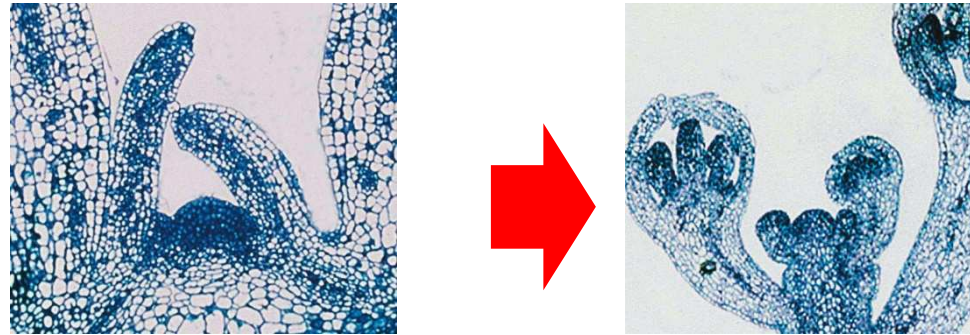




I'INDUZIONE FIOREALE

La transizione fiorale è uno dei più drastici cambiamenti che si hanno nel ciclo vitale di una pianta

MAV dalla produzione di foglie passa alla formazione del fiore

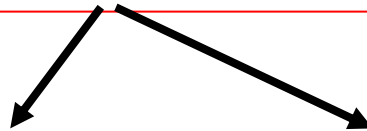


Cambiamento brusco e irreversibile

Regolato da un complesso network di geni

Il momento in cui si determina la transizione è determinato da una serie di fattori: AMBIENTALI ed ENDOGENI

Induzione fiorale: insieme degli eventi che avvengono nel
MAV e portano alla produzione di fiori



Fattori interni: regolazione autonoma
p. es età della pianta

Stimoli esterni: fotoperiodismo
vernalizzazione



Regolazione del tempo di fioritura

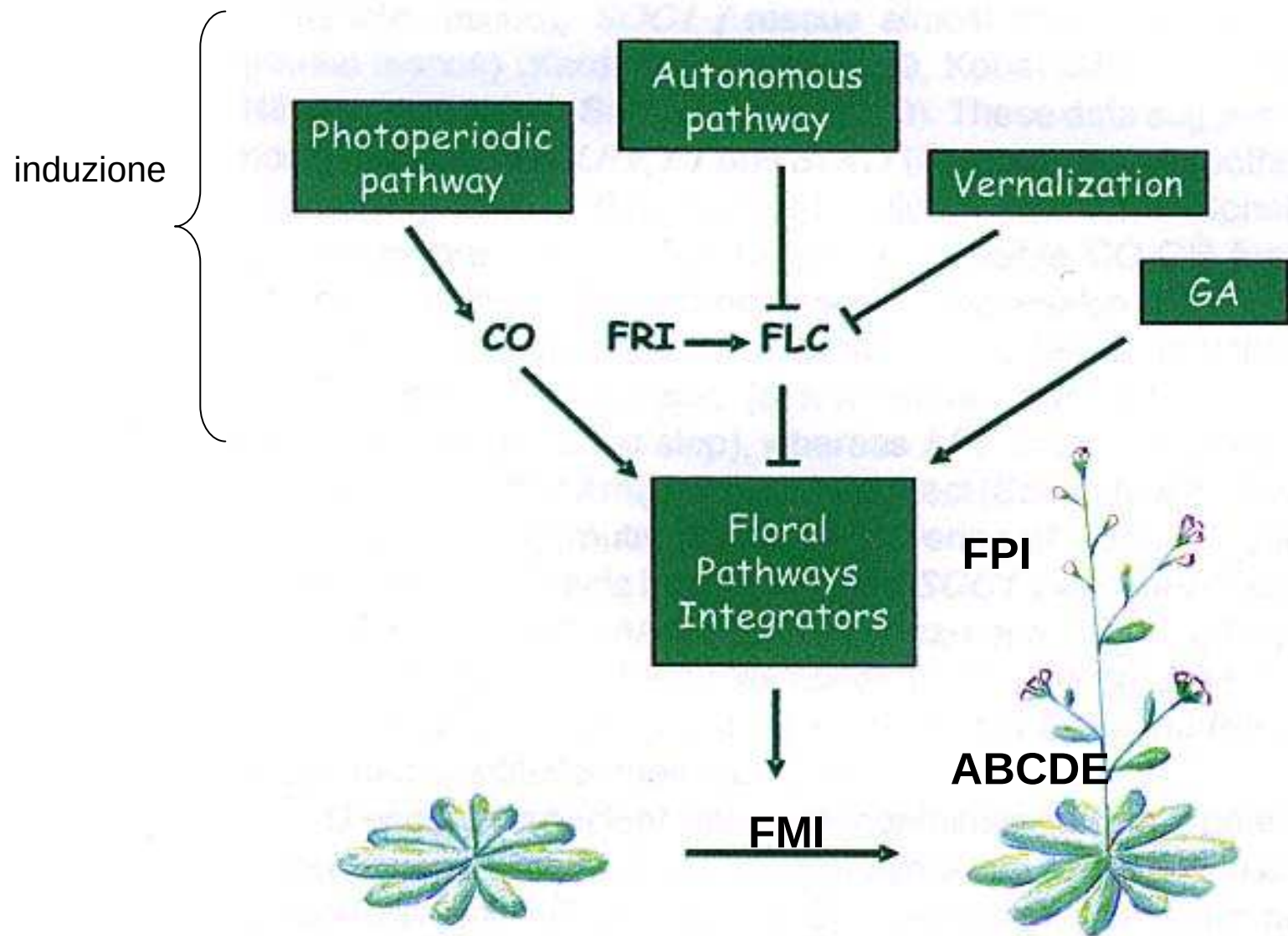


Fig. 1. Main pathways reaching Floral Pathways Integrators

➤ GENI DI INDUZIONE FIOREALE (vie fotoperiodo
vernalizzazione, autonomia ormonale)

➤ GENI INTEGRATORI DEI PATHWAYS DI
INDUZIONE FIOREALE (FPI)

➤ GENI DI IDENTITA' MERISTEMATICA (FMI)

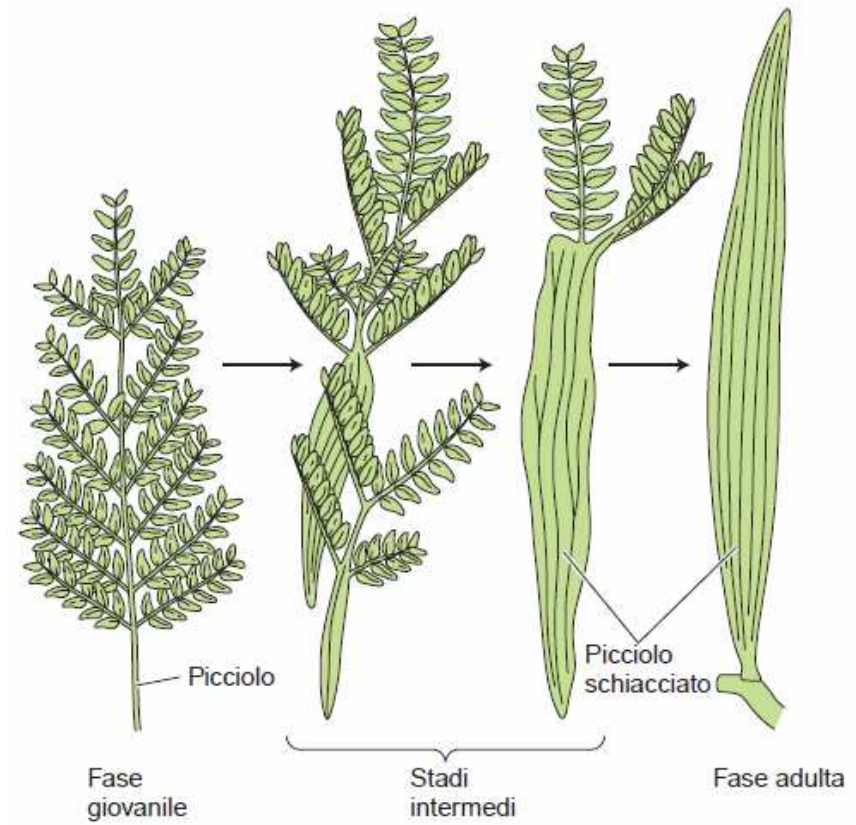
➤ GENI DI IDENTITA' DEGLI ORGANI DEL FIORE
(ABCDE)

MERISTEMA DELL'APICE VEGETATIVO: TRE STADI DI SVILUPPO

- Fase giovanile
- Fase adulta vegetativa
- Fase adulta riproduttiva

Da fase giovanile ad adulta vegetativa cambiamenti nella morfologia, fillotassi, più evidenti nelle specie arboree perenni

Hedera helix



Acacia heterophylla

TABELLA S25.1.1
Caratteristiche delle fasi adulte e giovanili di edera e mais

Carattere	Giovanile	Adulto
Edera (<i>Hedera helix</i>)		
Forma della foglia	Intera	Lobata
Spessore della foglia	230 μm	330 μm
Fillotassi ^a	Alternata	Spirale
Plastocrono ^b	1 settimana	2 settimane
Tipo di crescita	Orizzontale	Verticale
Antocianine	Presenti	Assenti
Radici aeree	Presenti	Assenti
Capacità radicante	Buona	Scarsa
Fiori	Assenti	Presenti
Mais (<i>Zea mays</i>)		
Spessore della cuticola	1 μm	3 μm
Forma delle cellule epidermiche	Circolare	Rettangolare
Cere epicutcolari	Presenti	Assenti
Radici aeree	Presenti	Assenti
Cellule bulbose ^c	Assenti	Presenti
Gemme laterali	A barra di timone ^d	Spighe o assenti

Fonte: Poethig 1990.

^a Dislocazione delle foglie sul fusto

^b Tempo che passa fra le fasi di produzione delle foglie

^c Grandi cellule dell'epidermide superiore, presenti nella famiglia delle graminacee, il cui cambiamento di turgore controlla l'arrotolamento della foglia

^d Rami che si formano alla base del fusto

I cambiamenti di fase sono influenzati da segnali trasmissibili: rifornimento di carboidrati (saccarosio), ormoni (gibberelline).

TABELLA 25.1
Lunghezza del periodo giovanile in alcune piante legnose

Specie	Lunghezza del periodo giovanile
Rosa	20-30 giorni
Vite	1 anno
Melo	4-8 anni
<i>Citrus</i> spp.	5-8 anni
Edera	5-10 anni
<i>Sequoia sempervirens</i> (Redwood)	5-15 anni
Acero	15-20 anni
Quercia	25-30 anni
Faggio	30-40 anni

➤ INDUZIONE FIORALE:

➤ COMPETENZA

➤ DETERMINAZIONE



Competente: in grado di rispondere allo stimolo

Determinato : in grado di eseguire il programma di sviluppo anche se rimosso dal contesto fisiologico normale

ESPERIMENTI CON INNESTI

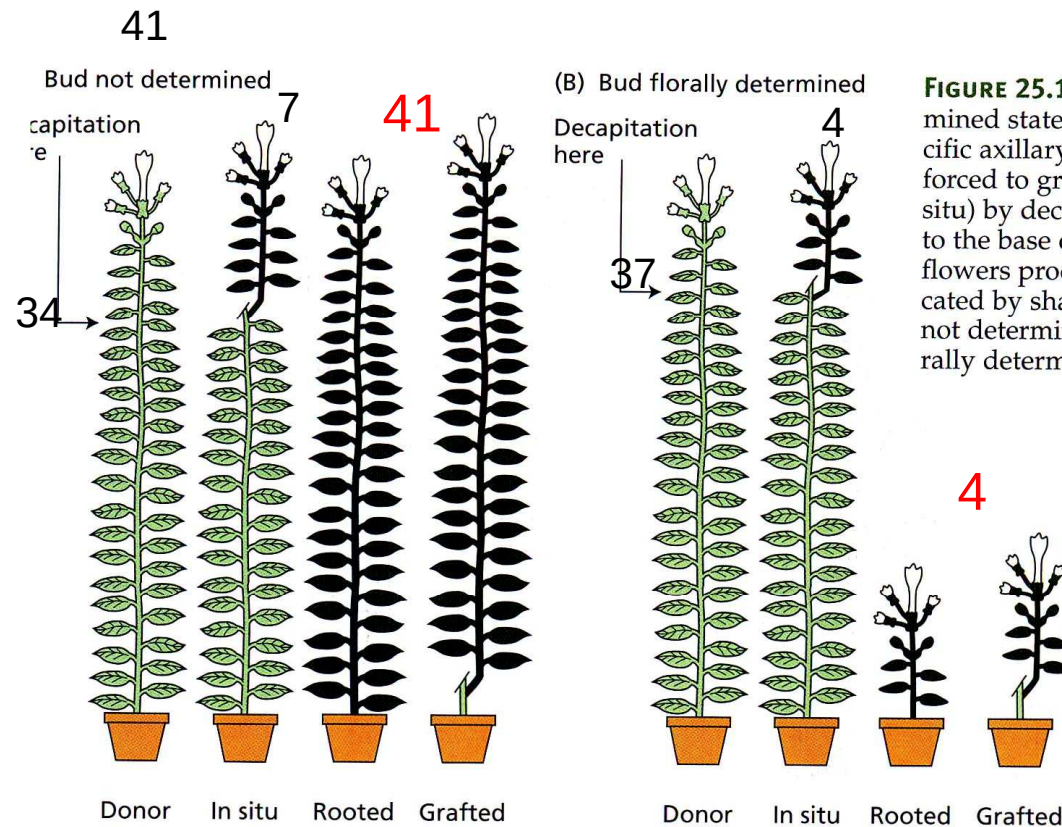
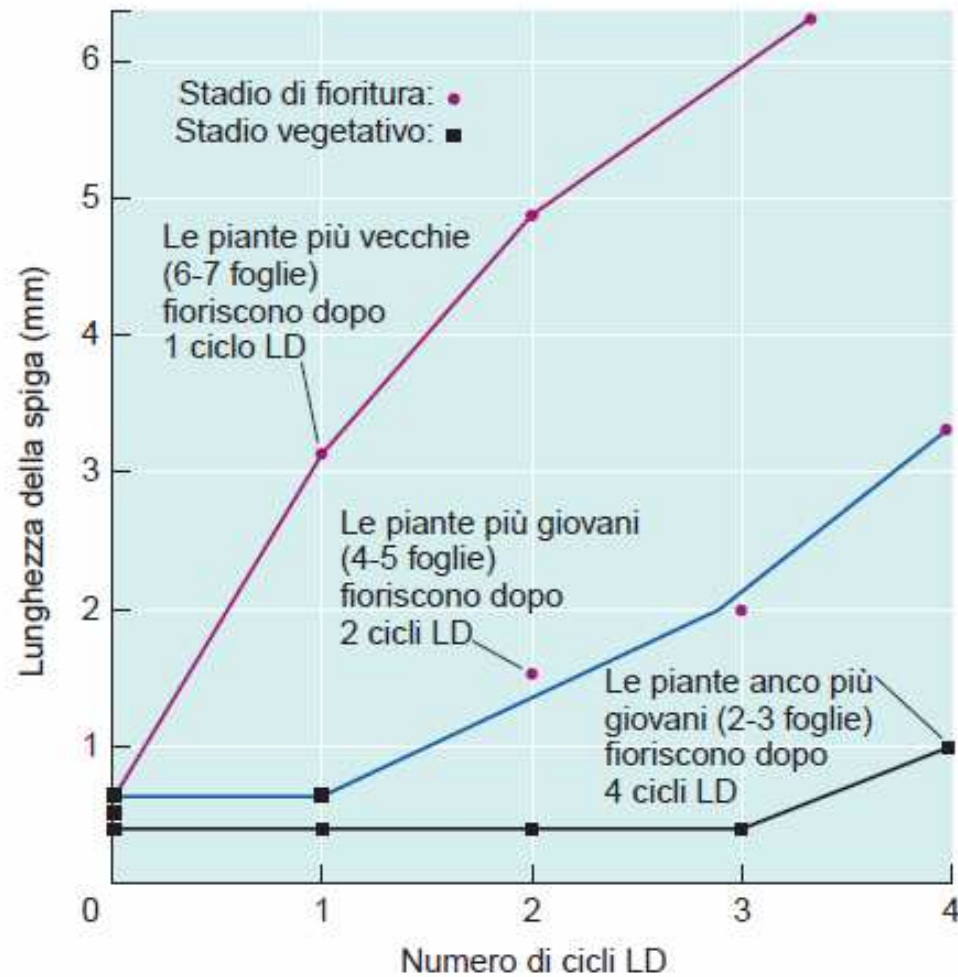


FIGURE 25.13 Demonstration of the determined state of axillary buds in tobacco. A specific axillary bud of a flowering donor plant is forced to grow, either directly on the plant (in situ) by decapitation, or by rooting or grafting to the base of the plant. The new leaves and flowers produced by the axillary bud are indicated by shading. (A) Result when the bud is not determined. (B) Result when the bud is florally determined. (After McDaniel 1996.)

