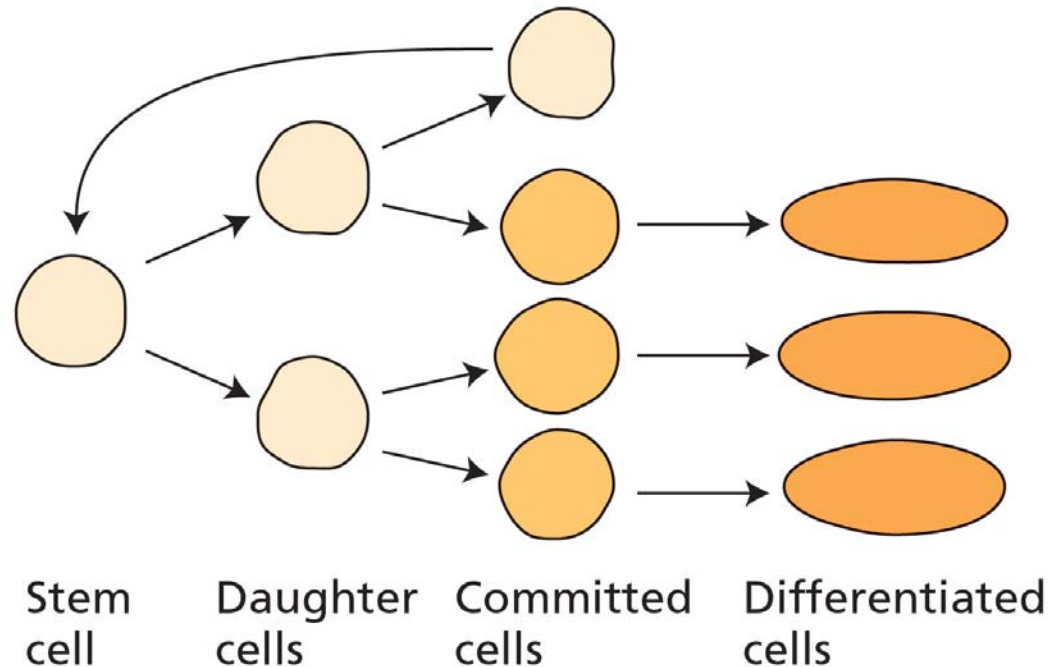


I MERISTEMI DELL'APICE DEL GERMOGLIO E DELLA RADICE

Meristemi: popolazioni di cellule piccole, isodiametriche, con caratteristiche embrionali da poche centinaia a migliaia di cellule (SAM arabidopsis 60)

I meristemi vegetativi oltre a generare gli organi della pianta si rigenerano; alcune cellule infatti non si differenziano ma mantengono la capacità di dividersi

Variazioni di attività: dormienza



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 16.12 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

Le cellule indifferenziate si chiamano INIZIALI (simili alle staminali animali) (stem cells)

Si formano durante l'embriogenesi

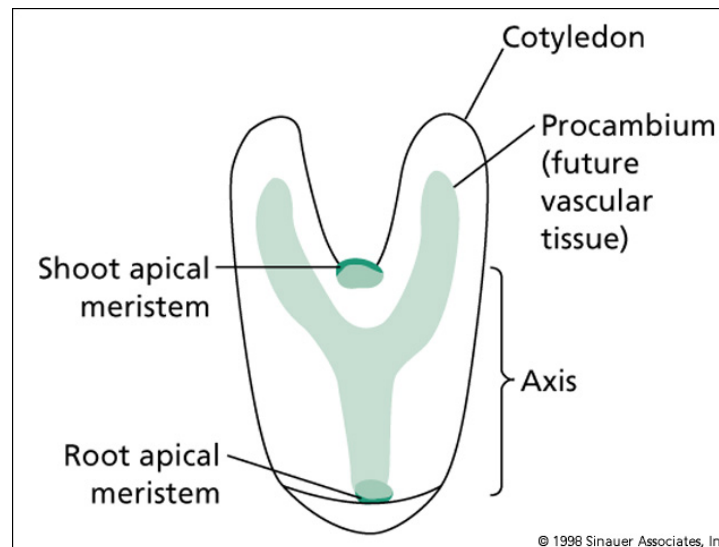
Più corretto il termine protomeristemi

Il protomeristema apicale è riconoscibile dallo stadio a cuore

(le cellule interposte tra i cotiledoni si dividono in maniera orientata e si stratificano)

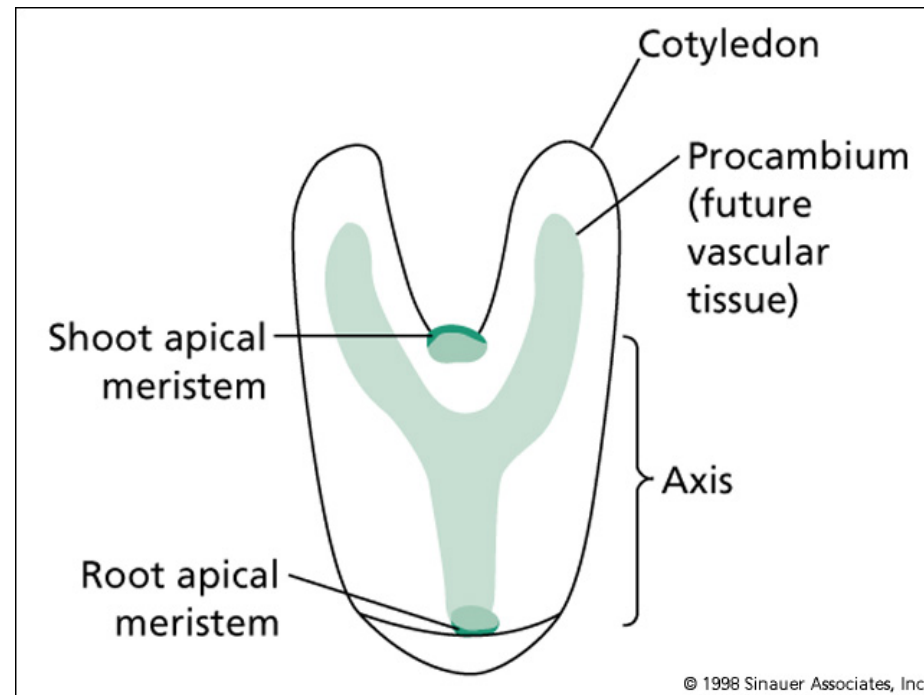
Probabilmente l'identità di cellule meristematiche apicali è acquisita più precocemente (stadio globulare)

Le iniziali della cuffia radicale si formano dall'ipofisi nello stadio a cuore, indicando che il protomeristema radicale si forma già in questo stadio



Meristemi diversi producono differenti tipi di tessuti o organi

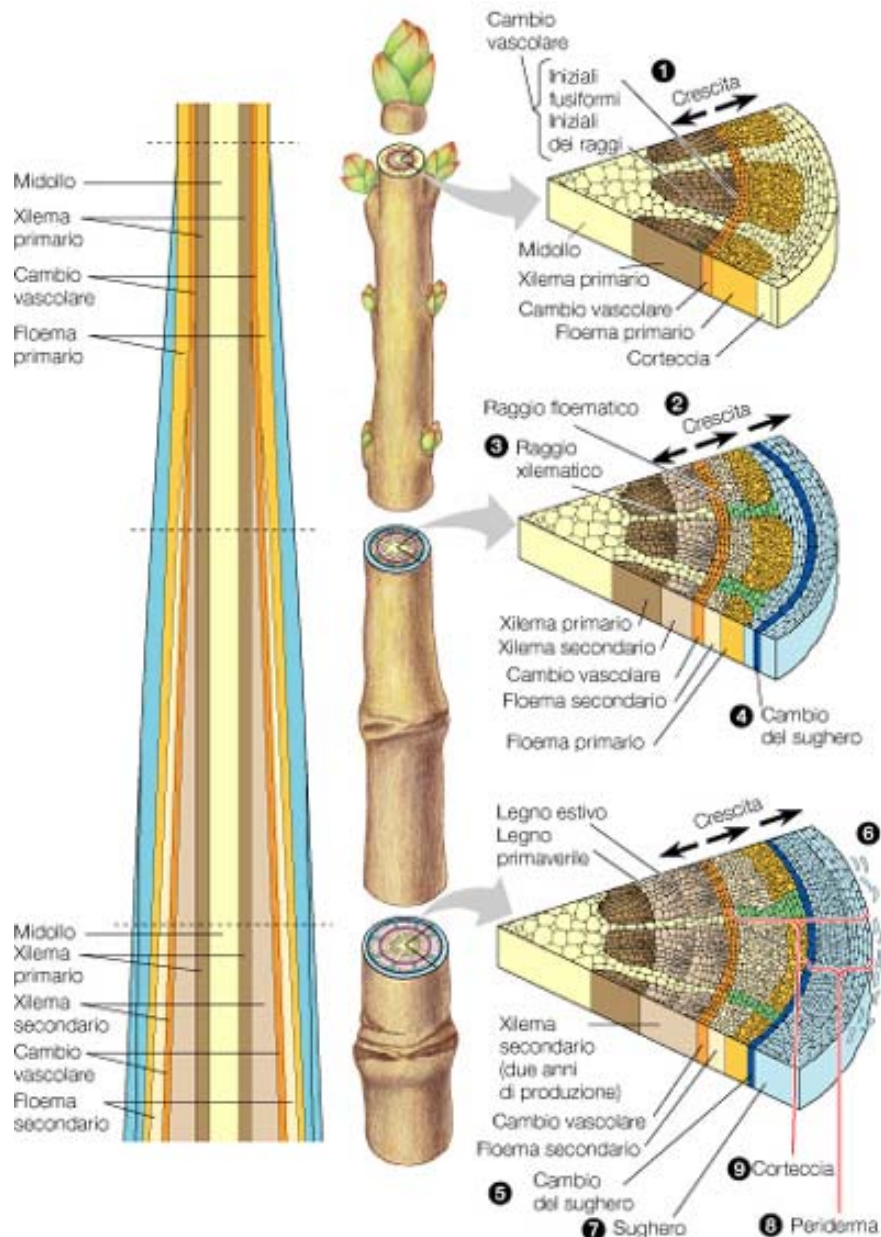
Meristemi primari: corpo primario della pianta,
si formano durante l'embriogenesi



Meristemi secondari: si formano nello sviluppo postembrionico

- **Meristemi ascellari:** si formano alle ascelle delle foglie; derivano dal meristema apicale
- **Meristemi delle radici laterali:** struttura di meristemi primari si formano dalle cellule del periciclo
- **Meristemi laterali:** cilindri di cellule meristematiche: aumento della circonferenza di fusti e radici
- **Cambio vascolare:** iniziali fusiformi e iniziali dei raggi; xilema e floema secondario; raggi di tessuto parenchimatico
- **Cambio subero fellodermico:** si sviluppa nelle cellule mature del cortex e del floema secondario; si differenziano in cellule del sughero che costituiscono il periderma
- **Meristemi intercalari:** si trovano alla base degli organi; graminacee
- **Meristemi fiorali:** derivano dai meristemi vegetativi, producono gli organi fiorali, sono a crescita **DETERMINATA** anziché indeterminata
- **Meristemi delle infiorescenze:** derivano dai meristemi vegetativi e producono brattee e meristemi fiorali alle ascelle delle brattee, possono essere determinati o indeterminati

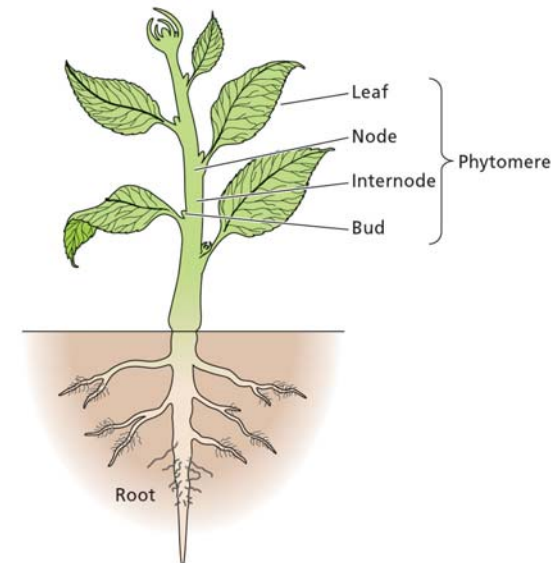
Crescita secondaria nel fusto



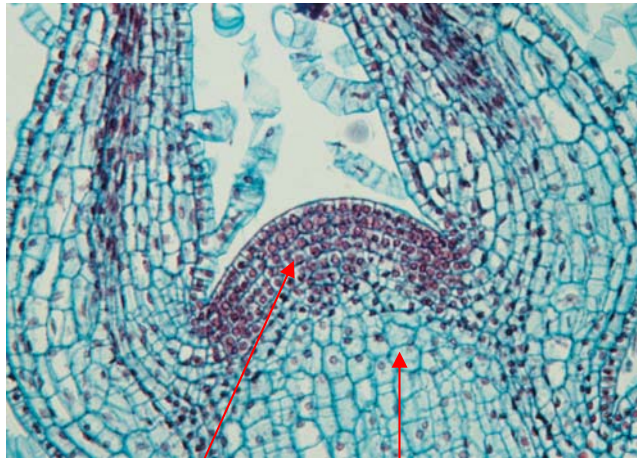
- 1 Nella parte più giovane del fusto è possibile vedere che il corpo primario della pianta è formato dal meristema apicale durante la crescita primaria. Il cambio vascolare sta iniziando a svilupparsi.
- 2 Continuando il fusto ad allungarsi per effetto della crescita primaria, la parte di fusto formata in precedenza nello stesso anno ha già iniziato la crescita secondaria. Questa parte del fusto aumenta di circonferenza poiché le iniziali fusiformi del cambio vascolare formano xilema secondario all'interno e floema secondario all'esterno.
- 3 Le iniziali dei raggi del cambio danno origine ai raggi floematici e xilematici.
- 4 All'aumentare del diametro del cambio vascolare, il floema secondario e gli altri tessuti esterni al cambio non possono seguire l'espansione perché le cellule cessano di dividersi. Un secondo meristema laterale, il cambio del sughero, si sviluppa da cellule parenchimatiche presenti nella corteccia del fusto. Il cambio del sughero produce cellule del sughero, che sostituiscono l'epidermide e il rivestimento protettivo alla superficie del fusto.
- 5 Al secondo anno di crescita secondaria, il cambio vascolare produce altro xilema e floema secondario e il cambio del sughero produce il sughero.
- 6 Man mano che il diametro del fusto continua ad aumentare, i più superficiali tra i tessuti posti esternamente al cambio del sughero si rompono e cadono dal fusto.
- 7 Il cambio del sughero si riforma in strati progressivamente più profondi della corteccia. Quando non rimane più niente della corteccia originaria, il cambio del sughero sviluppa floema secondario a partire da cellule parenchimatiche.
- 8 L'epidermide del corpo vegetale primario è stata sostituita dal tessuto protettivo del corpo vegetale secondario, detto periderma. Il periderma è costituito dal cambio del sughero e dal sughero.
- 9 La corteccia è costituita da tutti i tessuti esterni al cambio vascolare.

