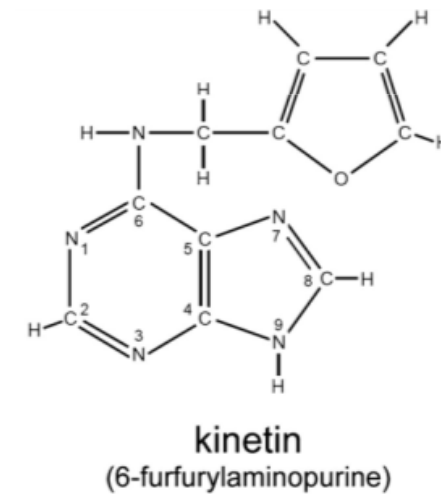


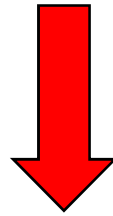


Scoperte nel corso di studi per identificare
sostanze in grado di stimolare le divisioni cellulari



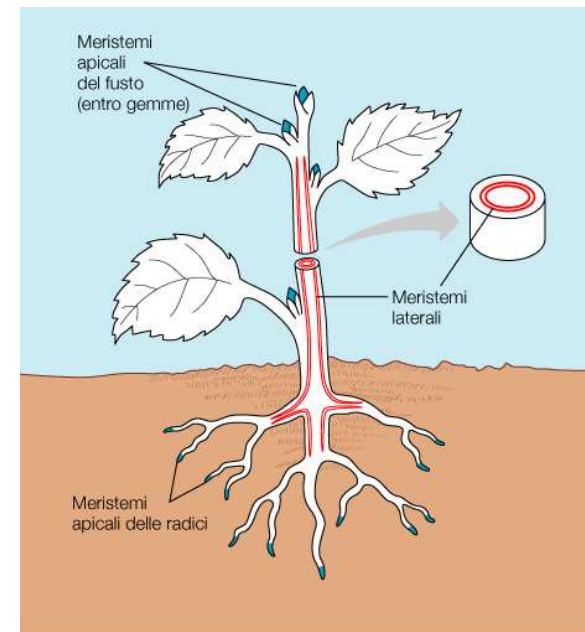
Skoog 1950

Cellule vegetali formate dalle divisioni cellulari nei meristemi primari o secondari



Differenziamento e espansione → funzioni

Differenziamento terminale



Cellule mature perdono la capacità di dividersi

Animali → differenziamento terminale

Piante → In alcuni casi possono tornare a dividersi

TOTIPOTENZA

cellule corteccia
e floema

divisione



meristemi secondari
cambio cribro-vascolare
cambio subero-fellodermico

picciolo foglie

divisione



nuovo strato cellule
abscissione

ferita

divisione



nuovo tessuto

ferita +
Agrobacterium

divisione



tumore del colletto

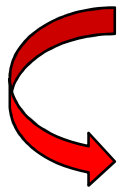
Tumori su fusto infettato da *Agrobacterium tumefaciens*



esistenza di un segnale chimico (ormone) che induce le divisioni cellulari

1913 Haberlandt

il tessuto vascolare contiene una sostanza in
grado di stimolare la divisione cellulare in
tuberi di patata lesionati



ORMONE DIFFUSIBILE

Studi sulla coltivazione di organi e tessuti vegetali

1930 White

Tessuti da radici di pomodoro → crescono in terreno minimo (saccarosio sali minerali vitamine)

tessuti da fusti → non crescono

quando il fusto radica → cresce la radice e il germoglio

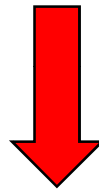
un fattore prodotto dalla radice regola la crescita del fusto

Ricerca di sostanze in grado di stimolare la proliferazione cellulare

Succo di pomodoro

Endosperma liquido noce di cocco (latte di cocco)

mezzo di White + auxina + 30% latte di cocco



efficace su molti tessuti:
formazione di calli



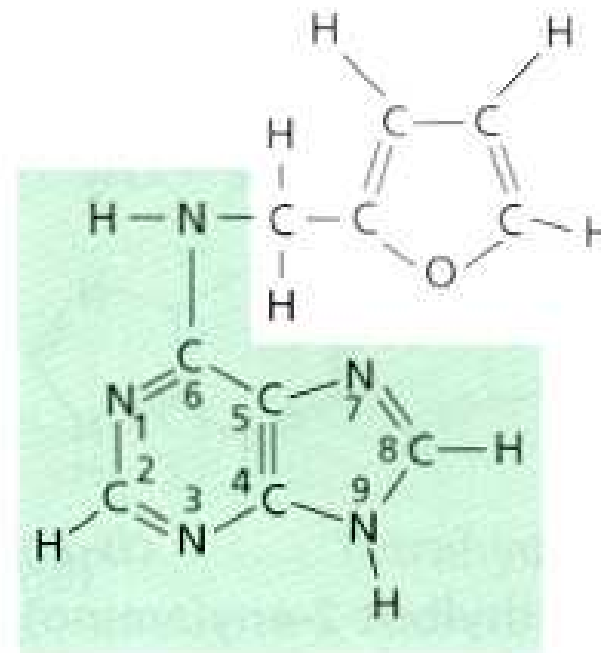
Nel 1974 nel latte di cocco identificata la Zeatina

La prima citochinina (sintetica) scoperta è stata la chinetina

Skoog: DNA di sperma di aringa autoclavato stimolava

la divisione cellulare in tessuti di tabacco in coltura

kinetina
(6-furfuril-aminopurina)



Kinetin

esiste nelle piante una sostanza simile alla chinetina?

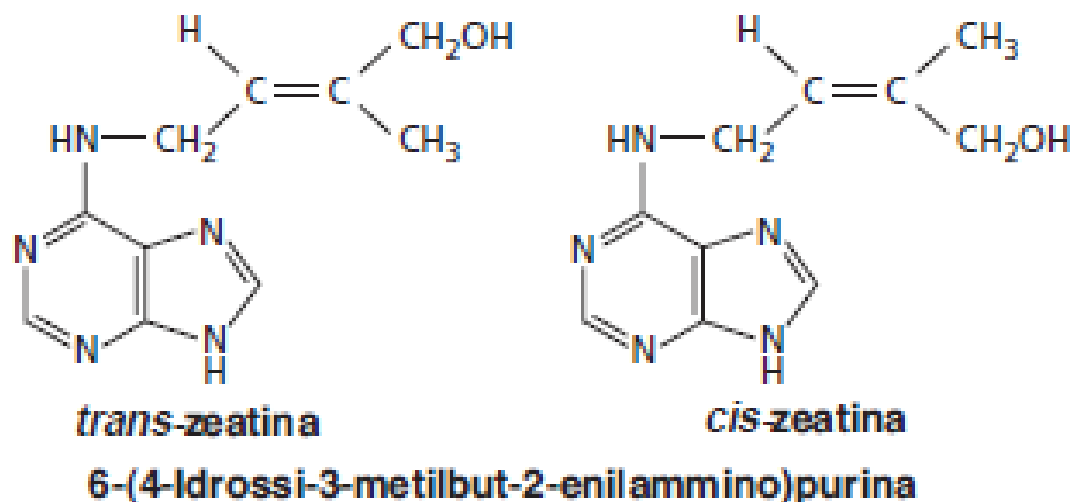
Nel 1973 identificata nell'endosperma di mais la
prima citochinina naturale : la Zeatina

simile alla
chinetina

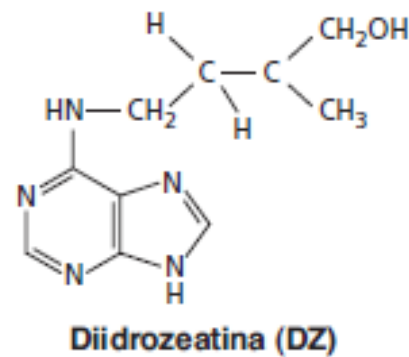
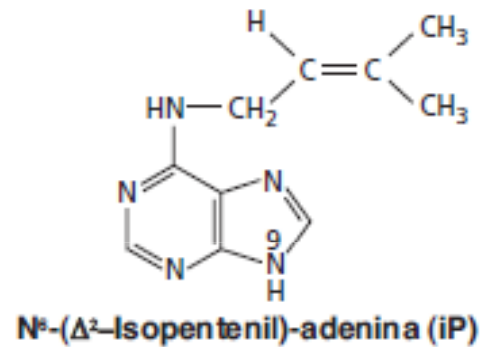
configurazione
cis/trans

Inerconvertite
dalla zeatina
Isomerasi

Ruolo biologico
certo per la
forma trans

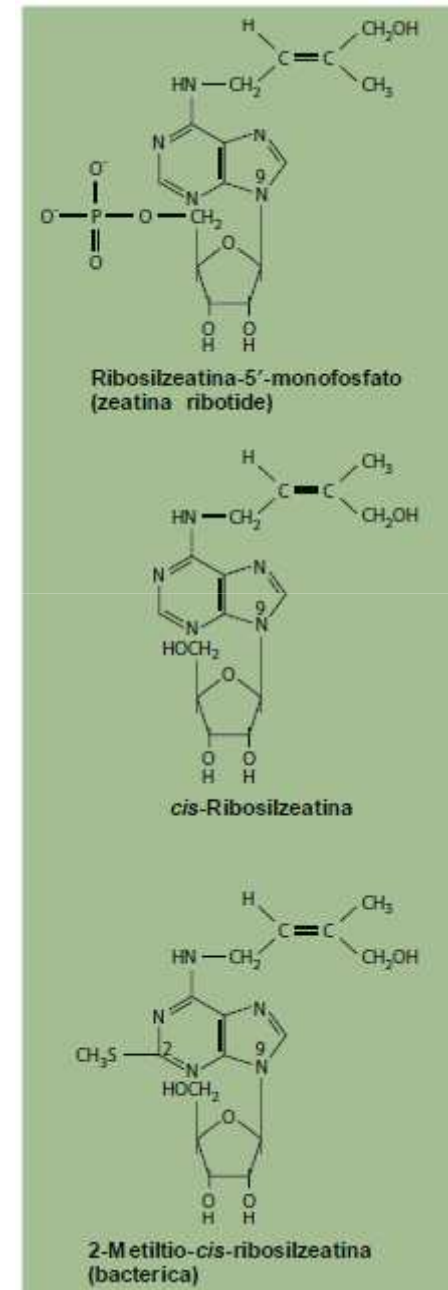
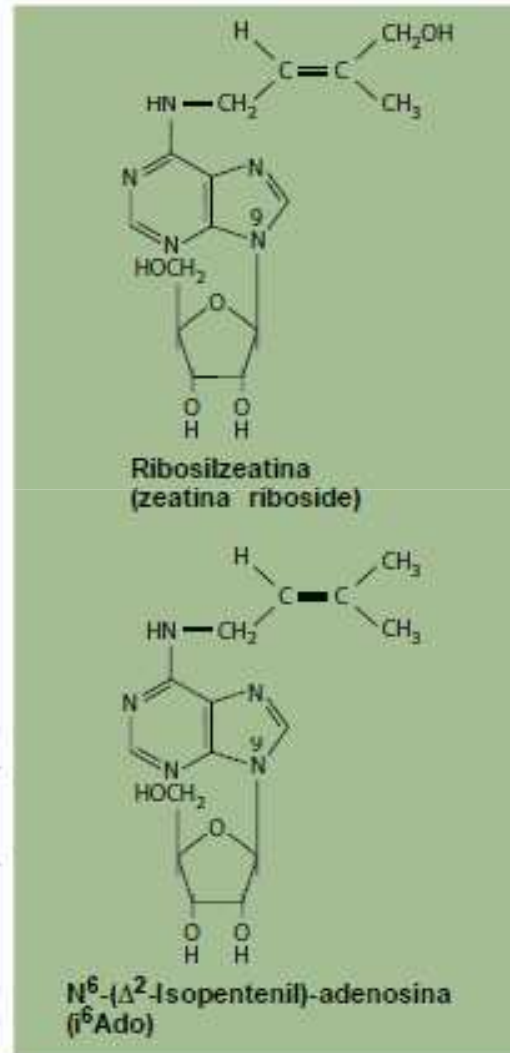


La zeatina è la citochinina principale nelle
piante superiori ma isolate da piante e batteri
altre citochinine



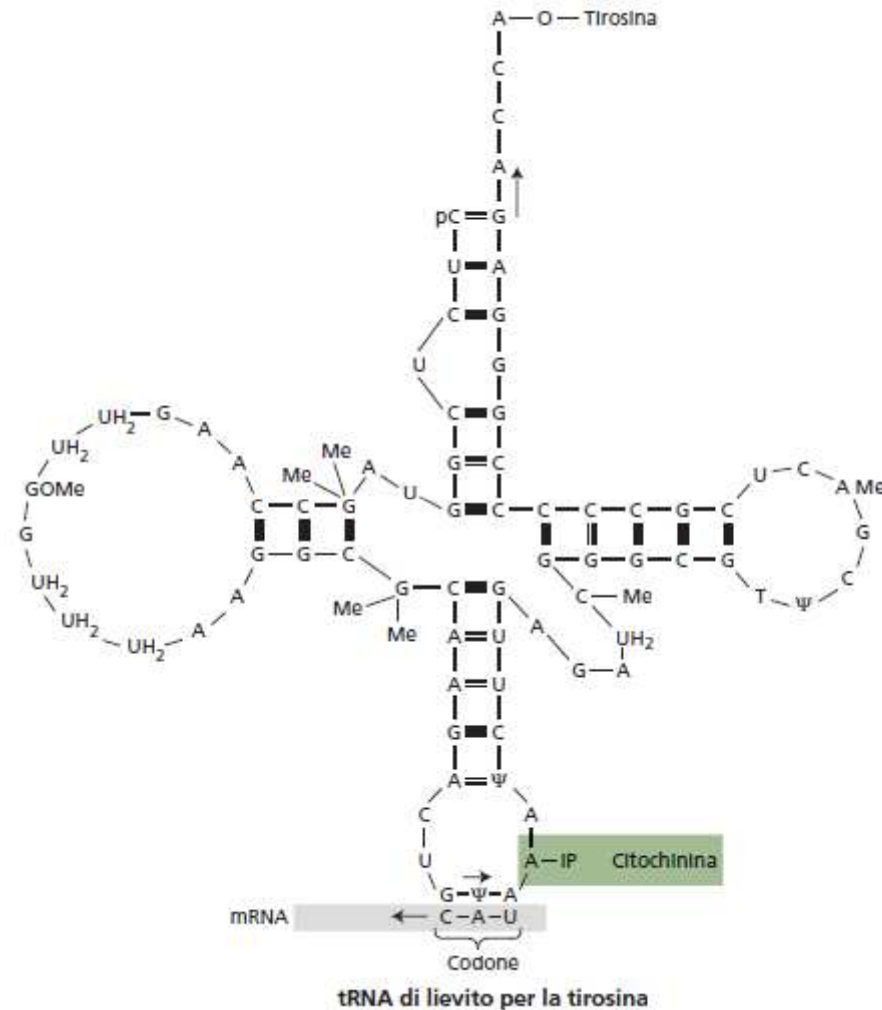
Le citochinine esistono anche in forma coniugata

ribosidi



ribotidi

Le citochinine sono presenti nei tRNA animali e vegetali



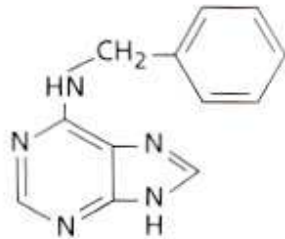
preniltransferasi



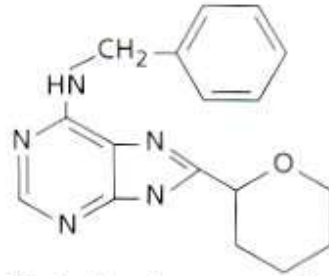
aggiunge gruppi isopentenilici
all'adenina

alcuni composti sintetici possono riprodurre gli effetti delle citochinine

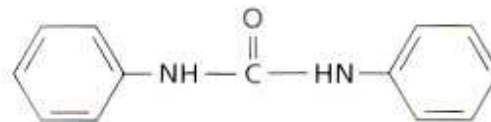
(A) Synthetic compounds active as cytokinins



