

# RIASSUNTO

Si stima che la popolazione umana, entro il 2050, raggiungerà i 9 miliardi. Per far fronte alla maggiore richiesta alimentare, sarà necessario migliorare e incrementare la produzione di semi, che sono alla base della nostra catena alimentare. Nelle Angiosperme, i semi vengono prodotti in seguito al processo di doppia fecondazione. Pertanto, lo studio di questo processo e dei suoi principali fattori che lo regolano risulta essere molto importante.

Il processo di doppia fecondazione coinvolge l'interazione tra i gametofiti femminili e maschili, che sono rispettivamente il sacco embrionale, racchiuso nell'ovulo e il tubo pollinico. Il sacco embrionale maturo è composto da sette cellule: la cellula uovo, la cellula centrale (diploide), tre cellule antipodali e due cellule sinergidi. Le due sinergidi svolgono un ruolo importante durante la doppia fecondazione: sono responsabili della produzione e della secrezione di molecole segnale che guidano i tubi pollinici verso l'ovulo; percepiscono l'arrivo del tubo pollinico e ne arrestano la crescita; infine una delle due cellule sinergidi, quella che entra in contatto con il tubetto pollinico, altresì chiamata sinergide recettiva, media tramite morte cellulare programmata, il burst del tubetto pollinico, necessario per il rilascio delle cellule spermatiche. A seguito di questo evento, una delle due cellule spermatiche si dirige verso la cellula uovo, la feconda e dando origine allo zigote/embrione; l'altra, fecondando la cellula centrale, formerà l'endosperma, il tessuto che fornisce nutrimento allo zigote/embrione.

È stato dimostrato, in *Arabidopsis thaliana*, che i fattori di trascrizione MADS-Box SEEDSTICK (STK), SHATTERPROOF1 (SHP1) e SHP2 regolano in modo ridondante l'identità dell'ovulo; ulteriori studi di interazione genetica e proteica hanno dimostrato che questi fattori di identità dell'ovulo interagiscono con il fattore di trascrizione SEPALLATTA 3 (SEP3) e che queste interazioni sono essenziali per la loro funzione nello sviluppo dell'ovulo (Favaro et al., 2003).

Sono stati individuati come target diretti del complesso STK-SEP3, *VERDANDI (VDD)* e *VALKYRIA (VAL)*, appartenenti alla famiglia dei fattori di trascrizione dei meristemi riproduttivi (REM) (M. Hernandez et al., 2010 e M. Mendes et al., 2013, 2016). Analisi di interazione (BIFC) hanno mostrato che VDD e VAL sono in grado di interagire e formare un dimero.

I mutanti per *VDD* e *VAL* hanno evidenziato difetti legati alla perdita d'identità delle cellule sinergidi e connessi alle funzioni svolte dalle stesse. Analisi al confocale e al TEM hanno permesso di scoprire che in entrambi i mutanti, la cellula sinergide recettiva non degenerava all'arrivo del tubetto pollinico, impedendo così, il burst del tubetto pollinico e di conseguenza al rilascio delle due cellule spermatiche.

Per scoprire i possibili target del complesso dei fattori di trascrizione VDD-VAL, è stata eseguita un'analisi di RNA-sequencing su pistilli maturi raccolti da piante mutanti *vddM (vdd-1 x VDD\_RNAi)*, che ha rivelato *CKX7*, *CKX6* e *CRK9*-

*EP1* come possibili target in quanto l'espressione di tali geni risultava essere significativamente ridotta nel background *vddM*.

Pertanto, l'obiettivo di questa tesi è stato quello di indagare il ruolo di questi presunti target del complesso VDD- VAL nella funzione delle sinergidi.

Per raggiungere questo obiettivo sono stati progettati esperimenti specifici durante i quali sono state analizzate diverse linee transgeniche e mutanti. Tra queste, mutanti inserzionali, linee di over-espressione utilizzando un promotore specifico per le sinergidi (*pMYB98*), marcatori sia per la biosintesi delle citochinine (*pIPT1::GUS*) sia per il loro pathway di signalling (*TCSn :: GFP*).

