

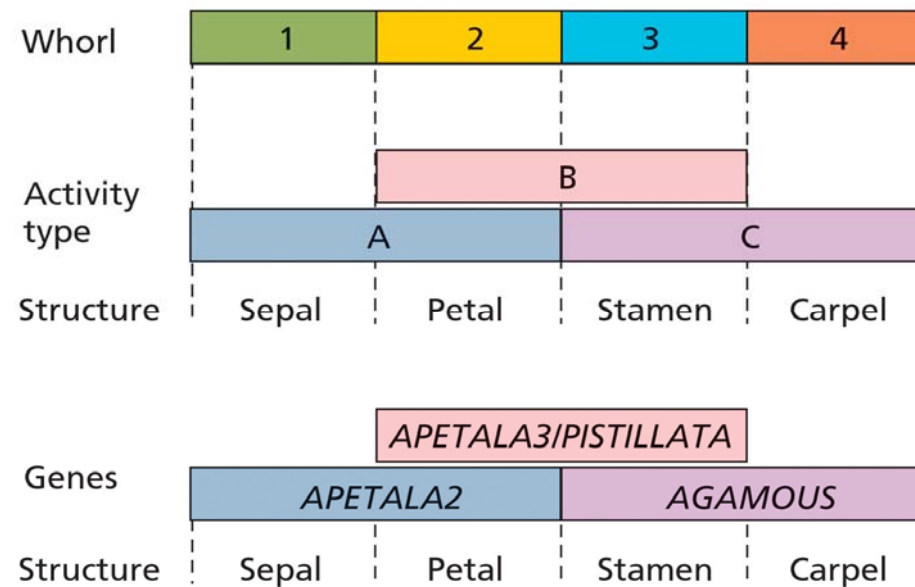
Il modello ABC postula che l'identità d'organo nel fiore è controllata dalla combinazione di tre funzioni geniche A B C nei verticilli fiorali

A = SEPALI

A+B = PETALI

B+C = STAMI

C = CARPELLI



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 24.6 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

A e B si reprimono reciprocamente

INTEGRAZIONE DEL MODELLO ABC

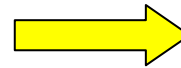
Il mancato sviluppo di organi nelle posizioni corrette nei mutanti ABC dimostra che i geni ABC sono **NECESSARI** per specificare l'identità degli organi fiorali

Sono anche sufficienti?

STUDI DI ESPRESSIONE ECTOPICA DEI GENI ABC (promotore 35S)

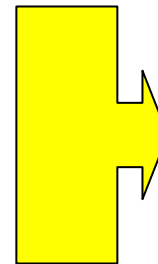
Overespressione di entrambi i geni di classe B (*AP3*; *PI*)

Nel fiore: verticilli esterni = Petali
verticilli interni = Stami



Sufficienti

In foglie a rosetta =
mancata conversione in petali



In foglie caulinari =
debole conversione in petali

Insufficienti

Altri componenti oltre ad *AP3/PI* al di fuori del fiore sono necessari per specificare la funzione B di identità di organo

geni SEP

- sono **NECESSARI** per specificare l'identità degli organi fiorali
- appartengono alla famiglia dei geni **MADS**

La maggior parte dei geni ABC sono membri della famiglia MADS box
(AP3; PI; AP1; AG)

In arabidopsis più di 80 geni MADS

Coinvolti in diversi aspetti dello sviluppo [*FLC*; *AGL20 (SOC1)*; *CAL*;

Inizialmente geni MADS identificati sulla base dell' omologia con AG

Designati come *AGAMOUS-LIKE (AGL)*

[**MADS** = **M**inichrome maintenance 1, **D**eficiens, **A**gamous, **S**erum response]

Tre geni MADS:

***SEP1* (AGL2); *SEP2* (AGL4); *SEP3* (AGL9)**

Sono simili nella sequenza ed esibiscono lo stesso pattern di espressione temporale durante le fasi iniziali e intermedia dello sviluppo del fiore

***SEP 1* e *SEP2* espressi in tutti e quattro i verticilli**

***SEP3* espresso soltanto nei verticilli 2, 3 ,4**

- Mutanti *sep* singoli o doppi non mostrano fenotipo
- Tripli mutanti *sep1 sep2 sep3* esibiscono un fenotipo simile a doppi mutanti BC

Come ad esempio *pi ag* oppure *ap3 ag*

Nei tripli mutanti il fiore è formato interamente da sepali e i fiori sono indeterminati

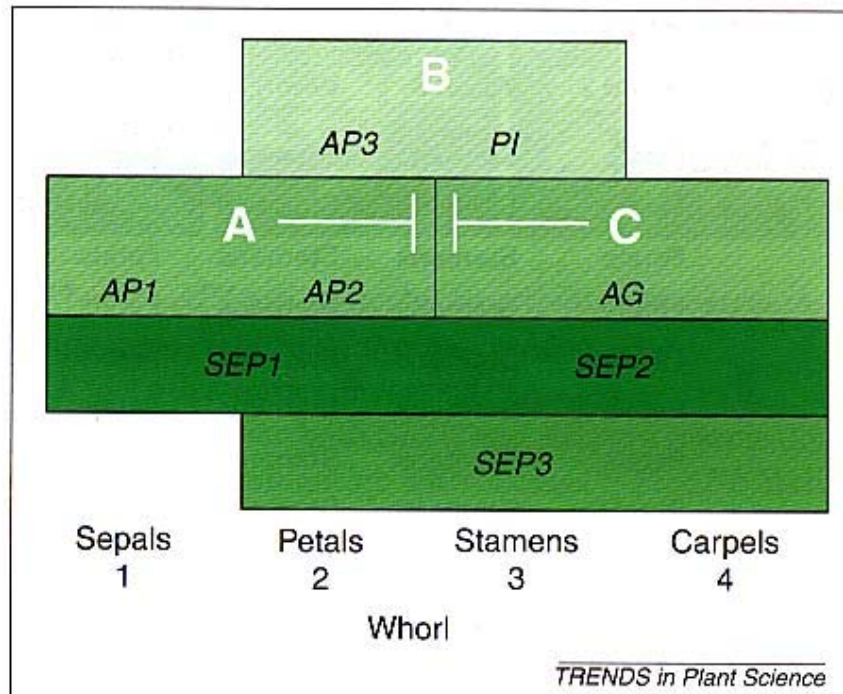
- Tutti e tre i geni *SEP* sono necessari per lo sviluppo corretto degli organi florali (in assenza dei geni *SEP* i tre verticilli interni si sviluppano tutti come sepali)
- I geni *SEP* sono ridondanti (necessari i tripli mutanti per la manifestazione del fenotipo)

Classe A: *APETALA1 (AP1), APETALA 2 (AP2)*

Classe B: *APETALA3 (AP3), PISTILLATA (PI)*

Classe C: *AGAMOUS (AG)*

MODELLO ABC integrato con i geni SEP



Box 1. ABC and SEP genes

AG	AGAMOUS (<i>Arabidopsis</i> C class)
AP1	APETALA1 (<i>Arabidopsis</i> A class)
AP3	APETALA3 (<i>Arabidopsis</i> B class)
DEF	DEFICIENS (<i>Antirrhinum</i> AP3 orthologue)
GLO	GLOBOSA (<i>Antirrhinum</i> PI orthologue)
PI	PISTILLATA (<i>Arabidopsis</i> B class)
PLE	PLENA (<i>Antirrhinum</i> AG orthologue)
SEP1	SEPALLATA1
SEP2	SEPALLATA2
SEP3	SEPALLATA3
SQUA	SQUAMOSA (<i>Antirrhinum</i> AP1 orthologue)

Table 1. Floral organ identity genes in *Arabidopsis* and *Antirrhinum*

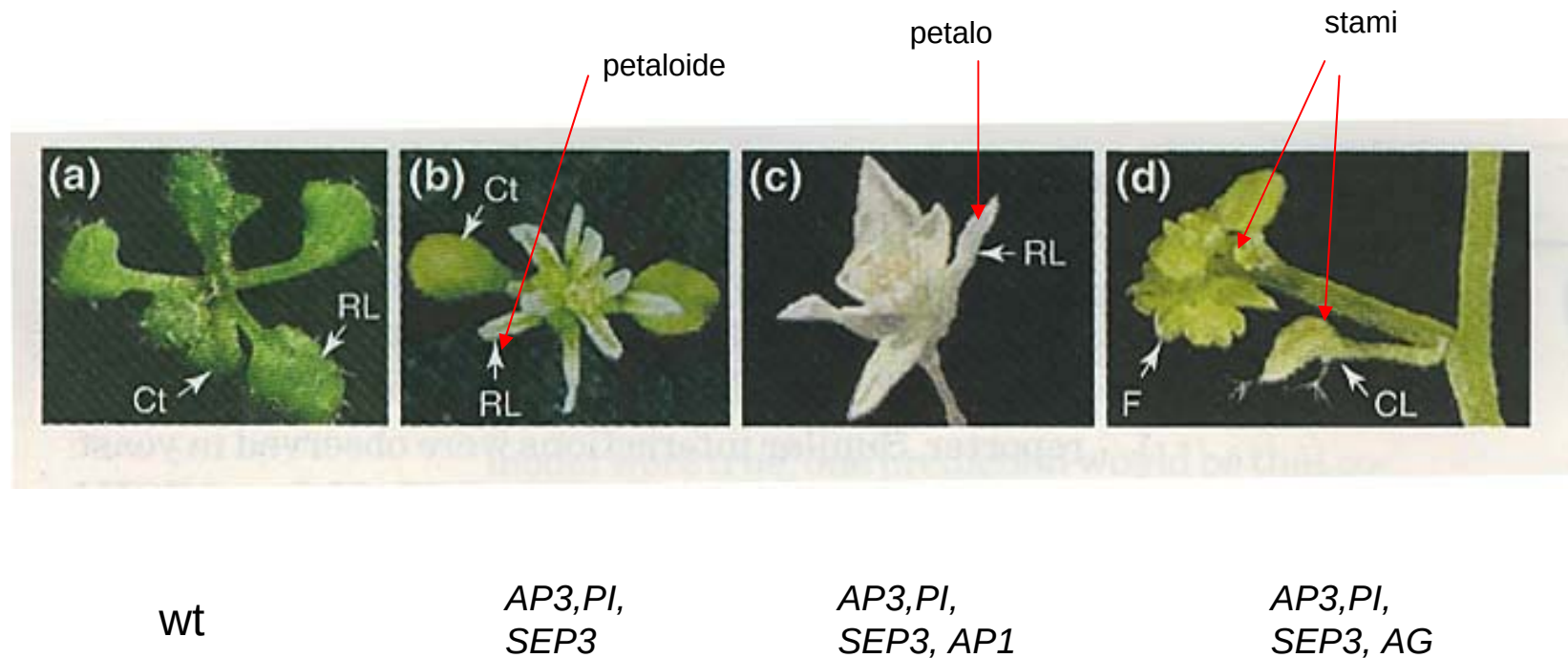
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Antirrhinum majus</i>
A class	AP1, AP2	SQUAMOSA (SQUA)
B class	AP3, PI	DEFICIENS (DEF), GLOBOSA (GLO)
C class	AG	PLENA
SEPALLATA	SEP1, SEP2, SEP3	DEFH84, DEFH200, DEFH72

Come test di “SUFFICIENZA” i geni *SEP* sono stati espressi ectopicamente insieme ai geni ABC

Table 2. Ectopic expression of ABC and *SEP* genes

	Overexpressed	Whorl 1	Whorl 2	Whorl 3	Whorl 4	Cauline leaves	Rosette leaves
B	<i>AP3, PI</i>	Petals	Petals	Stamens	Stamens	Slightly petaloid	Normal
	<i>AP3, PI, SEP1</i>	Petals	Petals	Stamens	Stamens	Petals	Slightly petaloid
	<i>AP3, PI, SEP2</i>	Petals	Petals	Stamens	Stamens	Petals	Slightly petaloid
	<i>AP3, PI, SEP3</i>	Petals	Petals	Stamens	Stamens	Petals	Slightly petaloid
	<i>AP3, PI, AP1</i>	Petals	Petals	Stamens	Stamens	Petals	Slightly petaloid
B,A	<i>AP3, PI, SEP3, AP1</i>	Petals	Petals	Stamens	Stamens	Petals	Petaloid
	<i>AP3, PI, SEP2, SEP3, AP1</i>	Petals	Petals	Stamens	Stamens	Petals	Petals
B,C	<i>AP3, PI, SEP3, AG</i>	Stamens	Stamens	Stamens	Stamens	Staminoid	Normal
	<i>AP3, PI, AG</i>	Petaloid staminoid	Stamens	Stamens	Stamens	Slightly petaloid	Normal

L'espressione ectopica dei geni *SEP* insieme ai geni *ABC* converte foglie caulinari o foglie a rosetta in petali o stami



Il fenotipo dei tripli mutanti *sep1*, *sep 2*, *sep3* (fiore con tutti sepal) sembrerebbe indicare che I geni *SEP* sono necessari per l'identità dei petali

ma l'espressione ectopica di *AP1* può sostituire la funzione dei geni *SEP*

Forse *SEP* necessari quando l'espressione di *AP1* è a livelli normali, non *35S::AP1*

AP1 e *SEP* evolutivamente vicini e distinti da altri gruppi di geni MADS come Quelli cui appartengono *AG*, *AP3*, *PI*.