Benzyladenine
(benzylaminopurine)
(BAP)

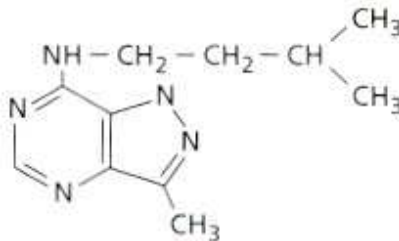


Tetrahydropyranylbenzyladenine



N,N'-Diphenylurea (nonamino
purine with weak activity)

(B) Cytokinin antagonist (note modified purine ring)

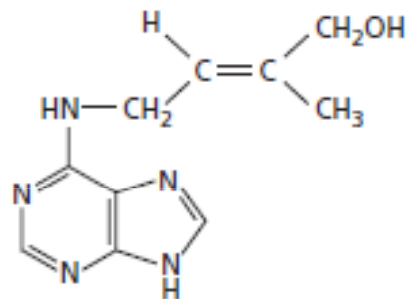


3-Methyl-7-(3-methylbutylamino)pyrazolo[4,3-D]pyrimidine

antagonista

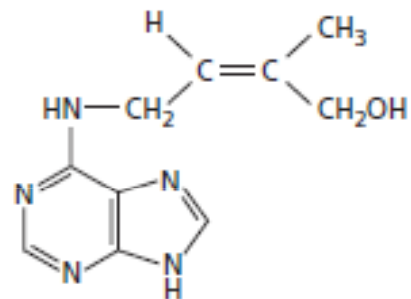


Le forme attive sono le basi libere

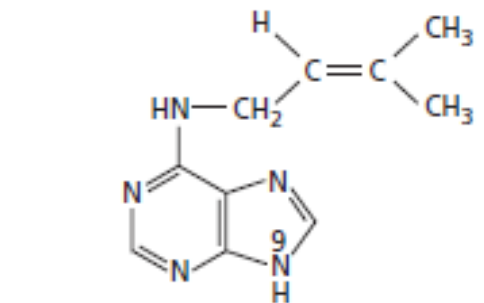


trans-zeatina

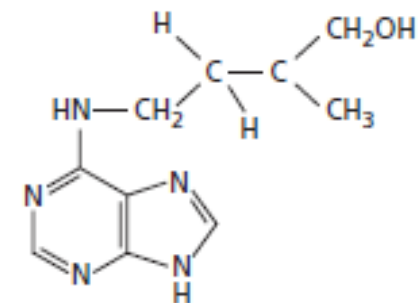
6-(4-Ildrossi-3-metilbut-2-enilammino)purina



cis-zeatina



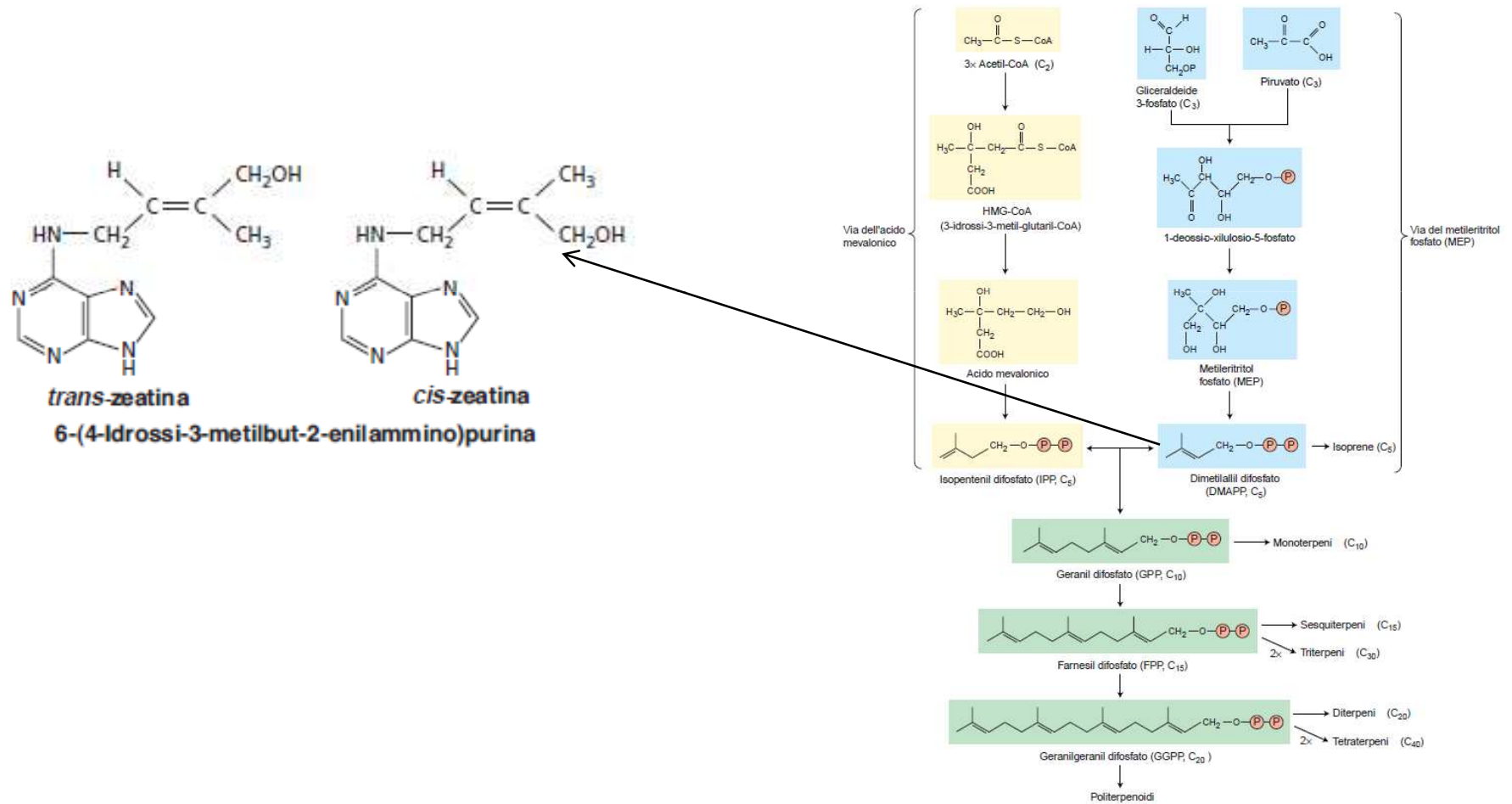
N⁶-(Δ²-Isopentenil)-adenina (iP)



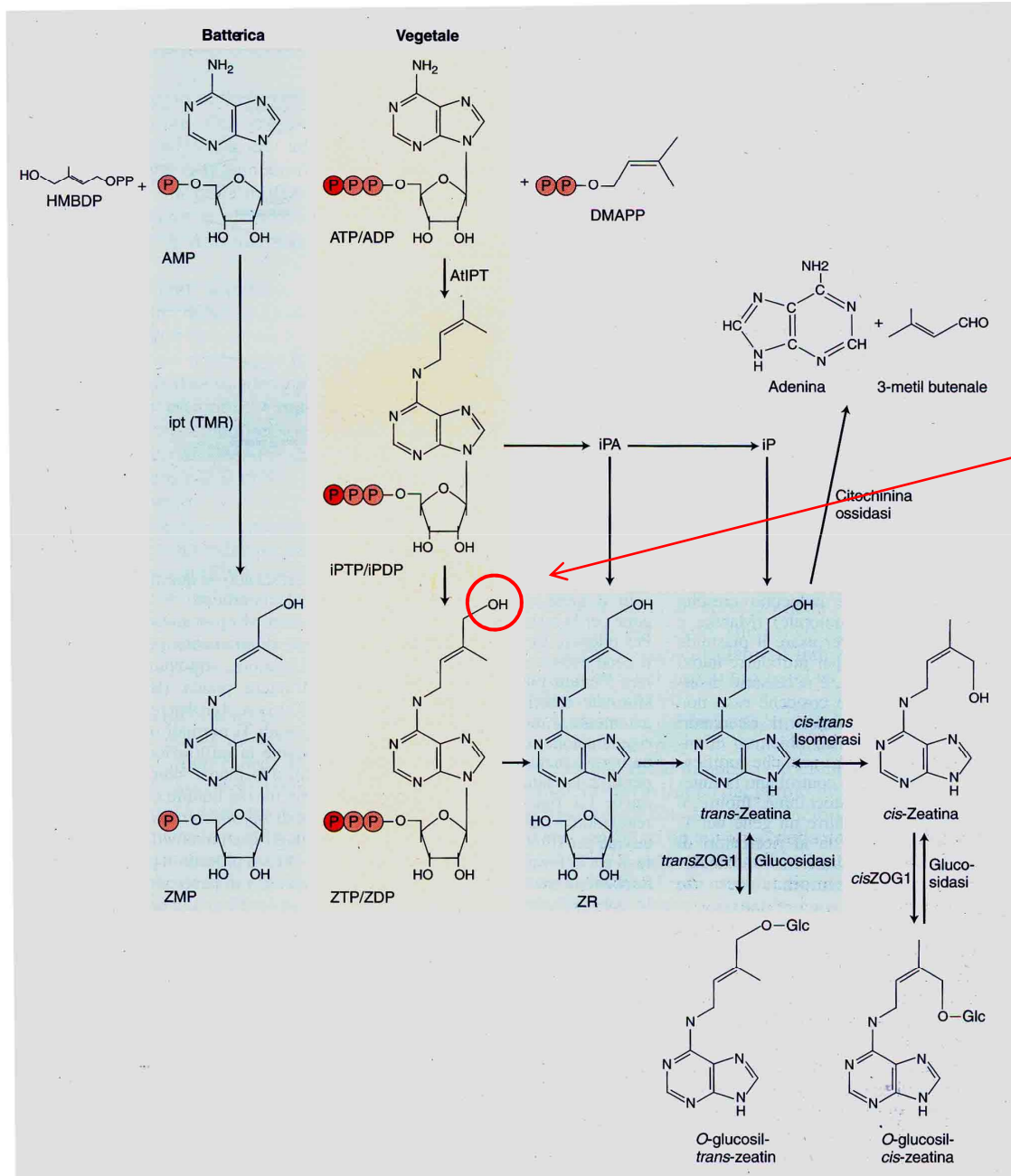
Dihidrozeatina (DZ)

BIOSINTESI DELLE CITOCHININE (ZEATINA)

La catena laterale è formata da un'unità isoprenica



BIOSINTESI DELLA ZEATINA



Ossidazione iPP:
Monossigenasi
CYP735A

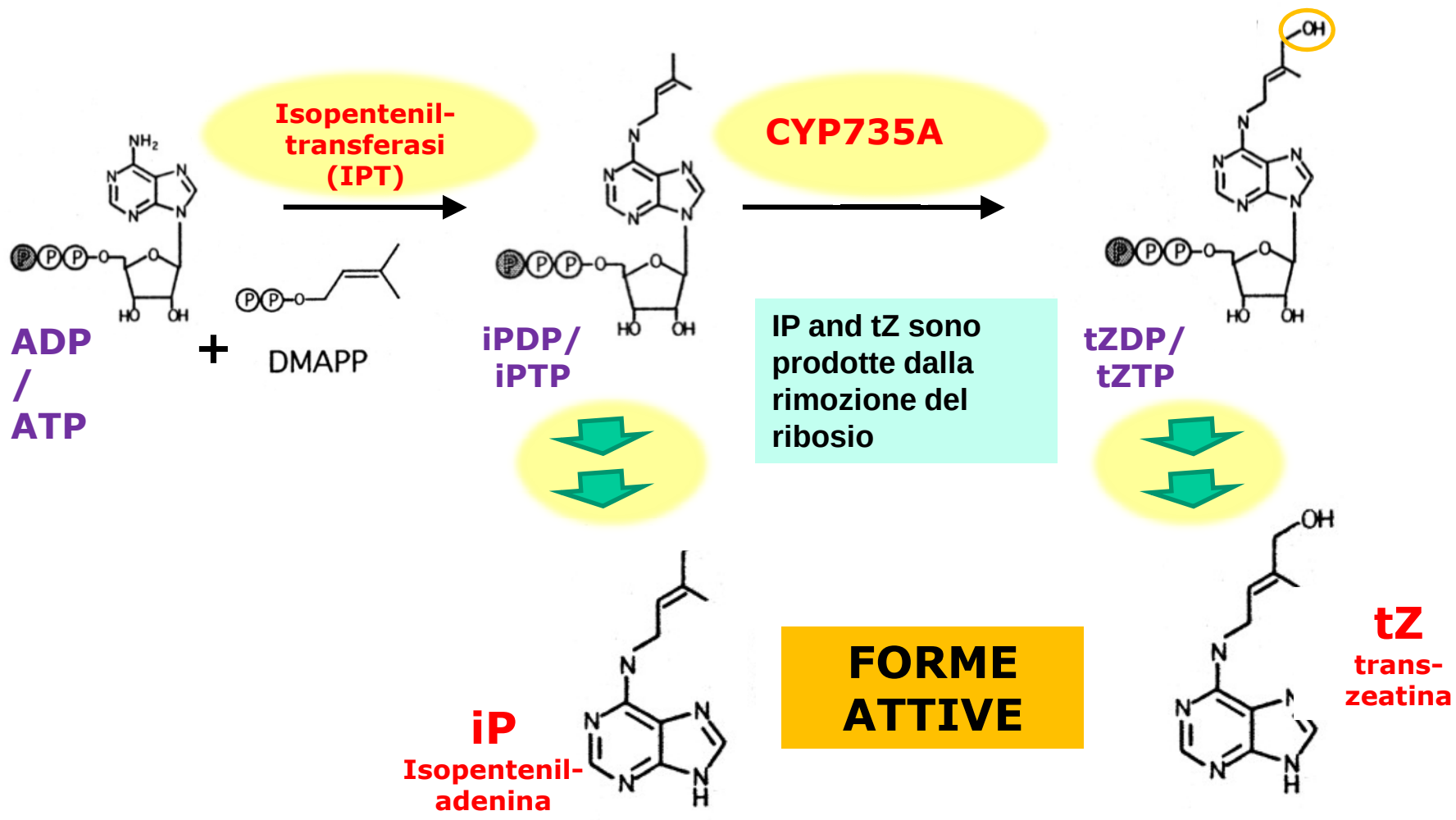
iPA= isopenteniladenosina
iP=isopenteniladenina

IPT: Isopentenil transferasi (citochinina sintasi)

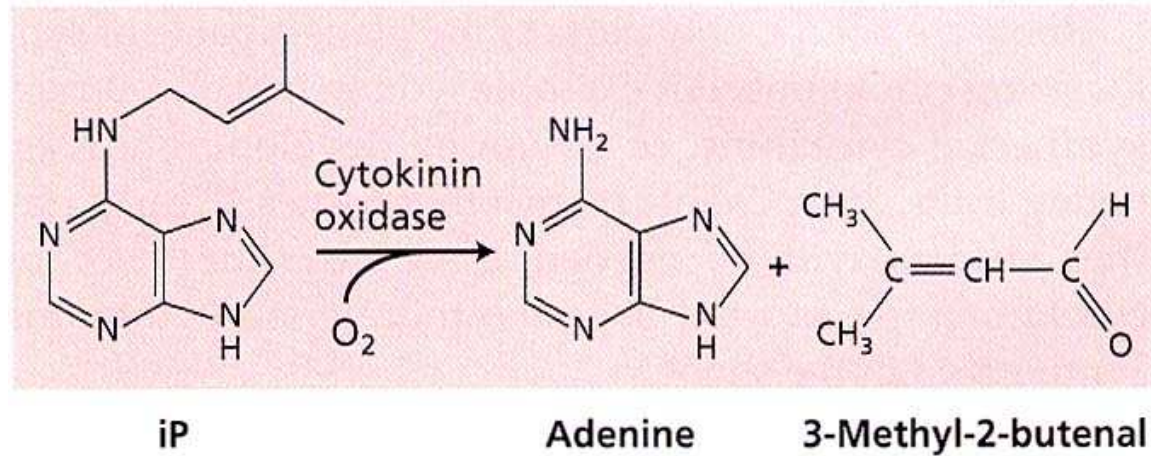


La sintesi delle citochinine avviene principalmente
nella radice

In arabidopsis 7 geni *iPT* espressi con pattern unici durante lo **sviluppo** di diversi tessuti