La gemma fiorisce anche se innestata su una pianta in stato vegetativo che non produce stimolo florale

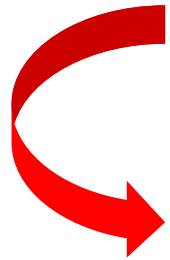
Acquisita la competenza il meristema aumenta la tendenza alla fioritura con l'età (numero di foglie)



Tra i fattori induttivi della fioritura : **DURATA DEL GIORNO**

le piante percepiscono la durata del giorno

gli organismi misurano il tempo



OROLOGIO BIOLOGICO

I ritmi circadiani sono un esempio di orologio biologico

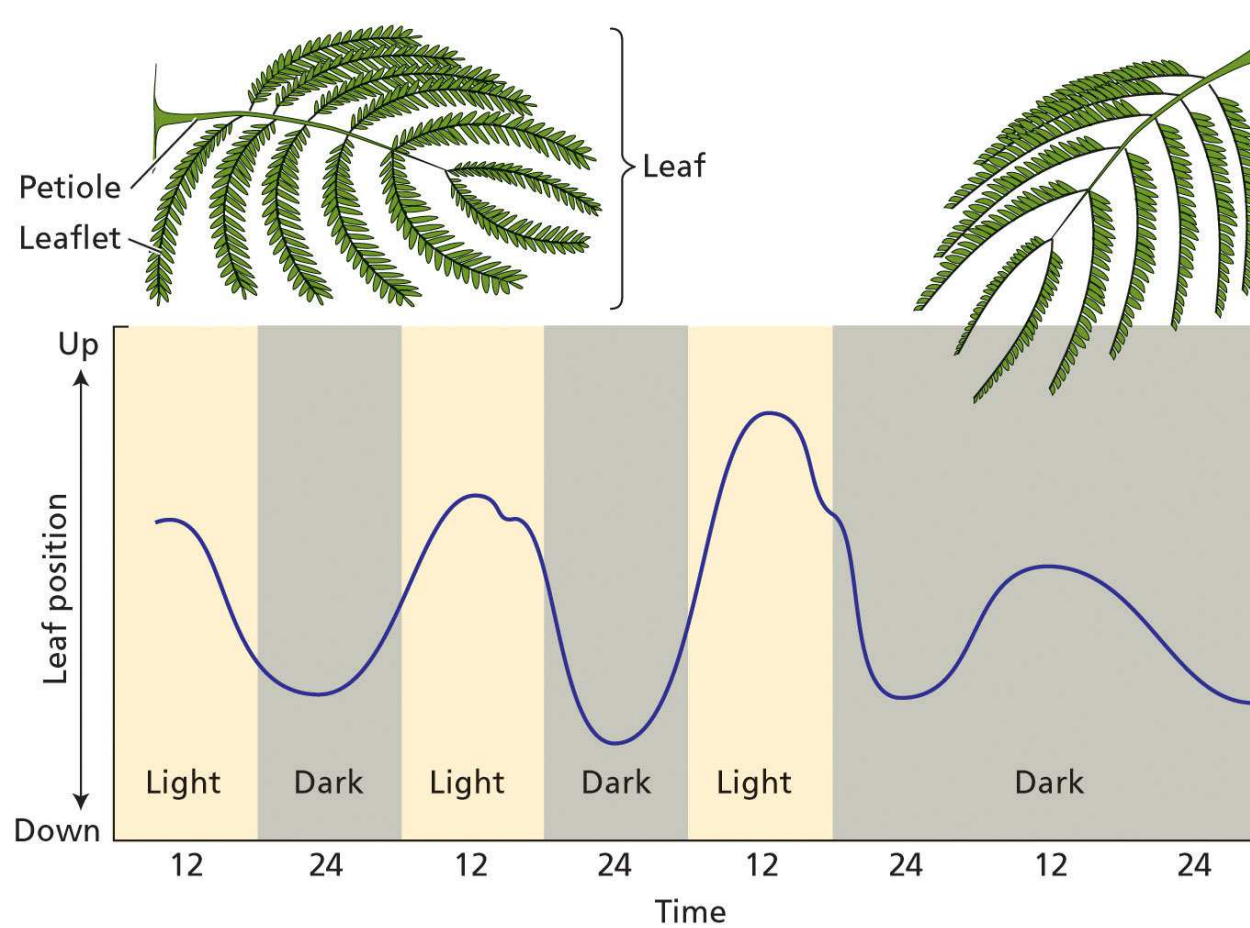
I RITMI CIRCADIANI

ritmi fisiologici endogeni di piante e animali associati alla durata del giorno

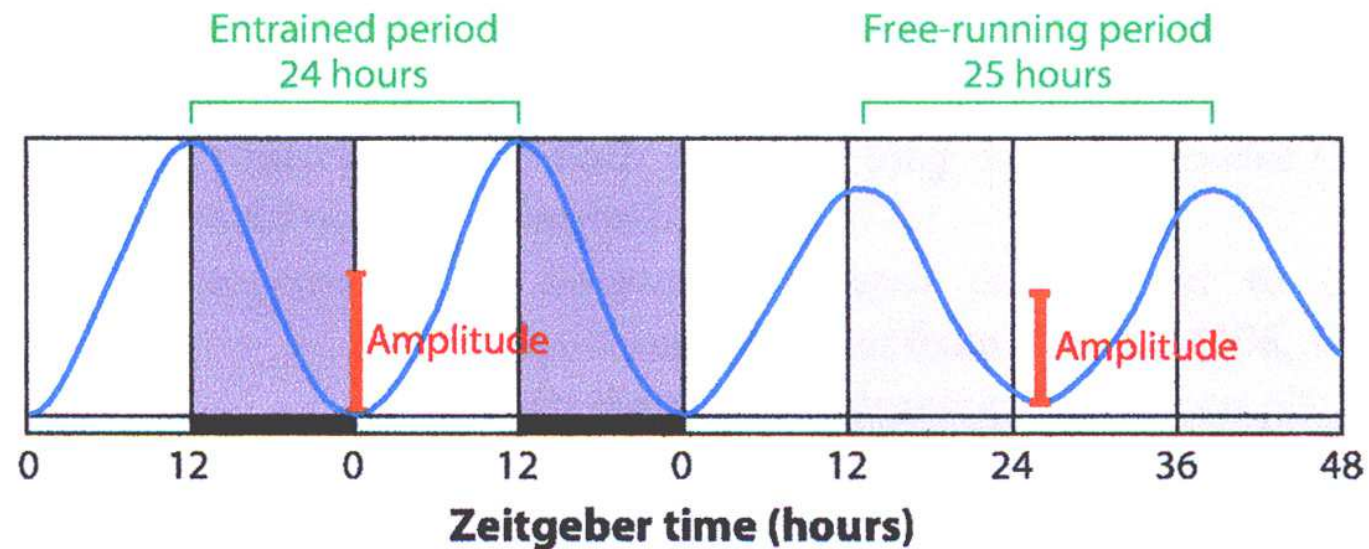
negli animali: ciclo veglia/sonno

piante: posizione delle foglie,
apertura/chiusura stomi, petali, fotosintesi

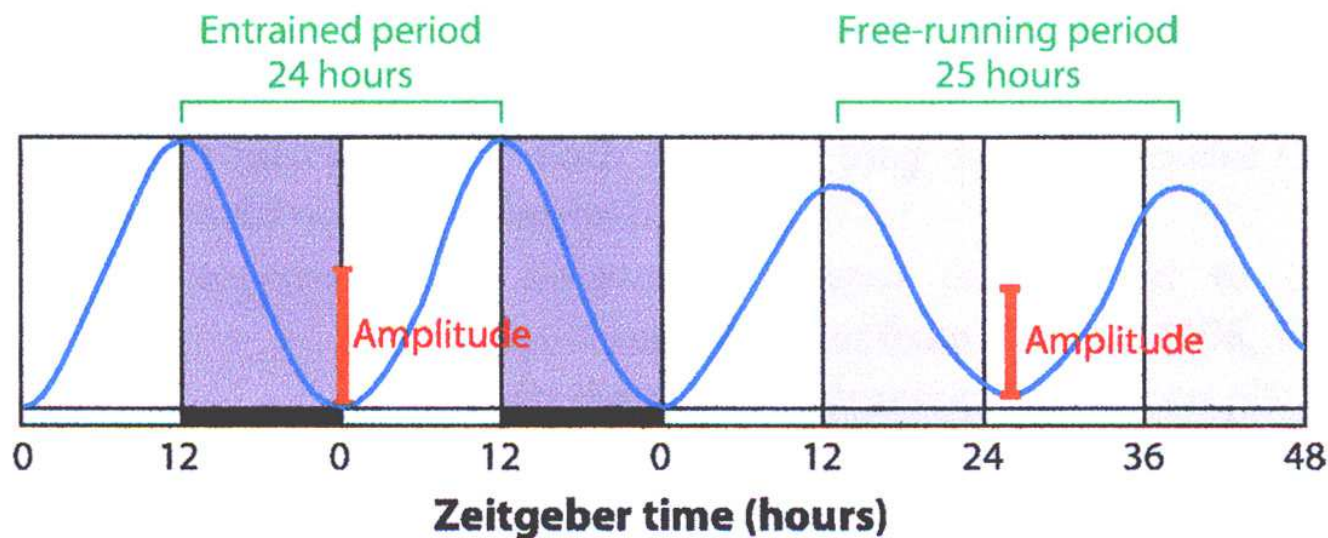
RITMO CIRCADIANO NEI MOVIMENTI DIURNI DELLE FOGLIE DI Albizzia



I ritmi endogeni assumono la forma di onde sinusoidali descrivibili in termini matematici da grandezze come periodo, fase, ampiezza



Se trasferiti in luce o buio continui molti di questi ritmi permangono per un certo tempo ma tendono a sfasarsi rispetto al periodo di 24 h



RITMI ENDOGENI

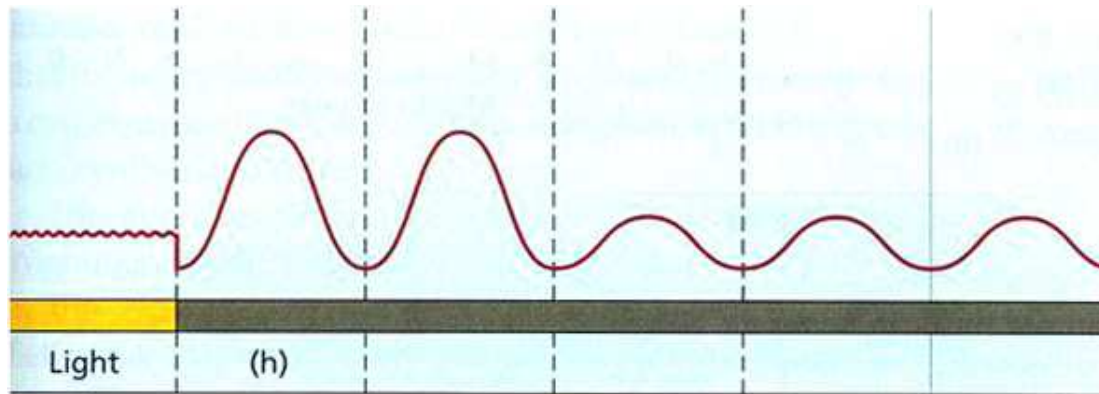
e durano **circa** 24 ore “CIRCA DIEM”

In condizioni naturali questi ritmi sono sincronizzati ad un periodo di 24 ore mediante **segnali ambientali**:

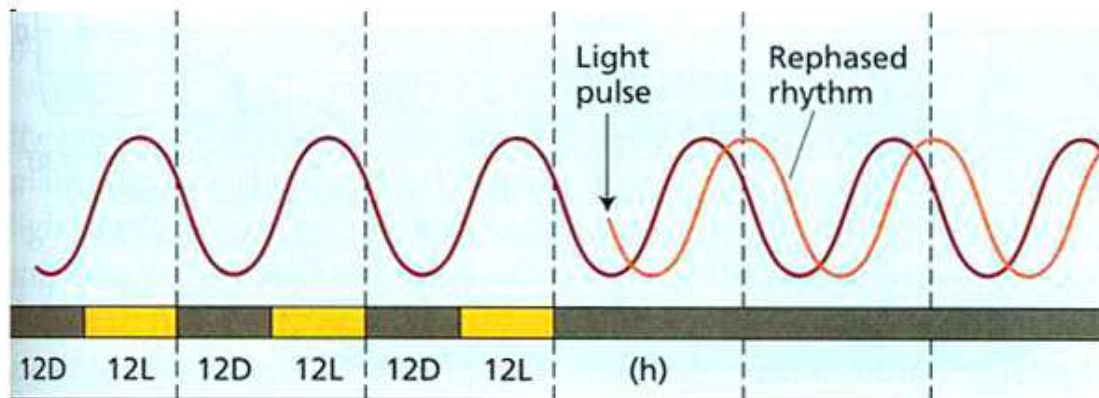
Il segnale ambientale più importante è **la luce**



Transizioni: luce /buio (tramonto) buio/luce (alba)



D)



Lo scorrimento di fase sincronizza il ritmo circadiano con differenti cicli giorno/notte

impulsi di luce nel periodo di buio inducono cambiamenti nella fase del ritmo

- Un impulso dato nelle prime ore della notte soggettiva RITARDA il ritmo
Impulso interpretato come fine del giorno precedente
- Un impulso dato nelle ultime ore della notte soggettiva AVANZA la fase del ritmo
Impulso interpretato come inizio del giorno successivo

gli spostamenti di fase sincronizzano il ritmo endogeno con diversi cicli giorno/notte.

La sensibilità del ritmo ai segnali ambientali è variabile:
a seconda del momento nella notte soggettiva o del giorno
soggettivo uno stimolo può provocare un avanzamento o un
ritardo della fase oppure essere inefficace

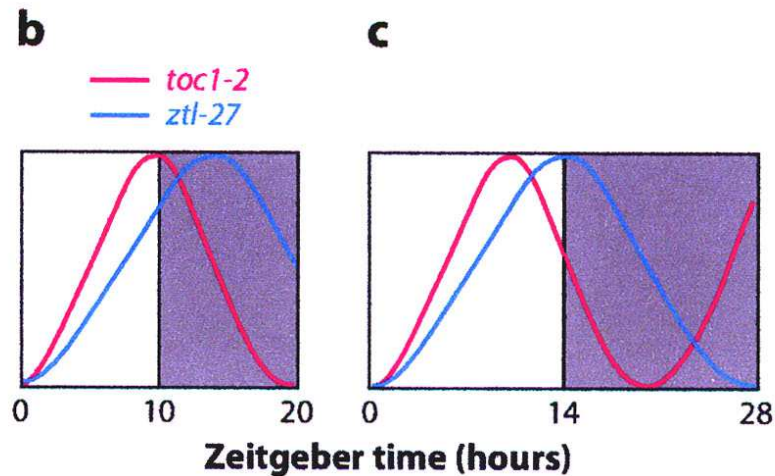
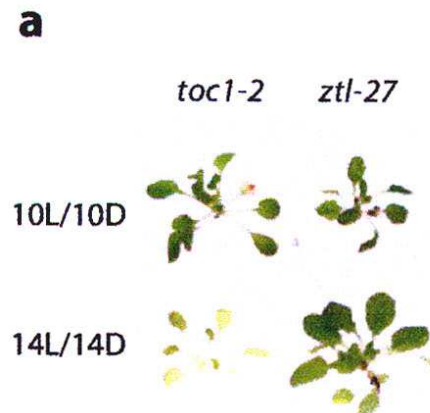


La capacità dell'ambiente di "resettare " l'orologio circadiano è
sotto il controllo dell'orologio stesso

I ritmi endogeni sono molto diffusi in natura: perché?