Gli esperimenti di espressione ectopica suggeriscono che nei tessuti vegetativi sia l'assenza di un fattore positivo (SEP3 , AP1) piuttosto che la presenza di un repressore a impedire la trasformazione completa delle foglie in petali

INTERAZIONI MOLECOLARI TRA I GENI *SEP* e *ABC*

Entrambi appartenenti alla classe MADS box
e necessari per il corretto sviluppo degli organi fiorali

Relazioni regolative a livello trascrizionale?

(Ad esempio la trascrizione dei geni *ABC* può dipendere
dai geni *SEP* o viceversa)

SEP* RNA si accumula in singoli mutanti *ABC

Espressione di *ABC* avviene nei tripli mutanti *sep1 sep2 sep3*

INTERAZIONE DIRETTA TRA PROTEINE ABC E PROTEINE SEP

Proteine MADS si legano in vitro al DNA come omo o etero dimeri

Si legano ad un motivo consenso detto CArG box
5'-CC[AT]₆GG-3'

In Arabidopsis: AG si lega alla CArG box sia come omodimero che eterodimero con SEP1

AP3 e PI non si legano come omodimeri ma come eterodimeri
AP1 e SEP non formano eterodimeri con AP3 o PI

Eterodimerizzazione SEP/ABC non utilizzabile per spiegare come lo sviluppo di petali e stami richieda l'espressione sia dei geni SEP che dei geni di classe B

SPECIFICITA' FUNZIONALE DELLE PROTEINE MADS

La specificità funzionale delle proteine ABC non sembra dipendere da una diversa specificità o affinità di legame al DNA

Tutte le proteine ABC hanno caratteristiche di binding in vitro al DNA in larga parte sovrapponibili

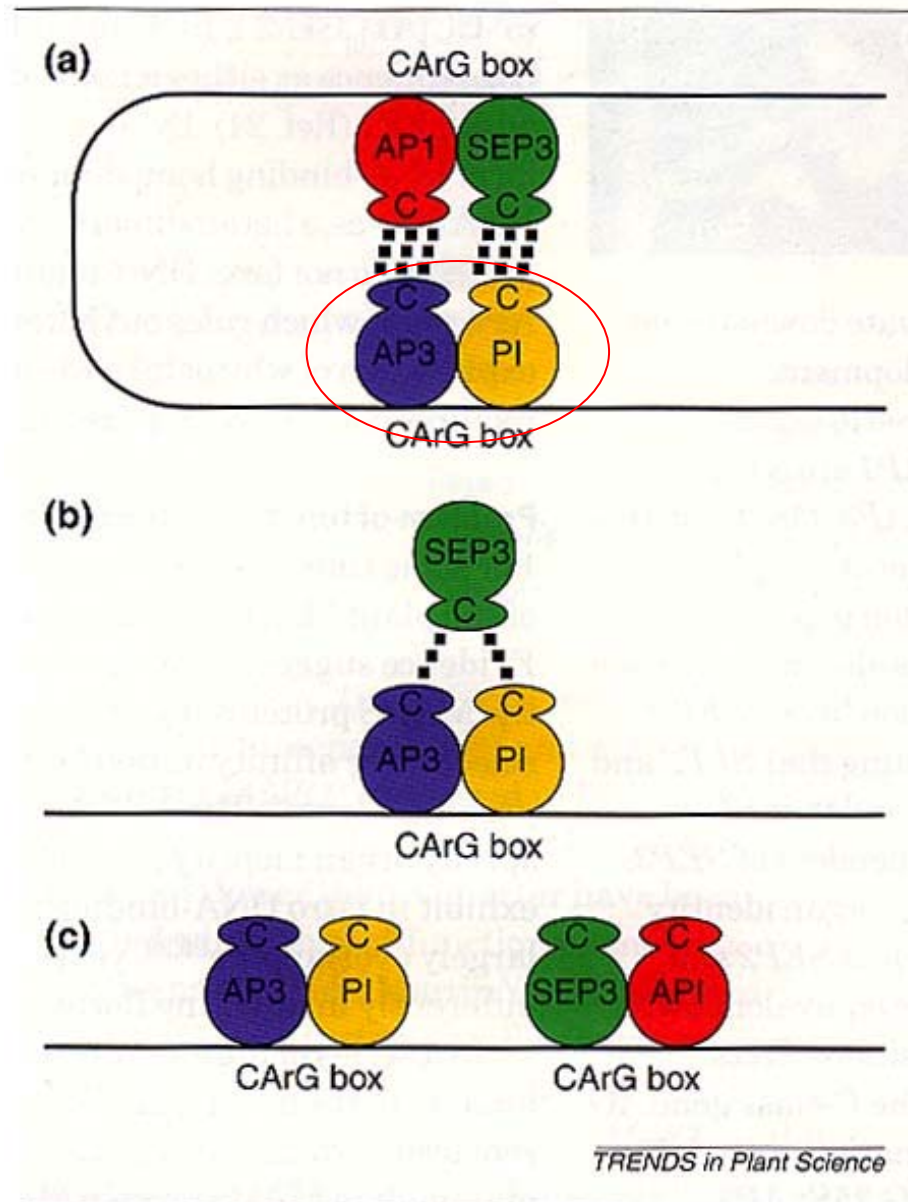
Come si spiega la specificità funzionale?

COMPLESSI DI ORDINE SUPERIORE DELLE PROTEINE MADS

Omo o eterodimeri delle proteine MADS potrebbero interagire con fattori accessori formando complessi ternari necessari alla specificità funzionale

Differenti combinazioni di dimeri MADS potrebbero interagire con differenti fattori accessori i quali determinerebbero la specificità funzionale del complesso;
p. es alterando la specificità di binding al DNA o attivando la trascrizione o secondo altri meccanismi

Modelli molecolari per l'interazione tra le proteine MADS ABC e SEP (petali)



“Quartetto”

Possibili anche
diversi modelli
su geni diversi

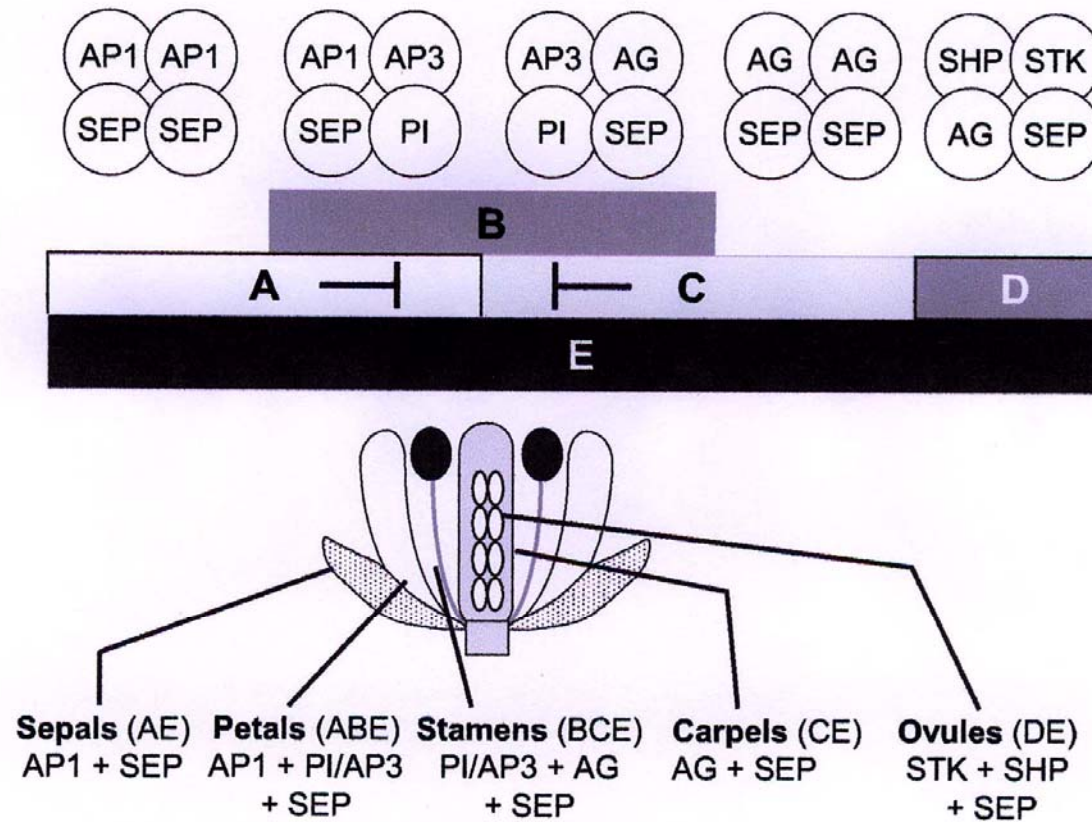


Figure 2. The genetic ABC + DE model and the quartet model. The ABC model states that A-function genes, such as *AP1* in *Arabidopsis*, are necessary for the formation of the sepals, B-function genes, which include *AP3* and *PI* in *Arabidopsis*, along with A-function genes, are necessary for the formation of the petals and B-function, along with C-function genes, which in *Arabidopsis* includes *AG*, are necessary for the formation of the stamens, and C-function genes alone are necessary for the formation of the carpels. This has been expanded to include class D- and E-function genes, which are necessary for the ovules and whorls of the flower, respectively. D-function genes in *Arabidopsis* include *SEEDSTICK* (*STK*) and *SHATTERPROOF1* and *SHATTERPROOF2* (*SHP1*, *SHP2*). E function *sensu lato* requires at least one of the four *SEPALLATA* (*SEP1*, *SEP2*, *SEP3*, and *SEP4*) genes. The floral quartet model expands on this idea using data from protein interaction studies (Theissen 2001; Theissen and Saedler 2001). In this figure the hypothesized quartets, based on experimentally determined dimeric or multimeric protein interactions, necessary for each floral organ are presented.