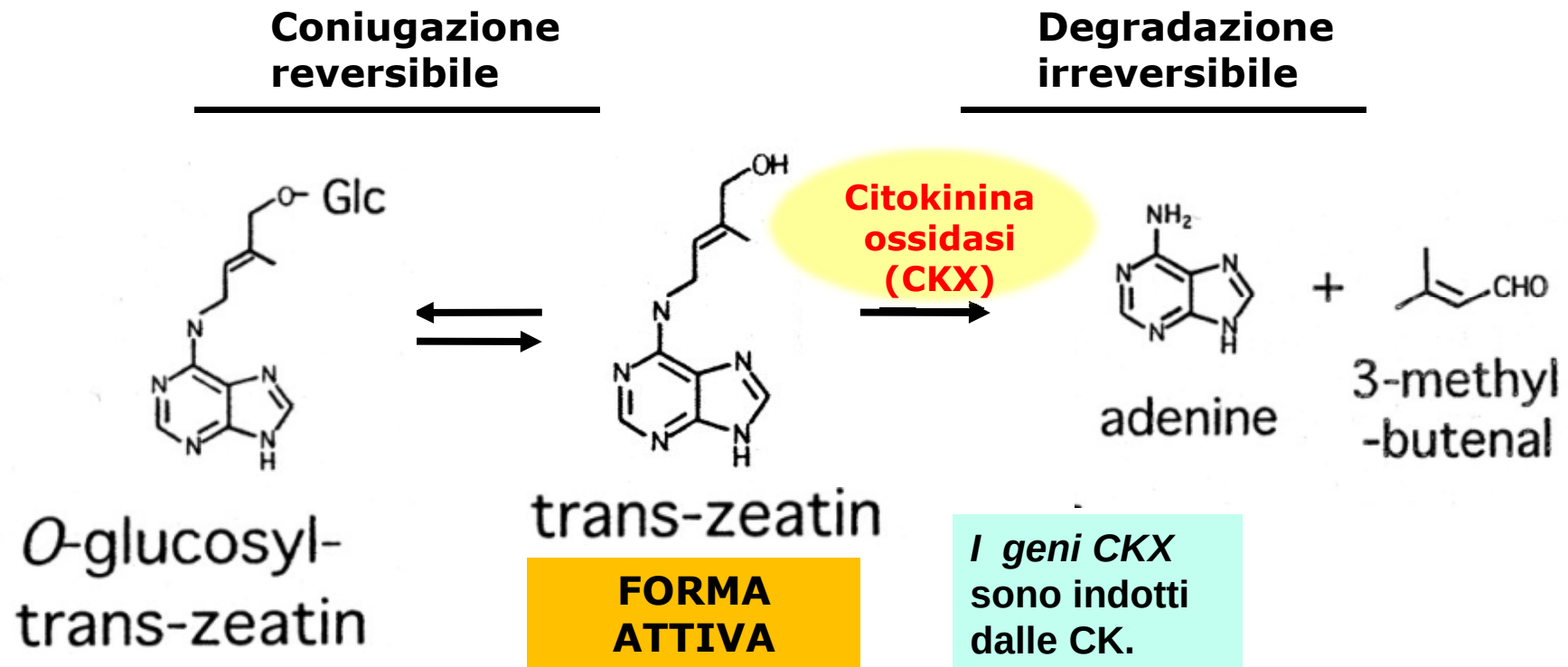


Inattivazione delle citochinine



gene citochinina ossidasi → indotto da citochinine
(feedback negativo)

INATTIVAZIONE DELLE CK



Trasporto delle citochinine: sono trasportate nello xilema e nel floema

meristema apicale radice



zeatina riboside

xilema



foglie
semi



Zeatina

Zeatina-glucoside

Il tumore del colletto è causato da infezioni di *Agrobacterium tumefaciens*

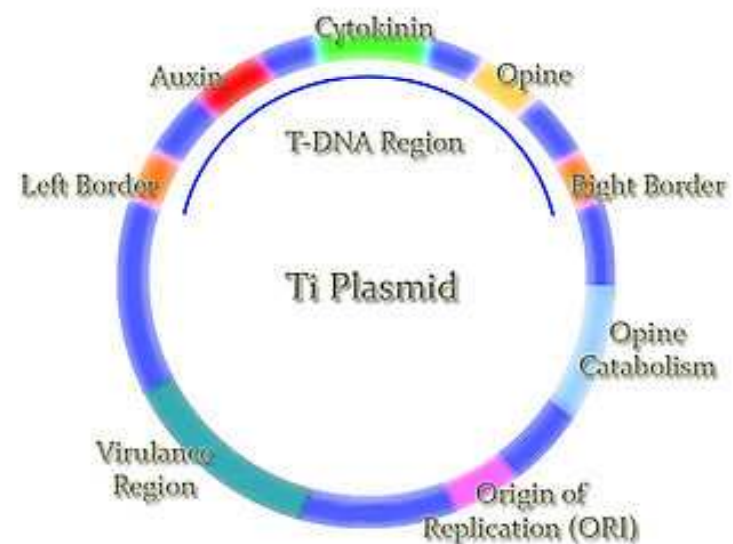
Il tessuto infettato prolifera e produce callo



Espianti di tessuto tumorale in coltura proliferano
senza aggiunta di ormoni al mezzo di coltura

Nel mezzo si ritrovano notevoli quantità di auxine e citochinine

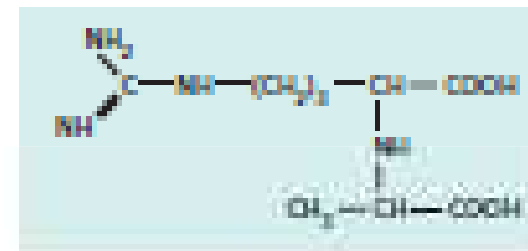
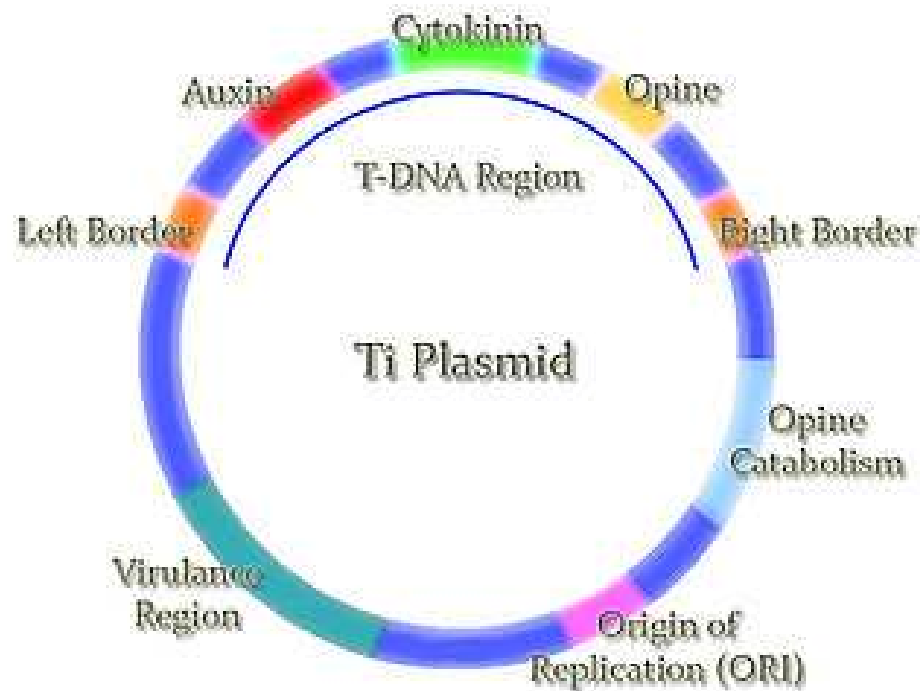
Agrobacterium trasferisce
nel genoma della pianta
il **T-DNA** contenuto nel **plasmide Ti**



TDNA: ipt batterica (locus tmr)

2 geni sintesi IAA

geni sintesi opine

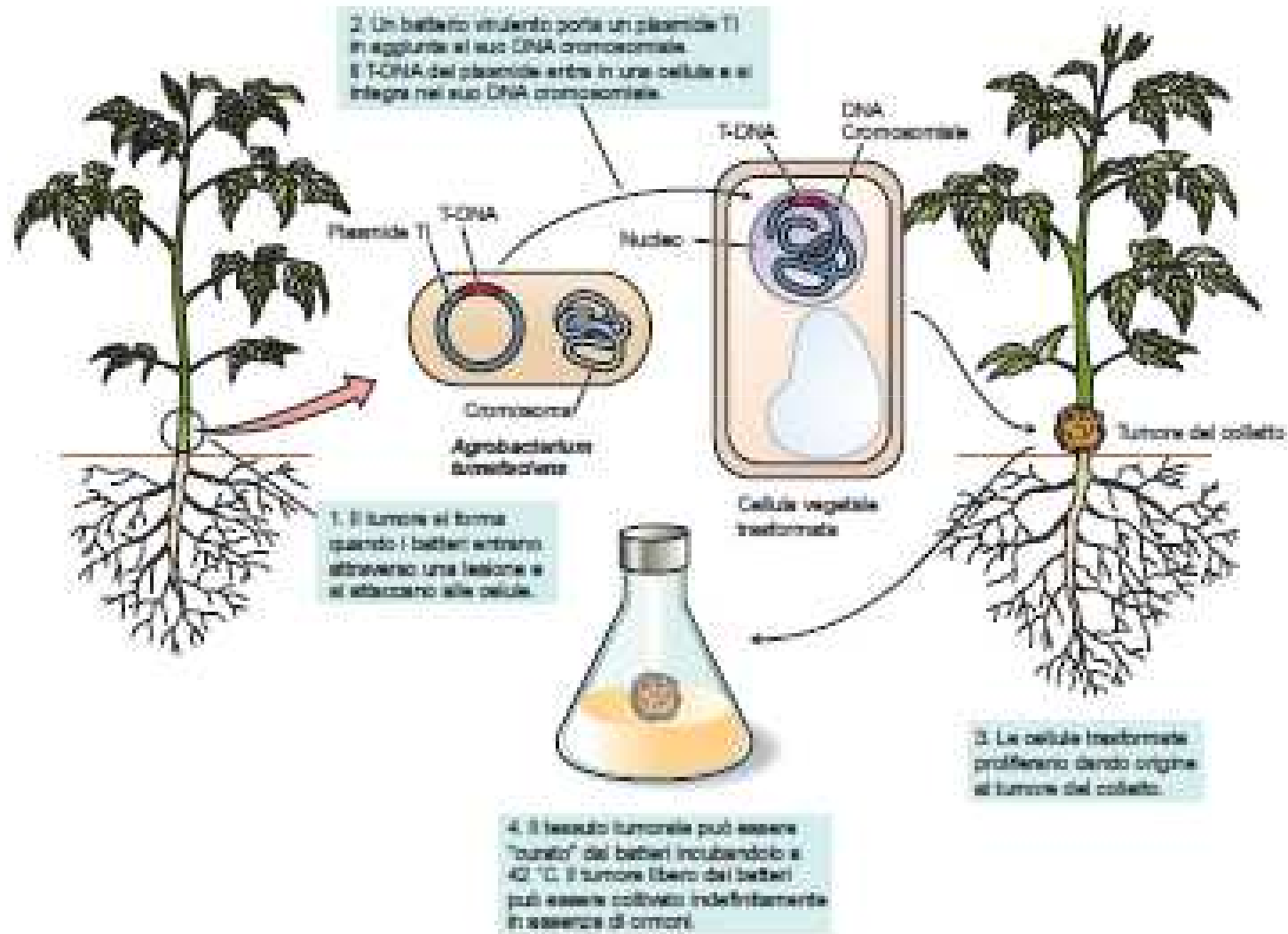


Octopine

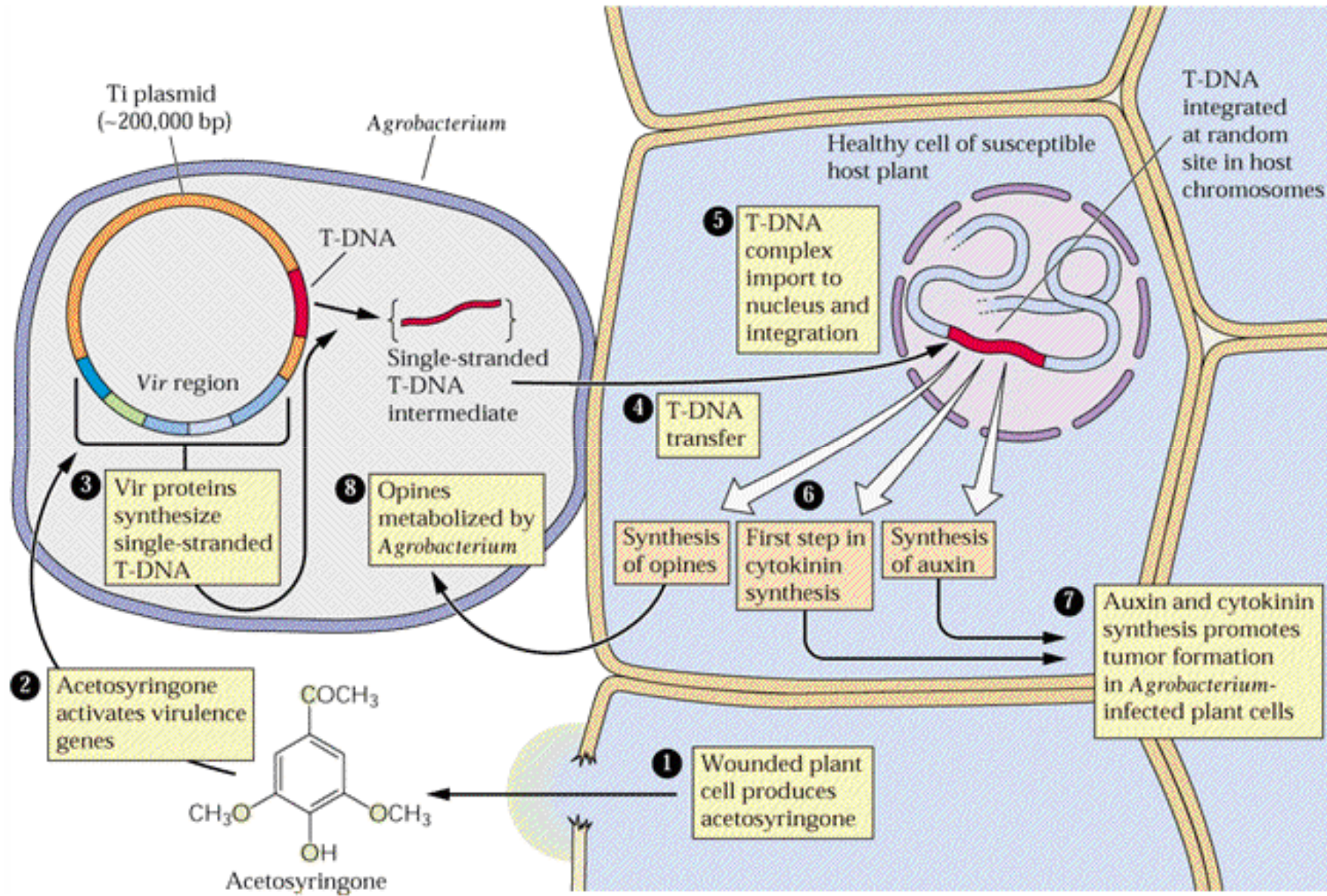


Nopaline

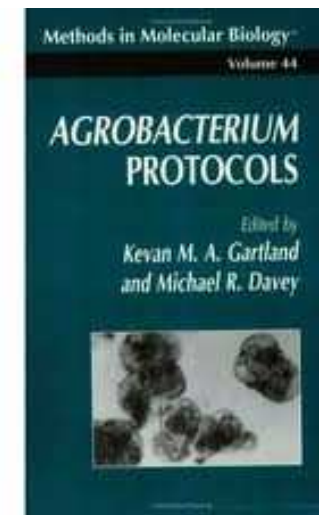
Infezione di *Agrobacterium tumefaciens*

