



Università degli Studi di Verona  
Dipartimento di Biotecnologie

**RELAZIONE SCIENTIFICA FINALE**

**Assegno di Ricerca AdR2161/13**

<i>Nome e Cognome del Beneficiario</i>	Chiara Santi
<i>Titolo del Programma di Ricerca</i>	Meccanismi molecolari di regolazione della nodulazione in <i>Medicago truncatula</i>
<i>Settore Scientifico Disciplinare di riferimento</i>	BIO/04
<i>Nome e Cognome del Responsabile Scientifico</i>	Tiziana Pandolfini
<i>Durata dell'Assegno di Ricerca (da...a...)</i>	1 ottobre 2013 – 30 settembre 2014
<i>Periodo di riferimento della relazione (da...a...)</i>	1 ottobre 2013 – 30 settembre 2014
<i>Note</i> (es.: eventuali periodi di sospensione dell'Assegno, etc.)	



## Università degli Studi di Verona Dipartimento di Biotecnologie

### DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ DI RICERCA (*presupposti/obiettivi, metodologie applicate, risultati intermedi e conclusivi, discussione*)

Le Lipid Transfer Proteins (LTPs) sono piccole proteine basiche che costituiscono un'ampia famiglia e sono caratterizzate dall'abilità di trasferire fosfolipidi tra una membrana donatore e una accettore. In pianta le LTPs possono ricoprire diverse funzioni e alcune di esse svolgono un ruolo fondamentale nella simbiosi tra i rizobi e le leguminose. Il gene *MtN5*, codificante per una non specific-LTP di *Medicago truncatula*, viene attivato nelle fasi iniziali del processo simbiotico a livello dell'epidermide e dei peli radicali e regola positivamente il processo di nodulazione (Pii *et al.* 2009, Pii *et al.*, 2012). Sulla base dell'omologia di sequenza con *MtN5* sono state identificate altre due putative LTPs (*Medtr3g055250* and *Medtr7g052640*) (Pii *et al.*, 2013) in *M. truncatula* e l'obiettivo di questo assegno di ricerca è stato quello di comprendere se anche questi geni fossero coinvolti nei meccanismi molecolari di regolazione della simbiosi tra *M. truncatula* e *Sinorhizobium meliloti*.

Il primo obiettivo è stato quello di studiare l'espressione dei geni in questione durante le varie fasi della simbiosi utilizzando la tecnica di RT-PCR quantitativa. A 72 ore dall'inoculo di *M. truncatula* con *S. meliloti* non si sono riscontrate variazioni significative nei livelli di espressione dei due geni nelle piante inoculate rispetto a quelle di controllo non inoculate. Tuttavia nelle piante che avevano sviluppato i primordi dei noduli (a 6 giorni dall'infezione) e i noduli maturi (18 giorni dopo infezione) l'espressione di entrambi i geni, *Medtr3g055250* e *Medtr7g052640*, era aumentata rispetto ai livelli di trascritto riscontrati in piante non inoculate. La sovra-regolazione è stata particolarmente evidente per il *Medtr7g052640*, dove l'aumento di trascritto è stato rispettivamente di 9 e 21 volte rispettivamente in piante a 6 e 18 giorni dall'avvenuta infezione. Questi dati indicano che l'induzione del gene *Medtr7g052640* avviene dopo l'invasione della radice da parte dei rizobi e suggeriscono che questa LTP potrebbe essere coinvolta nel targeting di nuovo materiale lipidico durante lo sviluppo del simbiosoma che richiede la riorganizzazione e la formazione *de novo* di membrane. Per quanto riguarda il gene *Medtr3g055250* si è riscontrata una tendenza all'aumento del livello di trascritto dopo inoculazione con i rizobi, tuttavia è necessario approfondire l'analisi per confermare la risposta di questo gene durante le diverse fasi dell'interazione simbiotica.

Al fine di investigare l'espressione temporale e spaziale di *Medtr3g055250* e *Medtr7g052640* a livello tissutale è stata monitorata l'attività dei due promotori tramite la fusione degli stessi con il gene reporter  $\beta$ -glucuronidase (GUS). I due costrutti sono stati inseriti in pianta tramite l'ausilio di *Agrobacterium rhizogenes* che permette di ottenere in tempi rapidi delle piante chimeriche aventi radici contenenti il transgene. Le radici transgeniche contenenti il costrutto *PromMedtr7g052640::GUS* così come quelle contenenti il costrutto *PromMedtr3g055250::GUS* non inoculate hanno mostrato l'attività del reporter nei siti di emergenza delle radici laterali e lungo tutta la lunghezza delle giovani radici laterali. D'altra parte le radici inoculate hanno mostrato un'induzione del gene GUS ben localizzata in conseguenza dell'inoculo delle piante con *S. meliloti*. In entrambi i casi, sei giorni dopo l'infezione, l'attività GUS è stata rilevata nei primordi dei noduli e, a 18 giorni dopo l'infezione, in tutti i tessuti dei noduli maturi e in modo predominante nella zona distale dei noduli. L'analisi ci ha quindi permesso di confermare la sovra-regolazione dei due geni nelle fasi tardive dell'infezione e ipotizzare che i prodotti genici possano avere una specifica funzione nel processo di nodulazione.

L'instaurarsi della simbiosi è preceduto da un raffinato scambio di segnali biochimici tra la pianta e il microrganismo che coinvolge anche lipochitoooligosaccaridi (LCO), composti prodotti sia da batteri azoto-fissatori che da funghi micorrizici arbuscolari che sono in grado di attivare la simbiosi. È stato quindi valutato se le LTPs in esame fossero coinvolte anche nella simbiosi tra *M. truncatula* e *Glomus irregularis*, fungo modello per lo studio di questo tipo di relazione simbiotica. A tal scopo è stata effettuata un'analisi di RT-PCR quantitativa su radici colonizzate dal fungo per verificare l'eventuale variazione dell'espressione dei geni *Medtr3g055250* e *Medtr7g052640* in risposta all'infezione fungina. I livelli di trascritto di entrambi i geni non hanno mostrato alcun tipo di variazione rispetto a piante non micorrizzate, suggerendo quindi che queste LTPs siano coinvolte in modo specifico nella simbiosi con i rizobi.



Università degli Studi di Verona  
Dipartimento di Biotecnologie

**DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ DI RICERCA SVOLTA ALL'ESTERO** *(eventuale)*

**DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NELL'AMBITO DEL DOTTORATO DI RICERCA** *(eventuale)*

**DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ DIDATTICA COLLEGATA** *(eventuale)*



Università degli Studi di Verona  
Dipartimento di Biotecnologie

**SEMINARI/CONFERENZE TENUTI**

--

**RISULTATI DELLA RICERCA** (*pubblicazioni, rapporti, brevetti, etc.*)

Partecipazione al congresso "Fisy 2014, XIII Congress, Pisa – 24-27 September 2014"  
Presentazione del poster "Study of the role of type III LTPs during the symbiotic interaction between *Sinorhizobium meliloti* and *Medicago truncatula*" Chiara Santi, Barbara Molesini, Youry Pii, Tiziana Pandolfini.

*Il Responsabile Scientifico*

*Tiziana Pandolfini*  
(Firma)

*L'Assegnista di Ricerca*

*Chiara Santi*  
(Firma)