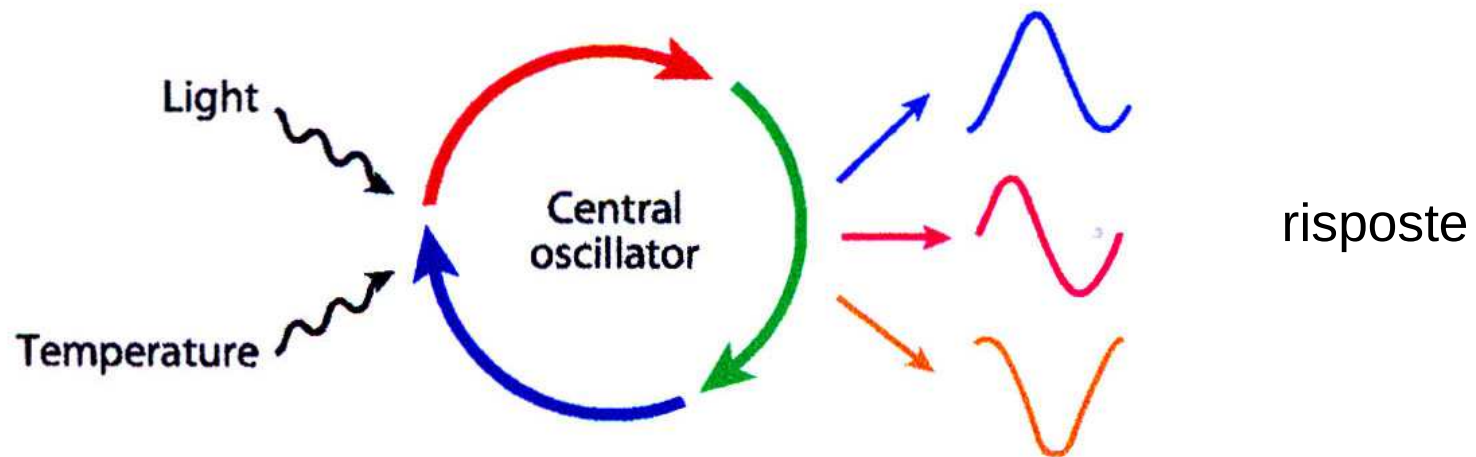
sono un meccanismo adattativo che consente agli organismi di rispondere al tempo opportuno al cambiamento delle condizioni ambientali

Le piante crescono meglio quando il loro ritmo endogeno coincide con quello ambientale



Un sistema circadiano nella sua formulazione più semplificata, si può considerare composto da un **oscillatore endogeno** (central clock) che genera il ritmo e produce delle risposte (outputs) attraverso specifiche vie di trasduzione (signaling pathways)

L'oscillatore può essere “resettato” da segnali ambientali come luce o temperatura





NEGLI ULTIMI ANNI STUDI DI BIOLOGIA MOLECOLARE E DI
GENETICA (mutanti) SULLA PIANTA MODELLO *ARABIDOPSIS*
HANNO PORTATO ALL'INDIVIDUAZIONE DI ALCUNI DEI
COMPONENTI MOLECOLARI DELL'OSCILLATORE
ENDOGENO

TOC1

Piantine trasformate con il gene della luciferasi sotto il controllo del promotore del gene LHCB (CAB)

sistema gene reporter

Il gene LHCB esibisce un ritmo giornaliero di espressione

la luciferasi in presenza di luciferina genera bioluminescenza

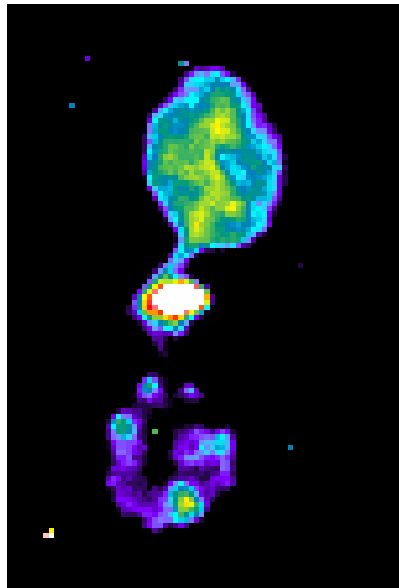
IDENTIFICATI mutanti *toc* (timing of LHCB (CAB) expression)

In questi mutanti si ha perdita del ritmo giornaliero di espressione del gene



toc1 componente dell'oscillatore centrale

Pianta di tabacco trasformata con *PHYB:LUC*, con le foglie sincronizzate su ritmi opposti di 12 ore luce: 12 ore buio



Inoltre isolati i mutanti :

CCA1 (CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED1)

LHY (LATE ELONGATED HYPOCOYLS)

Sono fattori di trascrizione MYB

Mutazioni recessive o espressione costitutiva determinano la perdita del ritmo giornaliero della espressione di diversi geni

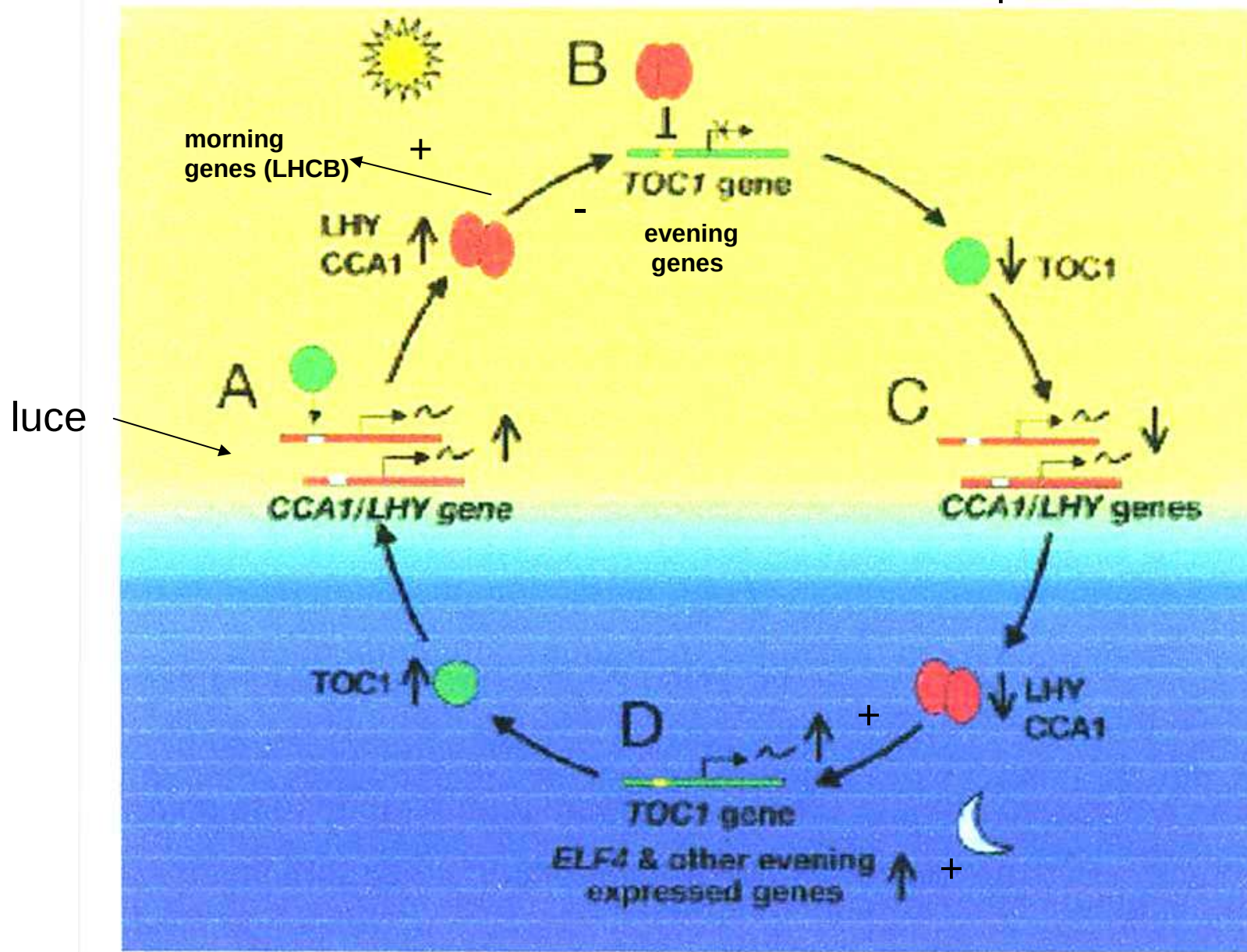


CCA1 e LHY componenti dell'oscillatore

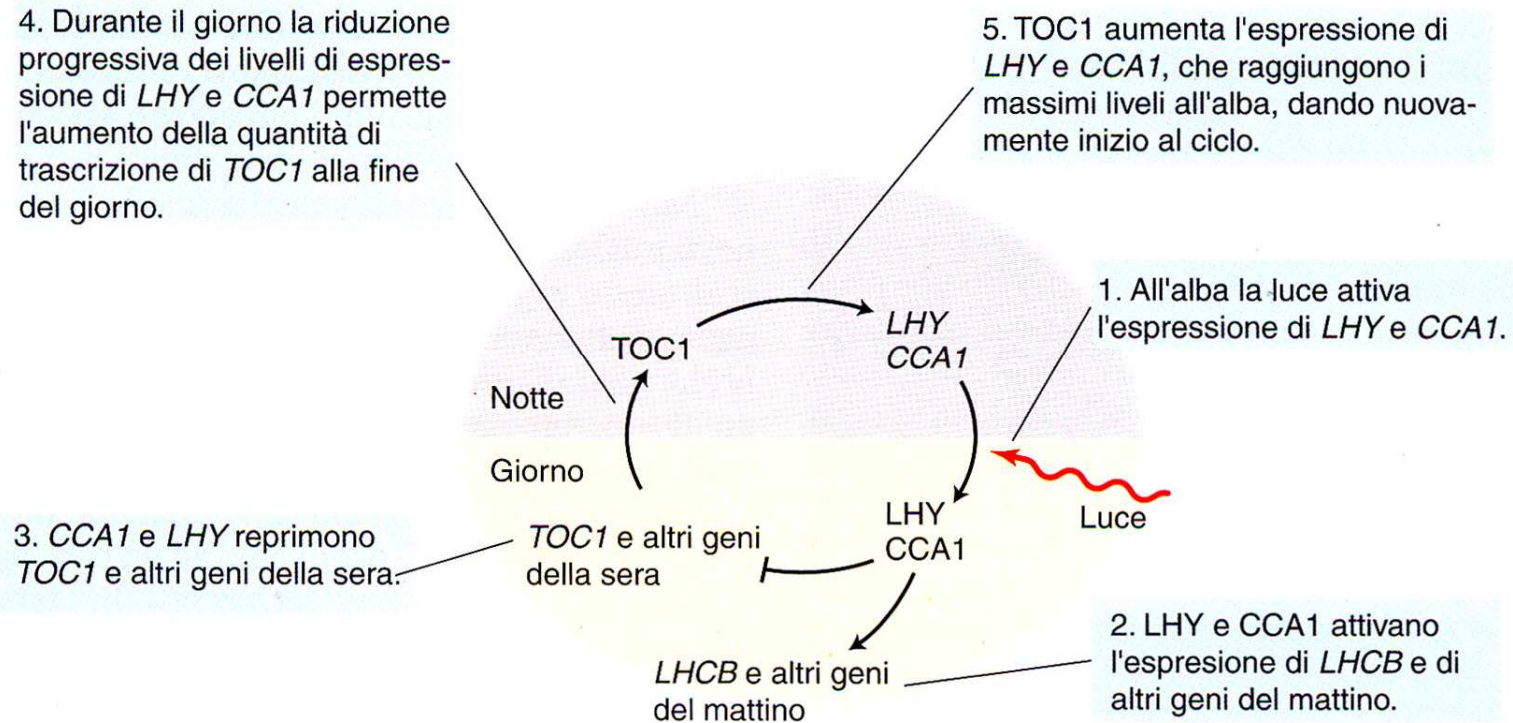
I meccanismi molecolari di base dell'oscillatore endogeno sono conservati nei diversi organismi (piante, animali)

Si basano sull'esistenza di “**loops trascrizionali**” con regolatori positivi e negativi in cui un componente controlla la sua espressione regolando quella degli altri componenti

modello dell'oscillatore centrale in arabidopsis

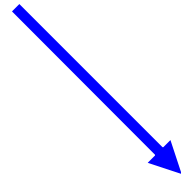


modello dell'oscillatore centrale in arabidopsis



Circadian clock system

Pathways di input
sincronizzazione con
alternanza giorno/notte



Oscillatore centrale
genera ritmi di circa 24 ore



Pathways di output
effetti biochimici, fisiologici, sviluppo: p es Fioritura

Per funzionare correttamente l'oscillatore deve essere sincronizzato con i cicli giornalieri giorno/notte dell'ambiente



FOTORECETTORI (fitocromi, criptocromi ELF3, TIC)

Piante mutanti *phyA* in luce rossa debole: ritmo rallentato

Piante mutanti *phyB* in luce rossa continua: ritmo alterato

CRY1 CRY2 coinvolti nella sincronizzazione mediata da luce blu

Alcuni adattamenti fisiologici delle piante avvengono su una dimensione temporale stagionale piuttosto che giornaliera;



un esempio tipico è la fioritura

La fioritura e' un fenomeno fotoperiodico

il cambiamento della lunghezza del giorno può determinare l'inizio
di un determinato processo

fioritura

riproduzione asessuale

formazione organi di riserva

dormienza

FOTOPERIODISMO: capacità di misurare la lunghezza del giorno
per produrre una risposta fisiologica in un determinato momento dell'anno

I ritmi circadiani e il fotoperiodismo hanno la proprietà comune
di rispondere a cicli giorno/notte