Meristema del germoglio:

- A crescita indeterminata
- genera il fusto e gli organi laterali ad esso attaccati: foglie e gemme laterali (fitomeri)
- Apice del germoglio: meristema apicale e primordi fogliari più recenti
- Meristema apicale del germoglio: popolazione di cellule indifferenziate senza organi vegetativi
- Contiene diversi strati e zone funzionali

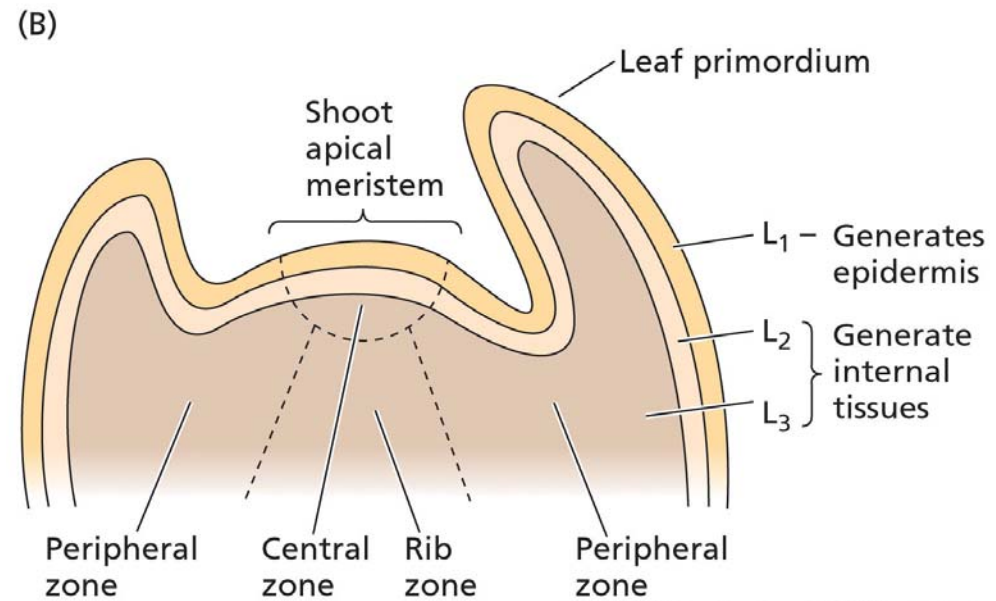


MERISTEMA DEL GERMOGLIO



L1, L2 tunica

L3 corpus



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 16.13 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

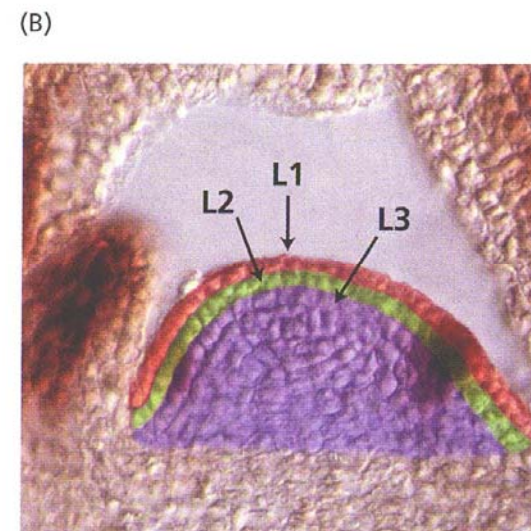
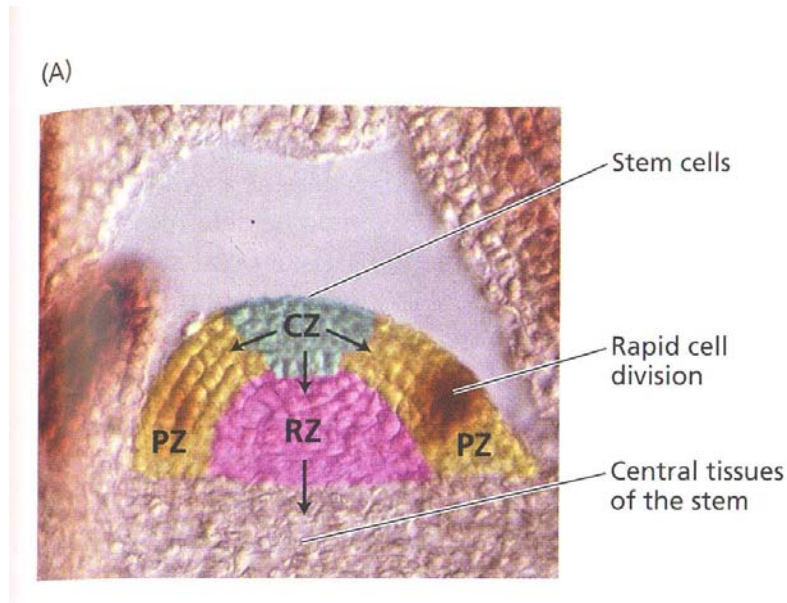
Aspetto stratificato: tre strati L1; L2; L3

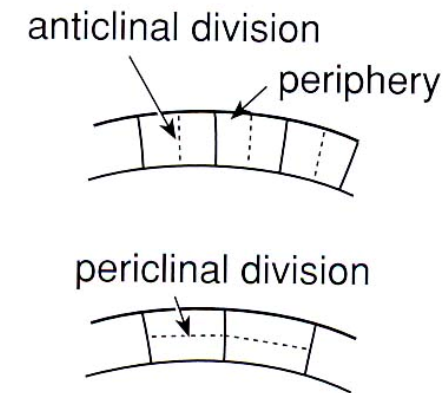
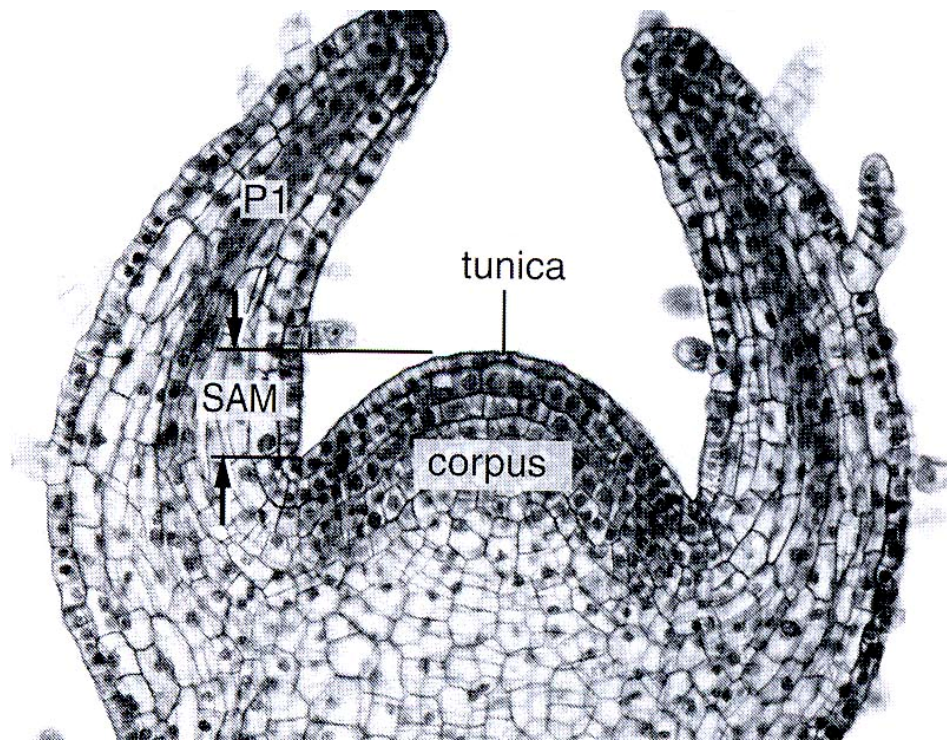
L1 strato più esterno

L1 e L2 : divisioni anticlinali cioè la nuova parete cellulare è perpendicolare alla superficie del meristema

L3: piano di divisione meno orientato

Tutti e tre gli strati hanno le proprie cellule iniziali e tutti e tre concorrono alla formazione del fusto e degli organi laterali





ANTICLINALI: divisioni perpendicolari alla superfice dell'organo
 PERICLINALI: divisioni parallele alla superficie dell'organo

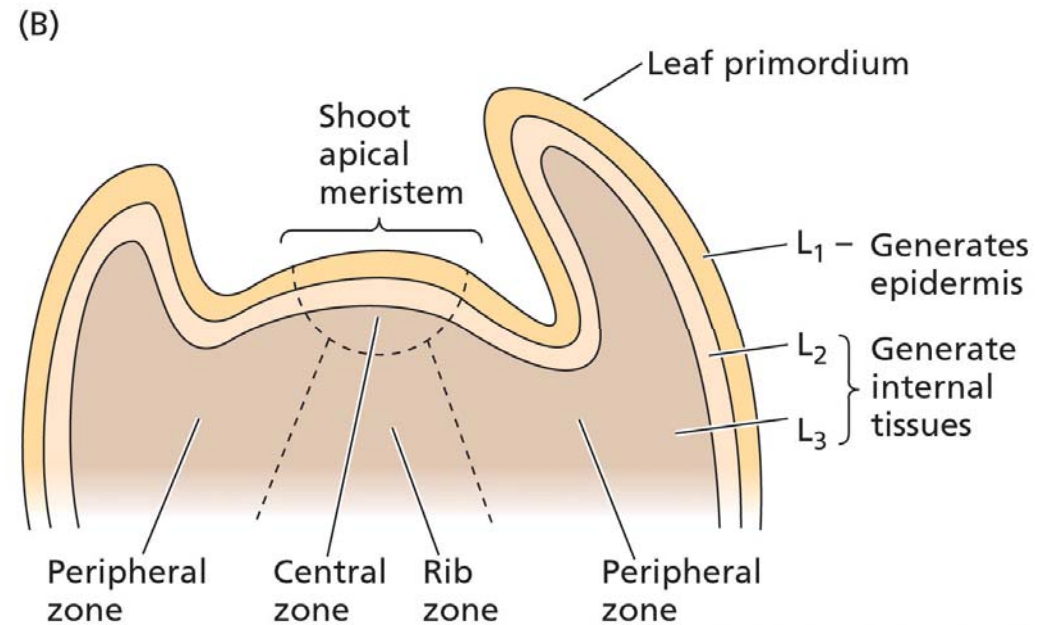
MERISTEMA DEL GERMOGLIO

Pattern definito zonazione citoistologica

Ogni zona composta da cellule distinguibili non solo per il piano delle divisioni ma anche per differenze in dimensioni, grado di vacuolizzazione.

