus* per verificare la funzione di trasporto di uno dei membri della famiglia fortemente indotto in condizioni di carenza di azoto.

La scelta della pianta *Lotus japonicus* come sistema sperimentale del mio progetto di Dottorato, è legata ad un secondo livello di investigazione. Infatti, nelle piante leguminose, lo studio dei geni deputati al trasporto dell'ammonio, si arricchisce di un ulteriore significato perché, a differenza delle altre piante, attraverso il processo di simbiosi azoto-fissativo, sono in grado di acquisire una sorgente addizionale di ammonio legata allo svolgimento del processo di organogenesi del nodulo e del suo funzionamento. Uno dei motivi d'interesse è quindi legato alla comprensione dei meccanismi con cui l'ammonio addizionale, fornito dal nodulo, si integra nel meccanismo generale di controllo che regola il trasporto e la distribuzione di questo elemento all'intera pianta.

Come ampiamente descritto nell'introduzione l'ammonio svolge un ruolo regolativo fondamentale in tutte le varie fasi dell'interazione simbiotica e di conseguenza i trasportatori di questo componente possono svolgere un ruolo importante come modulatori di tali effetti regolativi. In particolare, sono varie le fasi del processo di simbiosi in cui i trasportatori potrebbero essere implicati. Nelle primissime fasi potrebbero contribuire ad "avvertire" la condizione di carenza di azoto nel mezzo esterno e segnalarlo alla pianta in modo da dare il via a tutti gli eventi successivi. Questa funzione è in accordo con la teoria secondo cui i geni *Amt* possono svolgere un ruolo di *sensing* del segnale carenza di azoto nel mezzo esterno, legando tale capacità ad un preciso processo di sviluppo, come dimostrato per il mutante *mep2* di *S.cervisiae*. Tale ruolo di sensori potrebbe anche essere esercitato durante la fase di invasione del batterio quando i prodotti del metabolismo azotato rilasciati da *Rizobio* potrebbero rappresentare un segnale che consente alla pianta di riconoscere il simbionte come un *partner* efficiente per la fissazione dell'azoto e decidere quindi di proseguire nel processo di organogenesi del nodulo. E' stato ad esempio dimostrato che l'ammonio prodotto dalla nitrogenasi è necessario per lo sviluppo dei noduli indeterminati. Infine, i trasportatori potrebbero essere implicati ovviamente nel trasporto dell'ammonio ridotto dai batteroidi, attraverso la membrana

peribatteroidale al citoplasma delle cellule invase del nodulo e/o nel recupero di quello perso nello spazio apoplastico.

Per questo tipo di approccio, si è scelto di utilizzare delle linee di piante transgeniche stabili ottenute mediante procedure di trasformazione mediate da *Agrobacterium tumefaciens* per cercare di approfondire le indagini sul ruolo svolto dai geni AMT1 nel corso della simbiosi. In particolare, linee antisenso e over-esprimenti guidate da promotori transientemente attivi nel corso del processo simbiotico sono state utilizzate come strumento per modulare l'espressione dei membri della famiglia *LjAMT1* nelle varie fasi dell'interazione simbiotica ed analizzarne il conseguente fenotipo.

## **LOTUS JAPONICUS COME SISTEMA MODELLO**

*Lotus japonicus* appartiene alla famiglia delle leguminose (*Fabaceae*), che è la terza più grande famiglia delle angiosperme, ed è composta da un elevato numero d'importanti specie. E' stata proposta dodici anni fa come sistema modello, grazie alle sue caratteristiche, infatti le piante di *Lotus* sono piuttosto piccole, da adulte raggiungono una lunghezza di circa trenta centimetri, sono diploidi e self-fertili. Sono in grado di produrre un elevato numero di semi, disposti linearmente lungo l'asse dei baccelli, in numero di venti circa per baccello. La morfologia dei baccelli è simile a quella delle più importanti leguminose utilizzate comunemente per l'alimentazione umana e animale, come ad esempio soia e pisello.

*Lotus* è una pianta perenne, i suoi fiori sono gialli e relativamente grandi, ha un ciclo vitale breve, di circa tre mesi e un genoma molto piccolo, circa 450 Mb. E' facile da coltivare e soprattutto, a differenza della maggior parte delle leguminose che risultano essere recalcitranti alla trasformazione genetica e alla coltura *in vitro*, per *Lotus* sono stati messi a punto efficienti protocolli di trasformazione e rigenerazione *in vitro*. Infine, le numerose informazioni disponibili relative a sequenze EST depositate in banche dati (il completamento del progetto di sequenziamento del genoma è previsto per la fine del 2008), disponibilità di marcatori molecolari e fenotipici, disponibilità di "facilities" quali *Tilling* e *Chips* per *Affimetrix*, rendono tale sistema particolarmente appetibile e adatto a studi sia di tipo molecolare che fisiologico.

Il suo habitat naturale è l'Asia centrale, inclusa l'area intorno al Giappone, Corea, Cina, dove sono stati trovati molti ecotipi, materiale che rappresenta una ricca fonte di variabilità biologica (fenotipica) e genetica. L'ecotipo più comunemente utilizzato in laboratorio è il Gifu, che prende il nome dall'area geografica in cui è stato isolato (Figura 24).

Gli studi effettuati durante questi ultimi dodici anni hanno contribuito soprattutto ad una migliore comprensione del processo simbiotico che la pianta è in grado di

instaurare sia con batteri del genere *Rhizobiaceae* che con le micorrizze. Questo ha consentito di clonare una grande quantità di geni di pianta coinvolti nella simbiosi. Il *partner* simbiotico di *Lotus* è *Mesorhizobim loti*, genere *Rhizobio*, un batterio del suolo gram-negativo in grado di formare noduli determinati sulle radici della pianta. *Mesorhizobim loti* ma anche *Bradyrhizobium* sono in grado di interagire specificamente con le radici di *Lotus japonicus*, ma mentre il primo è in grado di portare alla formazione di noduli maturi in grado di fissare correttamente l'azoto, il secondo è in grado solo di indurre sulle radici della pianta lo sviluppo di noduli morfologicamente normali, ma incapaci di fissare l'azoto.

Il sequenziamento di *Mesorhizobim* è stato completato nel 2000 e ha evidenziato come il genoma sia formato da un unico cromosoma (7.036,074 bp) e due plasmidi rispettivamente denominati pMLa (351,911 bp) e pMLb (208,315 bp). I geni per la nodulazione e la fissazione dell'azoto sono localizzati sul cromosoma batterico.



**Figura 24.** Piante *wild type* di *Lotus japonicus*, ecotipo Gifu

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 Sterilizzazione dei semi di *Lotus japonicus*

Prima della germinazione i semi di *Lotus japonicus* vengono sterilizzati con una soluzione al 2,5% di ipoclorito di sodio e 0,05% di Triton-X100. I semi sono lasciati in questa soluzione per 20 minuti in leggera agitazione, quindi sciacquati per 6 volte con acqua sterile e posti su una piastra di agar all'1%. Prima di lasciarli germinare alla temperatura di 23°C con un ciclo giorno/notte di 16/8 ore, i semi sulla piastra sono mantenuti al buio capovolti per 24 ore a 4°C e per altre 24 ore a 23°C, questa operazione è necessaria per una parziale sincronizzazione della cinetica di germinazione. L'intensità luminosa negli armadi di crescita è di  $246 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$ .

### 2.2 Preparazione terreni di coltura e condizioni di crescita

**Murashige e Skoog medium (MS):** 0,5g di acido 2,4N-Morpholino etansulfossido (MES), 4,33 g di polvere MS (Duchefa) in un volume finale di 1 litro.

Il pH finale di 5,7 è ottenuto aggiungendo KOH.

**Gamborg's B5 medium (B5):** 0,5 g di acido 2,4N-Morpholino etansulfossido (MES), 3,04 g di polvere B5 (Duchefa) in un volume finale di 1 litro. Il pH finale di 5,7 è ottenuto aggiungendo KOH.

**Jensen medium:** preparare gli stocks dei diversi componenti sono aggiunti in un volume finale di 1 litro, per ottenere un mezzo 0,1X.

Ai terreni solidi viene aggiunto plant agar (DUCHEFA) in concentrazione 1%.

**Ormoni:** le auxine usate sono state acido indoloacetico (IAA), acido 1- naftalenico (NAA), acido 2,4-dicloro-fenossiacetico (2,4 D); le citochinine usate sono state N-benziladenina (BA), N-isopenteniladenosina (IPA), thidiazuron (TZN).

**Antibiotici:** per impedire la crescita di *Agrobacterium tumefaciens*, sono stati usati cefotaxime in concentrazione 0,2 mg/ml e vancomicina in concentrazione 50 µg/ml, inoltre come fungicida viene usata nistatina in concentrazione 25 µg/ml. Per la selezione degli espianti trasformati in seguito a trasformazione mediata da *A. tumefaciens* viene utilizzata igromicina in concentrazione 15 mg/l.

**Ecotipi:** l'ecotipo di *Lotus* utilizzato è stato "GIFU" F9.

### 2.3. Composizione dei mezzi di crescita

#### Murashige and Skoog medium (MS):

Microelementi	Quantità in mg/l	Concentrazione finale
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,025	0,11 µM
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,025	0,10 µM
NaFeEDTA	36,70	0,10 µM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20	0,10 µM
KI	0,83	5,00 µM
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	16,90	0,10 µM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,25	1,30 µM
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8,60	29,91 µM

Macroelementi	Quantità in mg/l	Concentrazione finale
CaCl <sub>2</sub>	332,02	2,99 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00	1,25 mM
KNO <sub>3</sub>	1900,00	18,79 mM
MgSO <sub>4</sub>	180,54	1,50 mM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,00	20,61 mM

Vitamine	Quantità in mg/ml	Concentrazione finale
Acido niconitico	1,00	8,12 $\mu\text{M}$
Piridoxina- HCl	1,00	4,86 $\mu\text{M}$
Tiamina HCL	10,00	29,65 $\mu\text{M}$

### Gamborg's B5 medium (B5)

Microelementi	Quantità in mg/l	Concentrazione finale
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,11 $\mu\text{M}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,10 $\mu\text{M}$
NaFeEDTA	36,70	0,10 $\mu\text{M}$
$\text{H}_3\text{BO}_3$	3,00	48,52 $\mu\text{M}$
KI	0,75	4,52 $\mu\text{M}$
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10,00	56,16 $\mu\text{M}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	1,30 $\mu\text{M}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,00	6,96 $\mu\text{M}$

Macroelementi	Quantità in mg/l	Concentrazione finale
$\text{CaCl}_2$	113,23	1.02 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2500,00	24,73 mM
$\text{KNO}_3$	1900,00	18,79 mM
$\text{MgSO}_4$	121,56	1,01 mM
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	130,44	1,09 mM
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134,00	1,01 mM

Vitamine	Quantità in mg/ml	Concentrazione final
Myo-inositolo	100,00	0,56mM
Acido niconitico	1,00	8,12 $\mu\text{M}$
Piridoxina- HCl	1,00	4,86 $\mu\text{M}$
Tiamina HCL	10,00	29,65 $\mu\text{M}$

## MEZZO JENSEN

### COMPONENTI:

1. $\text{CaHPO}_4$	100g/l
2. $\text{K}_2\text{HPO}_4$	20g/l
3. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20g/l
4. $\text{NaCl}$	20g/l
5. Fe citrate*	10g/l
6. $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	40g/l
7. MIX:	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	3,5g/l
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	61g/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	9,7g/l
8. $\text{H}_3\text{BO}_3$	12,7g/l

## **2.4 PROCEDURA DI TRASFORMAZIONE- RIGENERAZIONE DI *LOTUS JAPONICUS* MEDIATA DA *Agrobacterium tumefaciens***

Considerazioni generali: la trasformazione *in vitro* viene fatta su espianti separati dal resto della pianta sui quali si creano le condizioni che in natura sono alla base dell'infezione da parte di *Agrobacterium tumefaciens*. La fase iniziale quindi prevede la produzione di ferite nel tessuto vegetale per permettere il rilascio di flavonoidi da parte della pianta stessa e la conseguente attivazione della risposta batterica.

Gli espianti utilizzati possono essere prelevati da radici, foglie, cotiledoni, ipocotili, epicotili. La scelta del tessuto può variare da pianta a pianta sulla base della diversa suscettibilità ad *Agrobacterium* e della loro diversa capacità rigenerativa. In alcuni casi, la fase dell'infezione è preceduta da una fase in cui gli espianti sono coltivati in presenza di un regime ormonale ad alta concentrazione di auxine. Possono essere presenti anche citochinine ma il rapporto finale auxine/citochinine è sempre a favore delle prime. Questa prima fase di preincubazione degli espianti ha una duplice funzione: induce il de-differenziamento delle cellule, rendendole nuovamente totipotenti e pronte a redifferenziarsi e induce una proliferazione cellulare che rende gli espianti maggiormente competenti all'infezione con *Agrobacterium tumefaciens*.

La trasformazione è di solito condotta utilizzando un ceppo di *A. tumefaciens* che contiene un costrutto di T-DNA in cui è stato clonato il gene per la resistenza ad un antibiotico o ad un erbicida, sotto il controllo di un promotore costitutivo di pianta. Il promotore in questo caso utilizzato è il 35S del virus del mosaico del cavolfiore (CaMV), in quanto riesce a massimizzare l'espressione delle sequenze esogene. La presenza del gene per una resistenza è necessaria per potere selezionare il tessuto trasformato. Maggiore è la sua espressione, maggiore è la concentrazione di antibiotico che può essere utilizzata. In questo modo si riduce la possibilità per il tessuto non trasformato di sopravvivere. Successivamente alla trasformazione, gli espianti subiscono una serie di passaggi in mezzi contenenti diversi rapporti tra i fitormoni, in modo da produrre un avanzato de-differenziamento e un successivo

differenziamento per potere ottenere la pianta transgenica. I vari passaggi possono essere schematizzati come descritto qui di seguito.

1) Incubazione in un mezzo contenente sia citochinine, che inducono divisione cellulare, sia auxine, che stimolano distensione e divisione cellulare, in modo da indurre proliferazione cellulare. Tale mezzo (CIM = *Callus Induction Medium*) è lo stesso utilizzato per la pre-incubazione degli espianti.

2) Selezione delle cellule trasformate. Al mezzo CIM viene aggiunto l'antibiotico per potere selezionare le cellule trasformate. Solo tali cellule quindi prolifereranno, dando luogo ad un tessuto vegetale calloso non differenziato (callo). Ogni callo è quindi un clone di una singola cellula trasformata e in ognuno di essi il T-DNA si sarà integrato in maniera diversa, singola o multi copia, e in locus diversi del genoma.

3) I calli verdi, fotosintetizzanti, vengono separati dal resto del tessuto morto e trasferiti in un mezzo contenente principalmente citochinine per consentire il differenziamento del tessuto e la formazione in particolare del tessuto fogliare (Mezzo SIM = *Shoot Induction Medium*). Infatti le citochinine, in particolare la benzil-adenina, stimolano lo sviluppo delle gemme laterali. Per questa procedura è stato utilizzato il thidiazuron (TDZ), una fenilurea sostituita (Nphenyl-N1,2,3-thidiazuron-5ylurea), composto ad azione citochino-simile (Barbulova *et al.*, 2005).

4) Quando gli *shoot* hanno raggiunto un'adeguata dimensione, vengono trasferiti in un mezzo contenente alte concentrazioni di auxine per un tempo di circa una settimana. Le auxine, infatti, ad alte concentrazioni favoriscono lo sviluppo delle radici. In particolare si usa un'auxina sintetica, l'acido naftaline acetico.

5) Una volta sviluppate le radici, la piantina è pronta per essere trasferita in terreno per ottenere la generazione T1 di semi transgenici.

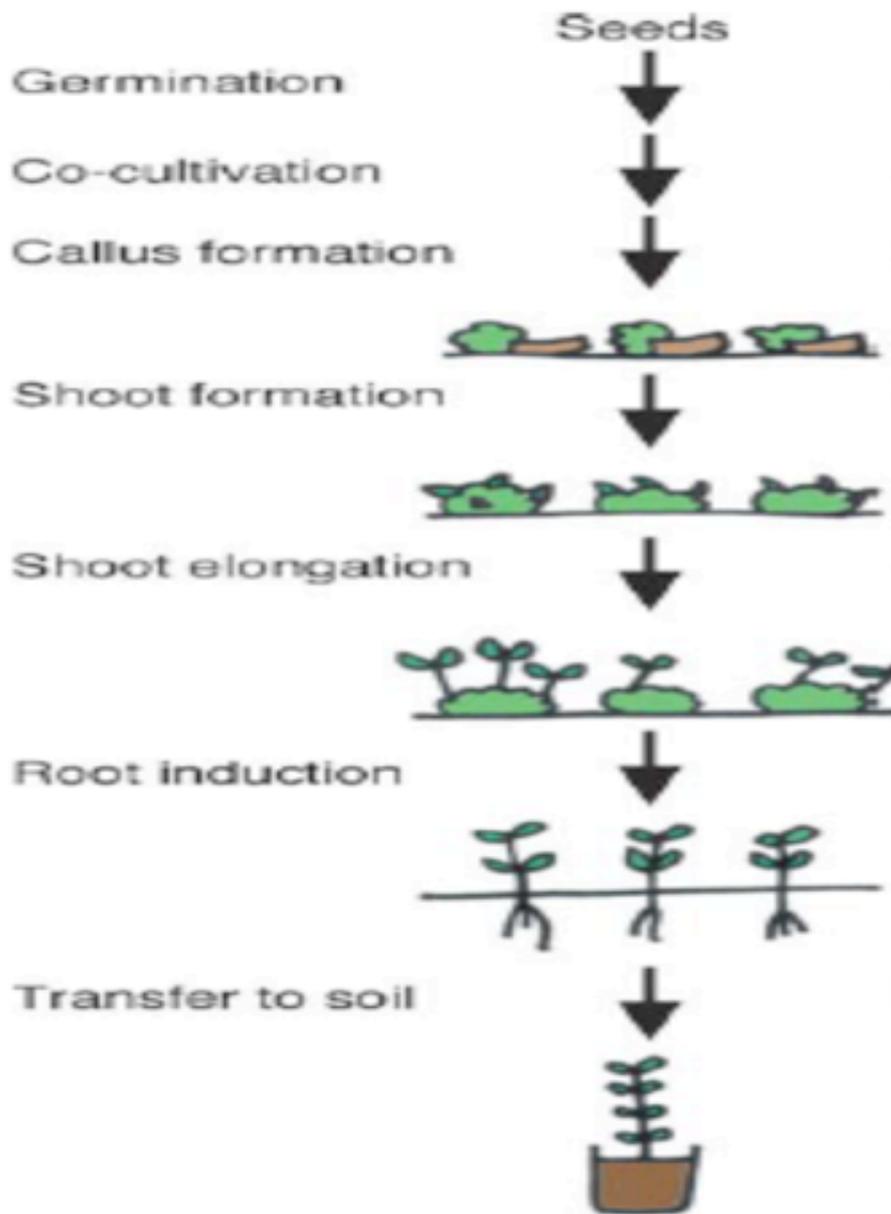
Mediante tale tipo di trasformazione si ottengono dei trasformanti primari (T0) che sono dei cloni eterozigoti (emizigoti) per i geni del T-DNA integrati nel genoma. Per ottenere omozigoti bisognerà attendere la generazione successiva (T1), nella quale il T-DNA segregherà in maniera Mendeliana (Lombari *et al.*, 2003).

### 2.4.1 Procedura di trasformazione

Le varie fasi della trasformazione sono schematizzate nella Figura 46.

Materiale di partenza: radici di piante cresciute *in vitro* per un periodo compreso tra 30 e 60 giorni.

1. Pre-coltura: separare le radici dalla parte aerea della pianta e trasferirle su mezzo in grado di indurre la formazione del callo (CIM) per cinque giorni.
2. Infezione: tagliare le radici in piccoli pezzetti di circa 0,5 cm e immergerli nella coltura di *Agrobacterium*. Lasciare gli espianti in queste condizioni per 10 minuti.
3. Co-coltura: trasferire gli espianti su CIM per 48 ore.
4. Lavare i trasformanti con H<sub>2</sub>O sterile, asciugarli su carta da filtro sterile e trasferirli su mezzo CIM selettivo, contenente 200 mg/l di Claforan; 15mg/l igromicina.  
Incubazione di 3, 4 settimane fino all'ottenimento di calli verdi.
5. Trasferire i calli verdi, resistenti, su SIM per 20 giorni.
6. Trasferire i calli su un mezzo, contenente una concentrazione 10 volte inferiore di thidiazuron (concentrazione finale di TDZ 0,05mg/l) e lasciare gli espianti per altri 15 giorni (Mezzo SEM = *Shoot Elongation Medium*).
7. Appena comincia a formarsi la parte aerea, gli espianti vanno trasferiti in un nuovo mezzo RIM per l'induzione della formazione delle radici senza selezione per altri dieci giorni
8. Trasferirli su mezzo B5 (REM = *Root Elongation Medium*), per l'allungamento delle radici, per un'altra settimana circa.



**Figura 46.** Fasi della trasformazione genetica mediata da *Agrobacterium tumefaciens*.

## 2.4.2 Mezzi di crescita per la procedura di trasformazione -rigenerazione

**Callus Inducing Medium (CIM):** 3 mg/l acido indolacetico (IAA); 0,15 mg/l acido diclorofenossiacetico (2,4-D); 0,6 mg/l benziladenina (BA); 0,3 mg/l isopentenialedenina (IPA)

**Shoot Inducing Medium (SIM):** MS medium; saccarosio 3%; vitamine MS; 0,5mg/l TDZ+200 mg/l Cef+15mg/l Hyg

**Root Inducing Medium (RIM):** B5/2 medium; saccarosio 1%; vitamine B5; 0,1 mg/l acido naftalenacetico (NAA)

**Root Elongation Medium (REM):** B5/2 medium; saccarosio 1%; vitamine B5

## 2.5 PROCEDURA DI NODULAZIONE *in vitro*

La messa a punto di condizioni *in vitro* riproducibili, è essenziale per lo studio dei diversi momenti del processo simbiotico tra le piante leguminose e il batterio *Mesorhizobium loti*. I semi di *Lotus japonicus*, previa sterilizzazione, vengono fatti germinare su mezzo Jensen 0,1% solido, in piastre Petri su un semicerchio di carta da filtro sterile.

### 2.5.1 Preparazione dei batteri

Una singola colonia di *Mesorhizobium loti* ceppo R7A, viene fatta crescere per 16 ore a 30°C nel mezzo TYR contenente 6mM di CaCl<sub>2</sub> e 100µM di antibiotico Rifampicina. I batteri cresciuti, vengono centrifugati a 4500 giri per 10 minuti, il *pellet* ottenuto viene lavato con una soluzione di PBS 1X. Una volta ricentrifugato, viene risospeso in 1ml di PBS 1X. La densità ottica dei batteri (OD) viene misurata alla lunghezza d'onda di 600nm e 20µl di sospensione batterica, contenente 5.10<sup>7</sup> cellule, viene utilizzata per infettare i singoli meristemi radicali.

### **2.5.2 Infezione**

Dopo 4-5 giorni dalla germinazione dei semi, quando la radice primaria raggiunge una lunghezza di circa 1 cm, le piante vengono inoculate con 20 µl di sospensione batterica fresca. La carta da filtro è importante per ottenere una completa e uniforme diffusione dei batteri sul meristema radicale. La carta da filtro viene rimossa quattro giorni dopo l'infezione. Le radici infettate vengono tenute al buio per le successive 6 settimane dall'infezione.

## **2.6 TRATTAMENTO DELLE CELLULE BATTERICHE**

### **2.6.1 Preparazione delle cellule competenti di *E. coli***

Affinché una cellula possa essere trasformata, deve essere resa permeabile al DNA (competenza). A questo scopo una colonia del ceppo DH5α viene inoculata in 5 ml di Ty e cresciuta con costante agitazione a 37°C per 16 ore. Successivamente 1 ml di questa coltura viene utilizzata per inoculare 100 ml di Ty. Le cellule vengono fatte crescere in un incubatore a 37°C con agitazione costante per 3 ore fino ad una concentrazione di circa 0.5-0.6 O.D./ml. Le cellule sono state centrifugate a 4000 giri per minuto (rpm) per 5 minuti a 4°C. Il pellet batterico, così ottenuto, è stato risospeso in 50 ml di una soluzione 50 mM calcio cloruro, precedentemente raffreddata, e le cellule incubate a 4°C per 30 minuti. Dopo centrifugazione, le cellule sono state risospese in 10 ml di una soluzione contenente 15% glicerolo e 50 mM calcio cloruro, suddivise in aliquote da 0,2 ml e conservate a -80°C.

### **2.6.2 Trasformazione per shock termico di cellule competenti di *E. coli***

A 0,1 ml di cellule competenti vengono aggiunti 50-100 ng di DNA plasmidico purificato. Le cellule vengono lasciate 15 minuti in ghiaccio, poi 5 minuti a 37° C. Si aggiunge 1 ml di Ty e le cellule vengono incubate per 50 minuti a 37° C, per permettere la stabilizzazione del DNA trasformante. A questo punto da 50 a 200 µl della miscela sono piastrati su Ty con opportuno antibiotico.