Identificate tre classi di geni che controllano lo sviluppo del fiore

➤ Geni che determinano l'identità degli organi del fiore

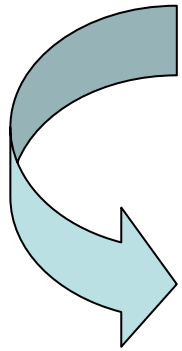
(fattori di trascrizione che controllano l'espressione di geni di differenziamento)

➤ Geni Catastali

(regolatori spaziali della espressione dei geni di identità degli organi)

➤ Geni di identità meristematica

(fattori di trascrizione necessari per l'induzione dei geni di identità degli organi fiorali)



**GENI INTEGRATORI DEI PATHWAYS DI
INDUZIONE FIOREALE (FPI)**

GENI DI IDENTITA' MERISTEMATICA (FMI)

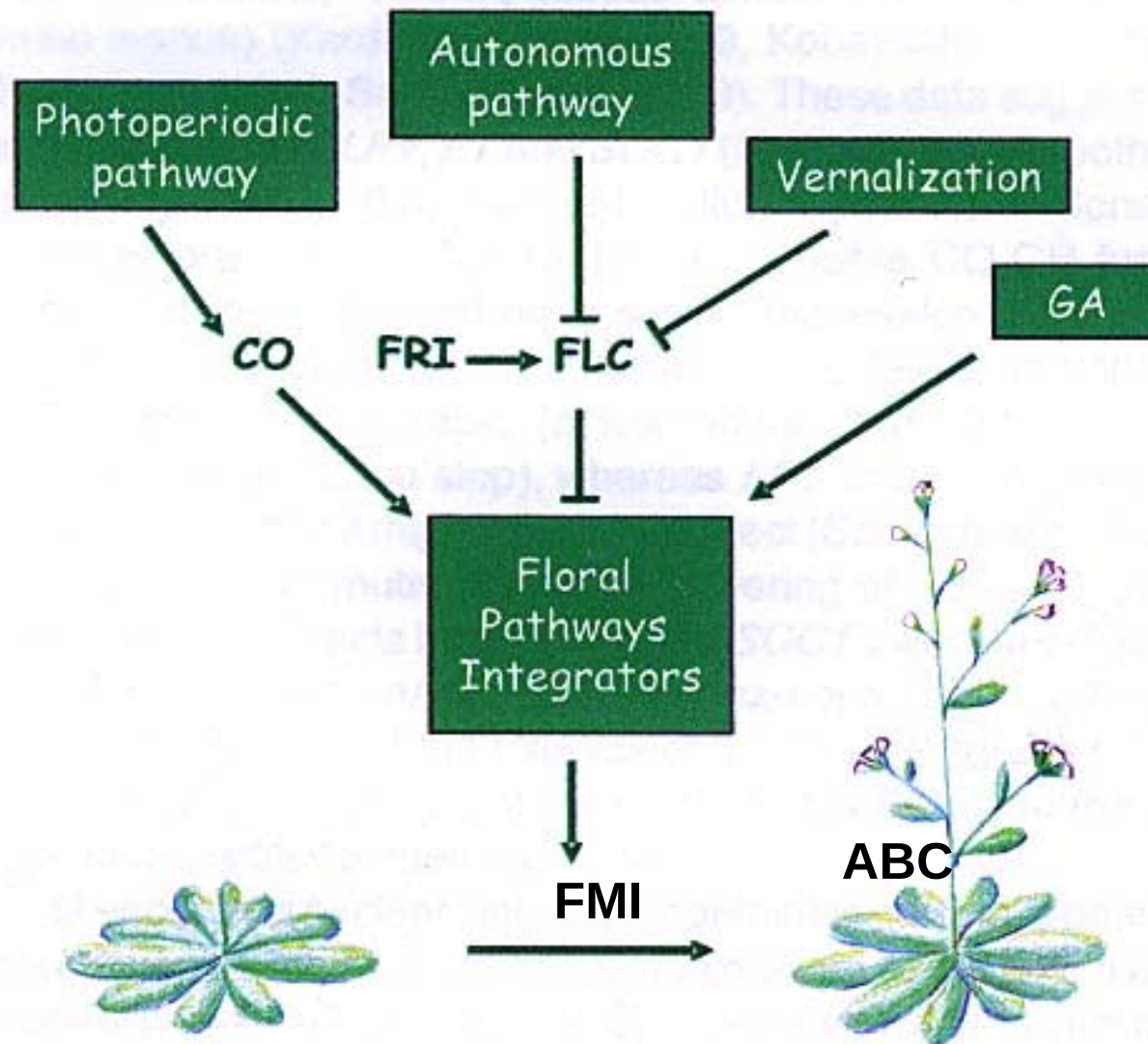


Fig. 1. Main pathways reaching Floral Pathways Integrators

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

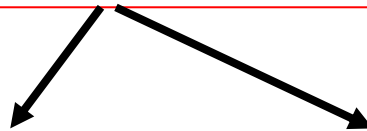
SAM dalla produzione di foglie passa alla formazione del fiore

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

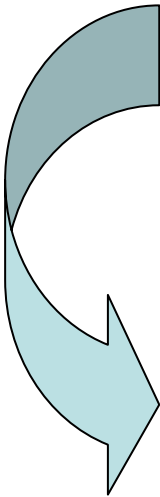
Induzione fiorale: insieme degli eventi che avvengono nel SAM e portano alla produzione di fiori



Fattori interni: regolazione autonoma
p. es età della pianta

Stimoli esterni: risposta obbligata
risposta facoltativa

Stimoli esterni: fotoperiodismo
vernalizzazione



Regolazione del tempo di fioritura

CAMBIAMENTI DI FASE

SAM: TRE STADI DI SVILUPPO

- Fase giovanile
- Fase adulta vegetativa
- Fase adulta riproduttiva

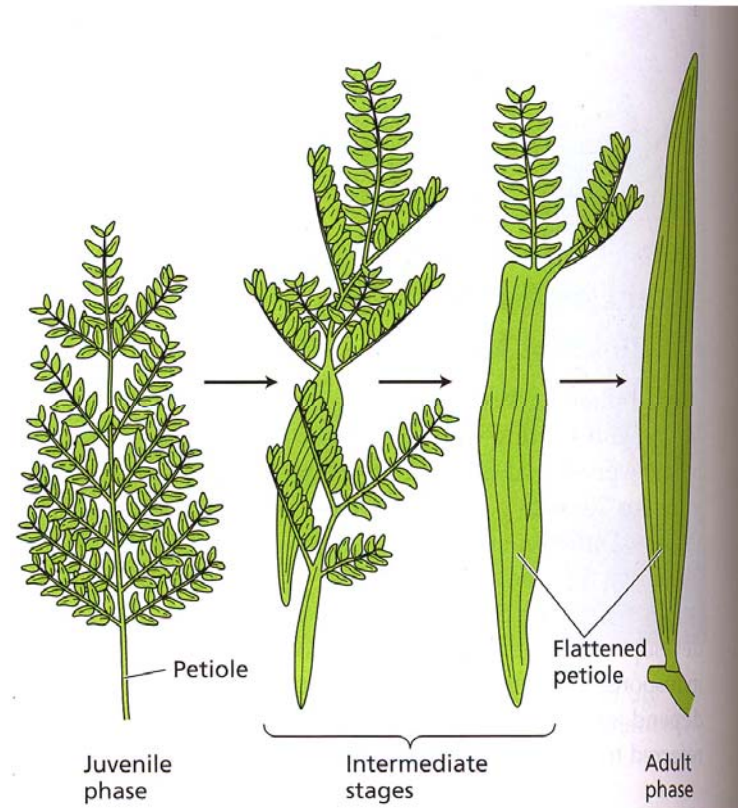
Da fase giovanile ad adulta vegetativa cambiamenti nella morfologia, fillotassi,

Più evidenti nelle specie arboree perenni

Hedera helix Ovate adult leaves



FIGURE 25.9 Juvenile and adult forms of English ivy (*Hedera helix*). The juvenile form has lobed palmate leaves arranged alternately, a climbing growth habit, and no flowers. The adult form (projecting out to the right) has entire ovate leaves arranged in spirals, an upright growth habit, and flowers that develop into fruits. (Courtesy of L. Rignanese.)



Acacia heterophylla

TABLE 25.1**Length of juvenile period in some woody plant**

Species	Length of juvenile period
Rose (<i>Rosa</i> [hybrid tea])	20–30 days
Grape (<i>Vitis</i> spp.)	1 year
Apple (<i>Malus</i> spp.)	4–8 years
Citrus spp.	5–8 years
English ivy (<i>Hedera helix</i>)	5–10 years
Redwood (<i>Sequoia sempervirens</i>)	5–15 years
Sycamore maple (<i>Acer pseudoplatanus</i>)	15–20 years
English oak (<i>Quercus robur</i>)	25–30 years
European beech (<i>Fagus sylvatica</i>)	30–40 years

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

L'induzione fiorale coinvolge due stadi di sviluppo: competente e determinato

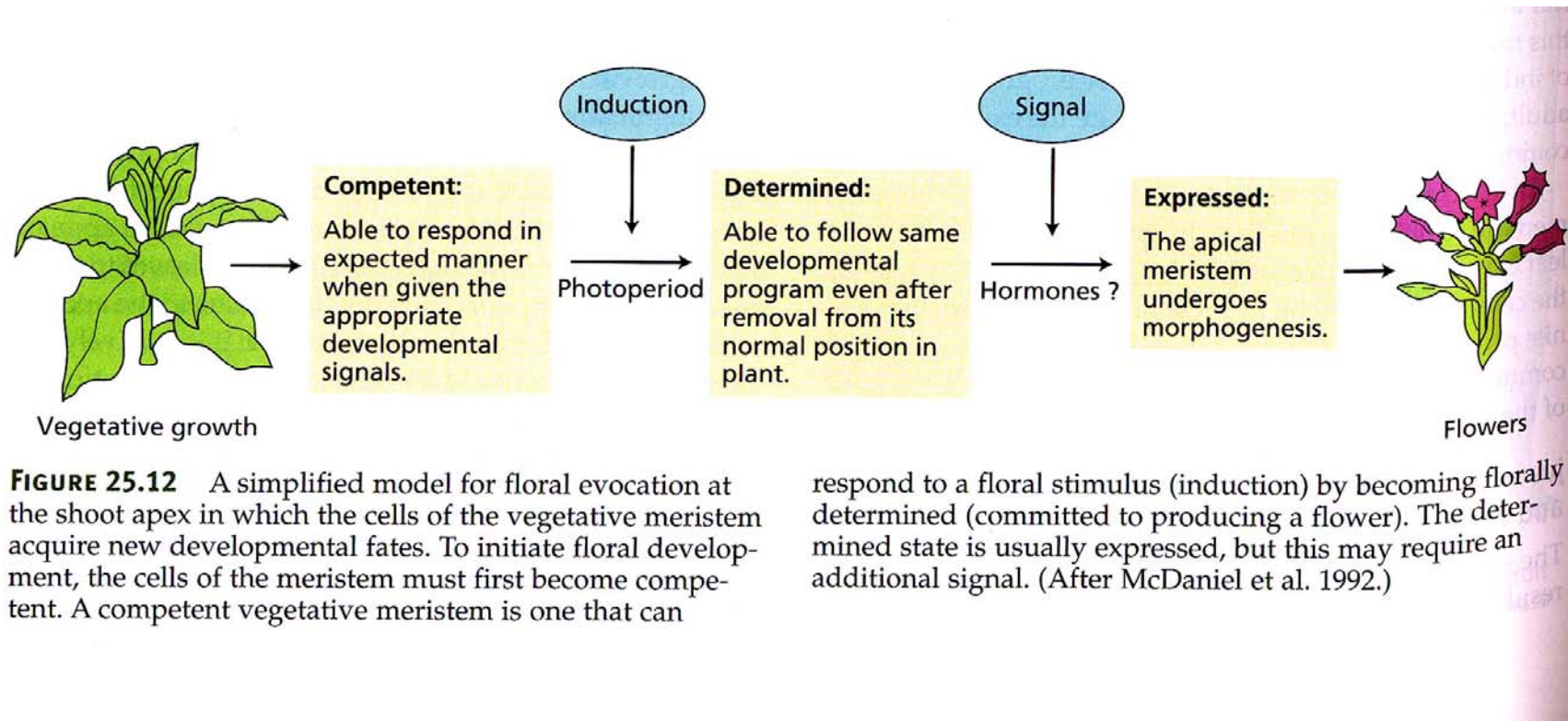


FIGURE 25.12 A simplified model for floral evocation at the shoot apex in which the cells of the vegetative meristem acquire new developmental fates. To initiate floral development, the cells of the meristem must first become competent. A competent vegetative meristem is one that can

respond to a floral stimulus (induction) by becoming florally determined (committed to producing a flower). The determined state is usually expressed, but this may require an additional signal. (After McDaniel et al. 1992.)