Hanno pattern diversi di espressione genica che riflettono le differenze di funzione tra le varie zone

Zona Centrale: iniziali apicali ;divisioni lente
Zona periferica: primordi fiorali; divisioni rapide
Costa meristemica: tessuti interni del fusto



Le foglie e le altre appendici laterali si originano dalle divisioni di cellule localizzate
Negli strati L1 e L2 in regioni specifiche nella zona periferica

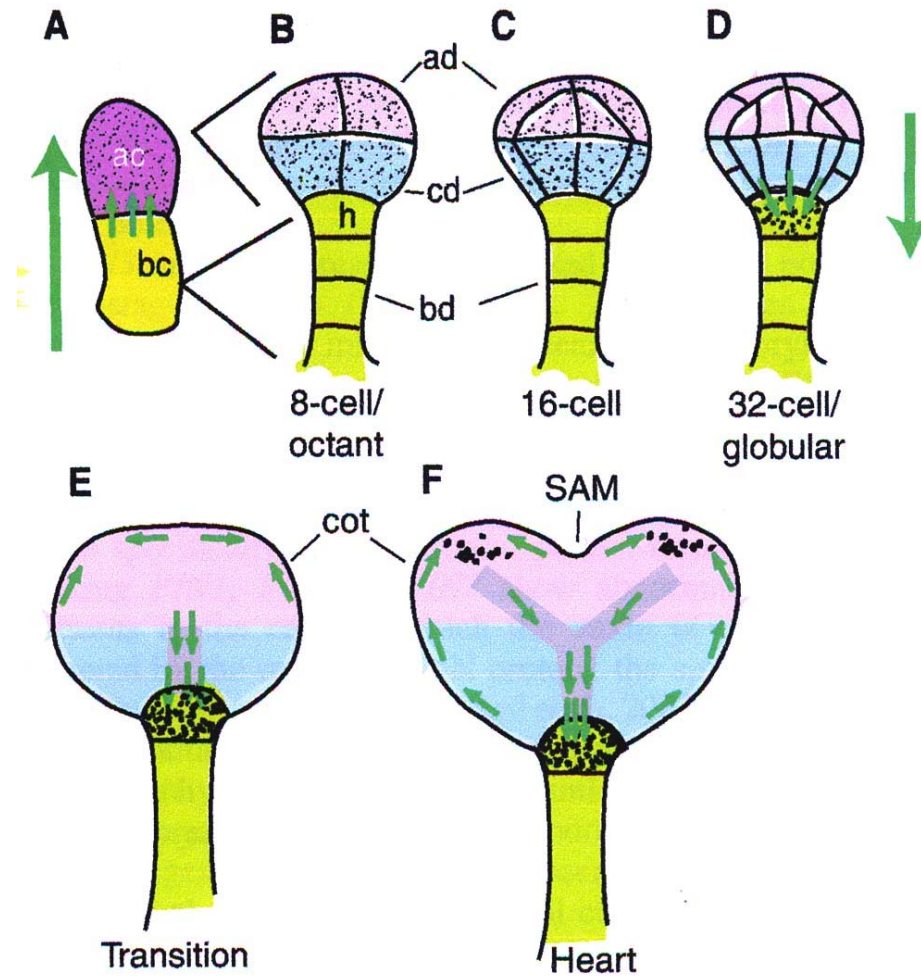
PRIMORDI  FOGLIE

Foglie: polarità dorso-ventrale; maturazione dall'estremità alla base
Meristema apicale: simmetria radiale

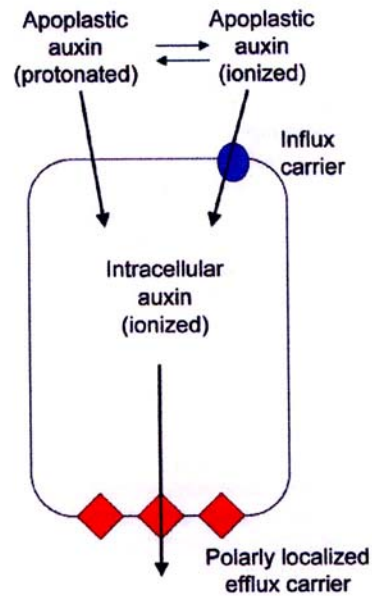
Meristema apicale crescita indeterminata
Primordi fogliari: crescita determinata

FORMAZIONE DEL MERISTEMA APICALE DEL GERMOGLIO

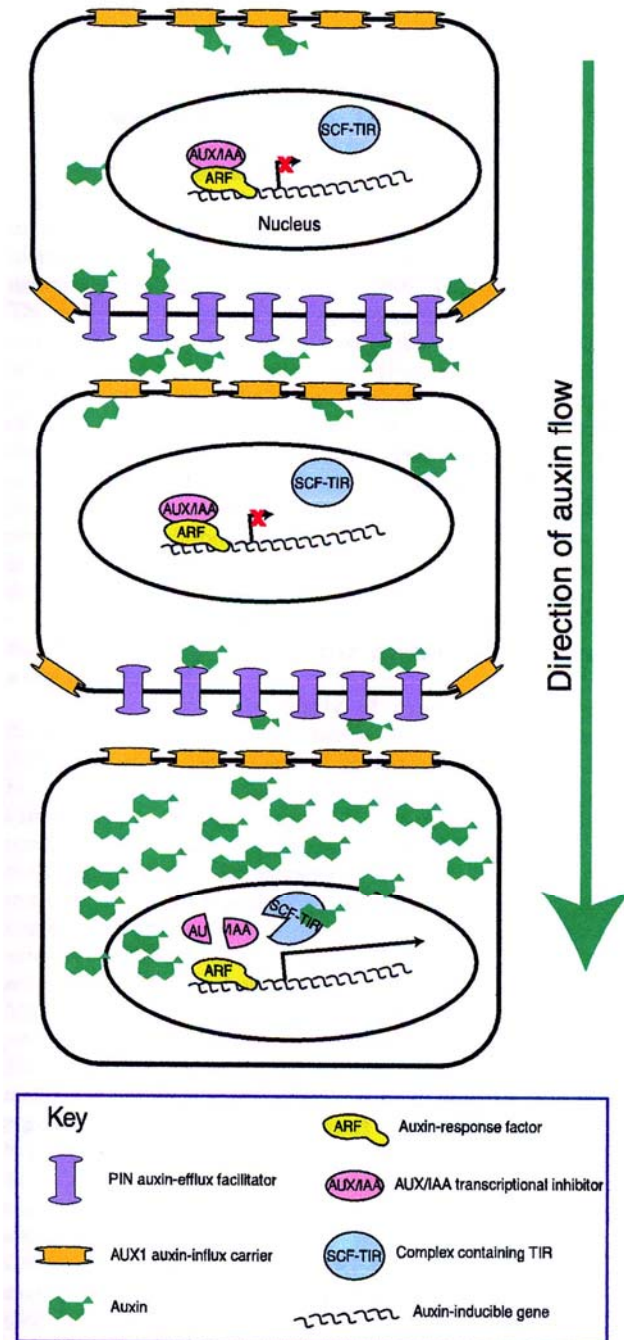
Trasporto di IAA in relazione alla formazione del meristema apicale



Il meristema apicale del germoglio si forma in una zona di bassa concentrazione di auxina

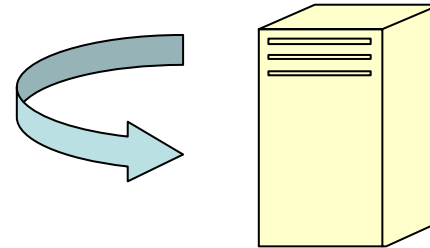


Nell'embrione vengono espressi i carriers PIN1 (PIN3) PIN4 e PIN7



PIN1; PIN4; PIN7; (PIN3)

PIN espresse in maniera asimmetrica:
1 o 2 lati dei sei di una cellula



- Localizzazione correla con la direzione del trasporto di IAA
- PIN riciclate continuamente tra reticolo e membrana plasmatica
richieste proteine ARF-GEF (GNOM)
- Non noto se PIN di per se carrier o in associazione con ABC transporter (MDR-like)

PIN1; PIN4; PIN7; (PIN3)

Espressi con diversa localizzazione in tempi diversi dello sviluppo dell'embrione

La sequenza di espressione regolata temporalmente e spazialmente, è responsabile della variazione nella direzione del flusso di IAA durante l'embriogenesi

Nello stadio precoce il flusso di IAA è verso l'apice, lontano dal sospensore; dallo stadio globulare tardivo il flusso è invertito, verso l'ipofisi e la radice in sviluppo.

PIN7, PIN1 i primi geni PIN espressi nell'embrione:

PIN7 si trova nella membrana apicale della cellula basale nell'embrione allo stadio a due cellule e nella membrana apicale delle cellule del sospensore fino allo stadio a 32 cellule



Trasporto di IAA da cellule basali verso l'apice

PIN1: espresso in maniera non polare nell'embrione fino allo stadio a 32 cellule;

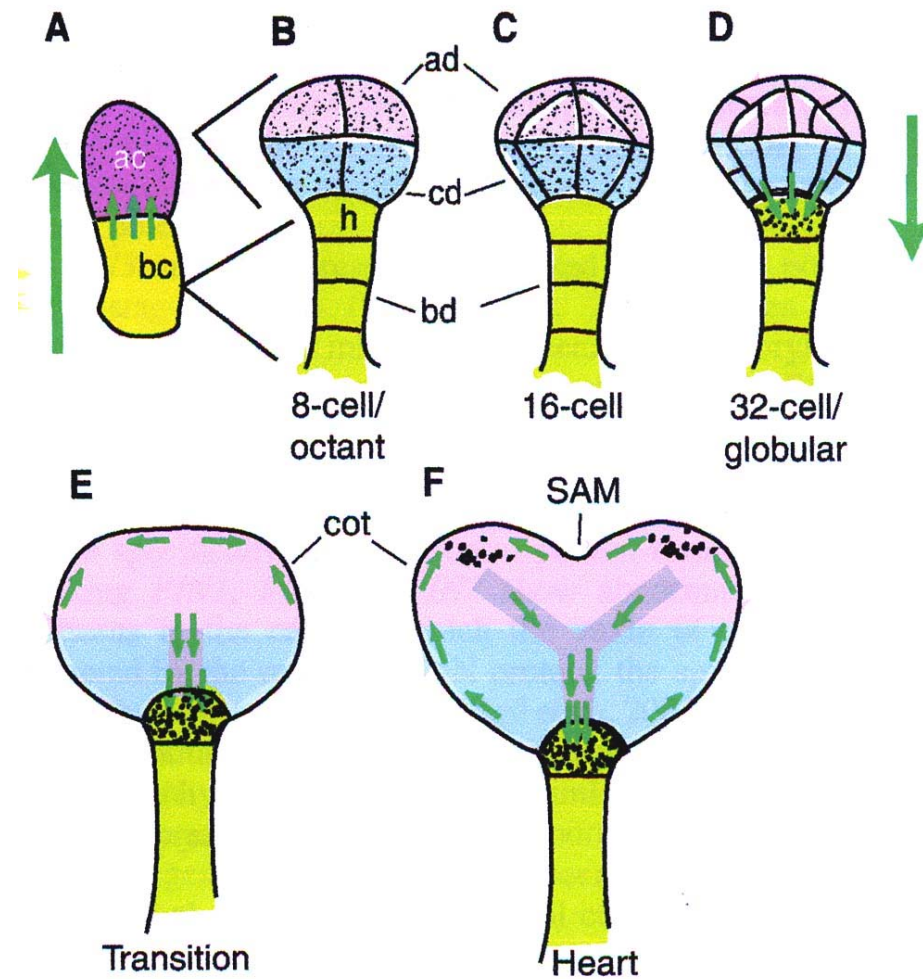
Successivamente si localizza nella parte basale delle cellule del procambio;
in questo stadio PIN7 si localizza nella parte basale delle cellule del sospensore
e PIN4 si accumula nella ipofisi e nelle iniziali vascolari



Il flusso di IAA è invertito verso l'ipofisi e il sospensore

(PIN3 espresso nel polo
radicale allo stadio a cuore)

Nel complesso l'azione combinata di PIN1; PIN4; PIN7 serve a invertire il flusso di IAA nello stadio globulare dall'embrione propriamente detto verso il polo basale



La funzione dei geni PIN è RIDONDANTE

- Singoli mutanti pin hanno fenotipo debole e alla fine sviluppano embrioni quasi normali
- Doppi o tripli mutanti pin hanno alterazioni dello sviluppo più marcate
- Mutanti *gnom* hanno un fenotipo molto marcato



Il gene GNO M determina il riciclo e la rilocalizzazione delle proteine PINe presumibilmente mutazioni *gnom* influenzano il riciclo di tutti i componenti della PIN

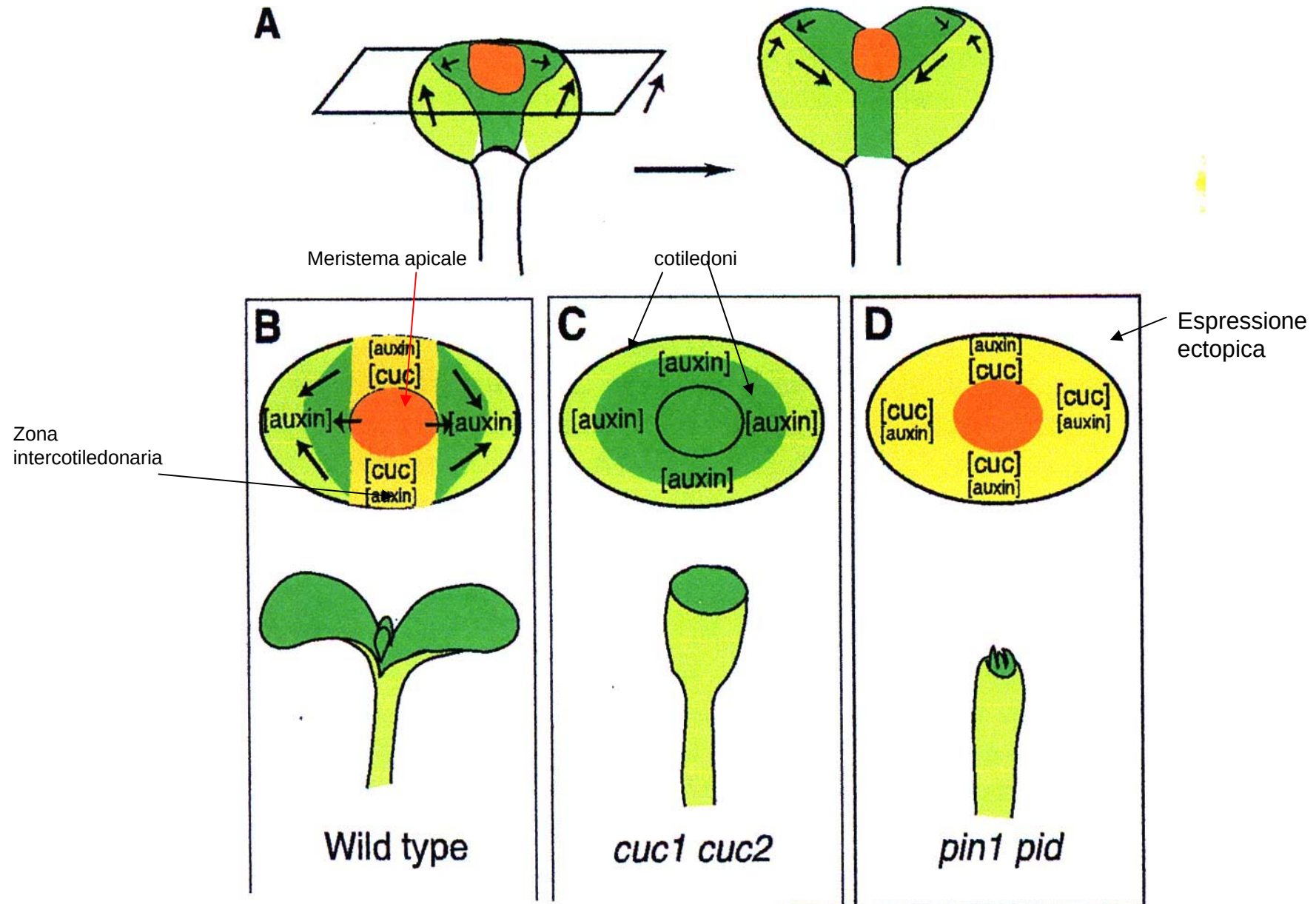
La formazione del meristema apicale dipende dall'espressione di geni modulati da IAA