### 2.6.3 Elettroporazione

Il metodo calcio cloruro non consente, nel caso di *Agrobacterium*, di ottenere un'alta efficienza di trasformazione a causa della parete cellulare che non è resa particolarmente permeabile da questo metodo. Per questo motivo è stata usata l'elettroporazione (Nagel *et al.*, 1990), la cui resa è molto maggiore ( $10^{-10}$  trasformanti/ $\mu\text{g}$  di DNA). A questo scopo, a 40  $\mu\text{l}$  di cellule competenti di *Agrobacterium*, sono stati aggiunti 100 ng del DNA trasformante. Tale DNA deve essere puro e risospeso in una soluzione a bassa concentrazione ionica, per cui è stato utilizzato DNA ottenuto da midi preparazione di DNA plasmidico (midiprep) sciolto in TE. Alla soluzione, posta in cuvetta, viene applicata una differenza di potenziale di 2,5 KV (capacitanza 25  $\mu\text{F}$  e resistenza  $\mu\text{200}$ ). Alle cellule elettroporate viene aggiunto 1 ml di terreno SOC e vengono incubate a 30°C in costante agitazione per 4 ore, per permettere l'espressione dei marcatori fenotipici. Successivamente le cellule vengono piastrate a diverse concentrazioni su Ty con opportuno antibiotico ed incubate a 30° C per due giorni.

## 2.7 DESCRIZIONE DEI PLASMIDI

### 2.7.1 Vettore pCR2.1

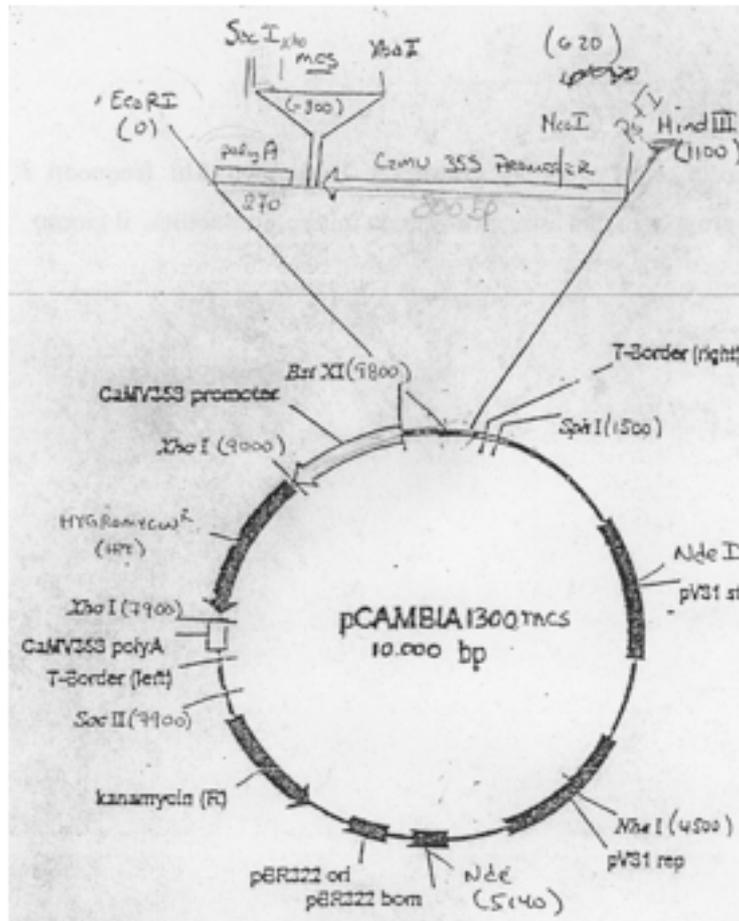
Vettore (Invitrogen) di 3600 bp; contiene i geni che codificano per la resistenza ai due antibiotici, canamicina e ampicillina; un'origine di replicazione F1, che gli permette di potersi replicare in *E. coli*; possiede inoltre il gene reporter *lacZ* e un *poly-linker* con siti unici per vari enzimi di restrizione. Il vantaggio di tale vettore è quello di potere clonare direttamente in esso sequenze, a doppio filamento di DNA, prodotte da reazioni di PCR, pur non presentando queste, estremità coesive specifiche, necessarie per i clonaggi nei comuni vettori. L'alta efficienza di ligasi è assicurata dal fatto che il DNA del vettore, opportunamente linearizzato, presenta alle due estremità una T che andrà ad ibridare con le A che caratterizzano la maggior parte delle estremità dei frammenti di DNA, ottenuti per PCR, favorendo, quindi, la successiva reazione di ligasi. L'inserzione del prodotto di amplificazione avviene tra i due siti di restrizione per l'enzima *EcoRI* all'interno dei quali si trova la sequenza *poly-linker*. Il promotore del gene *lacZ* è a monte del primo sito *EcoRI*, in posizione -283, mentre la sequenza del gene *lacZ $\alpha$* , codificante per la  $\beta$ -galattosidasi si trova a valle del secondo sito *EcoRI*, in posizione -301,. Tale enzima scinde il lattosio, e il derivato sintetico X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galattopiranoside), il cui prodotto di ossidazione esibisce una colorazione blu brillante. L'inserzione di sequenze di DNA tra i due siti *EcoRI*, interrompe dunque la sequenza del gene *reporter*, dando come risultato la non espressione dello stesso gene e quindi colonie batteriche bianche. Lo *screening* quindi, in base alla colorazione di queste ultime (bianco/blu), permette di potere identificare quelle contenenti il vettore in cui è avvenuta l'inserzione del frammento di interesse.

## 2.7.2 Vettore p-CAMBIA

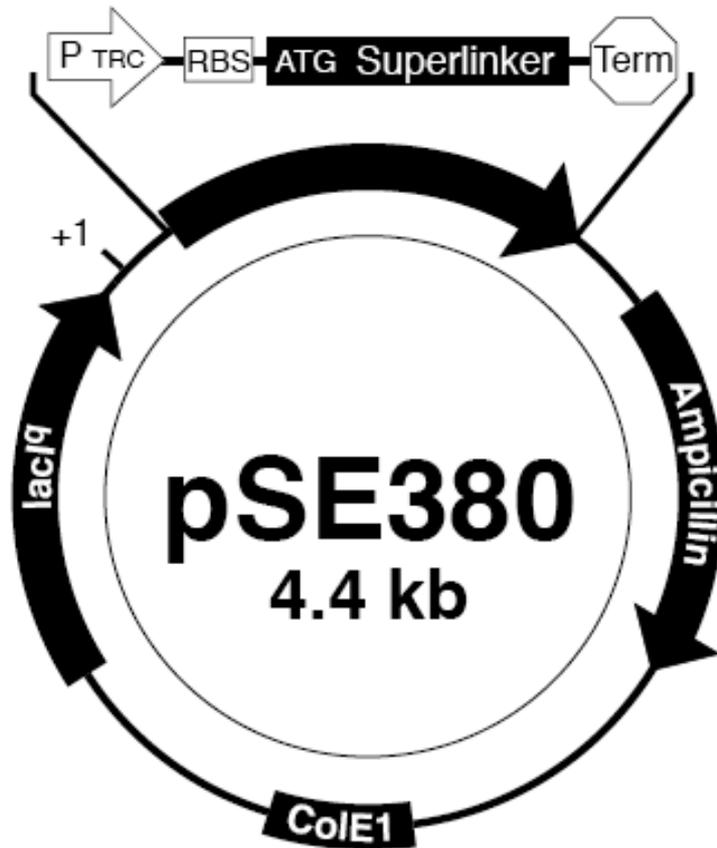
E' un vettore binario di 10 kB che viene utilizzato per consentire l'espressione di sequenze transgeniche in pianta (Figura 47). Contiene un *poly-linker* con siti unici per gli enzimi di restrizione *XbaI*, *BglII*, *SallI*; *KpnI* e *SacI*, inserito fra la sequenza del promotore (35S) e la sequenza terminatrice della trascrizione del virus a mosaico del cavolfiore. Contiene inoltre, all'interno del T-DNA, fra le sequenze *Right Border* (RB) e *Left Border* (LB), il gene per la resistenza all'igromicina per la selezione in pianta, anch'esso sotto il controllo del promotore costitutivo 35S CaMV.

Il gene per la resistenza all'antibiotico canamicina consente infine la selezione del plasmide nei batteri.

Questo vettore è stato utilizzato per clonare la sequenza completa del gene *LjAMT1;1* sotto il controllo, rispettivamente dei promotori dei due geni *ENOD12* e *ENOD40* e per il trasferimento di tali cassette nel genoma di *Lotus*. La sequenza completa di *LjAMT1;1*, clonata nel vettore PCR2.1, è stata digerita con gli enzimi di restrizione *EcoRV/KpnI* e ligata nel vettore pSE380 dell'Invitrogen (Figura 48) per ottenere i plasmidi pAR5 e pAR6, rispettivamente. In questi due plasmidi sono state poi clonate nell'opportuno orientamento le sequenze promotrici di *ENOD12* e *ENOD40* ottenendo i plasmidi denominati rispettivamente pAR7 e pAR8. Infine, questi ultimi sono stati digeriti con gli enzimi *HindIII/KpnI* e ligati nel pCAMBIA1300 digerito *HindIII/KpnI* per ottenere i plasmidi pAR12 e pAR13, rispettivamente, che sono stati utilizzati per trasformare mediante elettoporazione, cellule competenti di *Agrobacterium tumefaciens*.



**Figura 47.** Vettore binario pCAMBIA 1300



**Superlinker**  
**Enzyme Position**

Nco I	275
Dra III	294
Bsm I	304
BstB I	306
EcoR I	308
BspM I	326
Sal I	332
Aat II	333
Bsu36 I	338
Xma I	353
Sma I	355
Eco0109 I	357
BamH I	369
Bgl II	396
Eco47 III	420
Nhe I	438
Xba I	450
Kpn I	460
Nae I	478
SnaB I	484
Stu I	507
Avr II	508
Eag I	524
Not I	524
Pst I	535
Nru I	562
Sac II	569
Xho I	584
Sac I	585
Spe I	594
Sfi I	607
Afl II	619
Hind III	622

**Figura 48.** Vettore pSE380

### 2.7.3 Plasmidi per la complementazione in lievito

Per ottenere plasmidi esprimenti i geni *LjAMT1;2* e *LjAMT1;3*, le due sequenze geniche sono state dapprima amplificate a partire dal DNA genomico, con oligonucleotidi le cui sequenze coprivano l'intera regione codificante:

AMT1;2A: 5'-TCTGTCTGCACATCACAAGT-3'

AMT1;2B: 5'-ACCCCATGGCATCTCATAAT-3'

AMT1;3A: 5'-AGTACGCGGGACTGTTATTCT-3'

AMT1;3B: 5'-ACGTGATCTTTACAAAGTAACACA-3'

I prodotti di PCR delle dimensioni attese ottenuti, sono stati eluiti dal gel, sequenziati per controllare che non vi fossero stati errori di polimerizzazione da parte della Taq e subclonati nel vettore pCR2.1 (vedi Par.3.7.2) per ottenere i plasmidi pAB2 e pAB3, rispettivamente. Il DNA plasmidico pAB2 e pAB3 è stato digerito con gli enzimi di restrizione *EcoRV* e *HindIII* ed i frammenti ottenuti sono stati ligati nel vettore di lievito p426 MET26 digerito con *SmaI-HindIII*.

## **2.8 ANALISI DEL DNA DI PIANTA**

### **2.8.1 Estrazione del DNA da tessuto vegetale**

I tessuti vegetali prelevati (circa 0,2 gr) sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e ridotti in polvere mediante schiacciamento in mortaio. Alla polvere sono stati aggiunti 5 ml di una soluzione contenente 50 mM Tris-HCl pH 8, EDTA 10 mM pH 8, 100 mM NaCl, 1% sarcosyl e 10 mM Urea, il tutto è stato incubato a 37° C per un'ora, in costante agitazione. A questo punto è stata fatta un'estrazione con fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (24:24:1) mantenendo i campioni un'ora a 37°C in costante agitazione. Successivamente i campioni sono stati centrifugati a 7000 g per 5 minuti, è stato prelevato il sovrnatante ed è stata fatta una seconda estrazione con cloroformio:alcol isoamilico (24:1) per allontanare i residui di fenolo. Il DNA è stato quindi precipitato con l'aggiunta di un volume di isopropanolo e sodio acetato in concentrazione finale 0,3 M. Dopo centrifugazione a 7000 g per 5 minuti il DNA ottenuto è stato lavato con etanolo 70%, asciugato e risospeso in TE con l'aggiunta di RNAsi A (1µg/ml).

### **2.8.2 Elettroforesi e trasferimento di DNA su filtri di nylon (Southern blot)**

Una quantità di DNA cromosomale paria circa 5 µg, viene digerito, in un volume finale di 50 µl, con le appropriate endonucleasi di restrizione, usando circa 30 unità enzimatiche e incubando la soluzione ad una temperatura di 37°C per 6 ore.

I frammenti ottenuti sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio allo 0,8% in tampone TAE 1x. Il DNA contenuto nel gel, è stato poi trasferito su un filtro di nylon (Nucleobond), per potere essere ibridato con un'opportuna sonda radioattiva. Per questo motivo al termine dell'elettroforesi il gel è stato immerso prima per 5 min in una soluzione all'1% di HCl, per idrolizzare i frammenti di DNA in modo da migliorare l'efficienza del trasferimento, poi per un'ora in una soluzione denaturante (NaOH 0,5 N, NaCl 1,5 M), e infine in una soluzione neutralizzante (NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M pH 7,5), il tutto in costante agitazione (Sambrook *et al.*, 1989).

A questo punto il gel viene posto su di un supporto di vetro, situato all'interno di una vaschetta contenente SSC 20x e posto a contatto con tale soluzione tramite un ponte di carta Whatman 3 MM. Sul gel viene adagiato il filtro, 4 fogli di carta Whatman 3 MM (3 bagnati con SSC 20x e 1 asciutto), una pila di carta assorbente e un piccolo peso. La soluzione di SSC sale per capillarità, sfruttando il gradiente idrico, dalla vaschetta alla carta assorbente, trasferendo il DNA dal gel al filtro.

Dopo circa 16 ore il filtro viene recuperato, asciugato e posto in una stufa sottovuoto a 80°C per fissare il DNA.

### **2.8.3 Preparazione di sonde radioattive**

Le sonde sono state preparate come descritto da Sambrook e collaboratori (1989), usando il metodo del "*random primer*". Alla miscela di reazione, contenente Tris-HCl 0,5 M pH 8, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, DDT 10 mM, Hepes 1 mM pH 6,6, esanucleotidi random 3,1 ng/ml, sono stati aggiunti 25-50 ng di DNA denaturato (a 95° C per 5 minuti) dATP 1,5 nM, dTTP 1,5 nM, dGTP 1,5 nM, 50 mCi di  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (attività specifica 3000 Ci/mM) e due unità di frammento Klenow. La miscela è stata incubata per 20 minuti a 37° C. Il DNA marcato è stato separato dai nucleotidi non incorporati mediante precipitazione con acetato di sodio-etanolo, a cui viene aggiunto glicogeno come carrier per migliorare l'efficienza di precipitazione.

#### **2.8.4 Ibridazione del DNA legato a filtri di nylon**

I filtri vengono incubati per 5 minuti a 65° C, per sonde omologhe, a 60° C, per sonde eterologhe, in tubi di vetro, adattati alla stufa di ibridazione, contenenti una soluzione 0,5 M di NaPO<sub>4</sub>, 5% SDS, 10 mM EDTA. Tale alta concentrazione di fosfato viene utilizzata per saturare tutti i siti del DNA in maniera aspecifica. Successivamente, alla soluzione di pre-ibridazione viene aggiunta la sonda, marcata radioattivamente, e i filtri sono incubati per 16 ore a 65° C per sonde omologhe, a 60° C per sonde eterologhe. Dopo l'ibridazione, i filtri vengono lavati in 0,05 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5% SDS, 1 mM EDTA a 65° C per sonde omologhe, a 50° C per sonde eterologhe. A questo punto i filtri vengono esposti a -80° C, usando lastre Fuji RX e schermi intensificatori al tungsteno per un tempo utile all'osservazione dei segnali di ibridazione.

## 2.9 RACE PCR 5' e 3'

La sigla RACE è l'abbreviazione di *rapid amplification of cDNA ends* (amplificazione rapida delle estremità del cDNA) ed è una tecnica che serve ad estendere la porzione di sequenza nota di un RNA messaggero all'estremità 5' (5'-RACE) e 3' (3'-RACE). Le classiche tecniche di clonaggio del cDNA infatti spesso producono soltanto frammenti della sequenza, che possono essere estesi tramite le tecniche di RACE. Il metodo si basa sull'uso della reazione a catena della polimerasi. Tra le due estremità, quella più facile da clonare è l'estremità 3'. L'RNA messaggero possiede infatti a questa estremità una sequenza terminale ricca di adenine (poli-A), è quindi facile progettare un *primers* per la PCR che contenga un elevato numero di timine e si leghi all'estremità 3' (oligo-dT primer).

L'altro primer sarà invece progettato in base alla sequenza già conosciuta del gene.

Il clonaggio dell'estremità 5' è più complesso, non essendo presente una sequenza nucleotidica caratteristica come avviene al 3'. Sono state perciò messe a punto una serie di tecniche che si basano generalmente sull'aggiunta di una sequenza nota al 5', in modo da poter poi utilizzarla per disegnare un primer per la PCR, l'altro primer sarà anche in questo caso progettato in base alla sequenza già nota.

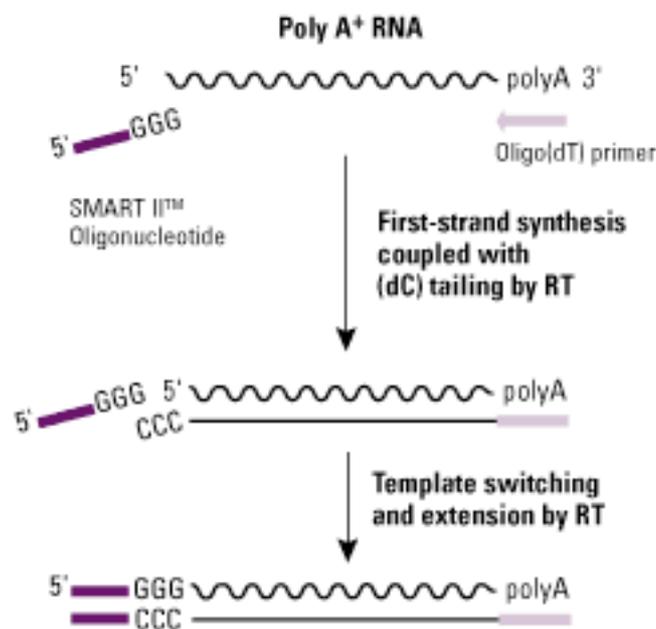
Il metodo classico di 5'-RACE consiste appunto nel legare all'estremità 5' del messaggero o alla corrispondente estremità del cDNA un oligonucleotide di sequenza nota. Un'alternativa è quella di usare l'enzima terminal transferasi per aggiungere una serie di nucleotidi (per esempio C) all'estremità in questione, in questo caso sarà poi possibile disegnare un primer per la PCR che si basi sulla serie di nucleotidi aggiunti. Le reazioni di 5' e 3' RACE sono state fatte utilizzando RNA totale estratto da radici di *Lotus japonicus*. (Qiagen RNeasy kit, Darmstadt, Germany). Il cDNA è stato sintetizzato secondo il metodo SMART Marathon brevettato dalla CLONTECH (Chenchic *et al.*, 1995), come mostrato nella figura 50.

I prodotti della 5' e 3' RACE sono stati ottenuti con una PCR (lunga) utilizzando i primers specifici disegnati sulla sequenza nota dei geni e un primer fornito dal kit chiamato AP1 (5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGG-3'; CLONTECH),

complementare alla sequenza dell'adapter fornito dal kit e ligato alle estremità del cDNA. Per incrementare la specificità della procedura, è stata fatta una PCR secondaria utilizzando dei primers nested specifici per il gene e un altro adattatore nested AP2, sempre fornito dal kit, (5'ACTCACTATAGGGCTGAGCGGC3'; CLONTECH).

E' stato seguito il protocollo della PCR come riportato da Marathon, CLONTECH, utilizzando la Taq Antibody Platinum (Invitrogen).

Sono stati fatti 35 cicli a 95°C per 30'', 60°C per 30'' per la PCR primaria e 62°C per la secondaria, 72°C per 1'30'' e la polimerizzazione finale a 72°C per 10 minuti. I prodotti della PCR-RACE sono stati clonati nel vettore pCR2.1 (TOPO cloning kit, Invitrogen) e sequenziati.



**Figura 50.** Schematizzazione della reazione di sintesi del cDNA e delle reazioni a catena di PCR utilizzando il metodo SMART Marathon CLONTECH.

## **2.10 REAL TIME RT-PCR**

La PCR real-time, denominata anche PCR quantitativa o PCR quantitativa in tempo reale (RTq-PCR), è un metodo di amplificazione e quantificazione simultanea dell'espressione genica. Il DNA è amplificato da reazioni a catena della DNA-polimerasi e dopo ogni turno di amplificazione, il DNA è quantificato. I metodi comuni di quantificazione si basano sull'analisi di fluorescenza, che può essere dovuta all'uso di coloranti che si intercalano con il DNA amplificato a doppio-filamento (ds) o ad oligonucleotidi modificati che diventano fluorescenti una volta ibridati con un DNA.

### **2.10.1 Saggio quantitativo con la PCR Real-time**

Similmente alle reazioni di PCR, sono richiesti diversi passaggi per sviluppare un'analisi quantitativa di PCR. Questi includono: la produzione di stampi puliti, la progettazione di primers; l'ottimizzazione degli stati di reazione. In una reazione tipica, il prodotto di PCR si raddoppia ad ogni ciclo dell'amplificazione. Siccome sono necessari parecchi cicli affinché abbastanza prodotto sia rilevabile, il diagramma della fluorescenza sul numero dei cicli esibisce un andamento sigmoide. Nei cicli finali, i substrati di reazione iniziano a scarseggiare, i prodotti di PCR non raddoppiano e la curva comincia ad appiattirsi. Il punto sulla curva in cui la quantità di fluorescenza comincia ad aumentare velocemente, solitamente alcuni scarti quadratici medi sopra la linea di base, è chiamato il ciclo della soglia (valore di Ct). Il diagramma di Ct su DNA stampo è lineare, così un confronto dei valori di Ct fra reazioni multiple permette di calcolare la concentrazione dell'acido nucleico che si vuole quantificare.

La pendenza di questa linea fornisce inoltre una misura dell'efficienza della PCR. Alcuni strumenti permettono agli utenti di generare delle curve di melting che seguono il completamento della PCR. Le curve di melting forniscono un'indicazione della purezza del prodotto di reazione e rivelano la presenza di dimeri dei primers.

### 2.10.2 Quantificazione

I prodotti di PCR possono essere quantificati generando una retta standard o essere quantificati rapportando la loro quantità rispetto a quella di un gene di controllo. Il metodo della quantificazione relativa richiede la quantificazione di geni di controllo o *housekeeping* per normalizzare l'espressione del gene studiato. Tuttavia, la selezione dei geni di controllo adatti può causare problemi poiché possono non essere espressi ugualmente attraverso tutti i campioni.

Gli esperimenti di Real Time PCR sono stati condotti utilizzando il sistema DNA Engine Opticon 2 (MJ Research, Boston). Per monitorare la sintesi del DNA doppia elica è stato utilizzato come fluorescente il SYBR Green (Finnenzyme), come standard interno è stato utilizzato il kit dell'Ambion, 18S Ribosomal RNA Primers-Competimers in rapporto di 1:9. Per ogni reazione sono state fatte due repliche, il programma usato prevede una denaturazione a 95°C per 13' e poi per 35 cicli una denaturazione a 95°C per 20'', annealing a 60°C per 15'', polimerizzazione a 72°C per 15''.

I dati sono stati analizzati utilizzando il software Opticon Monitor Analysis versione 2.01 (MJ Resaerch). Il relativo livello di espressione è stato calcolato secondo la formula del rapporto tra il relativo livello di espressione del gene di interesse e di quello di controllo,  $2^{-\Delta CT}$ , con  $\Delta CT = C_{t \text{ gene}} - C_{t18s}$ . Le sequenze degli oligonucleotidi utilizzati per amplificare i geni specifici sono state disegnate nella regione carbossi-terminale, quella meno conservata, utilizzando il programma PRIMER3.