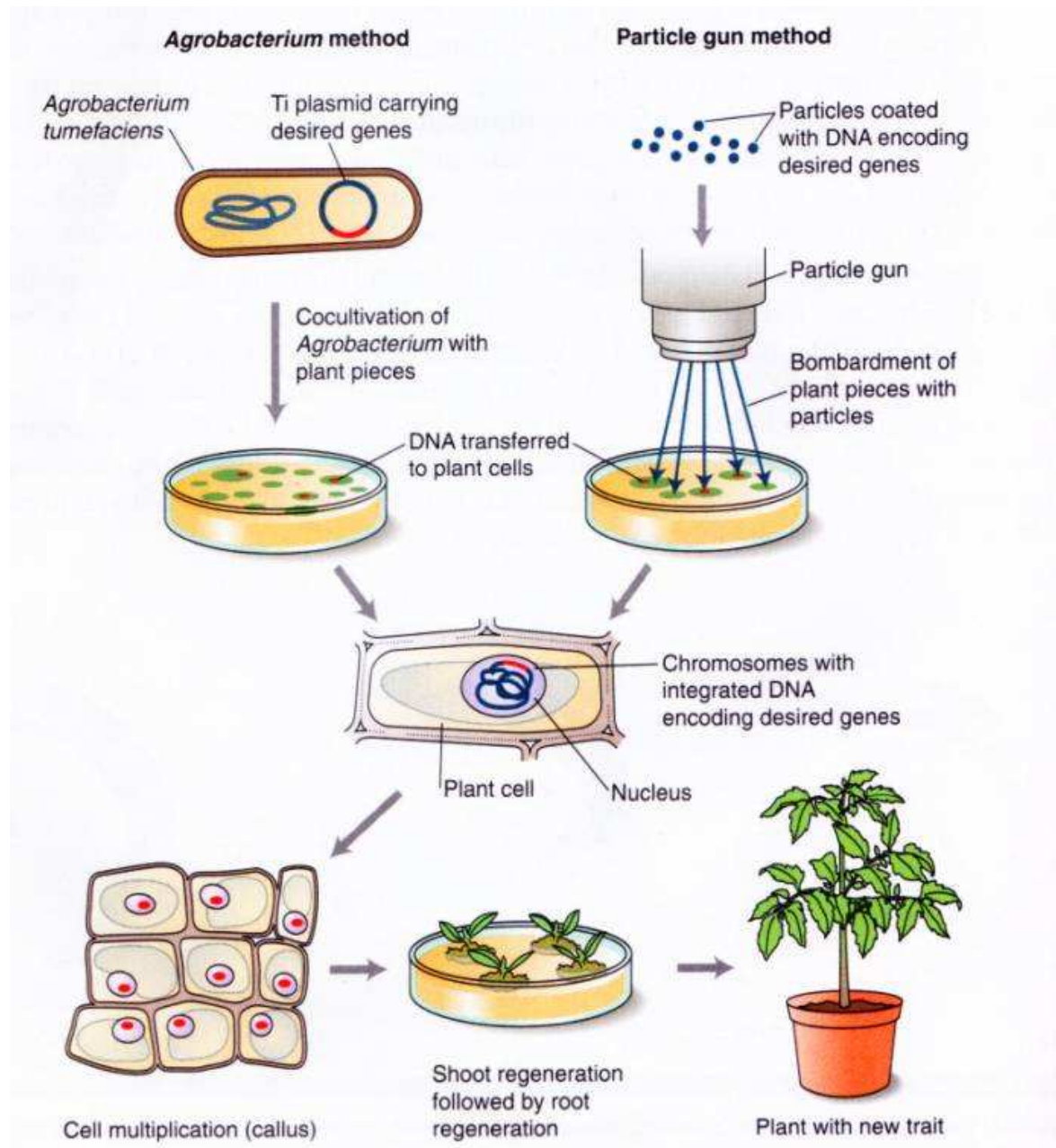


Trasferimento e integrazione del T-DNA



Agrobacterium tumefaciens è comunemente utilizzato per la manipolazione genetica delle piante





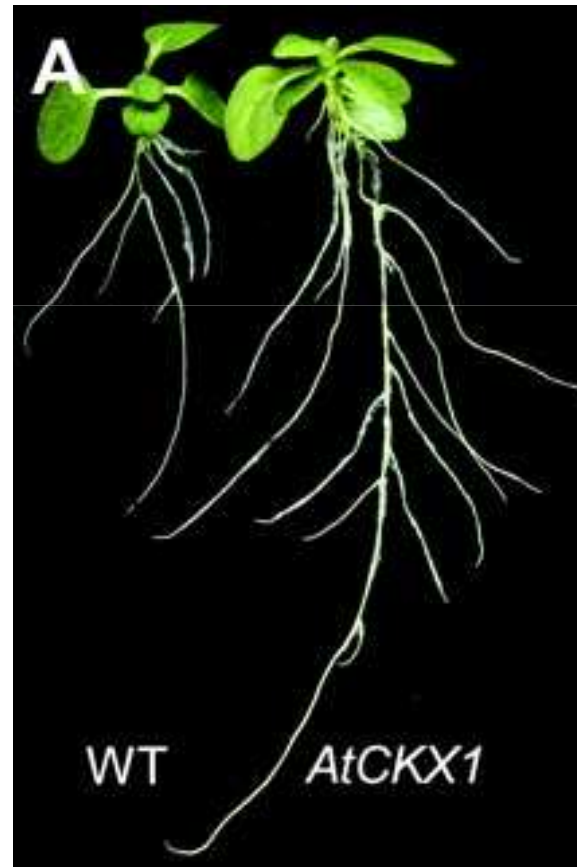
EFFETTI FISIOLOGICI

Le CK sono necessarie in vitro per la divisione cellulare



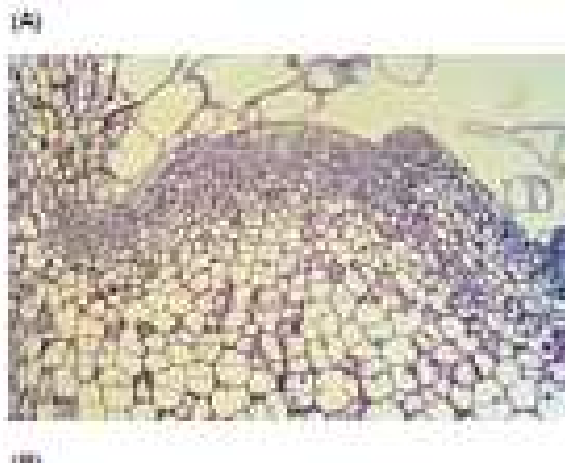
in vivo?

Piante che sovraesprimono il gene della CKX hanno uno sviluppo ridotto del germoglio e un'aumentata crescita delle radici



Le divisioni cellulari nella pianta adulta avvengono nei meristemi

Le CK sono necessarie per il mantenimento delle dimensioni del meristema apicale **del germoglio** (MAG)



Wt



Sovraesprimente AtCKX1

L'espressione localizzata del gene *ipt* di *agrobacterium* in piante genera meristemi ectopici

L'aumento di [CK] determina la sovraespressione di geni meristematici come *KNOTTED*, *KNAT1*, *STM*



Mutazione knotted nel
mais

Piante di tabacco sovraesprimenti il gene per la citochinina ossidasi



Wt

AtCKX



Wt

AtCKX

Le CK stimolano la crescita del germoglio

(La crescita del germoglio è dovuta alle divisioni cellulari nel meristema apicale)

Le CK regolano le divisioni cellulari in vivo

Piante di tabacco sovraesprimenti il gene per la citochinina ossidasi



Wt

AtCKX



Wt

AtCKX

Le CK inibiscono la crescita della radice
(che dipende dalle divisioni delle cellule del meristema
apicale della radice)

I meccanismi ormonali che regolano il mantenimento delle
dimensioni dei meristemi del germoglio e della radice sono diversi

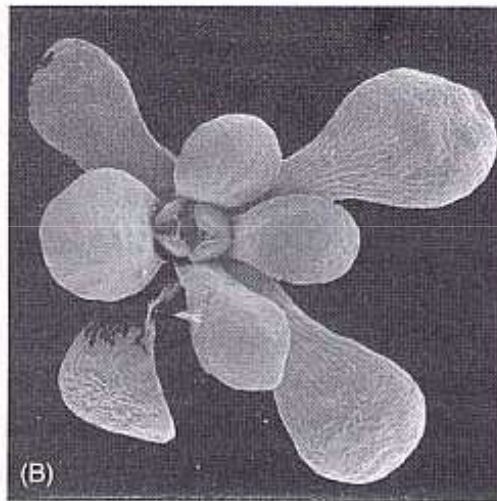
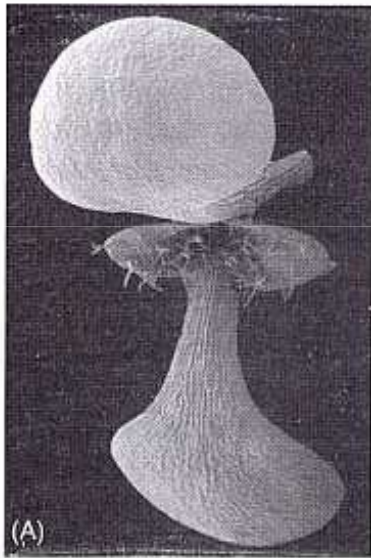
pianta trasformata con ipt batterica

- gli apici generano più foglie
- più clorofilla
- ritardata senescenza
- ridotta dominanza apicale
- ridotta capacità di produrre radici avventizie da fusti recisi

analisi di mutanti con morfologia alterata:



il mutante *amp1* di *Arabidopsis* ha alti livelli di zeatina



Maggior numero di cotiledoni

Meristema apicale più largo
(più foglie)

Ridotta dominanza apicale
(più infiorescenze)



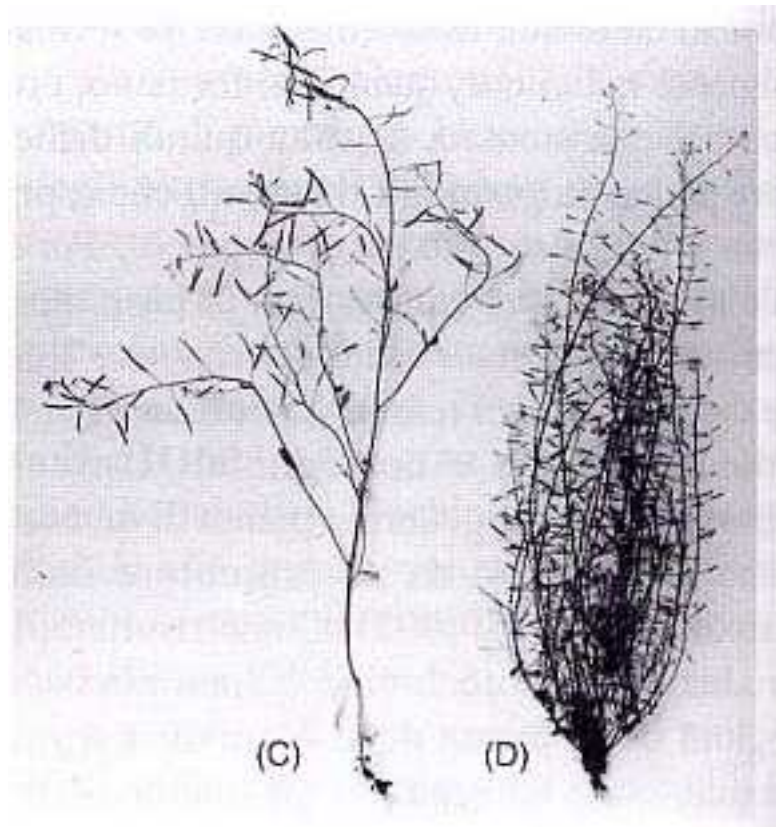
Le varietà di riso **japonica** e **indica** differiscono nella resa. La maggiore resa di indica è correlata alla ridotta attività di un gene della **citochinina ossidasi** nelle infiorescenze

si formano più organi riproduttivi e più cariossidi



le citochinine promuovono la crescita delle gemme laterali

le piante *amp1* hanno una ridotta dominanza apicale



Abete infettato da
Corynebacterium fascians

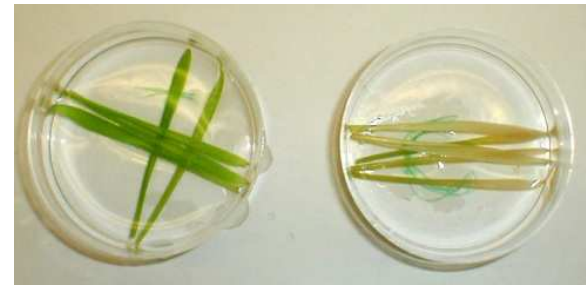
Whitches' broom

le citochinine ritardano la senescenza fogliare

applicazione citochinine



ritardo senescenza



(in vitro)

ipt + promotore cisteina proteasi
(senescenza specifico)



(in vivo)

