



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI
PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Biologia

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: BIOCHIMICA E
BIOTECNOLOGIE
INDIRIZZO: BIOTECNOLOGIE
CICLO: XX

**Caratterizzazione dei meccanismi di morte cellulare programmata in colture
cellulari di due Leguminose modello: *Medicago truncatula*
e *Lotus japonicus***

Direttore della scuola: Ch.mo Prof. Lorenzo A. Pinna

Supervisore: Ch.mo Prof.ssa Fiorella Lo Schiavo

Dottoranda: Fiorenza Bastianelli

DATA CONSEGNA TESI

31 Gennaio 2008

Riassunto

Negli organismi vegetali, i meccanismi molecolari delle varie fasi della PCD non sono ancora conosciuti in dettaglio. Il controllo degli eventi di senescenza sia fogliare che di senescenza di fiori e frutti, può portare ad applicazioni biotecnologiche e commerciali in diversi settori di interesse agrario.

Lo studio della PCD a livello di pianta presenta delle difficoltà poiché, spesso, questo evento interessa gruppi ristretti di cellule in un tessuto. Le colture cellulari permettono di studiare la PCD in una popolazione cellulare omogenea e facilmente manipolabile. In questa tesi per lo studio della PCD, si sono utilizzate sospensioni cellulari di *Medicago truncatula* e *Lotus japonicus*.

La somiglianza tra gli eventi di PCD presenti nelle colture cellulari a quelli di organi delle piante, è confermata dalla presenza di marcatori citologici e molecolari come le alterazioni nella morfologia nucleare, il laddering del DNA e dall'espressione di marcatori associati alla senescenza fogliare come i SAGs.

Le colture cellulari di *Medicago truncatula* si sono dimostrate un buon sistema modello per lo studio della senescenza/PCD. La linea cellulare, è stata ottenuta da espianti primari di radici e per prima cosa si è caratterizzata la curva di crescita: dopo la fase di crescita esponenziale si osserva una diminuzione in biomassa ed un corrispondente aumento della percentuale di morte cellulare. A partire dal 14° giorno fino alla fine di crescita cellulare, è ben visibile la condensazione della cromatina dei nuclei, l'espressione di un gene marcatore della senescenza (*MtSAG*), ed il rilascio del citocromo *c* dai mitocondri nel citoplasma. Sono state valutate le variazioni delle morfologie mitocondriali, durante le varie fasi del ciclo cellulare, riconoscendo fenotipi caratteristici associati all'aumento della percentuale di morte ("mitocondri giganti").

Oltre alla senescenza naturale, è stata analizzata la senescenza indotta dal trattamento con le citochinine. Il trattamento con queste molecole è stato in grado di indurre un aumento significativo nella percentuale di morte cellulare e della condensazione della cromatina. Il trattamento con citochinine è stato in grado di indurre senescenza anticipata, dimostrata dall'espressione di *MtSAG*; inoltre sono state osservate le stesse morfologie dei mitocondri simili a quelle riconosciute nella senescenza naturale.

I mutanti alterati nel processo di PCD sono un ottimo strumento di studio per conoscere in dettaglio i meccanismi di *signaling* della PCD; attualmente non è a disposizione tale tipo di mutante in *Medicago truncatula*.

Lotus japonicus è un'altra Leguminosa modello. In questa pianta sono stati isolati diversi mutanti, tra questi, alcuni sono mutanti nei processi di simbiosi. Un particolare mutante denominato *LjSym 4-2* non è in grado di instaurare nessun tipo di relazioni simbiotiche. Questo mutante non risponde agli elicitori rilasciati dai microrganismi benefici, perciò viene definito Nod⁻ e Mic⁻, perché non è in grado di formare noduli e micorrizze. In particolare dopo interazione con le ife fungine le cellule dell'epidermide radicale, vanno incontro a PCD. L'analisi di questo mutante suggerisce che *LjSym 4-2* rappresenta un sistema sperimentale interessante per lo studio dei meccanismi e delle molecole segnale coinvolte nel processo di PCD.

Inizialmente sono state prodotte colture cellulari da plantule di wt e da plantule di mutante. Successivamente sono stati caratterizzati i parametri fisiologici delle curve di crescita della linea wt e della linea mutante. Dall'andamento della crescita cellulare, il mutante presenta una crescita più lenta rispetto alla linea wt, dovuta con tutta probabilità alla sua morfologia cellulare. Analizzando l'andamento del percentuale di morte cellulare, non sono state osservate differenze sostanziali tra la linea wt e quella mutante; infatti la comparsa del DNA laddering avviene nello stesso periodo (21 giorni). Una volta caratterizzate le linee cellulari, si è studiato il ruolo dell'SA nelle due linee cellulari. L'SA è una molecola coinvolta nelle risposte agli stress abiotici, ed gioca un ruolo chiave nelle interazioni pianta-microrganismi, sia simbiotici che patogeni. Dopo il trattamento si è osservato che il wt ed il mutante rispondono in modo differente: il mutante presenta una riduzione della crescita cellulare, un aumento della percentuale di morte cellulare e la comparsa di nuclei dove la cromatina è altamente condensata. Si sono poi analizzati i componenti delle vie di *signalling* dell'SA: la produzione di H₂O₂ ed NO. A basse concentrazioni di SA nel mutante si è osservata una produzione bifasica di H₂O₂ ed una produzione di NO. Queste due molecole giocano un ruolo chiave nella PCD mediata da SA. Il lavoro svolto su *Lotus*, ha permesso di chiarire le differenti risposte all'SA tra le due linee cellulari. Il mutante contiene un livello basale di SA più alto rispetto alla linea wt. È noto che i livelli di SA possono regolare le interazioni simbiotiche e che la concentrazione di SA aumenta in risposta ad un attacco patogeno. Il mutante *LjSym 4-2* presenta alti livelli basali di SA rispetto al wt e questo probabilmente giustifica il suo fenotipo (Nod⁻ e Mic⁻), e potrebbe spiegare il motivo perché i micro-simbioniti vengono percepiti come patogeni.

Abstract

The molecular aspects of the various stages of PCD in vegetal system are not known in details; an understanding of this process would allow a biotechnological control of crops and fruit ripening. Studying the mechanism of PCD in whole plants can however be difficult as it often occurs in a small group of inaccessible cells buried in a bulk of surrounding healthy cells. Being simple and homogeneous, cell cultures represent an ideal system for the study of this physiological processes. In this thesis *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* suspensions cell cultures have been exploited to study the process of PCD.

The similarity of the senescence/PCD in cell cultures and whole plant organs has been confirmed by the presence of cytological and molecular markers like alterations in nuclear morphology, DNA laddering and the expression profile of typical marker of leaf senescence like *Senescence Associated Genes (SAGs)*.

Medicago truncatula cell cultures are good model system for studying senescence and PCD. In *Medicago truncatula* cells cultures, three phases can be distinguished: initial phase, in which cells condition their medium; log phase, in which cell division takes place; and final phase, in which cells stop dividing, elongate and senescence. The expression of *MtSAG*, was detectable at the beginning of cell-subculture cycle and increase at the end of log phase. The release of cytochrome *c* from mitochondria into cytoplasm revealed an increase at the end of log phase and reached a stable level in the latter phase. In the final phase of *Medicago truncatula* cell culture, the increase in cell death is concomitant with the increased number of nuclei showing chromatin condensations. The growth phases of *Medicago* cells in culture are associated with alterations in mitochondria dynamics and morphology ranging from interconnected networks of mitochondria to punctiform mitochondria. A particular type of mitochondria rename “giant mitochondria”, is a senescence marker for senescent cells entering PCD. During the process of senescence and cell death induced by cytokinins, the reticular arrangement of mitochondria disintegrates rapidly, *MtSAG* transcript levels increase, and giant mitochondria are detected together with an increasing release of cytochrome *c*, and nuclei showing chromatin condensations.

PCD mutants are good tools for better understanding the molecules involved in the signalling of PCD, but in *Medicago truncatula* no PCD mutants have been identified so far.

In another model Legume *Lotus japonicus* several cellular and development mutants have been identified; one of these mutants is *LjSym 4-2*. This particularly mutant is unable to make any type of symbiotic interactions, in fact it does not recognize the elicitors released by symbiotic micro-organism (bacteria and fungi); in particular with fungi the epidermal cells undergo PCD. For this reason this mutant was useful for studying signalling processes involved in PCD.

Cell cultures were generated from root of *Lotus japonicus* and *LjSym 4-2* plantlets and their physiological parameters were characterized. The mutant cell line grew slowly with respect to wt cell line, therefore the cells of mutant cell line were smaller and had a large vacuole. The percentage of cell death was similar in the two cell line, and the DNA laddering was seen at the same day. In this work, the characterisation of programmed cell death (PCD) induced by SA was reported, and differences between the two cell lines were underlined. SA is an important molecule that plays a key role in response to abiotic stresses and during biotic interactions.

Wild type and *Sym 4-2* cultured cells responded differentially to SA. Low levels of SA are able to induce a reduction in cell growth-rate and nuclei with chromatin condensation in mutant cell line. Two SA signalling components have been investigated: H_2O_2 and NO. After SA treatment in the mutant *LjSym4-2*, a continuous production of NO and a double peak ROS productions was observed. These molecules (H_2O_2 and NO) play a key role in SA-mediated PCD.

Previous work showed that endogenous level of SA controls the nodule and mycorrhiza formations.

During plant-pathogen interactions, the SA concentrations increase near the infection site, triggering local PCD and inductions of defence response like HR and SAR.

A higher basal level of SA has been reported in the mutant cells as compared to the wt cells; this higher levels of SA could explain the different response in these cells lines, and could justify the mutant phenotype (Nod- and Myc-). As the *LjSym 4-2* have a higher basal levels of SA than wt; this could explain why micro-symbionts are recognized as pathogenic micro-organism.

Indice

1	Introduzione	Pag. 1
1.1	Morte Cellulare Programmata (PCD)	Pag. 1
1.1.1	Ruolo degli organelli nella PCD	Pag. 4
1.2	Senescenza	Pag. 6
1.2.1	Eventi tipici della senescenza	Pag. 8
1.2.2	Regolazione della senescenza	Pag. 9
1.3	La PCD nelle risposte di difesa	Pag. 11
1.3.1	Relazione tra PCD in senescenza e durante la HR	Pag. 13
1.3.2	Molecole coinvolte nei meccanismi di difesa SA, H ₂ O ₂ , NO	Pag. 14
1.4	Interazione tra SA, ROS e NO	Pag. 20
1.5	Le Leguminose	Pag. 22
1.5.1	La simbiosi	Pag. 24
1.5.2	Ruolo dell' SA nelle interazioni pianta-patogeno	Pag. 26
1.6	Utilizzo di colture cellulari per lo studio della PCD	Pag. 28
2	Scopo della Tesi	Pag. 31
3	Materiali e metodi	Pag. 33
3.1	Colture cellulari	Pag. 33
3.2	Trattamenti	Pag. 33
3.3	Misura del peso fresco e secco	Pag. 34
3,4	Stima della mortalità	Pag. 35
3.5	Estrazione del DNA gnomico	Pag. 35
3.6	Elettroforesi su gel di agarosio	Pag. 36
3.7	Estrazione di proteine	Pag. 37
3.7.1	Dosaggio delle proteine	Pag. 38
3.7.2	Preparazione dei campioni proteici	Pag. 39
3.8	SDS-Page	Pag. 39
3.9	Western Blot	Pag. 40

3.9.1 Elettroblotting	Pag. 41
3.9.2 Colorazione delle membrane con Rosso Ponceau	Pag. 42
3.9.3 Immunoblotting	Pag. 42
3.9.4 Metodo colorimetrico di rilevazione	Pag. 43
3.10 Estrazione dell'RNA	Pag. 43
3.11 RT-PCR	Pag. 44
3.11.1 Sintesi della prima elica	Pag. 44
3.11.2 PCR (Polimerase Chain Reaction)	Pag. 44
3.12 Analisi bioinformatiche	Pag. 46
3.13 Analisi della morfologia dei nuclei colorati con DAPI	Pag. 46
3.14 Analisi della morfologia dei mitocondri colorati con TMRM	Pag. 47
3.15 Analisi della morfologia del citoscheletro	Pag. 48
3.16 Analisi della produzione di ossido nitrico (NO)	Pag. 49
3.17 Determinazione della concentrazione di H₂O₂ extracellulare	Pag. 50
4 Risultati e discussione	Pag. 53
4.1 Analisi di eventi di PCD in colture cellulari di <i>Medicago truncatula</i>	Pag. 53
4.1.1 Caratterizzazione della senescenza naturale/PCD in <i>Medicago truncatula</i>	Pag. 53
4.1.2 Analisi dei marcatori citologici molecolari della PCD	Pag. 54
4.1.3 Morfologia e dinamica mitocondriale durante il ciclo di crescita della coltura cellulare	Pag. 58
4.1.4 La PCD può essere indotta in colture cellulari da alte dosi di citochinine	Pag. 61
4.2 Mutanti di <i>Lotus japonicus</i> alterati nella regolazione del processo di PCD	Pag. 65
4.2.1 Caratterizzazione della senescenza naturale/PCD in colture cellulari di <i>Lotus japonicus</i> wt e <i>LjSym 4-2</i>	Pag. 65
4.2.2 Analisi di marcatori della PCD nelle colture	

cellulari di <i>Lotus japonicus</i> wt e <i>LjSym 4-2</i>	Pag. 66
4.2.3 Effetti dell'SA sulle colture cellulari di <i>Lotus japonicus</i> wt e <i>LjSym 4-2</i>	Pag. 67
4.2.4 Analisi dei componenti coinvolti nella PCD indotta da SA	Pag. 70
4.2.5 Effetto di alte concentrazioni di SA su colture cellulari wt	Pag. 75
4.2.6 Analisi del contenuto endogeno di SA	Pag. 78
5 Bibliografia	Pag. 81

1 Introduzione

1.1 Morte cellulare Programmata (PCD)

La morte cellulare programmata (PCD: *Programmed Cell Death*) è un processo fisiologico che consiste nell'eliminazione selettiva di cellule indesiderate (Ellis *et al.*, 1991). E' un tipo di morte geneticamente programmata, perché le cellule controllano attivamente la propria distruzione. La PCD è un processo ubiquitario, utilizzato da tutti gli organismi multicellulari sia durante lo sviluppo e la morfogenesi, sia per controllare l'omeostasi tissutale che come strategia difensiva per rimuovere le cellule infettate, mutate, o danneggiate (Vaux e Korsmeyer, 1999).

La PCD è stata studiata estensivamente negli animali, dove generalmente è definita apoptosi. L'apoptosi è identificabile grazie a una serie di caratteristiche peculiari come la condensazione e il raggrinzimento del citoplasma e la formazione di protrusioni dalla membrana plasmatica che si staccano dal corpo cellulare formando i cosiddetti corpi apoptotici. Anche il nucleo subisce delle modificazioni come la condensazione, la marginalizzazione della cromatina e la frammentazione del DNA. Il DNA viene inizialmente tagliato in frammenti di circa 50 kb, e successivamente digerito da endonucleasi specifiche, Ca^{2+} -dipendenti, nei tratti di DNA internucleosomale. I frammenti oligonucleosomali (multipli di 180 bp), originati da questo processo, appaiono con un *pattern* caratteristico a scala detto "laddering" del DNA.

L'apoptosi è un processo di morte attivo che richiede energia, e viene contrapposta ad un altro tipo di morte cellulare che si verifica quando le cellule sono sottoposte a severi traumi. Questo processo di morte "patologica" è chiamato necrosi ed è caratterizzato dalla rottura sia della membrana plasmatica che delle endomembrane, causando il rilascio di enzimi idrolitici e di altro materiale nello spazio intercellulare. Negli animali, i detriti cellulari causano processi infiammatori nelle cellule vicine e vengono fagocitati (Fig. 1).

Dall'osservazione che non tutti i tipi di morte cellulare presentano le caratteristiche tipiche dell'apoptosi, è stata avanzata la teoria che l'apoptosi e la necrosi siano agli estremi di un continuum di possibili tipi di morte cellulare.

Questo potrebbe spiegare la frequente coesistenza di entrambi i tipi di morte cellulare nelle situazioni patologiche, dove il programma di morte individuale, per ciascuna cellula in un tessuto, dipenderebbe dal livello di energia (Leist *et al.*, 1997).

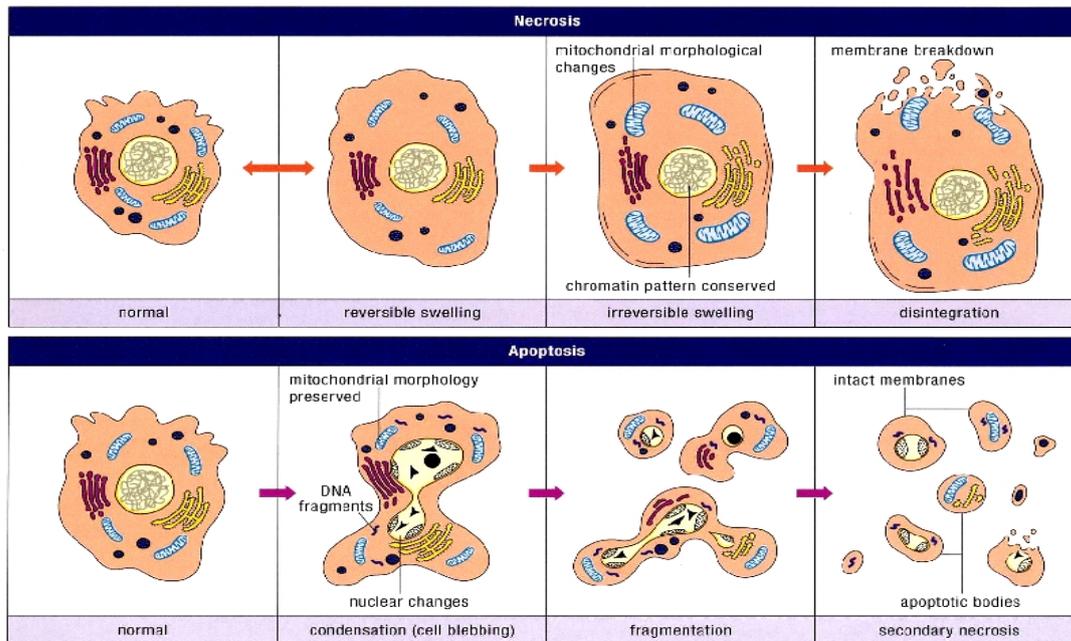


Fig. 1: Principali differenze tra necrosi ed apoptosi (da Trauth and Keesey, 1996).

Le cellule e i tessuti delle piante presentano diversi tipi di morte cellulare programmata che non manifestano tutte le caratteristiche tipiche dell'apoptosi, si parla quindi generalmente di PCD. A differenza dell'apoptosi negli animali, la presenza di una parete cellulare rigida nelle cellule vegetali fa sì che queste ultime non possano essere smantellate in corpi apoptotici. La degradazione cellulare può avvenire per autolisi, per rottura del vacuolo, come durante la differenziazione di elementi tracheali (Fukuda, 1996).

Durante lo sviluppo la PCD interviene infatti nell'eliminazione di tre dei quattro prodotti meiotici nella megasporogenesi, nella degradazione del sospensore dell'embrione e nelle cellule dell'aleurone durante la germinazione. L'aleurone dei semi delle monocotiledoni è un tessuto secretorio che rilascia idrolasi per digerire l'endosperma e nutrire l'embrione. Quando la germinazione è completata, l'aleurone, non più necessario, va incontro ad un processo di PCD stimolato dalle gibberelline e inibito dall'acido abscissico. La morte cellulare gioca un ruolo

chiave anche nella risposta agli stress ambientali. Per esempio, radici di piante sottoposte a stress di tipo ipossico, formano un tipo di tessuto, detto aerenchima, che deriva dalla morte cellulare programmata di cellule corticali; in questo modo, si formano dei canali attraverso i quali l'aria può diffondere. La morte cellulare programmata può partecipare nelle risposte ai patogeni, come nel caso della risposta ipersensibile (HR: *hypersensitive response*). La risposta ipersensibile è caratterizzata dalla morte delle cellule nel punto di attacco di un patogeno e provoca la formazione di un'area di cellule morte circondate da tessuto sano. La morte cellulare associata alla risposta ipersensibile è molto rapida e ha lo scopo di limitare la diffusione del patogeno nelle cellule adiacenti. È certo che si tratti di un tipo di morte programmata (PCD) in quanto è associata all'attivazione di geni di difesa e alla repressione di geni collegati al sistema di detossificazione dell' H_2O_2 , e alla produzione di ossido nitrico (Fig. 2).

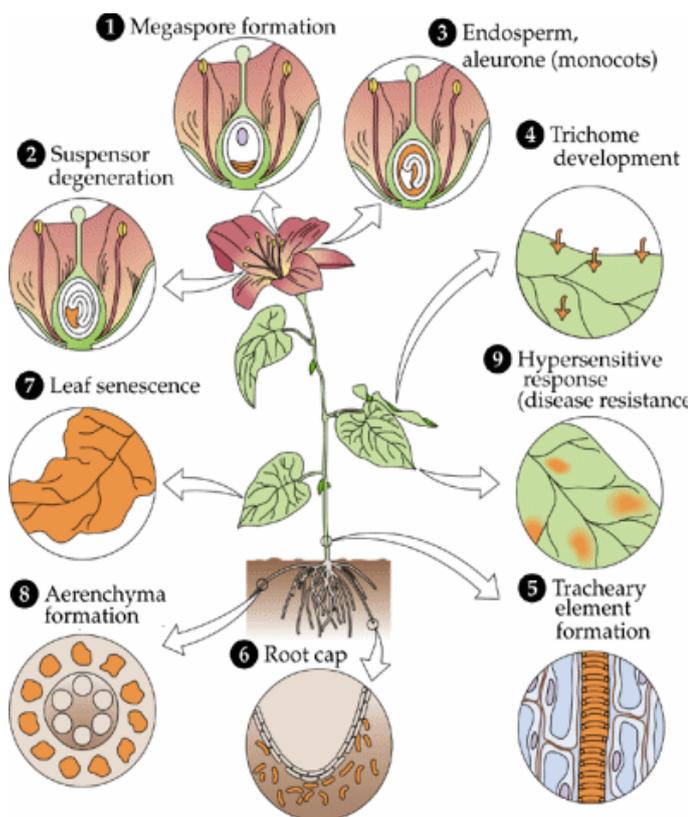


Fig. 2: Esempi di PCD nel ciclo vitale delle piante (da Buchanan *et al.*, 2000).

Sono stati identificati diversi geni coinvolti nella PCD vegetale. Tra i prodotti di questi geni troviamo le aspartato endopeptidasi, le metalloendopeptidasi, le serin-

proteasi, le cistein-proteasi ed papaina-simili (Beers *et al.*, 2000). Sono state identificate due classi di endonucleasi (Sugiyama *et al.*, 2000) coinvolte nelle vie della PCD: quelle Zn^{2+} dipendenti, identificate durante la senescenza fogliare in frumento (Blank e McKeon, 1989) e quelle Ca^{2+} dipendenti, coinvolte nella risposta ipersensibile in tabacco e nella senescenza in orzo (Mittler e Lam, 1997; Wood *et al.*, 1998).

Il “laddering” del DNA è stato osservato solo in alcuni processi di PCD nelle piante, per esempio nei carpelli senescenti di pero (Orzaez e Granell, 1997), nelle cellule dell'aleurone dei semi d'orzo (Wang M. *et al.*, 1996), in protoplasti e foglie di pomodoro trattate con tossine fungine (Wang H. *et al.*, 1996), nella senescenza e in seguito al trattamento con shock termico in cellule in coltura di *Arabidopsis thaliana* e di carota (Lo Schiavo *et al.*, 2000).

1.1.1 Ruolo degli organelli nella PCD

L'induzione dell'apoptosi in cellule di mammifero può avvenire attraverso due vie principali: una via “estrinseca” mediata da specifici recettori ed una via “intrinseca” incentrata sul ruolo svolto dai mitocondri. Nella via estrinseca, caratteristica dei vertebrati, l'induzione del processo apoptotico è mediata dalla presenza di recettori sulla membrana plasmatica (“death-receptor”), in grado di riconoscere i segnali provenienti dall'esterno della cellula (Vianello *et al.*, 2007; Yuan, 2007). La via intrinseca è invece caratterizzata dal ruolo di “sensing” e amplificazione del segnale di morte svolto dal mitocondrio (Haengaertner, 2000; Vianello *et al.*, 2007), che costituisce il principale sito di integrazione tra i segnali pro-apoptotici della cellula. Il mitocondrio, infatti, contiene al suo interno diverse proteine in grado di regolare l'apoptosi, tra cui il più importante è il citocromo *c*, componente della catena respiratoria. Il rilascio di questo componente nel citosol rappresenta l'evento chiave nell'attivazione del processo apoptotico: il citocromo *c* si lega ad una proteina “apoptotic protease activating factor 1” (Apaf-1), fattore del grande complesso molecolare apoptosoma, che porta all'attivazione, mediante proteolisi, della caspasi 9 (Chowdhury *et al.*, 2006; Swidiznski *et al.*, 2006).

Alcuni studi confermano il rilascio di citocromo *c* anche da parte dei mitocondri vegetali durante la PCD (Carimi *et al.*, 2003; Zottini *et al.*, 2006), ma non sembra

un evento sempre presente nella PCD vegetale. Negli organismi vegetali il mitocondrio potrebbe essere coinvolto solo in alcune forme di PCD, o attivare vie associate forse ad una precoce rottura del vacuolo (Vianello *et al.*, 2007; Zottini *et al.*, 2006).

Nelle cellule vegetali, il ruolo del mitocondrio non è ancora del tutto chiaro, non ci sono finora dati che confermano se le vie attivate nelle piante possono essere analoghe a quelle che esistono nei mitocondri animali. Infatti non sono ancora stati identificati nei vegetali geni omologhi a quelli della famiglia *Bcl-2* animale (geni coinvolti nella via di trasmissione del messaggio di morte cellulare) nel sistema modello *Arabidopsis thaliana* (Mitsuhara *et al.*, 1999).

Recenti esperimenti, basati sull'utilizzo degli inibitori delle caspasi (del Pozo e Lam, 1998; De Jong *et al.*, 2000), avvalorano l'ipotesi che le cistein-proteasi presenti nelle piante siano delle "caspasi-like" (CLPs), definite anche metacaspasi (Lam, 2004), in grado di regolare alcune forme di PCD.

Questi risultati indicano che strategie simili e molecole funzionalmente analoghe sono state conservate tra animali e piante, al fine di controllare il processo di morte. Un esempio è l'inibitore di Bax (BI-1). Questa molecola agisce da soppressore di uno specifico, anche se non ancora identificato tipo di morte cellulare programmata. Questo inibitore è stato identificato in diversi eucarioti, come animali, piante e funghi.

Nel corso del ciclo cellulare i mitocondri non vengono formati *de novo*, ma aumentano di numero per fissione (divisione). I mitocondri possono anche fondersi e, l'equilibrio tra questi due processi controlla la forma, le dimensioni e il numero dei mitocondri (Frank *et al.*, 2001). Recentemente il processo di fusione-fissione è stato riportato anche nelle piante, in particolare nelle cellule epidermiche di tabacco (Arimura *et al.*, 2004b). Lavori recenti hanno dimostrato che la morfologia dei mitocondri vegetali è controllata da particolari proteine definite "dynamine-like" con funzione simile alle dinamine animali (Arimura *et al.*, 2004a; Logan *et al.*, 2004). Nelle foglie di *Arabidopsis thaliana* è stato inoltre riportato che i mitocondri possono alterare la loro morfologia in risposta a diversi stress, come il buio prolungato (Yoshinaga *et al.*, 2005). Durante l'apoptosi, è stato visto che sia negli animali che nelle piante, il network mitocondriale si frammenta e prevale il processo della fissione.