### **2.10.3 Sequenze dei primers utilizzate per gli esperimenti di Real Time PCR**

*LjAMT1;1 a' 5'*-AGCGCCTATGATTCAAGGCAAC-3'

*LjAMT1;1 b' 5'*-TACTCCTCCTTGGCGAATAGC-3'

*LjAMT1;2 a' 5'*-AAAGCCTACGGTAACAACGGC-3'

*LjAMT1;2 b' 5'*-ATTAACAACCCGTACGGCATC-3'

*LjAMT1;3 a' 5'*-ATGGTGAGAGTGGTTCTGGT-3'

*LjAMT1;3 b' 5'*-AGCCCATATGGCCTATCAGGA-3'

## **2.11 ESTRAZIONE DELL'RNA DAL TESSUTO VEGETALE**

I tessuti prelevati (circa 0,2- 0,3 gr) dalla pianta di *Lotus* vengono immediatamente congelati in azoto liquido e ridotti in polvere mediante schiacciamento nel tissue lyser (QIAGEN). Alla polvere vengono aggiunti 550 µl di una soluzione di lisi contenente: 2% CTAB, 2% polyvinylpirrolydone (MW 360,000), 100 mM Tris-HCl, 25mM EDTA, 2M NaCl, 0,05% DEPC; a cui viene aggiunto prima dell'uso beta-mercaptoetanololo alla concentrazione finale 2%. A questo punto vengono fatte due estrazioni con fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (24:24:1); l'RNA contenuto nella soluzione, viene precipitato dopo l'aggiunta di un volume di isopropanolo, per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo una centrifugazione di 20 minuti a 14.000 g, il pellet ottenuto, viene lavato con etanolo 70%, asciugato e risospeso in acqua con l'aggiunta DEPC 0,005% (Matamoros *et al.*).

Per rimuovere contaminazioni da DNA dagli RNA preparati, è stato utilizzato un kit dell'Ambion DNA-free.

L'RNA totale ottenuto dall'estrazione viene successivamente utilizzato per la sintesi del cDNA. Il Kit dell'Ambion utilizzato prevede una prima fase di incubazione a 75°C di 3' per denaturare l'RNA in una soluzione contenente anche i random primers (50 µM concentrazione finale) e la miscela di dNTPs (2,5 mM concentrazione finale ognuno). Successivamente vengono aggiunti gli altri componenti; RT Buffer (10x) *RNAse Inhibitor* e l'enzima M-MLVRT (100 unità). La reazione di retrotrascrizione avviene a 42°C per un'ora.

## 2.12 COLTURE CELLULARI DI PIANTA

Mediante le colture cellulari, le cellule crescono su un terreno liquido, dando luogo a calli, cioè ammassi cellulari de-differenziati; si ottengono così linee cellulari che possono essere "isogeniche", con caratteri genetici stabilizzati. Piante transgeniche, ottenute mediante trasformazione con *Agrobacterium tumefaciens* trasformato con un costrutto contenente la sequenza antisenso del gene *LjAMT1;1* sotto il controllo del promotore costitutivo 35S CaMV, sono state utilizzate per ottenere diverse linee cellulari. Come espianti di partenza sono state utilizzate le radici. Le colture vengono mantenute in condizione di de-differenziamento, in mezzo liquido Gamborg B5 a pH 5.5, a cui sono stati aggiunti vitamine B5, 2% saccarosio e l'auxina 2,4D alla concentrazione finale di 2mg/l. Le colture (volume di 50 ml in beute da 250 ml) sono mantenute in costante agitazione (100 rpm) determinando quindi una frammentazione del materiale calloso solido e diluite di circa 20 volte ogni sette giorni in mezzo fresco, fino all'ottenimento di colture cellulari stabili in cui la maggior parte della popolazione è costituita da cellule singole non aggregate.

Le cellule possono quindi essere mantenute nelle medesime condizioni di coltura per un tempo indefinito previa, continua diluizione e sostituzione settimanale del mezzo di crescita.

### **2.12.1 SAGGIO DI UPTAKE DEL <sup>14</sup>C-METHILAMMONIO**

Il saggio di *uptake* del metilammonio marcato radioattivamente con <sup>14</sup>C (Amersham) è stato fatto sulle diverse linee cellulari ottenute, dopo averle trasferite per 24 ore in un mezzo privo di ogni fonte di azoto. Le linee cellulari sono state prima filtrate attraverso un materiale poroso con un *cut-off* di 0.2 µm, successivamente sono state centrifugate a 4000 g per 5' e il pellet di cellule ottenuto è stato risospeso in 2 ml di mezzo B5 privo di azoto. Alle cellule è stato aggiunto il <sup>14</sup>C-Metilammonio in concentrazione di 100µM e la quantità di metilammonio incorporata nelle cellule delle diverse linee cellulari è stata misurata allo scintillatore ad intervalli di tempo di cinque minuti, per venti minuti.

### **2.13 CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESSIONE (HPLC)**

La cromatografia liquida ad alta pressione o cromatografia liquida ad alte prestazioni, *High Pressure Liquid Chromatography* o *High Performance Liquid Chromatography*, è più semplicemente nota come HPLC. Si tratta di una tecnica cromatografica che permette di separare due o più composti presenti in un solvente sfruttando l'equilibrio di affinità tra una "fase stazionaria" posta all'interno della colonna cromatografica e una "fase mobile" che fluisce attraverso essa. Una sostanza più affine alla fase stazionaria rispetto alla fase mobile impiega un tempo maggiore a percorrere la colonna cromatografica (tempo di ritenzione), rispetto ad una sostanza con bassa affinità per la fase stazionaria ed alta per la fase mobile.

Il campione da analizzare è iniettato all'inizio della colonna cromatografica dove è "spinto" attraverso la fase stazionaria dalla fase mobile applicando pressioni dell'ordine delle centinaia di atmosfere. Per ottenere un'elevata efficienza nella separazione è necessario che le dimensioni delle particelle del riempimento siano molto ridotte (di solito hanno diametri compresi da 3 a 10 µm), per questo motivo è indispensabile applicare un'elevata pressione se si vuole mantenere una ragionevole

velocità di flusso dell'eluente e quindi un tempo di analisi adeguato.

Alla fine della colonna è applicato un rilevatore (IR, UV-VIS, spettrometro di massa) e un calcolatore che permettono una analisi in continuo dell'uscita della colonna e quindi di poter quantificare e/o identificare le sostanze iniettate.

### **2.13.1 Protocollo per l'estrazione degli amminoacidi liberi per l'analisi all'HPLC**

1. Prelevare le piante e separare le radici, le foglie o altri organi.
2. Lavare il materiale in H<sub>2</sub>O deionizzata e asciugare con carta delicatamente.
3. Pesare il materiale. Occorrono 0.2-0.5 gr di tessuto per campione da analizzare.
4. Polverizzare il tessuto in un mortaio con azoto liquido e mettere la polvere in un' eppendorf.
5. Aggiungere 1 ml di etanolo/acqua 80/20 (v/v). Lasciare estrarre per 30 minuti a 4°C.
6. Centrifugare la provetta per 5 minuti a 14000 rpm.
7. Il surnatante può essere conservato in freezer a -20°C oppure letto all'HPLC previa filtrazione (C18).

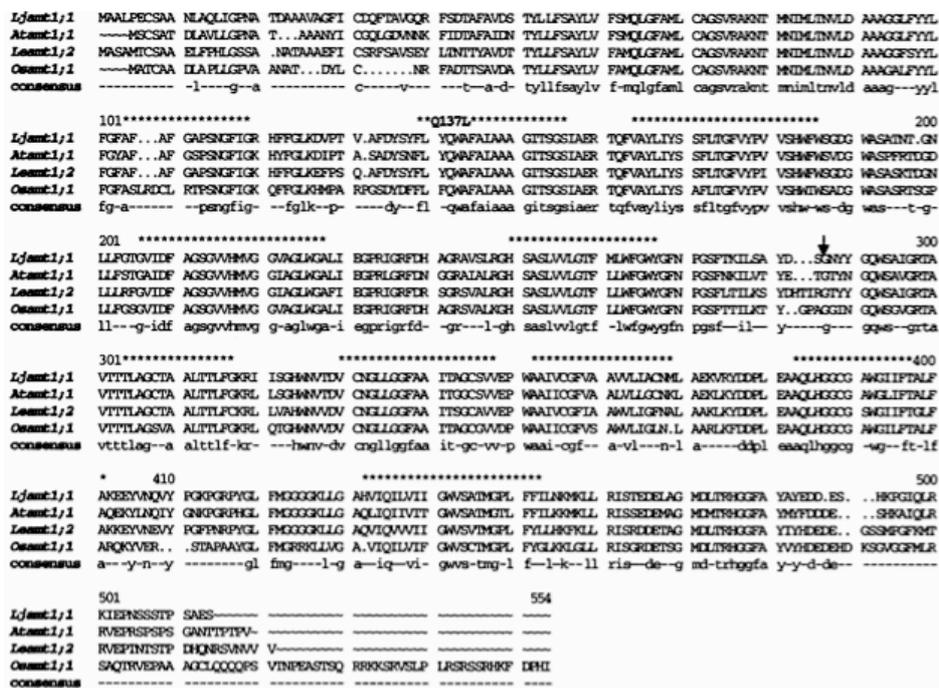
## 2.14 SAGGIO DELL'ATTIVITA' NITROGENASICA

Il metodo della riduzione dell'acetilene è largamente usato per saggiare l'attività nitrogensica *in vitro*, essendo l'enzima nitrogenasi capace di ridurre l'acetilene ad etilene. Il saggio per la riduzione dell'acetilene è una modifica del metodo descritto da Hardy e collaboratori (1968). L'intero apparato radicale, contenente le radici nodulate di ciascuna pianta, è stato escisso, introdotto in tubi Falcon da 15 ml ed ermeticamente chiuso con tappi Suba-Seac. Ai tubi è stato aggiunto 1 ml di acetilene ed essi sono stati incubati per circa un'ora a temperatura ambiente. Dai tubi, contenenti le radici nodulate, è stato prelevato 1 ml di gas che è stato iniettato nel gascromatografo Sigma 3B (Perkin Elmer), usando una colonna di Para-Pak R (0,8 \*100 cm) ed eluendo con N<sub>2</sub> a 45 ml min<sup>-1</sup>. Il rilevatore usato è del tipo ionizzazione a fiamma in cui è usato H<sub>2</sub> a 100 KPa e aria a 140 KPa. La separazione etilene/acetilene è stata effettuata con un'isoterma di 3 minuti a 30°C e con il rilevatore a 100°C.

### 3. RISULTATI

#### 3.1 ISOLAMENTO E ANALISI STRUTTURALE DEI GENI *LjAMT1;2* e *LjAMT1;3*

Le proteine AMT1, sono codificate da una famiglia multigenica, i diversi membri sono stati isolati in diverse specie vegetali quali *A. thaliana*, *L. esculentum*, *O. sativa* (Gazzarini *et al* 1999; Von Wirèn *et al.*; Kumar *et al.* 2003). Per identificare nuovi geni appartenenti alla famiglia AMT1 nella pianta leguminosa *Lotus japonicus*, è stata utilizzata una coppia di oligonucleotidi degenerati disegnati sulla base dell'allineamento amminoacidico dei trasportatori dell'ammonio di *Arabidopsis thaliana* *AtAMT1;1*, *Lotus japonicus* *LjAMT1;1*, *Lycopersicum esculentum* *LeAMT1;2* e *Oryza sativa* *OsAMT1;1* (Figura 25).



**Figura 25.** Allineamenti delle sequenze amminoacidiche dei trasportatori dell'ammonio di *Arabidopsis thaliana* *AtAMT1;1*, *Lotus japonicus* *LjAMT1;1*, *Lycopersicum esculentum* *LeAMT1;2* e *Oryza sativa* *OsAMT1;1* (Salvemini *et al.*, 2001 Gene).

L'assenza di introni nella regione compresa fra i due oligonucleotidi degenerati in quasi tutte le sequenze di AMT1 pubblicate in letteratura, ha consentito di effettuare l'amplificazione per PCR su uno stampo costituito da DNA genomico di *Lotus*. L'amplicone ottenuto come prodotto della PCR definiva, come atteso sulla base dell'allineamento di sequenze, un frammento di circa 400 coppie di basi che è stato clonato successivamente nel vettore pCR2.1 (Invitrogen) e analizzato mediante sequenziamento. Sono stati analizzati in maniera casuale trenta cloni ed il 90% di questi (27 su 30) hanno mostrato un alto livello di omologia con le proteine AMT1. Cinque di queste sequenze, vale a dire il 16%, sono risultate essere identiche a quelle del gene *LjAMT1;1*, mentre le restanti 22 hanno permesso di identificare due sequenze significativamente diverse tra loro ed al gene *LjAMT1;1* a livello nucleotidico. La conferma della presenza di tre loci diversi, è stata ottenuta dall'analisi tramite Southern blot sul DNA genomico di *Lotus* digerito con tre diversi enzimi di restrizione (dato non mostrato). Per isolare la sequenza completa del cDNA delle due sequenze identificate, è stata messa a punto una RACE PCR 5' e 3', sull'RNA totale estratto da radici di *Lotus japonicus* come descritto nei Materiali e Metodi. Il sequenziamento dei frammenti ottenuti ha confermato la presenza delle due sequenze diverse e inoltre ha permesso di escludere la presenza di introni al loro interno, a differenza del gene *LjAMT1;1* in cui ne è stato trovato uno (Salvemini *et al.* 2001). Le due sequenze sono state rispettivamente nominate *LjAMT1;2* e *LjAMT1;3*; (Figura 26). La loro analisi *in silico* per la ricerca di ORF prediceva due sequenze codificanti per polipeptidi di 57,6 e 56,2 kDa, di 519 e 507 amminoacidi rispettivamente (Figura 27).

*LjAMT1;1* e *LjAMT1;2* mostrano un'identità a livello amminoacidico, pari al 76%, mentre *LjAMT1;3* ha un'identità pari al 73% con *LjAMT1;1* e al 71% con *LjAMT1;2*. Le predizioni dell'idrofobicità delle proteine (Hidden Markov Model, <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMH> Copyright 2001, Academic Press), mostrano come queste siano altamente idrofobiche e come atteso contengano 11 domini transmembrana (Figura 28).

### *LjAMT1;2*

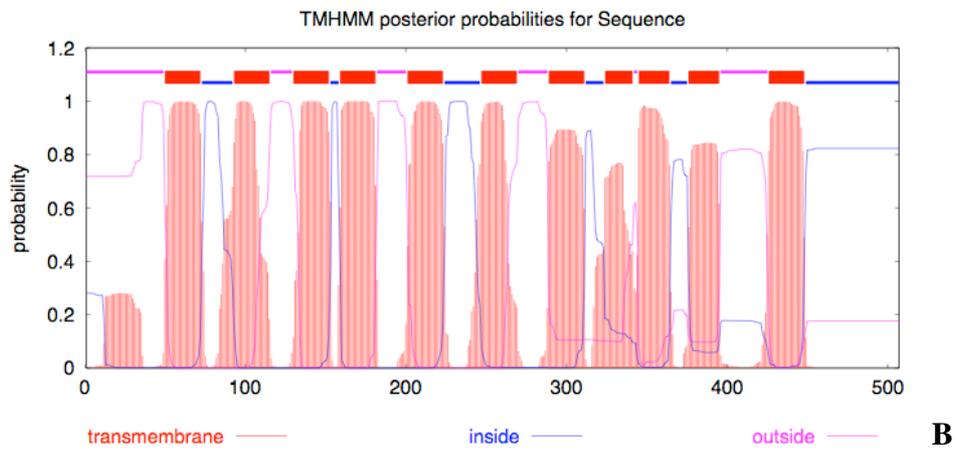
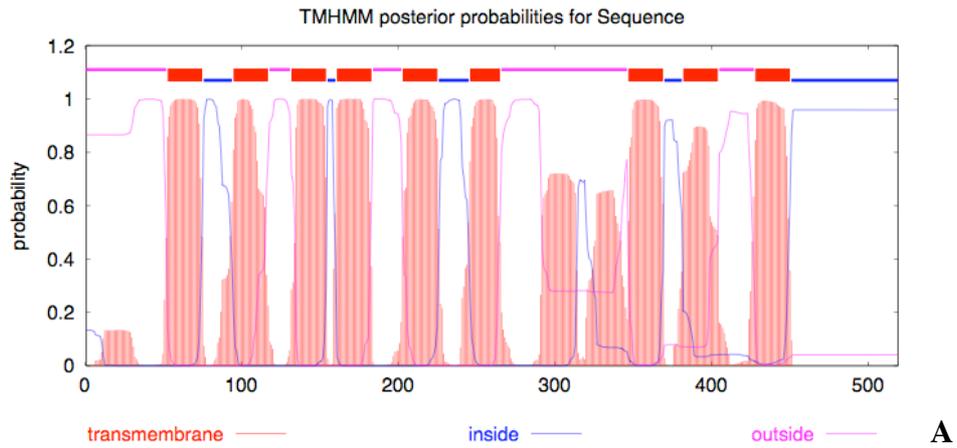
**ATG**GCTTCTCTCTCTTGGCTCAGCCACAGACCTCGCTCCACTCTTAACCGCCACAACCAACGCAACCGCAACCGCCGCCG  
CACCTACCTCTGCAACCAGCTCGATACAATCTCCAGGAAGCTCAGCGACACCACCTATGCCGTTGACAACACCTACCTCC  
TCTTCTCAGCTTATCTAGTCTTCGCCATGCAGCTCGGTTTTGCCATGCTCTGCCCGGCTCCGTCGGAGCCAAAAACACC  
ATGAACATCATGCTAACCAATGTTCTTGTATGCAGCAGCCGGCGGCTATCTACTACCTCTTCGGCTTCGCGTTTCGCTT  
CGGAGCCCCCTCAACGGCTTCATCGGCCGCCACTTCTTCGGCTCAAACACTACCCTTCGCCACCTACGACTACAGCT  
TCTTCTCTACCCAGTGGGCTTCGCCATCGCCGCTGCCGGAATCACCAGCGGCTCCATCGCCGAGAGGACACAATTCGTC  
GCCTACCTCATCTACTCTCTTCTTAACCGGCTTGTCTACCCGGTCGTCGCACTGGCTCTGGTCTCGGACGGCTG  
GGCCAGCCCCACCCGACCCTGGCAGCTTACTATTCCGATCCGGCGGATGATTTCCGCTGGATCCGGAGTAGTCCACA  
TGGTCGGTGGCATAAGCAGGACTATGGGGCGGCTTCATCGAAGGCCCTAGAATCGCCGGTTCGACCGAACCGCCGATCC  
GTAGCCTTACGTGGACTCAGTGGCTCCCTAGTTGTCTCTCGGTTTCGTTTCTACTATGGTTCGGTTGGTACGGTTCAACC  
CCGTTTCAATTTCTCACCATAGCAAAGCCTACGGTAACAACGGGCAAAACGGTAATTACTACGGTTCAGTGGAGCGGATA  
GGGAGAACAGCGGTCAACAACCACATTGGCTGGATGCATCGCGCACTCACCACGCTTTTCAGCAAACGGTTATTGGAGGG  
CCACTGGAAGTGTCTGACGTGTGTAACGGCTGCTCGCGGTTTCGCCGCCATCACCTCCGGTTGCTCCGTCGTCGAGC  
CGTGGCCGGCATTGTCTGCGTTTTGTGGCAGCGTGGGTGCTGATCGGGCTCAATTTGGTTGCGCGGAAAATGAAGTAC  
GACGATCCCTCGGAGGCGGCGCAGCTTCACGGCGGGTGCAGCGCTGGGGGTTTTATTCCGGGCTGTTTTCGAAGGGGA  
GTACGGGCGGAGGTTTACGGCAGCGCTGGAGCCGTGGTTGTTAAGGTGGCGAGGGAAGTTGCTGGCGGCGCAGGTGATTA  
GATATTGGTGGTGTGTGGGTGGGTACGGCGACGATGGGGCCTTGTCTATGGGCTCATAAGATGAAACTTTTGAGGA  
TTTCTGAAGATGATGAGACTGCGGGGATGGATTTGACGAGGCATGGTGGTTTTGCTTATGCTTACCATGATGAAGATGAT  
GTGTCCACCAAGAGAGGGGTGATGATGAGTAGGATTGGCCCTGGTAGTAGTTCTCCCTCCACCATGAACACGCCGCGGGC  
GAGCGCCGCCCAATGACTGT**TGAC**CGCGTTGCTGCTTCTGAACATGGGTGCATATATGGTAGGGGTGAATATTTCTA  
TGGGAAATTAATAATTTTGTGATAGAGAAATAGGTATTGAATTTGCTTTTTGCTTGATTTGTTGATGTAAGAAAGTTA  
TATGAGAATGCATGGGTGAATGGTGTGAGTGTATGATGATCTCATGGTAGGTGATGTGCAGTAAAT  
AATATTTTTATAGGTTTGTGGTTTTGTTTTGAAAGTTTGAAATGAGGGTGTACTCCCTACAATTGTAAGAAATTA  
GTGTCTCCCATTTCTATGTTATTGAATGTTTTTTTTATAGGCATGTTCTATTGAATGTAATTAAGGTTGTTTTGTCAAAAA  
AAAAA

### *LjAMT1;3*

**ATG**GCTGCGGGTTCACTTGCTCTGCCGCGACCTCCACCCCTTCTGGGCACCGGGGCTAATGCTACGGCGGGCGGAG  
GTTTCAATTTGTTCCCGGTTTGGTGCCATCTCGAACAAGTTCACTGACACCACCTACGCCGTGGACAACACCTACCTCTTGT  
TCTCTGCTTCTCGTCTTCGCCATGCAGCTGGTTTTGCCATGCTCTGCCCGGTTCCGTCGGTCCGAAGAACCATGAA  
CATCATGCTCACCAACGTTCTTGATGCGCCACCGGCGGATCTTCTTACTATCTTCGGTTTTCGCTTGGCCTTTGGCA  
CCCCATCAAATGGTTTTATCGGGGAGCACTTCTTTGGTCTCAACGAGTTTCTTCCCTTCTTTTTGACTATGGATTCTTT  
CTTTATCAGTGGGCTTTCGCCATCGCCGCTGCCGGGATTACCAGTGGTTCGATTGCAGAGAGGACTCAGTTTGTGCTTA  
TTTGATTTACTCTTCTGTTCTTACTGTTTGGTTTTACCCGATTGTGGCACATTTGGTTCTGGTCTTCTGATGGGTGGGTT  
CCCCTGCAAGAACAGAGAATCTTCTGTTTTGGTCTGGTGTATTGATTTTGTGGCTCTGGTGTGTCATTTGGTGGGA  
GCAGTTGCAGGATTTCTGGGGTGTCTTATTGAAGTCTCGTATGGGAAGGTTGATCATGCAGGGAAGCCTGTACCATT  
GAGGGGACACAGTGAACACTTGTGTTTTGGGGACATTTCTGTTGTGGTTTTGGTTGGTATGGTTTTAACCTGGTTCTT  
TTATTAATCTTGAAGAGTTATGGTGAGAGTGGTTCTGGTAATTAATGATGGAATGGAGTGAATGGGAGGACTGCA  
GTGACAACAACACTAGCTGGATGCTCTGCTGCACTCACTACTCTGTTTGGGAAGAGATTGCAAACAGGACATTGGAATGT  
GACTGATGTTTGAATGGTTTTGCTTGGTGGGTTTTGCTGCAATTAATTTAGGGTGTCTGTTGTGGATCCTTGGGCTGCAA  
TTATATGTGGATTTGTGGCAGCTTGGGTGCTGATTGGATGCAATGTGTTAGCTGAGAAGTTTCACTATGATGATCTCTT  
GAGGCTGCACAGCTTCATGGAGGTTGTGGAACCTGGGGGATAATCTTCACTGCATTTGTTGCTAAGAAGCAGTATGTAAA  
TGAGTTTTATGCTGGGCTTCTGATAGGCCATATGGGCTTTTAAATGGGTGGGGGTTGGAGGCTATTGGCTGCACATGTTG  
TGCAGATTTTACTATTGCTGGTTGGGTGAGTGTACAATGGGAGCTGTGTTCTTTGTGCTGCATAAGCTGAATCTGCTG  
AGGATTTACCTGAGGAGGAGATGGCTGGTTTTGGATATGACTAGTTCATGGTGGATTGGCTTATGAGTATCATGAAGACGT  
GGGGTCTGTGCAAAAAGCTTTGAAATTCGTGTTTTGATTTTTATGTAAGGGAAGTACTATAAGACTCTTCTAGAG**TGA**  
ATAAATAAAGTCAGCTAGTAAGGTTTTATTAACCTATAATTTAGCACTGTGTTACTTTGTAAGATCACGTTTTAAAAA

**Figura 26.** Sequenze nucleotidiche dei geni *LjAMT1;2* e *LjAMT1;3*. In rosso sono evidenziate le ATG e in blu i codoni di stop.





**Figura 28.** Predizione di idrofobicità delle proteine *Lj*AMT1;2 (A) e *Lj*AMT1;3 (B), secondo il modello Hidden Marcov (TMHMM).