Competente: in grado di rispondere allo stimolo

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

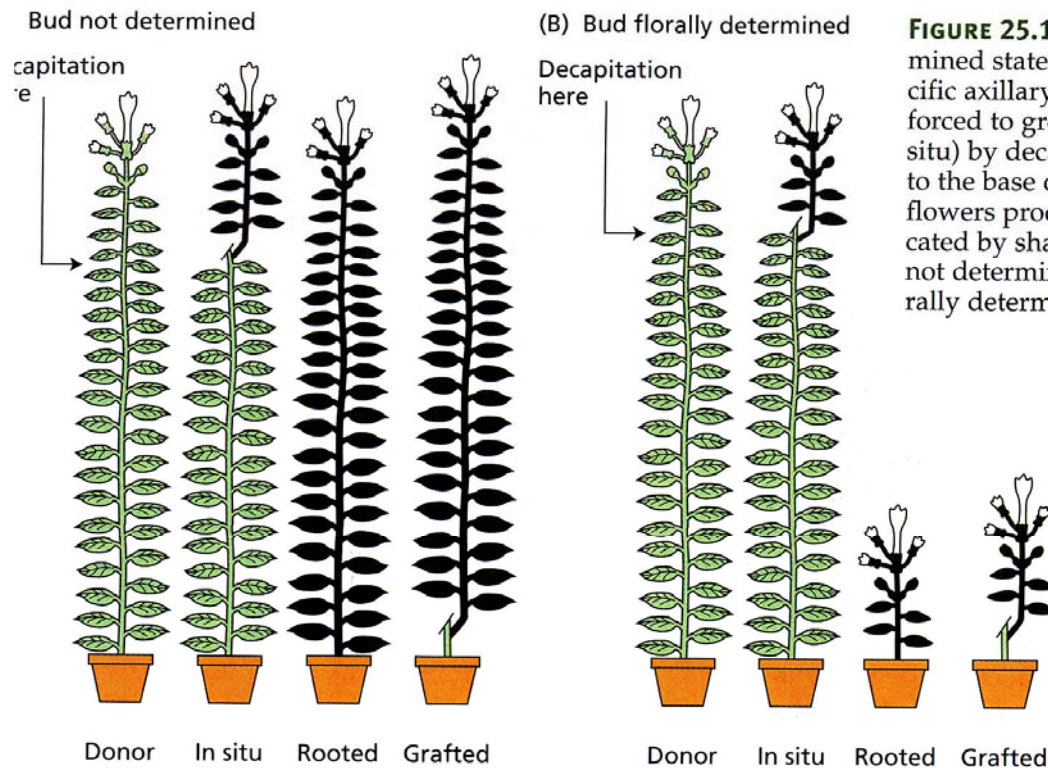


FIGURE 25.13 Demonstration of the determined state of axillary buds in tobacco. A specific axillary bud of a flowering donor plant is forced to grow, either directly on the plant (in situ) by decapitation, or by rooting or grafting to the base of the plant. The new leaves and flowers produced by the 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.)

Esperimenti con innesti hanno dimostrato che

Il numero di nodi formati da un meristema prima di fiorire dipende da due fattori

- La forza dello stimolo florale proveniente dalle foglie
- La competenza del meristema a rispondere al segnale induttivo

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

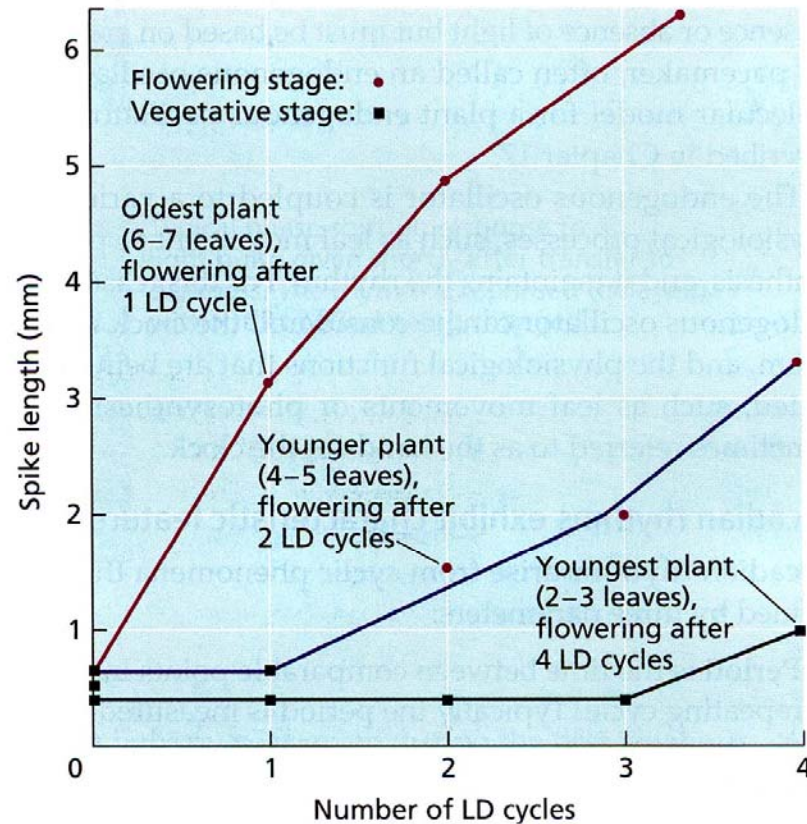


FIGURE 25.14 Effect of plant age on the number of long-day (LD) inductive cycles required for flowering in the long-day plant dandelion ryegrass (*Lolium temulentum*). An inductive long-day cycle consisted of 8 hours of sunlight followed by 16 hours of low-intensity incandescent light. The older the plant is, the fewer photoinductive cycles are needed to produce flowering.

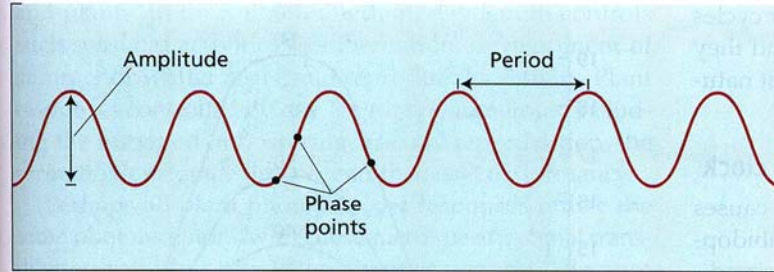
RITMI CIRCADIANI

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

Piante: posizione delle foglie, apertura chiusura stomi, petali, fotosintesi

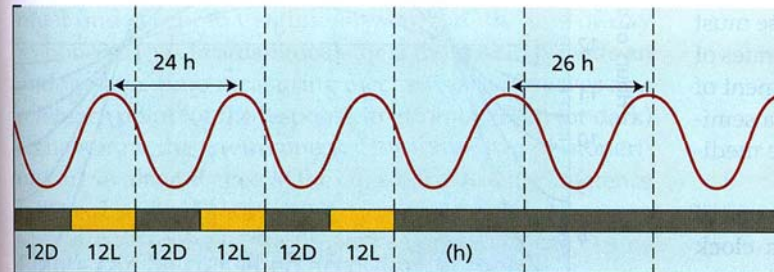
Animali: emergenza della pupa in *Drosophila*, attività cicliche roditori,
alternanza veglia /sonno; respirazione

(A)



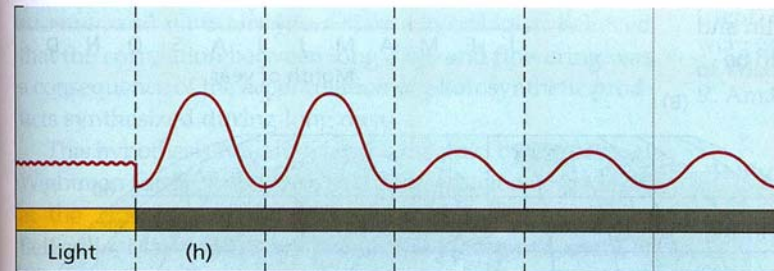
A typical circadian rhythm. The **period** is the time between comparable points in the repeating cycle; the **phase** is any point in the repeating cycle recognizable by its relationship with the rest of the cycle; the **amplitude** is the distance between peak and trough.

(B)



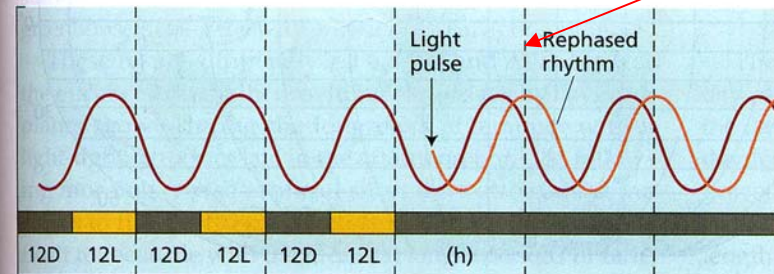
A circadian rhythm entrained to a 24 h light-dark (L-D) cycle and its reversion to the free-running period (26 h in this example) following transfer to continuous darkness.

(C)



Suspension of a circadian rhythm in continuous bright light and the release or restarting of the rhythm following transfer to darkness.

(D)



Typical phase-shifting response to a light pulse given shortly after transfer to darkness. The rhythm is rephased (delayed) without its period being changed.