Negli animali è stato riconosciuto il ruolo del reticolo endoplasmatico (ER) nella morte cellulare (Nagakawa e Yuan, 2000; Berridge, 2002). In seguito a condizioni di stress, che causano una alterazione del ER, può essere indotto un processo di PCD che coinvolge l'attivazione di specifiche proteasi, chitinasi, fattori di trascrizione o membri della famiglia delle Bcl-2 (Chowdhury *et al.*, 2006). Anche nelle cellule vegetali è stato recentemente riconosciuto il ruolo del ER nell'attivazione della PCD in cellule vegetali (Crosti *et al.*, 2001).

Tra gli organelli coinvolti nella PCD, sta sempre più emergendo il ruolo fondamentale del cloroplasto (Zapata *et al.*, 2005; Yao e Greenberg, 2006). Piante di tabacco trasformate con geni che codificano per membri anti-apoptotici della famiglia delle Bcl-2 animale, sono in grado di inibire la PCD quando trattate con erbicidi, diretti contro il cloroplasto (Chen e Dickman, 2004). Recentemente è stato dimostrato anche un coinvolgimento del citocromo *f* nella morte cellulare. Protoplasti di melanzana in cui è indotta la morte cellulare mediante trattamento con acido palmitoleico, mostrano un rilascio del citocromo *f* dalle membrane tilacoidali nel citoplasma (Peters e Chin, 2005).

1.2 Senescenza

La senescenza è un processo complesso e altamente regolato che avviene nella fase finale dello sviluppo e della maturità di vari organi, come foglie, radici, fiori. Durante questo processo, la pianta viene rimodellata, i nutrienti, soprattutto azoto e fosforo, vengono recuperati e nuove vie metaboliche vengono attivate, mentre altre vengono spente (Buchanan *et al.*, 2000). Nelle fasi iniziali della senescenza fogliare avviene la mobilitazione ed il recupero dei nutrimenti che vengono convogliati verso le parti fotosintetizzanti della pianta (Fig.3).

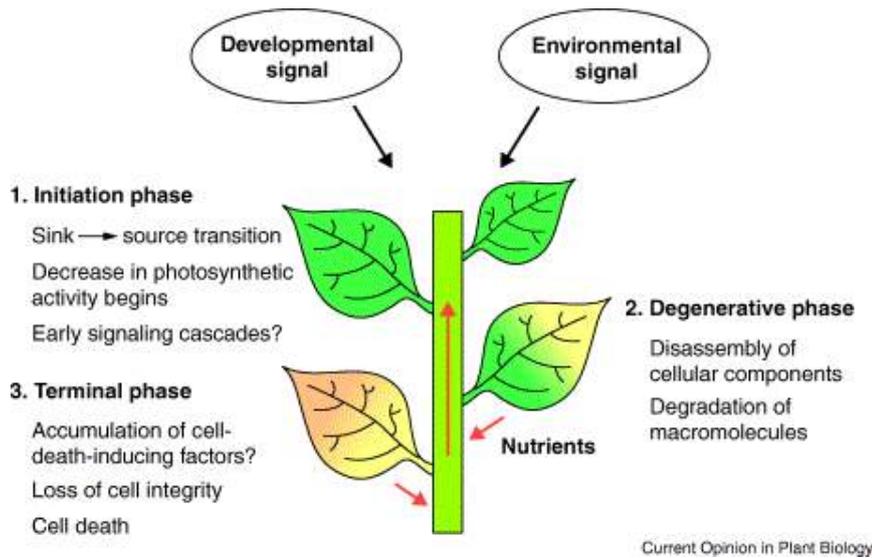


Fig. 3: Aspetti della senescenza fogliare (da Yoshida, 2003)

La senescenza avviene in due stadi successivi: il primo, durante il quale le cellule sono ancora attive, è reversibile e regolato da segnali come la luce o gli ormoni; il secondo stadio porta alla distruzione delle cellule attraverso un processo di morte geneticamente programmato (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003).

La distinzione in questi due stadi ha portato alcuni autori a definire “senescenza” lo stadio in cui le foglie sono gialle, prima del punto di non ritorno, e PCD il processo che ne segue (Delorme *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2003).

Sia stimoli endogeni (es. ormonali) che perturbazioni ambientali possono attivare il programma di senescenza. Gli stimoli esterni possono essere la qualità della luce, la temperatura, la siccità; tra gli stimoli interni, fattori di crescita, l’etilene, il metiljasmonato e l’acido abscissico sono ritenuti promuovere la senescenza, mentre è stato riportato che citochinine, auxine e gibberelline la ritardano (Jordi *et al.*, 2000). La senescenza è un processo lento, finemente regolato e i componenti della cellula vengono smantellati in una progressione ordinata. La senescenza risulta essere un programma reversibile almeno nelle sue fasi iniziali, come dimostra il “rinverdimento” causato dal taglio del fusto di piante di tabacco immediatamente al di sopra delle foglie ingiallite, che ritornano gradualmente verdi e fotosinteticamente attive. In effetti si può vedere come lungo il processo di senescenza di una foglia il mesofillo rimanga vivo e turgido, benché ingiallito, finché quasi tutti i nutrienti della foglia siano stati esportati. Solo successivamente avviene l’appassimento, cioè la rapida fase esecutiva di morte.

La reversibilità di un processo di morte programmata differenzia la PCD vegetale dall'apoptosi negli animali, dove le fasi iniziali possono essere reversibili ma di breve durata (esempio il rilascio di citocromo *c*, dal mitocondrio nel citosol), superati i quali le cellule vanno inevitabilmente incontro alla morte.

1.2.1 Eventi iniziali della senescenza

L'evento iniziale della senescenza è la degradazione della clorofilla, il cui processo coinvolge numerosi enzimi. L'intera via metabolica, che coinvolge diversi compartimenti subcellulari, dal cloroplasto, al citosol, al vacuolo, è stata analizzata in dettaglio grazie a mutanti definiti "stay-green", dove il processo di senescenza è ritardato (Thomas e Smart, 1993).

Durante la senescenza il metabolismo dei fenilpropanoidi viene alterato. Nei tessuti senescenti si accumulano composti come l'acido salicilico, coinvolto nella risposta agli stress, le fitoalessine che proteggono dai patogeni, la lignina e le antocianine che sono pigmenti vacuolari. In senescenza vengono poi attivate vie di demolizione e di recupero delle sostanze nutritive. Contemporaneamente alla degradazione della clorofilla i cloroplasti subiscono graduali modificazioni trasformandosi in gerontoplasti nelle foglie e cromoplasti nei frutti. I perossisomi invece si convertono in gliossisomi, compartimenti che partecipano alla gluconeogenesi. Tossine che bloccano la respirazione, come l'agente disaccoppiante dinitrofenolo, sono infatti molto efficaci nel bloccare il processo di senescenza.

La senescenza nel suo insieme appare un processo estremamente complesso. In una recente analisi del trascrittoma di *Arabidopsis thaliana*, durante la senescenza sono stati identificati oltre 2300 geni attivati durante questo processo (circa il 10% del totale dei geni in questa specie), tra cui 130 regolatori di trascrizione (Guo *et al.*, 2004). I geni attivati durante la senescenza sono detti *SAGs* (*Senescence Associated Genes*). Molti codificano per enzimi catabolici, come proteasi, nucleasi e lipasi, metallotioneine che sequestrano i metalli per il loro trasporto o per proteggere la cellula da danni ossidativi, proteine di trasporto e enzimi per la sintesi di molecole di difesa contro i patogeni.

Le proteasi, indotte dalla senescenza, non sono coinvolte esclusivamente nella imponente degradazione proteica cui va incontro la cellula, bensì sembra che alcune di esse svolgono un ruolo di regolazione. L'analisi comparativa dell'espressione genica in *Arabidopsis*, durante la senescenza e altri tipi di stress capaci di indurre PCD (*heat shock*, stress idrico, HR), ha mostrato che molti geni sono attivati in più processi. Questo risultato fa parte di una risposta generale della pianta agli stress come elementi di una via comune di PCD (Weaver *et al.*, 1998, Pontier *et al.*, 1999, Chen *et al.*, 2002). Tuttavia alcuni SAGs sono esclusivi della senescenza. In particolare *SAG12*, codificante per una cistein-proteasi, si è dimostrato il migliore marcatore di senescenza. La sua espressione è indotta all'inizio della senescenza fogliare, quando i margini fogliari cominciano a ingiallire (dopo la fase S1 nella classificazione dei vari stadi della senescenza in Lohman *et al.*, 1994), e tale marcatore non è espresso esclusivamente nelle foglie ma anche durante la senescenza nel fusto, dei sepali, petali e carpelli (Gan e Amasino, 1997).

1.2.2 La regolazione della senescenza

L'inizio della senescenza è soggetto a regolazione da parte di numerosi fattori endogeni ed ambientali. Tra i fattori endogeni, i più importanti sono l'età, lo stadio di sviluppo riproduttivo, livelli di fito-ormoni (Gan e Amasino, 1996; Gan e Amasino 1997). Tra i fattori ambientali possono indurre senescenza la mancanza di nutrienti, temperature estreme, stress idrico, infezione di patogeni, lesioni, oscurità, presenza di inquinanti quali l'ozono (Fig. 4).

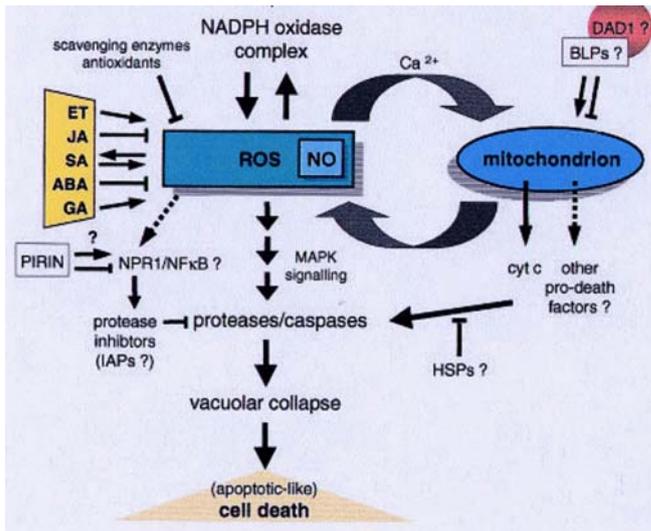


Fig. 4: Schema di alcuni elementi coinvolti nella PCD delle piante.

Tra i fitormoni, l'etilene è sicuramente il più forte promotore della senescenza. Mano a mano che le foglie invecchiano, aumenta la concentrazione di etilene prodotto; nella petunia l'etilene avvia il processo di senescenza nei petali dopo l'impollinazione del fiore. È inoltre noto che l'etilene gioca un ruolo importante nella maturazione dei frutti climaterici.

L'analisi di mutanti nella via di sintesi dell'etilene ha confermato il ruolo centrale di questo ormone nell'induzione della senescenza. Mutanti *etr1* (*ethylene resistant 1*) di *Arabidopsis* e *never ripe* di pomodoro, alterati in un recettore funzionale dell'etilene, presentano una senescenza ritardata (Grbic e Bleecker, 1995; Picton *et al.*, 1993).

Le citochinine sono invece note come inibitori del processo di senescenza: in primo luogo, la concentrazione delle citochinine cala nei tessuti senescenti; in secondo luogo, l'applicazione esogena di citochinine può causare un ritardo nella senescenza in molti tipi di tessuto (Gan e Amasino, 1996). L'attività anti-senescente delle citochinine è sfruttata da alcuni patogeni biotrofici, che inducono la formazione di "isole verdi" attorno alle zone di infezione in foglie gialle e senescenti (Angra-Sharma e Sharma, 1999).

L'overespressione del gene codificante per l'isopentenil-transferasi (*IPT*) un enzima coinvolto nella biosintesi delle citochinine, induce nelle piante una senescenza tardiva, accompagnata da vistose malformazioni morfologiche (Smart *et al.*, 1991). Ponendo invece il gene *IPT* sotto il controllo del promotore di

SAG12, che viene trascritto nella fase di induzione della senescenza, le citochinine vengono prodotte esclusivamente all'inizio del processo di senescenza. Si evita in tal modo la produzione di alte concentrazioni di citochinine nel resto della pianta e durante la crescita cellulare che sono causa di uno scorretto sviluppo, contemporaneamente viene mantenuto il ritardo nell'induzione della senescenza (Gan e Amasino, 1995; Mc Cabe *et al.*, 2001).

Negli ultimi anni si sono accumulate evidenze che le citochinine hanno un ruolo più complesso nella regolazione del processo di senescenza. Lavori recenti hanno dimostrato che questi ormoni quando presenti in alte concentrazioni sono in grado di "indurre" la senescenza in determinati sistemi sperimentali (Carimi *et al.*, 2004).

Oltre a etilene e citochinine, altri fito-ormoni sono coinvolti nella regolazione della senescenza, ma i dati appaiono spesso discordanti e piante o tessuti diversi rispondono in maniera differente.

1.3 La PCD nelle risposte di difesa

Le piante in risposta ad un attacco patogeno possono attuare diverse forme di difesa, le più note e studiate sono la HR e la resistenza sistemica acquisita (SAR: *Systemic Acquired Resistance*).

HR è la forma più efficace con la quale una pianta si oppone all'aggressione di un potenziale patogeno e, nella maggior parte dei casi, è stata osservata a seguito di interazioni ospite-patogeno di tipo "gene-for-gene" (Greenberg, 1997). L'HR consiste nella rapida morte delle cellule che si auto-eliminano lasciando, nel sito d'invasione, una piccola zona formata da cellule morte, mentre il resto della pianta risulta vivo. Diverse evidenze suggeriscono che la morte cellulare associata all'HR sia un fenomeno di PCD codificata nel genoma della pianta stessa, in quanto esistono alcune similitudini tra la risposta ipersensibile e la morte cellulare programmata nei mammiferi (Heath, 2000).

Il primo evento della catena di segnali dell'interazione ospite-patogeno è il riconoscimento da parte del recettore dell'elicitore (esogeno o endogeno); i passaggi che seguono non sono ancora del tutto chiari, ma sembra che siano

coinvolte proteine G, flussi ionici, attivazioni di chinasi e fosfatasi, specie reattive all'ossigeno (ROS), ossido nitrico (NO) e attivazione dei geni di difesa

Nelle cellule di *Arabidopsis thaliana* che muoiono durante HR, si riscontrano modificazioni del citoscheletro che provocano un arresto nei movimenti citoplasmatici, segue la digestione del DNA nucleare, che negli ultimi stadi, assume un aspetto granulare; solo in caso di infezione fungina, ma non batterica compare il laddering del DNA. Infine, la membrana citoplasmatica perde la sua semipermeabilità e inizia a contrarsi causando il raggrinzimento delle cellule (Heath, 2000). La HR è caratterizzata da una intensa alterazione metabolica nelle cellule circostanti le lesioni necrotiche, attivando la trascrizione dei geni di difesa. Tale evento viene indicato con il termine “resistenza acquisita localizzata” (LAR; *Local Acquired Resistance*) che contribuisce alla compartimentazione del potenziale patogeno. La HR spesso attiva un tipo di resistenza non specifico che si manifesta in zone diverse e a volte distanti da quelle dell'infezione e che conferisce alla pianta una protezione durevole nei confronti delle successive infezioni (SAR). La SAR è una risposta difensiva indotta in parti della pianta distanti dal sito di infezione (Durrant e Dong, 2004). Rappresenta una sorta di sistema immunitario della pianta che differisce dall'immunità presente negli animali, essendo meno specifica: infatti rende le piante più resistenti ad attacchi patogeni successivi di diverso tipo e ad ampio spettro. E' stato dimostrato che la SAR si verifica non solo quando la pianta è soggetta a infezioni patogene, ma anche in seguito a disordini fisiologici, lesioni o trattamenti con agenti chimici. La produzione di metaboliti secondari, come SA, sostanze antimicrobiche (fitoalessine) e l'espressione di numerosi geni, tra cui quelli codificanti per le proteine PR sono punti chiave per lo stabilirsi di questa forma di resistenza prolungata nel tempo (McDowell e Dlang, 2000). Sono stati usati approcci genetici per identificare le componenti coinvolte nel controllo della HR e della SAR, in particolare sono stati isolati varie classi di mutanti relativi alle risposte di difesa. I più importanti sono i mutanti che sviluppano lesioni HR e risposte di difesa in assenza di patogeni, per questo definiti “mutanti lesion-mimic” (LMM: *Lesion-Mimic Mutant*). I mutanti isolati in *Arabidopsis thaliana* sono stati divisi in due classi: “di avvio” dove si promuove la PCD e “di propagazione” dove il meccanismo blocca la PCD limitando l'estensione delle regioni. Nei primi si

formano macchie necrotiche localizzate e di determinate dimensioni, mentre nei secondi l'estensione delle lesioni non è controllata (Buchanan *et al.*, 2000). Alla classe dei mutanti di avvio, appartengono *acd6* (*acd*: *accelerated cell death*) e *cpr5* (*cpr*: *constitutive expression of PR gene*), in cui il livello di morte cellulare è relativamente basso e si osservano piccole o microscopiche lesioni (Bowling *et al.*, 1997; Rate *et al.*, 1999). Tra i mutanti di propagazione troviamo *acd2* in cui l'apparizione delle lesioni è accompagnata dall'espressione costitutiva di marker associati all'infezione patogena: depositi di callosio, produzione dei ROS, accumulo di SA e attivazione della SAR nelle parti della pianta non infettate (Yao e Greenberg, 2006).

Esiste un'altra classe di mutanti in cui la via del segnale SA è danneggiata che presentano un'espressione costitutiva dei meccanismi di difesa (Shah *et al.*, 2001).

1.3.1 Relazione tra PCD in senescenza e durante la HR

Diversi geni inizialmente identificati come geni indotti durante la senescenza delle foglie in diverse specie, codificano per prodotti che sono simili alle proteine PR, che fanno a loro volta parte del gruppo più generale di proteine note come "Defense-related protein" (DR). L'induzione dei geni *DR* durante il processo della senescenza potrebbe aiutare la pianta a proteggere le foglie dalle varie infezioni opportunistiche che possono accompagnare questo processo. I geni *DR* inoltre sono normalmente espressi nella senescenza delle foglie di *Arabidopsis thaliana* cresciuta in condizioni sterili, questo vuol dire che l'espressione dei geni *DR* è parte integrante del programma di senescenza, piuttosto che di una risposta alle infezioni patogene. L'SA è in grado di indurre alcuni geni *SAG* (Quirino *et al.*, 1999; Quirino *et al.*, 2000); questo indica che ci potrebbero essere delle sovrapposizioni tra i processi di senescenza delle foglie e di difesa dai patogeni, ma l'entità della possibile sovrapposizione è ancora poco chiara. Si ipotizza che potrebbero esistere dei regolatori comuni ad entrambi i processi, che inducono l'espressione di certi geni implicati sia nella senescenza che nella difesa e quindi sarebbe possibile isolare mutanti nelle risposte ai patogeni difettivi anche nella senescenza e vice-versa (Quirino *et al.*, 1999; Quirino *et al.*, 2000). L'analisi delle sequenze promotrici dei *SAG* suggerisce che la regolazione dell'espressione di

questi geni sia multifunzionale (Gan e Amasino, 1997), mentre l'assenza di sequenze *consensus* per proteine note leganti il DNA, suggerisce che la regolazione dei geni per la senescenza coinvolga classi nuove di fattori trascrizionali (Quirino *et al.*, 1999; Quirino *et al.*, 2000).

1.3.2 Molecole coinvolte nei meccanismi di difesa: SA, H₂O₂, NO

Come più volte ripreso tra le molecole che giocano un ruolo chiave nei meccanismi di difesa della pianta le più importanti sono SA, H₂O₂ e NO.

Acido salicilico (SA)

L'acido salicilico (SA) è un composto fenolico ubiquitario nel regno vegetale. Nelle piante i composti fenolici sono coinvolti nei meccanismi di regolazione della crescita e dello sviluppo; alcuni esempi di composti fenolici sono la lignina, le fitoalessine e l'acetosiringone. SA è coinvolto in numerosi processi fisiologici, come la termogenesi, la sintesi di etilene e la maturazione dei frutti (Rhoads e McIntosh, 1992). SA ha anche un ruolo durante la risposta agli stress abiotici come gli UV e l'ozono (Rao e Davis, 1999; Senaratna *et al.*, 2000), durante condizioni di sviluppo o in risposta a stimoli biologici come nella nodulazione (Stacey *et al.*, 2006). Il ruolo dell'SA durante l'attacco di un patogeno è di particolare rilevanza sia nel promuovere una risposta locale che la SAR (Alvarez, 2000). L'attacco di un patogeno induce un accumulo bifasico di SA nel sito di infezione (Chamnonpolg *et al.*, 1998). La prima fase, precedente alla formazione di lesioni necrotiche, corrisponde ad un accumulo transiente e limitato di SA, mentre nella seconda fase, la produzione di SA raggiunge livelli più alti e dura più a lungo nel tempo. Ciò suggerisce un coinvolgimento di SA anche nell'attivazione del programma di morte cellulare. In particolare, nella fase iniziale di accumulo, SA regola la cinetica di formazione delle lesioni necrotiche. Infatti, in piante transgeniche che non accumulano SA, c'è uno sviluppo ritardato della morte cellulare indotta dall'infezione con un patogeno avirulento. In queste piante inoltre l'estensione delle zone necrotiche è di gran lunga superiore rispetto al wt,

indicando un coinvolgimento di SA anche nella regolazione delle dimensioni della lesione (Mur *et al.*, 2000).

La maggior parte degli studi fino ad ora eseguiti ha rivelato che SA svolge un'azione induttiva nel promuovere le risposte di difesa, e che questa azione richiede a sua volta un accumulo di questa molecola; trattando diversi tipi di piante, con concentrazioni endogene di SA ed in contemporanea con patogeni avirulenti, si ha una forte attivazione di geni di difesa quali *PAL* e *GST*, il potenziamento del *burst* ossidativo, la produzione delle proteine PR e per ultimo l'induzione della morte cellulare (Shiratsu *et al.*, 1997).

Un modo per cui SA induce la sintesi delle proteine PR è mediante la formazione del radicale SA[•]. A basse concentrazioni, SA può agire da agente riducente nelle reazioni perossidasiche, generando radicali SA[•], che sono in grado di catalizzare la perossidazione lipidica portando all'attivazione dei geni *PR* (Klessing *et al.*, 2000). Oggi non sono ancora chiariti i meccanismi del *pathway* dell'SA. Si ipotizza che sia dopo attacco patogeno, sia dopo l'attivazione dei geni *R* si induce la sintesi e l'accumulo di SA, che a sua volta influisce sull'espressione di due geni: *EDS5* (*EDS: Enhance Disease Susceptibility*) e *PAD4* (*PAD: Phytoalexin Deficient*), che sono necessari per la resistenza basale e per un ulteriore accumulo di SA. L'azione di difesa dell'SA può essere attivata attraverso due meccanismi. Il primo attraverso il gene *NPRI* (*NPRI: Non-expressed PR genes*). Le piante mutate in questo gene non esprimono i geni *PR* e non sviluppano la SAR; tuttavia sono in grado di accumulare SA. Ciò indica che la mutazione è a monte dei geni *PR*, ma non influisce sull'accumulo di SA. *NPRI* codifica per una proteina che presenta un particolare dominio aminoacidico definito "ankyrin repeat". Questo dominio è in grado di legarsi, con molta affinità, a due fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia TGA (Klessig *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006). L'altra via prevede un coinvolgimento dell'etilene e del metiljasmonato (JA), che fungono da *enhancer* di SA per l'attivazione dei geni *PR*; questa via è detta anche *NPRI* indipendente (Shah, 2003).

In tabacco sono state isolate diverse proteine che rispondono all'SA: SIPK (*SIPK: Salicylic acid-Inducibile Protein Kinase*) una chinasi appartenente alla famiglia delle MAP chinasi. La sintesi di questa proteina è attivata da SA, come pure da altri elicitatori, stress meccanici, come tagli ed abrasioni (Klessig *et al.*, 2000;

Zhang e Klessig, 1998). Le altre proteine sono SABP (*SABP: Salicylic Acid-Binding Protein*), una catalasi che lega SA o gli analoghi funzionali, SABP2, che codifica per una proteina che ha affinità per SA circa 150 maggiore della catalasi (Klessig *et al.*, 2000). Recentemente si è scoperta un'altra proteina la SABP3, che ha una localizzazione plastidiale. Quest'ultima è una carbonato-anidrasa, che ha una azione anti-ossidante e sembra coinvolta nello sviluppo dell'HR (Shah, 2003; Slaymaker *et al.*, 2002).

Perossido d'idrogeno (H₂O₂)

Il perossido di idrogeno (H₂O₂) è un segnale che induce una serie di risposte biochimiche, molecolari e fisiologiche, quindi possiamo affermare che H₂O₂ è un mediatore di vari segnali (Neill *et al.*, 2002).

L'H₂O₂ può essere generato attraverso vari sistemi: durante la respirazione mitocondriale o durante la fotosintesi nel cloroplasto, salvo poi essere degradato immediatamente. Una potenziale fonte di H₂O₂ è la NADPH ossidasi di membrana, le perossidasi della parete e le lipossigenasi (Bóka *et al.*, 2007).

In risposta a vari tipi di stress la produzione di questa molecola aumenta, come ad esempio dopo una prolungata esposizione ad una forte radiazione luminosa o shock termico (Vacca *et al.*, 2004). L'H₂O₂ inoltre è coinvolta nello sviluppo della pianta; infatti durante la PCD nell'aleurone, sotto il controllo delle giberelline, si ha una forte produzione di H₂O₂ (Bethke e Jones, 2001). L'H₂O₂ è inoltre coinvolto in numerosi processi fisiologici come la chiusura degli stomi sotto il controllo dell'acido abscissico (Pei *et al.*, 2000).

Una maggiore produzione di H₂O₂ è innescata anche da stress biotici, in risposta a microrganismi patogeni o loro elicitori. L'H₂O₂ è una molecola segnale che ha un ruolo attivo durante la HR. La generazione di H₂O₂ in seguito ad un attacco patogeno, media l'interazione tra le proteine della parete e i composti fenolici da loro rilasciati. Secondo alcuni autori, l'H₂O₂ può avere anche effetti antimicrobici (Mehdy *et al.*, 1996; Rojkind *et al.*, 2002). In seguito ad un attacco patogeno dove si hanno lesioni della cellula ospite, L'H₂O₂ funge da segnale mobile di PCD (Neill *et al.*, 2002). Durante l'attacco da parte dei patogeni, la pianta produce di H₂O₂, che a sua volta induce l'espressione di geni coinvolti nella difesa della

pianta; infatti in *Arabidopsis thaliana* e in soia l'accumulo di H₂O₂ porta all'espressione del gene *GST* (glutazione S-transferasi) e del gene *PAL* (fenilalanina ammonio liasi). Questi due enzimi sono coinvolti nella detossificazione dell'H₂O₂ e in particolare *PAL* media anche la sintesi di composti di difesa come le fitoalessine. La produzione di H₂O₂ induce anche un'espressione locale di proteine PR, con l'induzione della LAR e della SAR (Chamnongpol *et al.*, 1998). Un accumulo bifasico di H₂O₂ è stato misurato in diverse colture cellulari vegetali, in risposta ad un attacco patogeno. In questi sistemi sperimentali il primo picco compare in tempi relativamente brevi (5-10 minuti), mentre il secondo picco si ha dopo 1-2 ore dal contatto con il patogeno. Il primo picco è stato interpretato come "non specifico" in quanto è indotto sia da patogeni virulenti che avirulenti; mentre il secondo picco è quello "specifico" in quanto attivato da patogeni specifici per la pianta (Shirasu e Shulze-Lefert, 2000).

Il H₂O₂ e le altre ROS possono reagire con una grande varietà di target cellulari, con effetti spesso deleteri come il danno del DNA o la perossidazione lipidica.

Si conosce ancora poco sulle vie di trasduzione del segnale mediata da H₂O₂. E' stata osservata una elevata concentrazione di calcio citosolico a livello cellulare quando la pianta è sottoposta ad un attacco patogeno (Levine *et al.*, 1994). In cellule di soia, dopo contatto con un fungo patogeno, L'H₂O₂ generata in seguito all'infezione induce forti flussi di calcio che poi porteranno alla morte delle cellule.