ipt

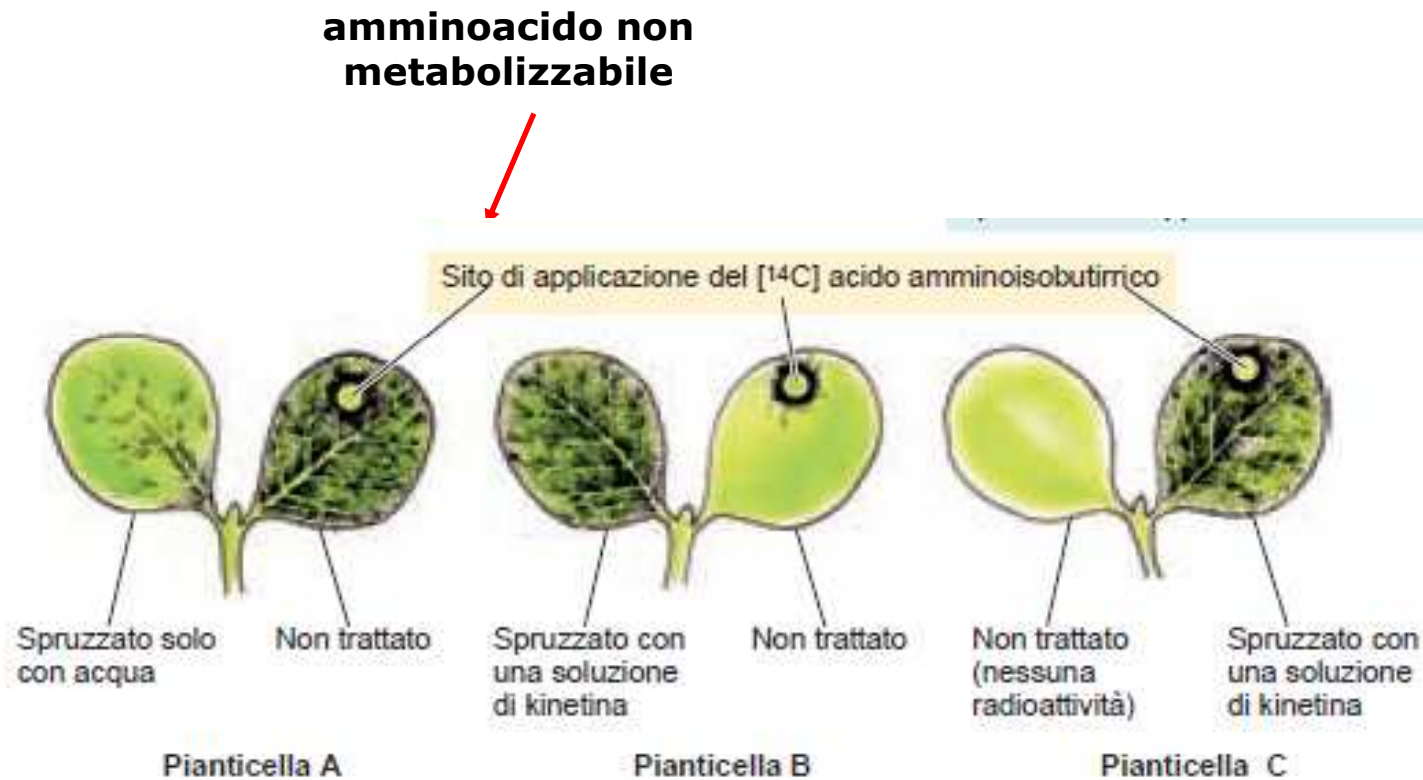
C

Piante di
lattuga di
controllo

Piante di lattuga che
esprimono il gene *ipt*
al momento della
senescenza



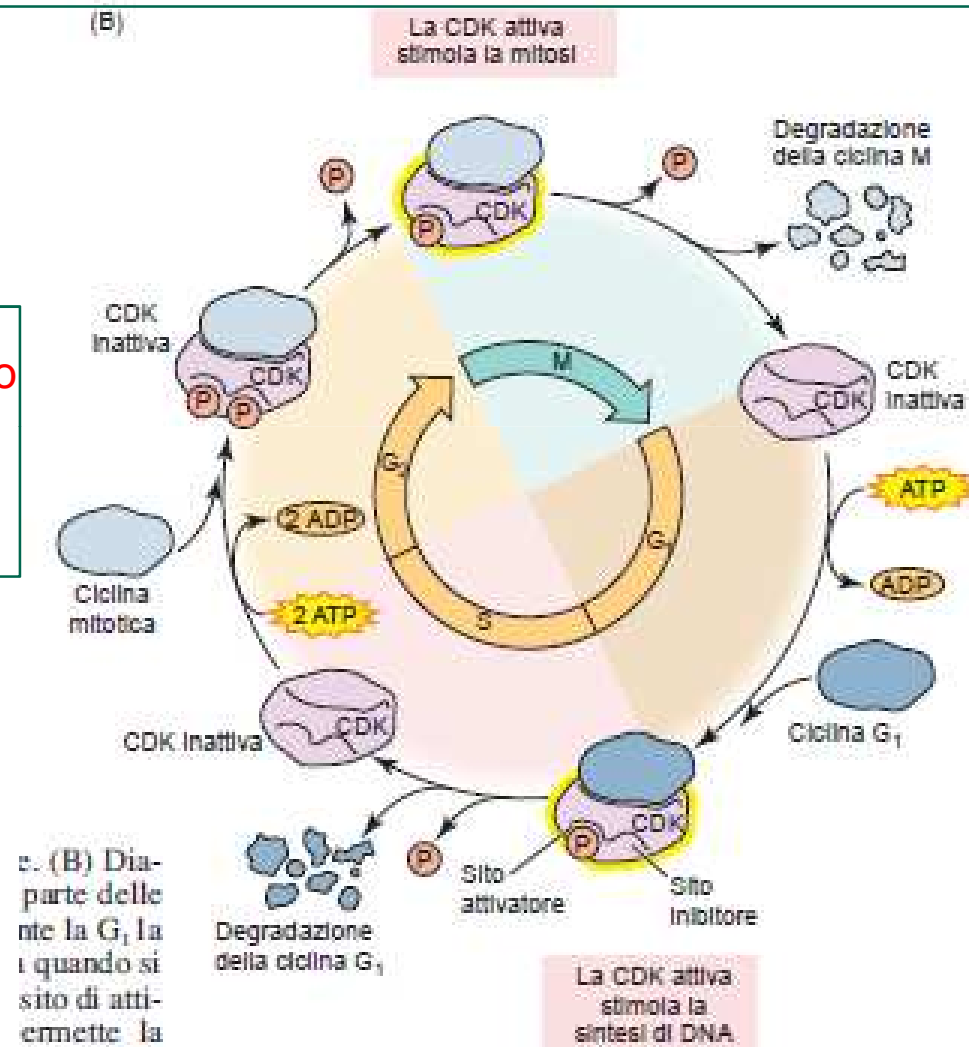
le citochinine promuovono la mobilitazione dei nutrienti



CK regolano l'espressione di componenti del ciclo cellulare (CDK)

Inducono l'espressione del gene CYDC3 che codifica per una ciclina di tipo D

Insieme a IAA CK regolano
il passaggio tra G2 e M
(attivazione di Cdc2)

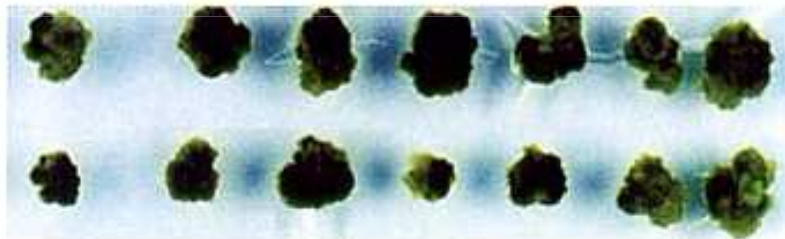


citochinine

CycD3

Espresso in arabidopsis in tessuti in divisione come meristemi del germoglio e primordi fogliari

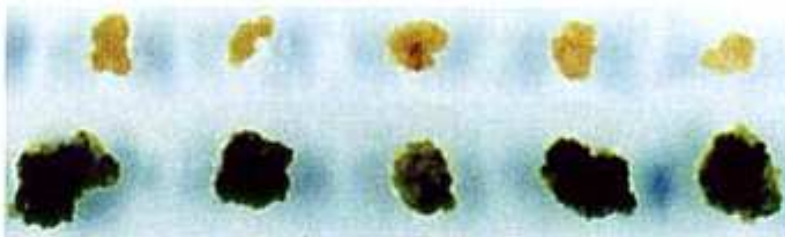
Auxin + cytokinin



wild type

CYCD3
overexpressor

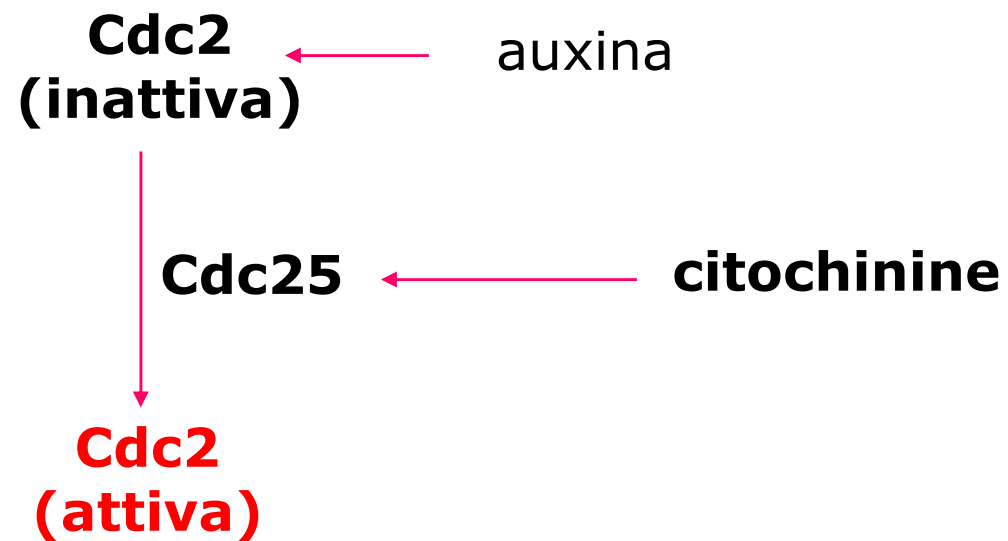
Auxin



wild type

CYCD3
overexpressor

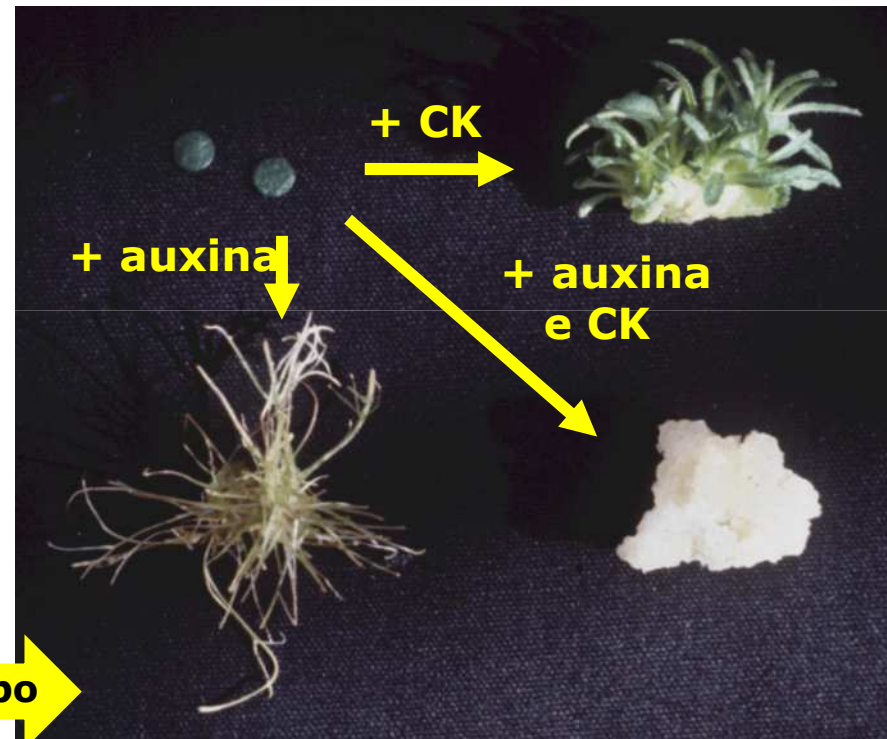
CDK
Cyclin dependent
protein kinase

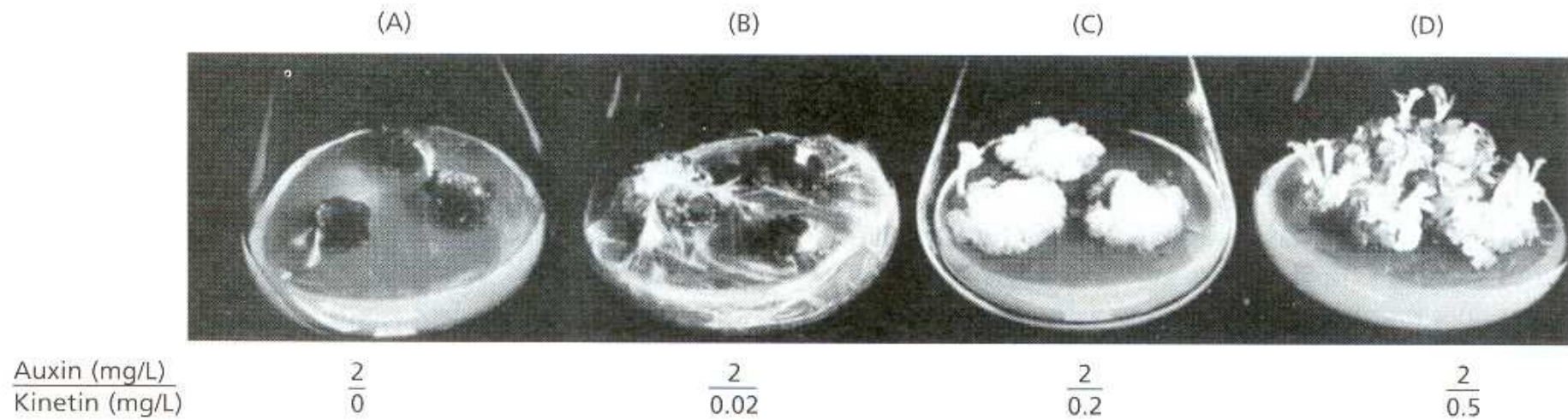


il rapporto auxina:citochinina regola la morfogenesi in tessuti in coltura



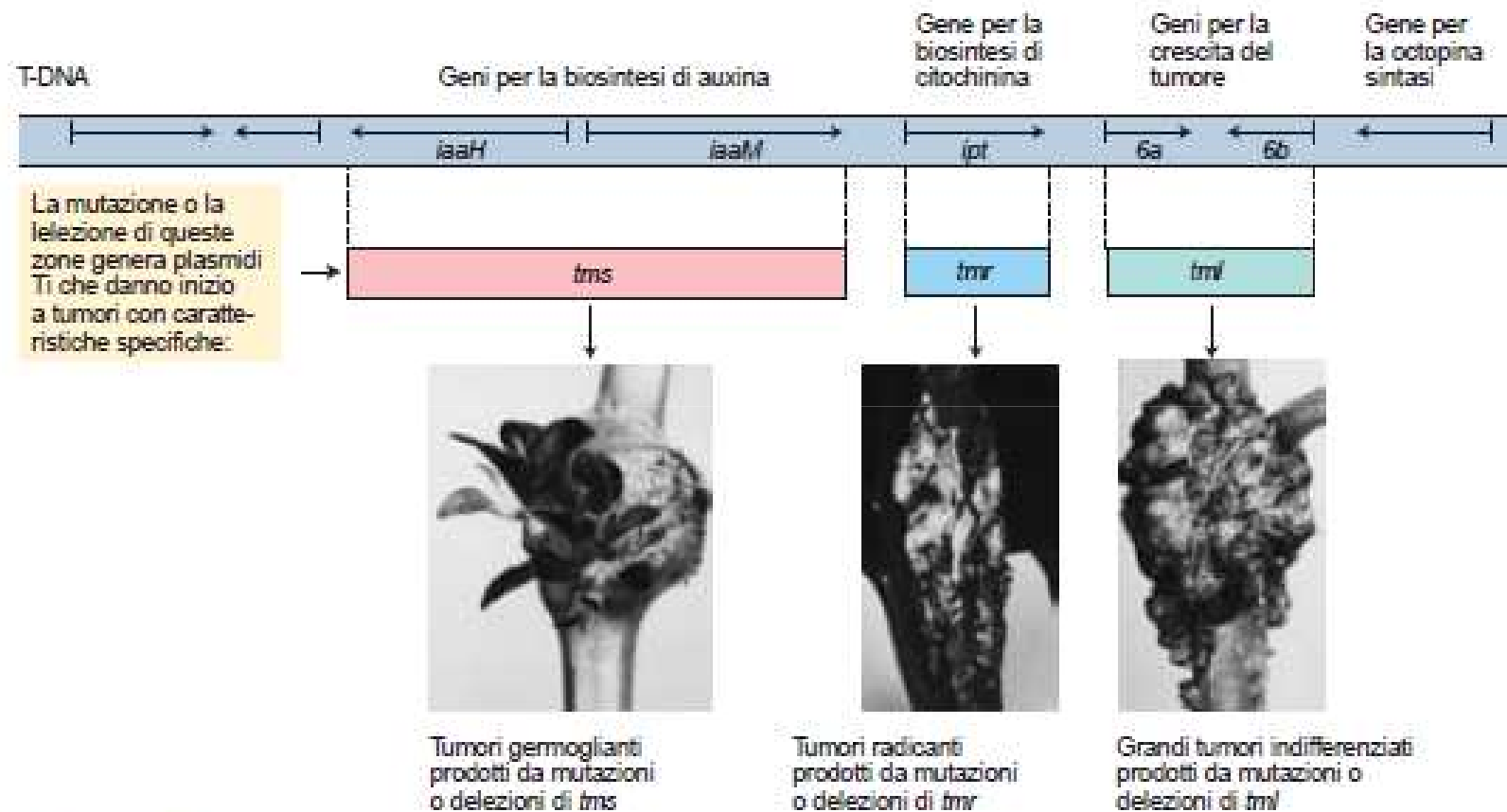
tempo

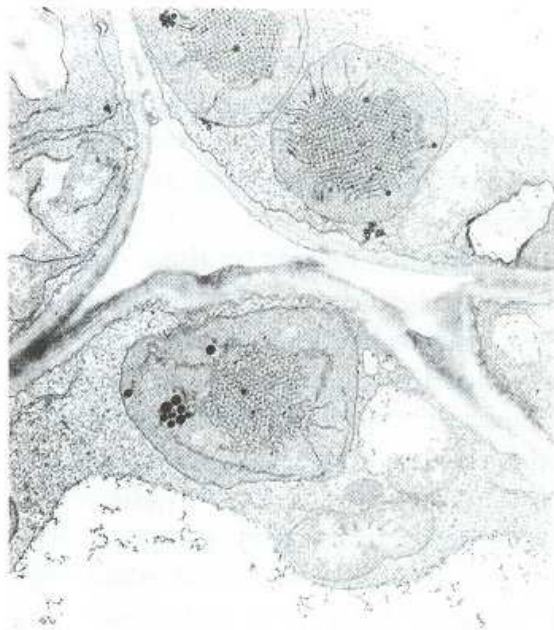




- A) no divisione cellulare**
- B) formazione radici**
- C) sviluppo callo indifferenziato**
- D) formazione germogli**