- Nell'embrione precoce i valori di IAA sono elevati e ciò mette in moto il programma di patterning assiale con l'espressione dei geni MONOPTEROS (MP ; NPH4)
- Allo stadio globulare tardivo la rilocalizzazione delle proteine PIN fa sì che il flusso di IAA sia diretto verso le zone fiancheggianti (cotiledoni) la zona centrale dove si formerà il meristema
- **Come conseguenza dell'abbassamento della concentrazione di IAA cessa l'espressione di MP nella zona centrale**

➤ La formazione del meristema apicale e della zona intercotiledonaria è correlata alla espressione dei geni **CUC1 CUC2 e CUC3**

➤ I geni CUC vengono espressi nella zona intercotiledonaria dove reprimono la crescita; crescita che ha luogo nelle zone cotiledonari dove alti livelli di IAA reprimono l'espressione dei geni CUC e determinano il passaggio alla simmetria bilaterale dello stadio a cuore

Formazione del meristema apicale e dei cotiledoni



MODELLO

IAA è trasportato via dalle regioni intercotiledonarie verso le zone cotiledonarie dove è in grado di determinare la degradazione di un repressore AUX/IAA

Ciò consente a geni del tipo MONOPTEROS (ARF) di reprimere la trascrizione dei geni CUC

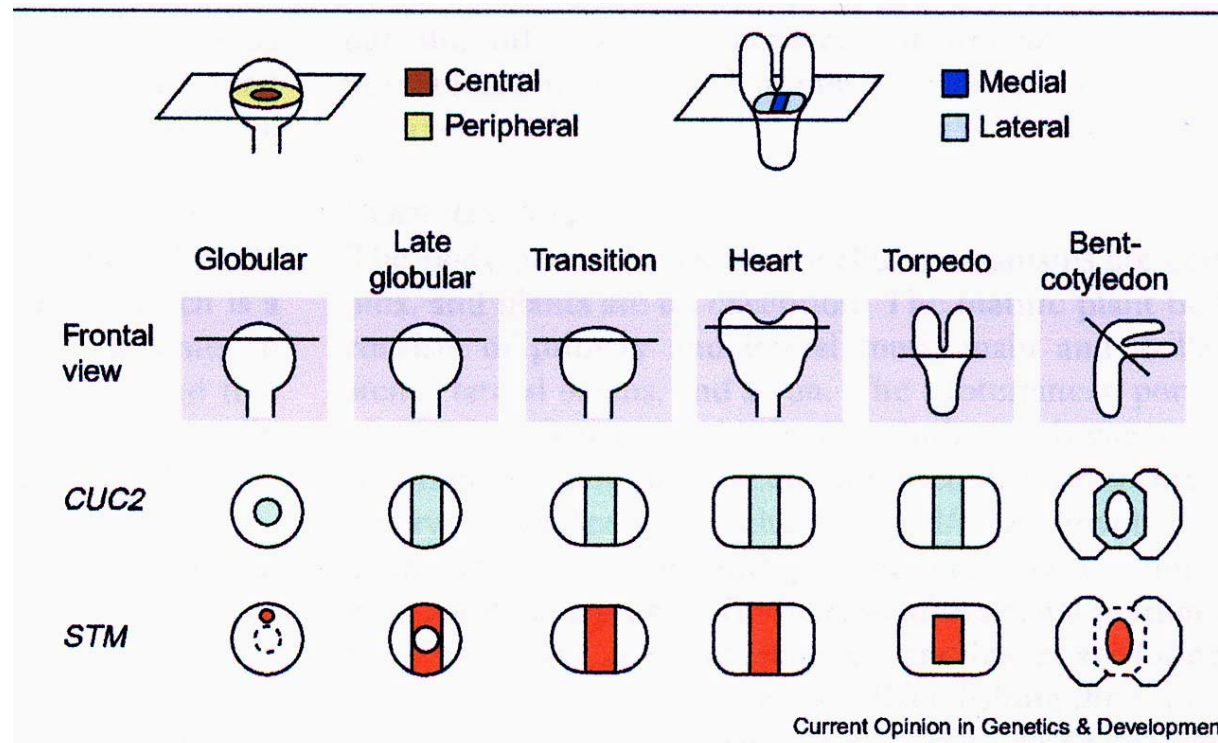
(la repressione da parte di MONOPTEROS può essere indiretta)

Per la formazione del meristema apicale è richiesta l'espressione di altri geni

SHOOTMERISTEMLESS (STM)

WUSCHEL (WUS)

(necessari anche per il mantenimento dell'identità meristemica)



I geni CUC sono necessari per l'espressione di STM

STM non è espresso in doppi mutanti cuc1/cuc2.

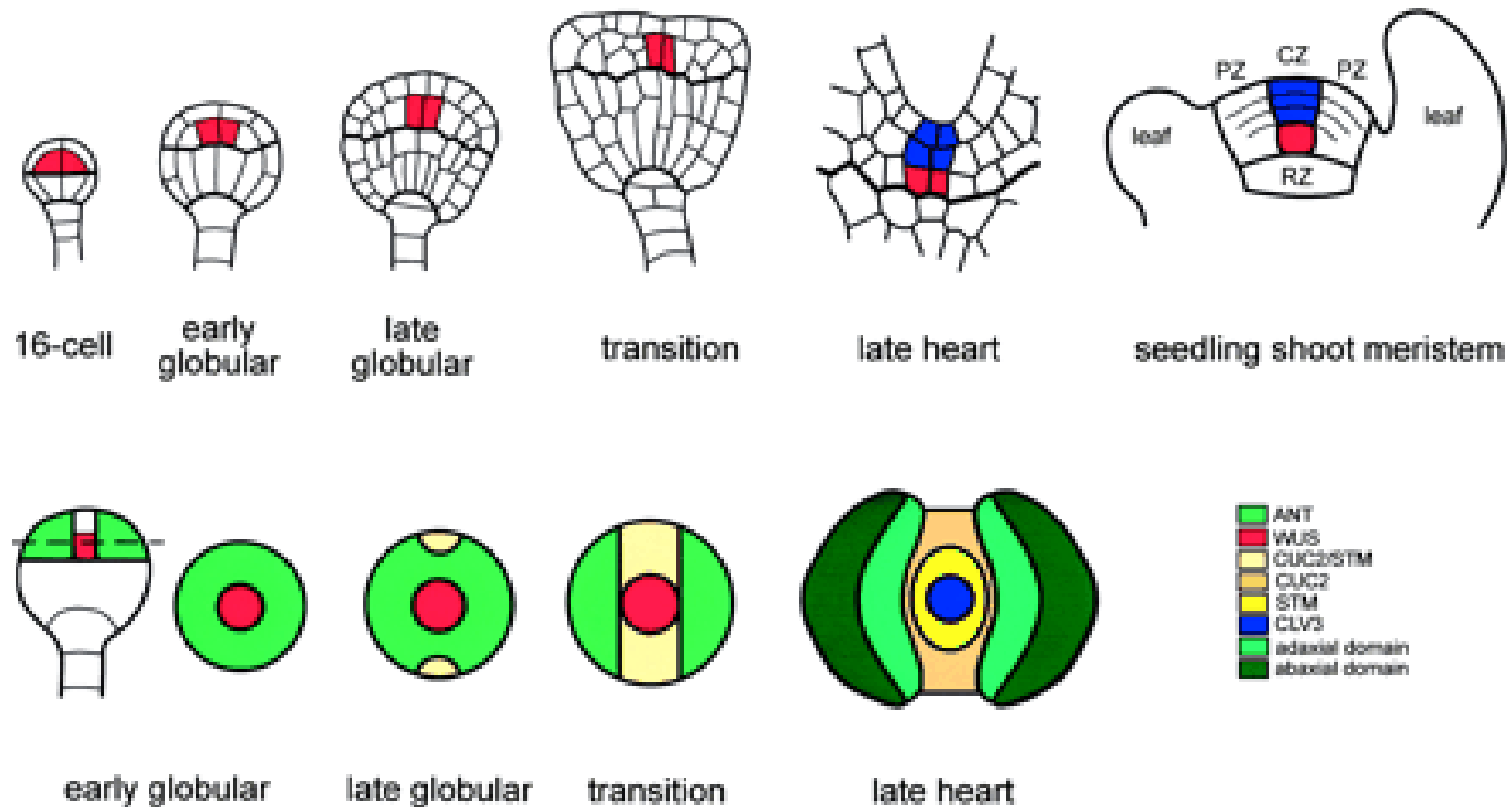
STM è richiesto per la corretta espressione spaziale dei geni CUC

Interazioni tra CUC e STM probabilmente non note e probabilmente indirette

CUC appartengono alla famiglia di proteine esclusive delle piante che contengono domini NAC

Funzione sconosciuta

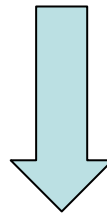
Sequenza di espressione genica nella formazione del meristema apicale



Mantenimento dell'identità delle cellule meristematiche

Il meristema apicale indeterminato dà luogo a strutture determinate come le foglie

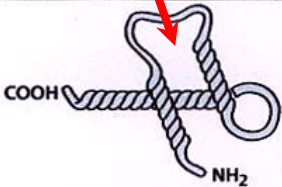
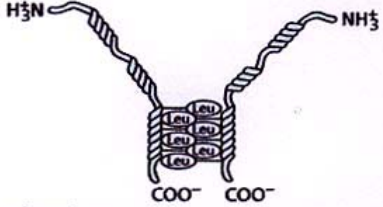
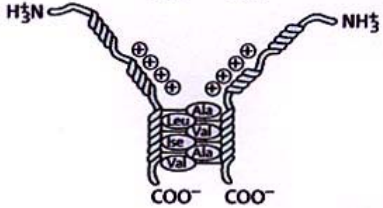
Perdita della identità di cellule meristematiche



Geni HOMEBOX della classe KNOTTED 1 (KNOX) necessari al mantenimento della identità meristematica

Classi di fattori di trascrizione

Table 14.1
DNA-Binding Motifs

Name	Examples of proteins	Key structural features	Illustration
Helix-turn-helix	Transcription factors that regulate genes in anthocyanin biosynthesis pathway	Two α helices separated by a turn in the polypeptide chain; function as dimers	
Zinc finger	COP1 in <i>Arabidopsis</i>	Various structures in which zinc plays an important structural role; bind to DNA either as monomers or as dimers	
Helix-loop-helix	GT element-binding protein of phytochrome-regulated genes	A short α helix connected by a loop to a longer α helix; function as dimers	
Leucine zipper	Fos and Jun	An α helix of about 35 amino acids containing leucine at every seventh position; dimerization occurs along the hydrophobic surface	
Basic zipper (bZip)	Opaque 2 protein in maize, G box factors of phytochrome-regulated genes, transcription factors that bind ABA response elements	Variation of the leucine zipper motif in which other hydrophobic amino acids substitute for leucine and the DNA-binding domain contains amino acids	