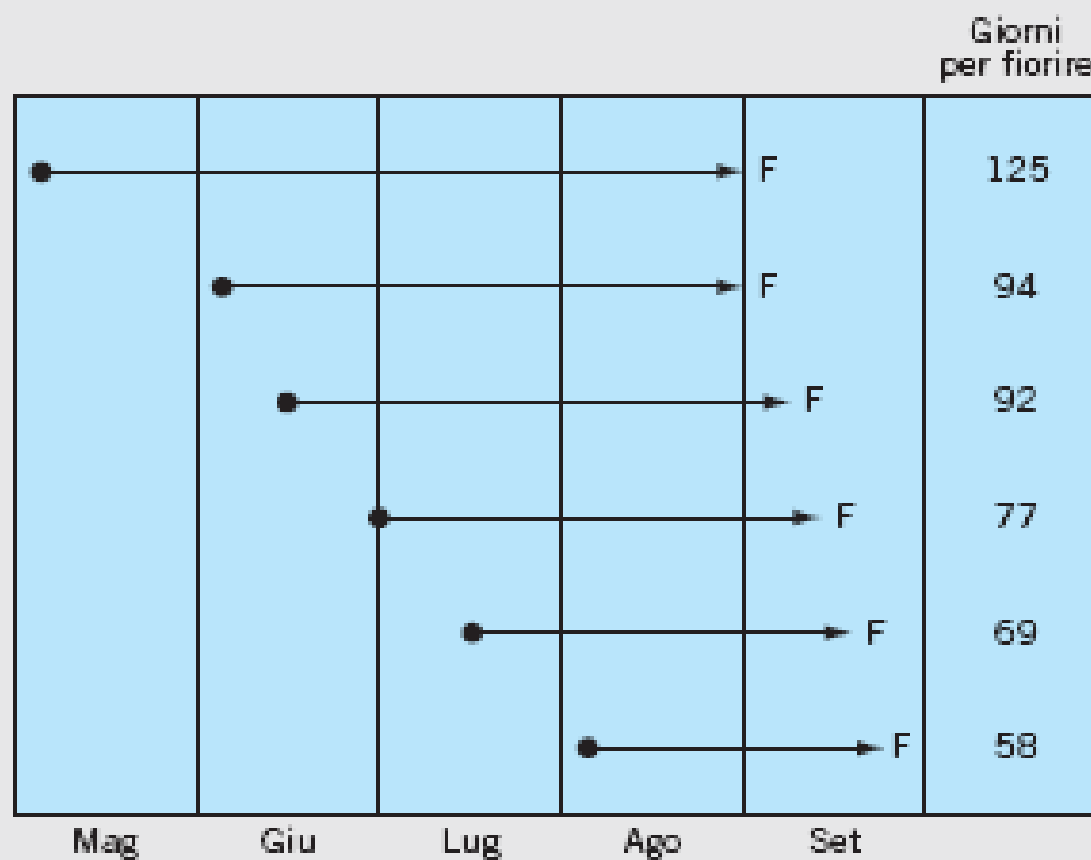
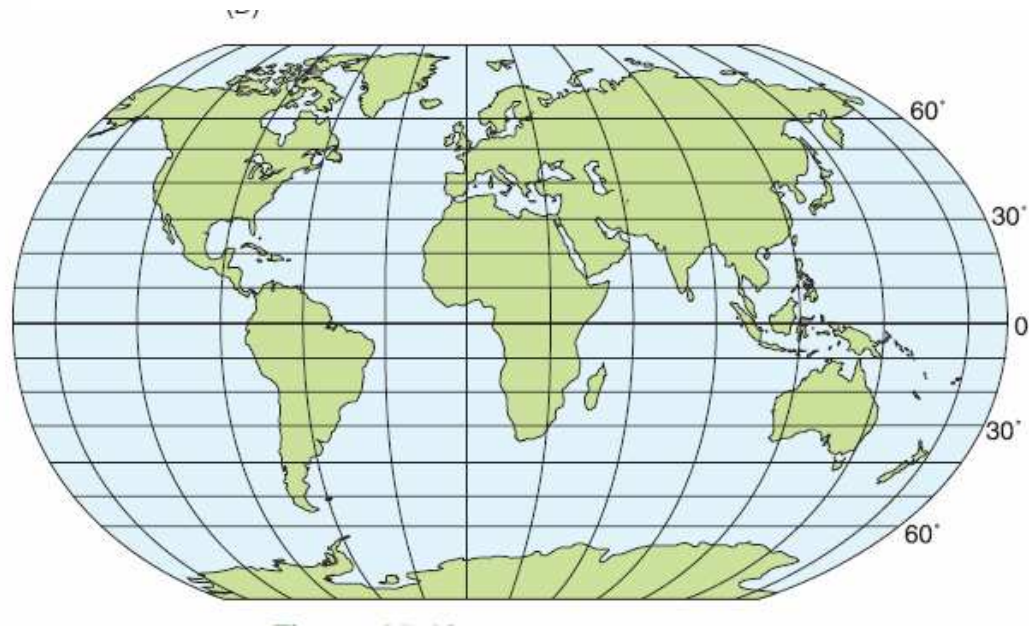
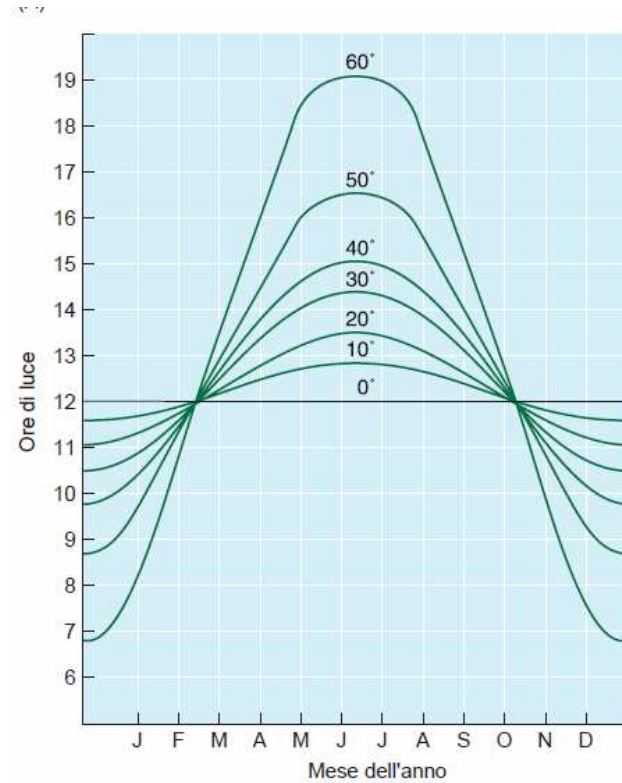


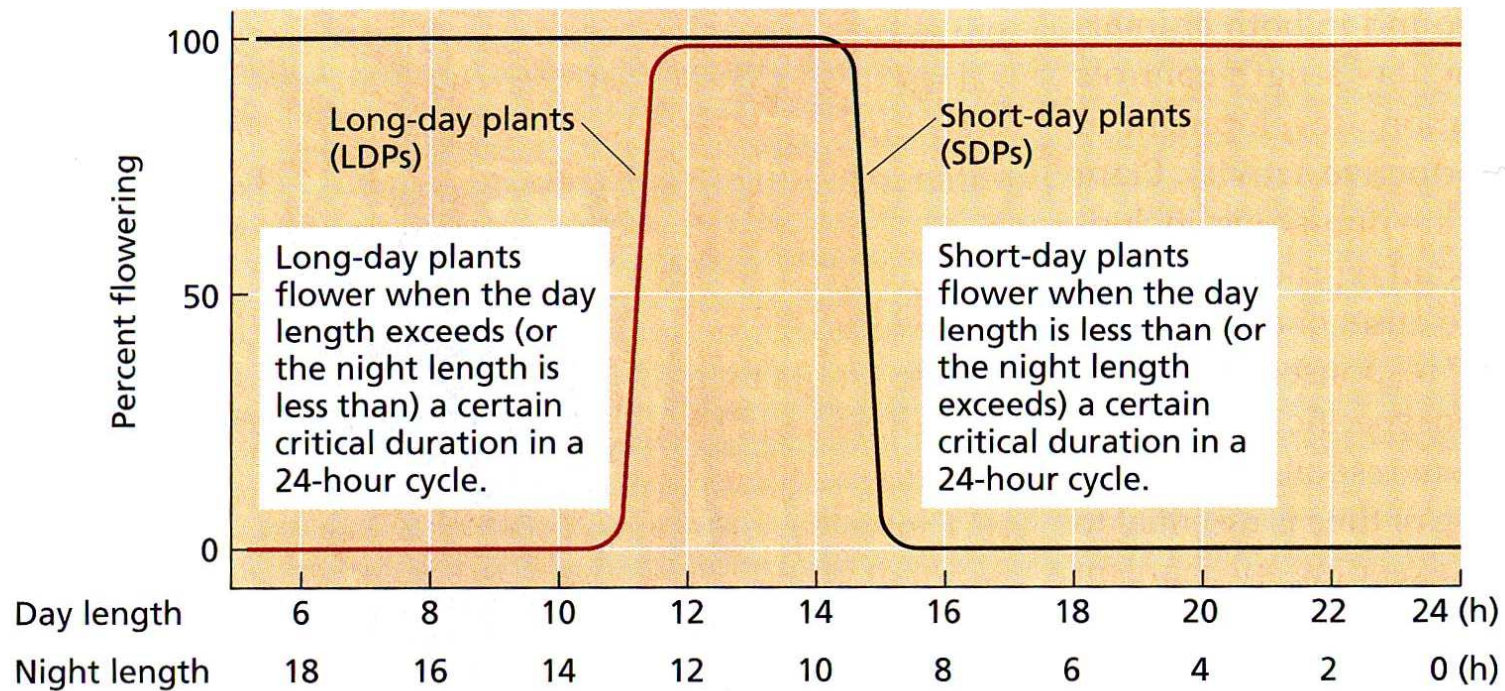
FIGURA 19.1 Piante di soia (*Glycine max*) seminate in diversi momenti lungo un periodo di tre mesi fioriscono tutte in settembre entro tre settimane.

Effetto della latitudine sulla durata del giorno

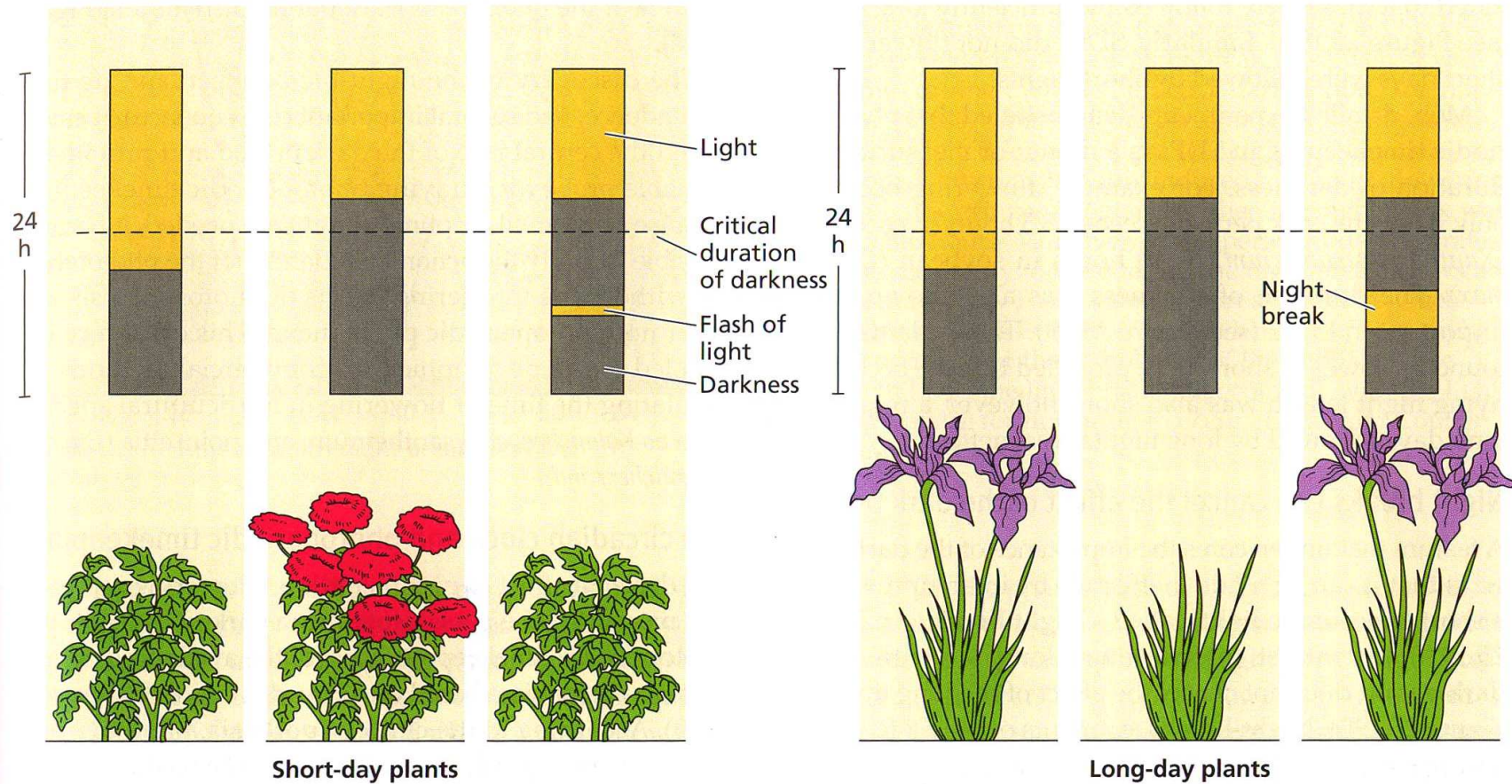


La risposta fotoperiodica è influenzata dalla latitudine alla quale la pianta cresce

Le piante possono essere classificate secondo la loro
risposta fotoperiodica rispetto alla fioritura



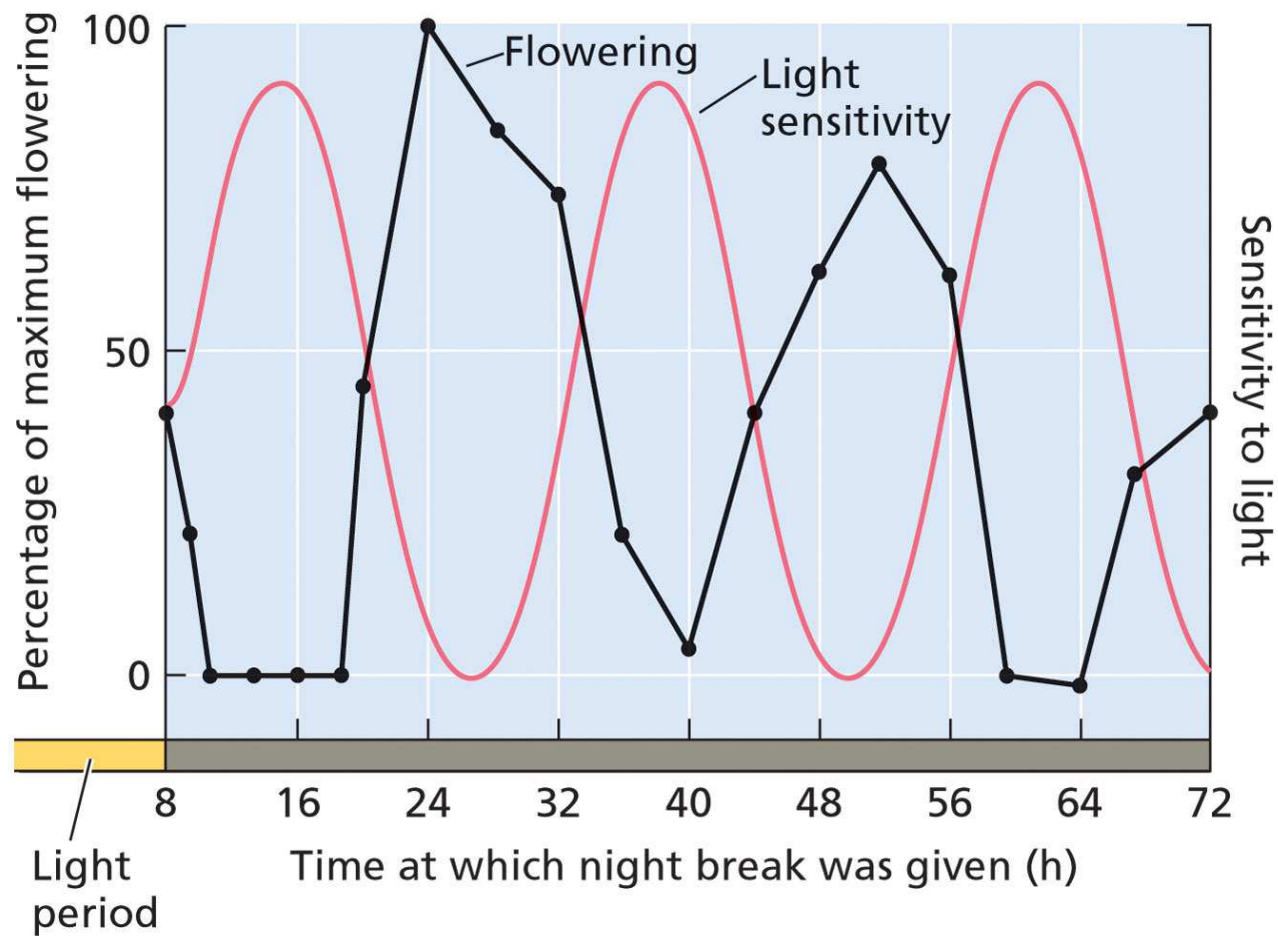
E' CRITICA LA DURATA DEL PERIODO DI BUIO