Effetto di delezioni sul T-DNA di un plasmide Ti di agrobacterium





(D) Chloroplasts of dark-grown seedlings without cytokinin



(E) Chloroplasts of dark-grown seedlings with cytokinin, showing thylakoid formation

le citochinine promuovono la maturazione dei cloroplasti

luce
citochinine

ezioplasti



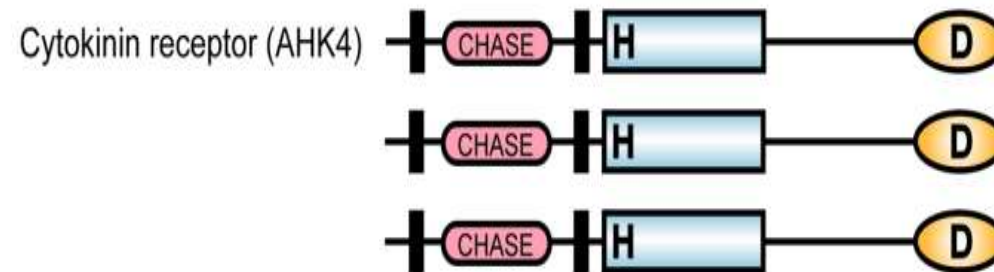
cloroplasti

TRASDUZIONE DEL SEGNALE

Identificati recettori per le CK in arabidopsis

CRE1 (AHK4): (mutanti *cre1* non sviluppano germogli da callo in risposta a CK)

AHK4



AHK2

AHK3

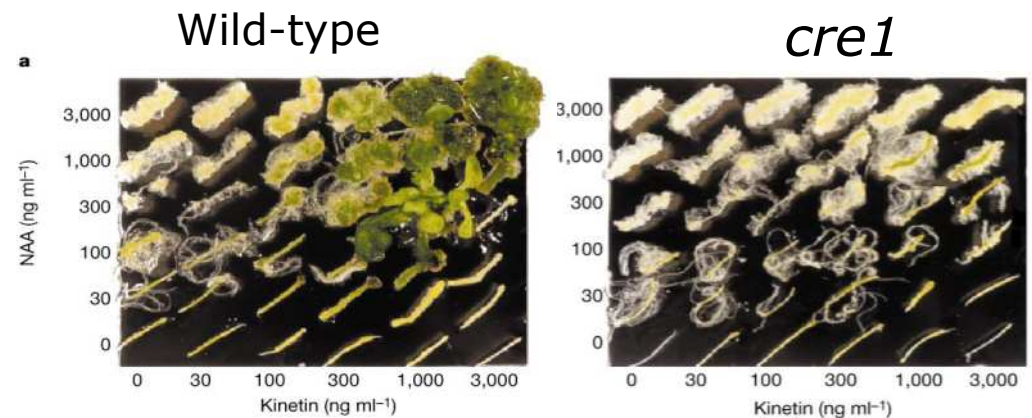
Il dominio CHASE lega le CK

AHK4



AHK4 è stato identificato nel mutante *wooden-leg (wol)* e nel mutante di risposta alle CK *cre1*

La radice di *wol* root è troncata per il mancato differenziamento del cilindro centrale. Il mutante *cre1* non produce germogli in coltura.



I recettori delle CK sono delle istidina chinasi ibride



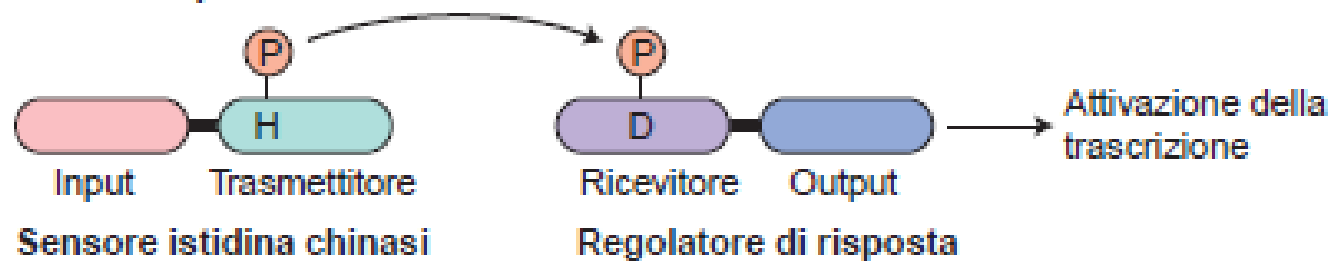
ISTIDINA CHINASI (HK) BATTERICA



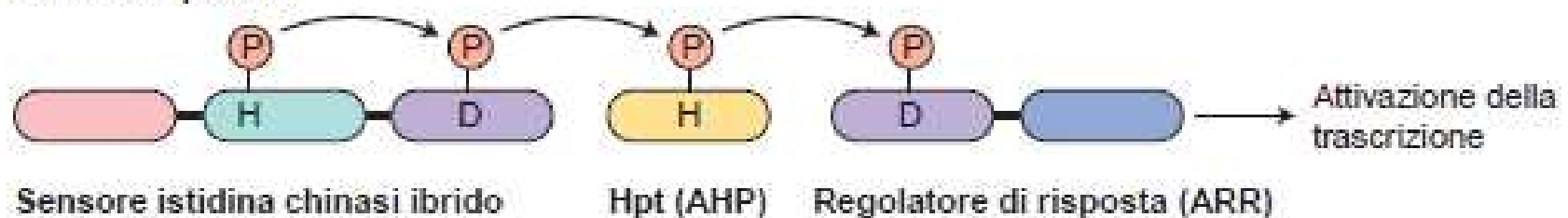
ISTIDINA CHINASI IBRIDA

LE ISTIDINA CHINASI IBRIDE SONO
PREDOMINANTI NEGLI EUCARIOTI

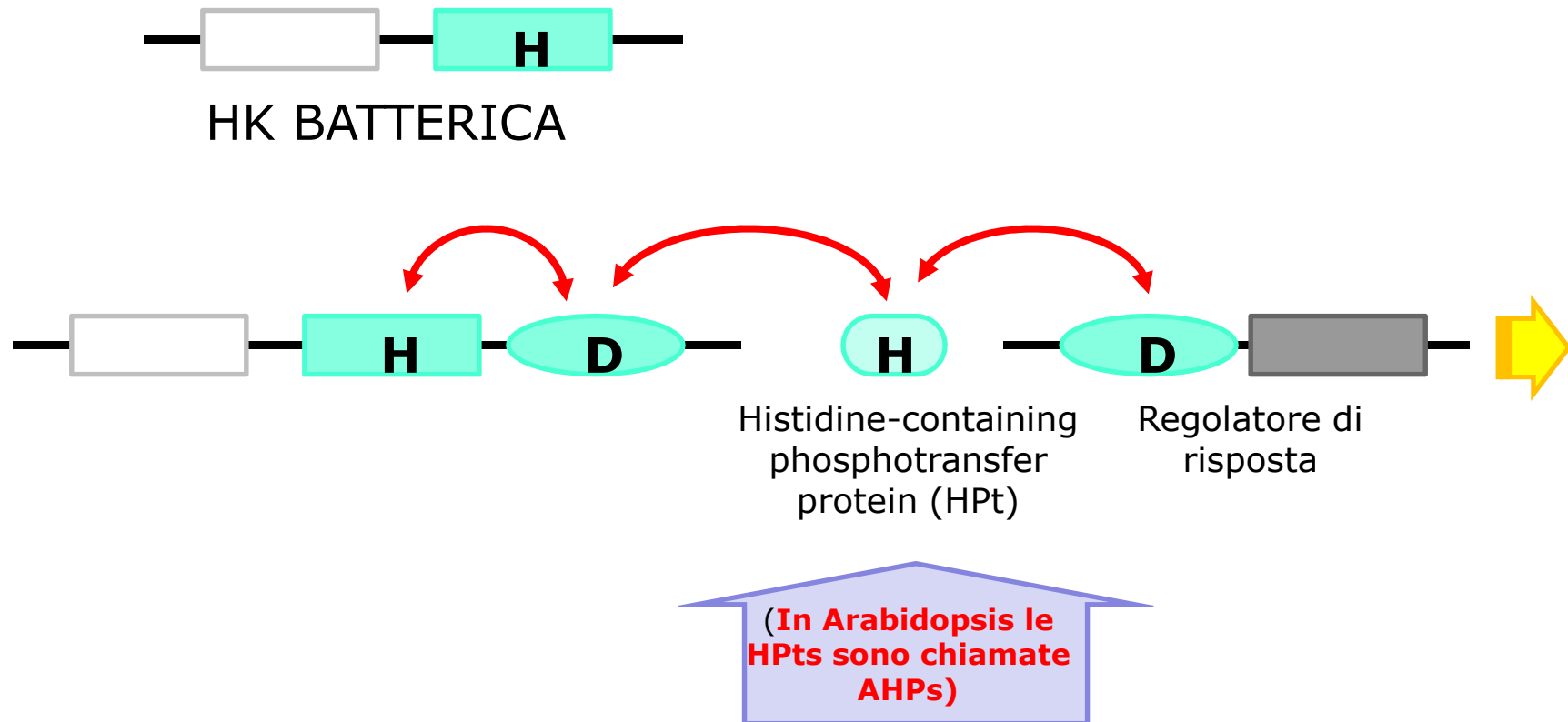
**Sistema di segnale semplice
a due componenti**



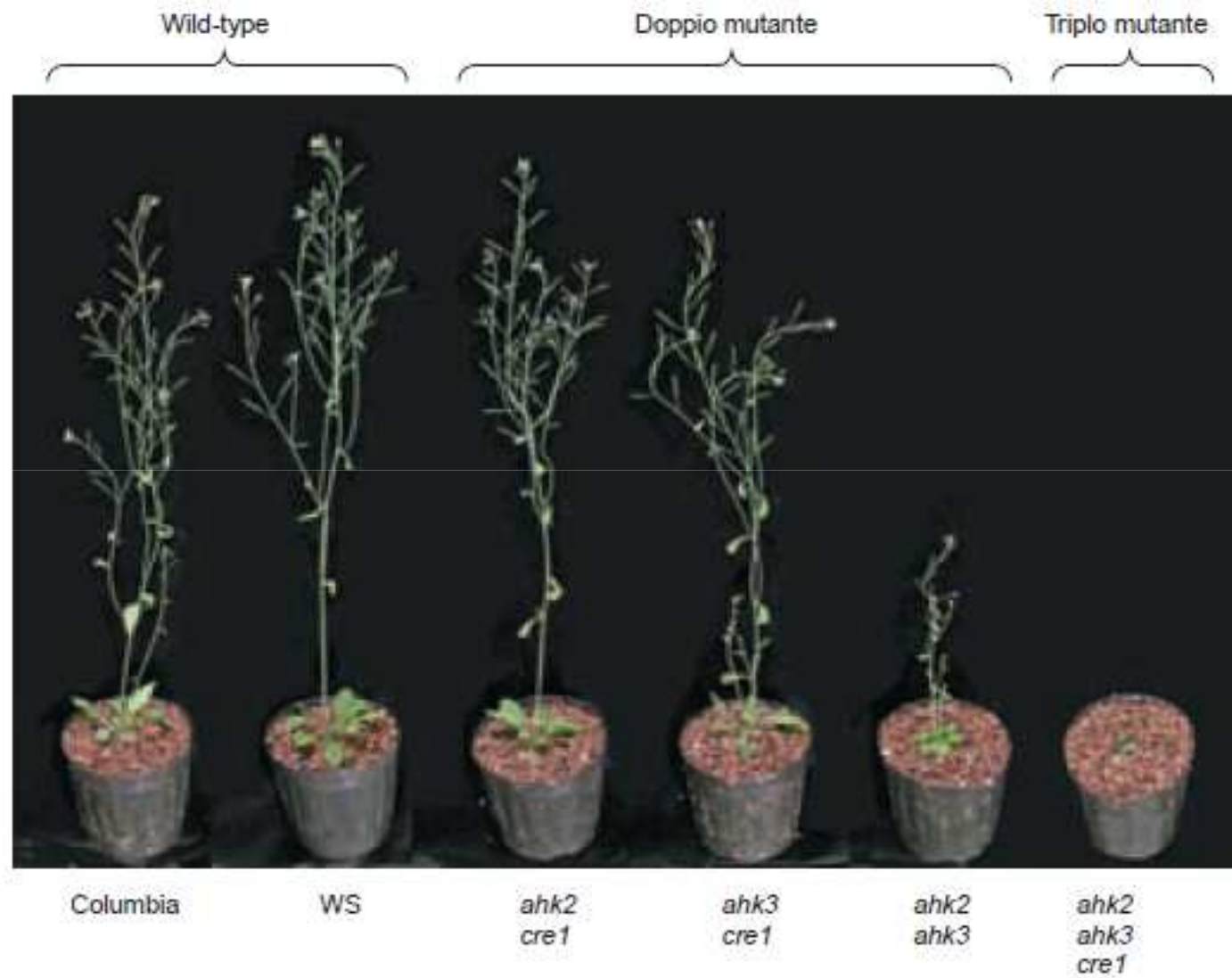
**Sistema di segnale fosforelay
a due componenti**