Tale analisi è in accordo con il prototipo delle altre proteine appartenenti alla famiglia dei trasportatori dell'ammonio. L'analisi delle estremità ammino terminali delle tre proteine AMT mostra per *LjAMT1;1* la presenza di una putativa sequenza segnale di taglio, indicativa di un potenziale inserimento nel pathway di secrezione e localizzazione finale sulla membrana plasmatica. Il valore di predizione ottenuto mediante l'analisi della sequenza amminoacidica con il programma TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) è pari a 0,786, e il segnale è localizzato tra i residui 23 e 24. In *LjAMT1;2* e *LjAMT1;3* questo tipo di sito è identificato in maniera molto più significativa, i valori infatti sono più vicini a uno, rispettivamente 0,903 e 0,808, con i siti di taglio rispettivamente compresi tra i residui 26/28 e 26/27.

Questi siti di taglio sono presenti anche in molte altre proteine AMT1 di pianta e suggeriscono, una diffusa localizzazione sulla membrana plasmatica per questi trasportatori. Altri segnali di localizzazione identificati all'estremità ammino-terminale dei trasportatori dell'ammonio includono potenziali segnali di transito cloroplastico come nel caso *OsAMT1;1* e *AtAMT1;2*, anche se la loro localizzazione su tali organelli non è stata confermata direttamente (Udvardi *et al.*, 2000).

### 3.2 COMPLEMENTAZIONE FUNZIONALE DEL MUTANTE DI LIEVITO *Saccharomyces cerevisiae* $\Delta mep$ CON LE SEQUENZE *LjAMT1;2* e *LjAMT1;3*.

Per dimostrare che le sequenze isolate codificano realmente per proteine deputate al trasporto dell'ammonio, sono stati effettuati esperimenti di complementazione eterologa in un ceppo di *Saccharomyces cerevisiae*, triplo mutante, difettivo nei tre geni *mep* deputati al trasporto dell'ammonio.

Il ceppo di lievito 31019 mutato nei geni *mep1*, *mep2*, *mep3* non è in grado di crescere in un mezzo contenente una concentrazione inferiore a 5 mM  $\text{NH}_4^+$  come unica fonte di azoto (Marini *et al.* 1997). Il ceppo è stato trasformato con un vettore di espressione di lievito p426 (Figura 29) in cui sono state clonate le sequenze dei geni *LjAMT1;2* e *LjAMT1;3* sotto il controllo del promotore *Met25*, un promotore represso quando nel mezzo di crescita è presente l'amminoacido metionina (vedi Materiali e Metodi).

I ceppi trasformati sono in grado di crescere in un terreno minimo contenente come unica fonte di azoto  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  a concentrazione 1mM a differenza del ceppo 31019 non trasformato (Figura 30A).

Questo risultato dimostra come i tre geni isolati, funzionano come trasportatori dell' $\text{NH}_4^+$  nel sistema eterologo *S. cerevisiae*. Per determinare le differenze di affinità per il substrato tra le tre diverse proteine *AMT1* di *Lotus japonicus*, è stato utilizzato come substrato, un analogo dell' $\text{NH}_4^+$ , il  $^{14}\text{C}$ -metilammonio ed è stata misurata la capacità di trasporto dei ceppi di lievito trasformati a tempi brevi (ogni cinque minuti per un tempo totale di venticinque minuti), in un determinato intervallo di concentrazioni di  $^{14}\text{C}$ -metilammonio. I parametri cinetici corrispondenti all'attività, sono stati calcolati con il diagramma di Lineweaver-Burk a concentrazioni comprese tra 0,025 e 2 mM. I valori delle costanti di affinità ( $K_m$ ), mostrano per *LjAMT1;2* un valore pari a 1,72 mM e per *LjAMT1;3* 0,47 mM (Figura 30 B, D). Il confronto con dati precedentemente pubblicati per *LjAMT1;1* indica quindi che quest'ultimo è il

membro della famiglia con l'affinità maggiore per il metilammonio (0,16 mM; Salvemini et al. 2001). I valori di velocità massima ( $V_{max}$ ) per *LjAMT1;2* e *LjAMT1;3*, sono rispettivamente di 73 e 24 nmoli su  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  di proteina (Figura 30 C).

Quindi questa prima analisi rivela un certo livello di variabilità nelle caratteristiche biochimiche dei tre trasportatori almeno in termini di affinità e capacità di trasporto del metilammonio.

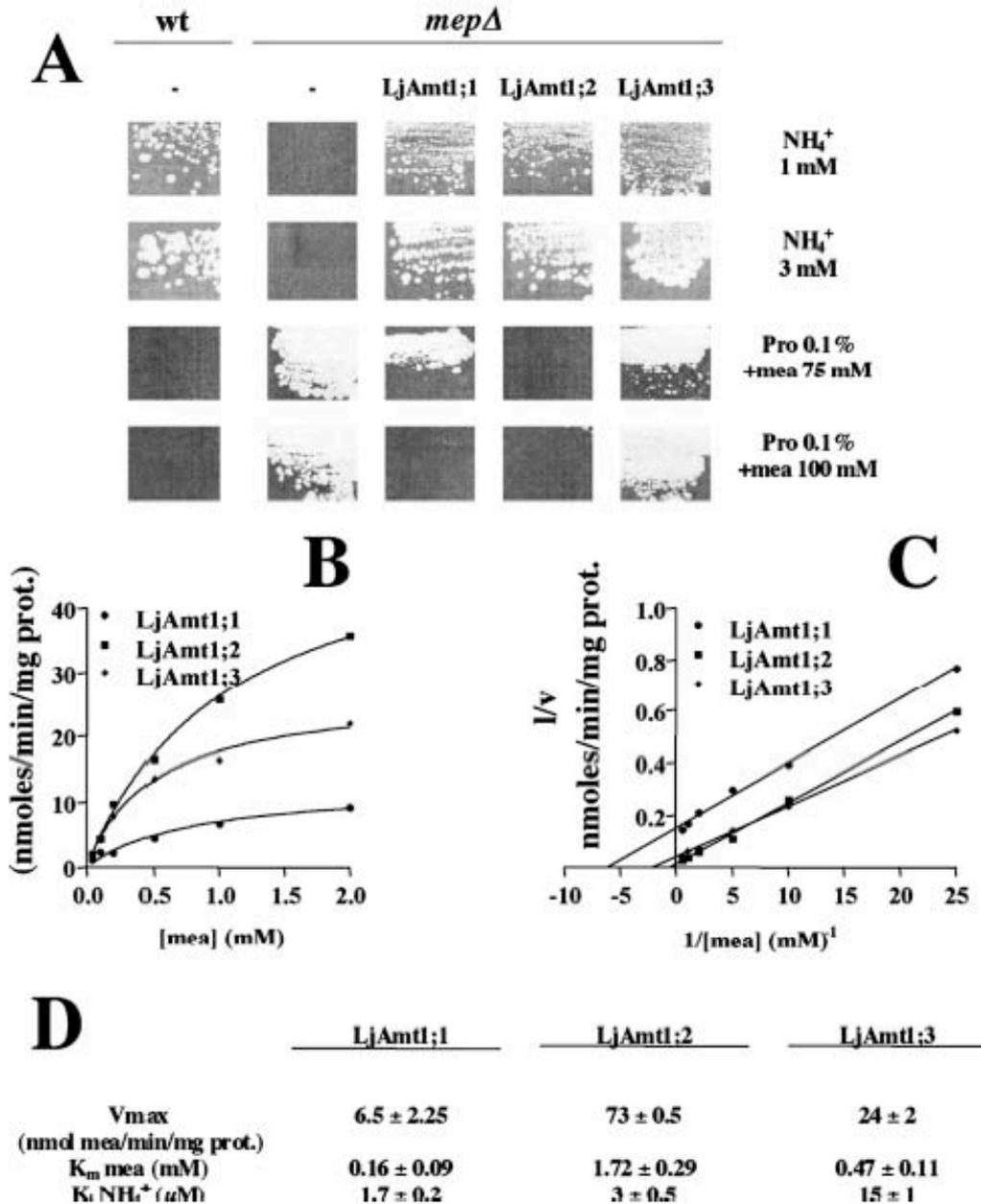
I risultati del test di sensibilità al metilammonio mostrano una certa consistenza con le diverse  $V_{max}$  (capacità) di *LjAMT1;2* e *1;3* in quanto solo l'espressione della prima proteina (che possiede una maggiore capacità) determina un effetto tossico sulle cellule di lievito trasformate, mentre con *AMT1;3* non viene osservato lo stesso fenotipo (Figura 30 A). Una simile differenza è stata anche osservata in cellule di lievito, in cui solo l'espressione di uno dei tre geni per il trasporto dell'ammonio, *mep1*, è associata alla sensibilità nei confronti del metilammonio (Dubois e Grenson 1979).

Poiché l'affinità per il metilammonio non riflette necessariamente l'affinità per l'ammonio (Venegoni *et al.* 1997) sono stati condotti studi di competizione utilizzando l'ammonio a diverse concentrazioni (Figura 30 D). Queste analisi sono state fatte considerando la  $K_m$  di ogni singolo trasportatore, è stato così osservato un 50% di inibizione da  $\text{NH}_4^+$  del trasporto di metilammonio con un valore di  $K_i$  pari rispettivamente a 3 e 15  $\mu\text{M}$  per *LjAMT1;2* e *1;3*. Considerando che *LjAMT1;1* ha una  $K_i$  di 1.7  $\mu\text{M}$ , questi dati mostrano che questo test di competizione trasportatore-substrato è stato essenziale per definire le caratteristiche biochimiche dei membri della famiglia *LjAMT1*, indicando una similarità molto maggiore nelle loro caratteristiche di trasporto rispetto a quella riscontrata con il metilammonio.

In definitiva, questi studi di competizione e le notevoli differenze riscontrate rispetto ai parametri di affinità per il metilammonio, dimostrano una notevole specificità per l' $\text{NH}_4^+$  dei tre trasportatori di *Lotus japonicus* (Figura 30).



**Figura 29.** Vettore di espressione di lievito p426 in cui sono state clonate con le sequenze dei geni *LjAMT1;2* e *LjAMT1;3* sotto il controllo del promotore Met25. I vettori contengono i geni marcatori per la crescita in assenza dell'amminoacido leucina (Leu2) e per la resistenza all'antibiotico ampicillina (Amp). Il vettore è in grado di replicarsi sia in *E.coli* che in lievito (2 $\mu$ ).



**Figura 30.** Analisi di complementazione e caratterizzazione biochimica di *LjAMT1;1*, *1;2* e *1;3*. A. Test di crescita in mezzo minimo contenente come unica fonte di azoto NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> a concentrazioni di 3 e 1mM. Test di sensibilità al metilammonio in mezzo minimo contenente 0,1% di prolina e 75 e 100mM metilammonio. Le sequenze di cDNA utilizzate per trasformare il ceppo di lievito 31019b ( $\Delta$ mep1,2,3, ) sono indicate. B. Cinetica del trasporto del <sup>14</sup>C-metilammonio a varie concentrazioni. C. Plot di Lineweaver-Burk del trasporto del <sup>14</sup>C-metilammonio. D. Parametri cinetici (K<sub>m</sub> e V<sub>max</sub>) per il trasporto del metilammonio e costante di inibizione (K<sub>i</sub>) dell' NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

### **3.3 Espressione differenziale dei trasportatori dell'ammonio nei maggiori organi della pianta.**

Con lo scopo di investigare il possibile ruolo fisiologico svolto dai geni *LjAMT1* ed il loro potenziale coinvolgimento nella regolazione dei diversi stadi del processo simbiotico con il partner *Mesorhizobium loti*, è stato inizialmente analizzato il livello dei trascritti dei tre geni nei diversi organi della pianta, inclusi i noduli. Semi *wild type* di *Lotus japonicus*, sono stati fatti germinare *in vitro* su mezzo Jensen (vedi Materiali e Metodi) completamente privo di fonti di azoto le radici primarie delle giovani piantine, a distanza di quattro giorni dalla germinazione, sono state inoculate con *Mesorhizobium loti* e dopo sei settimane dall'infezione è stato estratto l'RNA dalle radici, foglie e noduli maturi. I fiori, utilizzati per l'estrazione dell'RNA sono stati invece raccolti da piante cresciute in terreno e quindi in condizioni di crescita non controllate. Poiché l'analisi del Northern blot non consente di visualizzare il trascritto del gene *LjAMT1*;3, evidentemente espresso a livelli inferiori ai limiti di monitoraggio di questa tecnica, il profilo di espressione dei trasportatori è stato analizzato mediante Real Time RT-PCR quantitativa, allo scopo di ottenere un quadro completo del profilo di espressione di ogni singolo gene della famiglia. Questa tecnica è illustrata nei Materiali e Metodi e consente di seguire l'incremento di concentrazione dell'amplicone specifico in tempo reale e nell'intervallo di cicli in cui tale incremento mostra un andamento lineare. In ogni esperimento è stato utilizzato come gene costitutivamente espresso, per la normalizzazione dei dati, la subunità ribosomale 18S. Gli oligonucleotidi utilizzati per amplificare il gene sono stati utilizzati in un rapporto di 1: 9 con dei competitori universali per le sequenze ribosomali (Kit AMBION). L'aggiunta di competitori è legata all'altissimo livello di espressione dei geni per l'RNA 18S ed alla necessità di mettersi in condizioni tali da poter amplificare le sequenze dei geni di interesse (*LjAMT1*) e del gene controllo costitutivo (18S) nelle medesime condizioni ed in particolare poterne analizzare l'incremento in un intervallo simile di cicli di amplificazione. Ciò mette al riparo da

eventuali differenze legate a diverse efficienze della reazione TAQ-dipendente non legate alla diversa quantità di cDNA come stampo di partenza per la reazione di amplificazione. Queste condizioni sono state messe a punto sperimentalmente. Generalmente le indicazioni su quale rapporto utilizzare tra i competitori e i primers del 18S, si basano sul livello di trascritto atteso del gene d'interesse. Per un trascritto molto abbondante è consigliato l'uso di un rapporto 4:6 tra primers 18S e competitori, il rapporto aumenta a favore dei competitori man mano che diminuisce la quantità di trascritto atteso, fino al rapporto di 1:9 per i trascritti i cui livelli risultano essere estremamente bassi. Considerando che i livelli del trascritto dei tre geni *LjAMT1* risultano essere piuttosto bassi, tanto da non poter essere sempre facilmente visualizzati, soprattutto nel caso di *LjAMT1;3*; dopo aver testato sperimentalmente i diversi rapporti, si è arrivati alla conclusione che il rapporto migliore da utilizzare fosse appunto quello di 1:9, in modo da poter valutare, nelle medesime condizioni sperimentali (numero di cicli ecc.) le effettive differenze di quantità di trascritto dei tre geni *AMT1* e del 18S.

I primers disegnati per amplificare il gene *LjAMT1;1*, includono una sequenza intronica di 1kb (Salvemini *et al.*, 2001). Ciò consentiva di verificare la pulizia dei preparati di RNA e l'assoluta mancanza di contaminazione da DNA genomico, non essendo mai stata rivelata la banda di 1,3 kb, prodotto dell'amplificazione del DNA genomico. La quantizzazione dei dati di Real Time RT-PCR è mostrata nella figura 31. Tutti e tre i geni, a differenza di *LjAMT1;3* che è maggiormente espresso nei fiori, mostrano un'espressione preferenziale nelle foglie della pianta, a differenza della maggior parte dei trasportatori dell'ammonio caratterizzati nelle altre specie vegetali che mostrano una espressione preferenziale nelle radici. E' stato inoltre interessante osservare l'esistenza di una sorta di gerarchia nell'espressione dei tre geni nei diversi organi, con *LjAMT1;1* sempre maggiormente espresso rispetto a *LjAMT1;2* che a sua volta è più espresso rispetto a *LjAMT1;3*. Questo non è ugualmente vero per i fiori, in cui il gene *LjAMT1;1* è il meno espresso (Figura 31).

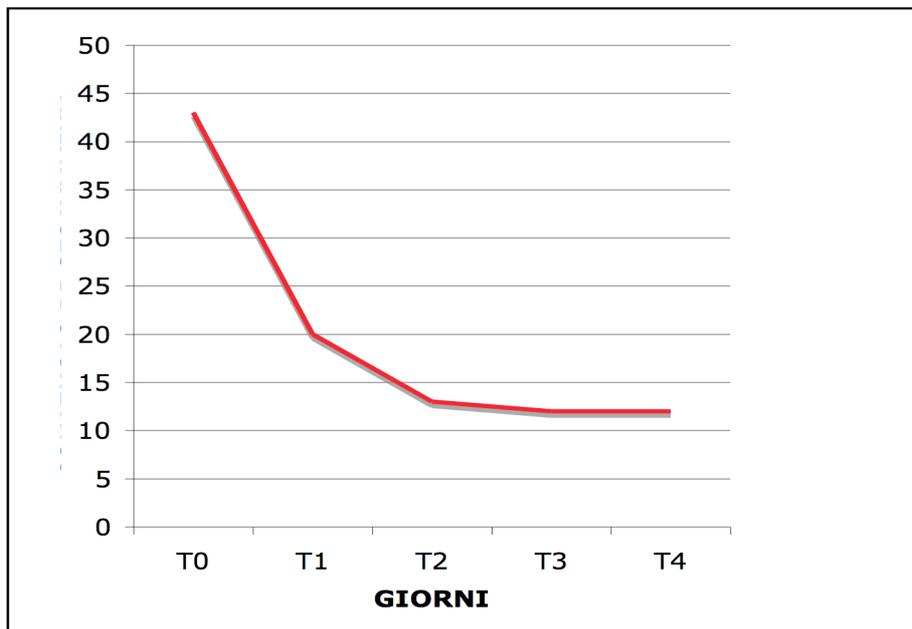
### **3.4 Messa a punto delle condizioni sperimentali per l'analisi di geni del metabolismo azotato in condizioni di carenza di azoto. Analisi all'HPLC di estratti proteici**

Nella fase iniziale del progetto ho cercato di mettere a punto un sistema sperimentale di condizioni di crescita *in vitro*, che riproduca le condizioni di carenza azotata per una pianta adulta di *Lotus japonicus* e che di conseguenza, permetta di analizzare l'effetto di tali condizioni sull'espressione dei geni del metabolismo azotato come quelli deputati al trasporto dell'ammonio, senza che quest'analisi sia influenzata da altri effetti da stress, di tipo pleiotropico. A questo scopo si è deciso di utilizzare il sistema sperimentale delle colture idroponiche. La coltura idroponica consente di mantenere costanti i diversi parametri di crescita poiché è possibile cambiare spesso il mezzo di crescita (generalmente ogni quattro giorni), senza provocare danni all'apparato radicale. In particolare possono essere monitorati i valori di pH del mezzo di crescita verificando che le oscillazioni di questo valore, che potrebbe influenzare la fisiologia della pianta e quindi l'espressione dei geni analizzati, non cadano al di là di un intervallo di  $\pm 0.5$  dal valore di pH 5.7 iniziale (vedi Materiali e Metodi). L'utilizzo delle colture idroponiche consente inoltre di mantenere le piante continuamente in un mezzo fresco, dalle caratteristiche costanti senza sottoporle ad eventuali limitazioni nutrizionali.

Per questo motivo, piante *wild type* sono state dapprima fatte germinare e crescere per due settimane *in vitro* su mezzo solido, contenente come unica fonte d'azoto,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  alla concentrazione di 1mM. Successivamente, le piante sono state trasferite per una settimana in coltura idroponica, alla stessa concentrazione di  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Dopo questo periodo di pre-incubazione in coltura idroponica in condizioni controllate e con una concentrazione di azoto identica a quella del mezzo solido utilizzato durante la fase iniziale di crescita delle piantine, queste ultime, sono state trasferite in un mezzo completamente privo di ogni fonte di azoto. Gli estratti proteici delle radici delle piante *wild type* cresciute in alto ammonio (T0) e successivamente

trasferite in condizioni di carenza di azoto per due (T1), quattro (T2) cinque (T3) e sei (T4) giorni, sono stati sottoposti all'analisi HPLC.

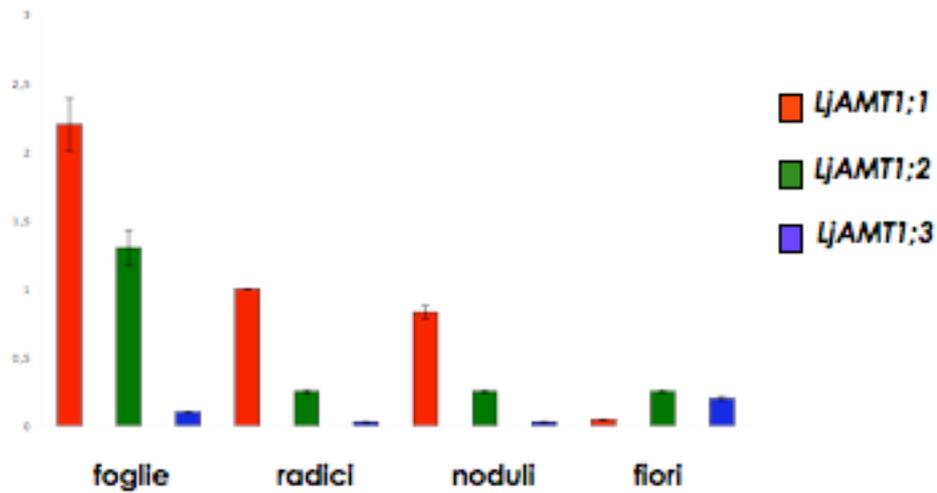
Partendo da circa 200 mg di peso fresco per ogni campione, sono stati analizzati, nei laboratori dell'Università di Napoli, in collaborazione con il Prof. Sergio Esposito, i diversi campioni ottenuti. In particolare è stato analizzato il contenuto dell'amminoacido glutammina, che è il primo prodotto dell'assimilazione dell'ammonio. Come mostrato nel grafico, si osserva una drastica riduzione della quantità di glutammina presente nelle radici rimaste per 48 ore (T1) in condizioni di carenza di azoto. Questo risultato correla perfettamente con la condizione di carenza di azoto, in cui viene a trovarsi la pianta, essendo la glutammina il primo prodotto di assimilazione dell'ammonio e quindi rappresenta una conferma della validità delle condizioni sperimentali utilizzate. Con il passare dei giorni, possiamo osservare un'ulteriore diminuzione del contenuto di glutammina libera nelle radici al tempo T2 (72 ore) fino al raggiungimento di una quota stabile che non si riduce ulteriormente ai tempi T3 e T4 e che presumibilmente coincide già con una avanzata risposta della pianta alle condizioni di crescita ed un conseguente rallentamento drastico delle sue attività metaboliche in generale (Figura 32). E' stato inoltre analizzato il contenuto di altri amminoacidi liberi e i risultati mostrano come le quantità di glutammato, aspartato e asparagina, non subiscono variazioni significative nei campioni analizzati, mentre nel caso dell'alanina si osserva una leggera diminuzione del contenuto nelle radici rimaste per 48 ore in condizioni di carenza di azoto, contenuto che però si mantiene stabile con il passare del tempo. Il livello di riduzione del contenuto di alanina non è comunque da considerare significativo, se confrontato con quello della glutammina (dato non mostrato).



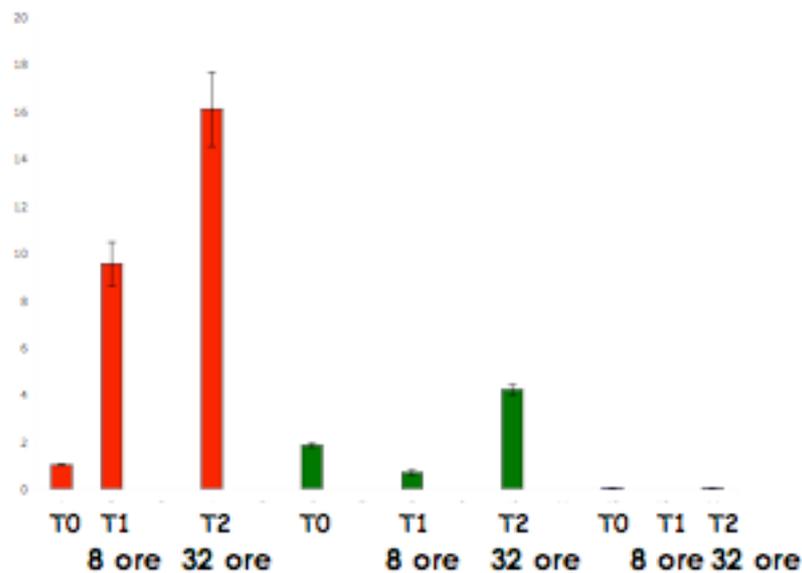
**Figura 32.** Analisi HPLC su estrarri proteici di radici di piante *wild type* di *Lotus japonicus*, cresciute in alto azoto  $1\text{mMNH}_4\text{NO}_3$  (T0) e successivamente trasferite in condizioni di crescita in carenza di azoto per 2 (T1); 3 (T2); 5 (T3) e 6 (T4) giorni. I valori sull'asse delle ordinate indicano la concentrazione di glutammina espressa come  $\mu\text{moli/gr}$  peso fresco.