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

Meccanismo molecolare della sincronizzazione non noto

Sono operanti fotorecettori tipici delle piante come i fitocromi e altri conservati negli insetti e nei mammiferi come CRY1 e CRY2

In *Drosophila* le proteine CRY interagiscono direttamente con i componenti dell'oscillatore endogeno

In *Arabidopsis* il meccanismo probabilmente è diverso in quanto doppi mutanti *cry1/cry2* perdono la sincronizzazione ma non hanno alterazioni dei loro ritmi circadiani

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

La Fioritura è un fenomeno fotoperiodico

Effetto della latitudine sulla durata del giorno

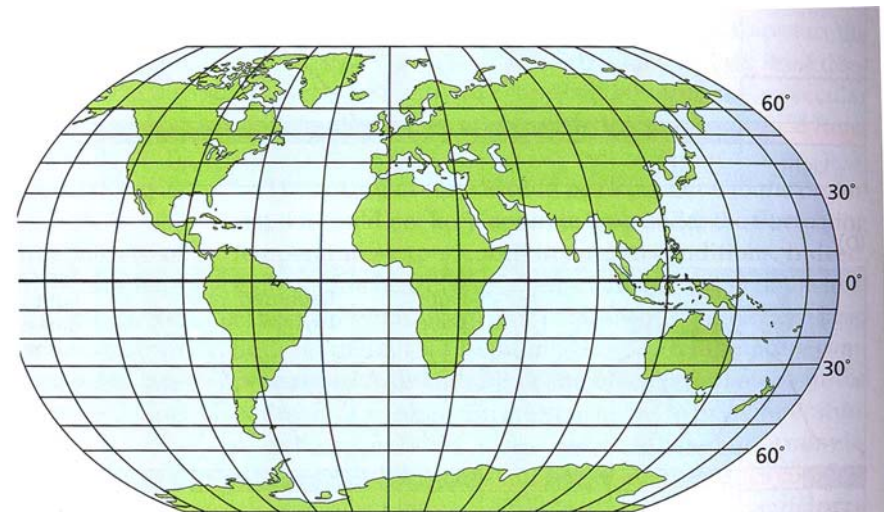
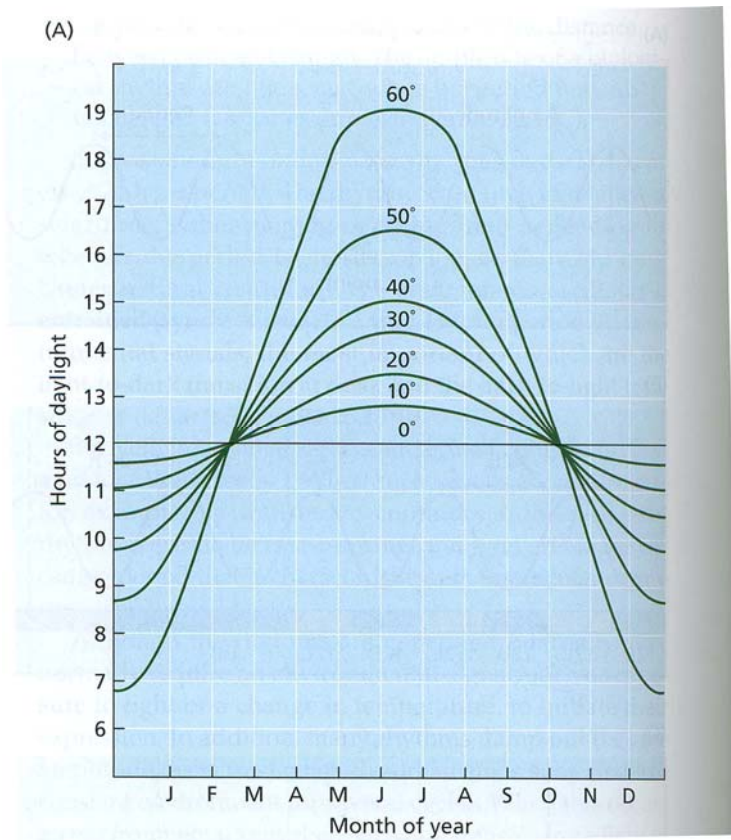


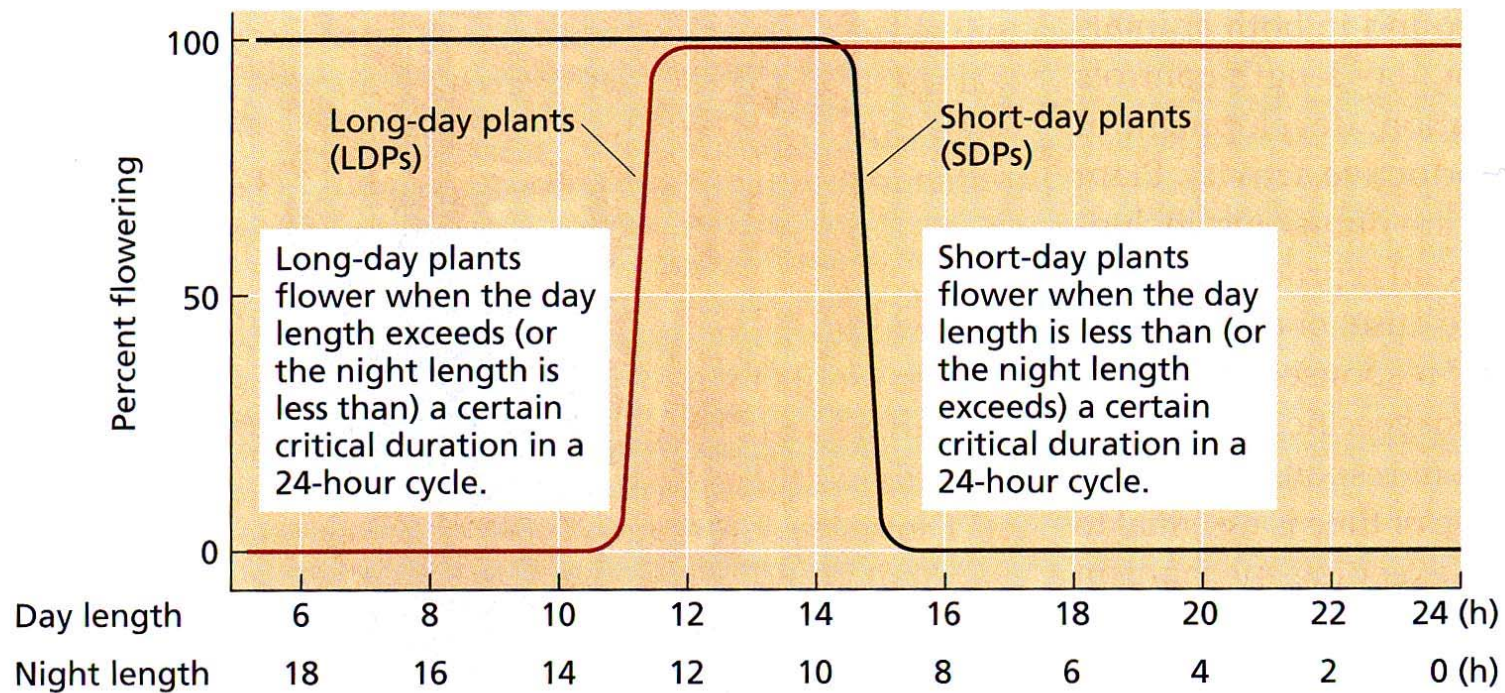
FIGURE 25.16 (A) The effect of latitude on day length at different times of the year. Day length was measured on the twentieth of each month. (B) Global map showing longitudes and latitudes.

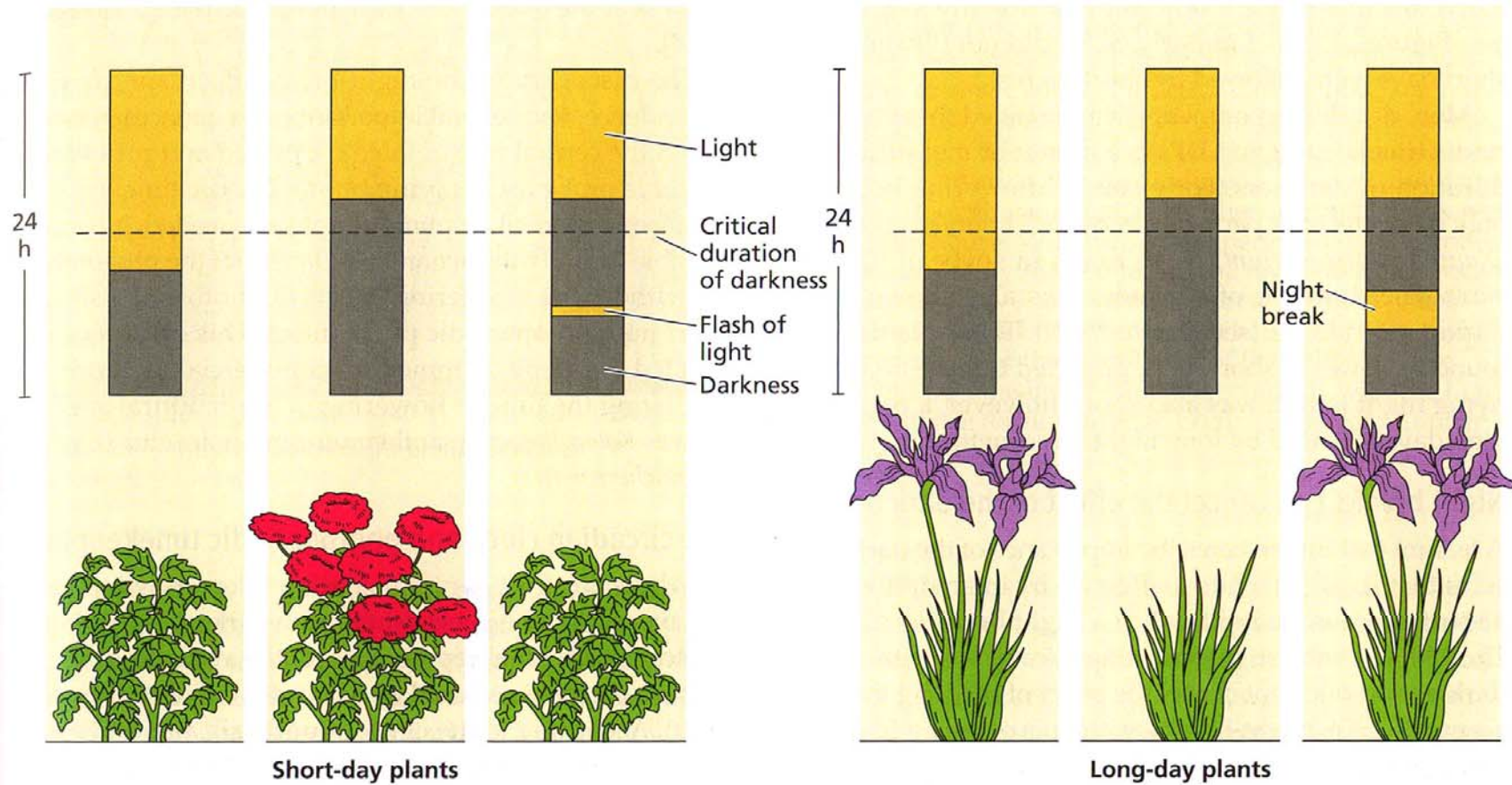
La misura del trascorrere del tempo è essenziale sia nei ritmi circadiani (risposte giornaliere) che nei fenomeni fotoperiodici (risposte stagionali)

Sia i ritmi circadiani che il fotoperiodismo si basano per la misura del tempo

Sull' **OSCILLATORE ENDOGENO**

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





Short-day plants

Short-day (long-night) plants flower when night length exceeds a critical dark period. Interruption of the dark period by a brief light treatment (a night break) prevents flowering.

Long-day plants

Long-day (short-night) plants flower if the night length is shorter than a critical period. In some long-day plants, shortening the night with a night break induces flowering.