Nel genoma delle piante sono state identificate molte forme di *mitogen activate protein kinase* (MAPK), che vengono attivate in seguito a diversi stimoli: elevate o basse temperature, fitormoni, patogeni o elicitori, e stress osmotici. In *Arabidopsis thaliana* l'H₂O₂ attiva due MAPK, una di queste è attivata indipendentemente dall'SA, JA e etilene (Neill *et al.*, 2002; Bóka *et al.*, 2007).

Recentemente in lievito è stato studiato un fattore di trascrizione sensibile allo stato red-ox della cellula, chiamato Yap1. Questa proteina nella sua conformazione originale è inattiva, ma in seguito al cambiamento dello stato red-ox, la proteina lega l'H₂O₂ attivandosi (Neill *et al.*, 2002). Si ipotizza che anche nei sistemi vegetali H₂O₂ possa agire da regolatore nell'espressione di proteine coinvolte nelle risposte di difesa.

Ossido nitrico (NO)

L'ossido nitrico (NO) è una piccola molecola gassosa, idro- e lipo-solubile. Estensivamente studiato come molecola segnale negli animali, negli ultimi anni si è rivelato importante anche nelle piante (per una *review* Neill *et al.*, 2003). Inizialmente l'NO è stato identificato come segnale di difesa durante la risposta ipersensibile, sia in colture cellulari trattate con elicitatori che *in planta*. Successivamente è emerso il ruolo chiave dell'NO in numerosi processi, durante la difesa contro stress abiotici (ozono, UV, shock termici), la germinazione dei semi, le simbiosi tra legumi e batteri, la crescita radicale, la chiusura degli stomi e durante la senescenza. In particolare NO si è dimostrato una molecola importante nella chiusura degli stomi indotta dall'acido abscissico (Shroeder *et al.*, 2001; Desikan *et al.*, 2002).

Anche alcuni effetti delle citochinine sono mediati dall'NO: colture cellulari di *Arabidopsis thaliana*, tabacco e prezzemolo trattate con queste molecole rispondevano con una rapida produzione di NO (Tun *et al.*, 2001; Carimi *et al.*, 2005).

La produzione di NO è stata messa in relazione anche con la sintesi di etilene durante la senescenza di foglie e fiori e la maturazione dei frutti. È stato osservato che durante questi processi i livelli di NO diminuivano contemporaneamente all'aumento di quelli di etilene. Inoltre il trattamento con NO esogeno è in grado di rallentare la senescenza dei tessuti e della maturazione dei frutti. L'effetto dell'NO avviene inibendo la biosintesi dell'etilene (Leshem, 2001). D'altra parte piante di *Arabidopsis thaliana*, trattate con NO, rispondono con un'aumentata produzione di etilene, e l'inibizione della sintesi di NO non ha influenza sull'accumulo di etilene (Magalhaes *et al.*, 2000). Il ruolo dell'NO nella senescenza appare quindi controverso.

Negli animali l'NO è prodotto attraverso l'enzima ossido-nitrico sintasi (NOS: *Nitric Oxide Synthase*), che converte la L-arginina in L-citrullina in NO. Nei mammiferi si sono scoperte tre isoforme della NOS: una neuronale (nNOS), una endoteliale (eNOS) entrambe costitutive, ed una forma inducibile (iNOS) presente nei macrofagi (Romero-Puertas *et al.*, 2004). Nelle piante numerose evidenze farmacologiche (uso degli inibitori delle NOS animali), e biochimiche

(produzione di L-citrullina da L-arginina) suggerivano la presenza di questo enzima ma, in seguito al sequenziamento del genoma di *Arabidopsis thaliana*, nessun omologo di sequenza è stato individuato.

L'ipotesi che sta emergendo, è che il genoma delle piante codifica per un enzima che svolge la stessa funzione della NOS animale, definito quindi "NOS-like". Questo enzima è sensibile all'azione degli inibitori della NOS, anche se differisce dalla classica struttura della NOS dei mammiferi.

Oltre alle "NOS-like" nelle piante esistono altre vie di produzione dell'NO. La nitrato-reduttasi citoplasmatica (cNR), che sembra operare in condizioni anaerobiche ed in presenza di un'elevata concentrazione di nitrito (Lamotte *et al.*, 2005; Yamasaki e Sakihama, 2000), una nitrato reduttasi che oltre al canonico ruolo di riduzione del nitrato a nitrito, è capace di ridurre il nitrito a NO (NI-NOR); questo enzima sembra importante nella produzione di NO indotta da acido abscissico in *Arabidopsis thaliana* (Stöhr *et al.*, 2001). La xantina-ossidoreduttasi è un altro enzima presente nelle piante e capace di generare NO. Infine esiste una via non-enzimatica, che produce NO a partire dal nitrito in condizioni di pH acido, soprattutto in presenza di antiossidanti. Questa via è rivelata importante nella produzione di NO nell'apoplasto dell'aleurone d'orzo (Bethke *et al.*, 2004).

L'azione dell'NO è estremamente complessa e, appare chiaro, che questa molecola è capace di avere effetti a volte contrapposti. Si comporta infatti come antiossidante, prevenendo la produzione di ROS e la PCD in cellule d'aleurone d'orzo trattate con gibberelline (Beligni *et al.* 2002), ma d'altra parte, il trattamento di cellule in coltura con molecole che rilasciano NO risulta indurre la PCD (Clarke *et al.*, 2000, Zottini *et al.*, 2002). L'importanza dell'NO nell'induzione della PCD è evidenziata anche in studi sulla risposta ipersensibile: se la produzione endogena di NO viene bloccata, tramite l'uso di inibitori di sintesi o *scavengers*, la PCD è inibita (Delledonne *et al.*, 1998, Durner *et al.*, 1998). L'NO è una molecola altamente reattiva che esiste nella cellula in differenti forme redox; è capace di reagire con i lipidi e residui di cisteina e tirosina nelle proteine. A questo proposito è possibile che la nitrosilazione possa rappresentare un meccanismo regolativo paragonabile alla fosforilazione. Negli animali la via di trasduzione del segnale dell'NO tipicamente coinvolge il cGMP, e ci sono evidenze che questo secondo messaggero abbia un ruolo importante

anche nelle piante, in quanto il trattamento con un inibitore della guanilato-ciclastasi previene la PCD in cellule di *Arabidopsis* trattate con NO (Clarke *et al.*, 2000). Recentemente si è visto che SA induce la produzione di NO in *Arabidopsis thaliana*. In questo studio si sono identificati i componenti del signalling dell'SA: la fosforilazione di una specifica proteina la casein kinase 2 (CK2) e la presenza dello ione calcio (Zottini *et al.*, 2007).

E' probabile che la PCD indotta dalla somministrazione di NO sia dovuta a una compromissione della funzionalità mitocondriale. Negli animali infatti l'NO blocca la respirazione inibendo inizialmente il complesso IV, poi il complesso I e causando quindi morte cellulare. Nelle piante si è dimostrato che l'NO inibisce la citocromo ossidasi (Zottini, 2004) e parzialmente inibisce la respirazione. Le cellule riescono a mantenersi vitali in quanto, a differenza degli animali, è presente l'ossidasi alternativa che permette un certo livello di respirazione. Questo enzima infatti è insensibile all'inibizione da parte dell'NO e anzi risulta indotto da questo trattamento (Zottini *et al.*, 2002). L'aumento dell'attività dell'ossidasi alternativa osservata in piante, in seguito ad attacco da patogeno, è quindi possibilmente dovuto all'aumentata produzione endogena di NO. Negli animali l'NO provoca l'apertura del poro di transizione (PTP: *permeability transition pore*) causando un rilascio di citocromo *c*. Le colture cellulari di *Citrus* trattate con NO vanno incontro a PCD, ma questa è prevenuta dal co-trattamento con ciclosporina A, un inibitore della formazione del PTP (Amirsadeghi *et al.*, 2007). Il rilascio di citocromo *c*, in seguito a esposizione di NO, è stato osservato anche in colture cellulari di carota (Zottini *et al.*, 2002).

Appare chiaro quindi che la funzionalità mitocondriale rappresenta un fattore importante nella PCD indotta da NO.

1.4 Interazione tra SA, ROS e NO

Recentemente sono emerse molteplici evidenze che vedono SA, ROS e NO interagire fra di loro per amplificare i segnali di difesa della pianta.

Usando analisi fisio-patologiche e biochimiche, e vari sistemi sperimentali quali le colture cellulari o piante, si sta tentando di definire le risposte che la pianta attua in risposta ad un attacco di un patogeno.

I ROS da soli però non sono in grado di indurre HR e di conseguenza di attivare la morte della cellula, ma hanno bisogno di altri componenti e questi sembrano essere SA e NO. L'SA è stato a lungo associato con dei meccanismi di difesa della pianta: un'applicazione esogena di SA è sufficiente a indurre l'attivazione dei geni di difesa e della SAR. NO collabora con i ROS per indurre le cellule alla morte nella risposta immunitaria nei mammiferi. Recenti studi hanno dimostrato il ruolo dell'NO assieme a SA e ROS nell'indurre HR e geni di difesa nelle piante. NO induce un flusso di calcio attraverso l'attivazione di adenosina difosfato ribosio ciclico (cADPR) (Durner *et al.*, 1998; Klessig *et al.*, 2000); inoltre NO può reagire con il perossido di idrogeno o l'anione superossido per indurre PCD e resistenza alle malattie (Neill *et al.*, 2002). Molti lavori hanno dimostrato che i ROS interagiscono con l'NO stesso per dare morte cellulare; a sua volta un'aggiunta esogena di perossido di idrogeno può provocare la sintesi e l'accumulo di NO nel sito di trattamento (Zhao *et al.*, 2007). Alcuni geni per essere indotti hanno bisogno di un'azione sinergica tra NO ed ROS, come *AOX*, *GST*, ed enzimi del metabolismo del JA. Altri geni invece vengono espressi solo da NO o da H₂O₂, come nel caso dei flavonoidi che sono indotti da NO ma non da H₂O₂ (Zago *et al.*, 2006; Amirsadeghi *et al.*, 2007).

In colture cellulari di soia, un'aggiunta esogena di SA in combinazione o meno con la cantaridina (una proteina che inibisce l'azione delle fosfatasi), è sufficiente per indurre la generazione dei ROS, mimando l'azione di un microrganismo patogeno. Tuttavia tale *burst* ossidativo non è in grado di attivare il processo di morte cellulare (Shirasu *et al.*, 1997; Mc Dowell e Dlang, 2000). Utilizzando piante di tabacco esposte a NO esogeno, si ha la modulazione dell'espressione dei geni *PR* e l'induzione di questi geni dipende da un accumulo di SA. Le ROIs e NO stimolano la biosintesi di SA ed SA a sua volta potenzia la risposta dipendente da NO e ROS. Durante l'attacco di patogeni si instaura un feedback positivo nel sistema SA-ROS-NO, con la produzione ed accumulo di SA, che rapidamente amplifica il segnale iniziale, portando alla morte la cellula e l'istaurarsi di altri meccanismi di difesa come la SAR (McDowel e Dang, 2000).

Nei mammiferi esiste una ricca letteratura sul ruolo dell'NO e dei ROS nelle risposte di difesa. Lo scenario più ovvio è quello che i ROS e l'NO interagiscono per formare radicali citotossici (radicale perossinitrito) che uccidono la cellula ed

il patogeno che l'ha infettata (Zhao *et al.*, 2007). Alternativamente ROS ed NO possono fungere da secondi messaggeri per mediare variazioni nello stato red-ox della cellula. Per esempio un omologo della ciclossigenasi delle piante, un fattore inducibile da SA, è anche un secondo target di NO nelle cellule di mammifero che catalizza la produzione di segnali lipidici (Song e Goodman, 2001). La guanilato ciclastasi è un secondo target di NO, e numerosi studi hanno messo in evidenza che il GMP ciclico è un fattore intermedio nell'induzione dei geni della difesa. Recenti studi hanno dimostrato che l'SA può inibire l'azione della NOS nei mammiferi, suggerendo un suo ruolo come fattore auto-limitante nella propagazione della HR. Similmente H₂O₂ induce l'espressione di enzimi antiossidativi in cellule adiacenti al sito di infezione (Zago *et al.*, 2006).

L'NO nelle piante ha un duplice ruolo: può proteggere le cellule dai possibili danni ossidativi, e assieme a SA e ROS può innescare il processo che porterà alla morte cellulare.

1.5 Le Leguminose

Il grande interesse che l'uomo ha sempre mostrato per le Leguminose deriva dall'alto potere nutritivo di queste piante. Le Leguminose sono seconde solo ai cereali per quanto riguarda l'importanza e l'impiego in agricoltura. Le Leguminose provvedono per circa un terzo al fabbisogno di azoto e proteine della dieta e un terzo degli oli vegetali consumati dall'uomo (Graham e Vance, 2003). È noto che i semi dei legumi contengono dal 20% al 40% di proteine. In molte zone, i legumi con il loro apporto proteico integrano nella dieta i cereali e i tuberi, fonti di carboidrati. I legumi sono inoltre importanti specie foraggere sia nelle zone temperate che tropicali.

Le Leguminose forniscono inoltre i minerali essenziali richiesti nella dieta umana, producono metaboliti secondari che difendono le piante dall'attacco dei patogeni e favoriscono la salute umana proteggendo contro il cancro e abbassando la colesterolemia e la glicemia (Gepts *et al.*, 2005); pertanto trovano applicazioni in campo industriale e farmaceutico.

Le Leguminose sono un eccellente modello per lo studio molecolare dei meccanismi di interazione tra gli organismi di regni diversi. Interazioni

simbiotiche con un gruppo di batteri azoto-fissatori, i Rizhobia (*Rhizobium*, *Bradhyrhizobium*, *Azorhizobium*) hanno un ruolo fondamentale all'interno della catena trofica per la loro capacità di fissare l'azoto atmosferico (Somers *et al.*, 2003). Grandi passi avanti sono stati compiuti nel chiarire le basi molecolari di queste relazioni simbiotiche, soprattutto nelle due specie modello *Medicago truncatula* e *Lotus japonicus* (Oldroyd *et al.*, 2005, Cook *et al.*, 1997; Stougaard, 2001) (Fig. 5 e Fig. 6).



Fig. 5: *Medicago truncatula*.



Fig. 6: *Lotus japonicus*.

Medicago truncatula e *Lotus japonicus* sono state scelte come specie modello nell'ambito delle Leguminose poiché hanno un genoma diploide e relativamente piccolo (circa 500bp; $2n=12$ per *Lotus* e $2n=16$ per *Medicago*), una notevole produzione di semi (circa 20 per baccello), sono autogame e il periodo di generazione da seme a seme è di circa 2-3 mesi. *Lotus* a differenza di *Medicago* si può propagare in vitro tramite apici vegetativi (Cook, 1999; Handberg e Stougaard, 1992).

È possibile trasformare *Medicago truncatula* e *Lotus japonicus* tramite *Agrobacterium tumefaciens* e ottenere piante transgeniche fertili (Trieu e Harrison, 1996; Hoffmann *et al.*, 1997; Aoki *et al.*, 2002). Il genoma di *Medicago truncatula* è in via di sequenziamento ed i dati preliminari sono disponibili in genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov); il genoma di *Lotus japonicus* è ancora in fase di sequenziamento, e si prevede entro tempi brevi la pubblicazione nei database. I recenti progressi nella genomica comparata confermano che le scoperte relative ai genomi di questi due organismi modelli possono essere estesi ad altri legumi, tra cui la maggior parte dei membri di largo uso in agricoltura (Young *et al.*, 2005).

1.5.1 La simbiosi

Circa l'80-90% dell'azoto organico è originato tramite la fissazione biologica dell'azoto. Alcune piante, in particolare le Leguminose, riescono ad effettuare simbiosi con diversi microrganismi per avere scambi benefici. Le simbiosi più importanti avvengono con i batteri del suolo formando noduli nelle radici o con funghi dando luogo alla formazione delle micorizze (Fig. 7 e Fig. 8).

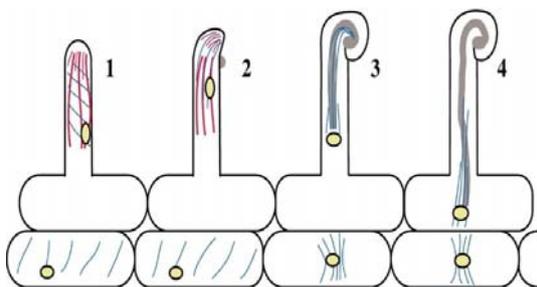


Fig. 7: Eventi iniziali nel processo di nodulazione.

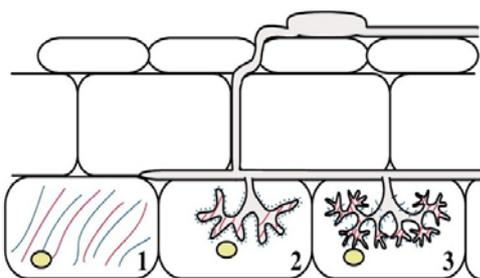


Fig. 8: Processo di micorrizzazione.

Una componente essenziale di qualsiasi simbiosi è un mutuo riconoscimento tra pianta e microrganismo. I composti rilasciati dalla pianta ospite inducono l'espressione di geni batterici, che modificano a loro volta il metabolismo della pianta.

I geni responsabili per la formazione iniziale dei noduli sono definiti geni *NOD*; alcuni sono comuni in tutte le specie (*NodABC*), mentre altri sono specifici per una singola specie. L'espressione di questi geni dipende da un segnale chimico della pianta (flavonoidi) e da un fattore di trascrizione endogeno, il *Nod D* (Buchanan *et al.*, 2000). Nel nodulo radicale, la pianta genera acidi organici che nutrono il batterio e lo riforniscono di scheletri carboniosi per il trasporto di composti azotati usati per trasferire l'azoto fissato (ridotto) al resto della pianta.

Le basi cellulari di riconoscimento da parte della pianta e le prime risposte delle cellule rizobiche dipendono da uno o più recettori responsabili della risposta tessuto specifica ai fattori Nod. Tramite lo studio di mutanti della nodulazione si sono identificati alcuni dei fattori coinvolti nella percezione e risposta ai fattori Nod. I fattori Nod possono essere percepiti a livello di recettori specifici, che possono presentare diverse localizzazioni. Ci sono recettori a livello delle cellule dell'epidermide radicale, altri si trovano a livello dei plastidi mentre altri hanno una localizzazione nucleare (Imaizumi-Anraku *et al.*, 2005; Stacey *et al.*, 2006; Riely *et al.*, 2007).

Anche le micorrizze giocano un ruolo molto importante sia per la fisiologia della pianta sia per l'ecologia dell'ambiente. La formazione delle micorrizze favorisce l'assorbimento di sali minerali in particolare di fosfato, utili alla crescita della pianta e conferisce una maggiore resistenza verso i patogeni. In cambio la pianta offre al fungo acidi organici fondamentali per la sua sopravvivenza.

Le radici modificate formate dalla simbiosi tra funghi e piante si presentano in due forme: ectomicorizze ed endomicorizze. Nelle endomicorizze le ife si estendono all'interno della radice digerendo piccole porzioni delle pareti cellulari della radice. Un'ifa non attraversa effettivamente la membrana citoplasmatica penetrando nel citoplasma della cellula ospite; al contrario, essa cresce in una struttura tubiforme prodotta dall'invaginazione della membrana della cellula radicale. Una volta penetrate in questo modo, alcune delle ife fungine si ramificano estesamente formando fitte strutture intrecciate dette arbuscoli (Buchanan *et al.*, 2000).

Grazie alla scoperta di mutanti della micorrizzazione si è potuto capire che questo processo avviene per stadi distinti. Nell'interazione della pianta con il fungo, esistono diversi punti dove la pianta può regolare l'interazione simbiotica: ci può essere un blocco a livello dell'epidermide, dove il fungo forma l'appressorio ma non riesce a penetrare all'interno. Un secondo blocco si ha a livello delle cellule interne dell'epidermide, dove le ife sono penetrate ma non riescono a raggiungere la corteccia radicale. Ed infine un terzo blocco nella corteccia radicale, dove non si ha la formazione degli arbuscoli da parte del fungo (Novero *et al.*, 2002).

Esistono poi mutanti sia nel processo di nodulazione che in quello della micorrizzazione; alcuni tuttavia sono ancora in grado di attuare simbiosi anche se

in numero limitato, altri possono manifestare fenotipi più severi (Kristen *et al.*, 2005). Tra questi ultimi è stato isolato un mutante molto particolare, denominato *LjSym 4-2* (EMS1749) (Bonfante *et al.*, 2000). Questo mutante è stato ottenuto trattando i semi della pianta wt con un mutageno (EMS: etil-metano sulfonato). La mutazione presenta alterazioni nei processi di simbiosi (Sym: *symbiosis*); infatti non è in grado di instaurare nessun tipo di relazione con i microrganismi benefici, per questo viene definita Nod^- e Mic^- . In presenza di funghi, le cellule dell'epidermide radicale vanno incontro a morte cellulare con le caratteristiche della PCD; in presenza del Rizobio benché si abbia il riconoscimento del fattore Nod, non si assiste al ripiegamento del pelo radicale (*hair curling*). Studi genetici suggeriscono quindi che il gene *LjSym 4-2* sia di fondamentale importanza per l'instaurarsi delle simbiosi e che abbia un ruolo chiave nelle cellule dell'epidermide radicale (Bonfante *et al.*, 2000). I lavori su questo mutante sono ancora pochi, si ipotizza che il gene mutato di *LjSym 4-2* sia un canale ionico, probabilmente del calcio; anche la sua localizzazione sub-cellulare è ancora incerta. Inizialmente si riteneva che la sua localizzazione fosse a livello della membrana plastidiale, (Imaizumi-Anraku *et al.*, 2005), ma studi successivi hanno messo in discussione questo risultato, dal momento che si è identificato l'omologo di questa proteina in *Medicago truncatula*, e che quest'ultima presenta una localizzazione a livello dell'*envelope* nucleare (Peiter *et al.*, 2007; Riely *et al.*, 2007). Attualmente sono in corso studi per completare e confermare i dati, fino ad ora riportati sul mutante *LjSym 4-2*.

1.5.2 Ruolo dell'SA nell'interazione pianta-microrganismo nella simbiosi

Recentemente è emerso il ruolo dell'SA nei meccanismi di regolazione nelle interazioni con i microsimbionti (batteri e funghi). Un lavoro recente ha dimostrato come i livelli endogeni di SA regolino le interazioni legume-rizobio. Alti livelli di SA possono inibire sia la crescita degli endosimbionti che la formazione dei noduli. Trasformando *Medicago truncatula* e *Lotus japonicus* con *NahG*, un gene di origine batterica, in grado di catalizzare la conversione dell'SA libero nella sua forma inattiva il catecolo, si è visto che il livello endogeno di SA

diminuiva e conseguentemente si è notato un aumento del numero di noduli radicali (Stacey *et al.*, 2006).

L'SA è in grado di inibire alcuni tipi di noduli, in particolare quelli definiti "indeterminati". Questo può dipendere dal fatto che i fattori Nod prodotti dal batterio sono formati da acidi grassi polisaturi,

e che questi riconoscono due tipi di recettori: uno "aspecifico" coinvolto nel ripiegamento del pelo radicale ed uno "specifico", coinvolto nella divisione delle cellule della corteccia radicale (van Spronsen *et al.*, 2003). L'SA sembrerebbe agire al livello del recettore "specifico", inibendo l'azione di una molecola, la oxilipina, derivata dal metabolismo del metiljasmonato. Alte dosi di SA sono in grado di alterare la via di sintesi del metiljasmonato e di conseguenza anche la oxilipina (van Spronsen *et al.*, 2003).

In piante di *Medicago sativa*, inoculate con un rizobio deficitario nella sintesi di un fattore Nod (Nod C), si osserva un accumulo di SA nelle radici; inoltre si è osservato una riduzione dell'azione degli enzimi antiossidanti ed un accumulo di acqua ossigenata (Martinez-Abarca *et al.*, 1998; Bueno *et al.*, 2001). La presenza di queste molecole (SA ed H₂O₂) può essere spiegata data la somiglianza, almeno nelle fasi iniziali, tra i meccanismi di simbiosi e quelli di patogenesi. Una volta discriminato il simbionte dal patogeno, per continuare il processo di interazione benefica, la pianta innesca meccanismi di detossificazione (Martinez-Abarca *et al.*, 1998). Un'azione svolta dall'SA è quella di promuovere la LAR, accumulandosi in prossimità della zona di infezione. La mancata interazione con i microrganismi simbiotici, documentata in diverse piante, si potrebbe quindi spiegare con la presenza dell'SA nel sito di interazione con i simbiotici (Lian *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2003).

SA media inoltre le interazioni tra le piante e i funghi endosimbionti (AM). Infatti l'applicazione esogena di SA, prima dell'inoculo con il fungo, provoca una drastica diminuzione del numero di arbuscoli rispetto al controllo. Un transiente accumulo di SA si è notato durante le primissime fasi della colonizzazione fungina delle radici come reminiscenza di un attacco patogeno; salvo poi osservare una riduzione dei livelli di SA con il procedere della simbiosi. Recentemente si è scoperto che alti livelli di SA sono responsabili della mancata micorrizzazione (Myc⁻) in piante iper-micorrizanti di pisello. E' interessante

notare che se l'applicazione di SA esogeno avviene nelle prime fasi del riconoscimento pianta-fungo, si ha una drastica diminuzione degli arbuscoli, ma se si aggiunge SA quando l'appressorio è già formato, i passaggi successivi non vengono influenzati. Si pensa quindi che l'SA possa avere un effetto diretto sull'interazione fungo-pianta (Medina *et al.*, 2003).

1.6 Utilizzo di colture cellulari per lo studio della PCD

Lo studio delle varie forme di PCD in organismi completi presenta delle difficoltà poiché spesso tale processo si verifica in gruppi ristretti di cellule, circondate da una maggioranza di cellule sane. Anche se un intero organo va incontro a PCD, normalmente varie zone si presentano in stadi differenti di tale processo. E' questo il caso della senescenza fogliare, dove l'ingiallimento e la morte cominciano dai margini e si concludono nelle venature molti giorni dopo l'inizio del processo stesso. Inoltre è possibile che cellule presenti nello stesso tessuto vadano incontro a PCD secondo meccanismi diversi: in una lamina fogliare, in seguito ad infezione con un patogeno incompatibile, le cellule direttamente colpite muoiono rapidamente per HR, mentre quelle circostanti vanno incontro a senescenza, rappresentando una seconda barriera all'infezione (Pontier *et al.*, 1999). Colture cellulari sono state usate per studiare molti processi fisiologicamente importanti ed in molti casi si sono dimostrati utili per studiare gli aspetti del processo di PCD *in vitro*, superando tali problemi di eterogeneità (McCabe e Liver, 2000). Le colture cellulari offrono quindi numerosi vantaggi:

- Uniformità: le cellule si presentano come un tessuto omogeneo;
- Ridotta complessità: generalmente le cellule in coltura sono in uno stato indifferenziato, e questo rappresenta un vantaggio nello studio dei meccanismi di base che regolano la PCD;
- Accessibilità: eventuali trattamenti si distribuiscono omogeneamente tra le cellule in maniera rapida, dando luogo a una risposta comune e riproducibile; è inoltre possibile esaminare singolarmente la risposta delle singole cellule isolandole;
- Crescita rapida: dopo essere subcoltivate le colture cellulari vanno rapidamente incontro a una crescita esponenziale, e alcune linee sono

caratterizzate da 3-4 divisioni per ciclo, permettendo la raccolta di una grande quantità di materiale.

Per il lavoro di questa tesi si sono utilizzate colture cellulari di *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus wt e LjSym 4-2*, derivanti da una porzione di cellule indifferenziate in mezzo solido (callo), precedentemente ottenuta da espianti radicali.