### **3.5 Effetto dei nutrienti azotati sulla regolazione dei geni *LjAMT1***

Allo scopo di analizzare l'effetto dell'azoto combinato sull'espressione dei tre geni *LjAMT1*, è stato approntato un esperimento in cui l'analisi dei trascritti viene effettuata in radici di piante *wild type* cresciute in diverse concentrazioni di azoto. Le piante sono state fatte crescere per due settimane *in vitro* su mezzo solido, contenente come unica fonte di azoto,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  alla concentrazione di 1mM. Successivamente, sono state trasferite per una settimana in coltura idroponica alla stessa concentrazione di  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Dopo un periodo di pre-incubazione in coltura idroponica in condizioni controllate queste ultime vengono infine trasferite per otto e trentadue ore in un mezzo completamente privo di ogni fonte di azoto. L'RNA è stato quindi estratto dalle radici al tempo zero (T0) e dopo otto (T1) e trentadue ore (T2) di permanenza in condizioni di carenza di azoto. Al tempo T0, condizione di alto ammonio, il livello di espressione di *LjAMT1;2* è leggermente maggiore rispetto a quello di *LjAMT1;1*, mentre quello di *LjAMT1;3* è appena rilevabile. Il trasferimento dalla condizione di crescita in alto azoto, a quella di carenza, si riflette in un'induzione dell'espressione del gene *LjAMT1;1* che incrementa rispettivamente di 9,5 e 16 volte dopo otto e trentadue ore dal trasferimento in carenza di azoto. Un incremento nel livello del trascritto di *LjAMT1;2*, di circa sei volte è osservato dopo trentadue ore dallo shift. Al contrario, l'espressione del gene *LjAMT1;3* non sembra essere regolata dalle concentrazioni di azoto presenti nel mezzo di crescita. L'induzione dell'espressione dei due geni *LjAMT1;1* e *LjAMT1;2*, suggerisce per entrambi i trasportatori, un ruolo importante nel meccanismo di trasporto dell'ammonio dal mezzo esterno all'interno della pianta in condizioni di carenza di azoto (Figura 33).



**Figura 31.** Espressione dei tre geni *LjAMT1* nei maggiori organi della pianta rivelata attraverso analisi quantitativa di real time RT-PCR.



**Figura 33.** Effetti della crescita in condizioni di carenza di azoto. L'analisi quantitativa di real time RT-PCR è stata effettuata sull'RNA estratto da radici di piante cresciute in un mezzo contenente  $1\text{mMNH}_4\text{NO}_3$  (T0) e successivamente trasferite in mezzo privo di ogni fonte di azoto per 8 e 32 ore (T1 e T2).

### **3.6 Analisi funzionale in colture cellulari di *Lotus* del ruolo svolto dal gene *LjAMT1;1* nel trasporto dell'ammonio dal mezzo esterno**

I risultati finora descritti, mostravano come tra i tre membri della famiglia il gene *LjAMT1;1* fosse quello più fortemente regolato dalle concentrazioni di azoto nel mezzo esterno di crescita. Per questo motivo, allo scopo di verificare il ruolo svolto da *LjAMT1;1* ed in particolare capire se il gene sia direttamente coinvolto nel trasporto dell'ammonio dal mezzo esterno alle cellule della pianta, è stato seguito un approccio con un sistema sperimentale *in vitro*. In collaborazione con l'Università di Padova, nei laboratori della professoressa Fiorella Lo Schiavo, sono state messe a punto le condizioni sperimentali per il differenziamento da radici *wild type* di *Lotus japonicus*, di linee cellulari stabili. Sono state quindi approntate delle colture cellulari da piante *wild type* e da piante transgeniche trasformate con un costrutto antisenso per il gene *LjAMT1;1* sotto il controllo del promotore costitutivo 35S CaMV.

La condizione di de-differenziamento, che è necessaria per il mantenimento delle colture cellulari *in vitro* è garantita dalla crescita e dai continui passaggi in mezzo liquido B5 (vedi materiali e metodi), contenente vitamine, saccarosio e con un regime ormonale che prevede un'alta concentrazione del fitormone 2,4D, un auxina, in grado di stimolare continuamente la divisione cellulare. L'analisi molecolare per verificare il grado di silenziamento del gene nelle linee cellulari transgeniche ottenute, è stata fatta mediante analisi di RT-PCR semiquantitativa e i valori relativi del livello di espressione del gene sono stati normalizzati rispetto a quelli del gene dell'actina, utilizzato come gene *housekeeping*. I risultati dell'analisi, mostrano una riduzione del livello di espressione di *LjAMT1;1* nelle linee cellulari trasformate, rispetto a quello delle linee *wild type* del 15, 20, 25 %, rispettivamente, per le linee 1, 4 e 7 (Figure 36).

Inoltre, l'analisi dell'espressione degli altri due trasportatori dell'ammonio, *LjAMT1;2* e *1;3* ha consentito di verificare come l'effetto di down-regolazione sia specifico per il gene bersaglio *LjAMT1;1* (dati non mostrati), nelle tre linee cellulari transgeniche.

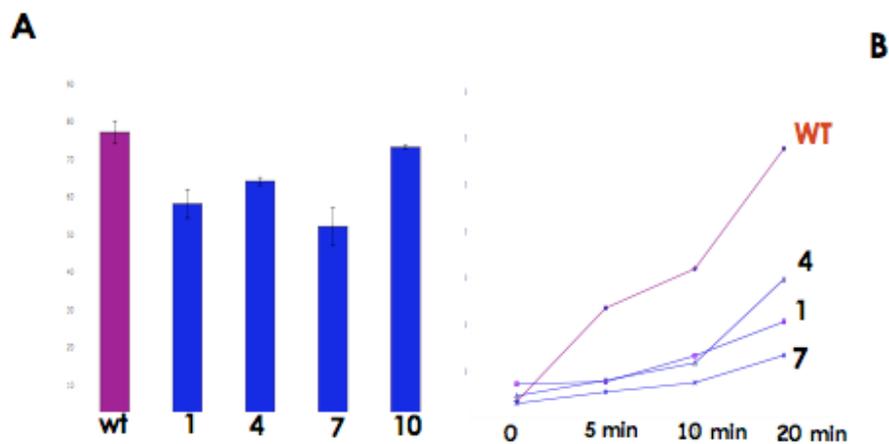
Il dato molecolare, evidenziava quindi solo una parziale riduzione del livello di espressione del gene *LjAMT1;1* nel sistema sperimentale utilizzato. Il passo successivo è stato quello di verificare se, tale livello di down-regolazione, fosse sufficiente a determinare un'alterazione della capacità delle cellule di trasportare l'ammonio dal mezzo esterno.

Allo scopo di indurre il trasporto dell'ammonio dal mezzo di crescita, anche nel caso delle colture cellulari si è proceduto ad un trasferimento delle cellule dalle condizioni di alto azoto del mezzo di crescita B5 a quelle di un mezzo assolutamente identico ma privo di fonte azotata. In questo caso il tempo di mantenimento in condizioni di carenza azotata è stato limitato a 24 ore in quanto le colture cellulari presentano una minore capacità di adattarsi a tale condizione. Infine, dal punto di vista sperimentale, è stato necessario approntare un ulteriore accorgimento. Infatti, le colture cellulari ottenute presentano un certo livello di aggregazione cellulare in materiale di tipo calloso e quindi, allo scopo di ottenere un materiale sperimentale uniforme in cui confrontare l'attività del gene di interesse, dopo lo shift di 24 ore in carenza di azoto, si è proceduto, al filtraggio di un identico volume delle colture *wild type* e transgeniche.

Dopo centrifugazione a bassi giri, un identico volume di cellule precipitate è stato risospeso in 2 ml di mezzo liquido privo di azoto e tale materiale testato per la capacità di trasporto dell'analogo dell'ammonio, il metilammonio radioattivo. I risultati hanno indicato per tutte le linee antisense analizzate una forte inibizione del trasporto del metilammonio marcato all'interno delle cellule rispetto alle *wild type*, del 50, 70 e 80% rispettivamente per le linee 4, 1 e 7 (Figura 34). La capacità di trasporto è stata calcolata a tempi brevi, per venti minuti, con aliquote di 0,2 ml analizzate a 5, 10 e 20 minuti. Il risultato ottenuto, suggerisce quindi, un diretto e

forte coinvolgimento del gene *LjAMT1;1* nel trasporto attivo dell'ammonio dall'esterno all'interno della pianta (Figura 34).

La forte riduzione dell'attività osservata, a fronte della solo parziale down-regolazione del gene nelle tre linee transgeniche 1, 4 e 7, potrebbe riflettere una specificità del sistema sperimentale utilizzato in cui la concentrazione di trasportatori diventa particolarmente limitante rispetto alle necessità fisiologiche delle cellule vegetali in coltura.



**Figura 34.** Analisi delle linee cellulari esprimenti il costrutto antisense per il gene *LjAMT1;1*. A. Analisi di RT-PCR semiquantitativa dell'espressione di *LjAMT1;1* nelle linee cellulari *wild type* e antisense. B. Capacità del trasporto del metilammonio marcato con <sup>14</sup>C, nelle linee cellulari *wild type* e antisense per il gene *LjAMT1;1*. L'attività di trasporto è espressa come nmoli di metilammonio trasportato per mg di proteina.

### 3.7 Regolazione localizzata o sistemica del gene *LjAMT1;1*

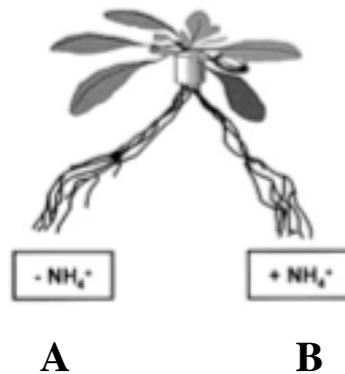
Per investigare se la regolazione dell'espressione dei trasportatori dell'ammonio, sia dovuta ad un segnale localizzato o sistemico, vale a dire se il segnale carenza di azoto, in grado di indurre la trascrizione di *LjAMT1;1*, resta localizzato o viene trasmesso in maniera sistemica a tutta la pianta, è stato messo a punto un esperimento di split-root system. Il materiale sperimentale è ottenuto in seguito ad un taglio effettuato in corrispondenza dell'ipocotile, delle radici di seedlings *wild type* di *Lotus japonicus*. Questo taglio in circa il 50% dei casi porta alla formazione di due radici laterali simili per grado di sviluppo. L'apparato radicale di una stessa pianta può quindi essere diviso in parti uguali e le piante vengono fatte crescere in un mezzo solido contenente alte concentrazioni di ammonio, 1mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , per tre settimane. A questo punto le piante, mantenendo sempre il sistema radicale "splittato", vengono trasferite in coltura idroponica nelle medesime condizioni di crescita per una settimana. Dopo questo periodo di pre-incubazione in idroponica, una parte delle radici vengono mantenute in mezzo contenente ammonio a concentrazioni di 1mM, mentre l'altra metà è trasferita in una condizione di totale carenza di azoto per 24 ore (Figura 35).

Il livello di espressione del gene *LjAMT1;1*, è stato analizzato mediante RT-PCR semiquantitativa utilizzando come controllo negativo. piante in cui le radici "splittate" erano cresciute entrambe nel mezzo contenente 1mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

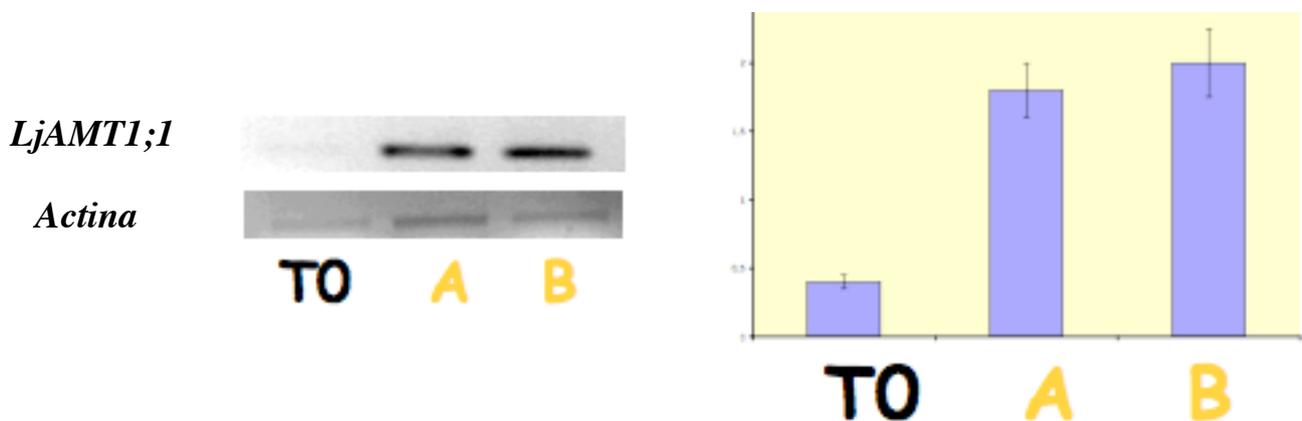
I valori ottenuti sono stati normalizzati rispetto ai valori del livello di espressione del gene costitutivo actina.

Entrambe le radici "splittate", cresciute nelle due differenti concentrazioni di alto e basso azoto, mostrano un'induzione del livello del trascritto del gene rispettivamente di 6,5 e 7,5 volte, se paragonato a quello del tempo T0 (Figura 36). Questo dato mostra, come l'induzione dell'espressione del gene sia regolata in maniera sistemica dalla pianta e suggerisce come tale controllo sia legato almeno

parzialmente ad un segnale nutrizionale correlato alla concentrazione di metaboliti azotati diffusibili (possibilmente anche dell'ammonio stesso).



**Figura 35.** Esperimento di *Split Roots System*: le radici di una stessa pianta di *Lotus japonicus* vengono divise in parti approssimativamente uguali e testate per la loro capacità di risposta a differenti condizioni ambientali (1mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e assenza di azoto).



**Figura 36.** Analisi di RT-PCR semiquantitativa dell'espressione di *LjAMT1;1* nelle radici splittate di piante cresciute in 1mMNH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (T0) e successivamente trasferite per 24 ore, una parte in mezzo privo di ogni fonte di azoto e l'altra mantenuta nelle condizioni iniziali. Le condizioni A e B si riferiscono a carenza e eccesso di azoto, rispettivamente. **A:** amplificazione ottenuta utilizzando i primers specifici per la sequenza del gene *LjAMT1;1*. **B:** quantizzazione delle bande amplificate normalizzate sull'espressione dell'actina.

### **3.8 Coinvolgimento delle proteine AMT1 nel trasporto dell'ammonio prodotto da diverse vie metaboliche**

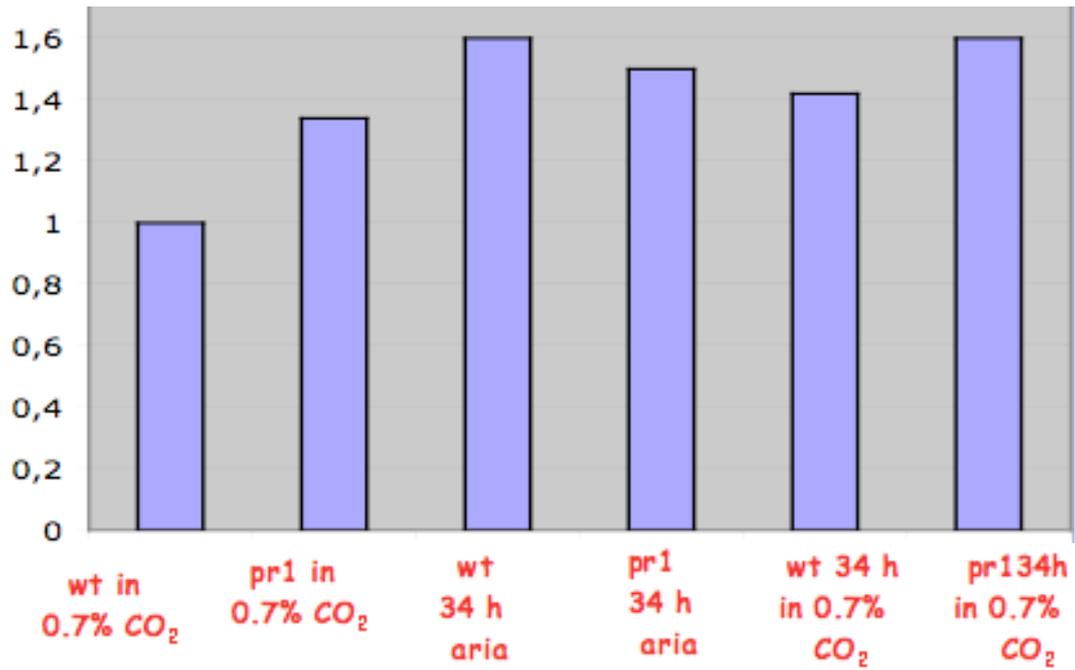
L'ammonio trasportato dal terreno nelle radici, non rappresenta l'unica fonte di azoto per le piante, che possono ottenerlo anche "internamente", attraverso diverse vie metaboliche come ad esempio la degradazione di proteine o la fotorespirazione.

E' stato quindi deciso di analizzare il possibile coinvolgimento delle proteine AMT1 nel trasporto di queste fonti aggiuntive di ammonio considerando che in particolari condizioni di crescita, le quantità di ammonio prodotte dalla fotorespirazione possono eccedere fino a 10 volte quelle ottenute dal trasporto dal mezzo esterno. In particolare, i trasportatori dell'ammonio potrebbero essere coinvolti nell'efflux dell'ammonio prodotto nei mitocondri e/o nell'influx all'interno dei cloroplasti dove avviene la sua assimilazione da parte della glutammina sintetasi plastidica. L'espressione del gene *LjAMT1;1* è quindi stata testata in condizioni di normale pressione d'ossigeno e in quelle di più alta pressione di CO<sub>2</sub> (0.7%) in cui la fotorespirazione non ha luogo. Inoltre questa espressione è stata analizzata in piante di *Lotus japonicus* mutate nella GS plastidica ottenute nei laboratori del Prof. A. Marquez dell'Università di Siviglia (Orea *et al.* 2002). I mutanti sono stati ottenuti mediante mutazione chimica utilizzando l'etil-metansulfonato (EMS), questi mutanti nella GS plastidica, denominati *Ljpr1* e *Ljpr2*, sono in grado di sopravvivere solo in condizione di alta CO<sub>2</sub> in quanto in condizioni normali non sono in grado di assimilare l'ammonio prodotto dalla fotorespirazione e pertanto lo accumulano fino a livelli tossici per la pianta. I primi sintomi da stress si manifestano sulle piante dopo circa 48, 72 ore di permanenza all'aria, e consistono in clorosi e successiva necrosi della foglia come mostrato nella figura 37.



**Figura 37.** Fenotipo dei mutanti di *Lotus japonicus* nella GS plastidica **A.** piante *wild type* (sinistra) e mutanti *Ljpr1* (centro) dopo trasferimento di una settimana dalle condizioni di crescita in alta CO<sub>2</sub> a quella normalmente presente nell'aria. A destra i mutanti trasferiti da condizioni di crescita in alta CO<sub>2</sub> e alla luce all'aria e mantenute al buio. **B.** piante *wild type* e mutanti *Ljpr1*, cresciuti in alta CO<sub>2</sub>, 0,7%. (Orea *et al.*, Plant Physiology 2002).

Nelle nostre condizioni, le piante sono prima fatte crescere *in vivo*, in alta pressione di CO<sub>2</sub> (0,7%), per quattro settimane e successivamente trasferite all'aria per 34 ore. In queste condizioni di crescita, alcune piante hanno mostrato sintomi da stress, successivamente le stesse, sono state di nuovo trasferite in condizioni di crescita in alta CO<sub>2</sub> per altre 34 ore. Il livello di espressione di *LjAMT1;1* è stato analizzato per Real Time RT-PCR sull'RNA estratto da foglie di piante *wild type* e *Ljpr1*, cresciute nelle stesse condizioni. In nessuna delle condizioni di crescita testate, è stato osservato un cambiamento significativo nei livelli del trascritto del trasportatore dell'ammonio, che fosse correlabile alle diverse condizioni di crescita, inoltre l'espressione resta invariata sia nelle piante mutate che nelle piante *wild type* controllo, come mostrato nella figura 38. Questi risultati indicano che l'espressione del gene *LjAMT1;1* non è direttamente regolata dall'ammonio prodotto dalla fotorespirazione.



**Figura 38.** Espressione di *LjAMT1;1* in piante *wild type* e mutate nelle GS plastidica (*Ljpr1*). L'analisi quantitativa di Real Time RT-PCR è stata effettuata sull'RNA estratto da foglie di piante cresciute in alta CO<sub>2</sub> (0,7%), trasferite per 34 ore all'aria e riportate per altre 34 ore in condizioni di crescita in alta CO<sub>2</sub>.

### **3.9 Analisi del ruolo svolto tardivamente dal gene *LjAMT1;1* nel processo simbiotico**

Come descritto nel Par. 2.3, l'analisi per Real-time PCR aveva rivelato un'espressione significativa per almeno due dei membri della famiglia *LjAMT1* nel tessuto nodulare maturo. Un'informazione estremamente interessante in tal senso era già venuta anche dall'analisi *in situ* dell'attività promotrice del gene *LjAMT1;1* effettuata nel nostro laboratorio e pubblicata in D'Apuzzo *et al.* nel 2004 che aveva indicato una specifica espressione nelle cellule invase del nodulo maturo. Questo dato è stato anche confermato da esperimenti di ibridazione *in situ* fatti nei laboratori del professor Katinakis dell'Università di Atene, che evidenziava effettivamente la presenza del messaggero di *LjAMT1;1* nelle cellule infette del nodulo maturo. Allo scopo di comprendere quindi, il ruolo giocato dal trasportatore *LjAMT1;1* nel tessuto nodulare, abbiamo deciso di seguire un approccio di tipo genetico, cercando di modulare l'espressione di questo gene all'interno del nodulo, verificandone poi il conseguente fenotipo.

Sono state analizzate quindi piante transgeniche di *Lotus japonicus* trasformate con un costrutto antisenso per il gene *LjAMT1;1* sotto il controllo del promotore specifico per la leghemoglobina (Figura 39). Le piante sono state ottenute nei laboratori del dottor Michel Udvardi del Max Planck Institute a Golm, in Germania, in seguito a trasformazione genetica mediata da *Agrobacterium tumefaciens*. La leghemoglobina è una nodulina tardiva che si esprime nel nodulo maturo e in particolare nelle cellule invase, in quelle cellule cioè in cui avviene la fissazione dell'azoto ad opera dei batteroidi.

Ho quindi inizialmente caratterizzato otto diverse linee antisenso, dal punto di vista dell'espressione di *LjAMT1;1* nel tessuto nodulare.

Le linee transgeniche sono state infettate con *Mesorhizobium loti* e l'RNA estratto da noduli maturi, ottenuti sei settimane dopo l'infezione.

I dati di espressione sono stati ottenuti in seguito ad esperimenti di Real Time RT-PCR ed hanno consentito di rivelare in tre linee transgeniche denominate

rispettivamente 125-1; 125-3; 131-1, un livello di espressione significativamente ridotto rispetto alle piante *wild type*, utilizzate come controllo, rispettivamente del 59%, 25% e 52%.

Di queste tre linee transgeniche è stato quindi analizzato il fenotipo di nodulazione, confrontandolo con quello ottenuto in seguito all'infezione di radici sia di piante *wild type*, che di piante transgeniche trasformate con un generico costrutto.

Sorprendentemente, i risultati dell'analisi hanno mostrato un'iper-formazione di noduli, sulle radici delle piante di tutte e tre le linee antisenso, rispetto a quello osservato sulle radici delle piante di controllo (Figura 39).