Fioritura ritmica in risposta a interruzioni del buio nella SOIA (SPD) (8h luce; 64buio)

Int 26 h= massima fioritura

Int 40 h= fioritura nulla



DURANTE IL PERIODO DI BUIO SI ALTERNANO FASI DI SENSIBILITA'
E DI INSENSIBILITA' ALLA LUCE

- Nelle SPD la fioritura è indotta se l'interruzione del buio (alba) avviene dopo il completamento della fase sensibile alla luce
- Nelle LPD si ha fioritura se l'interruzione della notte coincide con la fase sensibile alla luce

La fioritura è un fenomeno fotoperiodico ed è fondamentale la misura del trascorrere del tempo durante il periodo di buio

Ipotesi dell' orologio (Bunning 1936)

- La misura del tempo fotoperiodico si basa su di un **ritmo circadiano** in cui si alternano fasi di sensibilità e fasi di insensibilità alla luce
- La capacità del segnale luminoso di indurre la fioritura dipende dalla fase del ritmo endogeno in cui il segnale viene recepito

Quando il segnale luminoso è percepito durante la fase sensibile del ritmo si può avere

induzione della fioritura (LDP)

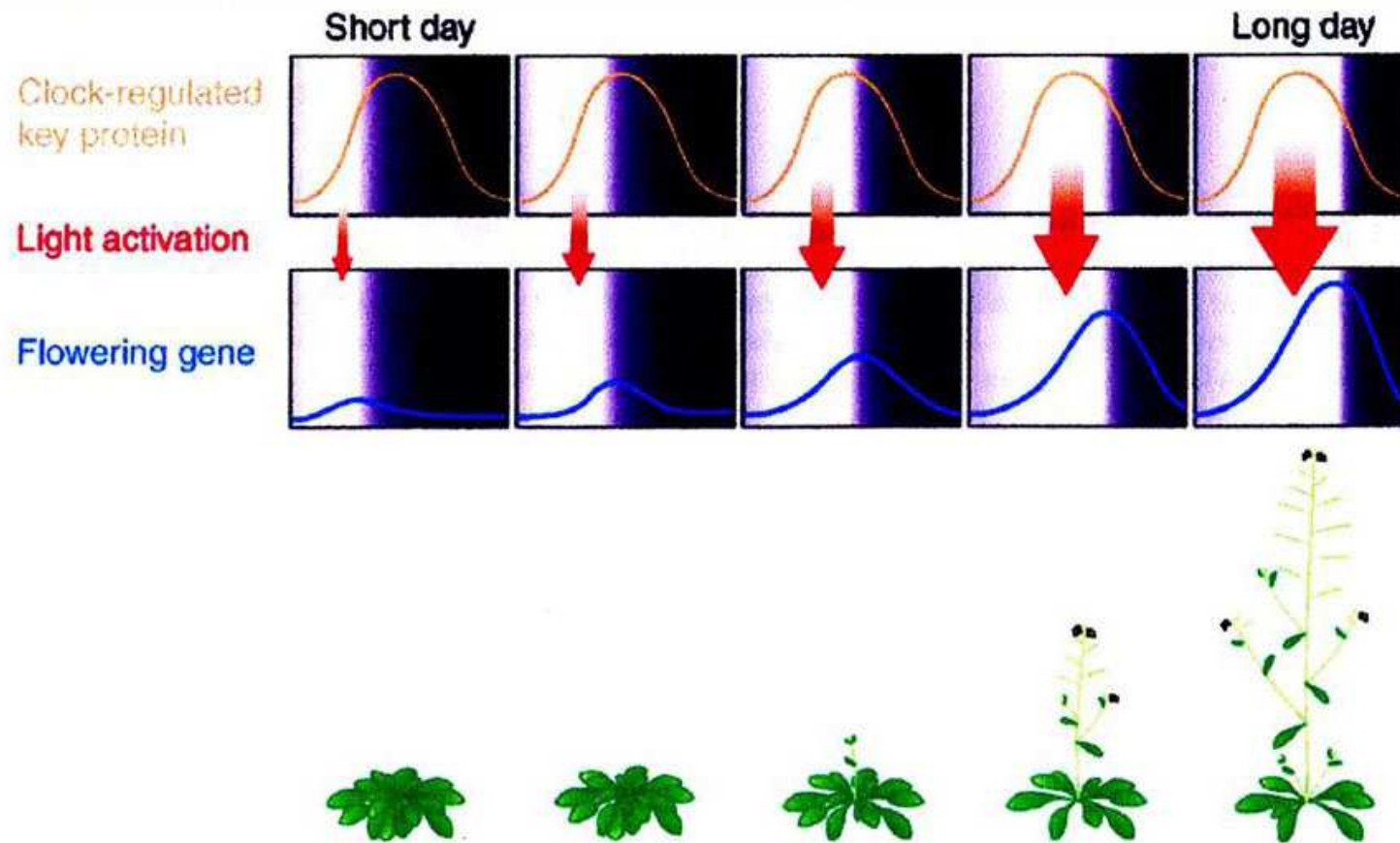
inibizione della fioritura (SDP)

SDP: fioritura se l'impulso è recepito
DOPO il completamento della fase sensibile

LDP: fioritura se l'impulso è recepito
DURANTE la fase sensibile

MODELLO DELLA “COINCIDENZA ESTERNA”

LPD: L'ESPOSIZIONE ALLA LUCE DEVE ESSERE COINCIDENTE CON LA FASE SENSIBILE DEL RITMO ENDOGENO



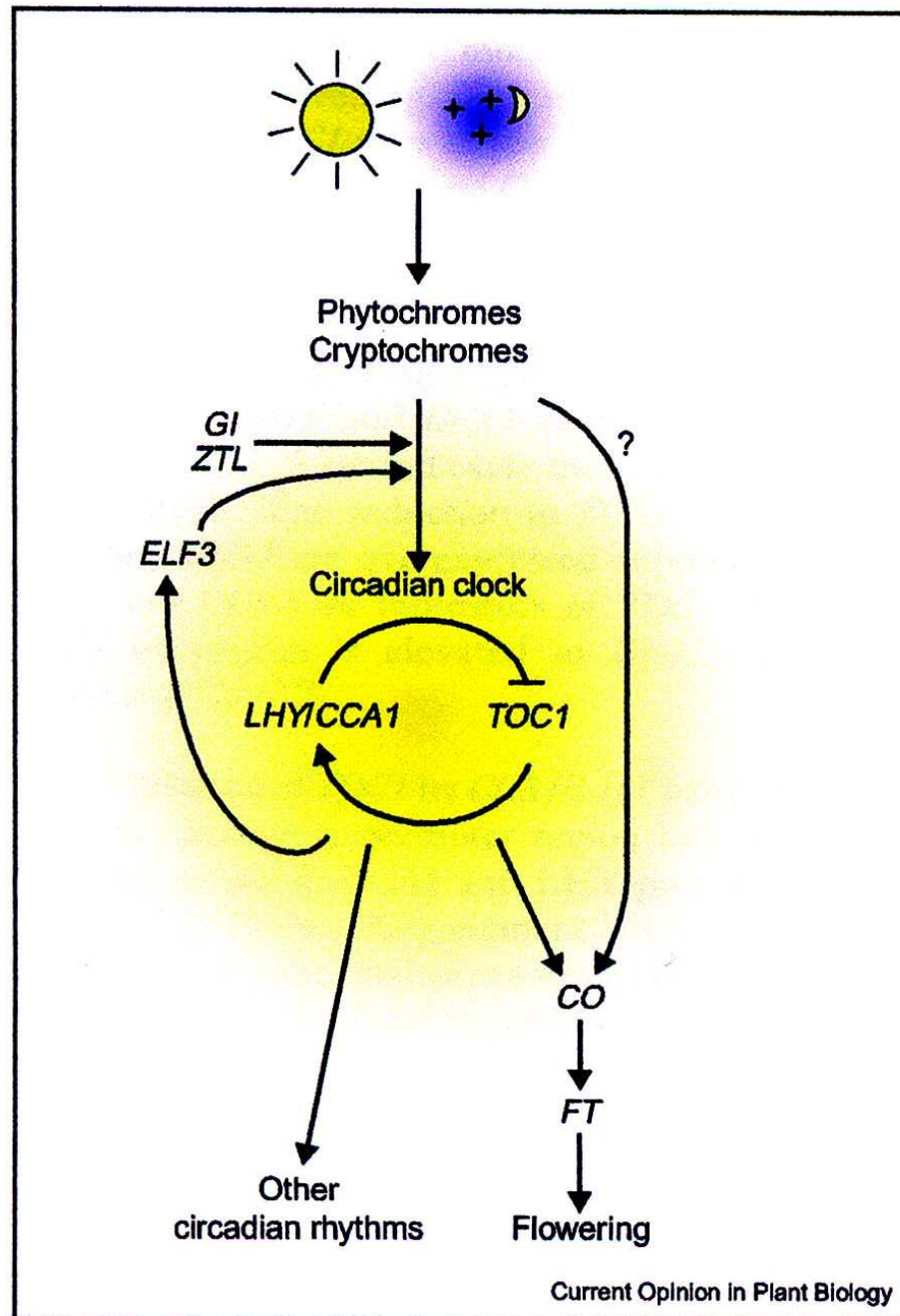
COINCIDENZA ESTERNA

L'orologio circadiano genera una fase **inducibile dalla luce** durante il ciclo giorno/notte

La fioritura si ha quando una particolare durata del giorno espone le piante alla luce durante la fase inducibile

L'interazione tra il ritmo circadiano e la luce avviene a livello della trascrizione del gene **CONSTANS (CO)** e della stabilità della proteina espressa

CONSTANTS determina direttamente la trascrizione del gene FLOWERING LOCUS T (FT) che è un potente induttore della FIORITURA



Nel normale ciclo giorno/notte il mRNA di CO mostra un ritmo giornaliero

- In condizioni di SD si hanno elevati livelli di CO mRNA solo di notte
- In condizioni di LD elevati livelli di CO mRNA si raggiungono alla fine del periodo di luce
- I livelli di CO mRNA determinano la **FASE INDUCIBILE** dalla luce

Modello della COINCIDENZA ESTERNA

La luce ha due funzioni:

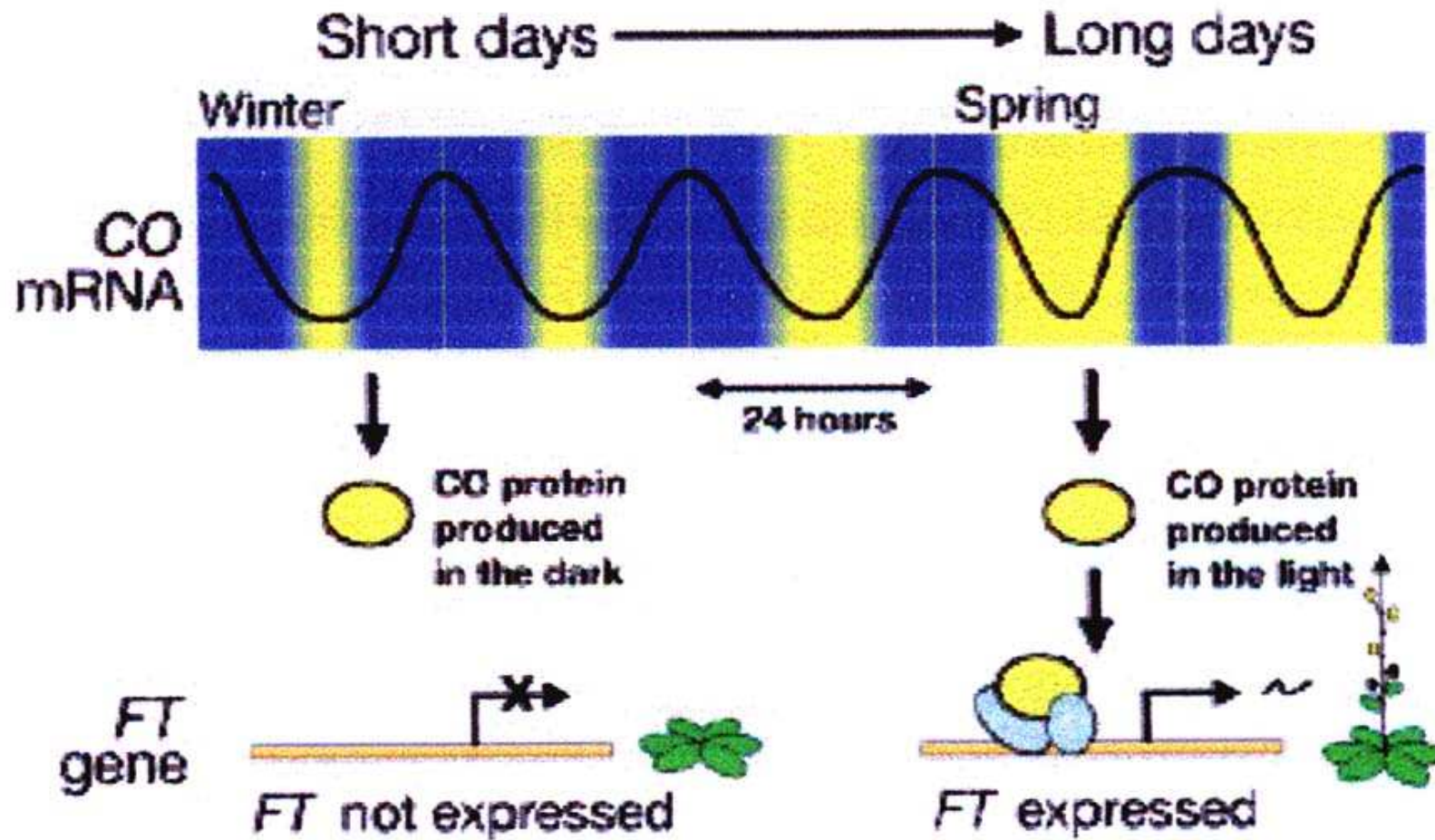
- “resetta” l’orologio circadiano in modo da generare oscillazioni giornaliere di un regolatore chiave della fioritura con picco nel tardo pomeriggio
- regola l’attività di questo componente chiave

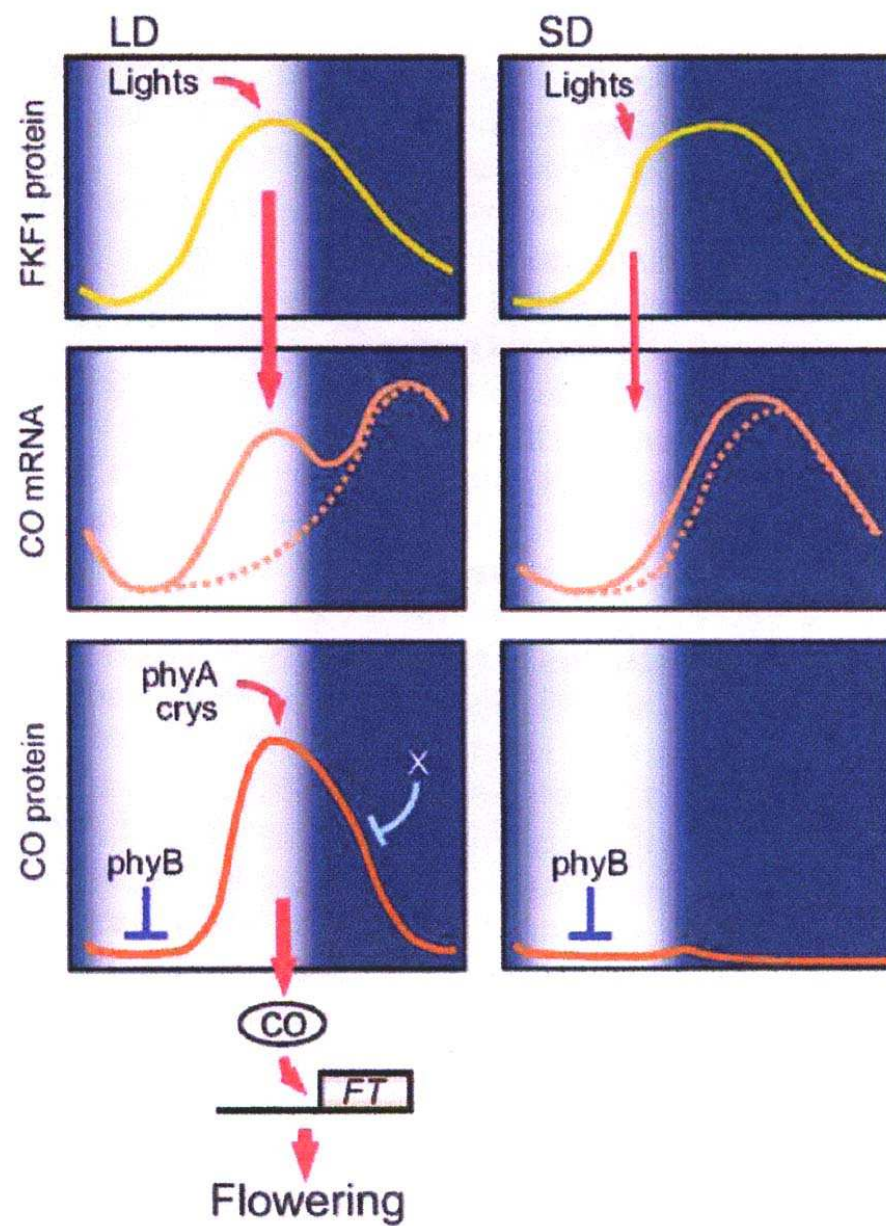
Deve esserci COINCIDENZA tra l'accumulo di mRNA del gene CO e la luce del giorno