2 Scopo della Tesi

Negli organismi vegetali, i meccanismi molecolari delle varie fasi della PCD non sono ancora conosciuti in dettaglio. Il controllo degli eventi di senescenza sia fogliare che di senescenza di fiori e frutti, può portare ad applicazioni biotecnologiche e commerciali in diversi settori di interesse agrario.

L'obiettivo di questa tesi è quello di identificare e studiare i meccanismi molecolari che regolano la senescenza e la PCD, utilizzando come sistema modello colture cellulari in sospensione di Leguminose: *Medicago truncatula* e *Lotus japonicus*.

Un primo obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di analizzare la senescenza naturale nelle linee cellulari di *Medicago truncatula* e *Lotus japonicus*. In particolare nella linea cellulare di *Medicago truncatula* si è analizzato il ruolo dei mitocondri nelle diverse fasi del ciclo cellulare, focalizzando l'attenzione sulle alterazioni della morfologia e dinamica mitocondriale.

Successivamente nella linea cellulare di *Medicago truncatula* si sono studiati gli effetti dei trattamenti ormonali capaci di influenzare la senescenza nelle colture cellulari, nella speranza di chiarire ulteriormente la complessa rete regolativa che queste sostanze giocano in tale processo.

In *Lotus japonicus* si è isolato di un particolare mutante, alterato nella PCD. Questo mutante denominato *LjSym 4-2*, non riconosce gli elicitori rilasciati dai micro-organismi simbionti, ed in particolare dopo interazione fungina le cellule dell'epidermide radicale vanno incontro a PCD. L'analisi di questo mutante suggerisce che *LjSym 4-2* rappresenta un sistema sperimentale interessante per lo studio dei meccanismi e delle molecole segnale coinvolte nel processo di PCD.

In questa linea si sono cercati di analizzare i *pathways* coinvolti nel processo di PCD indotta da SA, quali la produzione di H₂O₂ ed l'NO.

3 Materiali e metodi

3.1 Colture cellulari

Le linee cellulari utilizzate negli esperimenti sono:

Medicago truncatula Gaertner ecotipo Jemalong derivata da espunti radicali, è stata cresciuta in terreno di coltura MSR4: Murashige & Skoog (MS, Duchefa), con alcune modifiche (2,70mM KH_2PO_4 , 40 μM acido nicotinic, 33 μM Tiamina, 60 μM Piridossina), con aggiunta di saccarosio 3%, 0.5mg/l di estratto di malto, 4.5 μM di 2,4D (acido 2,4-diclorofenossiacetico, Fluka), 17.75 μM di BAP (N⁶-benzilamminopurina, Sigma).

Lotus japonicus (Regel) K. Larsen ecotipo Gifu: linea ottenuta da espunti radicali è stata cresciuta in terreno di coltura B52: Gamborg B5 medium (Duchefa), con aggiunta di saccarosio 2%, 9.2 μM 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D).

Le sospensioni cellulari sono state coltivate in beute da 250 ml con 50 ml di terreno. Ogni 10 giorni le cellule venivano trasferite in terreno fresco in condizioni di bassa densità. Le beute sono state incubate in una camera termostata alla temperatura di 25 °C, con fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio su un agitatore orbitale ad 80 rpm.

Il pH dei mezzi è stato portato al valore di 5.5 ± 0.1 con NaOH 1M prima di autoclavarli a 121 °C per 15 minuti.

I regolatori di crescita (2,4-D, BAP) sono stati sterilizzati per filtrazione e aggiunti alla coltura cellulare quando richiesto.

3.2 Trattamenti

In *Medicago truncatula*, per valutare gli effetti del trattamento con le citochinine, cellule di 4 giorni sono state incubate con DPU, BAP, BAR (tab. I), aggiungendo direttamente nella beuta il composto.

	Composto	Concentrazione finale	Solvente
DPU	Difenilurea	27 μ M	100% DMSO
BAP	6-Benzilaminopurina	27 μ M	0.1M NaOH
BA-R	6-Benzilaminopurina Ribosilata	27 μ M	0.1M NaOH

Tabella I Composti utilizzati nei trattamenti per *Medicago*

In *Lotus japonicus* i trattamenti sono stati somministrati a cellule di 4 giorni, aggiungendo il composto nel mezzo di coltura. Il trattamento con il cPTIO e L-NMMA precedeva di 1 ora il trattamento con SA; il trattamento con catalasi è avvenuto in concomitanza al trattamento con SA (tab.II).

	Composto	Concentrazione finale	Solvente
SA	Salicilato di Sodio	0.5mM/1mM/1.5mM 3mM	acqua
cPTIO	2-(4-Carboxifenil)- 4,4,5,5- tetrametilimidazoline- 1-oxil-3-ossido	400 μ M	acqua
L- NMMA	N ^G -monometil-L- arginina	1mM	acqua
CAT	Catalasi	75U/ml	acqua

Tabella II Composti utilizzati nei trattamenti per *Lotus*

3.3 Misurazione del peso fresco e secco

Per valutare le variazioni in peso fresco e secco delle colture cellulari (andamento della curva di crescita o effetti dei vari trattamenti), la sospensione cellulare è

stata filtrata su carta da filtro, posto su un apparecchio filtrante (Sartorius) collegato ad una pompa a vuoto (Millipore), in modo da eliminare il mezzo liquido ed in seguito pesate. Per ottenere il peso secco, le cellule sono state poste in stufa ad essiccare *overnight* a 50°C.

3.4 Stima della mortalità

Soluzioni utilizzate:

Blu di Evan 0.5% (p/v) in acqua.

Soluzione di eluizione:

50% (v/v) metanolo

1% SDS.

Il blu di Evan (Sigma) è un colorante non permeabile che viene utilizzato comunemente per misurare la percentuale di morte cellulare come descritto da Gaff e Okong'o-ogola (1971).

1 ml di sospensione cellulare è stato raccolto e incubato per 15 min. con 100 µl di blu di Evan. Le cellule sono state lavate 5 volte con 10 ml di acqua distillata per rimuovere l'eccesso di colorante utilizzando colonnine cromatografiche (BioRad) ed infine sono state incubate con 2 ml della soluzione di eluizione a 55°C per 30 min. In questo modo il colorante che è penetrato all'interno delle cellule morte viene solubilizzato perché le cellule vengono fissate dal trattamento con metanolo. La soluzione di eluizione è stata raccolta e diluita 1:5. Di questa soluzione è stata misurata la densità ottica (OD) a 600 nm. Per ogni trattamento, il 100% di morte cellulare è stato ottenuto prelevando una stessa quantità di cellule uccise mediante bollitura (7min. a 100°C). La percentuale di morte cellulare del campione in esame è stata ottenuta dal rapporto: OD delle cellule trattate /OD delle cellule bollite x 100.

3.5 Estrazione del DNA genomico

Soluzioni utilizzate:

Tampone di estrazione:

100mM Tris-HCl pH 8.0

20mM EDTA

1.4mM NaCl

2% CTAB

0.2% β -mercaptoetanolo.

TE:

10mM Tris-HCl pH 8.0

1mM EDTA pH 8.0.

1-2 grammi di cellule sono state pestate in un mortaio in presenza di azoto liquido. La polvere ottenuta è stata raccolta in tubi da 50 ml e incubata con 7.5 ml di tampone di estrazione preriscaldato a 60°C. Il β -mercaptoetanolo è stato aggiunto alla soluzione solo prima dell'estrazione. Per solubilizzare le cellule, i tubi sono stati incubati in un bagno termostato a 60°C per 40 min mescolando per inversione ogni 15 min. Si è aggiunto poi un volume di una soluzione di cloroformio:isoamilalcol (24:1), mescolato e si è centrifugato a 1300xg per 15 min. Il sopranatante è stato trasferito in un tubo da 15 ml, si sono poi aggiunti 0.7 volumi di isopropanolo freddo. La soluzione di estrazione è stata mescolata per inversione e conservata a -20 °C per 30 min., dopodiché centrifugata a 4000xg per 15 min. a 4 °C. Il pellet è stato trasferito in un tubo da 1.5 ml e lavato con etanolo al 70% centrifugando per 5 min. a 13000 rpm. Dopo aver fatto evaporare completamente l'etanolo, il pellet è stato risospeso nel tampone TE. Per facilitare quest'operazione i tubi sono stati incubati a 65 °C per 10 min. Per eliminare l'RNA il campione è stato trattato con 1 μ l di RNAasi A (10 mg/ml, Sigma) prima del caricamento su gel d'agarosio.

La concentrazione del DNA è stata misurata con uno spettrofotometro (GeneQuant *pro*, Amersham Pharmacia Biotech) a capillari.

3.6 Elettroforesi su gel di agarosio

Soluzioni utilizzate:

Tampone di caricamento: ORANGE G (Sigma).

Tampone di corsa TAE:

40 mM Tris-acetato

1 mM EDTA pH 8.

Bromuro d'etidid (10 mg/ml, Sigma)

Questo metodo permette di separare le molecole di DNA in base al peso molecolare. La scelta della concentrazione del gel viene adottata a seconda della lunghezza dei frammenti di DNA da risolvere. Per l'esame del DNA dei campioni ottenuti dagli esperimenti è stato utilizzato un gel all'1.5% di agarosio.

20 µg di DNA sono stati mescolati ad 1 µl di RNAasi A e al tampone ORANGE G in rapporto 5:1. Quando il DNA è troppo diluito è necessario concentrarlo precipitandolo in acetato di sodio 0.3 M e 2 volumi di etanolo assoluto a -20 °C per 30 min. Poi si centrifuga a 13000 rpm per 30 min. a 4°C, lavando il pellet con etanolo al 70% e risospingendolo in un volume appropriato di TE. La corsa elettroforetica è stata eseguita a 80 V per 1 ora e mezza.

Come scala di riferimento per i pesi molecolari sono stati utilizzati, in parallelo ai campioni, dei marcatori di peso molecolare (DNA Molecular Weight Markers II, Boehringer; PCR 100 bp Low Ladder, Sigma).

3.7 Estrazione di proteine

Soluzioni utilizzate:

Tampone di estrazione EB:

0.3 M Saccarosio

0.1 M Tris-HCl pH 7.5

1 mM EDTA
5 mM DTT
2 mM PMSF
1 mM Benzaminidina
5 mM Acido α -aminocaproico
5 g/ml Leupeptina
2 μ g/ml Aprotinina
0.7 μ g/ml Pepstatina.

Tampone di caricamento LB 3X:

0.1M Tris-HCl pH 8.8
0.5M Saccarosio
1mg/ml Blu di bromofenolo
5mM EDTA pH 8.
2M β -mercaptoetanololo

Si sono pestati circa 3 grammi di cellule congelate in presenza di azoto liquido in un mortaio. La polvere ottenuta è stata ulteriormente pestata aggiungendo polvere di quarzo e in 12 ml di EB. La sospensione così ottenuta è stata filtrata attraverso 3 strati di garza e raccolta in tubo da 50 ml, centrifugata 1500xg a 4°C per 15 min., per eliminare i detriti cellulari. I sopranatante è stato trasferito in un tubo Nalgene da 30 ml e centrifugato a 10000xg a 4°C per 15 min. Il pellet rappresenta la frazione mitocondriale e il sopranatante contiene il citoplasma e i microsomi. Si raccoglie il sopranatante, che contiene la frazione citoplasmatica, in un tubo da 15 ml. Si risospende il pellet, che contiene la frazione mitocondriale, in 500 μ l di EB. I campioni sono stati conservati a -80°C.

3.7.1 Dosaggio delle proteine

La quantificazione delle proteine presenti nei vari campioni è stata effettuata con il BioRad Assay, un adattamento commerciale del metodo di Bradford. Il colorante è stato diluito al 20% nel campione proteico. Si è incubato per 5 min. e si è letta la densità ottica a 595 nm. Il valore ottenuto è stato interpolato su una

retta di taratura costruita con soluzioni di BSA (frazione 5, Sigma) a concentrazione nota da 5 a 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

3.7.2 Preparazione dei campioni proteici

Sono stati precipitati 30 μg di proteine per la frazione mitocondriale e 40 μg di proteine per la frazione citoplasma con acido tricloroacetico (TCA) al 10%. Si è incubato il campione in ghiaccio per 40 min. e centrifugato a 13000 rpm per 30 min. Dopo aver rimosso il soprannatante, il TCA è stato fatto evaporare completamente. Al campione si è aggiunto il tampone di caricamento (LB 3X) in rapporto 3:1.

Prima del caricamento su gel di poliacrilammide per l'elettroforesi in condizioni denaturanti, il campione è stato bollito per 7 min. a 100°C, trasferito in ghiaccio in modo da evitare la rinaturazione e caricato.

3.8 SDS-PAGE

Stacking gel

Soluzione: 8ml al 4.5%:

H ₂ O	4.7ml
30% Acrilammide	1.3ml
1.5M Tris-HCl pH 6.8	2.0ml
10% SDS	80 μl
100mg/ml APS	80 μl
Temed	8 μl

Tampone di corsa:

25mM Tris
192mM Glicina
0.1% SDS

Resolving gel

Soluzione: 20ml al 15%:

H ₂ O	2.8ml
Acrilammide 30%	9.0ml
1.5M Tris-HCl pH 8.8	5.0ml
10% SDS	200µl
60% Saccarosio	3.0ml
100mg/ml APS	200µL
Temed	8µl

Le separazioni elettroforetiche delle proteine in condizioni denaturanti sono state condotte su gel di poliacrilammide, seguendo il protocollo di Laemmli (Laemmli, 1970). Questa tecnica permette di separare le proteine in base al loro peso molecolare. I gel sono costituiti da due porzioni, superiore e inferiore, che differiscono per la concentrazione di acrilammide e per il pH. La parte superiore, *stacking gel*, è quella che contiene i pozzetti di caricamento dei campioni in cui avviene l'impaccamento delle proteine in un fronte sottile per aumentare la risoluzione della separazione elettroforetica (isotacoforesi). La parte inferiore del gel, *resolving gel*, è quella in cui avviene la separazione vera e propria delle proteine. Come per le separazioni elettroforetiche del DNA, anche in questo caso si corrono parallelamente ai campioni dei marcatori di peso molecolare standard (Kaleidoscope Prestained Standards, Biorad).

La polimerizzazione richiede circa 30 min. Una concentrazione maggiore di acrilammide e quindi un setaccio molecolare a maglie più fitte permettono di risolvere meglio proteine a basso peso molecolare (come è il caso del citocromo *c*).

I gel sono stati montati nella vasca verticale "Mini-Protean" (BioRad). La corsa elettroforetica è effettuata alle seguenti condizioni: nello *stacking gel*: 90 V per circa 20 min., nel *resolving gel*: 110 V per circa 1 ora e mezza.

3.9 Western Blot

Soluzioni utilizzate:

Tampone di trasferimento:

25 mM Tris
192 mM glicina
20% (v/v) metanolo.

PBS:

137 mM NaCl
3 mM KCl
10 mM Na₂HPO₄
2 mM KH₂PO₄.

Soluzione di bloccaggio:

3% (p/v) di latte in polvere scremato (BioRad) sciolto in PBS.

Tampone AP:

100 mM Tris-HCl pH 9.5
100 mM NaCl
5 mM MgCl₂.

Soluzione di sviluppo:

BCIP/NBT (Sigma).

3.9.1 Elettroblotting

Al termine della corsa elettroforetica, si è assemblato il sistema di trasferimento delle proteine costruendo il cosiddetto “sandwich”: dal lato del polo positivo si sono posti, nell’ordine, una spugna ben imbevuta con il tampone di trasferimento, 1 foglietto di carta 3MM, la membrana di nitrocellulosa (Sartorius), il gel (al quale sono stati tagliati i pozzetti), ancora 1 foglietto di carta 3MM e la spugna.

Le bolle d'aria sono state eliminate rullando i vari strati con una pipetta Pasteur per evitare un'alterazione nel trasferimento delle proteine. Il “sandwich” viene così posizionato all'interno di una vaschetta riempita con il tampone di trasferimento e corso per 1 ora a 300 mA.

3.9.2 Colorazione delle membrane con Rosso Ponceau

Questa operazione si effettua alla fine del trasferimento per verificare che il trasferimento stesso sia avvenuto. La membrana di nitrocellulosa è stata incubata con la soluzione colorante Rosso Ponceau (0.1% Poceau S in 5% acido acetico, Sigma) per 5 min., in seguito il colorante in eccesso è stato eliminato con vari lavaggi con acqua deionizzata.

3.9.3 Immunoblotting

L'anticorpo primario utilizzato nel corso degli esperimenti è l'anti-citocromo c (7H8), anticorpo monoclonale sviluppato in topo IgG_{2b}, 200 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology); l'anticorpo secondario è l'anti-IgG_{2b} di topo coniugato con la fosfatasi alcalina, 40 µg/ml (Sigma).

Al termine del trasferimento, la membrana di nitrocellulosa è stata trasferita in una vaschetta e incubata in una soluzione proteica (soluzione di bloccaggio) in modo da bloccare tutti i siti di interazione idrofobica. Questa operazione è stata effettuata a temperatura ambiente per 1 ora, tenendo in leggera agitazione la soluzione. La membrana è stata quindi incubata in una soluzione di PBS + Tween-20 0.05% contenente l'anticorpo primario diluito 1:2000 per 2 ore.

Al termine dell'incubazione con l'anticorpo primario sono stati effettuati i seguenti lavaggi:

- 1) 5 min. in PBS
- 2) 5 min. in PBS + Tween-20 0.05%
- 3) 5 min. in PBS + Tween-20 0.05%
- 4) 5 min. in PBS

Successivamente la membrana è stata incubata con l'anticorpo secondario (diluizione 1:5000 in PBS + Tween-20 0.05%) per 1 ora a temperatura ambiente.

Trascorso questo periodo di tempo la soluzione contenente l'anticorpo secondario è stata rimossa e sono stati effettuati i lavaggi della membrana seguendo il seguente schema:

- 1) 5 min. in PBS
- 2) 5 min. in PBS + Tween-20 0.05%
- 3) 5 min. in PBS + Tween-20 0.05%
- 4) 5 min. in PBS.

3.9.4 Metodo colorimetrico di rilevazione

L'anticorpo secondario è coniugato con l'enzima fosfatasi alcalina che converte il sistema BCIP + NBT in un precipitato di colore blu. Questo metodo cromogenico permette di visualizzare le proteine riconosciute dall'anticorpo primario.

La membrana è stata lasciata nel tampone AP qualche minuto per portare il pH a valori basici, condizione in cui la fosfatasi alcalina funziona meglio. Poi è stata aggiunta la soluzione di sviluppo BCIP + NBT e si incubata finché non appaiono le bande (circa 5-15 min.). La soluzione di sviluppo è stata eliminata e la reazione è stata bloccata lavando la membrana con PBS. Lo sviluppo deve essere effettuato lontano da fonti di luce diretta perché i reagenti NBT e BCIP sono fotosensibili.

3.10 Estrazione dell'RNA

Cellule provenienti da sospensioni in mezzo liquido sono state raccolte, congelate in azoto liquido e conservate a -80°C . Per l'estrazione dell'RNA le cellule sono state polverizzate in mortaio con azoto liquido; la polvere aggiunta in eppendorf da 1.5 ml contenente 1ml di soluzione Trizol (Gibco-BRL, Life Technologies).

Dopo agitazione il campione è stato centrifugato 5 min. a 14000 rpm in centrifuga da banco a temperatura ambiente. Il surnatante è stato trasferito in nuovi tubi a cui successivamente si è aggiunto 200 μl di cloroformio. L'emulsione è stata miscelata per agitazione e dopo 10 min. centrifugata 5 min. a 14000 rpm. L'RNA è stato precipitato con 0.7 volumi di isopropanolo a -20°C per 2-4 ore. Dopo

centrifugazione per 10 min. a 14000 rpm, il pellet è stato lavato prima con etanolo 70%, poi con sodio acetato 3M pH 5.2 e infine due volte con etanolo 70%. Dopo evaporazione dell'etanolo, l'RNA è stato risospeso in un appropriato volume di H₂O a 65°C per 5 min. L'RNA viene poi conservato a -80°C.

La concentrazione dell'RNA è stata misurata spettrofotometricamente; 20 µg di RNA sono stati incubati con 4 µl di DNAsi (2 U/µl, Ambion), 10 µl di buffer 10X in un volume finale di 100 µl a 37°C per 1h 30 min. La DNAsi è stata quindi inattivata incubando i campioni a 65°C per 15 min. L'RNA è stato precipitato con 0.1 volume di sodio acetato 3 M pH 5.2 e 2.5 volumi di etanolo (70%) a -20°C per 15 min. Dopo centrifugazione per 5 min. a 14000 rpm, il pellet è stato asciugato e risospeso in 20 µl di H₂O.

3.11 RT-PCR

3.11.1 Sintesi della prima elica

L' RNA totale isolato da ogni trattamento è stato usato come stampo per la sintesi della prima elica di DNA tramite trascrittasi inversa (PowerScript, Clontech Laboratories).

2 µl di random "decamers" (50 µM, Ambion) sono stati aggiunti a 2.5 µg di RNA, ed il volume finale portato a 12 µl. La miscela è stata riscaldata a 70°C per 3 min. e quindi messa in ghiaccio immediatamente per 2 min. in modo da separare le eliche e facilitare l'ibridizzazione con i primers. Quindi sono stati aggiunti 5 µl di buffer 5X, 1 µl di mix di dNTPs (10 mM), 2 µl DTT (100 mM), 1 µl di enzima. Dopo incubazione a 42°C per 1h e 30min l'enzima è stato inattivato con trattamento a 65°C per 15 min. Il cDNA è stato quindi conservato a -20°C.

3.11.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Il numero di cicli di amplificazione è stato scelto in modo da ricadere a metà del range lineare dell'intensità della colorazione ottenuta con etidio bromuro della banda corrispondente a *PRI* e *MtSAG*, nel campione in cui tale gene è

maggiormente espresso. In tal modo l'apprezzamento della variazione tra i vari campioni è massimo.

Il rapporto primers/competimers del *18S* è stato scelto in modo da mantenere l'intensità della banda del *18S* simile a quella dei geni di interesse. Il *18S* è stato scelto come *housekeeping* per normalizzare la quantità di trascritto tra i campioni, perché solitamente è un gene espresso in maniera costante. Poiché il trascritto del *18S* è molto abbondante, la sua quantità è stata virtualmente limitata utilizzando i competimeri, primers modificati che non permettono l'amplificazione competendo con i normali primers. In tal modo la quantità di template di *18S*, disponibile per l'amplificazione, è paragonabile a quella del trascritto dei geni e le loro bande appariranno di intensità paragonabile ad un dato numero di cicli di PCR (Quantum RNA Universal 18S Internal Standards kit, Ambion).

Primers *PRI*:

forward: TGTGGGGTGACACTAGGAAAGTTGG

reverse: GCTACCCTCCCATGACATTATTGAGTGA

Primers *MtSAG*:

forward: GAAGGCTGCAATGGTGGTCTCA

reverse: CGGCCTCAATAGCAACGCTCAC

A 1 μ l di cDNA è stato aggiunto 2 μ l di ogni primer (10 μ M), 4 μ l mix primer/competimer *18S* per i geni di interesse (5 μ M), 5 μ l buffer 10X, 1 μ l dNTPs (10mM), 0.4 μ l Taq (5 U/ μ l, Taq DNA Polymerase, Eppendorf) e portati a volume finale di 50 μ l con H₂O.

Condizione PCR (*PRI*):

94°C 20 secondi	} 22 cicli
68°C 30 secondi	
72°C 1 minuto	

Condizioni PCR (*MtSAG*) :

95°C 30 secondi
94°C 20 secondi } 26 cicli
65°C 30 secondi }
72°C 1 minuto }

La macchina da PCR utilizzata è stata una Hybaid PCR Express Thermal Cycler. I prodotti da PCR sono stati sottoposti a elettroforesi in gel d'agarosio all'1.5% in TAE 1X. I prodotti dell'RT-PCR sono stati recuperati dal gel usando il kit GeneClean III (Bio101), clonati nel plasmide pCR2.1-TOPO (Invitrogen) e sequenziati per confermare l'identità dei prodotti di amplificazione. L'analisi delle intensità delle bande è stata effettuata tramite il programma Image J (NHI, USA).

3.12 Analisi bioinformatiche

La ricerca di geni coinvolti nel processo di senescenza/PCD è stata condotta utilizzando l'algoritmo BlastN (Altschul, 1991; Altschul, et al., 1994) contro il database di EST di *Medicago* e di *Lotus* del TIGR (www.tigr.org), e nel sito di Toulouse (<http://medicago.toulouse.inra.fr/Mt/EST>).

Per la ricerca di geni coinvolti in senescenza o PCD in *Arabidopsis thaliana* è stata utilizzata la banca dati dell'NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Per la ricerca di domini aminoacidici specifici di determinate famiglie di proteine (detti anche *signatures*) o regioni di similarità locale con domini noti è stato utilizzato il programma SMART (*Simple Modular Research Tool*, <http://smart.embl-heidelberg.de>).

3.13 Analisi della morfologia dei nuclei colorati con DAPI

Soluzione utilizzata:

Tampone HEM:

100mM HEPES pH 6.9

10mM EGTA

10mM MgSO₄

Il DAPI (4'-6 Diamidino-2 fenilidolo cloridrato, Alexis Chemical) è un colorante fluorescente che viene impiegato per la colorazione del DNA e quindi dei nuclei, sia in cellule vive che fissate.

Si sono preparate le cellule per l'analisi al microscopio seguendo il protocollo descritto da Traas con piccole variazioni (Traas *et al.*, 1992).

Le cellule sono state fissate aggiungendo 0.5 ml di una soluzione contenente paraformaldeide 4% (v/v), diluita nel tampone HEM a 0.5 ml di sospensione cellulare. Dopo incubazione per 15 min., le cellule sono state lavate per 3 volte con il tampone HEM ed infine si sono risospese in HEM contenente 0.2% (p/v) Triton X-100 (Sigma) e 1 µg/ml del colorante per DNA. Le cellule sono state montate su vetrini precedentemente fissati con poli-L-Lisina (Sigma) e osservate al microscopio a fluorescenza (LEICA DMR) con un filtro di eccitazione di 330-380 nm e filtro barriera di 400nm.

Per ogni esperimento sono stati contati circa 200 nuclei.

3.14 Analisi della morfologia dei mitocondri colorati con TMRM

Per visualizzare la morfologia e dinamica dei mitocondri si è usato come colorante il TMRM (*tetramethylrhodamine methyl and ethyl esters*, Molecular Probes), un colorante lipofilico sensibile al potenziale di membrana mitocondriale.

Si sono preparate le cellule per l'analisi secondo il protocollo descritto da Zottini (Zottini *et al.*, 2002).

A 300 μ l di sospensione cellulare si sono aggiunti 700 μ l di terreno (MSR4) contenente 1 μ M di TMRM, incubando le cellule per 15 min. su un agitatore orbitale alla temperatura di 25°C.

Trascorso il tempo utile, le cellule sono state centrifugate per 3 min. a 13000 rpm, eliminando poi il surnatante e lavando il pellet con 700 μ l di terreno per 5 minuti in agitazione. Successivamente i campioni sono stati centrifugati ed il pellet è stato risospeso in 500 μ l di mezzo fresco.

Si sono prelevati 100 μ l di sospensione cellulare e depositi su un vetrino, coperti con un vetrino coprioggetti ed i campioni si sono osservati al *laser scanning confocal microscopy* (Nikon PCM2000), con luce di eccitazione di 548 nm e luce di emissione di 573 nm.

Gli esperimenti di controllo sono stati effettuati in presenza del disaccoppiante carbonyl cyanide *p*-(trifluorometoxy) phenylhydrazone (FCCP).

Le immagini acquisite al microscopio confocale sono state processate utilizzando il software Corel-Photo Paint (Corel Corporation). La stima delle dimensioni mitocondriali è stata effettuata grazie al software ImageNT-Microimage (Casting imaging).

3.15 Analisi del citoscheletro

Soluzioni utilizzate:

Tampone PEM:

500mM Pipes pH 6.9

1mM EGTA

0.5mM MgCl₂.

PBS:

137 mM NaCl

3 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄.