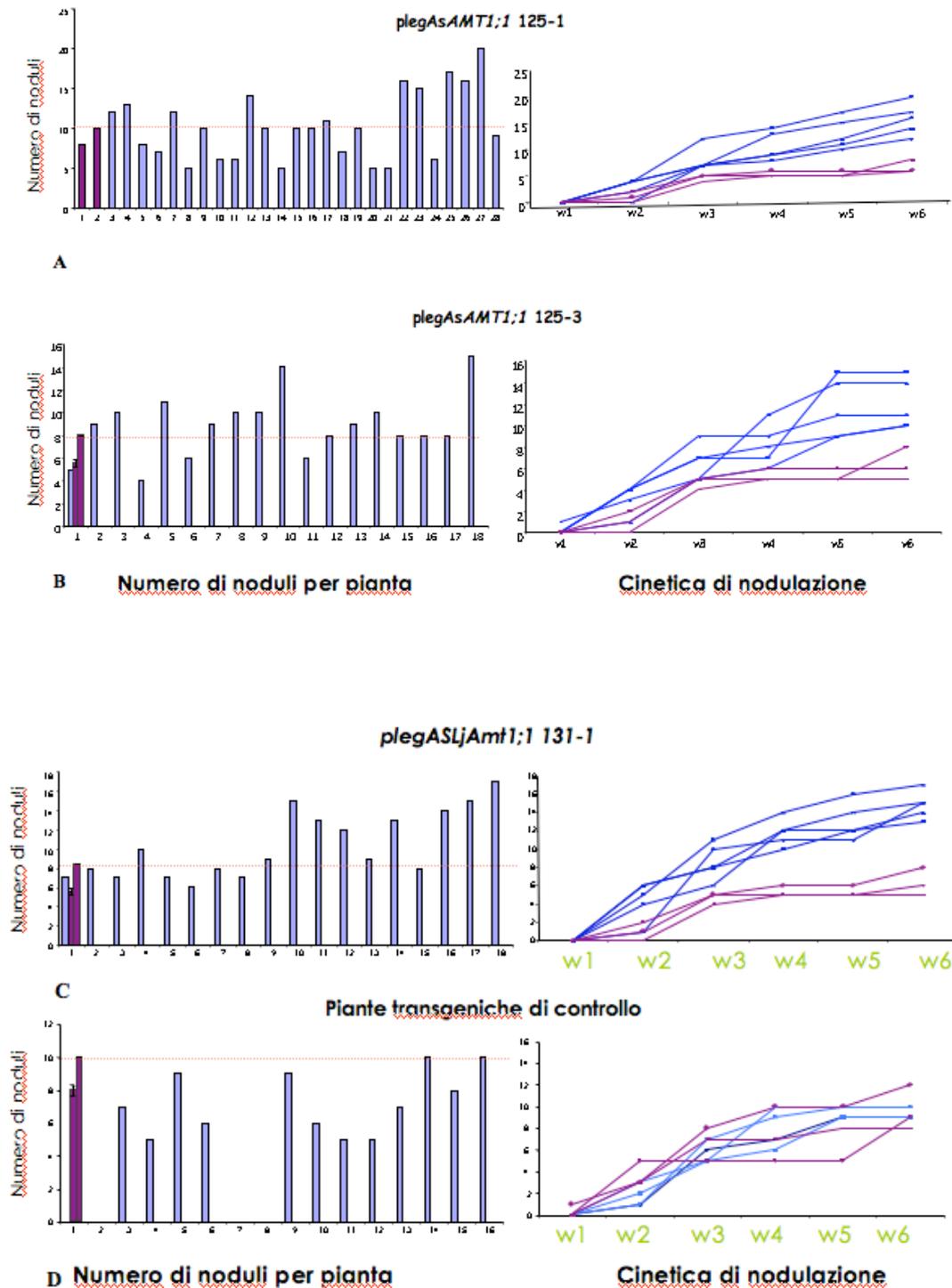
L'analisi riportata nella Figura 41 è stata effettuata su segreganti T1 delle tre linee transgeniche. La segregazione del fenotipo di resistenza all'igromicina il cui gene è sotto il controllo del promotore costitutivo 35S (Figura 41) consente di ipotizzare per le tre linee analizzate la presenza di una singola copia del T-DNA trasformante che è in accordo con la segregazione di tipo Mendeliano osservata. Questo tipo di analisi indica che probabilmente il numero di piante che mostrano il fenotipo ipernodulante e quindi la sua penetranza è sotto-stimato in quanto fra le piante analizzate ci sono anche segreganti (1/4 del totale) che non portano il transgene e di conseguenza non possono mostrare il fenotipo ad esso associato.

L'analisi della cinetica di nodulazione, mostra come l'incremento nel numero di noduli sulle piante trasformate cominci a comparire a partire dalla seconda settimana successiva all'infezione, e tale differenza aumenta fino alla sesta settimana (Figura 40). Inoltre, i noduli che si sviluppano in queste piante, crescono vicini tra loro in una zona circoscritta della radice, con fenotipo a grappolo, e mostrano diversi stadi di sviluppo (Figura 42).

Questo risultato ci consente di ipotizzare che il gene *LjAMT1;1* possa svolgere un ruolo di controllo sull'efficienza del processo di nodulazione.



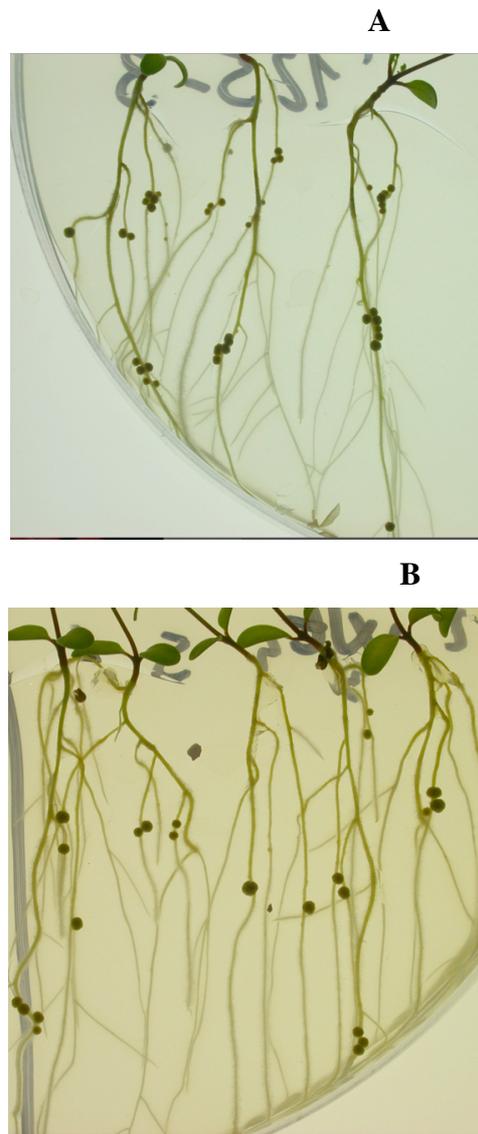
**Figura 39.** Costrutto antisense per il gene *LjAMT1.1* sotto il controllo del promotore per la leghemoglobina utilizzato per la trasformazione delle piante di *Lotus japonicus*, mediata da *Agrobacterium tumefaciens*.



**Figura 40.** Fenotipo e cinetica di nodulazione delle linee antisenso 125-1 (A), 125-3 (B), 131-1 (C) e piante transgeniche controllo (D). Il numero di noduli ottenuto sulle radici delle singole piante transgeniche dopo sei settimane dall'infezione con *M. loti* è stato confrontato con quello ottenuto dopo l'infezione su radici di piante *wild type* (barre viola). Nella parte destra di ogni pannello è mostrata la cinetica di nodulazione dalla prima alla sesta settimana dall'infezione nelle piante transgeniche (linee blu) e *wild type* (linee viola).

<b>p<sub>leg</sub> AS<i>LjAMT1;1</i></b>	<b>IGROMICINA<sup>R</sup></b>
	<b>R/S</b>
<b>125-1</b>	<b>22/12</b>
<b>125-3</b>	<b>25/15</b>
<b>131-1</b>	<b>24/13</b>

**Figura 41.** Analisi della segregazione del fenotipo di resistenza all'igromicina nelle tre linee trasformate con il costrutto antisenso per il gene *LjAMT1;1* sotto il controllo del promotore specifico della leghemoglobina.

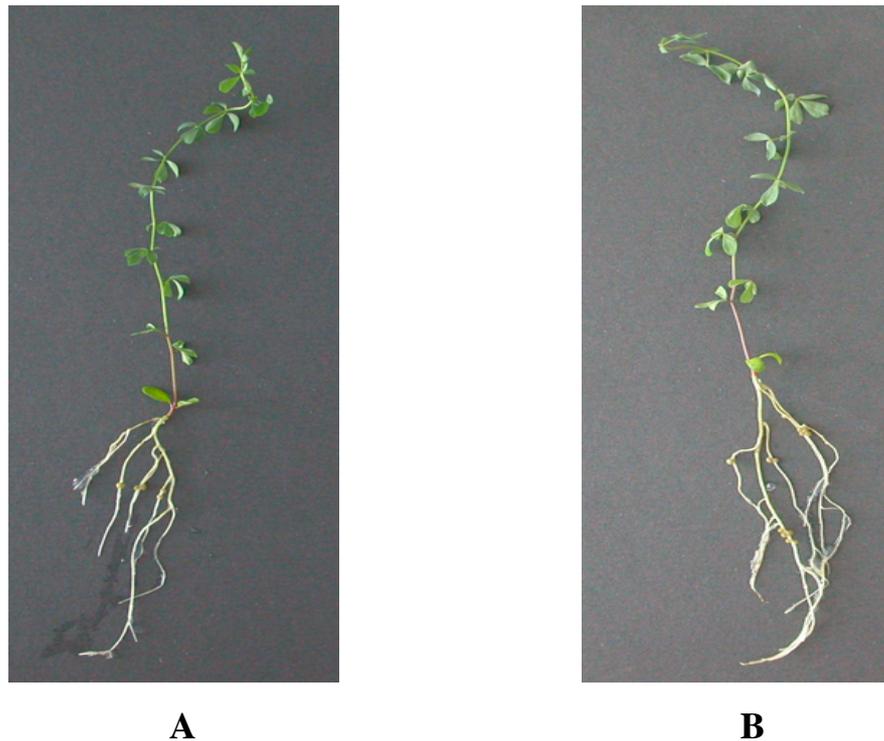


**Figura 42.** Particolare di radici di piante di *Lotus japonicus* dopo sei settimane dall'infezione con *Mesorhizobium loti*. **A.** Linea 125-3 antisenso per il gene *LjAMT1;1* sotto il controllo del promotore specifico della nodulina tardiva, leghemoglobina. **B.** Piante *wild type*, utilizzate come controllo.

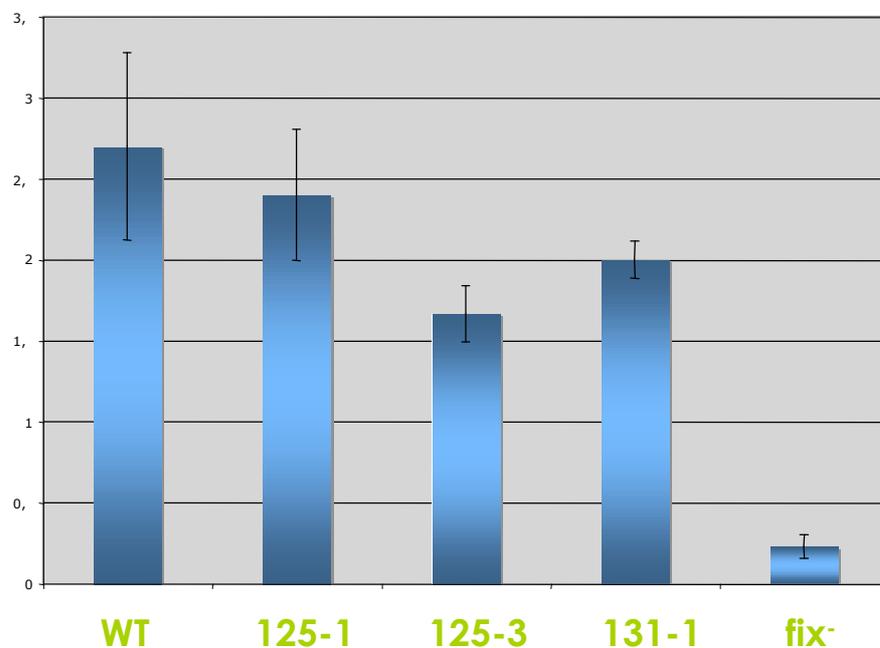
### 3.10 SAGGIO DELL'ATTIVITA' DELLA NITROGENASI

La caratterizzazione del fenotipo delle 3 linee transgeniche parzialmente down-regolate per l'espressione nodulare di *LjAMT1;1* è stata quindi completata dall'analisi della funzionalità dei noduli transgenici ottenuti. Innanzitutto, le piante trasformate non mostrano nessun fenotipo clorotico, che sta a indicare che i loro noduli fissano correttamente l'azoto e che quest'ultimo viene traslocato correttamente al resto della pianta (Figura 43) soddisfacendo quindi le richieste azotate delle piante cresciute in carenza di questo elemento. La prova sperimentale di tale osservazione è stata comunque ottenuta dal saggio di riduzione dell'acetilene (ARA) fatto sulle piante transgeniche e sulle piante wild type utilizzate come controllo. Le piante di *Lotus japonicus wild type* e trasformate, infettate e cresciute *in vitro* per sei settimane su mezzo Jensen, privo di ogni fonte di azoto, sono state analizzate al gas-cromatografo per valutarne l'attività riducente (vedi Materiali e Metodi). In accordo con l'osservazione fenotipica di mancanza di sintomi clorotici dopo un periodo di 6 settimane di crescita su mezzo Jensen, i risultati mostrano come la nitrogenasi delle piante transgeniche sia attiva e la sua attività sia paragonabile a quella delle piante *wild type*. Infatti, i valori ARA per nodulo, sono paragonabili a quelli delle piante *wild type* nodulate di controllo. Come atteso e come mostrato nella Figura 43, i valori di riduzione dell'acetilene ottenuti in piante *wild type* dopo infezione con un ceppo di rizobio mutato in una delle subunità della nitrogenasi (*fix*) sono notevolmente inferiori. Questi ceppi sono in grado di infettare le piante e portare a compimento il processo di organogenesi del nodulo, ma il nodulo maturo ottenuto, non è in grado di fissare l'azoto, di conseguenza le piante mostrano sintomi di carenza da azoto,

primo tra tutti clorosi (Figura 44).



**Figura 43.** Fenotipo di piante di *Lotus japonicus* dopo sei settimane dell'infezione con *Mesorhizobium loti*. **A.** Piante *wild type* **B.** Piante trasformate con il costrutto antisenso per il gene *LjAMT1*; sotto il controllo del promotore della leghemoglobina.



**Figura 44.** Saggio di attività nitrogenasica: nell'asse delle ordinate è riportata la quantità di etilene prodotta per nodulo, nelle piante *wild type*, nelle tre linee transgeniche e nelle piante *wild type* infettate con il ceppo Fix<sup>-</sup>.

### **3.11 Ottenimento di piante esprimenti il gene *LjAMT1;1* sotto il controllo di promotori specifici delle noduline precoci *ENOD12* e *ENOD40*.**

Il gene *LjAMT1;1* non sembra essere coinvolto nei processi precoci di infezione e organogenesi del nodulo, come indicato da esperimenti di analisi della localizzazione dell'espressione del gene nel tessuto nodulare effettuati mediante fusioni fra la regione promotrice di *LjAMT1;1* ed il gene reporter *gusA* che non ne evidenziano una specifica espressione a tempi brevi dall'infezione (dati non mostrati). Per analizzare un eventuale fenotipo indotto dall'espressione del gene durante le fasi precoci del processo simbiotico, sono stati ottenuti costrutti in cui l'espressione di *LjAMT1;1* viene guidata da specifici promotori di geni di alcune noduline precoci quali *ENOD12* e *ENOD40*. Il gene *ENOD40* è tra i geni delle noduline, uno di quelli più rapidamente indotto durante il processo di organogenesi del nodulo. In particolare, in seguito all'infezione da parte di rizobio, è espresso nel periciclo della radice e più tardivamente nella zona centrale e nel tessuto vascolare del nodulo (Gronlung M. *et al.*, 2005).

L'induzione di *ENOD12* avviene due, tre ore dopo l'infezione da parte di *Rhizobio*, e studi sulla localizzazione della proteina, dimostrano come questa sia specialmente localizzata sulle cellule dell'epidermide (Pingret *et al.*, 1998). Lo scopo è quello di indurre l'espressione di *LjAMT1;1* in condizioni e tessuti in cui questo non viene normalmente espresso e, analizzare se questo sia in grado di influenzare gli eventi più precoci di infezione e organogenesi del nodulo.

I trasformanti stabili, sono stati ottenuti in seguito a co-coltura di espianti radicali di piante *wild type* con *Agrobacterium tumefaciens*, come descritto nei materiali e metodi. La cassetta per l'espressione guidata di *LjAMT1;1* è stata clonata nel vettore binario di espressione pCAMBIA 1300, contenente la resistenza all'antibiotico igromicina (Figura 45).

I trasformanti primari stabili di *Lotus japonicus* ottenuti, sono stati trasferiti *in vivo*, in terreno, in camera di crescita con condizioni di luce, umidità e temperatura

controllate. La procedura di trasformazione e rigenerazione *in vitro* di *Lotus japonicus*, richiede un tempo di circa quattro mesi, dal momento dell'induzione del callo al momento in cui le piante rigenerate vengono trasferite *in vivo*.

Per ognuno dei due costrutti sono stati ottenuti cinquanta singoli trasformanti e di questi si è deciso di trasferirne *in vivo* dieci, per ogni costrutto.

Al momento i semi della prima generazione dei trasformanti delle diverse linee, sono stati ottenuti ed è stata analizzata la loro percentuale di germinazione e la segregazione del fenotipo di resistenza all'igromicina. In particolare sono state analizzate sette linee per il costrutto *pENOD40LjAMT1;1* e nove per quello *pENOD12LjAMT1;1* (Figura 47). La segregazione del fenotipo di resistenza all'igromicina il cui gene è sotto il controllo del promotore costitutivo 35S, consente di ipotizzare per alcune delle linee analizzate la presenza di una singola copia del T-DNA trasformante che è in accordo con la segregazione di tipo Mendeliano osservata, come ad esempio per *pENOD12LjAMT1;1* linea 1 e *pENOD40LjAMT1;1* linea 4. Questo tipo di analisi indica anche come fra le linee analizzate ce ne siano alcune che non portano il transgene e che presumibilmente rappresentano piante non trasformanti che hanno evitato la pressione selettiva con igromicina nel corso della procedura di rigenerazione, altre che probabilmente hanno integrato più di una copia del transgene come ad esempio le linee 6 e 9 di *pENOD12LjAMT1;1* o la linea 1 di *pENOD40LjAMT1;1* mentre altre che mostrano un rapporto di segregazione di tipo non mendeliano potrebbero rappresentare dei trasformanti primari chimerici.

Sono comunque in corso esperimenti per la caratterizzazione fenotipica e molecolare delle diverse linee di trasformanti, in attesa della successiva generazione, omozigote.



**Figura 45.** Costrutti del gene *LjAMT1;1* sotto il controllo di due promotori specifici di noduline precoci *ENOD12* e *ENOD40*.

LINEE <i>pENOD12AMT1;1</i>	IGROMICINA <sup>R</sup> R/S
1	14/6
2	0/11
3	0/2
4	3/15
5	0/10
6	16/0
7	2/14
8	1/18
9	11/1

LINEE <i>pENOD40AMT1;1</i>	IGROMICINA <sup>R</sup> R/S
1	17/2
2	11/8
3	7/10
4	7/3
5	15/4
6	0/4
7	1/2

**Figura 46.** Analisi della segregazione del fenotipo di resistenza all'igromicina nelle diverse linee di trasformanti primari *pENOD12LjAMT1;1* e *pENOD40LjAMT1;1*.

## 4. DISCUSSIONE

L'azoto può essere assorbito dalle piante sotto diverse forme come ad esempio nitrato, ammonio o amminoacidi. Le due principali fonti di azoto presenti nel terreno che possono direttamente essere assimilate dalle piante sono l'ammonio e il nitrato.

L'ammonio per la sua assimilazione richiede un minore dispendio di energia rispetto al nitrato che deve prima essere ridotto ad ammonio per poter essere assimilato, ma nonostante ciò sono poche le specie vegetali che crescono bene in terreni contenenti prevalentemente ammonio. La maggior parte delle piante infatti manifestano sintomi di tossicità se cresciute in terreni contenenti prevalentemente questo ione come sorgente azotata e la presenza di entrambe le forme azotate sotto forma di ammonio e nitrato, è fondamentale poiché entrambe sono implicate in diverse funzioni fisiologiche e metaboliche della pianta (Lue *et al.*, 2005).

Sono state avanzate diverse ipotesi per spiegare l'effetto tossico dell'ammonio, una è quella postulata da Britto e collaboratori (Britto *et al.*, 2001), secondo cui poiché il meccanismo di trasporto dell'ammonio è legato al rilascio di protoni nel mezzo esterno, questo provoca una diminuzione dei valori di pH nel mezzo esterno. La tossicità potrebbe inoltre essere dovuta ad uno sbilancio del rapporto C/N determinando concentrazioni limitanti di carboidrati. Infatti, poiché la maggior parte dell'ammonio non viene trasportato alla parte aerea della pianta ma assimilata nelle radici, un eccesso di ammonio potrebbe provocare una considerevole dispendio di energia per la sua assimilazione, con conseguente carenza di carboidrati prodotti dalla fotosintesi che dalle foglie vengono traslocati alla radice. Inoltre la crescita in terreni contenenti elevate concentrazioni di ammonio provoca una diminuzione di ioni  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  che vengono pompati all'esterno per compensare l'effetto dell'uptake dell' $NH_4^+$  sul pH intracellulare nei vari tessuti della pianta, con effetti sulla fisiologia e sul metabolismo della pianta e conseguenti sintomi di carenza nutrizionale. Un altro effetto inibitorio dell'ammonio, quando questo è presente come sola fonte azotata

può anche essere semplicemente legato all'assenza del nitrato che normalmente regola l'apertura degli stomi e la traspirazione (Lu *et al.*, 2005).

Ad ogni modo, l'ammonio, all'interno delle piante, viene generalmente rapidamente convertito in amminoacidi e la sua assimilazione avviene principalmente ad opera del sistema della glutammina sintetasi (GS) e glutammato sintasi (NADH-GOGAT). Successivamente, i vari aminoacidi ottenuti vengono quindi trasportati nei vari tessuti e organi della pianta.

In diverse specie vegetali sono stati isolati e caratterizzati numerosi geni deputati al trasporto dell'ammonio ad alta affinità, questi sono stati raggruppati in due grandi famiglie denominate AMT1 e AMT2. Le proteine raggruppate nella famiglia AMT2 mostrano un'identità inferiore al 25% con i membri appartenenti alla superfamiglia AMT1 ma risultano comunque in grado di trasportare l'ammonio (e non il metilammonio), così come dimostrato dagli esperimenti di complementazione eterologa in lievito.

Questi sistemi di trasporto sono presumibilmente in grado di rispondere alle varie condizioni ambientali e varie possibili concentrazioni di azoto nel mezzo in cui può venire a trovarsi una pianta, oltre che capaci di soddisfare le esigenze dei diversi tessuti nel corso delle varie fasi di sviluppo.

In *Arabidopsis thaliana* e in *Oriza sativa*, le due specie vegetali rappresentative delle dicotiledoni e monocotiledoni, i cui genomi sono stati completamente sequenziati, sono stati isolati e caratterizzati rispettivamente sei e dieci geni *AMT1* codificanti per proteine deputate al trasporto dell'ammonio (Kumar *et al.*, 2003; Sonoda *et al.*, 2003; Loque *et al.*, 2006).

Durante questo progetto di dottorato, ho lavorato all'isolamento di due geni deputati al trasporto dell'ammonio nella pianta leguminosa modello *Lotus japonicus*.

Queste due sequenze compongono, insieme con il gene *LjAMT1;1* precedentemente isolato (Salvemini *et al.* 2001), la famiglia genica *LjAMT1* di *Lotus japonicus*.

L'approccio utilizzato per isolare i due geni, si è basato sull'amplificazione del DNA genomico, utilizzando oligonucleotidi degenerati. Questo tipo di strategia risulta più

sicura rispetto a quella che utilizza come stampo molecole di cDNA in quanto mette al riparo dai problemi legati all'estrema ridondanza e/o al contrario estrema scarsità di prodotti di amplificazione rappresentativi dei vari membri della famiglia che sarebbero stati dovuti al diverso livello di espressione delle varie sequenze nelle condizioni utilizzate per l'estrazione di RNA. Le complete sequenze dei tre cDNA, ottenute dalle 5' e 3' RACE-PCR, sono state utilizzate per esperimenti di complementazione eterologa in lievito, col fine di stabilire i parametri biochimici di costante di affinità, velocità massima e costante di inibizione (Figura 30).

La caratterizzazione biochimica, dimostra che le tre sequenze hanno un'alta affinità per l'ammonio, i valori dell'affinità per l'ammonio dei trasportatori di *Lotus*, compresi tra 1,7 e 15 $\mu$ M, sono simili a quelli riportati per i membri AMT1 di *Arabidopsis* (Gazzarrini *et al.*, 1999). Inoltre, l'analisi biochimica effettuata in *S. cerevisiae*, evidenzia una notevole specificità per il trasporto dell'ammonio da parte delle tre proteine di *Lotus* che invece mostrano una maggiore variabilità per quanto concerne l'affinità e la capacità di trasporto del metilammonio (Figura 30).

L'analisi del pattern d'espressione dei tre geni nei maggiori organi della pianta rivela come questi siano differenzialmente espressi e regolati. Sembra quasi ci sia una gerarchia d'espressione in cui *LjAMT1;1* è sempre maggiormente espresso, rispetto agli altri due, ad eccezione dei fiori in cui sono *LjAMT1;2* e *LjAMT1;3* a mostrare un maggiore livello di espressione (Figura 31).

La caratteristica peculiare dei trasportatori di *Lotus japonicus* è che tutti e tre i geni sono maggiormente espressi nelle foglie piuttosto che nelle radici, come invece è stato osservato per la maggior parte dei trasportatori di pianta fino ad ora caratterizzati. L'espressione preferenziale nelle foglie è stata comunque riscontrata in altri due trasportatori già caratterizzati, e in particolare il trasportatore di pomodoro *LeAMT1;3* e in *AtAMT2;1* di *Arabidopsis thaliana* (Von Wirèn *et al.*, 2000, Sohlenkamp *et al.*, 2002).