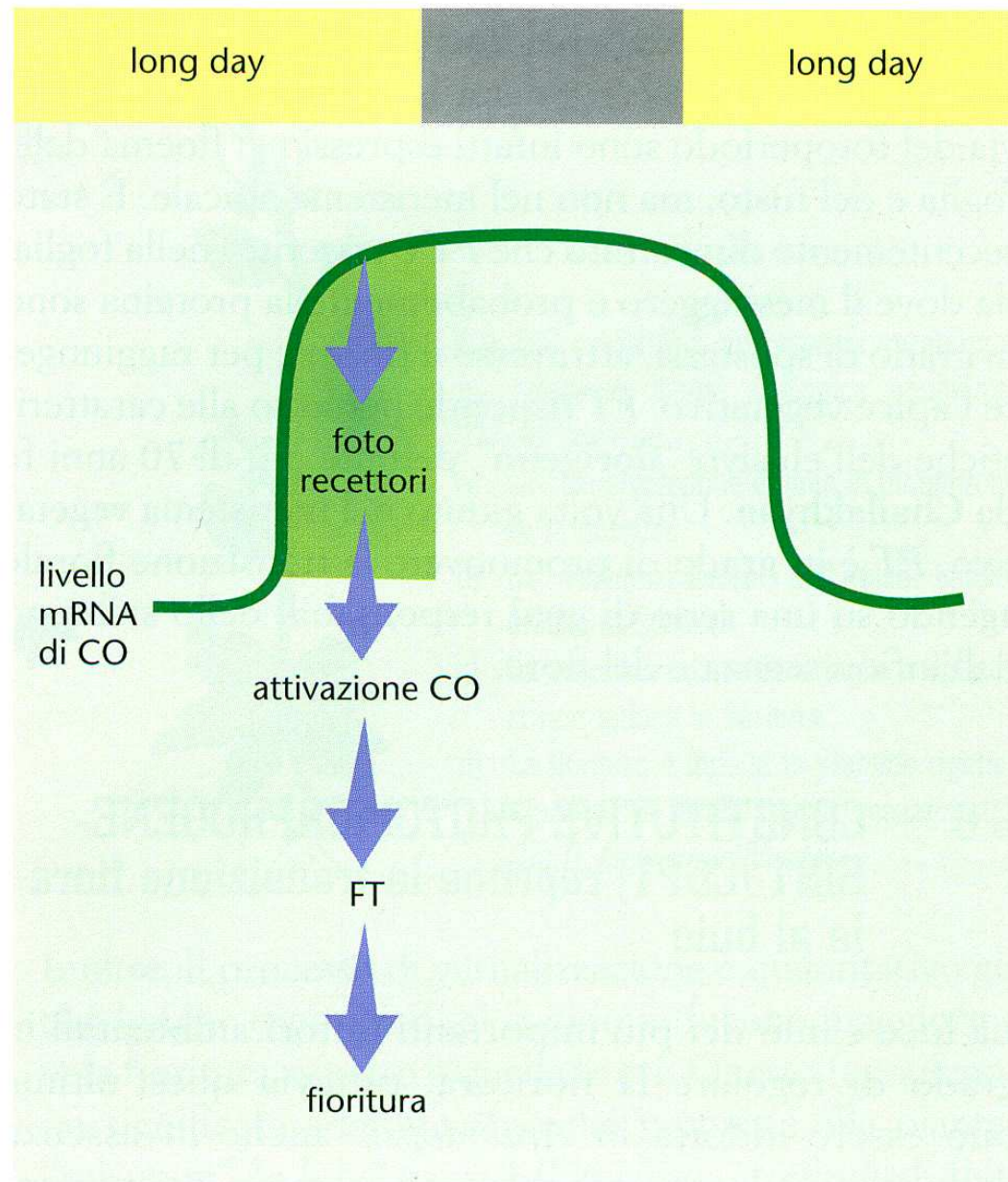


In modo da consentire l'accumulo della proteina CO

Fioritura di Arabidopsis in condizioni di LD



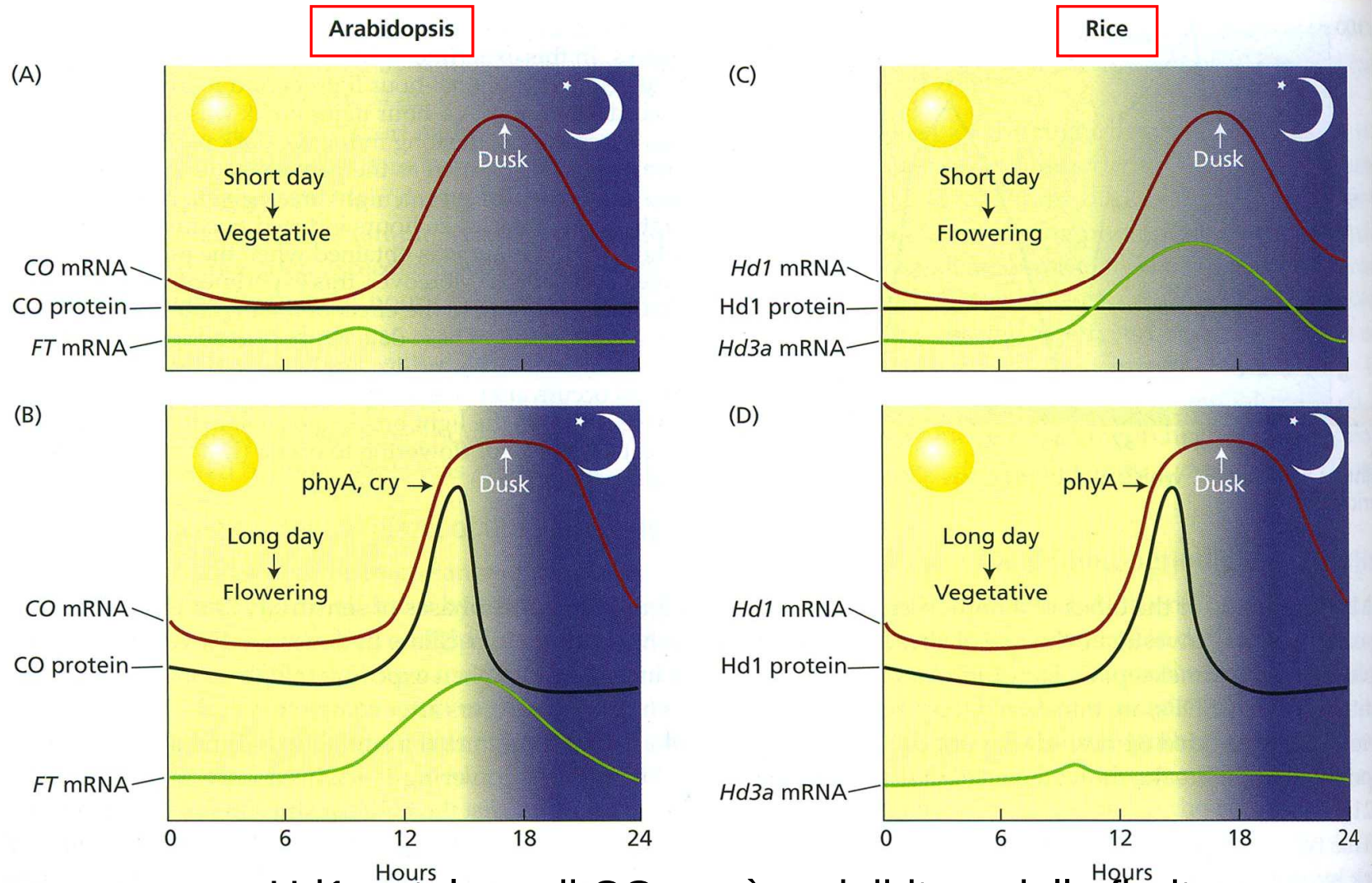




Come viene generato il ritmo giornaliero dei livelli della proteina CO?

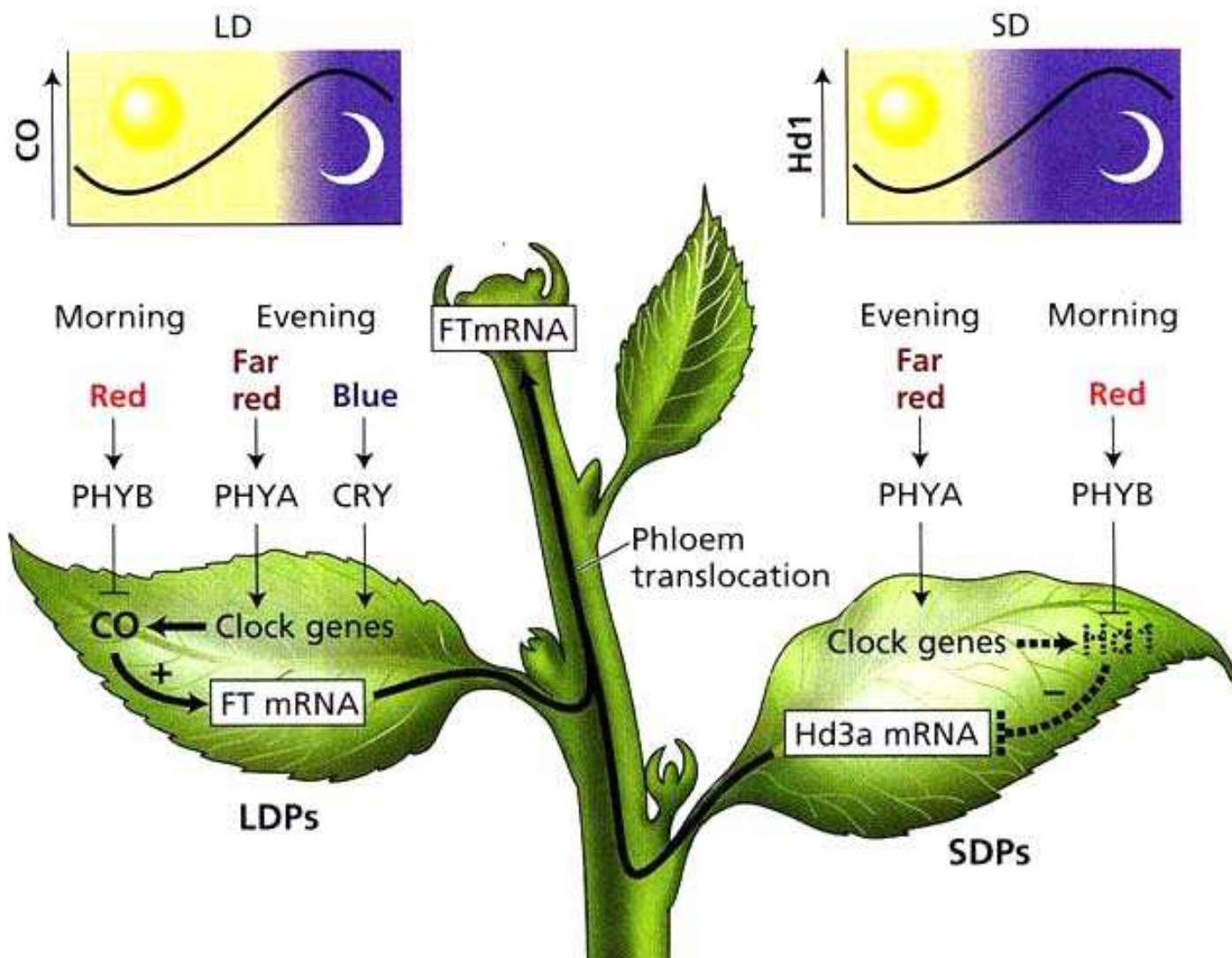
- PhyB promuove la riduzione dei livelli di CO al mattino
- PhyA e criptocromi stabilizzano la proteina CO alla fine del giorno
- Durante la notte CO è degradato secondo un meccanismo indipendente

Induzione della fioritura in LPD e SPD



Hd1: ortologo di CO ma è un inibitore della fioritura

Hd3a ortologo di FT

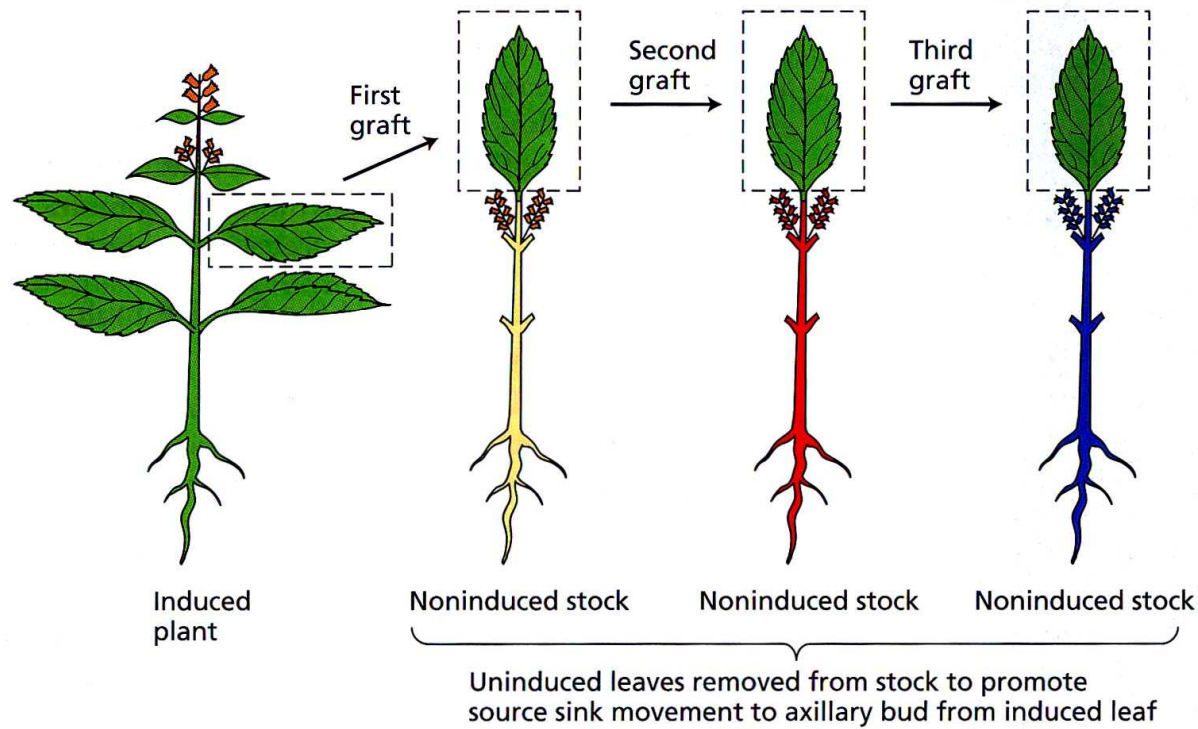


Il segnale **fotoperiodico** è percepito nelle foglie e trasmesso all'apice meristematico



IPOTESI DEL “FLORIGENO”

(B) Grafting of induced leaf to uninduced shoot causes flowering in multiple grafts in *Perilla*.