Preparazione dei vetrini:

Si sono lavati i vetrini con etanolo al 70% in modo da eliminare qualsiasi traccia di grasso residuo, poi sono stati trattati per 2h in polilisina 0.1% (p/v, Sigma). Trascorso questo tempo si è effettuato un lavaggio per circa 10' con acqua distillata, lasciando asciugare in stufa per almeno 2h oppure o/n a 60°C.

Fissazione:

Si è preparata la Paraformaldeide al 3% (v/v) diluendola con il tampone PEM e si è controllato il pH che deve essere compreso tra 6.5-7. Sono state poi prelevate una quantità desiderata di cellule che sono state deposte all'interno di microprovette, quindi si è fissato il contenuto per 1h a temperatura ambiente (RT). In questo passaggio le microprovette possono essere inclinate in modo da fissare meglio il materiale. Si eseguono poi tre lavaggi in PEM per 15 min.

Preparazione del materiale:

Si prelevano i vetrini dalla stufa e si depositano circa 50-100µl di cellule, con carta 3MM si aspira il liquido in eccesso. Con un coprioggetto le cellule sono state delicatamente schiacciate, eliminando poi il liquido in eccesso. E' stato effettuato un lavaggio con PBS 1X+BSA 1% per 10 min. ponendo 1-2 gocce su ogni vetrino.

Incubazione con Ac primario:

Come anticorpo è stato usato il monoclonal Anti β -tubuline mouse (Sigma) diluito 1:200 in PBS 1X+BSA 1%. Il trattamento è stato fatto o/n a 4°C; i vetrini sono stati posti rigorosamente al buio.

Trascorso il tempo di incubazione si sono effettuati tre lavaggi di 15 min. in PBS 1X+BSA 1%.

Incubazione con Ac secondario:

Si è usato come anticorpo Anti Mouse IgG (whole molecole) FITC coniugate (Sigma) diluito 1:50 con PBS 1X+BSA 1%, per 2h a RT. Trascorso questo tempo sono stati effettuati due lavaggi in PBS 1X ed uno in Eq. Buffer (Molecular Probes) per 10 min. ognuno.

Montaggio:

I vetrini sono stati fissati poi con Citifluor o Slow Fade (Molecular Probes) per eliminare l'eventuale eccesso di fluorescenza. I vetrini possono essere conservati a 4°C per circa una settimana.

Le cellule sono state analizzate al *laser scanning confocal microscopy* (Nikon PCM2000), con luce di eccitazione di 488 nm e luce di emissione di 510-540 nm. Le immagini sono state processate usando il software Corel Photo-Paint (Corel Corporation).

3.16 Analisi della produzione di ossido nitrico (NO)

L'ossido nitrico (NO), rilasciato dalle cellule nel mezzo di coltura, è stato quantificato tramite legame della molecola 4,5-diaminofluoreceina (DAF-2, Alexis Biochemicals) in un saggio fluorimetrico (Nakatsubo *et al.*, 1998). La reazione con l'NO in presenza di O₂ porta alla formazione di un anello aromatico, il triazolo, che rende il composto altamente fluorescente. Il DAF-2 presenta un'elevata specificità per l'NO in quanto non reagisce con NO₂⁻ o con NO₃⁻ né con i ROS. Ha un limite di rilevazione pari a 5nM e la stechiometria proposta è 1DAF-2: 2NO.

Le misure di fluorescenza sono state effettuate con Perkin-Elmer LS-55 Luminescence Spectrometer con un'emissione di 495 nm e un'eccitazione di 515 nm, con un'ampiezza di slit di 3 nm.

E' stato seguito il protocollo di Tun, con delle piccole variazioni (Tun *et al.*, 2001). In ogni misura sono state utilizzate 25.5 mg di cellule, trasferite in 2 ml di mezzo tamponato costituito da 50 µl di buffer sodio fosfato 0.5 M (pH 7.2), 1 ml di H₂O, 2.5 µM DAF-2 e portato a volume finale con mezzo B52. Dopo 15 min. di incubazione a 25°C su un agitatore orbitale, la sospensione cellulare è stata trasferita in una cuvetta di quarzo da 10 mm ed è stata misurata l'emissione fluorescente a 24°C. Tutte le reazioni sono state condotte almeno in duplicato e la loro riproducibilità è stata controllata. Ogni esperimento è stato ripetuto 3 volte. La fluorescenza relativa è espressa come il rapporto verso i valori del controllo ottenuti da cellule non trattate.

3.17 Determinazione della concentrazione di H₂O₂ extracellulare.

Soluzione utilizzata:

Soluzione 2X:

200 mM sorbitolo,

500 μM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$,

200 μM arancio xilenolo (Xylenolorange, Riedel-de-Haën),

50 mM H_2SO_4 .

La concentrazione di H_2O_2 si determina utilizzando il saggio dell'arancio xilenolo descritto da Jiang (Jiang *et al.*, 1990). Aggiungendo H_2O_2 alla Soluzione stock 2X composta da solfato ferroso in soluzione diluita di acido solforico, lo ione ferroso (Fe^{2+}) si ossida a ione ferrico (Fe^{3+}) che forma un complesso con l'arancio xilenolo il cui picco di assorbimento massimo è a 560 nm.

Sono stati prelevati 1ml di sospensione cellulare, successivamente il campione è stato centrifugato a 13000 rpm per 3 min e sono stati prelevati 500 μl di sopranatante al quale si aggiungono 500 μl di Sol 2X. Trascorsi 45 min. di incubazione, è stata effettuata la lettura dell'assorbanza dei campioni a 560nm. Attraverso la costruzione di una retta di taratura è stato possibile convertire i valori di assorbanza in concentrazione. Infine i valori ottenuti sono stati normalizzati rispetto al peso fresco dei campioni analizzati.

4 Risultati e discussione

4.1 Analisi di eventi di PCD in colture cellulari di *Medicago truncatula*

4.1.1 Caratterizzazione della senescenza naturale/PCD in *Medicago truncatula*

Le colture cellulari *in vitro* proliferano in mezzi sintetici ed in presenza di opportune concentrazioni di ormoni. Gli esperimenti svolti sono stati condotti su *Medicago truncatula* Gaertn., una leguminosa modello per gli studi di biologia vegetale. Come sistema sperimentale è stata utilizzata una linea cellulare ottenuta da espianti di radici di Jemalong (linea “JR”).

La curva di crescita della linea cellulare è stata definita misurando le variazioni di peso secco delle cellule nel tempo (Fig. 9a). E' caratterizzata da una fase iniziale di adattamento (0-4 giorni), seguita da una fase di rapida crescita “esponenziale” (4-10 giorni) Se alla fine di questo periodo di crescita (di circa 10 giorni) non si procede ad una subcoltura in terreno fresco, inizia un processo di senescenza cellulare. Infatti si osserva un periodo di declino della crescita tra 10 e 14 giorni, cui segue una più rapida diminuzione tra 14 e 21 giorni. In parallelo all'andamento della biomassa è stato valutato il percento di morte presente nella popolazione cellulare nelle varie fasi del ciclo subcoltura. Inizialmente la percentuale di morte è di circa del 20%; tale valore rimane costante fino all'inizio della fase di declino della fase esponenziale di crescita. Quando il tasso di divisione cellulare diminuisce, inizia il processo di senescenza della cultura cellulare e, in corrispondenza alla diminuzione del peso secco, aumenta la percentuale di morte cellulare. Tra il 10° e 17° giorno si verifica un incremento significativo della percentuale di morte cellulare fino a valori attorno al 50-60% (Fig. 9b).

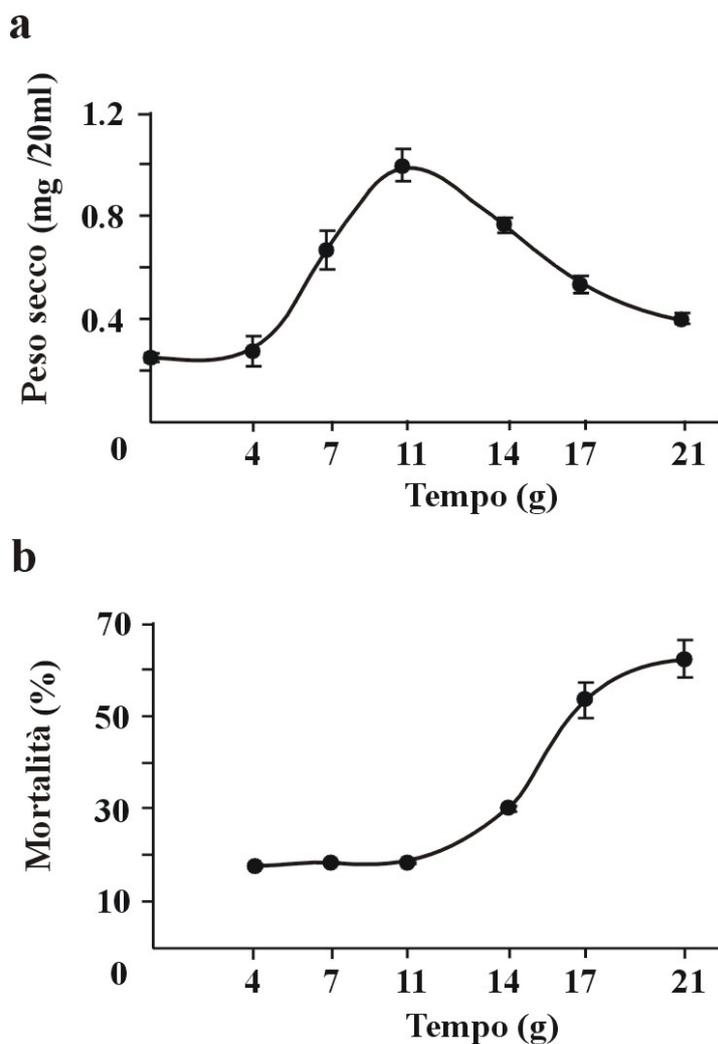


Fig. 9a,b: Curva di crescita (a) e mortalità della coltura (b) di *Medicago truncatula*.

4.1.2 Analisi dei marcatori citologici e molecolari della PCD

Per valutare se la morte delle cellule possa essere una morte cellulare di tipo programmato (PCD), si sono analizzati i seguenti marcatori citologici e molecolari: l'alterazione della morfologia nucleare, l'espressione di un marcatore di senescenza ed il rilascio del citocromo *c* dai mitocondri durante le varie fasi della crescita cellulare. Nel caso della coltura cellulare di *Medicago truncatula*, non è stato possibile analizzare la presenza del laddering del DNA data l'elevata quantità di polisaccaridi presenti nel mezzo di coltura, che interferisce con l'estrazione del DNA.

Tre sono principalmente le morfologie dei nuclei che appaiono in successione temporale: nuclei normali e rotondeggianti, nuclei condensati ed nuclei allungati. La morfologia dei nuclei condensati nelle cellule con parete è tuttavia maggiormente variabile rispetto a quelle osservate nei protoplasti (McCabe e Leaver, 2000).

In cellule in attiva divisione si può notare una diffusa colorazione del nucleo, mentre in cellule senescenti, prossime alla PCD, sono stati osservati nuclei con la cromatina condensata formante micronuclei, allungati; queste due morfologie nucleari caratterizzano i nuclei apoptotici (Fig. 10).

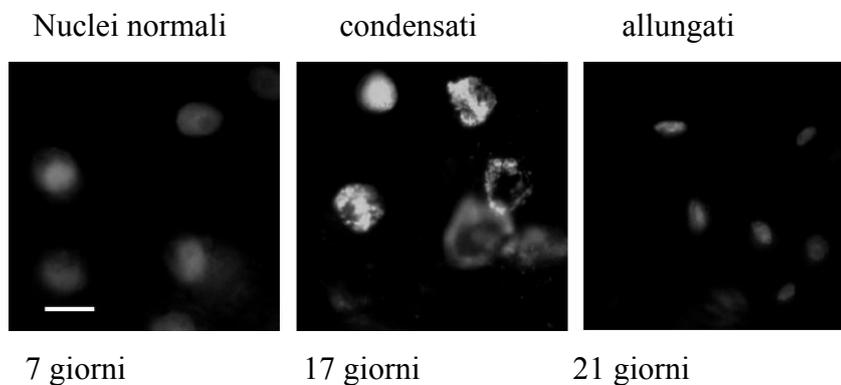


Fig. 10: Morfologia nucleare durante la senescenza spontanea (7 giorni, 17 giorni, 21 giorni). Barra 20 μ m

In tre esperimenti indipendenti sono stati contati circa 200 nuclei in cellule raccolte a diverse fasi del ciclo di crescita, ed i risultati sono mostrati in Fig. 11.

Nelle prime fasi del ciclo di crescita, la percentuale dei nuclei condensati cala fino a scomparire del tutto in cellule in attiva divisione, dove si riscontrano solo nuclei con morfologia normale (11 giorni). Dopo l'11° giorno, quando la coltura si avvia verso la fase finale di crescita, in parallelo con la diminuzione in crescita cellulare ed all'aumentare della percentuale di morte cellulare (14 giorni) aumenta, in modo significativo, la percentuale di nuclei condensati ed allungati di circa il 20%, per poi avere alla fine della coltura (21 giorni) circa l'80% di nuclei con morfologia allungata.

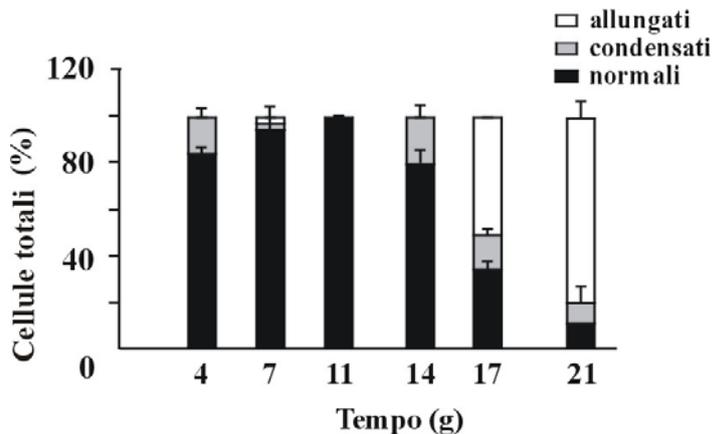


Fig. 11: Percentuale dei nuclei normali e apoptotici (condensati ed allungati).

La ricerca di geni indotti o, più in generale, modulati a livello dell'mRNA, durante il processo di senescenza, è stata condotta acquisendo informazioni dalla bibliografia e tramite ricerche bioinformatiche. Lavori recenti hanno dimostrato che colture cellulari di *Arabidopsis thaliana* alla fine del loro ciclo di sub-coltura, prima di entrare in PCD, esprimono un gene indotto durante la senescenza fogliare, *SAG12*, che codifica per una cistein-proteasi (Carimi *et al.*, 2004). Per questo motivo, è stato ricercato nei database disponibili, un gene che presentasse un'omologia di sequenza con il prodotto del gene *SAG12*. In *Medicago truncatula* è stato identificato un trascritto da noi denominato *Medicago truncatula Senescence Associated Gene (MtSAG)*, che codifica per una proteina, con circa il 50% di similitudine con *SAG12*.

Tramite RT-PCR abbiamo studiato l'andamento dell'espressione del gene durante la crescita e la senescenza della coltura. Nei primi sette giorni della coltura è stato osservato un basso livello basale di espressione di *MtSAG*, salvo poi aumentare, segno che la coltura cellulare era entrata nella fase di senescenza (8 giorni). La relativa abbondanza del trascritto nelle cellule di 11 giorni era di circa 80% superiore a quello delle cellule all'inizio del ciclo di crescita e tale livello si manteneva relativamente costante durante tutta la fase di senescenza. L'aumento del livello del trascritto si osservava quando le cellule dalla senescenza andavano incontro a PCD (Fig. 12).

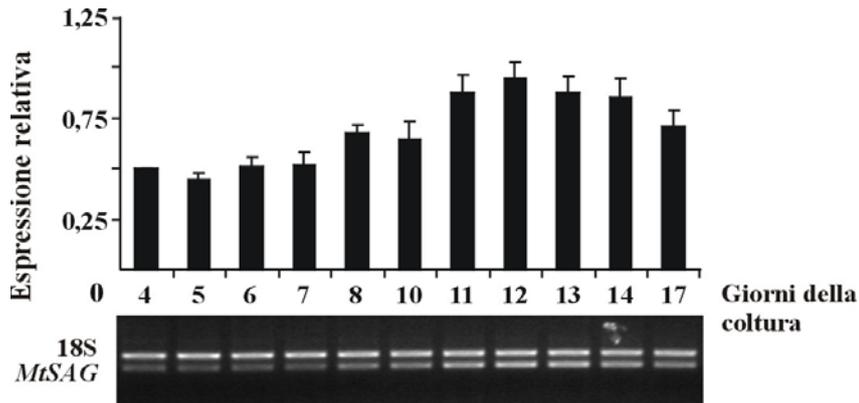


Fig. 12: Analisi dell'espressione di *MtSAG* durante la senescenza della coltura cellulare.

Un evento precoce nell'induzione di molte forme di PCD è il rilascio di citocromo *c* (cyt *c*) nel citoplasma. Si è cercato di analizzare le differenti fasi di una coltura cellulare monitorando la presenza di citocromo *c* nel citosol. Il cyt *c* è chiaramente osservabile in cellule nella prima fase della crescita logaritmica (8 giorni) ed in cellule in fase iniziale della senescenza (11 giorni). Il suo livello poi rimane costante per alcuni giorni e aumenta in modo significativo a 21 giorni, quando si riscontra anche un'elevata percentuale di morte cellulare. Si è notata la presenza di cyt *c* nel citosol di cellule nelle fasi iniziali, della crescita in coltura (5 giorni) (Fig. 13). Il *pattern* del rilascio del citocromo *c* è simile a quello osservato per l'espressione di *MtSAG*. Questo risultato suggerisce che la presenza del citocromo *c* nel citoplasma nelle prime fasi della coltura, può dipendere dall'alto livello basale di morte cellulare (20%) presente nella popolazione.

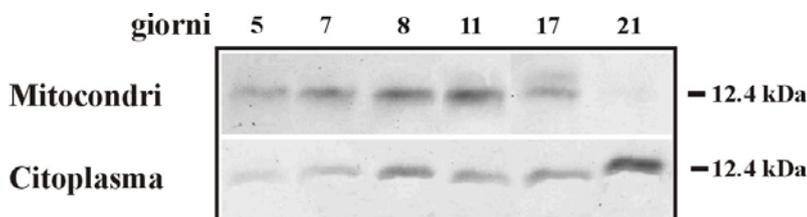


Fig. 13: Rilascio del citocromo *c* durante la crescita della coltura.

4.1.3 Morfologia e dinamica mitocondriale durante il ciclo di crescita della coltura cellulare

Nelle cellule animali in crescita i mitocondri formano una rete in cui sono connessi in un continuo processo di fusione-fissione, che ne alterano la morfologia e la dinamica. Recentemente questo processo è stato osservato anche nelle cellule vegetali. Per tale motivo siamo andati ad analizzare la morfologia dei mitocondri durante le varie fasi del ciclo cellulare. Come mostrato in Fig. 14, a 4 giorni le cellule sono in attiva divisione ed i mitocondri sono distribuiti uniformemente all'interno della cellula. I mitocondri in questa fase appaiono come piccole sfere, e talora si possono riscontrare nelle vicinanze della piastra di divisione cellulare delle cellule in mitosi (a,b). A 7 giorni, quando le cellule sono in fase esponenziale di crescita, i mitocondri si presentano con un aspetto vermiforme e sono bene visibili le reti di interconnessione mitocondriali (c,i). A 10 giorni, verso la fine della fase esponenziale di crescita, in concomitanza con un arresto della divisione cellulare, si osserva una diminuzione del numero dei mitocondri e le reti mitocondriali cominciano a frammentarsi (d). Se in questa fase non si rinnova il mezzo di crescita, la coltura entra nella fase di senescenza. Infatti a 14 e 17 giorni, i mitocondri sono di piccole dimensioni con morfologia puntiforme (e,f) ed il numero totale dei mitocondri con il potenziale di membrana integro decresce in modo progressivo (f,l). A 21 giorni, quando la coltura è in fase di morte cellulare programmata, si osservano mitocondri con una morfologia molto particolare, denominati “mitocondri giganti”, alcune volte formanti un *cluster* intorno alla membrana nucleare (g,h,m). Questa tipologia di mitocondri è stata osservata quando si riscontrano alti livelli di morte cellulare, e l'intera popolazione sta procedendo verso PCD. Questo tipo particolare di mitocondri può essere identificativo del passaggio della coltura da senescenza a PCD.

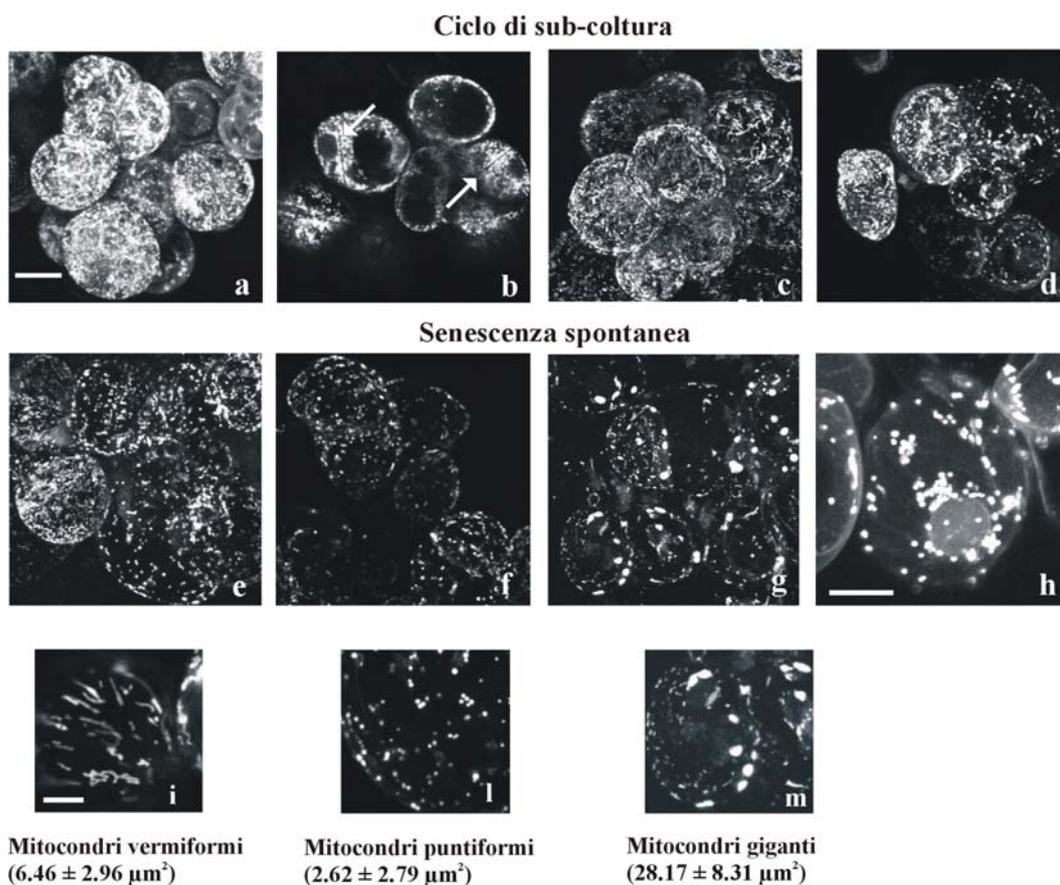


Fig. 14: Morfologia mitocondriale durante le fasi della coltura. (a) cellule di 4 giorni, con numerosi mitocondri puntiformi. (b) cellule in divisione, con i mitocondri adiacenti al setto di divisione cellulare. (c) cellule di 7 giorni con le reti di interconnessione mitocondriale. (d) cellule di 10 giorni con una diminuzione del numero dei mitocondri e delle reti mitocondriale. (e,f) cellule di 14 e 17 giorni con mitocondri piccoli e puntiformi, (g) cellule con mitocondri *oversize*. Barra 20 μm . (h) Cellule con mitocondri giganti formanti un *cluster* attorno al nucleo cellulare. (i, l, m) ingrandimento di cellule di 7, 17 e 21 giorni. Barra 5 μm .

Oltre all'analisi della morfologia dei mitocondri, si è valutata anche la loro dinamica, nelle varie fasi della crescita cellulare. In cellule giovani ed in attiva divisione, si è riscontrata un'elevata mobilità mitocondriale; al contrario in cellule senescenti si è osservata una diminuzione della loro dinamicità. Questi dati sono in perfetto accordo con l'andamento della crescita cellulare: cellule in attiva divisione presentano una ridotta mortalità, l'assenza di nuclei apoptotici ed mitocondri vitali altamente interconnessi gli uni agli altri; cellule in senescenza

mostrano mitocondri poco mobili, disgregazioni delle reti mitocondriali, elevata percentuale di morte cellulare, confermata dalla presenza di nuclei apoptotici.

I mitocondri sono spesso associati agli elementi del citoscheletro, che ne determinano i movimenti all'interno della cellula; per questo si è studiata la morfologia dei microtubuli, nelle differenti fasi della crescita cellulare in parallelo alla morfologia mitocondriale. Cellule di 7 giorni, con fitte reti mitocondriali, mostrano un network ben organizzato di microtubuli (Fig. 15a). A 14 giorni, quando le cellule sono nella fase di senescenza ed i mitocondri sono piccoli e puntiformi, le cellule mostrano alterazione degli elementi del citoscheletro, con conseguente disorganizzazione dei microtubuli (Fig. 15b). Questo risultato suggerisce una correlazione tra la morfologia e la dinamica mitocondriale e l'organizzazione del citoscheletro

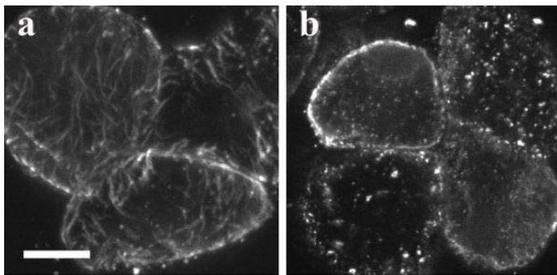


Fig. 15a,b: Organizzazione dei microtubuli a 7 (a) e 14 giorni (b). Barra 20 μ m.

Il lavoro svolto su *Medicago truncatula*, ha prodotto risultati nuovi e mai documentati. Si è osservato per la prima volta che le differenti fasi del ciclo cellulare sono associate a modificazioni nella morfologia e della dinamica mitocondriale. Cellule in attiva divisione sono caratterizzate da fitte reti mitocondriali, dove i mitocondri sono interconnessi gli uni agli altri in un continuo processo di fusione e fissione; in cellule senescenti, caratterizzate dall'espressione di un gene marcatore della senescenza (*MtSAG*), le reti mitocondriali si disgregano e si osservano mitocondri puntiformi. Il numero di questi mitocondri appare ridotto rispetto e quelli osservati all'inizio della fase di senescenza, probabilmente dovuto ad una diminuzione del loro potenziale di membrana. Una tipologia di mitocondri denominata “gigante” è stata osservata quando la coltura presenta un'alta percentuale di morte cellulare e, a questo stadio, il citocromo *c* è completamente rilasciato nel citoplasma Questo

morfologia mitocondriale è stata già osservata in cellule di tabacco eposte a stress ipossico (Van Gestel e Verbelen, 2002), confermando quindi una correlazione tra i mitocondri giganti e la PCD come osservato nel nostro sistema.

4.1.4 La PCD può essere indotta in colture cellulari da alte dosi di citochinine

Recentemente si è scoperto che alte dosi della citochinina BAP sono in grado di indurre PCD accelerando il processo di senescenza, in colture cellulari di *Arabidopsis thaliana* e carota (Carimi *et al.*, 2004).