I trasportatori nelle foglie potrebbero avere come compito il recupero dell'ammonio prodotto dalla fotorespirazione, perso dai mitocondri e riprotonato nel citoplasma.

Questo potrebbe essere in accordo con i dati ottenuti attraverso l'analisi dell'attività GUS in linee transgeniche stabili trasformate con i costrutti in cui il gene reporter *gusA* è sotto il controllo delle regioni promotrici dei tre trasportatori. L'analisi istochimica mostra infatti per *LjAMT1;1* e *LjAMT1;2* una localizzazione nelle foglie al livello del sistema vascolare e nelle cellule del mesofillo (D'Apuzzo *et al.*, 2004). *LjAMT1;3* è l'unico membro della famiglia che mostra un maggiore livello di espressione nei fiori piuttosto che nelle foglie e questi risultati suggeriscono in generale un diverso ruolo delle tre proteine nel trasporto e utilizzo dell'ammonio tra i tessuti che producono ammonio ("source tissues") e tra quelli che lo utilizzano ("sink tissues"). In particolare lo sviluppo dei fiori e degli organi riproduttivi, è anche il risultato di una complessa rete di rifornimenti nutrizionali e sicuramente, dal punto di vista del metabolismo azotato, non essendo i fiori in grado di produrre direttamente l'ammonio, l'espressione dei trasportatori dell'ammonio ed in particolare di *LjAMT1;3* potrebbe giocare un ruolo importante in tale approvvigionamento, come d'altra parte dimostrato dall'espressione nei fiori di altri geni implicati nell'assimilazione dell'azoto.

Gli esperimenti volti ad analizzare la regolazione da azoto dei tre geni, hanno evidenziato come questi, analogamente agli altri membri caratterizzati nelle altre specie, siano fortemente regolati dalla disponibilità di composti azotati nel mezzo esterno. Il gene *LjAMT1;1* è quello che manifesta la maggiore dipendenza dall'azoto. L'espressione del gene infatti è significativamente indotta nelle radici di piante *wild type* dopo 8 e 32 ore di permanenza in un mezzo privo di ogni fonte di azoto, rispetto al livello del trascritto riscontrato nelle radici cresciute in alto ammonio. Anche *LjAMT1;2* mostra una regolazione da azoto, infatti dopo 32 ore di permanenza in un mezzo privo di ogni fonte di azoto si osserva un'induzione di circa sei volte del trascritto rispetto alla condizione di crescita in alto ammonio, mentre *LjAMT1;3* mantiene una bassa e stabile espressione, sia in condizioni di crescita in alto ammonio che in condizioni di crescita in carenza (Figura 33).

I risultati ottenuti fino a questo momento comunque hanno evidenziato come *LjAMT1;1* sia tra i tre geni *AMT1* di *Lotus*, quello maggiormente espresso nei diversi organi della pianta e quello maggiormente indotto in condizioni di carenza di azoto, suggerendo un suo ruolo importante nel trasporto dell'ammonio all'interno delle radici a basse concentrazioni di azoto nel mezzo circostante. Tale ruolo è in accordo inoltre con la sua più alta affinità per l'ammonio. *LjAMT1;1* sembrerebbe inoltre rappresentare l'ortologo di *AtAMT1;1* e infatti la sua regolazione è molto simile a quella di questo gene di *Arabidopsis*. Entrambi sono up-regolati in condizioni di crescita in carenza di azoto ed entrambi mostrano la maggiore affinità per l'ammonio fra i diversi membri della famiglia.

Inoltre questi due geni mostrano anche una co-localizzazione dell'espressione nei tessuti. *LjAMT1;1*, è espresso nei peli radicali (D'Apuzzo *et al.*, 2004), analogamente ad *AtAMT1;1*, come dimostrato recentemente dai risultati ottenuti dall'analisi di piante di *Arabidopsis* trasformate con un costrutto contenente la fusione tra il gene *AMT1;1* e la GFP (Loquè *et al.*, 2006).

Uno dei ruoli fondamentali postulati per le proteine AMT1 è quello del trasporto dell'ammonio dal suolo alle cellule della radice della pianta. I primi esperimenti che mostrano un diretto coinvolgimento delle proteine nel trasporto dell'ammonio dal mezzo esterno all'interno delle cellule vegetali, sono stati pubblicati da Kaiser e collaboratori nel 2002. In quel lavoro è caratterizzato un mutante knockout in *Arabidopsis* per il gene *AtAMT1;1*. Le piante mostrano una riduzione della capacità del trasporto pari al 30% rispetto a quella delle piante *wild type*. Recentemente, una ulteriore analisi genetica condotta su due diverse linee mutanti di *Arabidopsis* ottenute per inserzione di T-DNA nei geni *AtAMT1;1* e *AtAMT1;3* ha indicato per ognuno delle due proteine codificate da questi geni un contributo di circa il 30% di attività di uptake dell'ammonio nelle radici dimostrando un sinergismo nella loro azione (Loquè *et al.*, 2006).

Gli esperimenti condotti nel nostro laboratorio su linee cellulari di *Lotus japonicus*, trasformate con un costrutto contenente la sequenza antisenso del gene *LjAMT1;1*

sotto il controllo del promotore costitutivo 35S del virus del mosaico del cavolfiore (CaMV), mostrano come in tali linee ci sia una riduzione dal 50 all'80% della loro capacità di trasporto del metilammonio dal mezzo esterno all'interno delle cellule. Tale inibizione si osserva nonostante il livello di riduzione del trascritto di *LjAMT1;1* nelle linee cellulari trasformate, rispetto a quello delle linee *wild type* sia solo del 15, 20 e 25 %, rispettivamente (Figura 34). Questo suggerisce fortemente che il gene *LjAMT1;1* sia direttamente implicato in questo meccanismo del trasporto e inoltre come la sinergia tra i tre geni isolati in *Lotus*, almeno nel sistema sperimentale da noi utilizzato, sia diversa rispetto a quella riscontrata tra i trasportatori di *Arabidopsis*.

Come mostrato nella Figura 6, il flusso dei composti azotati dal mezzo esterno alle radici della pianta e fra i vari organi e tessuti di questa è estremamente complesso ed è quindi importante stabilire se e come, la pianta attraverso tali flussi possa trasmettere il suo stato nutrizionale continuamente a tutti i suoi organi.

Esperimenti condotti in *Arabidopsis* da Rawat e collaboratori (Rawat *et al.* 1999), suggeriscono che la sintesi di glutamina, il primo prodotto dell'assimilazione dell'ammonio, è in grado di influenzare l'espressione di *AtAMT1,1*. Un tale tipo di regolazione dovrebbe suggerire che il controllo sull'espressione di *AMT1;1* è dovuto ad un segnale che dipende dallo stato nutrizionale generale della pianta, che viene decodificato attraverso la concentrazione di particolari metaboliti. Un tale segnale è lecito aspettarsi che possa quindi essere diffusibile in modo da essere recepito da vari organi e tessuti della pianta. Allo scopo di investigare se la regolazione dell'espressione dei trasportatori dell'ammonio, sia dovuta ad un segnale localizzato o sistemico, vale a dire se il segnale carenza di azoto, resta localizzato o se in maniera sistemica viene avvertito da tutta la pianta, è stato messo a punto un esperimento di *split-root system*, in cui le radici di una stessa pianta di *Lotus japonicus* vengono divise in parti uguali, e fatte crescere in coltura idroponica, una parte in alto ammonio, l'altra in totale carenza di azoto. I risultati del nostro esperimento mostrano come l'espressione del gene *LjAMT1;1* sia controllata in maniera sistemica,

attraverso un sistema che probabilmente trasmette, attraverso lo shoot al resto della pianta, lo status nutrizionale azotato (Figura 36).

Nel 2001 Gansel e collaboratori, avevano dimostrato attraverso un analogo esperimento di split root system in *Arabidopsis thaliana*, come l'espressione di *AtAMT1;1* fosse invece controllata localmente dallo status azotato delle radici. Quindi ancora una volta questi risultati mostrano un diverso comportamento dei trasportatori di *Lotus* rispetto a quelli di *Arabidopsis*. Al contrario, l'analisi dell'espressione del trasportatore del nitrato di *Arabidopsis*, *AtNTR2;1*, mostra una regolazione analoga a quella di *LjAMT1;1*, infatti la sua espressione è controllata dallo status nutrizionale azotato dell'intera pianta.

In generale comunque, esistono delle differenze sostanziali nella regolazione dei trasportatori ad alta affinità dell'ammonio e del nitrato, mentre l'espressione dei primi è indotta in condizioni di carenza di azoto, l'espressione dei geni responsabili del trasporto del nitrato, è up-regolata dall'aggiunta di nitrato a concentrazioni non limitanti per la pianta, mentre quando la disponibilità di quest'ultimo diventa limitante, il livello del trascritto del gene diminuisce (Nazo *et al.*, 2003). Recentemente, per il trasportatore ad alta affinità di *Arabidopsis AtNTR2;1* è stato dimostrato un ruolo di sensore delle concentrazioni di nitrato nel mezzo di crescita. Infatti, un mutante knockout in questo gene è in grado, indipendentemente dalla presenza di nitrato nel mezzo di crescita, e quindi dalla sua attività di uptake, di influenzare l'architettura del sistema radicale (Little *et al.*, 2005; Remans *et al.*, 2006)

L'ammonio trasportato dal mezzo esterno all'interno delle cellule radicali della pianta non è comunque l'unica fonte di cui possono disporre le piante, che infatti possono ottenerlo "internamente" attraverso diverse vie metaboliche come ad esempio la degradazione di aminoacidi o la fotorespirazione.

Un'altra parte di esperimenti ha avuto quindi come scopo l'analisi del possibile coinvolgimento delle proteine AMT1, nel trasporto di queste fonti aggiuntive di ammonio considerando che le quantità di ammonio prodotte dalla fotorespirazione possono eccedere di 10 volte quelle dovute all'assimilazione dal mezzo esterno.

L'espressione dei geni *AMT1* è quindi stata verificata in condizioni di normale pressione d'ossigeno e in quelle di più alta pressione di CO<sub>2</sub> (0.7%) in cui la fotorespirazione non ha luogo. Inoltre questa espressione è stata analizzata in piante di *Lotus* mutate nella GS plastidica (Orea et al. 2002). Questi mutanti nella GS sono in grado di sopravvivere solo in condizione di alta CO<sub>2</sub> in quanto in condizioni normali non sono in grado di assimilare l'ammonio prodotto dalla fotorespirazione e lo accumulano fino a livelli tossici per la pianta. Analizzando il livello di espressione di *LjAMT1;1* sia nei mutanti che nelle piante *wild type* non osserviamo differenze significative nelle due condizioni di crescita descritte (Figura 38). Quindi, l'espressione dei geni *AMT1* non sembra essere direttamente regolata dall'ammonio prodotto dalla fotorespirazione. Tutto ciò è in accordo con le loro caratteristiche di trasportatori ad alta affinità e con la mancanza di segnali che ne suggeriscano una localizzazione su particolari compartimenti cellulari. I dati fin'ora riportati in letteratura indicano infatti per i trasportatori caratterizzati in altre specie vegetali, una localizzazione sulla membrana plasmatica (Udvardi *et al.* 2002) che sembra essere anche confermata da dati preliminari ottenuti nel nostro laboratorio. Comunque, non si può escludere che una localizzazione sulla membrana plasmatica delle cellule del mesofillo fogliare sia connessa ad una funzione di recupero dell'ammonio prodotto dalla fotorespirazione perso nello spazio apoplastico.

La specificità di uno studio avente come scopo la caratterizzazione di geni coinvolti nel trasporto dell'ammonio è sottolineata dal fatto che le piante leguminose, a differenza delle altre specie vegetali, possono disporre di una fonte aggiuntiva di azoto, grazie alla loro capacità di intraprendere con i batteri del suolo, appartenenti alla famiglia delle *Rhizobiaceae*, un processo mutualistico-simbiotico che porta alla formazione di un nuovo organo sulle radici della pianta, il nodulo, all'interno del quale avviene il processo di fissazione dell'azoto. Tra i due simbionti inizia così uno scambio di metaboliti, il batterio fornisce alla pianta l'ammonio prodotto dal processo di fissazione dell'azoto, e la pianta fornisce ai batteri i prodotti carboniosi della fotosintesi, come fonte di energia. A livello quindi dei simbiosomi (vedi Par. 1.15)

avvengono moltissimi scambi fra i due partners simbiotici e la membrana peribatteroidale va incontro ad un preciso programma di differenziamento nel corso dell'infezione proprio per poter svolgere al meglio tale funzione. In particolare, gli acidi dicarbossilici, metabolizzati dal ciclo TCA (acidi tricarbossilici), sono l'unica fonte di carbonio per i batteroidi come dimostrato dal fenotipo *fix<sup>-</sup>* dovuto a mutazioni batteriche nel gene per il trasporto degli acidi dicarbossilici (*dctA<sup>-</sup>*) e in quello codificante per l'attivatore trascrizionale (*dctD<sup>-</sup>*) responsabile dell'espressione dei prodotti enzimatici deputati all'utilizzo di questi zuccheri.

Per quanto riguarda gli aminoacidi che vengono rilasciati dalle cellule invase del nodulo a quelle non invase e al resto del nodulo, quasi certamente si tratta di alanina, ma anche l'aspartato, il glutammato e la glutammina possono derivare direttamente dall'assimilazione dell'ammonio rilasciato dai batteroidi (Poole *et al.*, 2006).

Per quanto riguarda l'ammonio, questo è stato dimostrato essere allo stesso tempo il primo prodotto del processo simbiotico e il suo maggiore regolatore. L'aggiunta di piccole quantità di nitrato, ammonio o urea induce un incremento della crescita delle giovani piantine e il numero e la grandezza dei noduli che si formeranno, mentre una presenza eccessiva di queste fonti azotate, riduce il numero dei siti di infezione e in generale il corretto sviluppo e funzionamento del nodulo. Quindi, lo studio dei geni AMT1 risulta di particolare interesse, sia per investigare un loro eventuale coinvolgimento nel processo di simbiosi batterio-pianta, sia per comprendere i meccanismi con cui l'ammonio addizionale fornito dal nodulo, si integra nel meccanismo generale di controllo che regola il trasporto e la distribuzione di questo nutriente all'intera pianta. In altre parole, giocando l'ammonio un ruolo regolativo fondamentale in tutte le varie fasi dell'interazione simbiotica è plausibile pensare che i trasportatori di questo componente possano svolgere un ruolo importante come modulatori di tali effetti regolativi.

In particolare, sono varie le fasi del processo di simbiosi in cui i trasportatori potrebbero essere implicati. Nelle fasi precedenti all'infezione, potrebbero contribuire

ad “avvertire” la condizione di carenza di azoto nel mezzo esterno, condizione necessaria affinché possa iniziare il processo simbiotico, e segnalarlo alla pianta in modo da dare il via a tutti gli eventi successivi che porteranno alla formazione del nodulo. Questa funzione è in accordo con la teoria secondo cui i geni *AMT* possono svolgere un ruolo di *sensing* del segnale carenza di azoto nel mezzo esterno, legando tale capacità ad un preciso processo di sviluppo, come dimostrato per il mutante *mep2* di *S. cerevisiae*. Infatti, in condizioni di carenza di azoto *S. cerevisiae* inizia un programma di sviluppo che porta alla formazione di pseudoife, delle strutture filamentose attraverso le quali le cellule aumentano la loro superficie di contatto con il mezzo esterno alla ricerca di fonti azotate. Risultati sperimentali hanno evidenziato che questo programma di sviluppo è mediato dall’azione di uno dei tre geni deputati al trasporto dell’ammonio, in particolare da *mep2*. Infatti un ceppo di lievito mutato nel gene *mep2*, pur trovandosi in condizione di carenza di azoto, non è in grado di sviluppare le pseudo-ife (Lorenz and Heitman, 1998).

Tale ruolo di sensore potrebbe anche essere esercitato durante la fase di infezione del batterio quando i prodotti del metabolismo azotato rilasciati da *Rizobio* potrebbero rappresentare un segnale che consente alla pianta di riconoscere il simbionte come un partner efficiente per la fissazione dell’azoto e decidere quindi di proseguire nel processo di organogenesi del nodulo.

La progressione dei batteri nei canali d’infezione avviene per divisione cellulare: ossia la pianta fornisce ai batteri tanto nutrimento da consentire loro di riprodursi molto efficientemente. I canali d’infezione procedono in direzione opposta a quella della crescita del nodulo radicale quindi verso il centro della radice. Durante la fase d’infezione, i batteri giovani, all’interno del filamento non sono ancora in grado di fissare l’azoto, il loro metabolismo azotato è pertanto di tipo assimilativo e l’espressione dei trasportatori dell’ammonio di pianta dovrebbe in questa fase essere ridotta, per non interferire con la necessità di assimilazione dell’ammonio da parte del batterio invadente. Per quanto riguarda *Rhizobium* è infatti noto che, al momento dell’invasione delle cellule del primordio nodulare, avviene una down-regolazione dei geni codificanti per gli enzimi coinvolti nell’assimilazione dell’azoto (Brown and

Dilworth, 1975), il batterio smette di dividersi e differenziatosi nella forma di batteroide maturo fissa l'azoto atmosferico ad ammonio.

In letteratura sono riportati dati in cui si dimostra come l'espressione ectopica del gene *amtB* di *Rhizobium etli*, nella zona centrale di fissazione dell'azoto, determini una precoce senescenza del nodulo di fagiolo e difetti nel processo di invasione (Tatè *et al.*, 1999). Questo suggerisce che affinché l'invasione possa essere efficiente i batteroidi giovani devono completamente rilasciare l'ammonio prodotto dalla fissazione (metabolismo di tipo fissativo), che deve quindi essere trasportato alle cellule vegetali.

Infine, i trasportatori potrebbero essere implicati nel trasporto dell'ammonio ridotto dai batteroidi, attraverso la membrana peribatteroidale al citoplasma delle cellule invase del nodulo e/o nel recupero di quello perso nello spazio apoplastico.

Di nuovo la mia attenzione si è soprattutto focalizzata sul gene *LjAMT1;1*, questo perchè esperimenti condotti in laboratorio, aventi come scopo lo studio della localizzazione della espressione genica, mediante analisi di piante trasformate con un costrutto contenente la sequenza del gene reporter *gusA* di *E. coli*, sotto il controllo del promotore di *LjAMT1;1*, avevano dimostrato una specifica espressione del gene, nella zona centrale del nodulo maturo e presumibilmente nelle cellule invase, oltre che nel tessuto nodulare vascolare. Tali risultati sono inoltre stati confermati da esperimenti di ibridazione *in situ* effettuati con sonde specifiche del gene *LjAMT1;1* (D'Apuzzo *et al.*, 2004). Quindi, dato questo quadro del profilo di espressione nodulare di *LjAMT1;1* la nostra attenzione si è focalizzata soprattutto sull'analisi del coinvolgimento del trasportatore durante le fasi più tardive del processo di nodulazione ed in particolare durante il funzionamento del nodulo.

Sono state analizzate piante transgeniche trasformate con un costrutto contenente la sequenza antisenso di *LjAMT1;1* sotto il controllo specifico del promotore di una nodulina tardiva, la leghemoglobina espressa specificamente nelle cellule invase del nodulo (Figura 39). In generale, la fissazione dell' $N_2$  ad ammonio avviene grazie all'azione catalitica della nitrogenasi la cui attività è strettamente dipendente dalla pressione di ossigeno presente nel nodulo. Nella zona di fissazione è presente una

molecola molto simile, per struttura e per ruolo, all'emoglobina umana, che prende il nome appunto di leghemoglobina: questa proteina tiene sotto controllo la concentrazione di ossigeno, bilanciando da un lato la necessità di O<sub>2</sub> per la respirazione mitocondriale, ma evitando dall'altro l'inibizione della nitrogenasi ad opera dell'ossigeno stesso. Tale proteina, responsabile del colore rosato che assume il nodulo proprio nella zona di fissazione, è una vera proteina simbiotica in quanto il gruppo eme (che contiene il ferro responsabile del legame con O<sub>2</sub>) è sintetizzato dal batteroide, mentre la regione globinica è prodotta dalla cellula vegetale.

In laboratorio avevamo a disposizione nove linee antisense e di queste, tre hanno mostrato una riduzione significativa del livello di espressione di *LjAMT1;1*, rispetto alle piante *wild type*, utilizzate come controllo.

I dati sono stati ottenuti in seguito ad esperimenti di Real Time RT-PCR effettuati su RNA estratto da noduli maturi, ottenuti sei settimane dopo l'infezione con *Mesorhizobium loti*. In nessuno dei campioni analizzati è stata osservata la completa mancanza del trascritto del gene, ma questo, è in accordo con il dato della localizzazione dell'attività promotrice del gene, in cui si osserva espressione del trasportatore anche nel tessuto vascolare del nodulo maturo. Nelle piante transgeniche infatti l'espressione del gene *LjAMT1;1* nel tessuto vascolare deve essere di un livello pari a quello delle piante *wild type*, in quanto il promotore della leghemoglobina è espresso solo nelle cellule invase del tessuto centrale e l'RNA viene estratto da noduli maturi, non essendo possibile separare il tessuto vascolare dalla zona centrale, invasa.

In queste piante silenziate, è stata analizzato il fenotipo di nodulazione ed il numero di noduli ottenuto è stato confrontato con quello ottenuto dopo l'infezione di piante *wild type*, e di piante transgeniche trasformate con un generico costrutto (Figura 40). I risultati dell'analisi mostrano un significativo aumento del numero di noduli sulle piante delle tre linee antisense rispetto ai controlli. L'incremento nel numero di noduli comincia a comparire a partire dalla seconda settimana successiva all'infezione e va via via aumentando fino a 6 settimane. L'analisi sulle piante

trasformate con un diverso costrutto, ci ha consentito di escludere che il fenotipo osservato fosse dovuto semplicemente all'inserzione casuale del transgene nel genoma della pianta.

Questo risultato ci fa ipotizzare che *LjAMT1;1* svolge un ruolo di sensore e di controllo delle fasi tardive della nodulazione. E' possibile che le piante, in mancanza del gene *AMT1;1*, inizino un secondo ciclo di nodulazione, che è normalmente inibito nelle piante *wild type*; infatti sulle radici delle piante transgeniche si osservano noduli a diversi stadi di sviluppo, e in particolare noduli più giovani che si formano sulle radici secondarie.

Questo tipo di fenotipo è normalmente osservato in piante *wild type* infettate con ceppi di *Rhizobium* non in grado di fissare l'azoto ed in questi casi la pianta deve rispondere con un nuovo ciclo di nodulazione, per cercare di sopperire alla condizione di carenza di azoto che infatti si manifesta con sintomi di clorosi a livello della parte aerea. Nel caso delle piante antisenso per *LjAMT1;1* invece la fissazione dell'azoto avviene normalmente come dimostrato dal saggio dell'attività della nitrogenasi ed infatti le piante non mostrano alcun sintomo di carenza azotata (Figura 44).

Quindi l'espressione di *LjAMT1;1* nelle cellule invase potrebbe essere legata ad una funzione di "sensing" del corretto funzionamento del nodulo che non sarebbe direttamente correlata ad una sua funzione di trasporto. D'altra parte, la concentrazione di ammonio nella cellula invasa è molto al di là dell'intervallo compatibile con l'attività di un trasportatore ad alta affinità come *LjAMT1;1* ed inoltre, dati recenti sembrano escludere il coinvolgimento di questa proteina nel trasporto dell'ammonio dal simbiosoma al citoplasma delle cellule invase. Il meccanismo di trasporto dell'ammonio dal simbiosoma al citoplasma della cellula invasa del nodulo e da questa al resto della pianta è stato oggetto nel tempo di molti dibattiti. Il primo modello postulato da Day nel 1990 (Udvardi e Day 1990), proponeva una diffusione dell'ammonio sotto forma di  $\text{NH}_3$  attraverso la membrana del simbiosoma al citosol della cellula vegetale. Più recentemente l'ipotesi della

diffusione è stata rivista e sembrerebbe che lo ione ammonio sia invece trasportato come tale all'esterno dei simbiosomi attraverso i canali cationici della membrana peribatteroidale, attraverso un trasporto non selettivo, come quello operato invece dai trasportatori ad alta affinità. Elevate concentrazioni di ammonio potrebbero provocare una depolarizzazione della membrana con conseguente apertura di questi canali cationici. La depolarizzazione della membrana è mediata inoltre da una pompa  $H^+$  ATPase permettendo l'apertura dei canali ed il flusso dei cationi quali  $NH_4^+$  e  $K^+$  (Roberts *et al.*, 2002). Tale processo dovrebbe essere naturalmente, finemente controllato perché un'eccessiva depolarizzazione danneggerebbe la membrana e questo controllo potrebbe essere esercitato dalle concentrazioni del magnesio citosolico.