E' critica la durata del periodo di buio

(B)

Lighting treatment

Light

Darkness



24 h

Flowering response

SDP

LDP

Flowering

Vegetative

Vegetative

Flowering

Vegetative

Flowering

Vegetative

Flowering

Vegetative

Flowering

Flowering

Vegetative

Il fitocromo è il principale recettore implicato nel controllo della fioritura

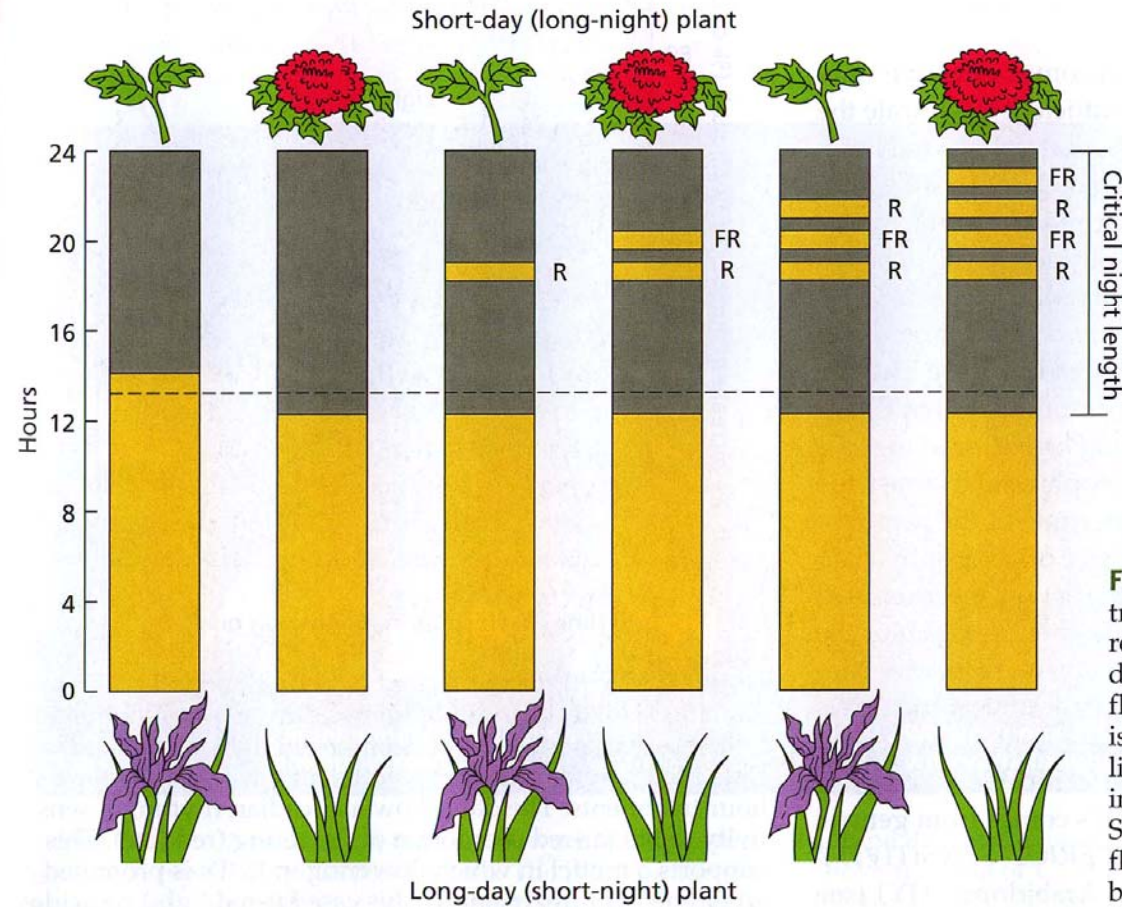


FIGURE 25.23 Phytochrome control of flowering by red (R) and far-red (FR) light. A flash of red light during the dark period induces flowering in an LDP, and the effect is reversed by a flash of far-red light. This response indicates the involvement of phytochrome. In SDPs, a flash of red light prevents flowering, and the effect is reversed by a flash of far-red light.

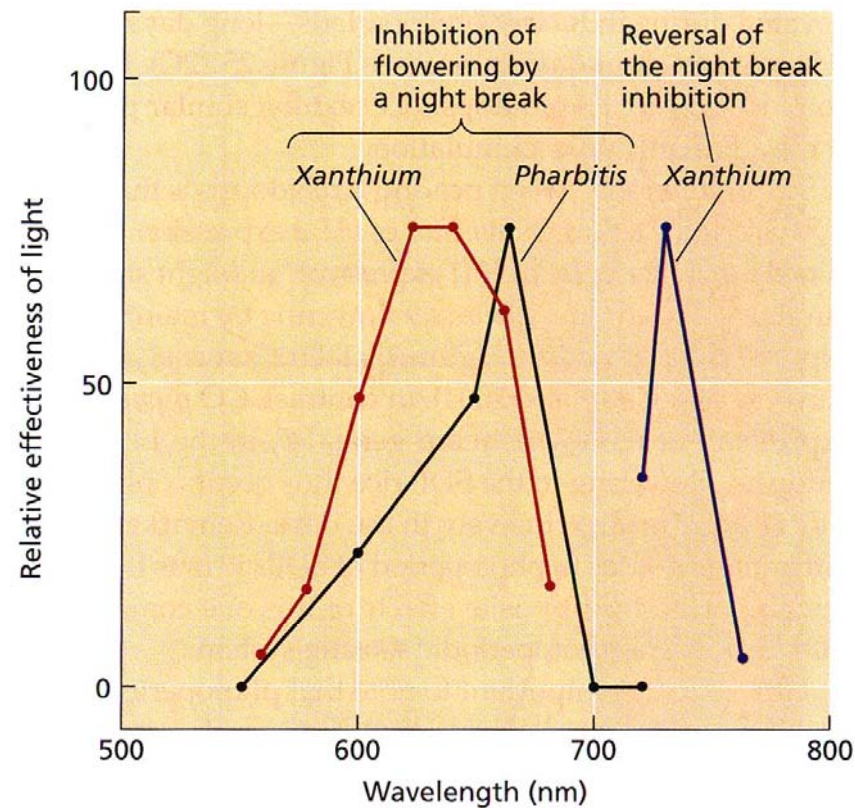


FIGURE 25.24 Action spectra for the control of flowering by night breaks implicates phytochrome. Flowering in SDPs is inhibited by a short light treatment (night break) given in an otherwise inductive period. In the SDP *Xanthium strumarium*, red-light night breaks of 620 to 640 nm are the most effective. Reversal of the red-light effect is maximal at 725 nm. In the dark-grown SDP *Pharbitis nil*, which is devoid of chlorophyll and its interference with light absorption, night breaks of 660 nm are the most effective. This 660 nm maximum coincides with the absorption maximum of phytochrome. (Data for *Xanthium* from Hendricks and Siegelman 1967; data for *Pharbitis* from Saji et al. 1983.)

- L'interruzione della notte cancella gli effetti induttivi del periodo di buio
- L'effetto dell'interruzione varia a seconda del momento della notte in cui è dato

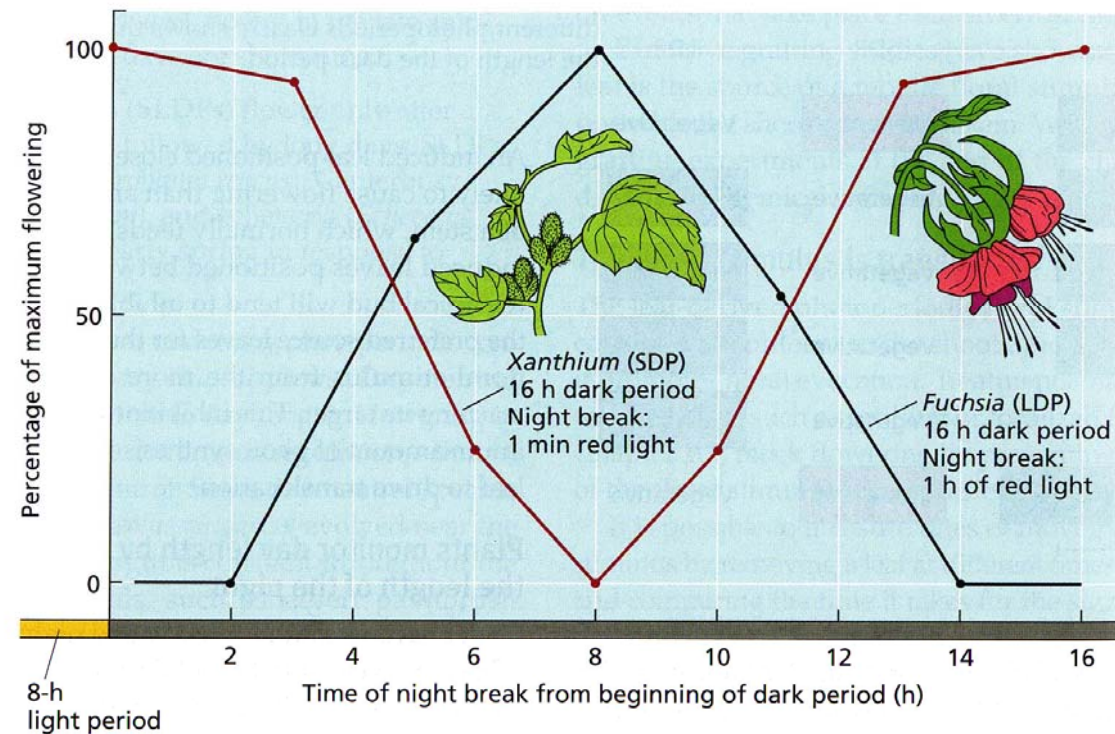


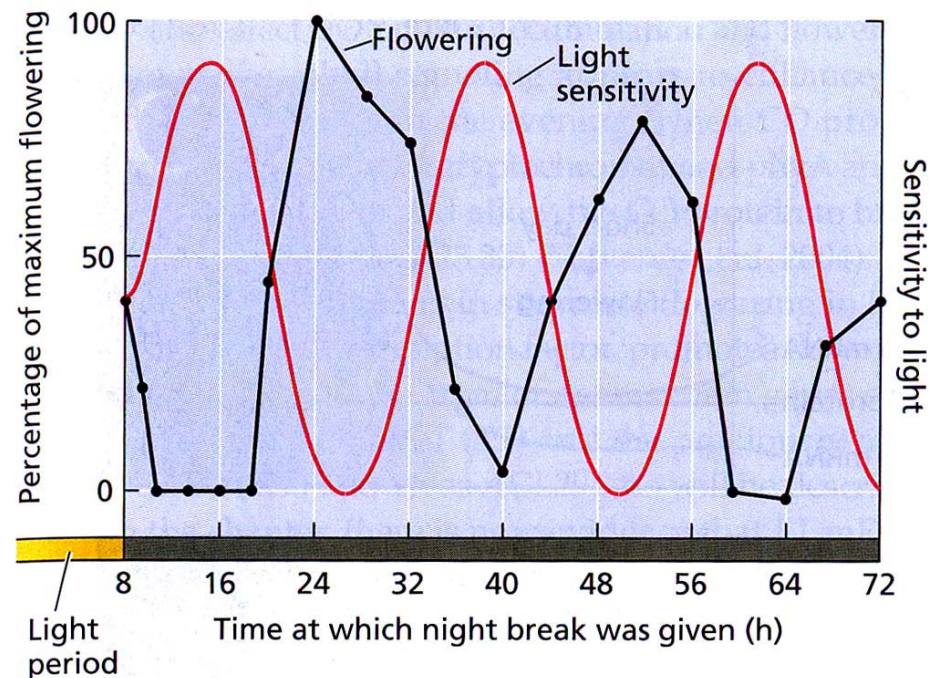
FIGURE 25.20 The time at which a night break is given determines the flowering response. When given during a long dark period, a night break promotes flowering in LDPs and inhibits flowering in SDPs. In both cases, the greatest effect on flowering occurs when the night break is given near the middle of the 16-hour dark period. The LDP *Fuchsia*

was given a 1-hour exposure to red light in a 16-hour dark period. *Xanthium* was exposed to red light for 1 minute in a 16-hour dark period. (Data for *Fuchsia* from Vince-Prue 1975; data for *Xanthium* from Salisbury 1963 and Papenfuss and Salisbury 1967.)