GENI OMEOBX

Motivo helix-turn-helix

Tre classi nelle piante

Class 1		Helix I		Helix II	Turn	Helix III	
Maize	KN1	S K K K K K G K L P	K E A R Q Q L L S W W D Q H Y K W P Y P	S E T Q K V A L A E S	T G L D	L K Q I N N W F	I N Q R K R H W K P S
Rice	OSH1	S K K K K K G K L P	K D A R Q Q L L N W W E L H Y K W P Y P	S E S Q K V A L A E S	T G L D	L K Q I N N W F	I N Q R K R H W K P S
Maize	RS1	S K K K K K G K L P	K E A R Q K L L H W W E L H Y K W P Y P	S E T E K I A L A E S	T G L D	Q K Q I N N W F	I N Q R K R H W K P S
Maize	KNOX4	S K K K K K G K L P	K E A R Q K L L H W W E L H Y K W P Y P	S E T E K I A L A E A	T G L D	Q K Q I N N W F	I N Q R K R H W K P S
Arabidopsis	KNAT1	S K K K K K G K L P	K E A R Q K L L T W W E L H Y K W P Y P	S E S E K V A L A E S	T G L D	Q K Q I N N W F	I N Q R K R H W K P S
Maize	KNOX8	S K R K K K G K L P	K E A R Q K L L H W W E L H Y K W P Y P	S E T E K M A L A E T	T G L D	P K Q I N N W F	I N Q R K R H W K P A
Maize	KNOX3	C K R R K K D K L P	K E A R Q K L L S W W E L H Y R W P Y P	S E M E K I A L A E S	T G L E	Q K Q I N N W F	I N Q R K R H W K P S
Soybean	SBH1	M K R R K K G K L P	K E A R Q Q L L E W W N R H Y K W P Y P	S E S Q K L A L A E S	T G L D	Q K Q I N N W F	I N Q R K R H W K P S
Arabidopsis	KNAT2	S K K K K K G K L P	R E A R Q A L L D W W N V H N K W P Y P	T E G D K I S L A E E	T G L D	Q K Q I N N W F	I N Q R K R H W K P S
Maize	KNOX10	S R K K K K G K L P	R D A R Q K L L H W W Q L H Y R W P Y P	S E L E K A A L A E S	T G L E	A K Q I N N W F	I N Q R K R H W K Q A
Maize	LG3	L K R R K K G K L P	K D A R T V L L E W W N T H Y R W P Y P	T E E D K V R L A A M	T G L D	P K Q I N N W F	I N Q R K R H W K P S
Maize	KNOX5	L K R R K K G K L P	K D A R S A L M D W W N T H Y R W P Y P	T E E D K V R L A A M	T G L D	P K Q I N N W F	I N Q R K R H W K P S
Maize	KNOX11	L K R R K K G K L P	K D A R S A L M D W W N T H Y R W P Y P	T E E D K V R L A A A	T G L D	P K Q I N N W F	I N Q R K R H W K P S
Class 2							
Maize	KNOX1	L R K R R A G K L P	G D T T S I L K Q W W Q E H S K W P Y P	T E D D K A K L V E E	T G L Q	L K Q I N N W F	I N Q R K R N W H N N
Maize	KNOX2	L R K R R A G K L P	G D T A S T L K A W W Q A H S K W P Y P	T E E D K A R L V Q E	T G L Q	L K Q I N N W F	I N Q R K R N W H N N
Maize	KNOX6	M R K R R A G K L P	G D T A S V L K A W W Q A H S K W P Y P	T E D D K A R L V Q E	T G L Q	L K Q I N N W F	I N Q R K R N W H S N
Maize	KNOX7	M R K R R A G K L P	G D T A S V L K A W W Q A H S K W P Y P	T E D D K A R L V Q E	T G L Q	L K Q I N N W F	I N Q R K R N W H S N
B. napus	BNHD1	M R K R R A G K L P	G D T T T V L K N W W Q Q H C K W P Y P	T E D D K A K L V E E	T G L Q	L K Q I N N W F	I N Q R K R N W H S N
Other							
Arabidopsis	ATH1	Q I W R P Q R G L P	E K S V S V L R N W M F Q N F L H P Y P	K D S E K H L L A I R	S G L T	R S Q V S N W F	I N A R V R L W K P M
Human	PNX-1		L P K H A T N V M R S W L F Q H I G H P Y P	T E D E K K Q I A A Q	T N L T	L L Q V N N W F	I N A R R R I L Q P M

Mutazione knotted1 (kn1) identificata originariamente nel mais

Mutazione gain of function (dominante)

Espressione del gene nel momento e nel posto errato

Si ha espressione di KN1 nelle foglie durante lo sviluppo

Anormalità intorno alle venature

Proliferazione irregolare di divisioni cellulari
Intorno alle nervature

Formazione di nodi (knot) che protrudono dalla
foglia

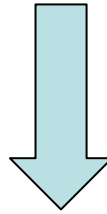
Nodi simili a meristemi, continuano a dividersi

KN1 controlla l'attività meristemica



Piante di tabacco trasformate con KN1 sotto
il controllo di un promotore costitutivo

sviluppano meristemi apicali avventizi sulla superficie delle foglie



KN1 controlla l'attività dei meristemi

In *Arabidopsis* geni KNOX

KNAT1

KNAT2

SHOOT MERISTEMLESS

Mutanti *SHOOTMERISTEMLESS (STM)*:

***STM* espresso specificamente nelle cellule che diverranno cellule meristematiche
la sua espressione è richiesta per la formazione del protomeristema apicale**

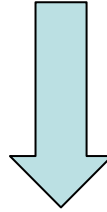
**Mutanti *stm* omozigoti, loss of function, non formano meristema apicale e
le cellule si differenziano**

***STM* è espresso specificamente nelle cellule che formeranno il
protomeristema apicale; l'espressione del gene è necessaria per la
formazione del protomeristema**

***STM* inibisce il processo di differenziamento assicurando che le cellule
meristematiche rimangano indifferenziate**

***STM* è necessario anche per il mantenimento dell'identità meristematica delle
cellule nella pianta adulta**

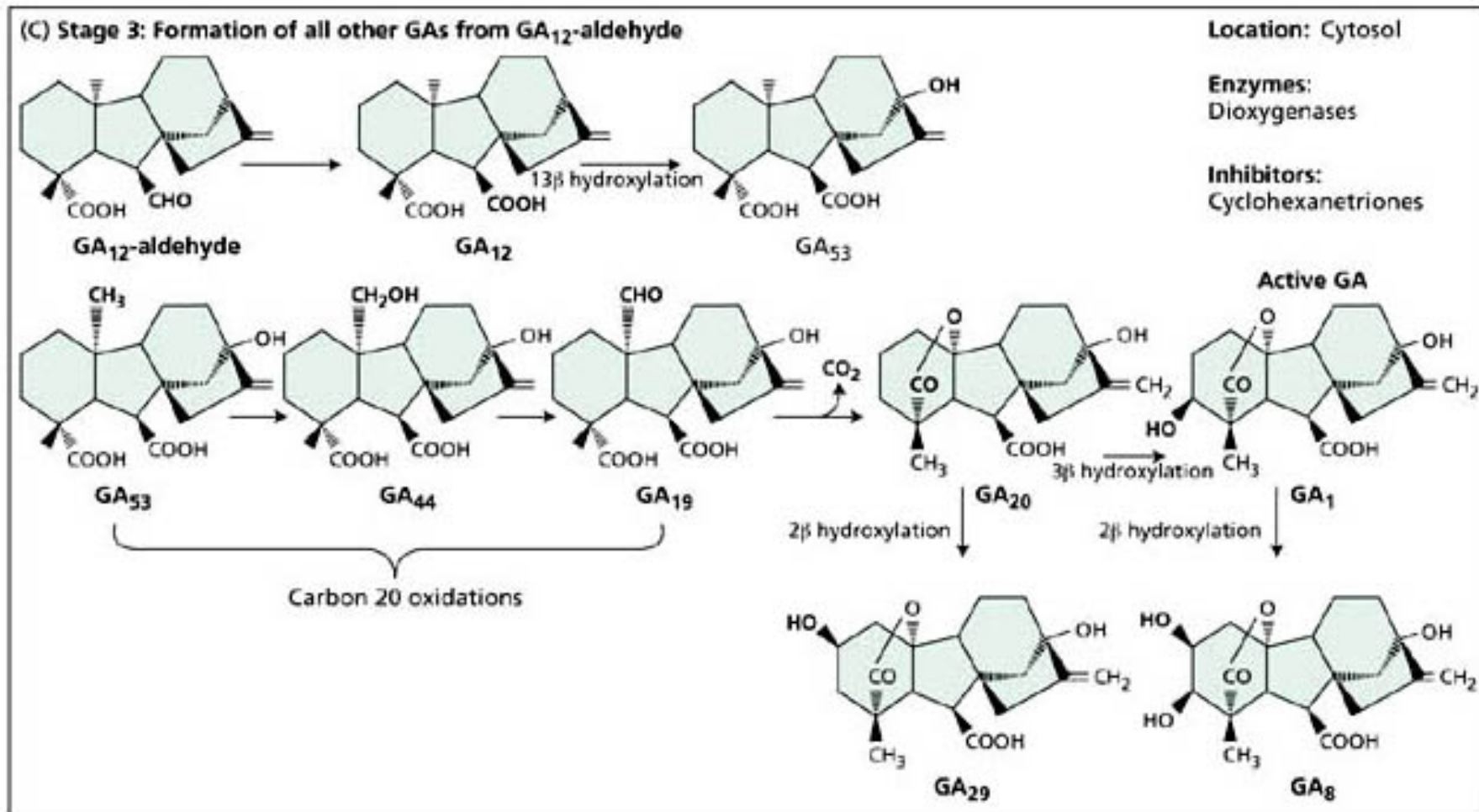
Funzione del gene *SHOOTMERISTEMLESS (STM)*:



***STM* appartiene alla classe di fattori di trascrizione homeodomain (KNOTTED-1 like) KNOX**

I geni KNOX reprimono la trascrizione del gene della GA20-ossidasi (penultimo passaggio biosintesi gibberelline)

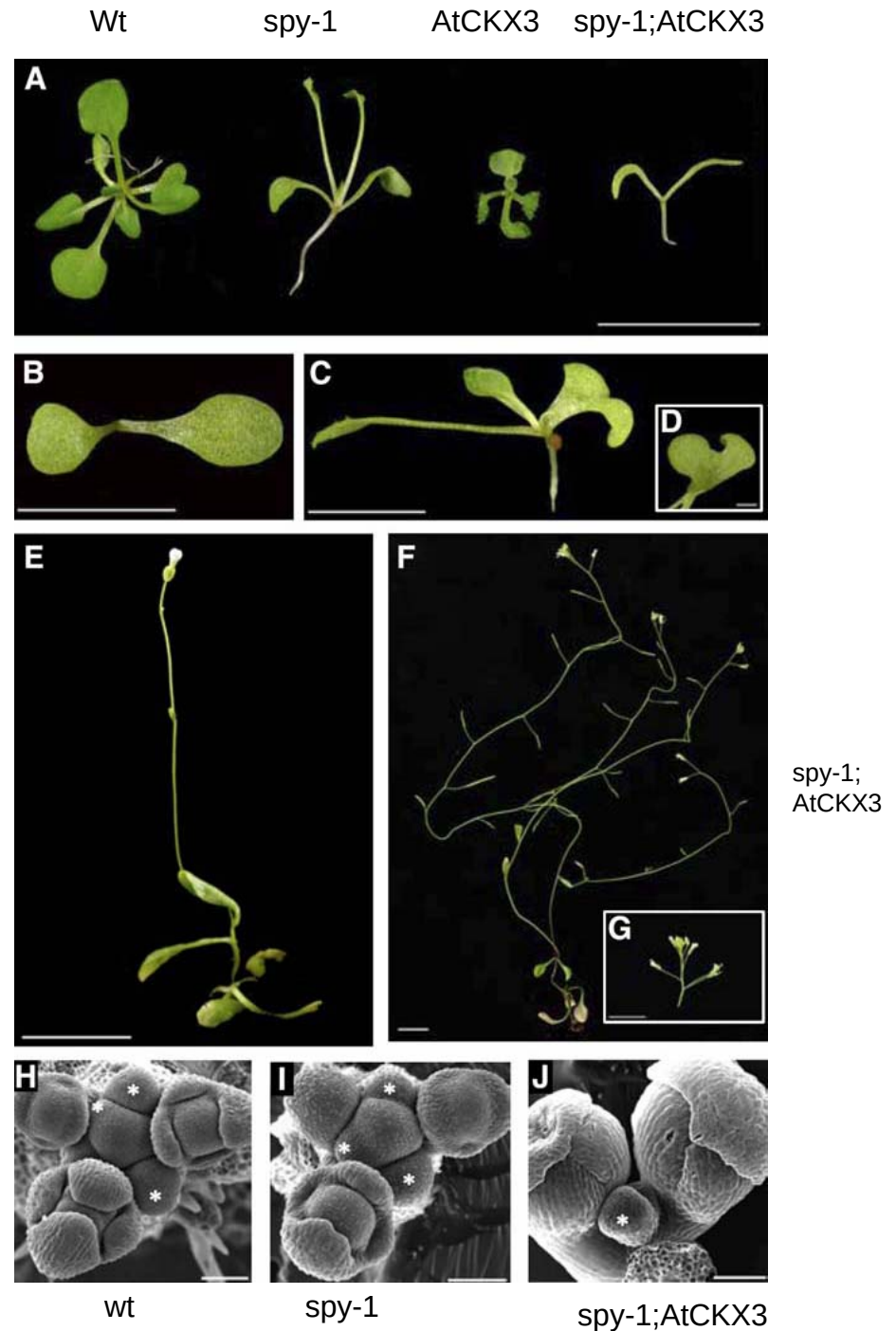
Biosintesi delle Gibberelline (dalla GA₁₂- aldeide)



Elevati livelli di citokinine e bassi di gibberelline sono necessari per la promozione dell'attività dei meristemi