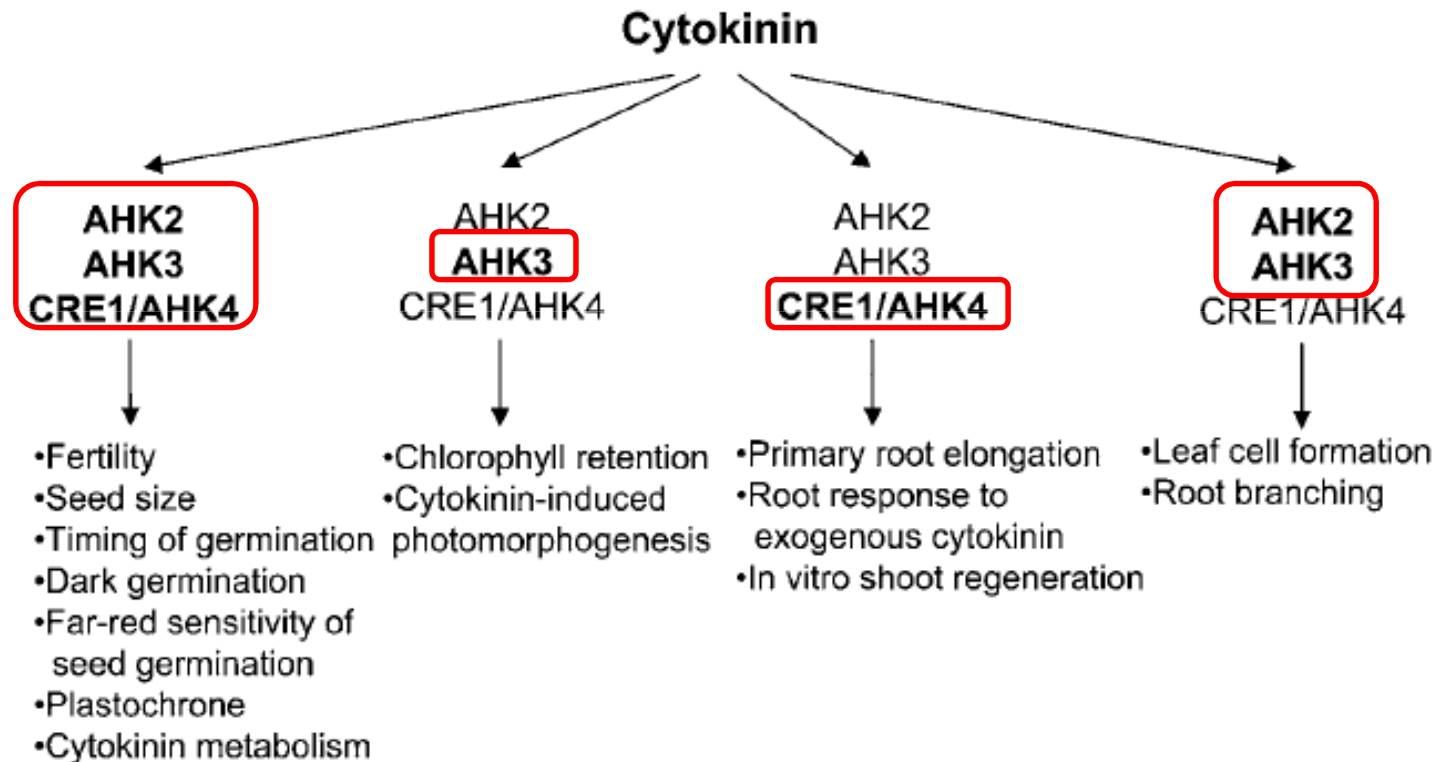
Catena di trasduzione del segnale delle CK in arabidopsis



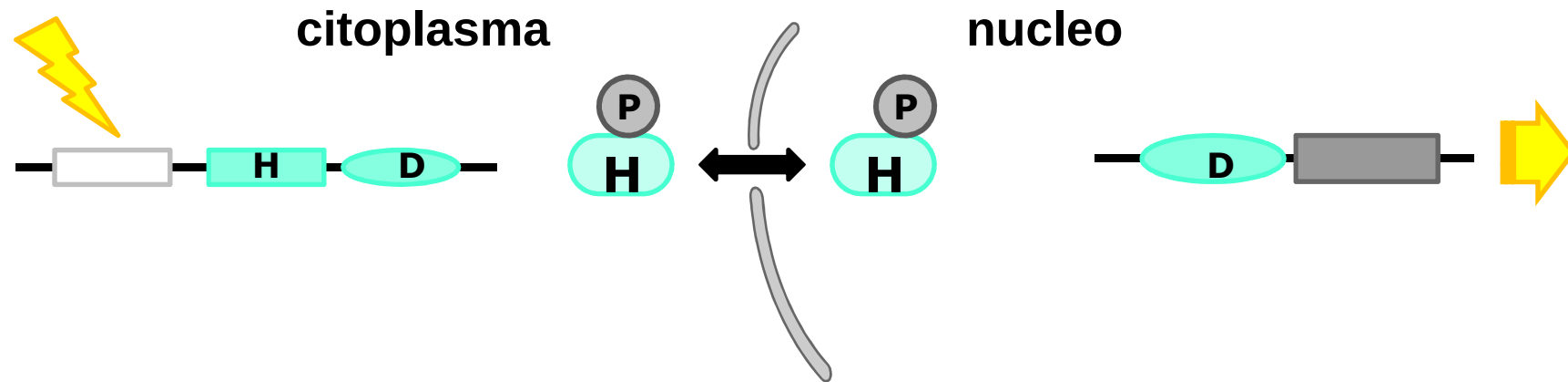
Famiglia multigenica: ridondanza



I recettori hanno ruoli in parte diversi nella risposta alle CK



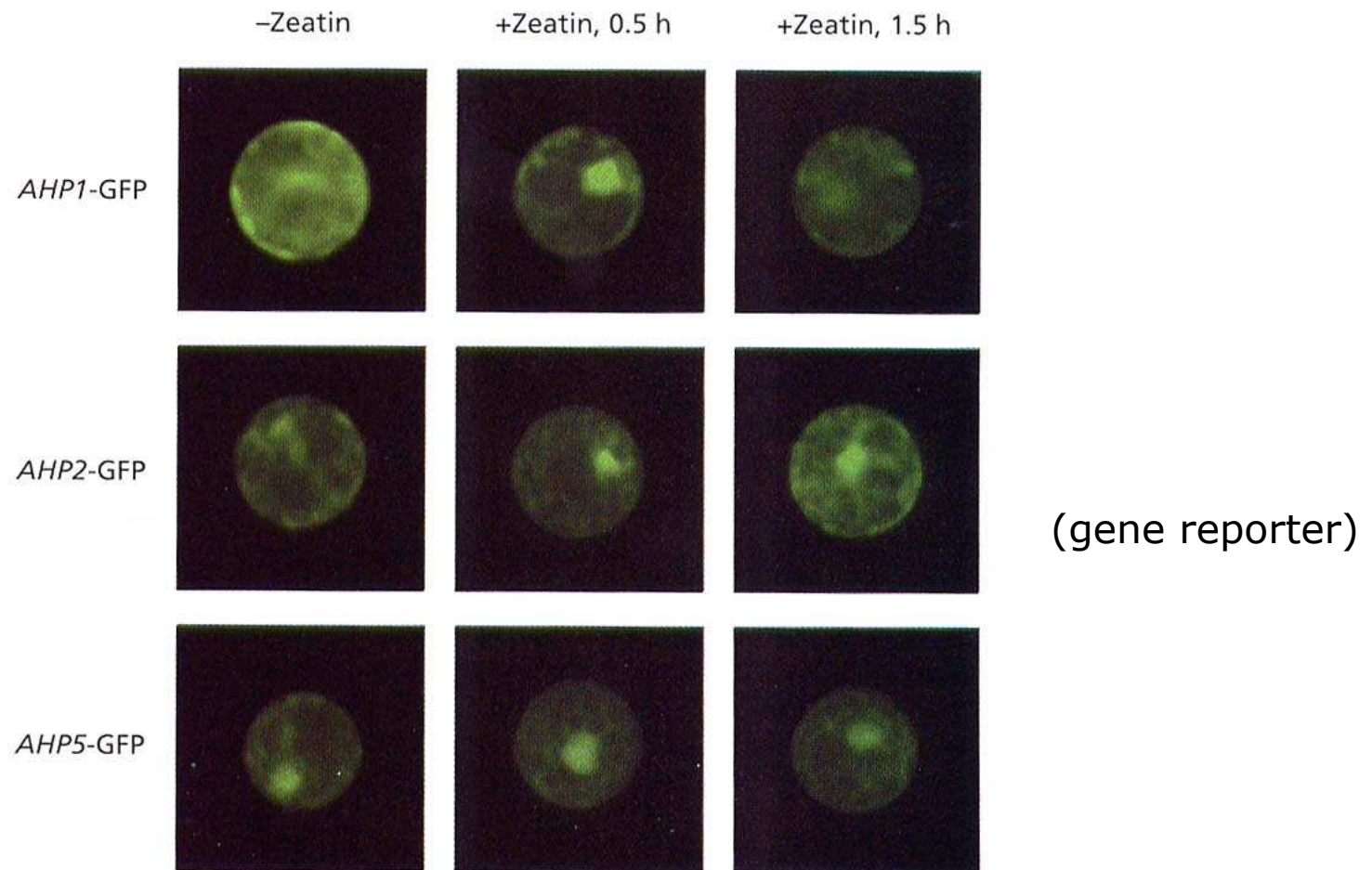
Le AHPs migrano nel nucleo



(AHP = Hp di arabidopsis)

Le CK inducono il movimento transiente nel nucleo di proteine AHP

In arabidopsis 5 geni AHP

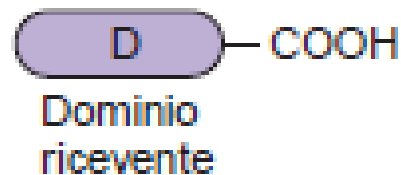


LE CK inducono l'espressione di
geni di risposta **ARR** (arabidopsis response regulator)

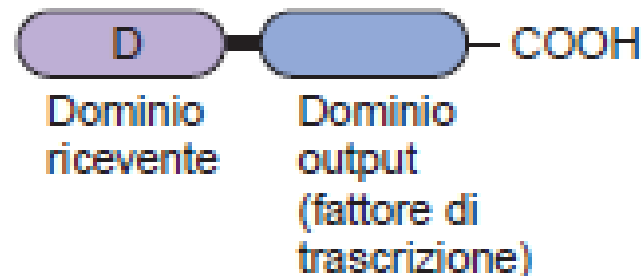
Questi geni sono di due tipi:

ARR A (solo dominio ricevente)

ARR B (dominio ricevente e dominio di legame al DNA)