Gli esperimenti sono stati condotti trattando cellule di 4 giorni con varie citochinine: 27 μ M BAP (6-benzilamminopurina), la stessa citochinina sintetica utilizzata nella preparazione del terreno di coltura; 27 μ M BA-R (6-benzilamminopurina ribosilata); 27 μ M DPU (difenilurea), un composto inibitore delle citochinine-ossidasi, enzimi coinvolti nel catabolismo delle citochinine (Christianson e Horbuckle, 1999). I dati sono stati raccolti dopo tre giorni di trattamento (cellule di 7 giorni). Dopo il trattamento con BAP e DPU, si induce una percentuale di morte cellulare attorno al 40%, con un aumento del 100% rispetto al controllo, anticipando la morte cellulare al 7° giorno rispetto al 14° della senescenza naturale (Fig. 16).

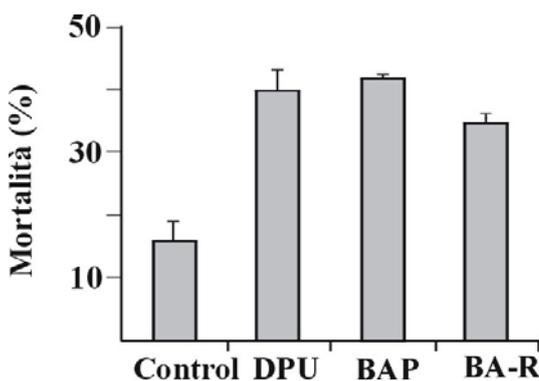


Fig. 16: Analisi della morte cellulare in cellule trattate con citochinina.

In concomitanza si osserva un aumento della percentuale di nuclei apoptotici, formati da nuclei condensati e allungati (Fig. 17). Questo risultato è comparabile con quelli di cellule che entrano nella fase finale di senescenza/PCD (17 e 21 giorni).

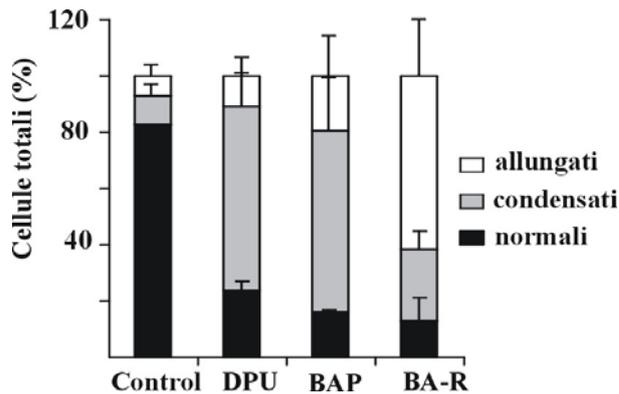


Fig. 17: Percentuale dei nuclei normali ed apoptotici in cellule trattate con citochinina.

Dal momento che il trattamento con alte dosi di citochinina induce PCD, si è analizzata l'espressione del marcatore di senescenza *MtSAG*. Gli esperimenti sono stati condotti solo con la forma ribosilata della citochinina BAP (BA-R), poiché è la molecola che presenta maggiore effetto nell'induzione di morte cellulare. Gli esperimenti sono stati effettuati trattando cellule di 4 giorni, ed i risultati sono stati analizzati dopo tre giorni di trattamento. Dopo tale periodo si è vista un'induzione dell'espressione di *MtSAG* (pari al 65%) confermando così che alte concentrazioni di citochinine inducono PCD mediante accelerazione della senescenza. In parallelo è stato misurato il rilascio del *cyt c* da cellule trattate con BA-R. Anche in questo caso si è osservato che alte dosi di questa molecola provocano il rilascio del *cyt c* dal mitocondrio nel citoplasma. Questi dati dimostrano che le citochinine sono in grado di indurre PCD (Fig. 18a,b).

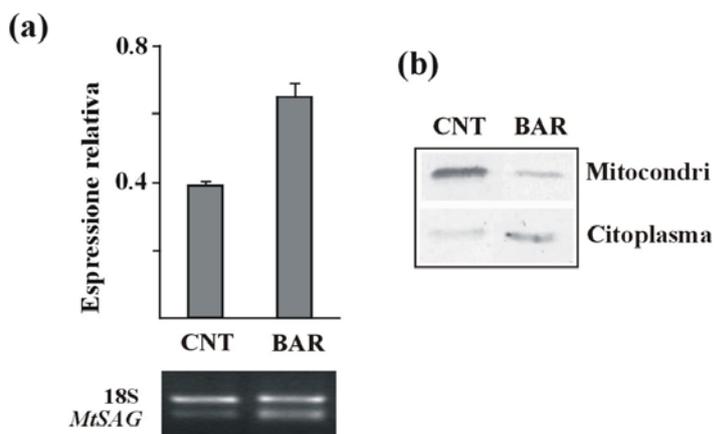


Fig. 18a,b: Analisi dell'espressione di *MtSAG* (a) e rilascio del *cyt c* (b) in cellule trattate con 27 μ M BA-R.

E' stato poi valutato se alte dosi di citochinine potessero influire sulla morfologia e dinamica mitocondriale. Dopo trattamento con 27 μ M di BAP, BA-R, DPU non si è osservata la tipica struttura tubulare dei mitocondri presente nelle cellule non sottoposte al trattamento e in cellule in attiva divisione, ma anzi si può notare la presenza di mitocondri con morfologia "gigante", già osservati nella coltura cellulare in fase di senescenza naturale. Anche la dinamica dei mitocondri è notevolmente influenzata dal trattamento con le citochinine: in cellule trattate il numero di mitocondri vitali si riduce drasticamente, rispetto al non trattato (Fig. 19).

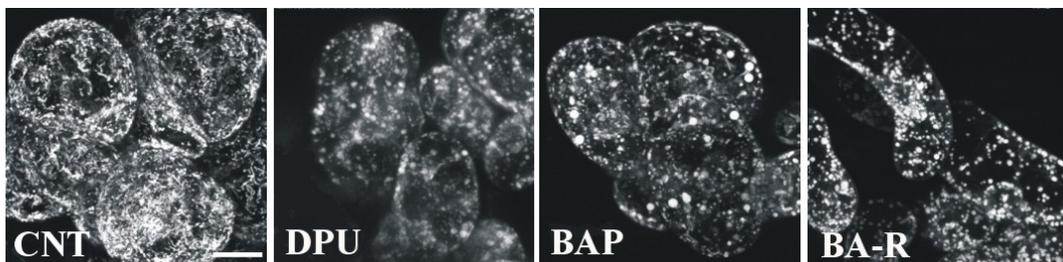


Fig. 19: Analisi della morfologia mitocondriale in cellule trattate con citochinine. Barra 20 μ m.

Anche la morfologia del citoscheletro è modificata in cellule trattate con 27 μ M di BA-R. In Fig. 20 si può notare come la rete di microtubuli sia disorganizzata e gli elementi del citoscheletro non sono più visibili.

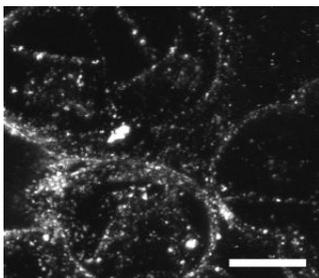


Fig. 20: Analisi dell'organizzazione del citoscheletro in cellule trattate con 27 μ M BA-R. Barra 20 μ m.

Nelle piante gli ormoni sono noti regolatori della senescenza. Tipicamente, l'etilene accelera la senescenza in pianta mentre le citochinine sono note per la

loro attività anti-senescente. Negli esperimenti di questa tesi tuttavia si è visto come ad alte dosi ed in cellule in attiva proliferazione quest'ultima classe di ormoni è in grado di indurre PCD, sotto forma di senescenza anticipata.

Appare chiaro dunque che il ruolo delle citochinine nella regolazione della senescenza è più complicato di quanto precedentemente ipotizzato. L' effetto paradossale, per cui un composto ha effetti opposti in dipendenza dalla concentrazione, è un fenomeno già osservato tra gli ormoni vegetali, ed in particolare per l'auxina (Blatt e Thiel 1994), e potrebbe spiegare questa natura dualistica delle citochinine.

Il trattamento con le citochinine oltre che indurre senescenza anticipata, modifica la dinamica e la morfologia mitocondriale, confermando il ruolo di questo organello nel processo di morte cellulare. Infatti si riscontra una disgregazione delle reti e la presenza di mitocondri "giganti" simili a quelli osservati nella coltura cellulare che procede verso la PCD.

Conclusioni

Il lavoro svolto su *Medicago truncatula* ha portato alla luce dei risultati nuovi e interessanti. Si è osservato per la prima volta che le differenti fasi del ciclo cellulare sono associate a modificazione nella morfologia e dinamica mitocondriale. In particolare, è stata definita una tipologia di mitocondri, detta "gigante", come marker di passaggio dalla senescenza alla PCD. Inoltre, si è visualizzato nella coltura cellulare il rilascio del citocromo *c* dai mitocondri, sebbene il ruolo di questa proteina non sia ancora stato del tutto chiarito nel sistema sperimentale utilizzato.

L'analisi delle diverse fasi della crescita ha permesso poi, di confermare che le colture cellulari vanno incontro a senescenza naturale, ancor più dimostrata dalla presenza di *MtSAG*, marker di senescenza di recente individuazione.

4.2 Mutanti di *Lotus japonicus* alterati nella regolazione del processo di PCD

Lotus japonicus è un'altra Leguminosa modello. In questa pianta sono stati isolati diversi mutanti, tra questi, alcuni sono mutanti nei processi di simbiosi. Un particolare mutante denominato *LjSym 4-2* non è in grado di instaurare nessun tipo di relazioni simbiotiche. Questo mutante non risponde agli elicitori rilasciati dai microrganismi benefici, perciò viene definito Nod^- e Mic^- , perché non è in grado di formare noduli e micorrizze. In particolare dopo interazione con le ife fungine le cellule dell'epidermide radicale vanno incontro a PCD. L'analisi di questo mutante suggerisce che *LjSym 4-2* rappresenta un sistema sperimentale interessante per lo studio dei meccanismi e delle molecole segnale coinvolte nel processo di PCD.

4.2.1 Caratterizzazione della senescenza spontanea/PCD nelle colture cellulari di *Lotus japonicus* wt e *LjSym 4-2*

Inizialmente sono state prodotte colture cellulari da plantule di wt e da plantule di mutante. Le linee cellulari sono state caratterizzate misurando l'andamento della curva di crescita in peso secco (Fig. 21a). Il mutante *LjSym 4-2* presenta un incremento del peso secco minore ed una crescita più lenta rispetto al wt; questo potrebbe dipendere dalla morfologia cellulare del mutante, infatti le cellule presentano dimensioni ridotte e con un grosso vacuolo che occupa tutta la cellula. Per entrambe le linee si possono definire le fasi della curva di crescita: una fase di adattamento (0-3gg) comune per entrambe le linee, una fase esponenziale dove le cellule sono in attiva divisione (4-10gg per il wt, 4-14 giorni per il mutante), ed una fase di declino della crescita (11-27 giorni per il wt, 15-27 giorni per il mutante), dove si riscontra una diminuzione della biomassa. Dai dati a nostra disposizione le colture cellulari di *Lotus japonicus* wt e *LjSym 4-2* presentano un ciclo di crescita di 10 giorni; se alla fine di questo periodo non viene rinnovato il mezzo di crescita, inizia il processo di senescenza naturale.

In concomitanza è stato valutato l'andamento della mortalità nella popolazione cellulare. Si nota che la variazione del percento della morte cellulare nelle due

linee è molto simile, sia nelle fasi iniziali, dove è bassa (10-13%), che durante le fasi finali della curva di crescita, in cui la percentuale di morte aumenta, fino a raggiungere valori dell'80% (27 giorni) (Fig. 21b).

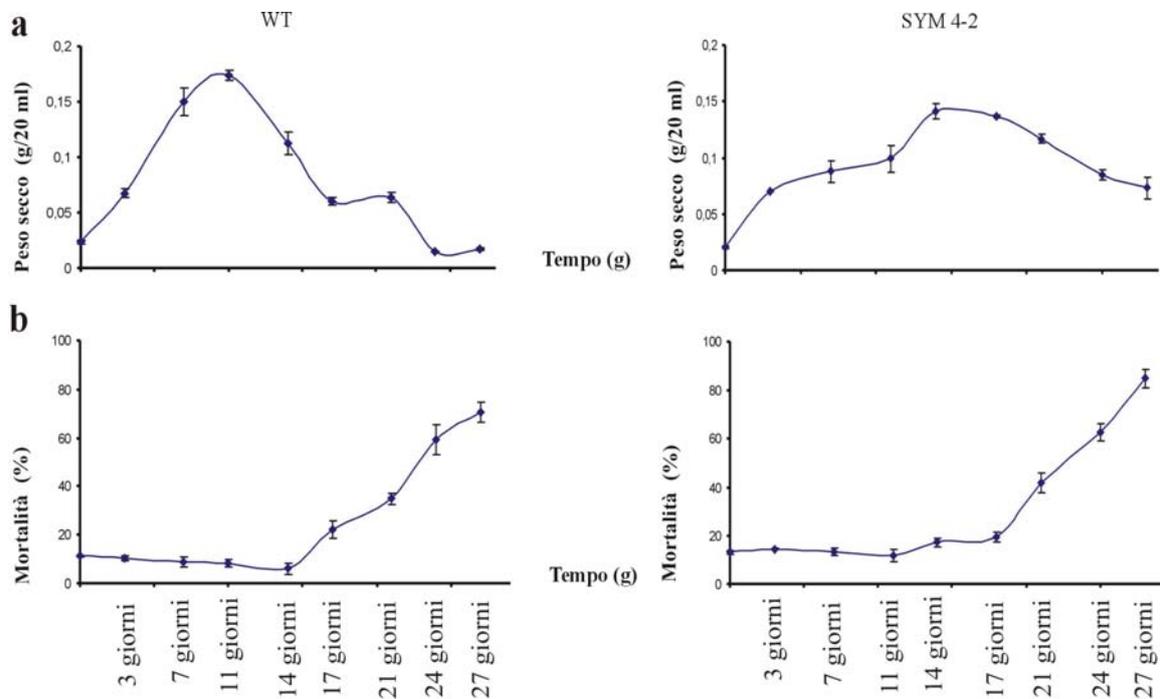


Fig. 21a, b: Andamento della curva di crescita (a) e di morte cellulare (b) di *Lotus japonicus* wt e *LjSym 4-2*.

4.2.2 Analisi di marcatori di PCD nelle colture cellulari di *Lotus japonicus* wt e *LjSym 4-2*

Per studiare la natura dell'evento di morte cellulare, si è esaminato lo stato del DNA genomico delle cellule durante la crescita in coltura. Come riportato in Fig. 22a,b si osserva che nelle fasi più avanzate del ciclo cellulare, ad una diminuzione della quantità di DNA ad alto peso molecolare, corrisponde la comparsa di DNA laddering, con intensità crescente nel tempo. In entrambe le specie in esame la comparsa del laddering si presenta quando la mortalità cellulare supera circa il 40% (dopo 21 giorni in entrambe le linee). La presenza del laddering conferma che la fase finale del ciclo di crescita di una coltura cellulare va incontro ad un programma geneticamente controllato di morte cellulare.

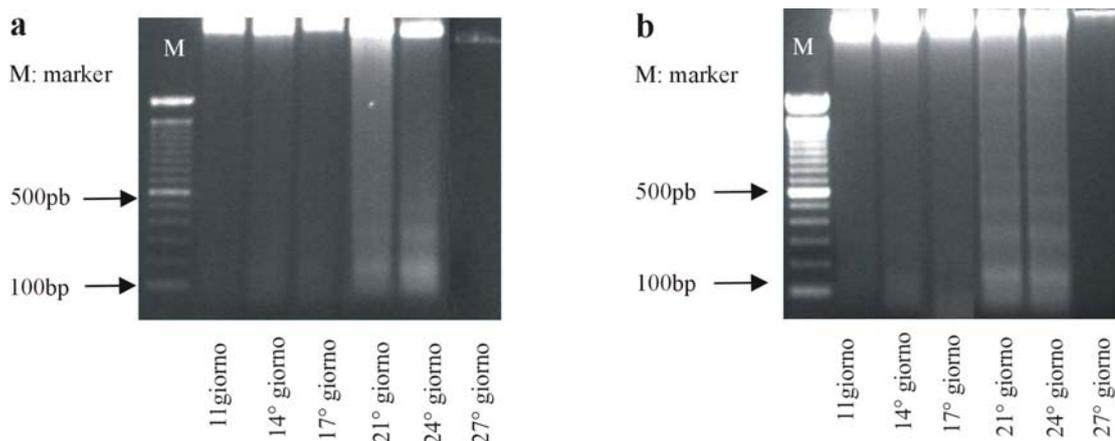


Fig. 22a,b: Analisi in gel di agarosio del DNA estratto a vari giorni delle colture di *Lotus japonicus* wt e *LjSym 4-2*.

4.2.3 Effetti dell'SA sulle colture cellulari di *Lotus japonicus* wt e *Ljsym 4-2*

SA è una molecola chiave non solo nelle risposte a stress abiotici (UV, temperatura) ma anche nelle interazioni pianta microrganismi, sia nella simbiosi che durante un attacco patogeno.

Per studiare l'effetto che questa molecola ha sulle linee cellulari di *Lotus japonicus*, cellule di quattro giorni sono state trattate con due concentrazioni di SA (0,5mM ed 1mM) per cinque giorni.

Dalla Fig. 23a,b si nota che le due linee cellulari rispondono in modo differente al trattamento, sia in termini di crescita che di variazioni di cellulare. Si può osservare che nel wt, le due concentrazioni di SA hanno un lieve effetto sulla crescita della coltura, ma non influiscono sulla percentuale di morte cellulare passando da un 6.5% del controllo ad un 10.5% di cellule trattate con SA.

Nel mutante invece dopo trattamento con SA si osserva una forte diminuzione della crescita, di circa il 70% rispetto al controllo ed un considerevole aumento del percentuale di morte cellulare rispetto al controllo, circa 4 volte maggiore.

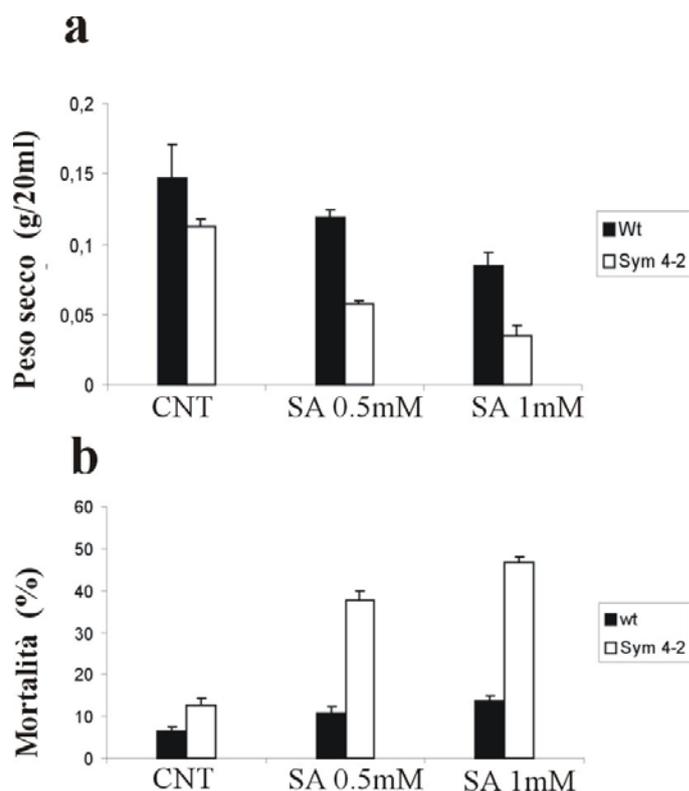


Fig. 23a,b: Peso secco e percentuale di morte dopo cinque giorni di trattamento con SA in *Lotus japonicus* wt e *LjSym 4-2*.

In seguito, sono state analizzate le differenti morfologie nucleari sia nel wt che nel mutante, per verificare se il trattamento con SA inducesse morte di tipo apoptotico. Le cellule per questo esperimento sono state trattate con le due concentrazioni di SA utilizzate in precedenza per 48h e successivamente analizzate le morfologie nucleari, dato che la condensazione della cromatina, è un evento che precede la morte cellulare .

Dall'analisi effettuata e mostrata in Fig. 24, si può notare che nei controlli la morfologia prevalente sia quella definita "normale" (Fig. 25a). Nel wt dopo il trattamento con le due concentrazioni di SA, non si riscontrano variazioni nelle morfologie nucleari rispetto al controllo. Nel mutante al contrario, il trattamento con SA induce la comparsa di nuclei altamente condensati e nuclei allungati (Fig. 25b,c), confermando che SA nel mutante induce PCD.

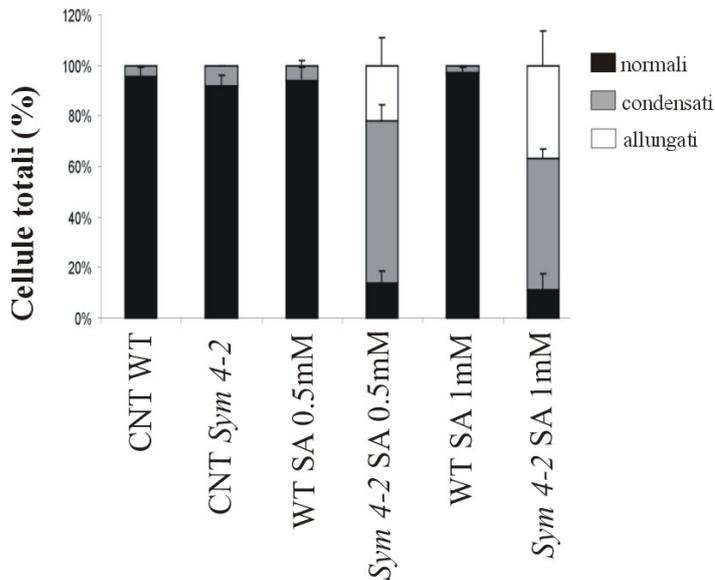


Fig. 24: Percentuale dei nuclei normali ed apoptotici (condensati e allungati) nelle linee wt e *LjSym 4-2*, dopo trattamento per 48h con SA.

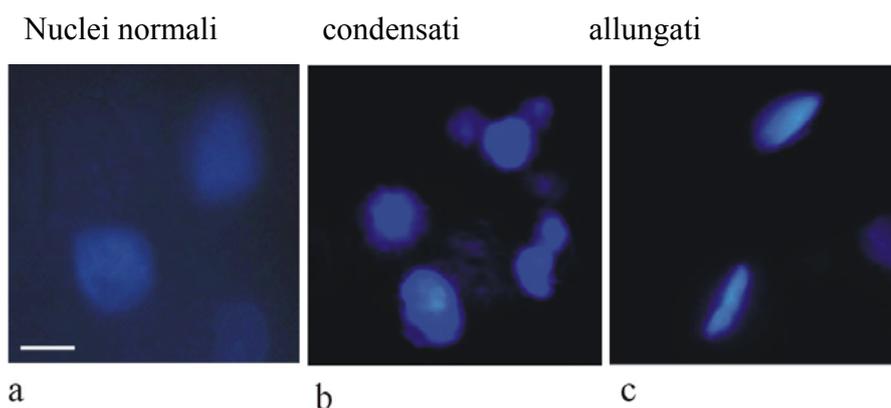


Fig. 25a,b,c: Morfologia nucleare nei trattamenti indotta da SA, dopo 48h in cellule di *LjSym 4-2* (barra 30 μ m).

E' stata effettuata un'estrazione di DNA da cellule wt e di *LjSym 4-2*, dopo cinque giorni di trattamento. Nel mutante, data l'elevata percentuale di morte nella coltura, il DNA si presenta completamente degradato, al contrario del wt dove non si osserva nessun tipo di degradazione, vista la mortalità circa uguale a quella del controllo (Fig. 26a,b).

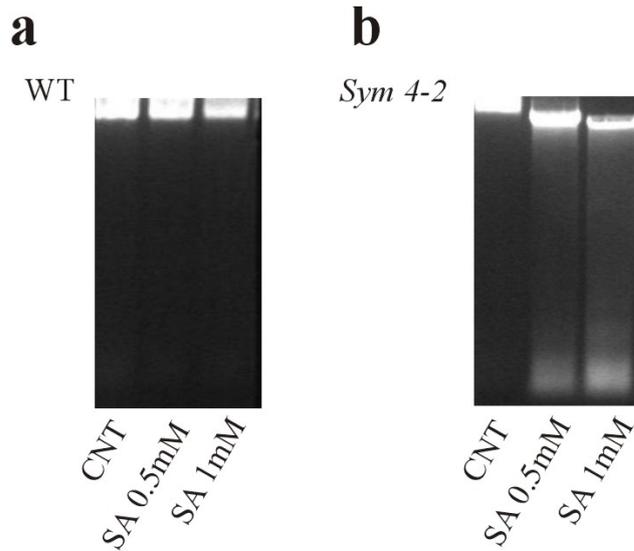


Fig. 26a,b: Analisi in gel di agarosio in cellule wt e mutanti trattate con SA per cinque giorni.

4.2.4 Analisi dei componenti coinvolti nella PCD indotta da SA

Perossido d'idrogeno (H₂O₂)

Un'azione ben documentata di SA è l'induzione di un *burst* ossidativo. E' stato perciò analizzato l'accumulo di ROS, nelle cellule wt e nel mutante *LjSym4-2*, in seguito al trattamento con SA 0.5 ed 1mM in combinazione o meno con 75U/ml di catalasi.

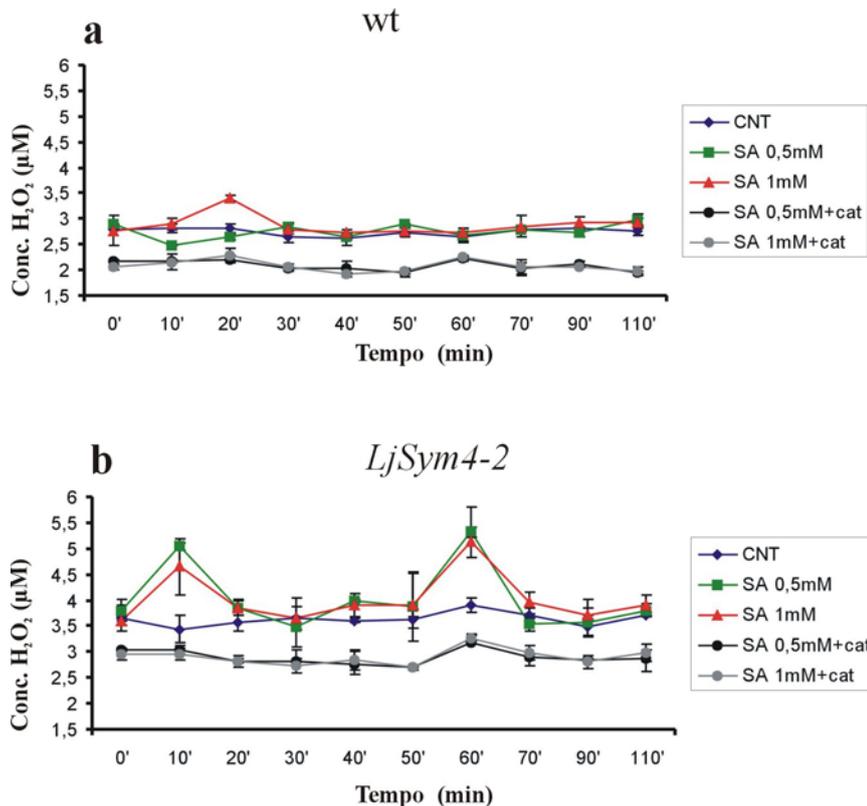


Fig. 27a,b: Misura della produzione di H₂O₂ in cellule di *Lotus japonicus* wt e *LjSym 4-2*.