Le citochinine sono fitormoni coinvolti nell'attivazione del ciclo cellulare e nella differenziazione cellulare. Mantenere l'omeostasi dei livelli di citochinine è importante per il corretto sviluppo dell'ovulo. Alterazioni nei livelli di citochinine influenzano il numero, lo sviluppo degli ovuli e la dimensione del seme (Chia-Yi Cheng e Joseph J. Kieber, 2013).

*CKX6* e *CKX7* sono due citochinine ossidasi / deidrogenasi, coinvolte nella degradazione irreversibile delle citochinine. Per valutare l'ipotesi del coinvolgimento delle citochinine nella morte programmata della cellula sinergide recettiva, si è deciso di studiare l'espressione del fitormone con la linea reporter *TCSn :: GFP* in background wild-type e *vdd-1*. Dalle nostre analisi, in *vdd-1* background il signalling delle citochinine è risultato alterato mostrando un segnale anomalo nel lato micropilare, in corrispondenza delle sinergidi. Questa alterazione nel signalling suggerisce che nel mutante *vdd-1* un accumulo ectopico di citochinine nel micropilo potrebbero essere collegato alla mancata morte cellulare della cellula sinergide recettiva. Inoltre, il fenotipo di doppi mutanti inserzionali *ckx6-2* e *ckx7-1* ha mostrato un difetto gametofitico. Per trovare una migliore correlazione tra i livelli di citochinine e l'assenza di degenerazione della sinergide recettiva, si è deciso di analizzare il fenotipo della linea transgenica, *pMYB98 :: IPT1*, dove l'espressione del gene *IPT1* (precursore della biosintesi della citochinina) è guidata dal promotore specifico per le sinergidi, aumentando così i livelli di citochinine nelle cellule sinergidi.

Si è osservata una situazione simile a quella vista nei mutanti di *verdandi* e *valkyria*: gli ovuli che riuscivano a completare il loro sviluppo riuscivano anche ad attrarre il tubetto pollinico, dimostrando che l'attrazione del tubetto pollinico non era compromessa. Comunque, nonostante tutti gli ovuli maturi venivano raggiunti da almeno un tubetto pollinico, il processo di fecondazione non avveniva, dal momento che si è osservata un'alta percentuale di ovuli non fecondati all'interno delle silique.

Sempre nell'ambito dello studio delle citochinine, è interessante notare che associato a *CKX6* vi è un long non coding antisense naturale, *AT3G63445*; dal momento che questo trascritto potrebbe svolgere un ruolo nella regolazione di *CKX6* o di altri geni, si è deciso di utilizzare la tecnologia di RNA interference per ridurre l'espressione dell'antisense.

Come secondo obiettivo di questa tesi, si è voluto indagare anche il possibile ruolo di *CRK9-EP1* nelle synergidi, in quanto anche l'espressione di questo gene è risultata essere significativamente ridotta nel mutante *vddM*

*CRK9-EP1* appartiene ai recettori RLK ricchi di residui cisteinici e potrebbe essere coinvolto nella ricezione del tubetto pollinico, infatti i recettori RLK sono già stati descritti in processi di morte programmata cellulare e anche in risposta immunitaria nelle piante. Per scoprire il possibile coinvolgimento della funzione *CRK9-EP1* nella degenerazione sinergica, è stato analizzato il fenotipo delle linee di TDNA, *SALK\_085648 (ep1-1)* e *SALK\_080814 (ep1-2)*, controllando se questi mostrassero difetti legati al gametofito femminile come ad esempio, ovuli non fecondati, semi abortiti o diminuzione del numero totale di ovuli. Una delle due linee, *ep1-2* in cui *CRK9-EP1* risultava down-espresso, mostrava un difetto gametofitico, con un alta percentuale di ovuli non fecondati. Come strategia alternativa per l'analisi funzionale di *EP1*, è stato deciso di usare la tecnica di genome-editing CRISPR/Cas9 per modificare / eliminare una porzione del gene *CRK9-EP1*.

I risultati ottenuti hanno permesso di proporre un modello attraverso il quale descrivere il possibile ruolo delle citochinine e di *CRK9-EP1* nel controllo della morte cellulare programmata nella sinergide recettiva.