Ritmi circadiani nella fioritura

Soia (SDP): 8 ore luce/64 buio con interruzioni in diversi momenti
l'effetto induttivo è massimo a 26 ore, nullo a 40 **ritmo endogeno**

La fioritura nelle SDP richiede un periodo di buio sufficientemente lungo e un segnale luminoso in una fase appropriata del ritmo circadiano



L'effetto della durata della notte sulla fioritura indica che è fondamentale la misura del trascorrere del tempo al buio nel fotoperiodismo

Ipotesi dell'orologio (Bunning 1960)

- La misura del tempo fotoperiodico è operata da un meccanismo basato su di un ritmo circadiano in cui si alternano fasi di sensibilità alla luce e fasi insensibili
- 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)

(le fasi di sensibilità/insensibilità si alternano al buio)

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

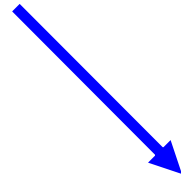
LDP: fioritura se l'impulso è recepito **DURANTE** la fase sensibile

L'esposizione alla luce deve essere **COINCIDENTE** con la fase appropriata del ritmo

Modello della **“COINCIDENZA ESTERNA”**

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

Identificati mutanti nell' oscillatore centrale in Arabidopsis

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

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

toc1 componente dell'oscillatore centrale

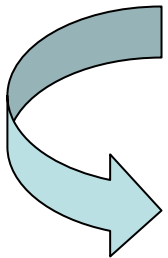
Inoltre isolati mutanti

CCA1 (CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED1)

LHY (LATE ELONGATED HYPOCOYLS)

Sono fattori MYB

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



CCA1 e LHY componenti dell'oscillatore

Modello dell'oscillatore circadiano in Arabidopsis

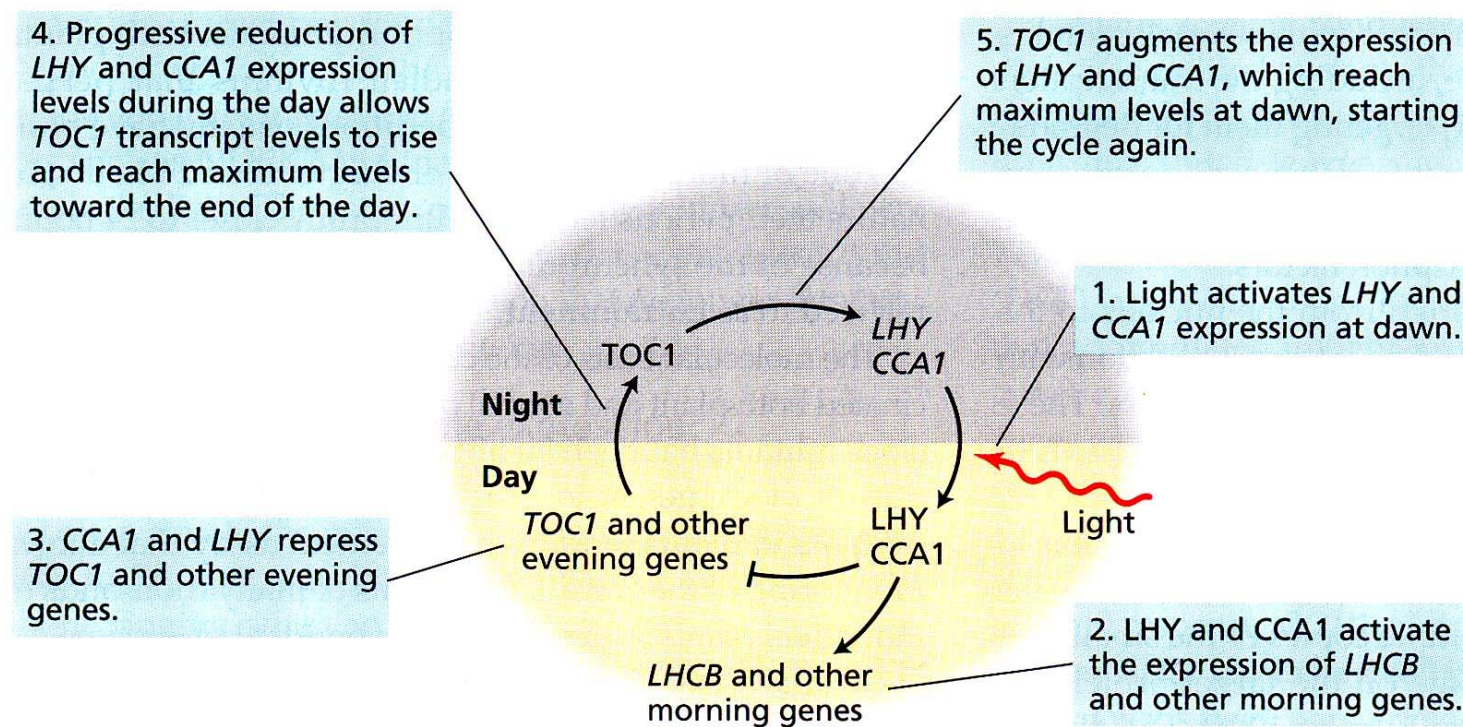
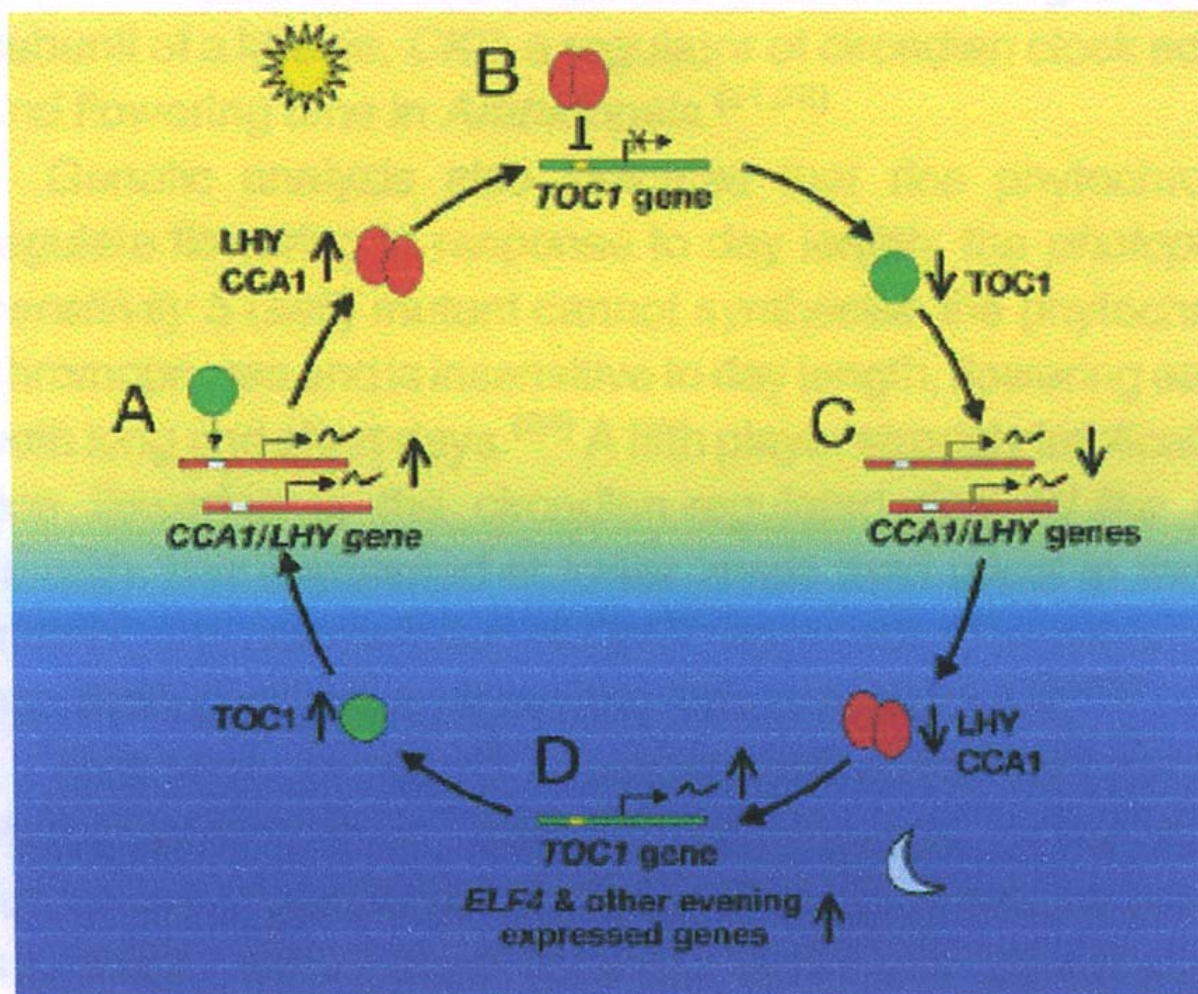
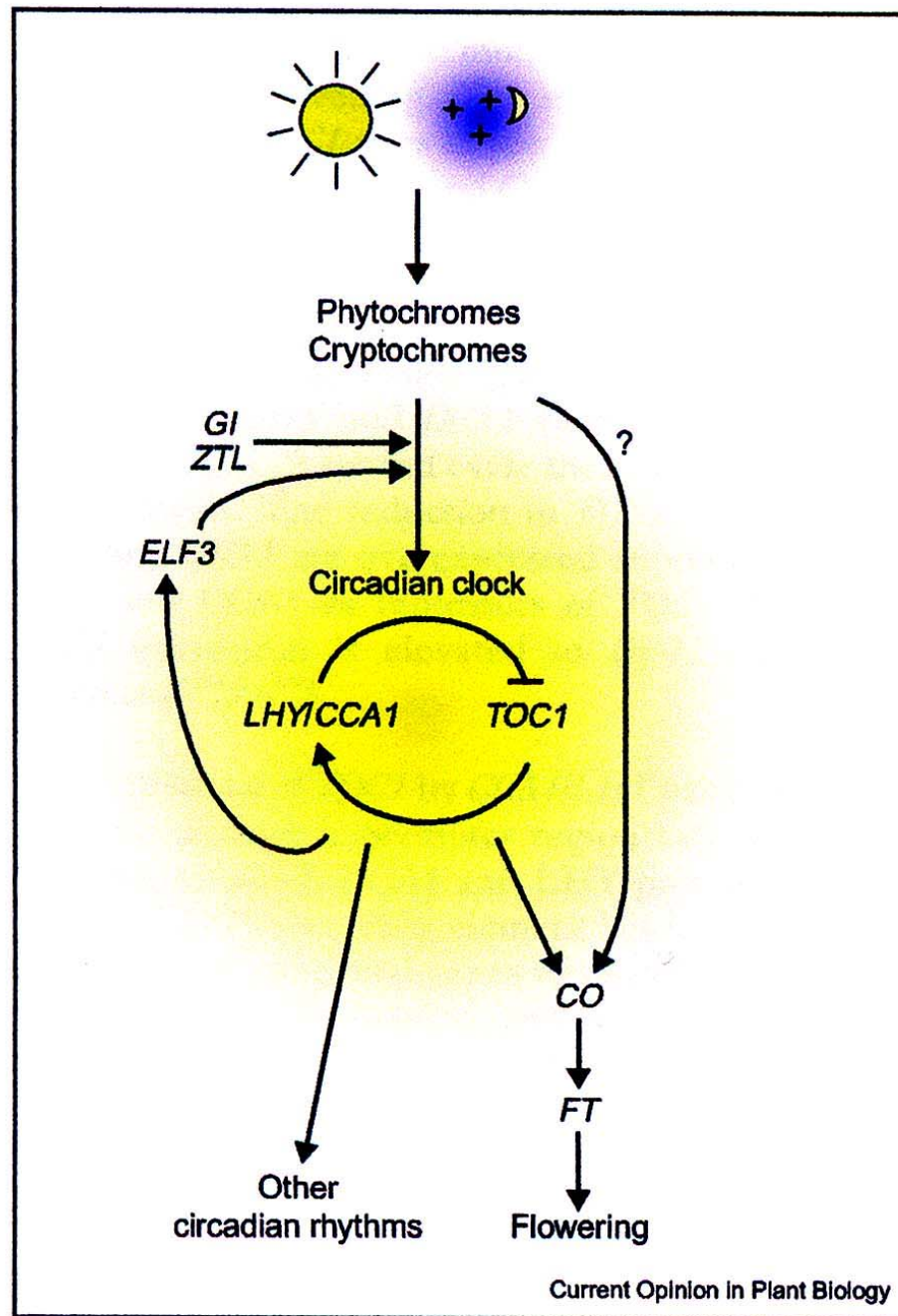


FIGURE 17.16 Circadian oscillator model showing the hypothetical interactions between the *TOC1* and *MYB* genes *LHY* and *CCA1*. Light at dawn increases *LHY* and *CCA1* expression. *LHY* and *CCA1* regulate other daytime and evening genes.