Come emerge dai grafici in Fig. 27a, l'aggiunta di diverse concentrazioni di SA nel terreno di coltura di cellule wt non determina alcuna produzione di H₂O₂. In seguito al trattamento con SA nel mutante si osserva una produzione bifasica di H₂O₂ (Fig. 27b). Il primo picco si osserva dopo 10 minuti, il secondo dopo circa 1h. Una produzione bifasica di H₂O₂ è stata osservata in diverse colture cellulari vegetali in risposta ad attacco patogeno (Shirasu e Shulze-Lefert, 2000). In questi sistemi il primo picco appare in tempi relativamente brevi (10-20 minuti), mentre il secondo si ha dopo 1-2 ore dall'infezione. Il primo picco è stato definito "non specifico" in quanto prodotto sia da patogeni virulenti che avirulenti; mentre il secondo picco viene definito "specifico" in quanto attiva il meccanismo di HR (Shirasu e Shulze-Lefert, 2000). Il trattamento con catalasi, annulla la produzione di H₂O₂ visibile soprattutto nel mutante, confermando quindi SA è in grado di indurre la produzione di H₂O₂.

Per valutare l'effetto dell'H₂O₂ sulla via di *signaling* dell'SA, è stato valutato il suo effetto sulla vitalità cellulare. Cellule di *Lotus japonicus* wt e di mutante

LjSym 4-2 sono state incubate per 5 giorni con SA 0,5/1mM ed in presenza o meno di 75U/ml di catalasi.

L'analisi dei risultati mostrati in Fig. 28a,b mostra che il pre-trattamento con catalasi nella linea mutante induce un lieve incremento della crescita cellulare e una riduzione della mortalità cellulare, suggerendo quindi una correlazione tra la produzione di H₂O₂ e la PCD indotta da SA.

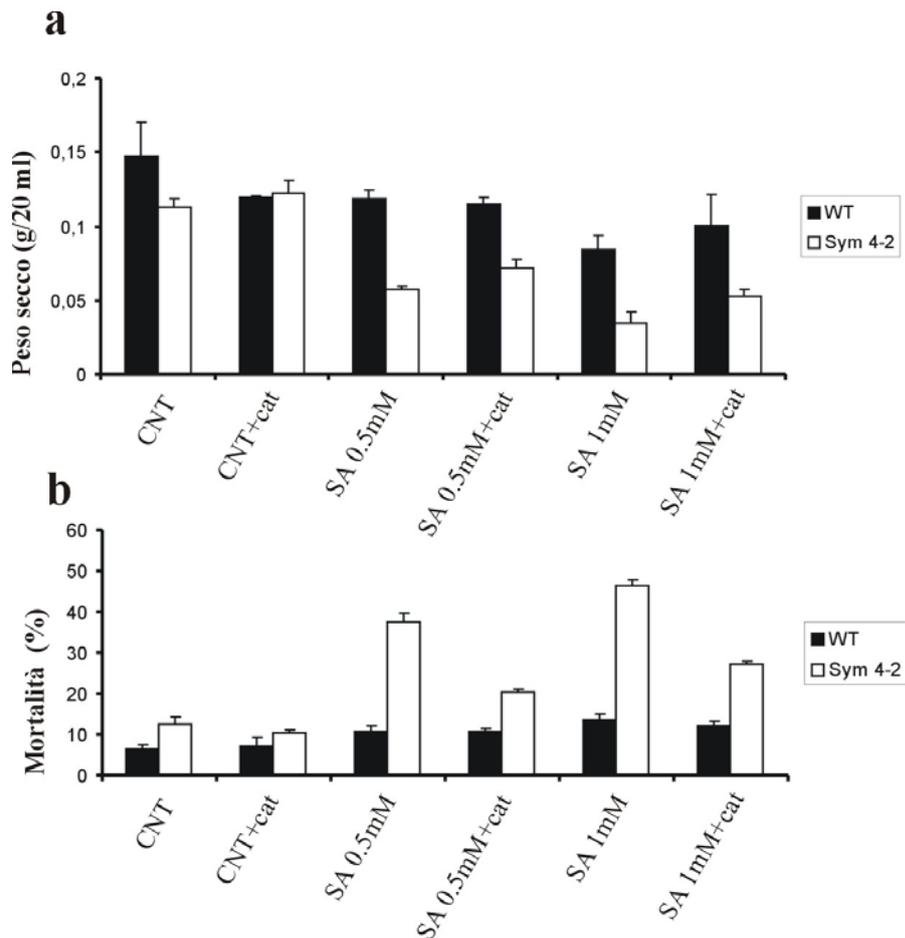


Fig. 28a,b: Peso secco (a) e percentuale di morte (b) in cellule wt e mutante pre-trattate con catalasi e SA.

Ossido nitrico (NO)

Studi recenti hanno dimostrato che in *Arabidopsis thaliana*, SA è in grado di indurre la biosintesi di NO (Zottini *et al.*, 2007). Per valutare se nel nostro sistema, SA è in grado di indurre la produzione di NO e per valutare il ruolo che questa molecola ha nella PCD mediata da SA, cellule wt e mutante di 4 giorni

sono state incubate con SA 0.5 ed 1mM. La misura del rilascio di NO è stata valutata nell'arco delle 7 ore successive al trattamento (Fig. 29a,b).

Nella linea wt non si evidenziano sostanziali differenze tra il controllo ed le cellule trattate con SA 0.5mM; mentre in cellule wt, trattate con SA 1mM, è stato osservato un picco di fluorescenza, dopo 1h dal trattamento, che raggiunge un livello due volte superiore rispetto al controllo, salvo poi tornare a livelli basali nelle ore successive. Nel mutante dopo trattamento con SA, nella prima ora non si è osservata un incremento nella produzione di NO, ma si riscontra una fluorescenza di circa 2 volte superiore rispetto al non trattato. Dopo circa tre ore dal trattamento con le due concentrazioni di SA, è stato osservato un aumento della produzione di NO, fino a raggiungere il massimo a 7h. Il pre-trattamento con uno scavenger dell'NO (c-PTIO) riduce l'accumulo di NO nel wt ed in maggior misura nel mutante.

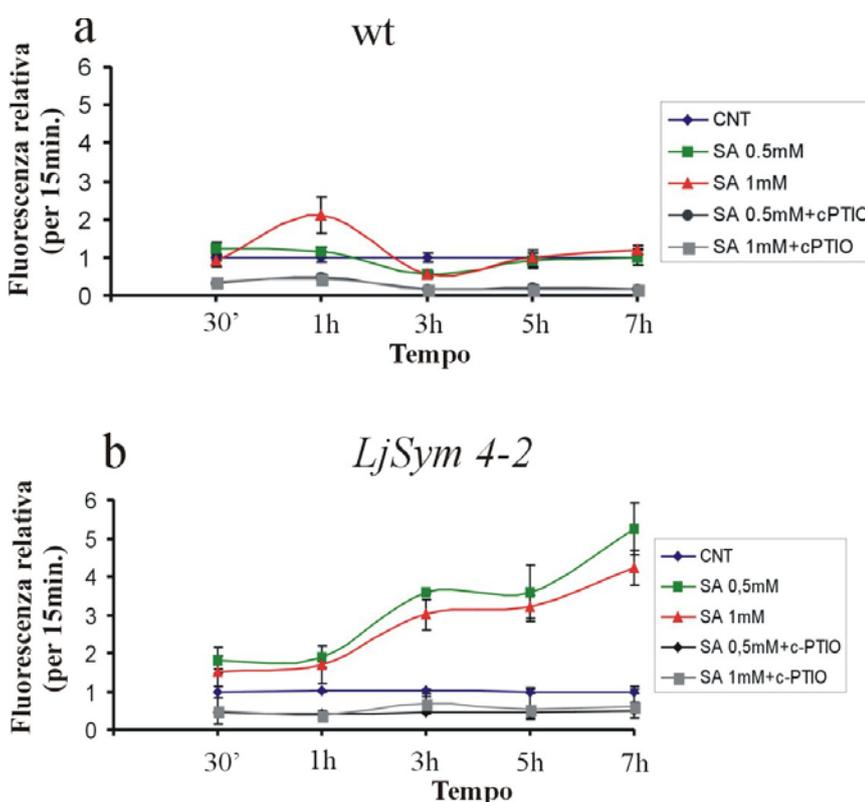


Fig. 29a,b: Misura del rilascio di NO in cellule wt e *LjSym 4-2*.

Ci si è quindi chiesti se la produzione di NO fosse semplicemente una conseguenza del trattamento con SA, o se invece questa molecola avesse un ruolo

attivo nella PCD. Per rispondere a questa domanda è stata valutata la crescita e la mortalità della coltura, trattata con SA ed in presenza o meno dello scavenger dell'NO (c-PTIO) o dell'inibitore della NOS animale (L-NMMA).

L'analisi dei parametri fisiologici della coltura, mediante la misura del peso secco e la stima della mortalità cellulare (Fig. 30a,b), dimostra che l'NO è necessario per l'azione di SA nell'indurre PCD. Il pre-trattamento con c-PTIO o L-NMMA limita i danni cellulari provocati dal trattamento con SA, in particolare in *LjSym 4-2*. Infatti nel mutante il pre-trattamento con L-NMMA induce un recupero della crescita cellulare di circa 30% per SA 0,5mM, mentre il pre-trattamento con c-PTIO incrementa la biomassa del 90% per SA 0.5mM e del 121% per SA 1mM.

Il pre-trattamento influisce anche sul recupero della vitalità cellulare, infatti il pre-trattamento con L-NMMA induce una riduzione della morte cellulare di circa il 60% per SA 0.5mM ed 49% per SA 1mM, mentre il pre-trattamento con il c-PTIO riduce la morte cellulare di circa il 40% sia per SA 0.5mM che per SA 1mM.

Da questi risultati possiamo affermare quindi che l'ossido nitrico è un segnale di morte necessario nella PCD indotta dal trattamento con SA.

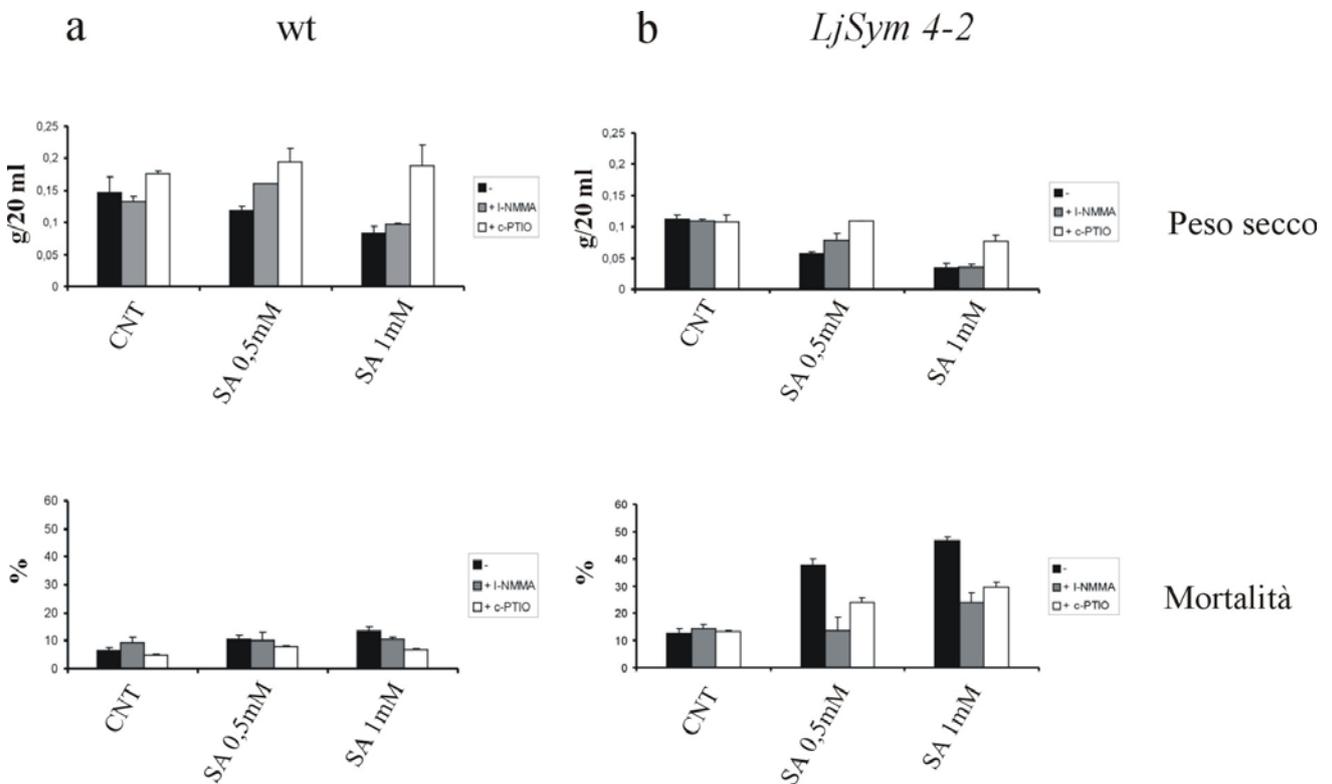


Fig. 30a,b: Analisi dello scavenger c-PTIO e dell'inibitore L-NMMA sulla vitalità delle colture di *Lotus japonicus* wt e *LjSym 4-2*.

Dall'analisi dei dati, si evince che la produzione di H₂O₂ precede temporalmente la produzione di NO nelle cellule di mutante, infatti la produzione di acqua ossigenata avviene nei primi 10 minuti, mentre la produzione di NO si osserva dopo circa 3h dal trattamento con SA. In altri sistemi sperimentali, come in colture cellulari di tabacco, si è osservato che la produzione di H₂O₂ precede la formazione di NO (de Pinto *et al.*, 2006).

Per verificare se anche in questo sistema sperimentale, la produzione di H₂O₂ è necessaria per indurre la sintesi di NO cellule di mutante sono trattate con SA 0.5mM e con catalasi (75U/ml), misurando il rilascio di NO nel mezzo.

Nella Fig. 31 si osserva che il pre-trattamento con catalasi induce una riduzione nella produzione di NO e di conseguenza del suo rilascio nel mezzo. Questo dato indica che la produzione di H₂O₂ è necessaria per la biosintesi di NO e che quest'ultimo è una molecola segnale nell'induzione della morte cellulare.

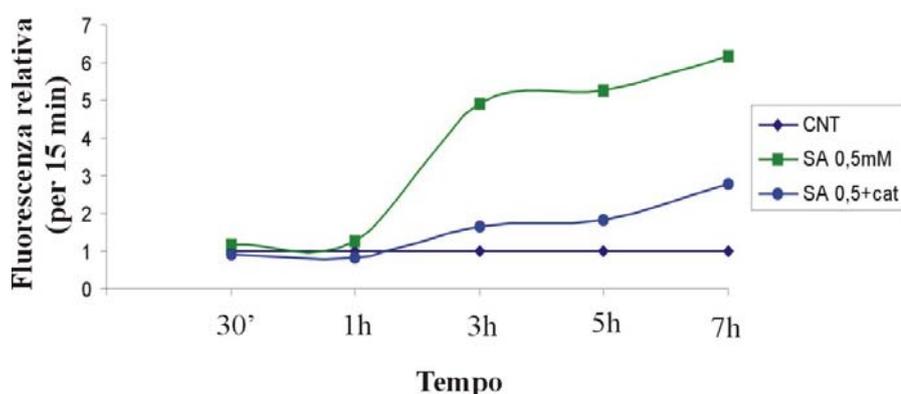


Fig. 31: Misura del rilascio di NO in cellule di *LjSym 4-2*.

4.2.5 Effetto di alte concentrazioni di SA su colture cellulari wt

Dai risultati fino ad ora ottenuti, si nota che esiste una differente sensibilità all'SA delle cellule di *Lotus japonicus* wt rispetto a quelle del mutante *LjSym 4-2*. Per indagare più in dettaglio questa differenza, cellule wt di 4 giorni sono state trattate per 5 giorni con concentrazioni crescenti di SA (1.5, 3mM) e si è analizzato l'effetto di queste alte concentrazioni. Dopo trattamento con alte concentrazioni di SA, si osserva una brusca riduzione della crescita cellulare ed un aumento considerevole della mortalità cellulare (Fig. 32a,b).

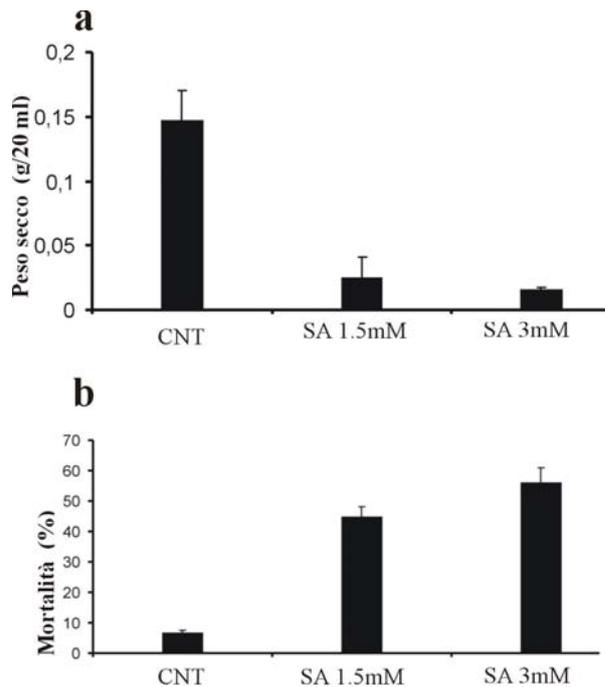


Fig. 32a,b: Peso secco e mortalità di *Lotus japonicus* wt dopo aggiunta di SA 1.5mM ed SA 3mM.

Si può notare che cellule wt trattate con SA 1.5mM hanno un livello di morte cellulare attorno al 40%, del tutto simile a quello riscontrato nel mutante dopo trattamento con SA 0.5mM.

Anche l'analisi dei nuclei in cellule wt trattate con SA 1.5mM (Fig. 33) mostra gli stessi risultati osservati nelle cellule mutanti trattate con SA 0.5mM, quali una maggiore presenza di nuclei condensati rispetto a quelli allungati. Dopo trattamento con SA 3mM, la percentuale di nuclei allungati è maggiore dei nuclei condensati, risultato simile a quello osservato nelle cellule mutanti trattate con SA 1mM.

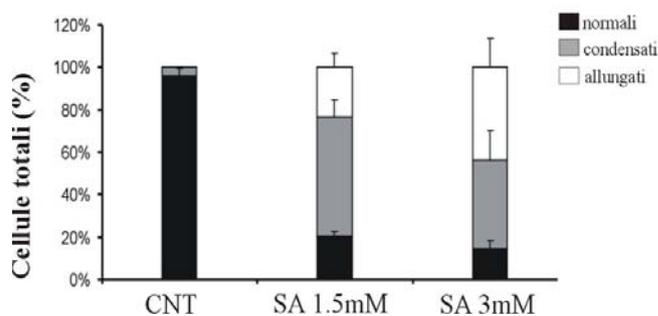


Fig. 33: Percentuale dei nuclei normali ed apoptotici (condensati e allungati) nella linea wt dopo trattamento per 48h con SA.

Anche l'analisi delle molecole coinvolte nella PCD, come l' H_2O_2 , mostra risultati simili a quelli ottenuti nella linea mutante dopo trattamento con SA 0.5 ed 1mM. In Fig. 34a si può osservare che il trattamento con SA 3mM induce una produzione bifasica come quella osservata per la linea mutante trattata con SA 0.5 ed 1mM. In Fig. 34b si può notare come il pre-trattamento con catalasi annulli la produzione di H_2O_2 e riduca la mortalità della coltura soprattutto con SA 3mM.

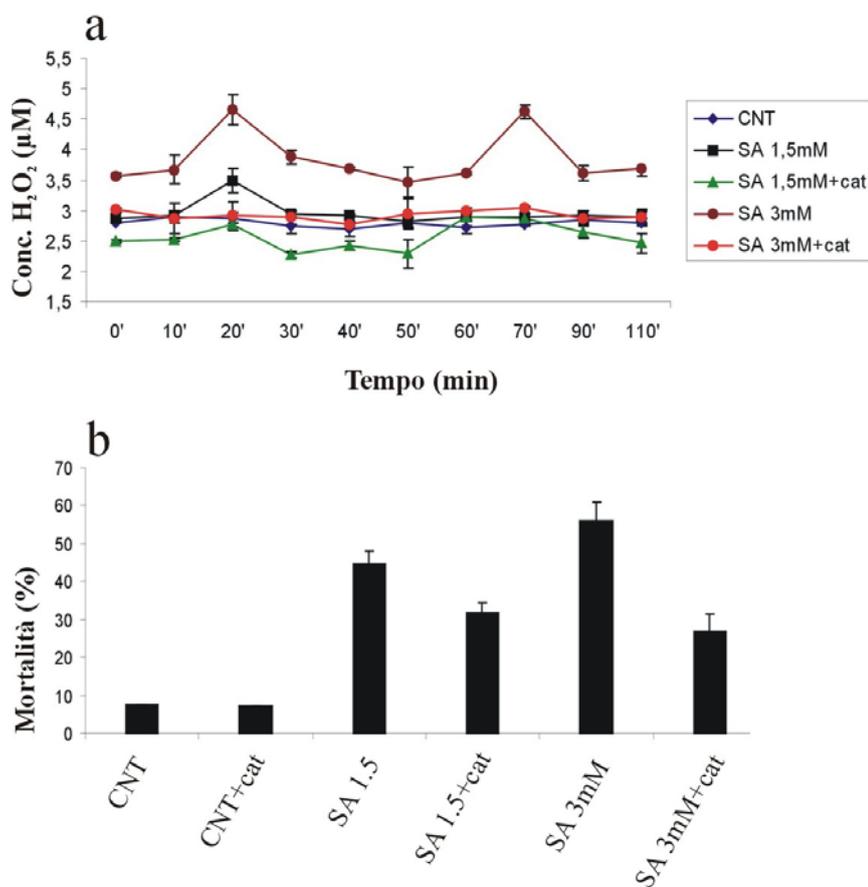


Fig. 34a,b: misura della produzione di H_2O_2 e della mortalità cellulare nella linea wt.

Le elevate concentrazioni di SA usate in questi esperimenti non consentono l'indagine relativa al rilascio di NO. Questo dipende dalla sensibilità al pH del fluoroforo per determinare il rilascio di NO (DAF-2). Concentrazioni di SA maggiori di 1mM inducono un'acidificazione del mezzo, con conseguente variazione del pH, impedendo il legame del fluoroforo con l'NO.

4.2.6 Analisi del contenuto endogeno di SA

Visti i risultati, si è ipotizzato che il mutante possa contenere una concentrazione endogena di SA maggiore rispetto al wt, e che questa sia in grado di indurre risposte differenziali tra il wt ed il mutante dopo i trattamenti con SA.

Per verificare la validità di questa ipotesi, si è analizzata l'espressione di un gene sotto il diretto controllo di SA quale *PR1*. Questo è il primo gene espresso durante l'attacco patogeno ed il suo livello di espressione è mediato dalla quantità di SA presente. Pertanto questo gene può fornire anche una misura indiretta della concentrazione di SA nelle colture cellulari. La ricerca di questo gene è stata condotta mediante analisi bio-informatiche, prendendo come modello il gene *PR1* di *Arabidopsis thaliana*, e cercando poi nei database disponibili un omologo in *Lotus japonicus*.

Cellule wt e mutanti non sottoposte al trattamento (4giorni) sono state utilizzate quale modello di studio; tramite RT-PCR si è analizzata l'espressione basale di *PR1* in cellule di *Lotus japonicus* wt e mutante *LjSym 4-2*.

Si può notare che il mutante presenta un livello basale di espressione di *PR1* (e quindi di SA) circa due volte e mezzo rispetto a quello presente nel wt (Fig. 35).

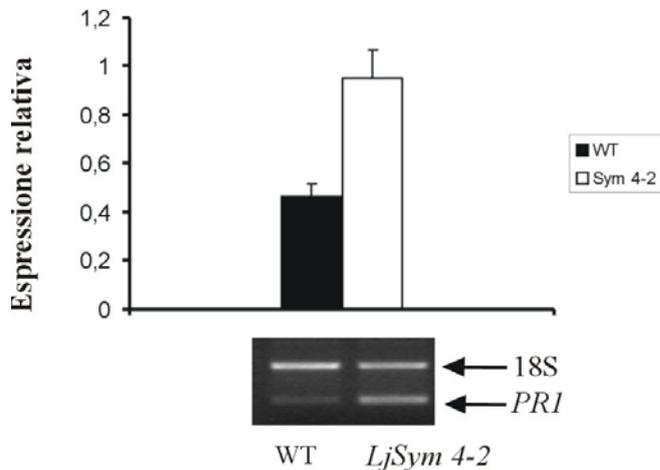


Fig. 35: Analisi dell'espressione di *PR1* in *Lotus* wt e *LjSym 4-2*.

Una prova di indagine diretta che consente di misurare la concentrazione di SA nelle colture cellulari di *Lotus japonicus*, è rappresentata dall'analisi mediante HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), questa analisi è stata svolta in collaborazione con il laboratorio del prof. Juergen Zeier (Univesità di

Wuerzburg, Germania). Cellule wt e mutanti di 7 giorni non trattate sono state analizzate ed i valori ottenuti con questa tecnica mostrano che cellule mutanti contengono circa un 30% in più di SA rispetto al wt (Fig. 36).

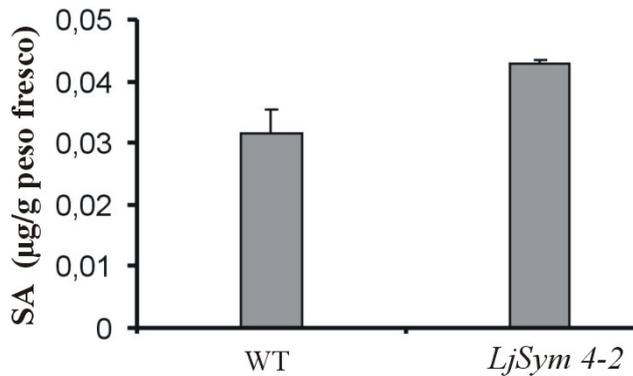


Fig. 36: Misura della concentrazione endogena di SA mediante HPLC in cellule wt e mutanti.

L'analisi di questi dati conferma l'ipotesi che il mutante presenta una concentrazione endogena di SA più alta rispetto alle cellule wt e che questo alto livello basale di SA possa provocare le differenti risposte delle due linee cellulari rispetto al trattamento con SA.

Conclusioni

E' noto che l'SA regola la formazione dei noduli e delle micorrizze. Lavori recenti hanno dimostrato che modulando i livelli endogeni di SA con il *NahG*, tali concentrazioni di SA diminuivano portando ad un aumento significativo del numero dei noduli radicali. Si è anche dimostrato che l'aggiunta esogena di SA in piante di pisello, impedisce la formazione degli arbuscoli (Medina *et al.*, 2003; Stacey *et al.*, 2006).

Inoltre SA gioca un ruolo chiave durante l'attacco di un patogeno. I livelli di SA aumentano soprattutto nelle vicinanze del sito di interazione con il microrganismo; questo *burst* di SA è in grado di innescare le risposte di difesa della pianta come la HR e la SAR.

Dagli esperimenti effettuati su *LjSym 4-2*, è emerso che questo mutante presenta un contenuto endogeno di SA maggiore rispetto al wt, e questo alto livello di SA, potrebbe spiegare il suo fenotipo (Nod^- e Mic^-) in quanto non riesce ad interagire con i microrganismi simbiotici. Dopo aggiunta esogena di SA, il mutante a differenza del wt va incontro a PCD, come se il trattamento esogeno con SA mimasse un attacco da parte di un patogeno.

L'alto livello endogeno di SA presente nel mutante, oltre che impedire l'interazione con gli endosimbionti, crea uno stato di "allarme perenne", che impedisce di discriminare i microrganismi benefici dai patogeni.

Lo studio e la caratterizzazione del mutante di *Lotus japonicus*, potrebbe quindi chiarire i complessi meccanismi che stanno alla base delle interazioni pianta-microrganismo, sia simbiotico che patogeno.