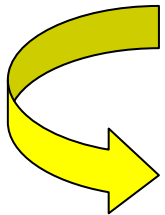
CO è espresso nel sistema vascolare delle foglie (cellule compagne del floema)

CO promuove fioritura se espresso nelle foglie ma non se espresso nel MAV

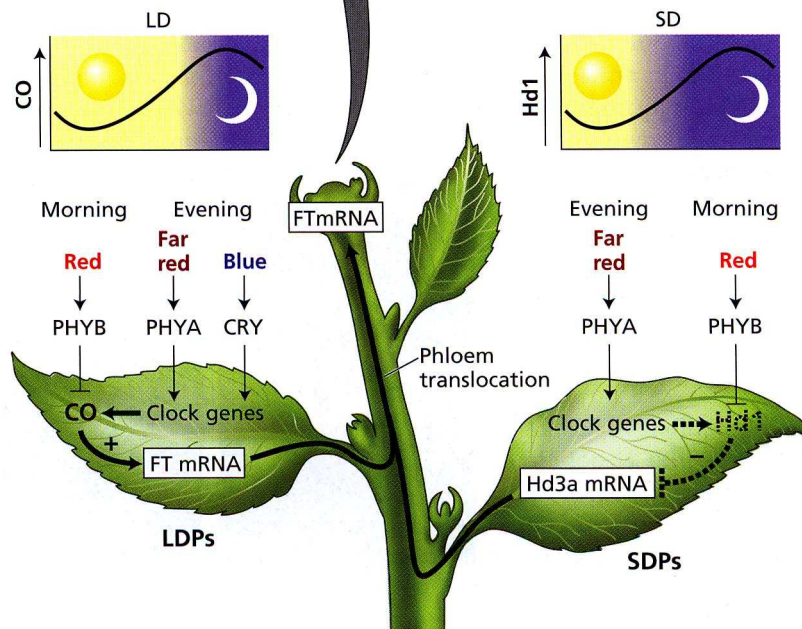
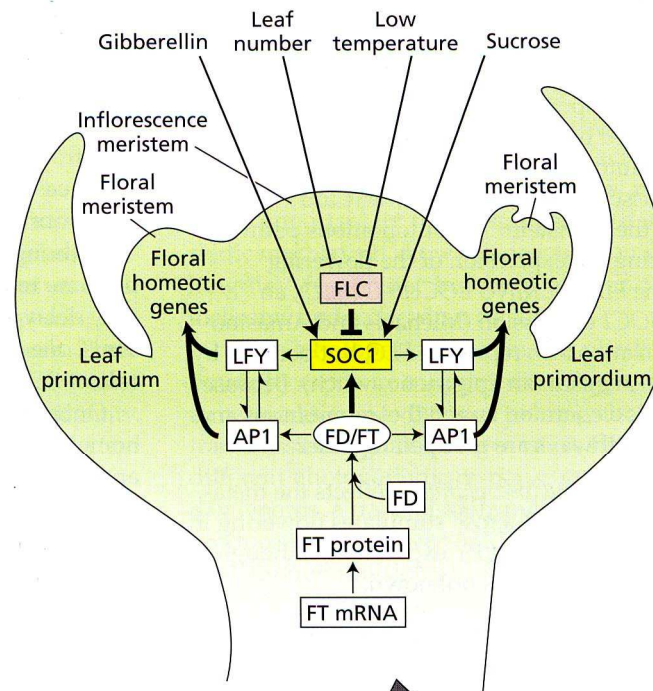
FT è il FLORIGENO

mRNA di FT e la proteina possono migrare dalle foglie al SAM

FT si lega al fattore di trascrizione **FD** espresso nel MAV



Il complesso FT/FD attiva la trascrizione dei geni **di identità meristemica (FMI)** che determinano la transizione fiorale



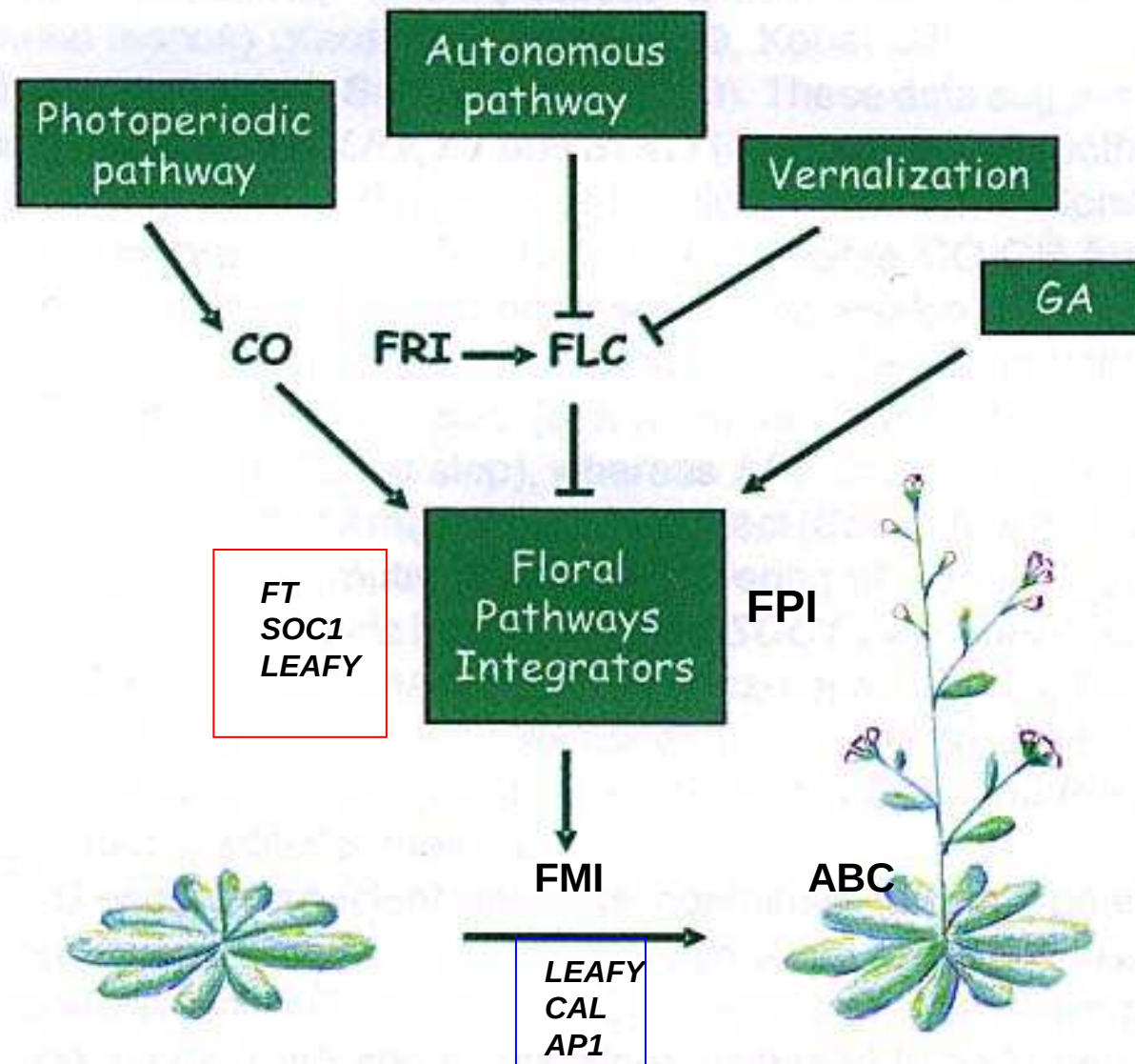
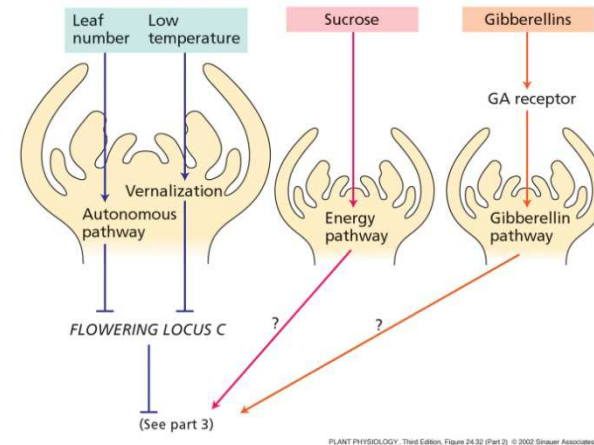


Fig. 1. Main pathways reaching Floral Pathways Integrators

Pathway ormonale



GA determinano la fioritura precoce in assenza di condizioni fotoperiodiche induttive (giorno corto per Arabidopsis)

In Arabidopsis la fioritura in condizioni non induttive è promossa dalla somministrazione di GA e ritardata da inibitori biosintetici

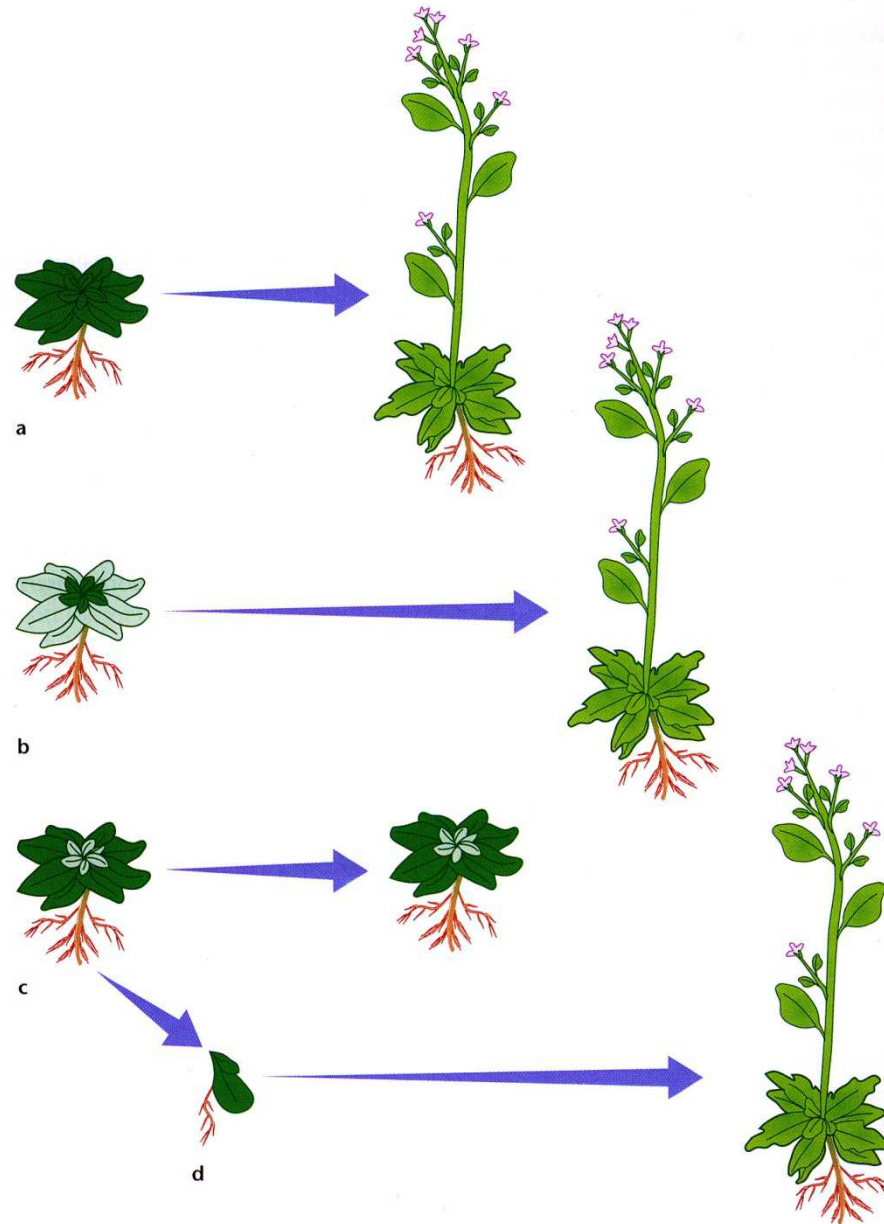
pathway indipendente da quelli fotoperiodico e vernalizzazione

VERNALIZZAZIONE

Alcune specie per fiorire o per accelerare la fioritura
richiedono l'esposizione ad un periodo di basse temperature

Studi negli anni 60' su
Thlaspi arvense

vernalizzazione dell'apice



Il sito di percezione del freddo
è il meristema apicale
vegetativo

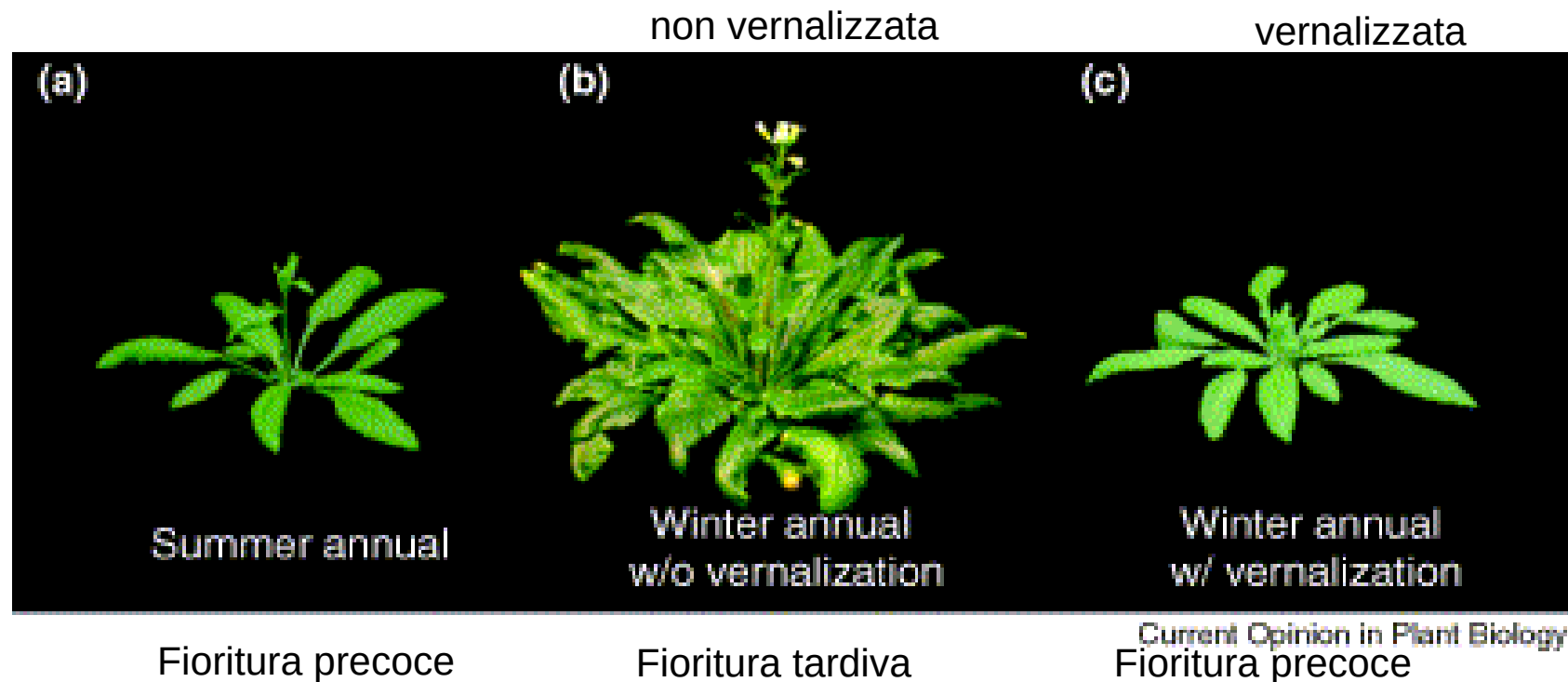
Esistono diverse varietà di *arabidopsis* in quanto al tempo di fioritura

a fioritura tardiva, con vernalizzazione (invernale annuale)