Naturalmente, non si può escludere che la proteina AMT1;1 eserciti nel nodulo, una funzione di trasporto indirizzata verso il recupero dell'ammonio, non immediatamente assimilato, e perso all'esterno delle cellule invase ("leakage"), nello spazio apoplastico. Indipendentemente da questa eventuale funzione comunque, LjAMT1;1 potrebbe essere coinvolto in quel processo generale che prende il nome di autoregolazione della nodulazione, e che finemente stabilisce il numero di noduli che si formeranno sulle radici della pianta in seguito all'infezione.

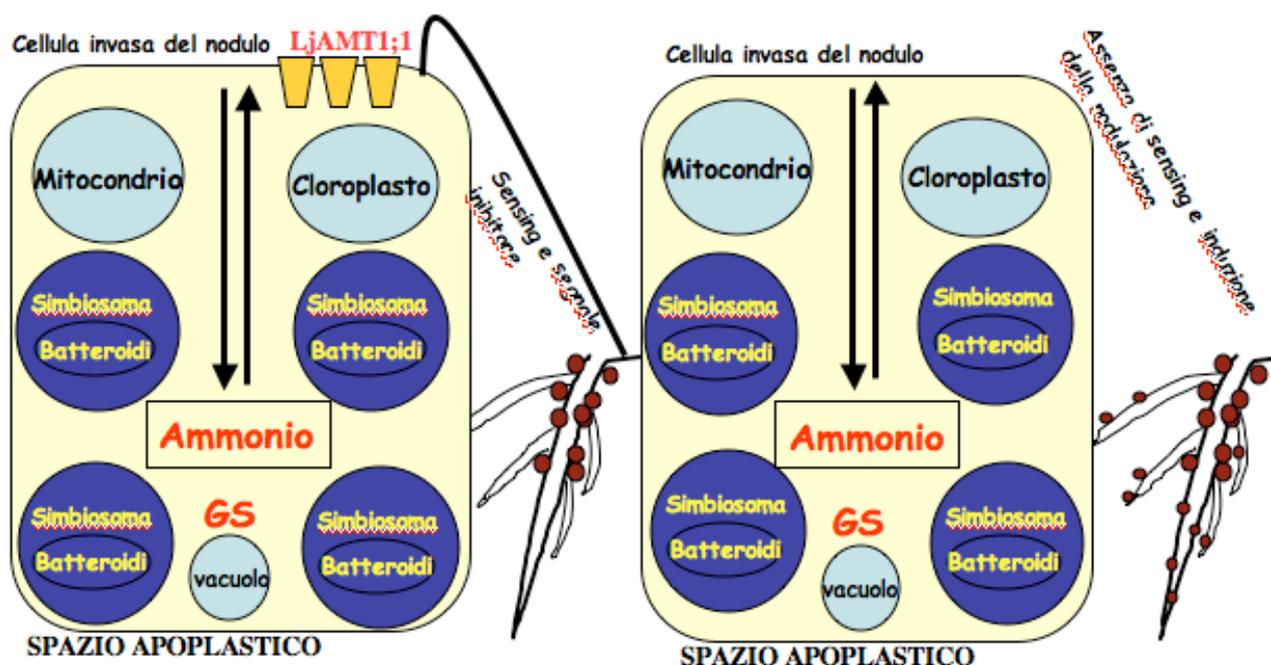
Questo meccanismo era noto fino ad ora agire molto precocemente facendo in modo che solo i primi eventi d'infezione, che si verificano nelle 24 ore successive all'inoculazione, sono in grado di completare il processo di organogenesi del nodulo, mentre tutti gli eventi più tardivi, abortiscono. Nel 2002 Stougaard e collaboratori hanno isolato il gene responsabile del controllo di questo processo, *Har1*, che codifica per un recettore chinasi del tipo serina/treonina, che è espresso ubiquitariamente nei vari organi della pianta, e coinvolto nello sviluppo delle radici secondarie oltre che dei noduli. Il gene ha un'omologia pari al 51% con *CLAVATA1* di *Arabidopsis thaliana*, un'altra chinasi che controlla lo sviluppo dei meristemi apicali e fiorali.

Il meccanismo di autoregolazione, è controllato dalla parte aerea della pianta, come dimostrato da Krusell e collaboratori in un esperimento di *grafting*, in cui sostituendo lo shoot di piante di *Lotus japonicus* mutate nel gene *HAR1*, con uno *wild type*, in seguito all'infezione, non si osserva più un fenotipo ipernodulante sulle radici mutate e si ha inoltre una architettura del sistema radicale di tipo selvatico (Krusell *et al.*, 2002).

Quindi in seguito all'inoculazione con *Rizobio*, dai siti di infezione sulle radici parte un segnale indirizzato verso la parte aerea della pianta dove viene presumibilmente recepito da *HAR1* che a sua volta fa partire un segnale inibitorio che torna alla radice inibendo la formazione di nuovi noduli. Altri fattori sono implicati nel processo di autoregolazione quali la luce, il nitrato e i fitormoni etilene e auxina (Oka-kira *et al.*, 2006). In particolare l'auxina sembra svolgere un importante ruolo durante il processo di inizio e sviluppo dei noduli. Il suo trasporto avviene principalmente dalla parte aerea della pianta dove viene sintetizzato principalmente nelle foglie giovani e nel meristema apicale, alle radici mediante un meccanismo di trasporto polare mediato da specifici trasportatori implicati nell'importo ed esporto di questo ormone lungo le cellule dello stem, laddove tali proteine sono localizzate in maniera asimmetrica alla base e all'apice di tali cellule. Tale tipo di trasporto a partire dallo shoot ha fatto supporre che l'auxina (in particolare l'acido indoloacetico, IAA) sia anch'essa parte del meccanismo di autoregolazione. van Noorden e collaboratori infatti, hanno dimostrato che piante di *Medicago truncatula* mutate nel gene *SUNN* (*Super Numeric Nodules*), l'ortologo di *HAR1*, con un fenotipo di iperformazione di noduli sulle radici della pianta, mostrano anche un difetto nel trasporto basipeto dell'auxina (van Noorden *et al.*, 2006).

Comunque, la nostra ipotesi di lavoro è che ci sia un altro momento in cui il processo di formazione dei noduli viene regolato, che avviene più tardivamente, durante il funzionamento del nodulo, e che questo sia controllato proprio da *LjAMT1;1*.

Secondo il nostro modello, la proteina localizzata sulla membrana plasmatica della cellula invasa del nodulo, trasmette un segnale di corretto funzionamento del nodulo alla pianta, inibendo la formazione di altri noduli. Quando questo segnale manca, quando cioè il gene non è espresso nel posto giusto, come nel caso delle piante transgeniche analizzate, anche se il nodulo sta funzionando correttamente, la pianta inizia un nuovo ciclo di nodulazione, analogamente a quanto avviene quando i noduli non fissano l'azoto (Figura 51). Naturalmente il segnale che viene recepito da *AMT1;1* e che gli consente di comportarsi da "sentinella" del corretto funzionamento del nodulo è completamente da identificare e potrebbe essere rappresentato da un segnale legato allo sviluppo del nodulo o dall'ammonio stesso rilasciato nello spazio apoplastico.



**Figura 51.** Modello postulato per il ruolo svolto dal gene *LjAMT1;1*, nella fase tardiva del processo di nodulazione, durante il funzionamento del nodulo.

## 5. BIBLIOGRAFIA

**Arcondeguy T.,** Jack R., Merrick M. (2001).

P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control.  
Microbiol Mol Biol Rev.65(1):80-105. Review.

**Barbulova A.,** D'Apuzzo E., Rogato A., Chiurazzi M. (2005)

Improved procedures for *in vitro* regeneration and for phenotypic analysis in the model legume *Lotus japonicus*.

Functional Plant Biology, 32: 529-536.

**Becker D.,** Stanke R., Fendrik I., Frommer W.B., Vanderleyden J., Kaiser W.M., Hedric R. (2002).

Expression of the NH<sup>+</sup>(4)-transporter gene LEAMT1;2 is induced in tomato roots upon association with N(2)-fixing bacteria.

Planta;215(3):424-9.

**Blakey D.,** Leech A., Thomas G.H., Coutts G., Findlay K., Merrick M. (2002).

Purification of the Escherichia coli ammonium transporter AmtB reveals a trimeric stoichiometry.

Biochem Journal 364(Pt 2):527-35.

**Britto D.T.,** Siddiqi Y., Glass A.D.M., Kronzucker H.J., (2001).

Futile transmembrane NH<sub>4</sub><sup>+</sup> cycling: a cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants.

PNAS 98 (7): 4255-4258

**Brown C.M.,** Dilworth M.J. (1975).

Ammonia assimilation by rhizobium cultures and bacteroids.

Journal Gen. Microbiol. 86(1): 39-48

**Calderòn-Flores A.,** Du Pont., Huerta-Saquero A., Merchant-Larios H., Servín-González L., Durán S. (2005).

The Stringent Response Is Required for Amino Acid and Nitrate Utilization, Nod Factor regulation, nodulation, and Nitrogen Fixation in *Rhizobium etli*.

Journal of Bacteriology: 5075- 5083.

**Clarkson, D.T.** (1986) Regulation of the absorption and release of nitrate by plant cells. A review of current ideas and methodology. In Fundamental, Ecological, and Agricultural aspect of Nitrogen Metabolism in higher plants.

Dordrecht, the Netherlands: Martinus-Nijhoff, 113-126.

- Coruzzi G.,** Hsieh M.H., Lam H.M., van de Loo F.J.(1998)  
A PII-like protein in Arabidopsis: putative role in nitrogen sensing.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 10;95(23):13965-70.
- Coutts G.,** Thomas G., Blakey D., Merrik M. (2002).  
Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB.  
EMBO J. 15;21(4):536-45
- Dandekar T.,** Snel B., Huynen M., Bork P. (1998).  
Conservation of gene order: a fingerprint of proteins that physically interact.  
Trend Biochem. Sci. 23: 324-328.
- D'Apuzzo E.,** Rogato A., Simon-Rosin Ulrike, El Alaoui H., Barbulova A., Betti M., Dimou M., Katinakis P., Marquez A., Marini A.M., Udvardi K.M., Chiurazzi M. (2004). Characterization of three functional High Affinity Ammonium Transporter in *Lotus japonicus* with differential transcriptional regulation and spatial expression.  
Plant Physiology 134: 1763-1774.
- Downie A.,** Giles E.D., Oldroyd (2004).  
Calcium kinases and nodulation signalling in legumes.  
Nature 5: 566-576.
- Eyers K.,** Ridgwell K., Mawby W.J., Tanner M.J. (1994).  
Topology and organization of human Rh (rhesus) blood group-related polypeptides.  
Journal Biol Chem. 269(9):6417-6423.
- Frassen H.J.,** Vijn I., Yang W.C., Bisseling T. (1992).  
Developmental aspects of the Rhizobium-legume symbiosis.  
Plant Mol Biol. 19(1):89-107.
- Gansel X.,** Munos S., Tillard P., Gojon A. (2001). Differential regulation of the NO<sub>3</sub> and ammonium transporter genes *AtNrt2;1* and *AtAmt1;1* in *Arabidopsis*: relation with long-distance and local controls by N status of the plant. The Plant J. 26: 143-155.
- Gazzarrini S.,** Leijay L., Gojon A., Ninnemann O., Frommer W.B., von Wiren N., (1999). Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. Plant Cell 11: 937-948.
- Glass A.D.M.,** Britto D.T., Kaiser B.N., Kinghorn J.R., Kronzucker H.J., Kumar A., Okamoto M., Rawat S., Siddiqi M.Y., Unkles E., Vidmar J.J., (2002).  
The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants.  
Journal of Experimental Botany 53: 855-864.

**Gronlund M.**, Roussis A., Flemetakis E. Quaedvlieg N., Schlaman H. R. M., Umehara Y., Katinakis P., Stougaard J., Spaink H. (2005)  
Analysis of promoter activity of the early nodulin *Enod40* in *Lotus japonicus*.  
Molecular Plant-Microbe Interactions 18: 414- 427.

**Howitt S. M.**, Udvardi M. K. (2000)

Structure, Function and Regulation of Ammonium Transporters in Plants  
Biochimica and Biophysica acta 152- 170

**Kademi S.**, O'Connell Ill J., Remis J., Robles-Colmenares Y., Mierck L. J. W., Stroud R. M. (2004)

Mechanism of ammonia transport by Amt-Mep-Rh: Structure of AmtB at 1.35Å.  
Science 305: 1587-1594.

**Kaiser B.N.**, Rawat S.R., Siddiqi M.Y., Masle J., Glass A., (2002).

Functional analysis of an *Arabidopsis* T-DNA "Knockout" of the High Affinity Ammonium Transporter *AtAMT1;1*.

Plant Physiology 130: 1263-1275.

**Klopprogge K.**, Stips J., Schmitz R.A. (2002).

The inhibitory form of NifL from *Klebsiella pneumoniae* exhibits ATP hydrolyzing activity only when synthesized under nitrogen sufficiency.

Biochim Biophys Acta. 11;1594(2):243-54.

**Krussel L.**, Madsen L. H., Sato S., Aubert G., Genua A., Szczyglowski K., Duc G., Keneko T., Tabata S., De Broijn F., Pajuelo E., Sandal N., Stougaard J. (2002).

Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor like kinase.  
Nature: 1-5.

**Lamm H.M.**, Coschigano K.T., Oliveira I.C., Melo-Oliveira R., Corazzi g.M. (1996).

The molecular genetic of nitrogen assimilation into ammino acid in higer plants.

Plant physiology Plant. Mol. Biol.47: 569-593.

**Lauter F.R.**, Ninnemann O., BucherM., Riesmeier J.W., Frommer W.B. (1996).

Preferential expression of an ammonium transporter and of two putative nitrate transporters in root hairs of tomato.

Proc Natl Acad Sci U S A 23;93(15):8139-44.

**Little DY**, Rao H, Oliva S, Daniel-Vedele F, Krapp A, Malamy JE (2005)

The putative high-affinity nitrate transporter NTR2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues.

Proc. Natl. Acad. Sci. 102: 13693-13698.

**Lodwig E.**, Poole P. (2003)

Metabolism of Rhizobium bacteroids  
Crit. rev. plant sci 22: 37-47

**Loquè D.**, Von Wiren N. (2004).

Regulatory levels for the transport of ammonium in plants roots.  
Journal of Experimental Botany 55: 1293-1305.

**Loquè D.**, Yuan L., Kojima S., Gojon A., Wirth J., Gazzarrini S., Ishiyama K., Takahashi H., von Wiren N. (2006).

Additive contribution of AMT1;1 and AMT1;3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen deficient Arabidopsis root.  
The Plant Journal 48: 522-534.

**Lorenz M.C., Heitman J.** (1998).

Regulators of pseudo-hyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae* identified through multicopy suppressor analysis in ammonium permease mutant strains. Genetics 150: 1443-145.

**Lu Y.X.**, Li C.J., Zhang F.S. (2005).

Transpiration, Potassium Uptake and Flow in Tobacco as Affected by Nitrogen Forms and Nutrient Levels.  
Annals of Botany 95: 991-998.

**Ludewig U.**, Von Wiren N., Frommer W. B. (2002).

Uniport of  $\text{NH}_4^+$  by the roots hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT1;1.  
The Journal of Biological Chemistry 277: 13548-13555.

**Ludewig U.**, Stephanie Wilken, Binghua Wu, Wolfgang Jost, Petr Obrdlik, Mohamed El Bakkoury, Anne-Marie Marini, Bruno Andre, Tanja Hamacher, Eckhard Boles, Nicolaus von Wiren, and Wolf B. Frommer (2003).  
Homo- and Hetero-oligomerization of Ammonium Transporter-1  $\text{NH}_4$  Uniporters.  
The Journal of Biological Chemistry 278: 45603- 45610.

**Marini A. M.**, Soussi-Boudekou S., Vissers S., Andre B. (1999).

A family of Ammonium Transporter in *Saccaromyces cerevisiae*.  
Molecular and cellular Biology: 4282-4293.

**Marini A. M.**, Matassi G., Raynald V., Andre B., Cartron J.P., Cherif-zahar B. (2000).

The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast.  
Nat Genet. 200026(3):341-344.

- Marshner H.**, Kirkby E.A., Engels C. (1997).  
Importance of cycling and recycling of mineral nutrients within plants for growth and development. *Bot. Acta* 4:265-274.
- Martin D.E.**, Reinhold-Hurek B. (2002).  
Distinct roles of P(II)-like signal transmitter proteins and *amtB* in regulation of *nif* gene expression, nitrogenase activity, and posttranslational modification of NifH in *Azoarcus* sp. strain BH72.  
*J Bacteriol.* 184(8):2251-9.
- Merrick Mike** and Von Virén Nicolaus (2004).  
Regulation and function of ammonium carriers in bacteria, fungi, and plants.  
*Topics in Current Genetics*: 1-26.
- Monahan B.J.**, Unkles S.E., Tsing I.T., Kinghorn J.R., Hynes M.J., Davis M.A. (2002).  
Mutation and functional analysis of the *Aspergillus nidulans* ammonium permease *MeaA* and evidence for interaction with itself and *MepA*.  
*Fungal Genet Biol.* 236(1):35-46.
- Nap J.P.**, van de Wiel C., Spaik H.P., moerman m., van de Heuvel M., Djordjevic M.A., van Lammeren A.A., van Kammen A., Bisseling T. (1989).  
The relationship between nodulin gene expression and the *Rhizobium nod* genes in *Vicia sativa* root nodule development.  
*Mol Plant Microbe Interaction* 2(2):53-63.
- Nazoa P.**, Vidmar J. J., Tranbarger T.J., Mouline K., Damiani I., Tillard P., Zhuo D., Glass A.D.M., Touraine B. (2003).  
Regulation of the nitrate transporter gene *AtNTR2;1* in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage.  
*Plant Molecular Biology* 52: 689-703.
- Newcomb W.** (1979)  
A correlated light and electron microscopic study of symbiotic growth and differentiation in *Pisum sativum* root nodules.  
*Can. J. Bot.* 54, 2163–2186
- Ninnemann O.**, Jauniaux J.C., Froemer W.B. (1994).  
Identification of a High-Affinity Transporter from plants.  
*EMBO J.* 13:3463-3471.
- Oka-Kira E.**, Kawaguchi M., (2006).  
Long distance signaling to control root nodule number.  
*Current Opinion in Plant Biology*, 9: 496-502.

**Orea A**, Pajuelo P, Pajuelo E, Quidiello C, Romero JM, Marquez AJ.  
Isolation of photorespiratory mutants from *Lotus japonicus* deficient in glutamine synthetase. *Physiol Plant*. 2002 Jul;115 (3):352-361.

**Patriarca E. J.**, Tatè R., Iaccarino M, (2002)  
Key role of bacterial  $\text{NH}_4^+$  metabolism in rhizobium-plant symbiosis.  
*Microbiology and Molecular Biology*, 66 (2), 203-222.

**Pena A.**, Pardo J.P., Ramirez J. (1987)  
Early metabolic effects and mechanism of ammonium transport in yeast.  
*Arch Biochem Biophys*. 253(2):431-8.

**Prell J.**, Pool P. (2006)  
Metabolic Changes of rhizobia in legume nodules  
*Science* 161-168.

**Pingret J.L.**, Journet E.P., Barker D.G. (1998).  
Rhizobium nod factor signaling. Evidence for a G protein-mediated transduction mechanism.  
*Plant Cell* 10(5): 659-672.

**Quentin F.**, Eladari D., Cheval L., Lopez C., Goossens D., Colin J.P., Paillard M., Chambrey R. (2003).  
RhBG and RhCG, the putative ammonia transporters, are expressed in the same cells in the distal nephron.  
*J. Am. Soc. Nephrol*. 14(3): 545-554.

**Rawat S.R.**, Silim N.S., Kronzucker H.J., Siddiqui M.Y., Glass A.D.M., (1999)  
AtAMT1 gene expression and  $\text{NH}_4$  uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels.  
*The Plant Journal* 19 (2), 143-152.

**Remans T.**, Nacry P., Pervent M., Girin T., Tillard P., Lepetit M., Gojon A., (2006)  
A central role for the nitrate transporter NRT2.1 in the integrated morphological and physiological responses of the root system to nitrogen limitation in *Arabidopsis*.  
*Plant Physiology*. 140: 909-921

**Roberts D.M.**, Tyerman S.D. (2002).  
Voltage-dependent channels permeable to  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  in the symbiosome membrane of the model legume *Lotus japonicus*.  
*Plant Physiology* 128(2): 370-378.

- Salvemini F.**, Marini A.M., Riccio A., Patriarca E. J., Chiurazzi M. (2001).  
Functional characterization of an ammonium transporter gene from *Lotus Japonicus*.  
*Gene* 270: 37-43.
- Schauser L., Roussis A., Stiller J., Stougaard J. (1999)  
A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules.  
*Nature* 402: 191-195.
- Schjoerring J.K.**, Husted S., Mack G., Mattsson M. (2002).  
The regulation of ammonium translocation in plants.  
*Journal of Experimental Botany*, 53: 883-890.
- Simon-Rosin U.**, Wood C., Udvardi M. K., (2003).  
Molecular and cellular characterization of Lj AMT2;1, an ammonium transporter from  
the model legume *Lotus japonicus*.  
*Plant molecular Biology* 51: 99-108.
- Sonoda Y.**, Ikeda A., Saiki S., von Wiren N., Yamaya T., Yamaguchi J. (2003).  
Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (OsAMT1;1-1;3)  
in rice.  
*Plant Cell Physiology* 44(7): 206- 211.
- Soupe E.**, Lee H., Kustu S. (2002).  
Ammonium/methylammonium transport (Amt) proteins facilitate diffusion of NH<sub>3</sub>  
bidirectionally.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 99(6):3926-31
- Suenaga A.**, Moriya K., Sonoda Y., Ikeda A., von Wiren N., Hayakawa T., Yamaguchi J.,  
Yamaya T. (2003).  
Constitutive expression of a novel type ammonium transporter OsAMT2 in rice plants  
*Plant Cell Physiology* 44:206 211.
- Sugiyama K.**, Hayakawa T., Kudo T., Ito T., Yamaya T. (2004).  
Interaction of N-acetylglutamate kinase with a PII-like protein in rice.  
*Plant Cell Physiology* 45 (12):1768-1778.
- Tatè R.**, Patriarca E.J., Iaccarino M., (2004).  
Organogenesis of legume root nodules.  
*Int. Rev. Cytol.* 234: 201-262.
- Thomas G.H.**, Mullins J.G., Merrick M. (2000).  
Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters.  
*Mol Microbiologia* 37 (2): 331-344.

**Tritichine L.**, Sandal N., Madsen L.H., Radutoiu S., Albrektsen A.S., Sato S., asamizu E., Tabata S., Stougaard J. (2006).

A Gain-of-Function Mutation in a Cytokinin Receptor Triggers Spontaneous Root Nodule Organogenesis.

Science 16

**Udvardi M.K.**, Day D.A. (1990).

Ammonia (C-methylamine) Transport across the Bacteroid and Peribacteroid Membranes of Soybean Root Nodules.

Plant Physiology 94(1):71-76.

**Udvardi M.K.**, Sohlenkamp C., Wood C.C., Roeb G.W. (2002)

Characterization of *Arabidopsis thaliana* AtAMT2, a High Affinity Ammonium Transporter of the Plasma Membrane.

Plant Physiology 130: 1788-1796.

**Van Noorden G.E.**, Ross J.J., Reid J.B., Rolfe G.B., Mathesius U. (2006)

Detective Long-Distance Auxin Transport Regulation in *Medicago truncatula super numeric nodules* Mutant.

Plant Physiology 140: 1494-1506.

**Vasse J.**, de Billy F., camut S., Truchet G. (1990).

Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules.

J Bacteriology 172(8):4295-306.

**Verma D.** (1992).

Signals in Root nodule Organogenesis and Endocytosis of Rhizobium.

Plant Cell. 4(4):373

**Von Wiren N.**, Lauter F.R., Ninnemann O., Gillissen B., Walch-Liu P., Engels C., Jost W., Frommaer W.B., (2000).

Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato.

The Plant Journal, 12: 167-175.

**Von Wiren N.**, Gazzarrini S., Gojon A., Frommer W.B. (2000).

The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval.

Current Opinion in Plant Biology 3: 254-261.

**Wopereis J.**, Pajuelo E., Dazzo F.B., Jiang Q., Gresshoff P. M., de Bruijn F. J., Stougaard J. and Szczyglowski K. (2000).

Short root mutant of *lotus japonicus* with a dramatically altered symbiotic phenotype.

The plant Journal, 23: 97-114

**Xu Y.**, Cheah E., Carr P.D., van Heeswijk W.C., Westerhoff H.V., Vasudevan S.G., Ollis D.L. (1998).

GlnK, a PII-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition.

Journal Mol Biol. 11;282(1):149-65.

**Zahran H.H. (1999).**

Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate.

Microbiol Mol Biol Rev. 63(4):968-89 Review.

**Zengh L.**, Kostrewa D., Berneche S., Winkler F., Li X. D. (2004).

The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of E. coli  
Proc. Natl Acad. Sci USA 101 (49): 17090-17095.