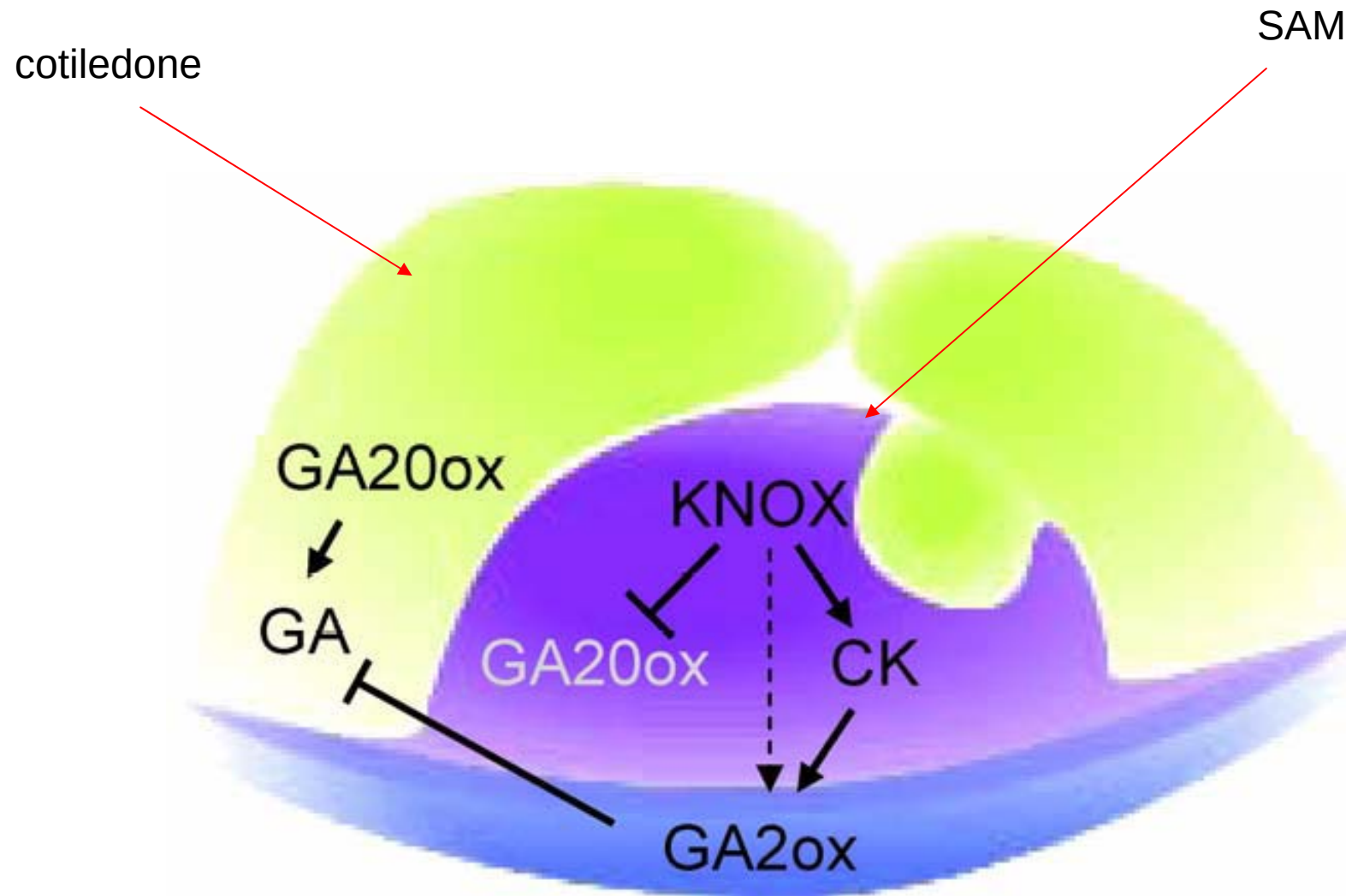
Mutanti *spindly* con ridotti livelli di CK (35S::AtCKX3) hanno bassa attività meristemica

spy-1



KNOX viene espresso nel SAM dove attiva la biosintesi delle CK e reprime sintesi della GA20ox e quindi la biosintesi delle GA e promuove l'attività meristemica.

CK attivano l'espressione di GA20ox stimolando l'inattivazione delle GA. Il risultato è che le GA attive vengono confinate nelle foglie cotiledonari



MANTENIMENTO DELL'IDENTITA' DI CELLULE MERISTEMATICHE

I programmi di sviluppo sono regolati da reti di geni interagenti

Implicati altri geni HOMEBOX

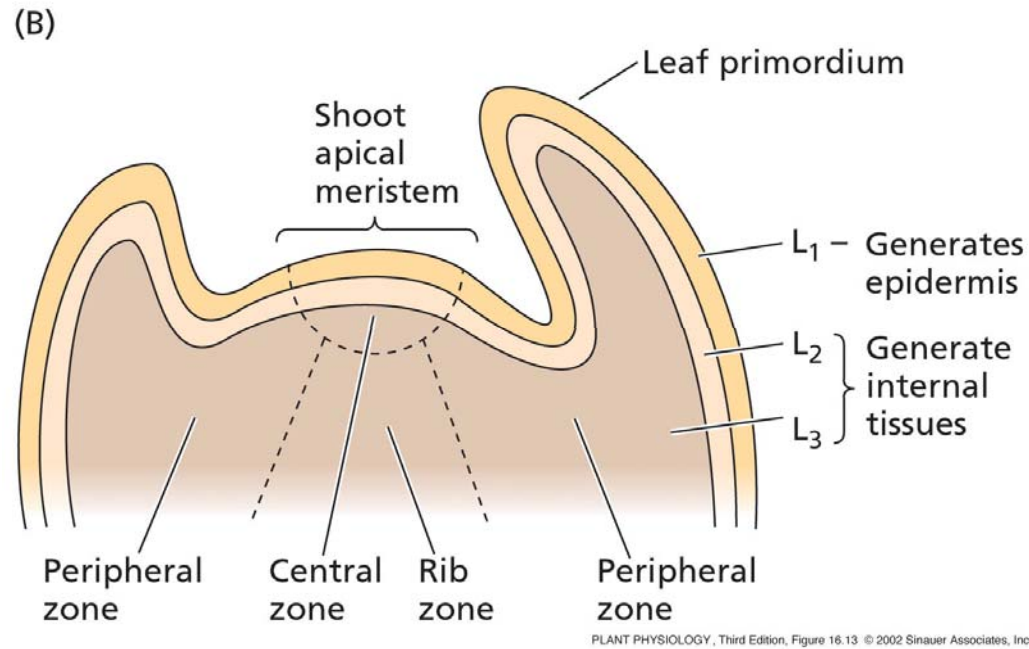
WUSCHEL (WUS)

Nei mutanti *wus* loss of function l'attività meristematica (SAM) cessa alla fine dell'embriogenesi e la crescita si arresta allo stadio di cotiledoni
Non viene mantenuta la popolazione delle cellule iniziali

**IDENTIFICATO UN CIRCUITO REGOLATIVO CHE COINVOLGE
WUSCHEL (WUS) , SHOOTMERISTEMLESS (STM) e CLAVATA (CLV1, CLV3)**

- Nelle piante a differenza degli animali l'organogenesi è postembrionale consentendo di adattare lo sviluppo alle condizioni ambientali (piante organismi sessili)
- Dopo la germinazione SAM dà luogo agli organi laterali
- SAM mantiene una struttura organizzata pur rispondendo a segnali interni ed esterni di sviluppo
- A questo scopo al centro del SAM viene mantenuta una popolazione di cellule indifferenziate che si dividono lentamente
- Cellule che lasciano questa zona entrano in quelle periferiche e si differenziano a formare gli organi laterali; oppure nella zona sottostante (rib zone) e si differenziano in cellule del fusto

La velocità di proliferazione delle cellule iniziali nel SAM deve essere coordinata con la velocità di differenziamento delle cellule figlie



Il meccanismo di mantenimento del SAM e di coordinamento con il processo differenziativo identificato mediante lo studio dei mutanti di *Arabidopsis*

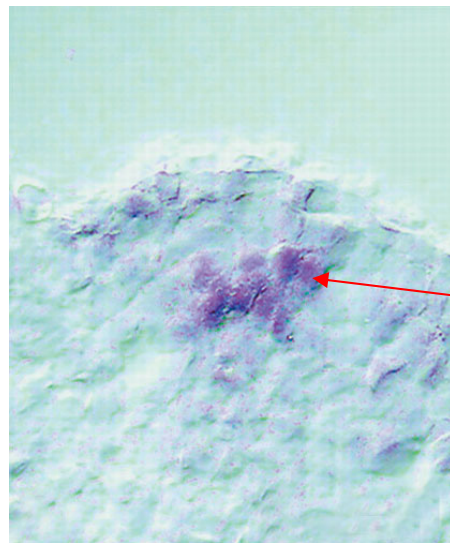
WUSCHEL ,CLAVATA-1, CLAVATA-2 ,CLAVATA-3

CLAVATA 3 regola negativamente l'espressione di WUSCHEL

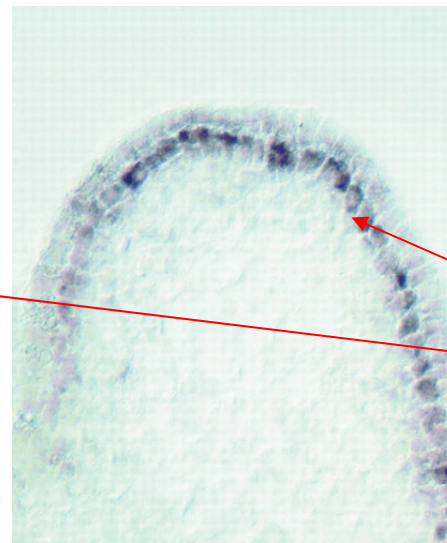
WUSCHEL regola positivamente l'espressione di CLAVATA 3

WUS è espresso nelle cellule del centro organizzatore tra gli strati L1 e L3
nella zona centrale del SAM

WT



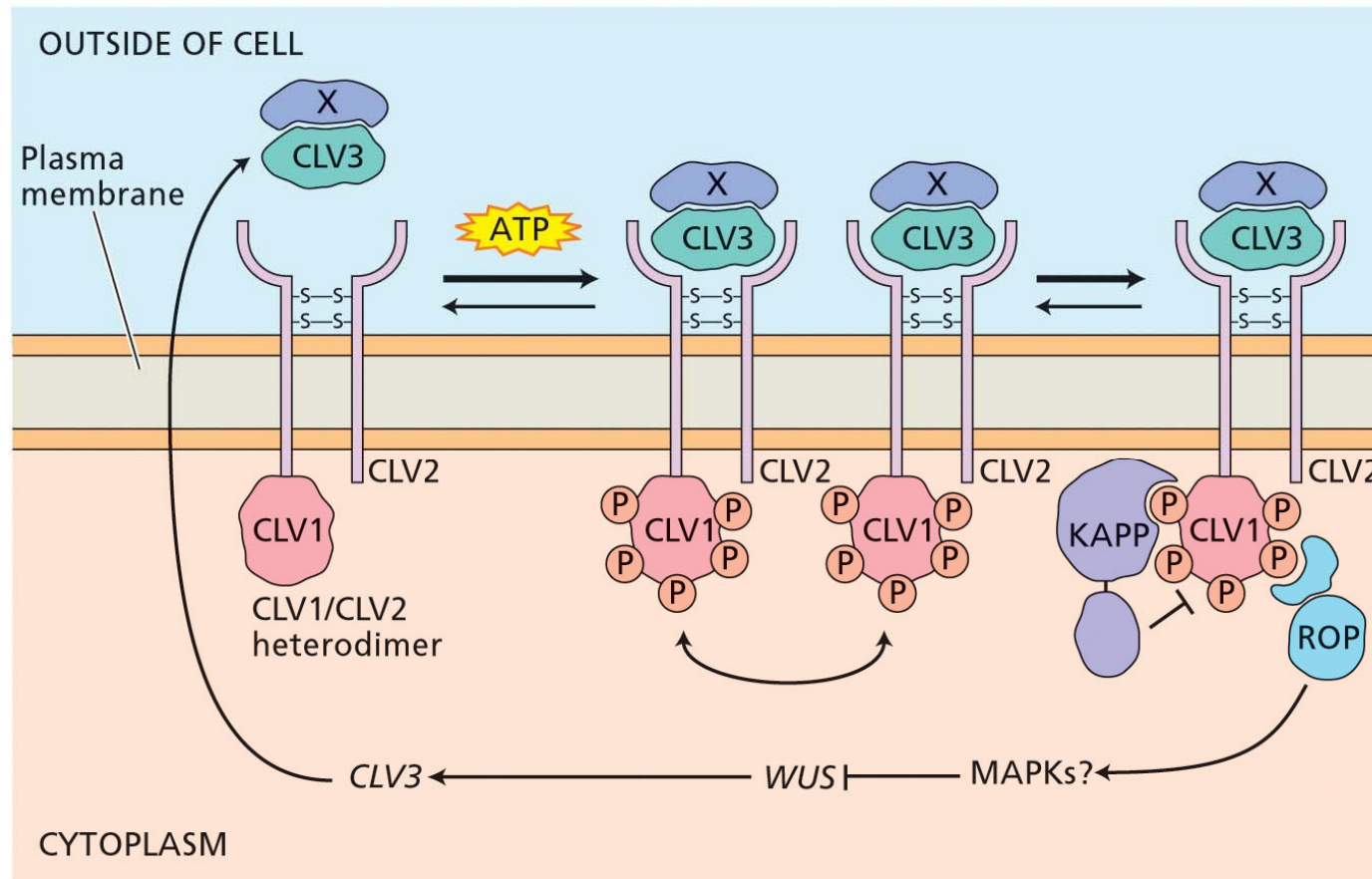
clv3



WUS

CLAVATA 1 è un recettore Chinasi (receptor kinase)

CLAVATA 2 manca del dominio kinasico ma possiede il dominio di binding per CLV 3



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 16.24 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