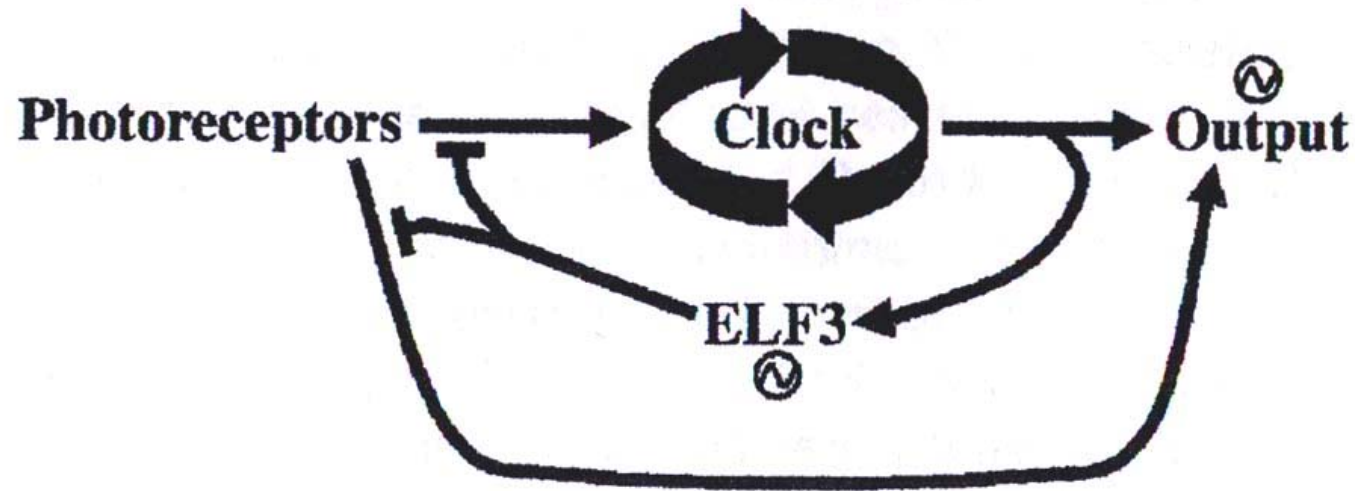


Figure 6. Model of the Role of ELF3 in the Plant Circadian System.

ELF3 has a unique role within the circadian system of *Arabidopsis*. Circadian regulation of *ELF3* expression enables the oscillator to control the light sensitivity of both clock resetting and the induction of circadian outputs in a phase-specific manner. This is a prime example of a gating mechanism in which a circadian output feeds back to regulate input pathways.

Arabidopsis è una LONGIDIURNA facoltativa

molti ecotipi di Arabidopsis fioriscono dopo un periodo di freddo (vernalizzazione)

IDENTIFICATI una serie di mutanti rispetto al tempo di fioritura

Assegnati a quattro vie (pathways) principali di induzione della fioritura

Identificati alcuni geni coinvolti

Pathways per l'induzione della fioritura

✓ FOTOPERIODO

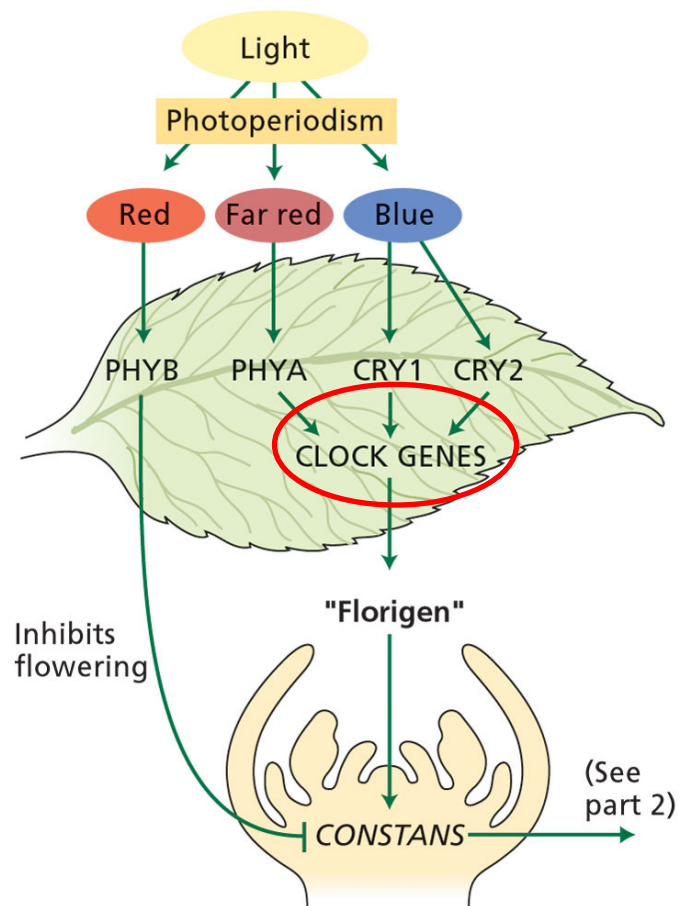
ambientali

✓ VERNALIZZAZIONE

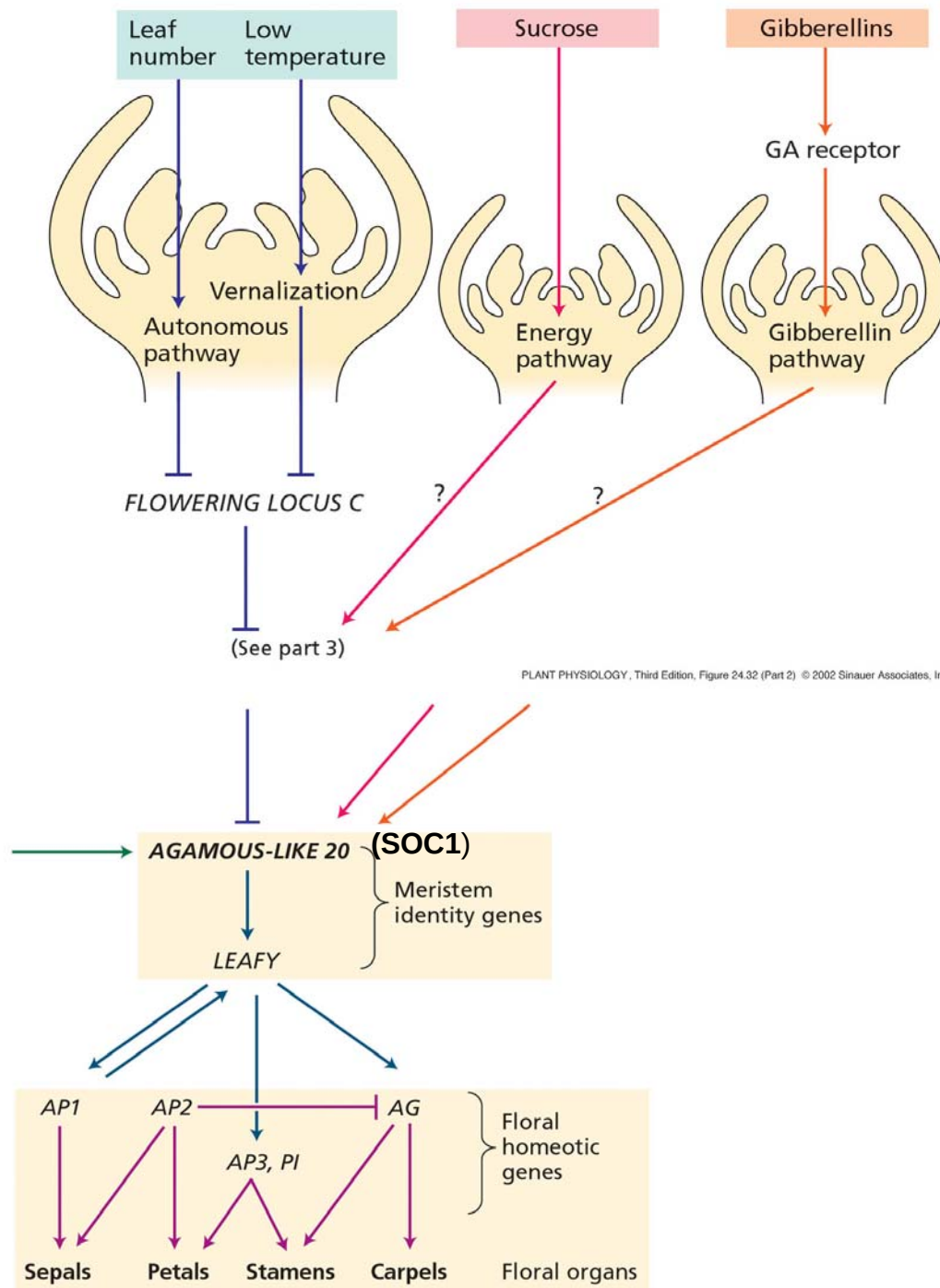
✓ AUTONOMO

endogeni

✓ GIBBERELLINE

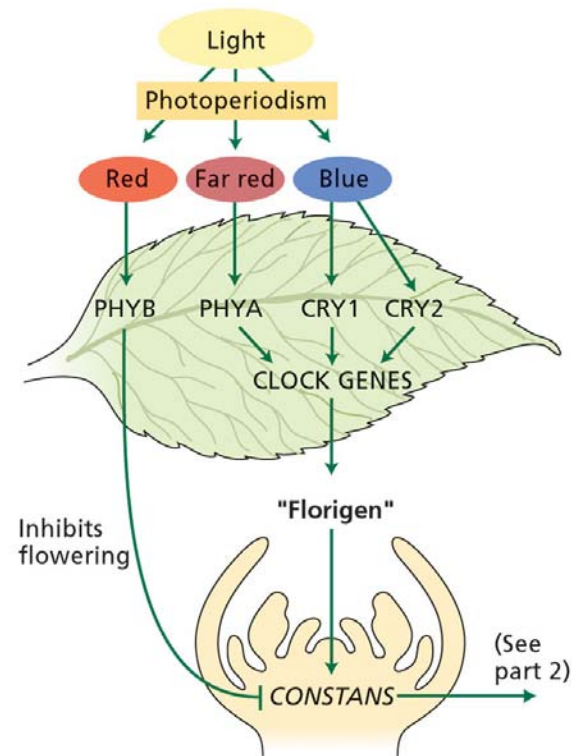


PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 24.32 (Part 1) © 2002 Sinauer Associates, Inc.



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 24.32 (Part 2) © 2002 Sinauer Associates, Inc.

PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 24.32 (Part 3) © 2002 Sinauer Associates, Inc.



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 24.32 (Part 1) © 2002 Sinauer Associates, Inc.

FOTOPERIODO: coinvolge fitocromi e criptocromi, i quali interagiscono con l' orologio circadiano e danno inizio ad un pathway che determina l'espressione del gene *CONSTANS* (CO) che promuove la fioritura

CO agisce attraverso altri geni per incrementare l'espressione del gene di identità meristemica *LEAFY* (LFY)