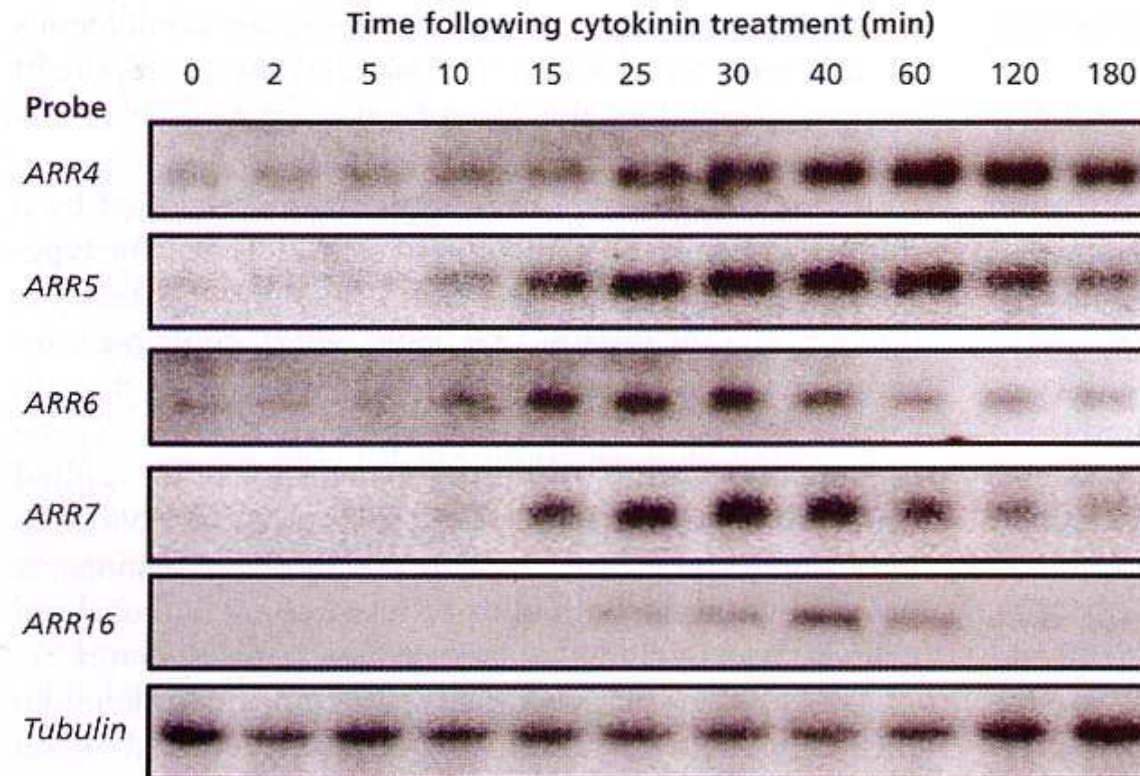


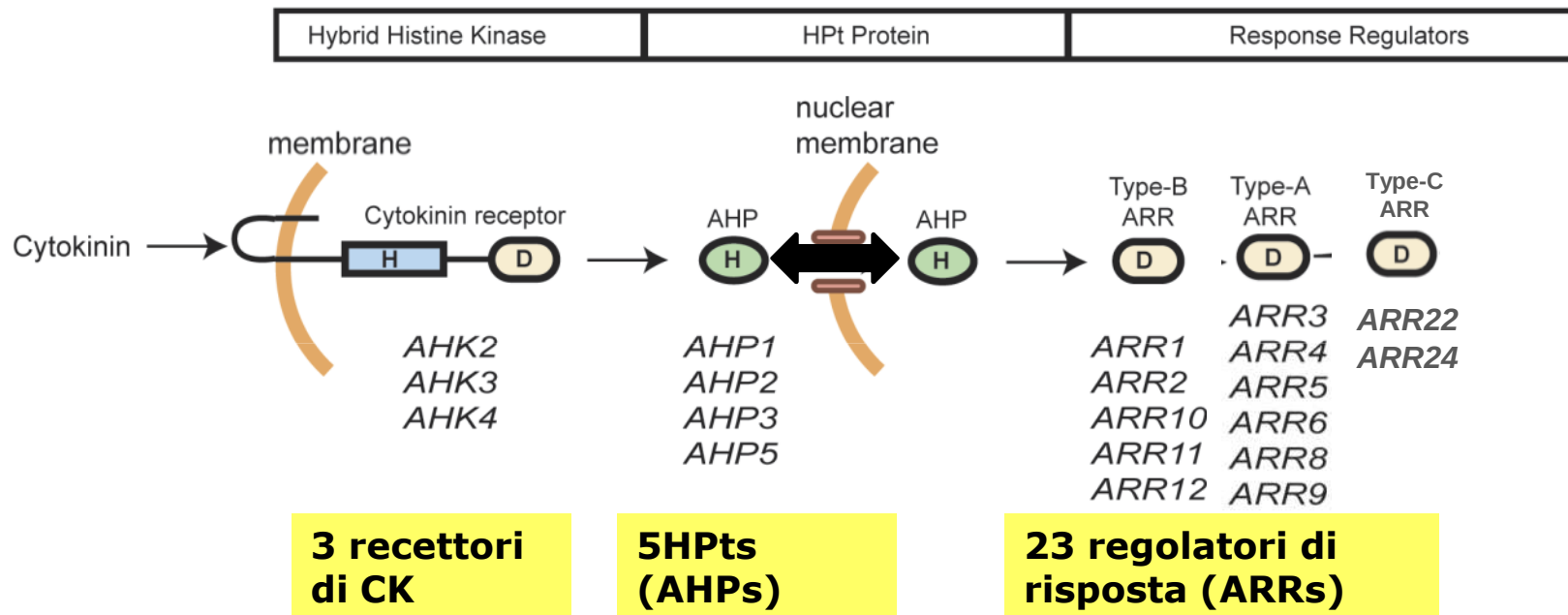
ARR di tipo A



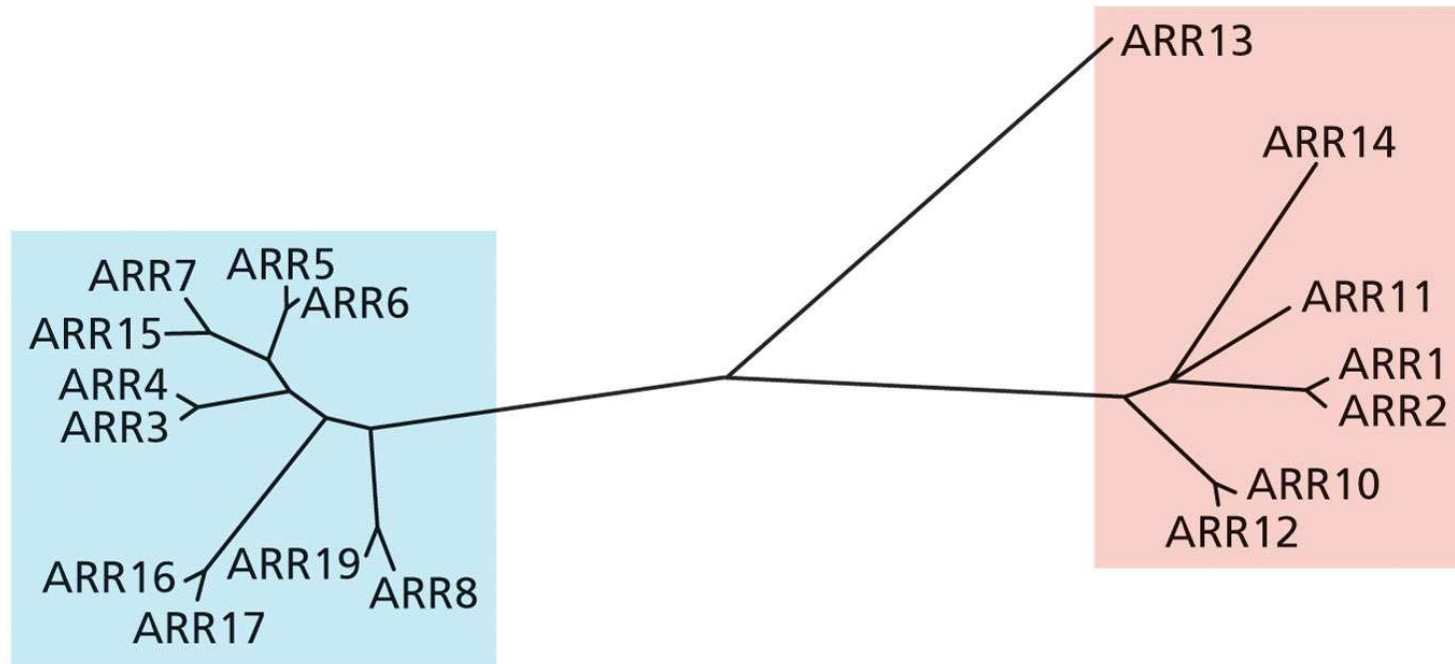
ARR di tipo B

induzione geni ARR in risposta alle citochinine

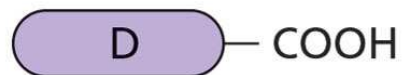




Esistono due tipi di proteine ARR con opposte funzioni



Type A ARRs



Receiver domain

ARR6 reprime le divisioni cellulari indotte da citokinine

Type B ARRs

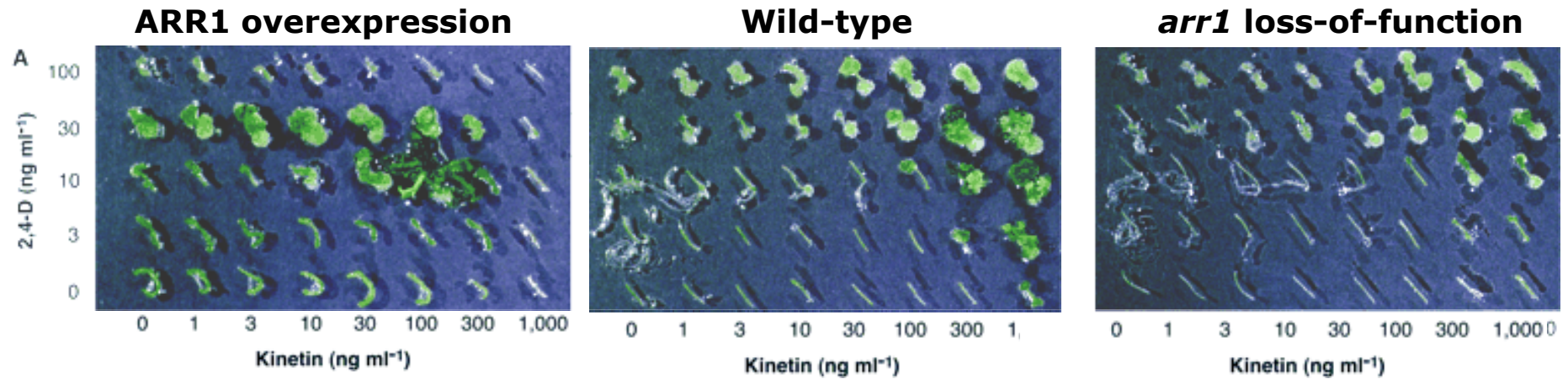


Receiver domain

Output domain

ARR2 stimola le divisioni cellulari Indotte da citokinine

La sovraespressione di ARR1 (ARR tipo B) rende il tessuto più sensibile alle CK

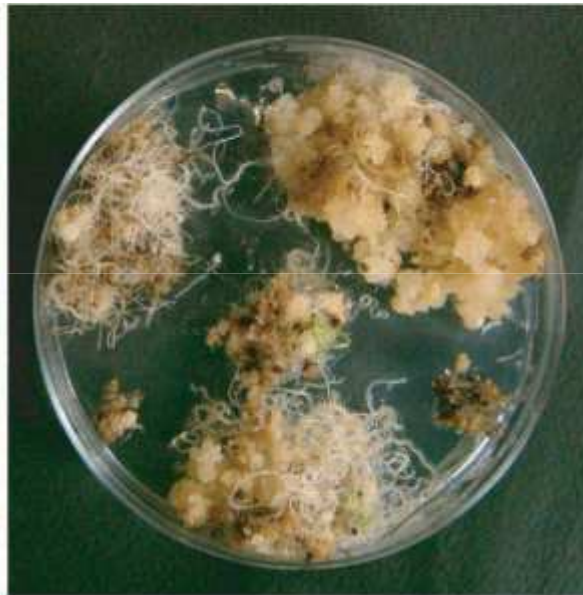


Sensibilità misurabile come [CK] necessaria per produrre l'inverdimento

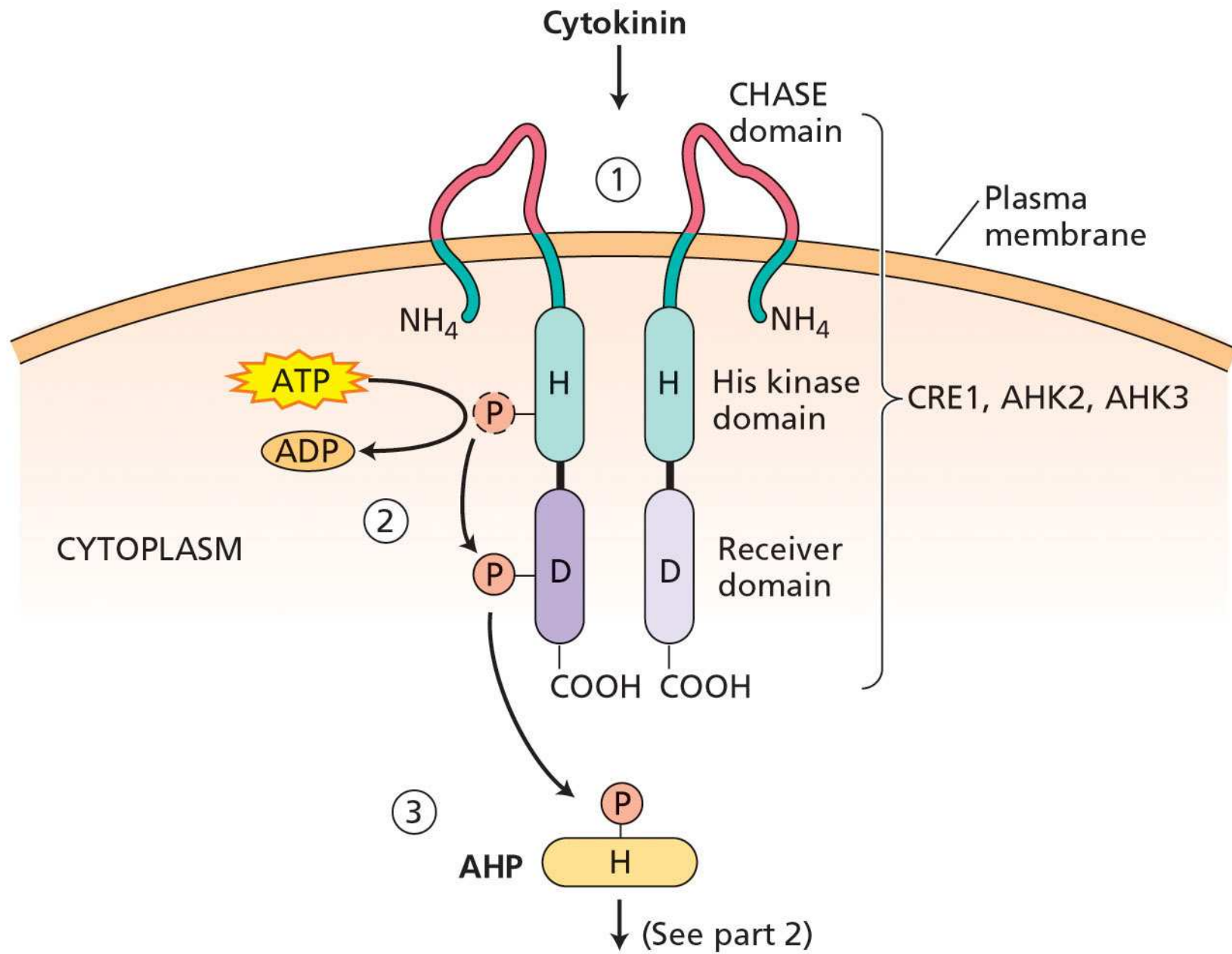
La sovraespressione di A-ARR inibisce la formazione di germogli

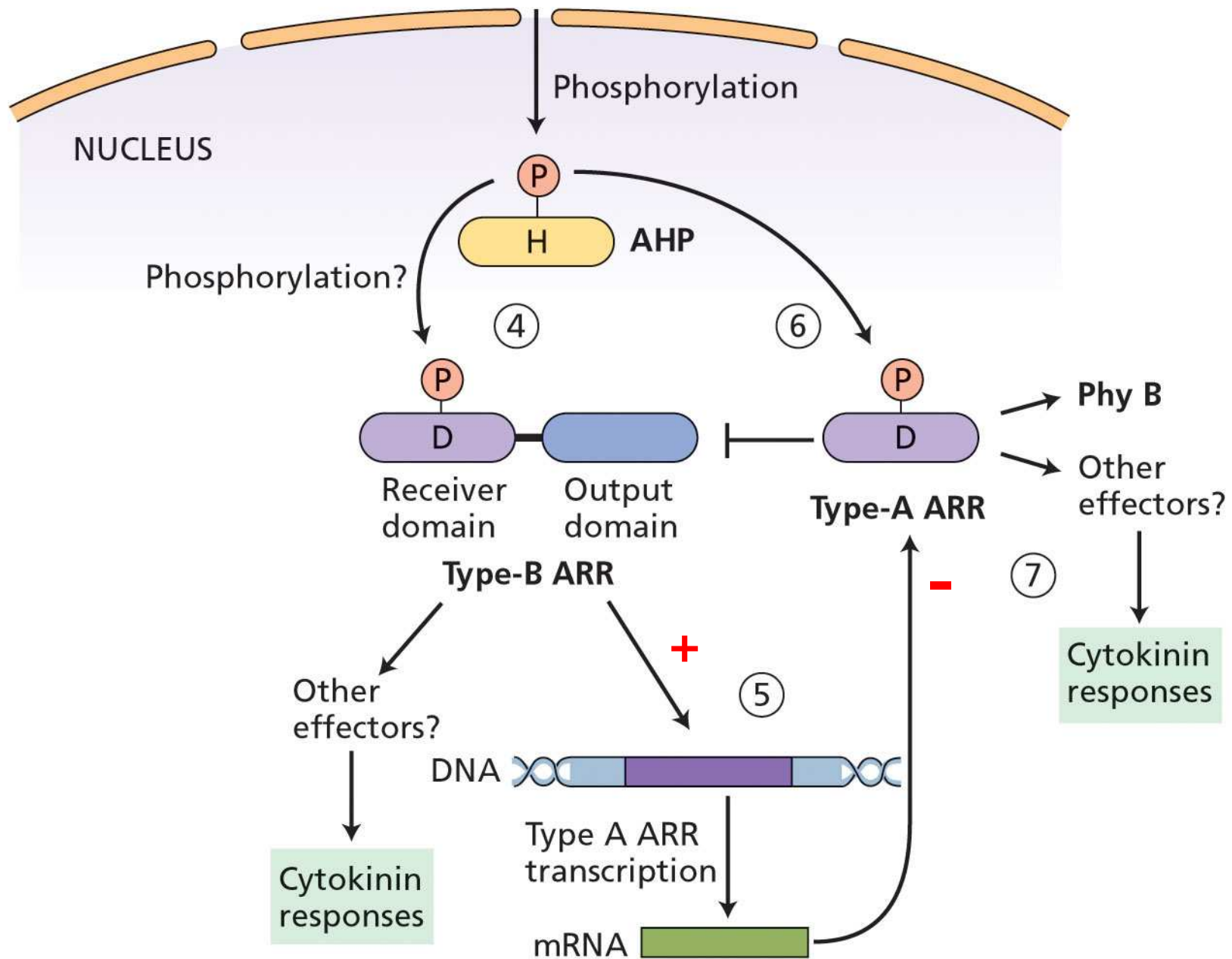


Control

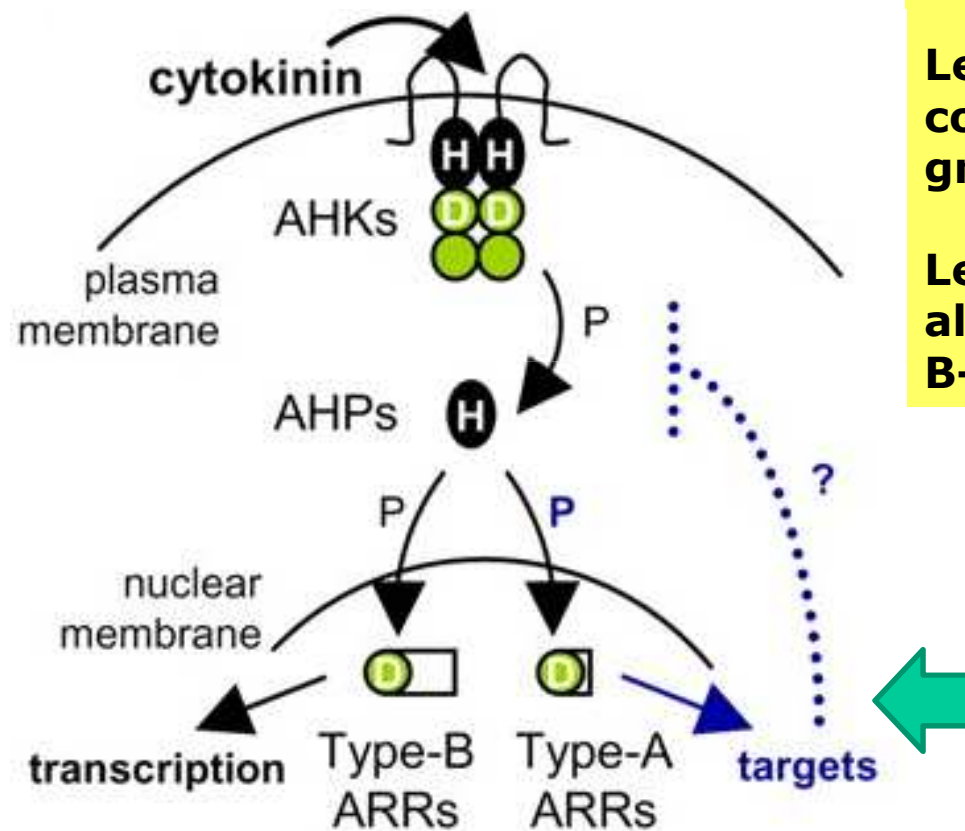


Overexpression of *OsRR6*





Le A-ARR come inibiscono la risposta alle CK?



Le A -ARRs potrebbero competere con le B -ARRs per i gruppi fosforici

Le A- ARRs potrebbero inibire in altro modo la fosforilazione delle B-ARR