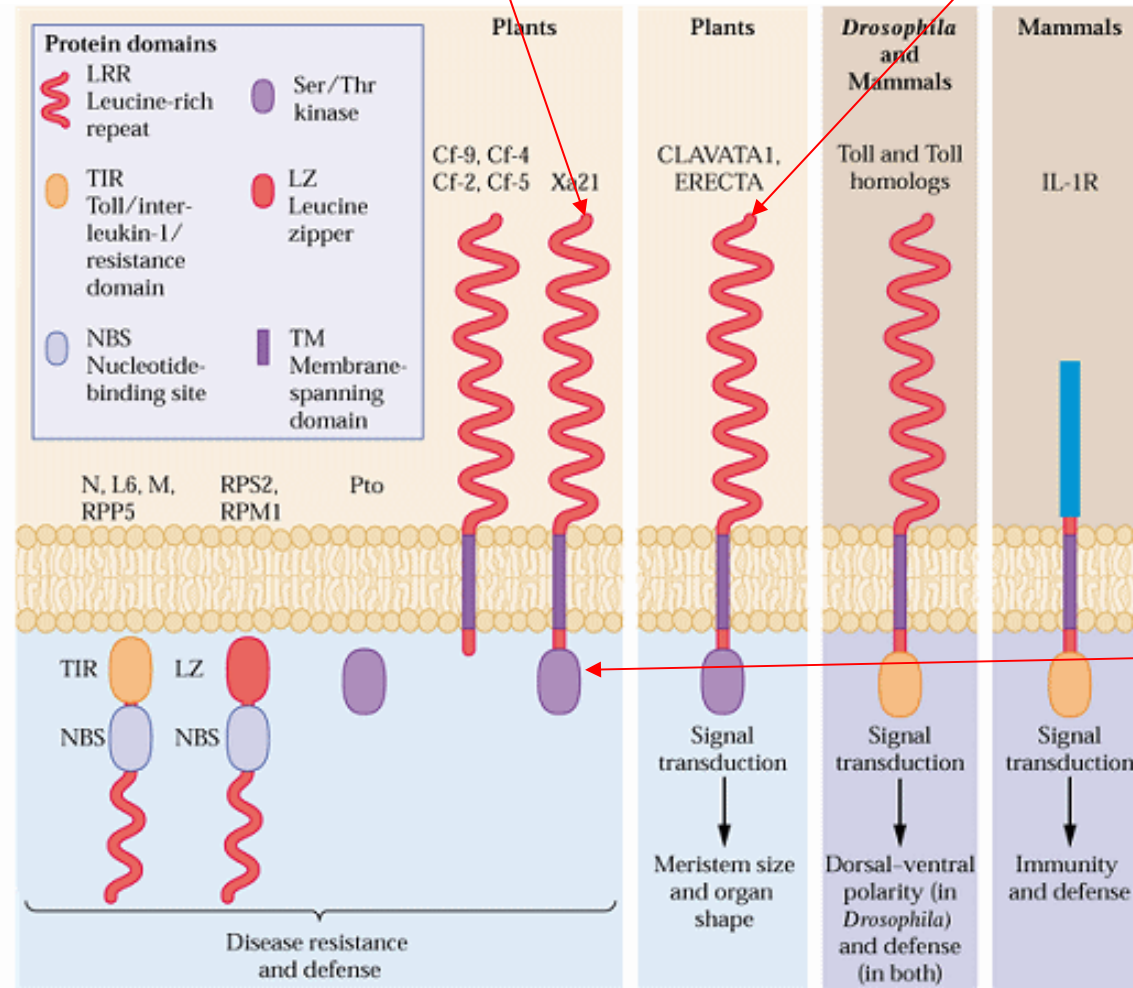
CLAVATA3 è una piccola proteina appartenente alla classe CLE ed è il ligando Di CLV3/CLV2

BRI1

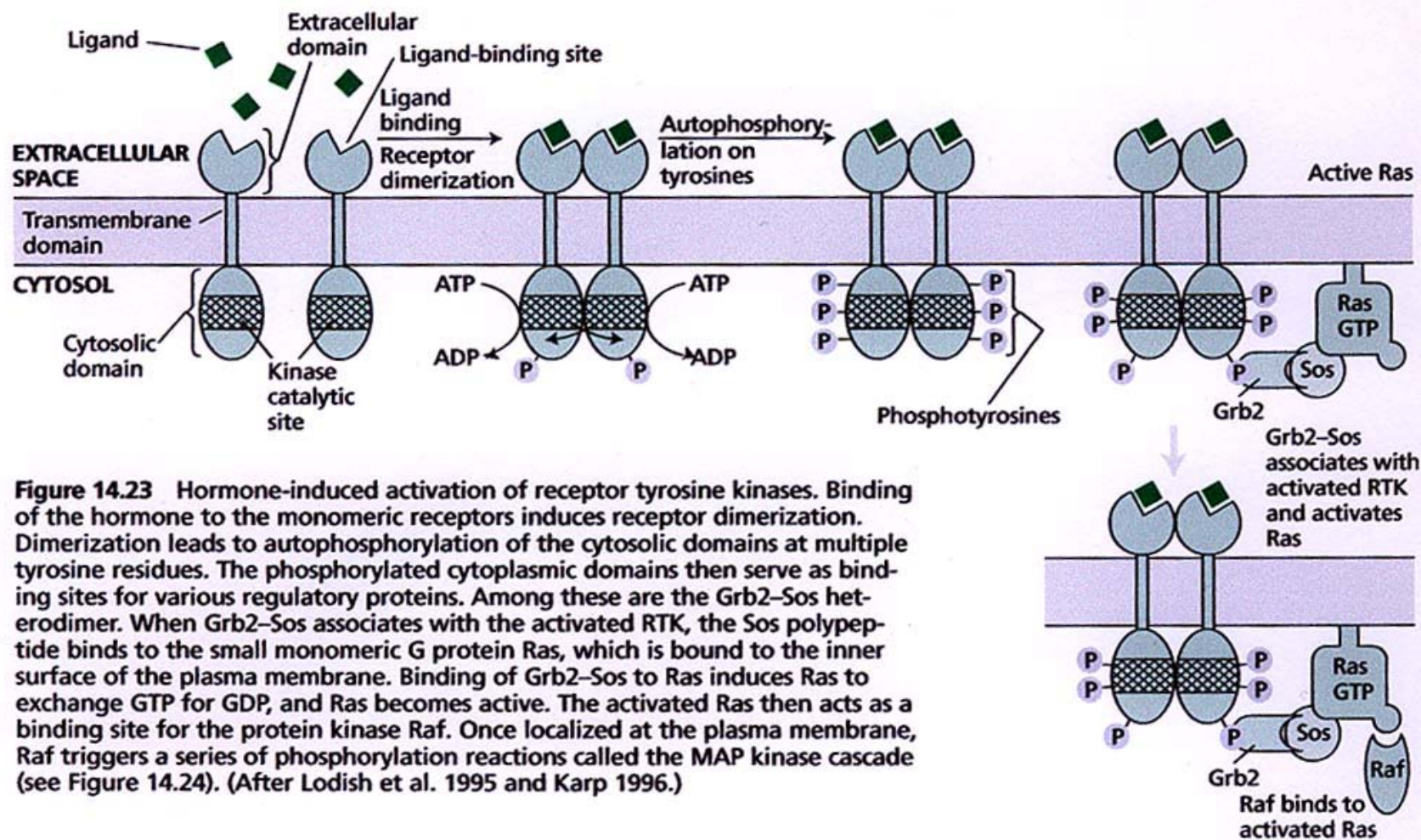
Recettore di sistemina
e brassinosteroidi

Xa21

Clavata1



Dominio
Chinasico
Serina/treonina
kinasi



- I geni CLAVATA sono stati identificati come mutazioni che determinano un aumento delle dimensioni dei meristemi vegetativo apicale e fiorale, con aumento nel numero degli organi laterali (numero di organi fiorali)
- I geni CLAVATA regolando l'espressione di WUSCHEL controllano le dimensioni del meristema apicale (numero di cellule iniziali nella zona centrale del SAM)



MECCANISMO A FEEDBACK



CLV3 è espresso nelle cellule degli strati L1 e L2 della CZ nel meristema apicale

WUS è espresso nelle cellule del OC della zona centrale (strato L3)

CLV1 ha un pattern di espressione simile a quello di WUS ma più ampio

WUS agisce in maniera “nonautonoma” infatti la sua attività è richiesta per mantenere l'identità delle cellule iniziali ma è espresso solo in poche cellule dello strato L3 (azione a distanza)

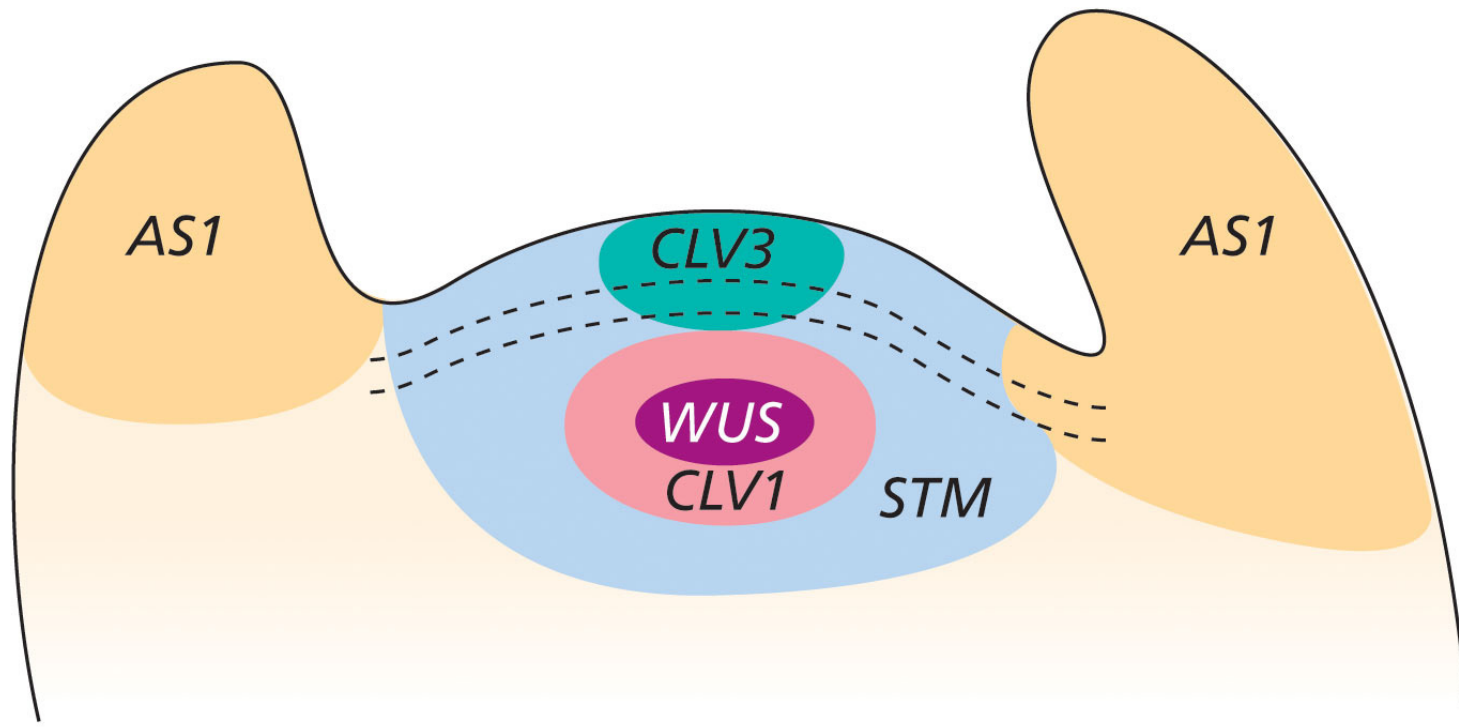
CLV3 controlla il numero di cellule iniziali regolando negativamente l'espressione di WUS nello strato L3

Se mutazioni inattivano CLV1 o CLV3 l'espressione di WUS si espande e aumenta il numero di cellule iniziali indifferenziate

WUS promuove l'espressione di CLV3 che a sua volta reprime l'espressione di WUS

MECCANISMO A FEEDBACK per il controllo della popolazione di cellule iniziali

Pattern di espressione di geni di sviluppo nel meristema apicale di Arabidopsis



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 16.28 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

STM mantiene la proliferazione cellulare nella zona periferica
Svolgendo un ruolo complementare a quello di WUSCHEL