(germinano in estate e fioriscono in primavera)

a fioritura precoce (estiva annuale)

(germinano e fioriscono nella stessa estate)



la differenza a livello molecolare è determinata dalla variazione allelica di

➤ *FRIGIDA (FRI)*

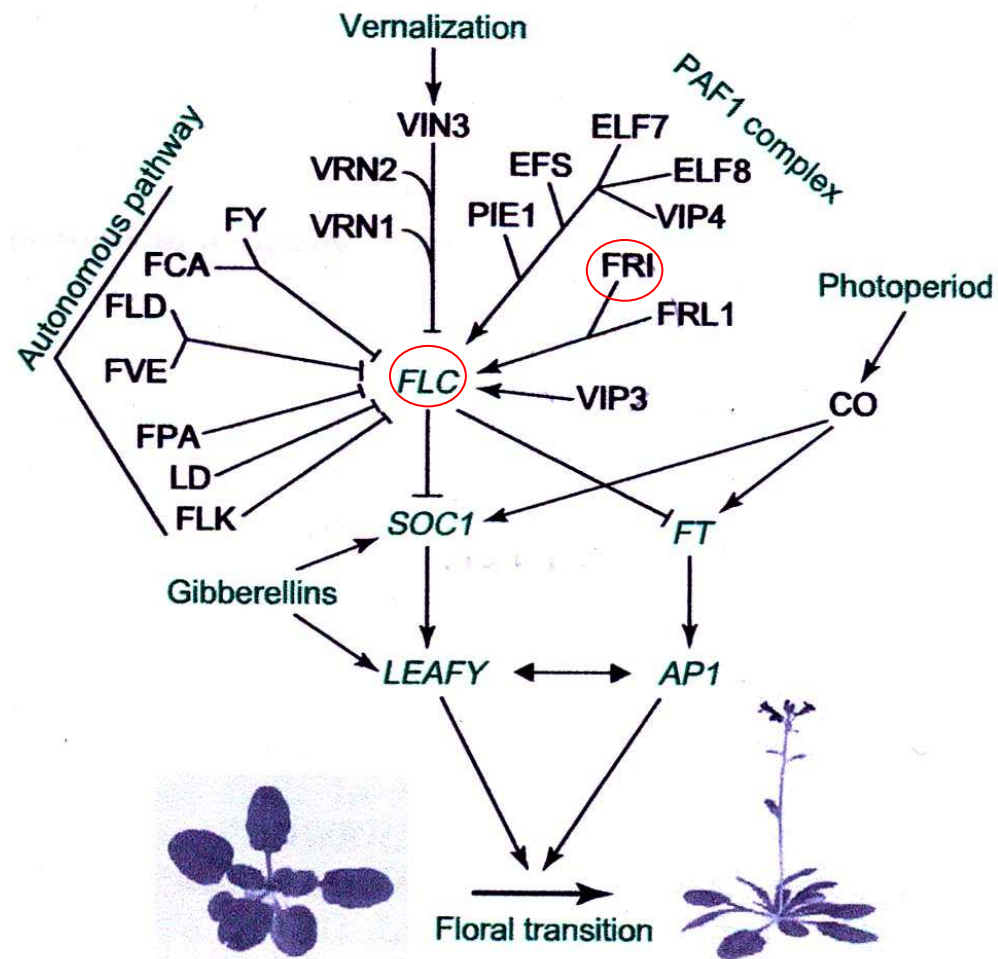
➤ *FLOWERING LOCUS (FLC)*

annuali invernali hanno alleli dominanti di *FRI* e *FLC*

varietà precoci hanno alleli *fri* non funzionali o *flc* deboli

FRI e *FLC* agiscono sinergicamente

- FLC è un inibitore della fioritura
- FRI è un modulatore positivo della espressione di FLC



REGOLAZIONE EPIGENETICA



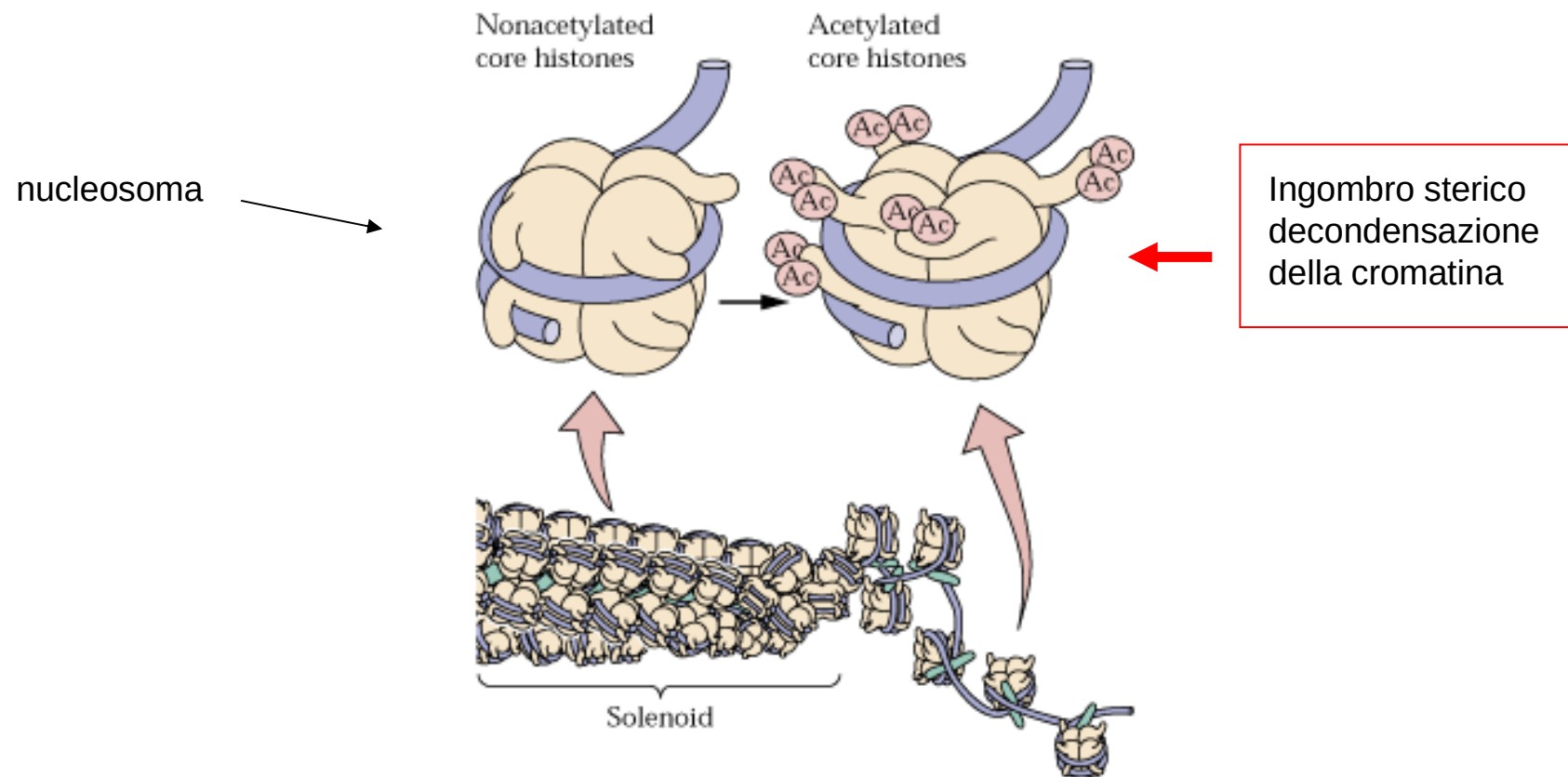
METILAZIONE DEGLI ISTONI



FLC

Modificazioni covalenti della cromatina come metilazione e acetilazione di residui specifici di istoni costituiscono il “codice istonico”

Fornisce un livello ulteriore di controllo della trascrizione genica che affianca quello esercitato dai fattori di trascrizione

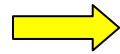


REGOLAZIONE DELLA TRASCRIZIONE DI *FLC*

Meccanismo epigenetico

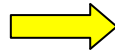
La ipermetilazione H3-K4 della cromatina di *FLC* è associata con il ritardo della fioritura nelle varietà invernali-annuali di *arabidopsis*

H3-K9 metilazione

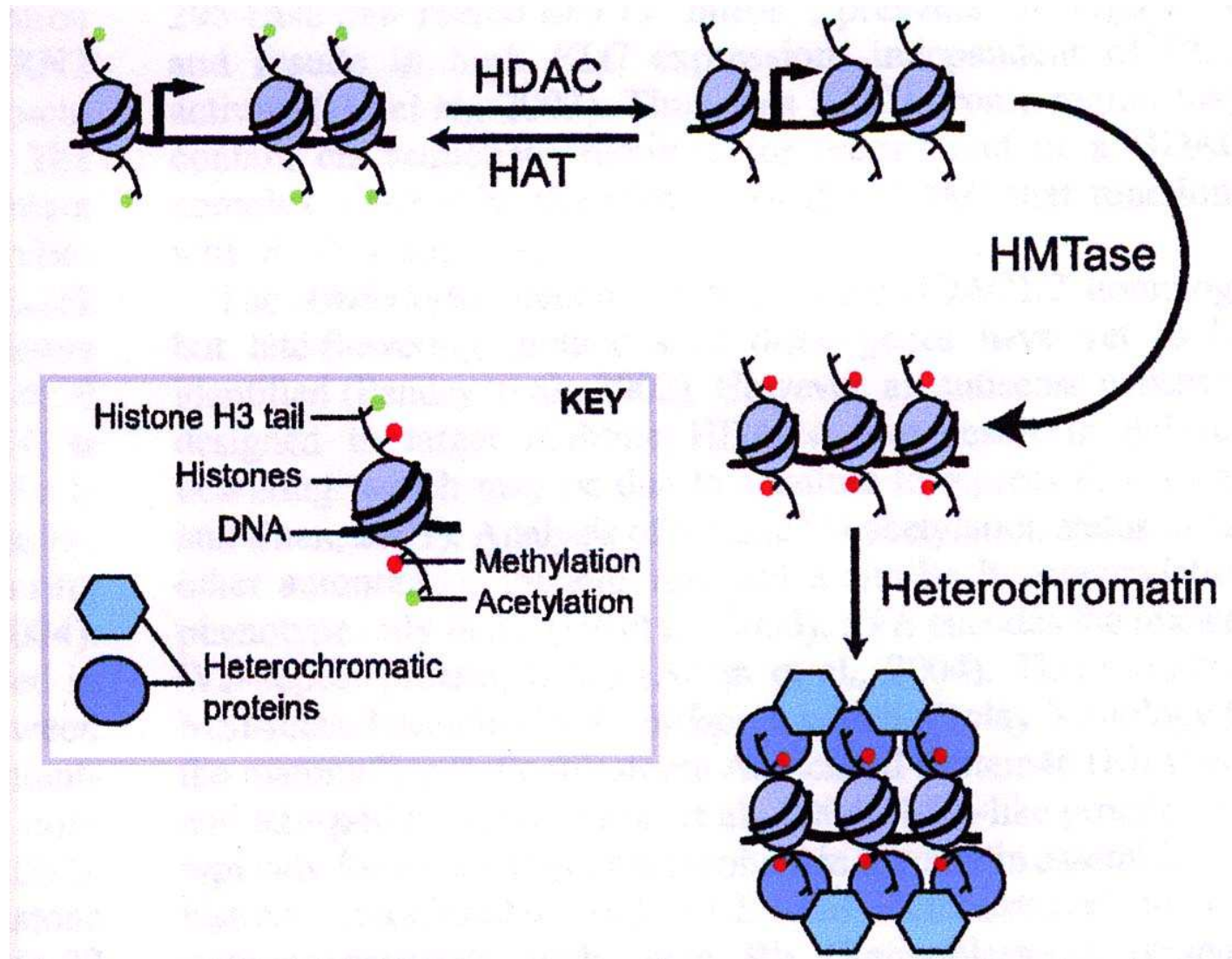


Repressione della trascrizione

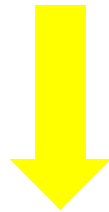
H3-K4 metilazione



evolutive conservata
e associata a geni trascritti

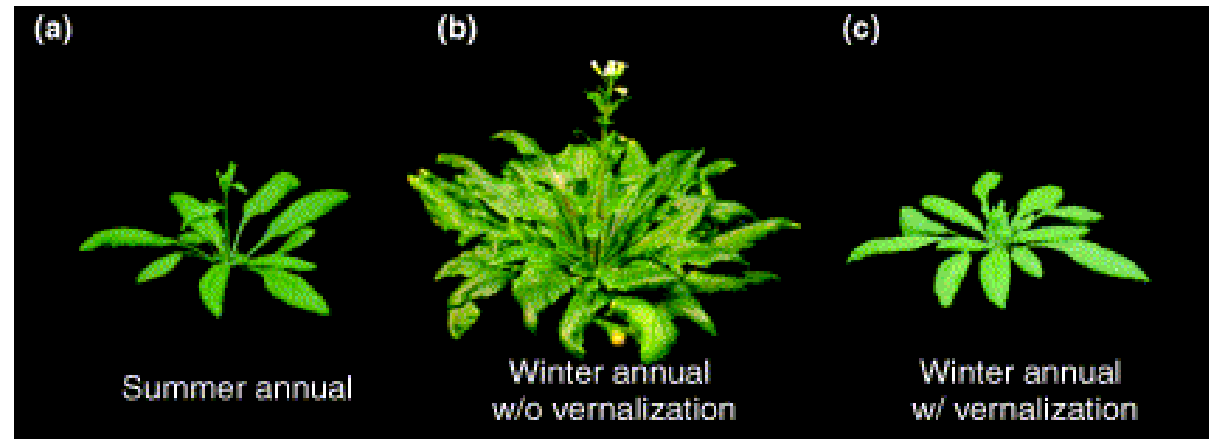


➤ In varietà **annuali invernali** di *arabidopsis* contenenti l'allele *FRI* la cromatina di *FLC* ha **elevati livelli di H3-K4 metilazione** in confronto a specie precoci che hanno un allele *FRI* non funzionante (*fri*)



FRI* è un promotore della H3-K4 metilazione di *FLC

Come agisce la vernalizzazione ?



Current Opinion in Plant Biology

Identificati tre geni coinvolti

VERNALIZATION1 (VRN1)

VERNALIZATION2 (VRN2)

VERNALIZATION INSENSITIVE (VIN3)

Dall'analisi di mutanti insensibili a vernalizzazione, cioè a fioritura tardiva anche dopo un periodo prolungato di freddo

Individuati tre mutanti:

Vernalization1 (*vrn1*)

Vernalization2 (*vrn2*)

Vernalization insensitive (*vin3*)

In *vrn1* e *vrn2* *FLC* è represso al freddo ma la repressione non è stabile a temperature normali

In *vin3* *FLC* non è represso dalla vernalizzazione

vin3 è responsabile per la repressione iniziale di *FLC*; *vrn1* e *vrn2* per il mantenimento

Studi recenti dimostrano che la vernalizzazione determina
modificazioni che convertono la cromatina

di *FLC* in eterocromatina, inattiva nella trascrizione

Durante la vernalizzazione le code degli istoni della cromatina di *FLC*
vengono deacetilate e in seguito si ha un aumento della H3-K9 e K27
metilazione

La modificazione è mantenuta con il ritorno a temperature più elevate

Dall'analisi dei mutanti e dalle informazioni sulla struttura dei geni *vrn1*,
vrn2, e *vin3*, elaborato un modello

Modello per la repressione della espressione di *FLC* da VERNALIZZAZIONE