5 Bibliografia

Altshul, S.F. (1991): Amino acids substitution matrices from an information theoretic perspective, *J. Mol. Biol.*, 5: 555-565.

Altshul, S.F., Boguski, M.S., Gish, W., Wootton, J.C. (1994): Issue in searching molecular databases. *Nat. Genet.*, 6: 119-129.

Alvarez M.E. (2000): Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol., Biol.*, 44: 429-442.

Amirsadeghi S., Robson C.A., Vanlerberghe G.C. (2007): The role of the mitochondrion in plant response to biotic stress. *Physiol. Plantar.*, 129: 253-266.

Angra-Sharma R., D.K., Sharma, (1999): Cytokinins in pathogenesis and disease resistance of *Pyrenophora teres*-barley and *Drechslera maydis*-maize interactions during early stages of infection. *Mycopathologia*, 148: 87-95.

Aoki T., Kamizawa A., Ayabe S. (2002): Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lotus japonicus* with reliable antibiotics selection. *Plant Cell Rep.*, 21: 238-243.

Arimura S., Aida J.P., Fujimoto M., Nakazomo M., Tsutsumi N. (2004a): *Arabidopsis* dynamin-like protein 2a (ADL2a), like ADL2b, is involved in plant mitochondrial division. *Plant Cell Biol.*, 45: 236-242.

Arimura S., Yamamoto J., Aida J.P., Nakazomo M., Tsutsumi N. (2004b): Frequent fission and fusion of plant mitochondria with unequal nucleoid distribution. *PNAS* 101: 7805-7808.

Beers E.P., Woffenden B.J., Zhao C., (2000): Plant proteolytic enzymes: possible role during programmed cell death. *Plant Mol. Biol.*, 44: 399-415.

Beligni, M.V., Fath, A., Bethke, P.C., Lamattina, L., Jones, R.L., (2002) Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. *Plant Physiol.*, 129: 1642-1650.

Berridge M.J., (2002): The endoplasmic reticulum: a multifunctional signalling organelle. *Cell Calcium*, 32: 235-249.

Bethke P.C., Jones R.L., (2001): Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species. *Plant J.*, 25: 19-29.

Bethke P.C., Badger M.R., Jones, R.L., (2004): Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell*, 16: 332-341.

Blank A., McKeon T.A., (1989):Single-strand-preferring nuclease activity in wheat leaves is increased in senescence and is negatively photoregulated. *PNAS*, 86: 3169-3173.

Blatt M.R., Thiel G., (1994): K⁺ channels of stomatal guard cells: bimodal control of the K⁺ inward-rectifier evoked by auxin. *Plant J.*, 5: 55-68.

Bóka K., Orbán N., Kristóf Z., (2007): Dynamics and localization of H₂O₂ production in elicited plant cells. *Protoplasma*, 230: 89-97.

Bonfante P., Genre A., Faccio A., Martini I., Shauser L., Stougaard J., Webb J., Parniske M., (2000): The *Lotus japonicus* *LjSym 4* gene is required for the successful symbiotic infection of root epidermal cells. *MPMI*, 13: 1109-1120.

Bowling S.A., Clarke J.D., Liu Y., Klessing D.F., Dong X., (1997): The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expressed both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *Plant Cell*, 9: 1573-1584.

Buchanan B., Gruissem W., Jones R., (2000): Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, pp 1044-1099.

Buchanan-Wollaston V., Earl S., Harrison E., Mathas E., Navabpour S., Page T., Pink D., (2003): The molecular analysis of leaf senescence- a genomics approach. *Plant Biotech. J.*, 1: 3-22.

Bueno P., Soto M.J., Rodríguez-Rosales M.P., Sanjuan J., Olivares J., Donaire J.P., (2001): Time-course lipoxygenase, antioxidant enzyme activities and H₂O₂ accumulation during the early stages of *Rhizobium*-legume symbiosis. *New Phytol.*, 152: 91-96.

Carimi F., Zottini M., Formentin E., Terzi M., Lo Schiavo F., (2003): Cytokinins: new apoptotic inducers in plant. *Planta*, 216: 413-421.

Carimi F., Terzi M., De Michele R., Zottini M., Lo Schiavo F., (2004): High levels of the cytokinin BAP induce PCD by accelerating senescence. *Plant Sci.*, 166: 963-969.

Carimi F., Zottini M., Costa A., Cattelan I., De Michele R., Terzi M., Lo Schiavo F., (2005): NO signalling in cytokinin-induced programmed cell death. *Plant Cell Env.*, 28: 1171-1178.

Chamnongpol S., Willekens H., Moeder W., Langebartels C., Sanderman H. Jr., Van Montagu M., Inzé D., Van Camp W., (1998): Defence activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco. *PNAS*, 95: 5818-5823.

Chen S., Dickman B.M., (2004): Bcl-2 family members localize to tobacco chloroplasts and inhibit programmed cell death induced by chloroplast-targeted herbicides. J. Exp. Bot., 55 (408): 2617-2623.

Chen W., Provarit N., Glazebrook J., Katagiri F., Chang H.S., Eugelm T., Maunch F., Luan F., Zou G., Whitman A.A., Budworth P.R., Tao Y., Xie Z., Chen X., Lam S., Kreps J.A., Harper J.F., SiAmmour A., Mauch-Main B., Heinlein M., Kobayashi K., Hon T., Dangl J.L., Wnag X., Zhou T., (2002): Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. Plant Cell, 14: 559-574.

Chowdhury I., Tharakan B., Bhat G., (2006): Current conception in apoptosis: the physiological suicide programmed revisited. Cell. Mol. Biol. Letters, 11: 506-525.

Christianson M.L., Horbuckle J.S., (1999): Phenylurea cytokinins assayed for induction of shoot buds in the moss *Funaria hygrometrica*. Am. J. Bot., 86: 1645-1648.

Clarke A., Desikan R., Hurst R.D., Hancock J.T., Neill S.J., (2000): NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension culture. Plant J., 24: 667-677.

Cook D.R., VandenBosh K., De Bruijn F.J., Huguet T., (1997): Model legumes get the nod. Plant Cell, 9: 275-281.

Cook D.R., (1999): *Medicago truncatula*: A model in the making! Curr. Opin. Plant Biol., 2 : 301-304.

Crosti P., Malerba M., Bianchetti R., (2001): Tunicamycin and Brefeldin A induce in plant cell a programmed cell death showing apoptotic features. Protoplasma, 216: 31-38.

De Jong A., Hoeberichts F.A., Yakimova E.T., Maximova E., Woltering E.J., (2000) : Chemical-induced apoptotic cell death in tomato cells : involvement of caspase-like proteases. *Planta*, 211: 656-662.

de Pinto M.C., Paradiso A., Leonetti P., De Gara L., (2006): Hydrogen peroxide, nitric oxide and cytosolic ascorbate peroxidase at the crossroad between defence and cell death. *Plant J.*, 48(5): 784-795.

del Pozo O., Lam E., (1998): Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plant to pathogens. *Curr. Biol.*, 8: 1129-1132.

Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C., (1998): Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394: 585-588.

Delorme V.G.R., McCabe P.E., Kim D.J., Leaver C.J., (2000): A matrix metalloproteinase gene is expressed at the boundary of senescence and programmed cell death in cucumber. *Plant Physiol.*, 123: 917-927.

Desikan R., Griffiths R., Hancock J., Neill S., (2002): A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*, 99: 16314-16318.

Durner, J., Wendehenne, D., Klessig, D.F., (1998) Defence gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP-ribose. *PNAS*, 95: 10328-10333.

Durrant W.E., Dong X., (2004) : Systemic acquired resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 42: 185-209.

Ellis R.E., Yuan J., Horvitz H.R., (1991): Mechanisms and functions of cell death. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 7: 663-698

Frank S., Gaume B., Bergmann-Leitner E.S., Leitner W.W., Robert E.G., Catez F., Smith C.I., Youle R.J., (2001): The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Develop. Cell*, 1: 515-525.

Fukuda H., (1996): Xylogenesis: initiation, progression, and cell death. *Ann. Rev. Plant Mol. Biol.*, 47: 299-325.

Gaff D.F., Okong'o-Ogola O., (1971): The use of non-permeating pigments for testing the survival of cells. *J. Exp. Bot.*, 22:756-758

Gan S., Amasino R.M., (1995): Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, 270: 1986-1988.

Gan S., Amasino R.M., (1996): Cytokinins in plant senescence: from spray and pray to clone and play. *BioEssays*, 18: 595- 602.

Gan S., Amasino R.M., (1997): Making sense of senescence. *Plant Phys.*, 113: 313-319.

Gepts P., Beavis W.D., Brummer E.C., Shoemaker R.C., Stalker H.T., Weeden N.F., Young N.D., (2005): Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. *Plant Physiol.*, 137: 1228-1235.

Graham P.H., Vance C.P., (2003): Legumes. Importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.*, 131: 872-877.

Grbic V.E., Bleecker A.B., (1995): Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 8: 595-602.

Greenberg, J.T., (1997): Programmed cell death in plant-pathogen interaction. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48: 525-545.

Guo Y., Cai Z., Gan S., (2004): Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Cell and Env.*, 1-29.

Heath M.C., (2000): Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.*, 44: 321-334.

Handberg K., Stuogaard J., (1992): *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant J.*, 2: 487-496.

Hengartner M.O.: (2000): The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407: 685-687.

Hoffmann B., Trinh T.H., Leung J., Kondorosi A., Kondorosi E., (1997). A new *Medicago truncatula* line with superior in vitro regeneration, transformation, and symbiotic properties isolated through cell culture selection. *MPMI*, 10: 307-305.

Imaizumi-Anraku H., Takeda N., Charpentier M., Perry J., Miwa H., Uemehara Y., Kouchi H., Murakami Y., Mulder L., Vickers K., Pike J., Downie J.A., Wang T., Sato S., Asamizu E., Tabata S., Yoshikawa M., Murooka Y., Wu G.J., Kawaguchi M., Kawasaki S., Parniske M., Hayashi M., (2005): Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature*, 433: 527-531.

Jiang Z., Wooland A.C.S., Wolff S., (1990): Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *FEBS*, 268 (1): 69-71.

Jordi W., Schapendonk A., Davelaar E., Stoopen G.M., Pot C.S., De Visser R., Van Rhijn J.A., Gan S., Amasino R.M., (2000): Increased cytokinin levels in transgenic P_{SAG12}-IPT tobacco plants have large and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning. *Plant Cell Env.*, 23: 279-289.

Klessing D.F., Durner J., Noad R., Navarre D.A., Wendehenne D., Kumar D., Zhou J.M., Shah J., Zhang S., Kachroo P., Trifa Y., Pointer D., Lam E., Silva H. (2000): Nitric oxide and salicylic acid signalling in plant defense. *PNAS*, 97: 8849-8855.

Kristner C., Winzer T., Pitzchke A., Mulder L., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Stougaard J., Webb J., Szczyglowski K., Parniske M. (2005): Seven *Lotus japonicus* genes required for transcriptional programming of the root during fungal and bacteria symbiosis. *Plant Cell*, 17: 2217-2229.

Laemmli U.K., (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 227: 680-685.

Lam E., (2004): Controlled cell death, plant survival and development. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 5: 305-315.

Lamotte O., Courtois C., Barnavon L., Pugin A., Wendehenne D., (2005) : Nitric oxide in plants: the biosynthesis and cell signalling properties of a fascinating molecule. *Planta*, 221: 1-4.

Lee J., Nam J., Park H.C., Na G., Miura K., Jin J.B., Yoo C.Y., Baek D., Kim D.H., Jeong J.C., Kim D., Lee S.Y., Mengiste T., Gong Q., Ma S., Bohnert H.J., Kwak S.S., Bressan R.A., Hasegawa P.M., Yun D.J., (2006): Salicylic acid-mediated innate immunity in *Arabidopsis* is regulated by *SIZ1 SUMO E3* ligase. *Plant J.*, 49 (1): 79-90.

Leist M., Single B., Castoldi A.F., Kühnle S., Nicotera P., (1997): Intracellular adenosine triphosphate concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis *J. Exp. Med.*, 185: 1481-1486.

Leshem, Y.Y., (2001) *Nitric oxide in plants*. London, UK: Kluwer Academic Publisher.

Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C., (1994): H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 94: 491-501.

Lian B., Zhou X., Miransari M., Smith D.L., (2000) : Effects of salicylic acid on the development and root nodulation of soybean seedling. *J. Agron. Crop Science*, 185 : 187-192.

Lo Schiavo F., Baldan B., Compagnin D., Ganz R., Mariani P., Terzi M., (2000): Spontaneous and induced apoptosis in embryogenic cell cultures of carrot (*Daucus carota* L.) in different physiological states. *Eur. J. Cell. Biol.*, 79: 294-298.

Lohman K.N., Gan S., John M.C., Amasino R.M., (1994): Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant.*, 92: 322-328.

Logan D.C., Scott I., Tobin A.K., (2004): ADL2a like ADL2b, is involved in the control of higher plant mitochondria morphology. *J. Exp. Bot.*, 55: 783-785.

Magalhaes, J.R., Monte, D.C., Durzan, D., (2000) Nitric oxide and ethylene emission in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 6: 117-127.

Martínez-Abarca F., Herrera-Cervera J.A., Bueno P., Sanjuan J., Bisseling T., Olivares J., (1998): Involvement of salicylic acid in the establishment of the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *MPMI*, 11: 153-155.

McCabe P.F., Leaver C.J., (2000): Programmed cell death in cell cultures. *Plant Mol. Biol.*, 44: 359-368.

McCabe M.S., Garratt L.C., Schepers F., Jordi W.J.R.M., Stoopen G.M., Dacelaar E., van Rhijn J.H.A., Power J.B., Davey M.R., (2001): Effects of *P-SAG12-IPT*

gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. *Plant Physiol.*, 127, 505-516.

McDowell J.M., Dlang J.L., (2000): Signal transduction in the plant immune response. *Trends Bioch. Science*, 25: 79-82.

Medina M.J., Gagnon H., piché Y., Ocampo J.A., Garrido J.M., Vierheiling H., (2003): Root colonisation by arbuscular mycorrhizal fungi is affected by the salicylic acid content of the plant. *Plant Science*, 164: 993-998.

Mehdy M.C., Sharma Y.K., Sathasivan K., Bays N.W., (1996): The role of activated oxygen species in plant disease resistance. *Physiol. Plant*, 98: 365-374.

Mitsuura I., Malik K.A., Miura M., Ohashi Y., (1999): Animal cell-death suppressor Bcl-x(L) and Ced-9 inhibit cell death in tobacco plants. *Curr. Biol.*, 9: 775-778.

Mittler R., Lam E., (1997): Characterization of nuclease activities and DNA fragmentation induced upon hypersensitive response cell death and mechanical stress. *Plant Mol. Biol.*, 34: 209-221.

Mur L.A.J., Brown I.R., Darby R.M., Bestwick C.S., Bi Y.M., Mansfield J.W., Draper J., (2000): A loss of resistance to avirulent bacterial pathogen in tobacco is associated with the attenuation of a salicylic acid-potentiated oxidative burst. *Plant J.*, 23: 609-621.

Nagakawa T., Yuan J., (2000): Cross-talk between two cistein-protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J. Cell Biol.*, 150: 887-894.

Nakatsubo N., Kojima H., Kikuchi K., Nagoshi H., Hirata Y., Maeda D., Imai Y., Irimura T., Nagano T., (1998): Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using a new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. *FEBS Lett.*, 427: 263-266.

Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D., Hancock J., (2002): Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J. Exp. Bot.*, 53: 1237-1247.

Neill S.J., Desikan R., Hancock J.T., (2003): Nitric oxide signalling in plant. *New Phytol.*, 159: 11-35.

Novero M., Faccio A., Genre A., Stougaard J., Webb K.J., Mulder L., Parniske M., Bonfante P., (2002): Dual requirement of the *LjSym4* gene for mycorrhizal development in epidermal and cells of *Lotus japonicus* root. *New Phytol.*, 154: 741-749.

Oldroyd G.E.D., Harrison M.J., Udvardi M., (2005): Peace talks and trade deals: keys to long-term harmony in legume-microbe symbioses. *Plant Physiol.*, 137: 1205-1210.

Orzaez D., Granell A., (1997): The plant homologue of the defender against apoptotic death gene is down-regulated during senescence of flower petals. *FEBS Lett.*, 404: 275-278.

Pei Z.M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klusener B., Allen G.J., Grill E., Schroeder J.I., (2000): Calcium channel activated by hydrogen peroxide mediated abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, 406: 731-734.

Peiter E., Sun J., Heckmann A.B., Venkateshwaran M., Rieley B.K., Otegui M.S., Edwards A., Freshour G., Hahn M.G., Cook D.R., Sanders D., Oldroyd G.E.D., Downie J.A., Ané J., (2007): The *Medicago truncatula* DMI1 protein modulates cytosolic calcium signaling. *Plant Physiol.*, 145: 192-203.

Peters J.S., Chin C., (2005): Evidence for cytochrome *f* involvement in eggplant cell death induced by palmitoleic acid. *Cell Death Diff.*, 12: 405-407.

Picton S., Barton S.L., Bouzayen M., Hamilton A.J., Grierson D., (1993): Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene. *Plant J.*, 3: 469-481.

Pontier D., Susheng G., Amasino R., Dominique R., Lam E., (1999): Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns of expression. *Plant Mol. Biol.*, 39: 1243-1255.

Quirino B.F., Normanly J., Amasino R.M., (1999): Diverse range of gene activity during *Arabidopsis thaliana* leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related gene. *Plant Mol. Biol.*, 40: 267-278.

Quirino B.F., Noh Y.S., Himelblau E., Amasino R.M., (2000): Molecular aspect of leaf senescence. *Trends Plant Sci.*, 5: 278-282.

Rao M.V., Davis K.R., (1999): Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of SA. *Plant J.*, 17: 603-614.

Rate D.N., Cuenca J.V., Bowman G.R., Guttman D.S., Greenberg J.T., (1999): The gain-function of *Arabidopsis acd6* mutant reveals novel regulation and function in the salicylic signalling pathway in controlling cell death, defences and cell growth. *Plant Cell*, 11: 1695-1708.

Riely B.K., Lougnon G., Ane J.M., Cook D.R., (2007): The symbiotic ion channel homolog DMI1 is localized in the nuclear membrane of *Medicago truncatula* roots. *Plant J.*, 49: 208-216.

Rhoads D.M., McIntosh L., (1992): Salicylic acid regulation of respiration in higher plants: alternative oxidase expression. *Plant Cell*, 4: 1131-1139.

Rojkind M., Domínguez-Rosales J.A., Nieto N., Greenwel P., (2002): Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *Cell Mol. Life Sci.*, 59: 1872-1891.

Romero-Puertas M., Perazzolli M., Zago E.D., Delledonne M., (2004): Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions. *Cell. Microbiol.*, 6 (9): 795-803.

Senaratna T., Tuchell D., Bunn T., Dixon K., (2000): Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regul.*, 30: 157-161.

Shah J., Kachroo P., Nandi A., Klessing D.F., (2001): A recessive mutation in the *Arabidopsis* *SSI2* gene confers SA and NPR1 independent expression of *PR* genes and resistance against bacterial and oomycete pathogens. *Plant J.*, 25: 563-574.

Shah J., (2003): The salicylic acid loop in plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6: 365-371.

Shirasu K., Nakajima H., Rajasekhar K.V., Dixon R.A., Lamb C., (1997): Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defence mechanisms. *Plant Cell*, 9: 261-270.

Shirasu K., Schulze-Lefert P., (2000): Regulation of cell death in plant resistance. *Plant Mol. Biol.*, 44: 371-385.

Shroeder J.I., Allen G.J., Hugouvieux V., Kwak J.M., Waner D., (2001): Guard cell signal transduction. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio.*, 52: 627-658.

Slaymaker D.H., Navarre D.A., Clark D., del Pozo O., Martin G.B., Klessig D.F., (2002): The tobacco salicylic-binding protein 3 (SAPB3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defence response. *PNAS*, 99: 11640-11645.

Smart C.M., Scofield S.R., Bevan M.W., Dyer T.A., (1991): Delayed leaf senescence in tobacco plants transformed with *TMR*, a gene for cytokinin production in *Agrobacterium*. *Plant Cell*, 3: 647-656.

Somers D.A., Samac D.A., Olhoft P.M., (2003): Recent advances in legume transformation. *Plant Physiol.*, 131: 892-899.

Song F., Goodman R.M., (2001): Activity of nitric oxide is dependent on, but is partially required for function of, salicylic acid in the signaling pathway in tobacco systemic acquired resistance. *MPMI*, 14: 1458-1462.

Stacey G., M^cAlvin C.B., Kim S.Y., Olivares J., Soto M.J., (2006): Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.*, 141: 1473-1481.

Stöhr C., Strube F., Marx G., Ullrich W.R., Rockel P., (2001): A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta*, 212: 835-841.

Stougaard J., (2001): Genetics and genomics of root symbiosis. *Plant Biol.*, 4: 328-350.

Sugiyama M., Ito J., Aoyagi S., Fukuda H., (2000): Endonucleases. *Plant Mol. Biol.*, 4: 387-397.

Swidzinski J.A., Leaver C.J., Balk J., (2006): Balancing life and death: the role of the mitochondrion in programmed cell death. *Plant Physiology On Line*. L.Taiz & E. Ziger, eds, <http://4e.plantphys.net> Essay 11.8.

Thomas H., Smart C.M., (1993): Crops that stay green. *Ann. Appl. Biol.*, 123: 193-219.

Thomas H., Ougham H.O., Wagstaff C., Stead A.D., (2003): Defining senescence and death. J. Exp. Bot., 54: 1127-1132.

Traas J.A., Beven A.F., Doonan J.H., Cordewener J., Shaw P.J., (1992): Cell-cycle-dependent changes in labelling of specific phospho-proteins by monoclonal antibody MPM-2 in plant cells. Plant J., 2: 723-732.

Trauth B.C., Keeseey J., (1996): Cell death, in guide to cell proliferation and apoptosis methods. Catalogo Boehringer Mannheim.

Trieu A.T., Harrison M.J., (1996): Rapid transformation of *Medicago truncatula*: regeneration via shoot organogenesis. Plant Cell Rep., 16: 6-11.

Tun N.N., Holk A., Scherer G.F.E., (2001): Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin. FEBS Lett., 509: 174-176.

Vacca R.S., de Pinto M.C., Valenti D., Passarella S., Marra E., De Gara L., (2004): Production of reactive oxigene species, alteration of cytosolyc ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco bright-yellow 2 cells. Plant Physiol., 134: 1100-1112.

Van Gestel K., Verbelen J.P., (2002): Giant mitochondria are response to low level pressure in cells of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). J. Exp. Bot., 371: 1215-1218.

van Spronsen P.C., Tak T., Rood A.M., van Brussel A.A.N., Kljne J.W., Boot K.J.M., (2003): Salicylic acid inhibits indeterminate-type nodulation but not determinate-type nodulation. MPMI, 16: 83-91.

Vaux D.L., Korsmeyer S.J., (1999): Cell death in development. Cell, 96: 245-254.

Vianello A., Zancani M., Peresson C., petrussa E., Casolo V., Krajnakova J., PatuiS., Braidot E., Macri., (2007): Plant mitochondrial pathway leading to programmed cell death. *Physiol., Plantarum*, 129: 242-252.

Wang H., Li J., Bostock R.M., Gilchrist D.G., (1996) Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell*, 8: 375-391.

Wang M., Oppedijk B.J., Lu X., Van Duijn B., Shilperoort R.A., (1996) Apoptosis in barley aleurone during germination and its inhibition by abscissic acid. *Plant Mol. Biol.*, 32: 1125-1134.

Weaver L. M., Gan S., Quirino B., Amasino R.M., (1998): A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol. Biol.*, 37: 455-469.

Wood M., Power J.B., Davey M.R., Lowe K.C., Mulligan B.J., (1998): Factor affecting single-strand-preferring nuclease activity during leaf aging and dark-induced senescence in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Sci.*, 131: 149-159.

Yao N., Greenberg J.T., (2006): Arabidopsis *ACCELERATED CELL DEATH 2* modulates programmed cell death. *Plant Cell*, 18: 397-411.

Yamasaki H., Sakihama Y., (2000): Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: *in vivo* evidence for NR dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett.*, 468: 89-92.

Yoshida S., (2003) Molecular regulation of leaf senescence. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6: 79-84.

Yoshinaga K., Arimura S., Niwa Y., Tsutsumi N., Uchimiya H., Kawai-Yamada M. (2005): Mitochondrial behaviour in the early stage of ROS stress leading to cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Annals Bot.*, 96: 337-342.

Young N.D., Cannon S.B., Sato S., Kim D., Cook D.R., Town C.D., Roe B.A., Tabata S. (2005): Sequencing the genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.*, 137: 1174-1181.

Yuan J. (2007): Transducing signals of life and death. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9: 247-251.

Zago E., Morsa S., Dat J.F., Alard P., Ferrarini A., Inzé D., Delledonne M., Van Breusegem F. (2006): Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death in tobacco. *Plant Physiol.*, 141: 404-411.

Zapata J.M., Guerra A., Esteban-Carrasco A., Martin M., Sabater B. (2005): Chloroplasts regulate leaf senescence: delayed senescence in transgenic *ndhF*-defective tobacco. *Cell Death Diff.*, 12: 1277-1284.

Zhang S., Klessig D.F. (1998): The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. *PNAS*, 95: 7225-7230.

Zhao J., Fujita K., Sakai K. (2007): Reactive oxygen species, nitric oxide, and their interactions play different roles in *Cupressus lusitanica* cell death and phytoalexin biosynthesis. *New Phytol.*, 175: 215-229.

Zottini M., Formentin E., Scattolin M., Carimi F., Lo Schiavo F., Terzi M. (2002): Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality in vivo. *FEBS Lett.*, 515: 75-78.

Zottini M. (2004): Nitric oxide and plant mitochondria. Chapter 11, pp 219-237. In: *Nitric Oxide Signalling in Higher Plants*. (Eds Magalhaes J.R., Singh R.P., Passos L.P.) Studium Press, LLC, Houston, USA.

Zottini M., Barizza E., Bastianelli F., Carimi F., Lo Schiavo F., (2006): Growth and senescence of *Medicago truncatula* cultured cells are associated with characteristic mitochondrial morphology. New Phytol., 172: 239-247.

Zottini M., Costa A., De Michele R., Ruzzane M., Carimi F., Lo Schiavo F., (2007): Salicylic acid activates nitric oxide synthesis in *Arabidopsis*. J. Exp. Bot., 58: 1397-1405.

Ringraziamenti

Per prima cosa vorrei ringraziare il mio tutor, la prof.ssa Fiorella Lo Schiavo per avermi dato la possibilità di fare il Dottorato nel suo laboratorio e per i suoi suggerimenti, non solo per il lavoro di questa tesi.

Ringrazio anche di tutto cuore la dott. Michela Zottini per avermi insegnato molto, non solo dal punto di vista scientifico ma anche umano.

Un grazie di tutto cuore va agli altri amici del laboratorio e non, passati e presenti, che in questi anni mi sono stati molto vicini e che hanno reso indimenticabile il periodo del mio Dottorato: Elisabetta, Elide&Stefano, Roberto, Alex, Marzia, Chiara, Cristina, Mario, Vijay, Smruti, Stefania e Marco.

Grazie di tutto cuore anche alla mia famiglia (essendo molto numerosa la raggruppato), con un pensiero speciale a chi ora non c'è più.

Un ringraziamento non basta per esprimere quello che vorrei dire ad una persona per me speciale. In ogni modo dedico un ringraziamento particolare a Fabio, per avere percorso assieme a me questi tre anni di Dottorato e spero di percorrere con lui tutta la vita.

Grazie mille anche alle mie più care amiche, Giovanna (futura testimone di nozze) e Michela, per avere condiviso con me le gioie ed i problemi della vita quotidiana.

Infine una citazione che ho sempre cercato di applicare:

“Bisogna chiamare scienza soltanto

l'insieme delle ricette che riescono sempre.

Tutto il resto è letteratura”

Paul Valéri.

Grazie.