Stem cell autofeedback loop

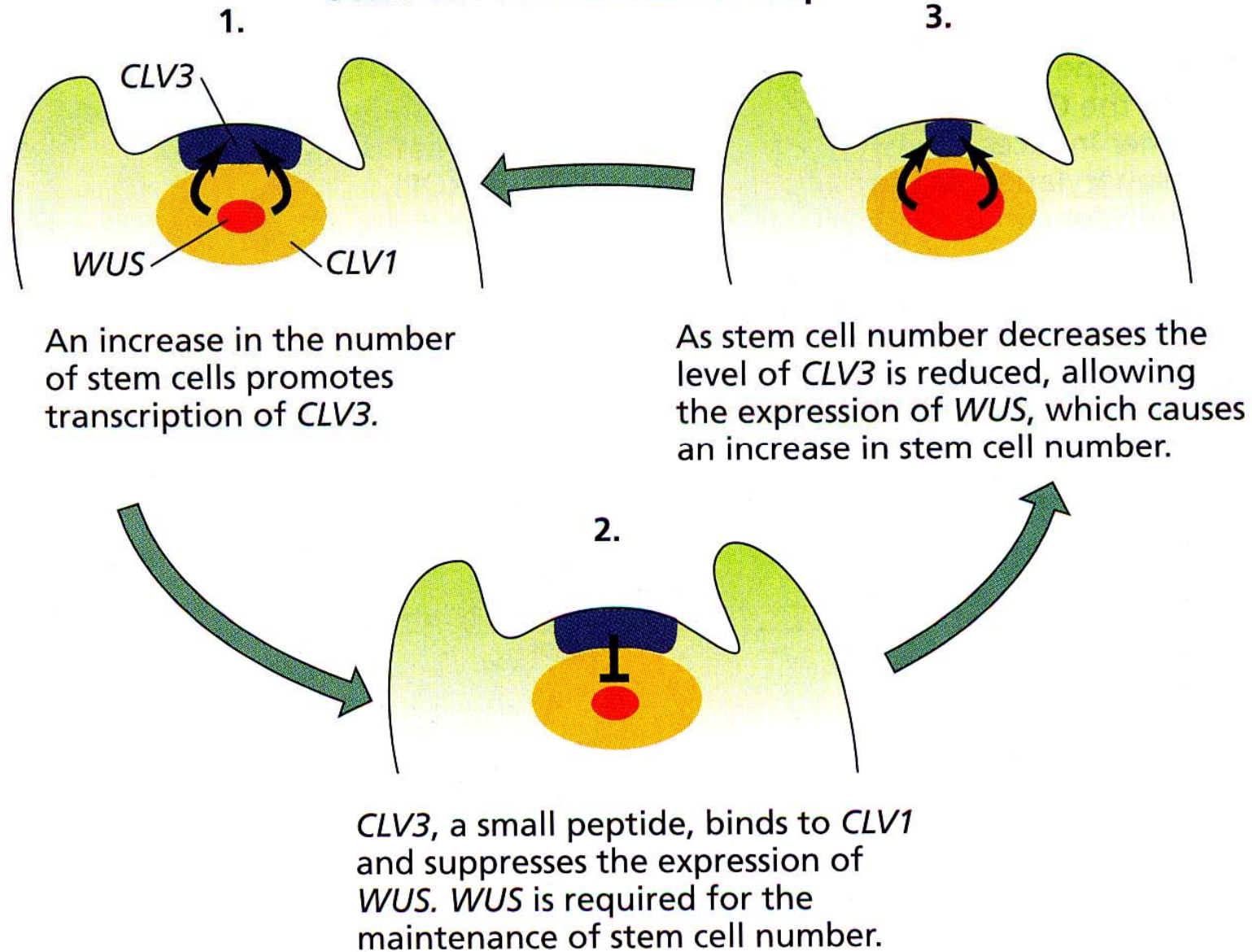
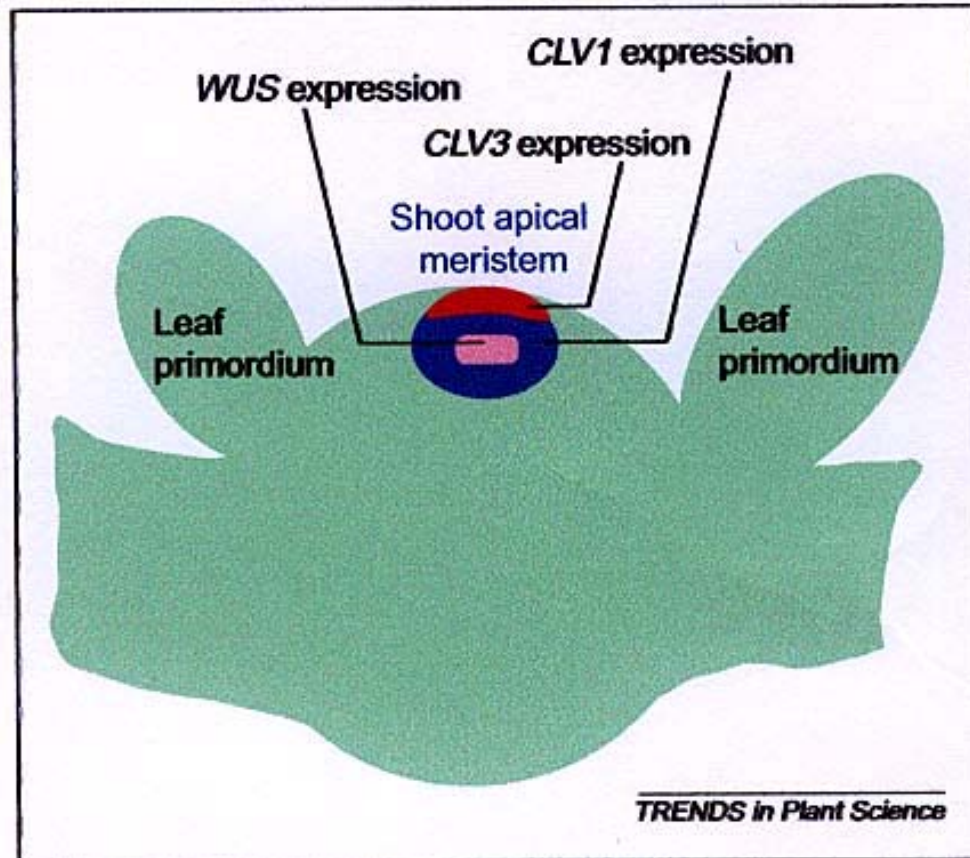
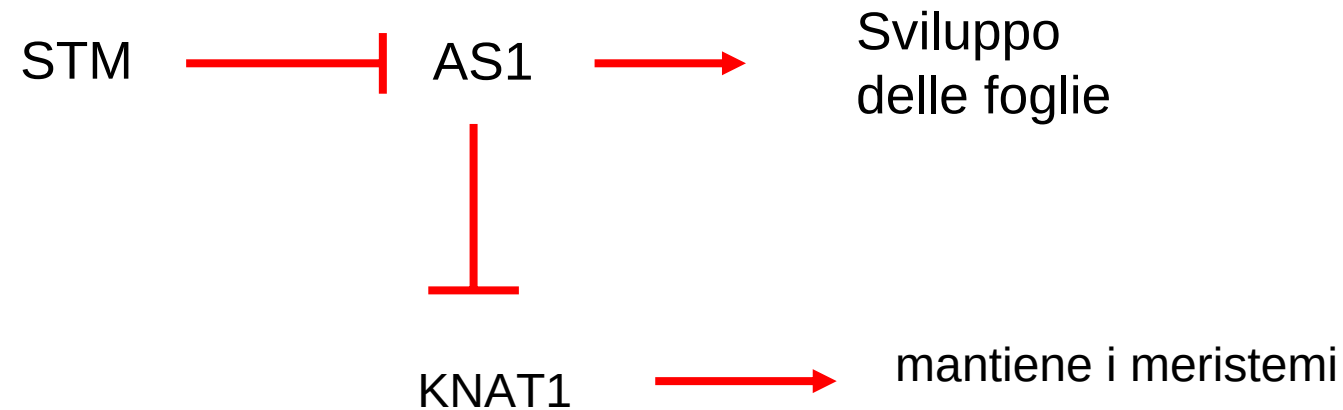


Fig. 3. *CLAVATA1* (CLV1) and *CLAVATA3* (CLV3) are both expressed in the central zone of the shoot apical meristem (SAM) and prevent the overproliferation of undifferentiated stem cells at that position. *CLV3* encodes a peptide produced by the stem cells at the SAM apex, which might be the ligand for the CLV1 receptor-kinase-like protein produced in cells deeper in the central zone. The *WUSCHEL* (*WUS*) gene encodes a homeodomain protein that promotes stem cell identity and is negatively regulated by CLV signalling in a feedback system that regulates the balance of stem cell production and division activity at the SAM [63,64].



STM mantiene l'identità meristemica sopprimendo il differenziamento



espressione di AS1

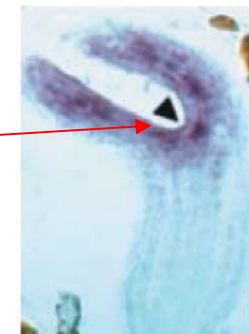
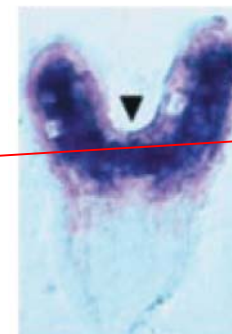
WT



stm

ASYMMETRIC LEAVES (AS1)

manca il meristema apicale

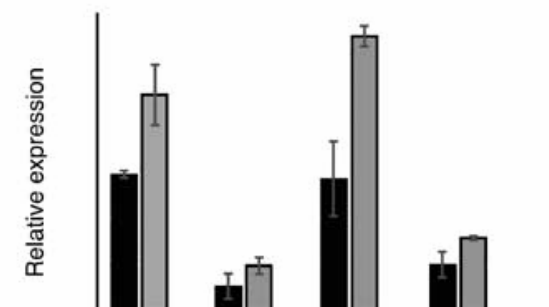
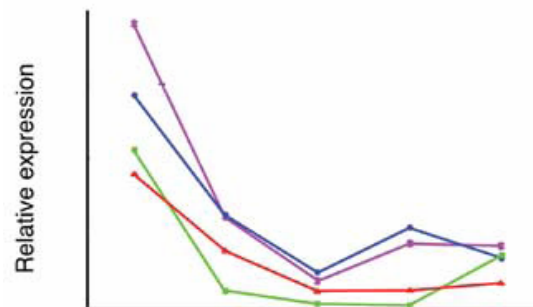
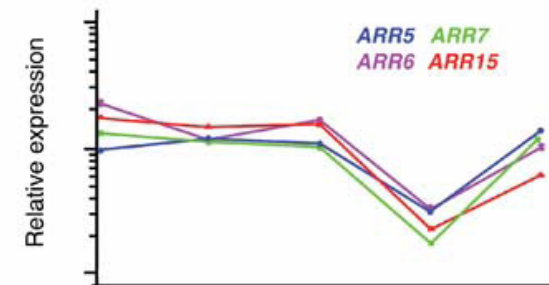
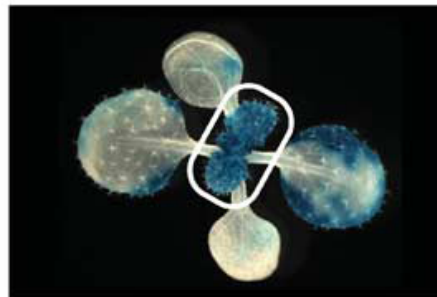


FUNZIONE DEL GENE WUSCHEL

(mutanti recessivi *wus* non formano SAM o formano pochi organi)

Reprime la trascrizione dei geni *ARR5*, *ARR6*, *ARR7* e *ARR15* che codificano per regolatori di risposta nel sistema a due componenti attivato dalle citokinine

ARR5, *ARR6*, *ARR7*, e *ARR15* agiscono come regolatori negativi della risposta alle citokinine

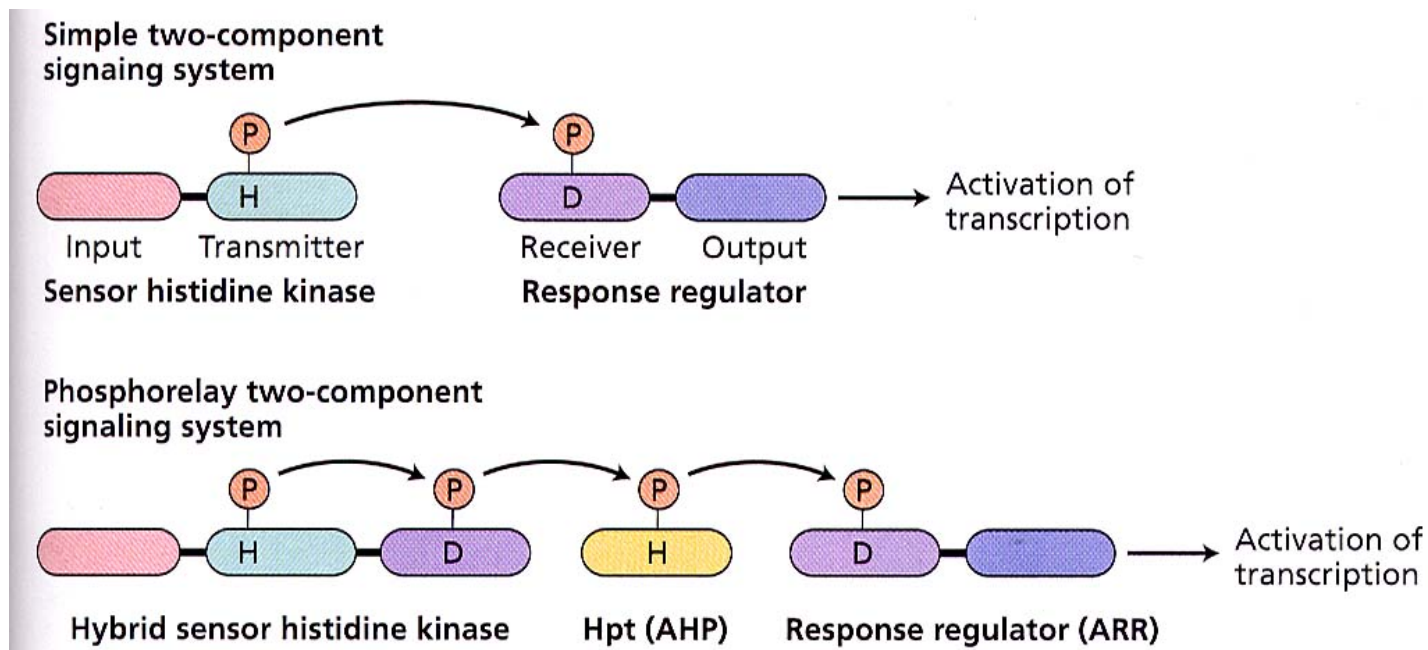


MECCANISMO DI AZIONE

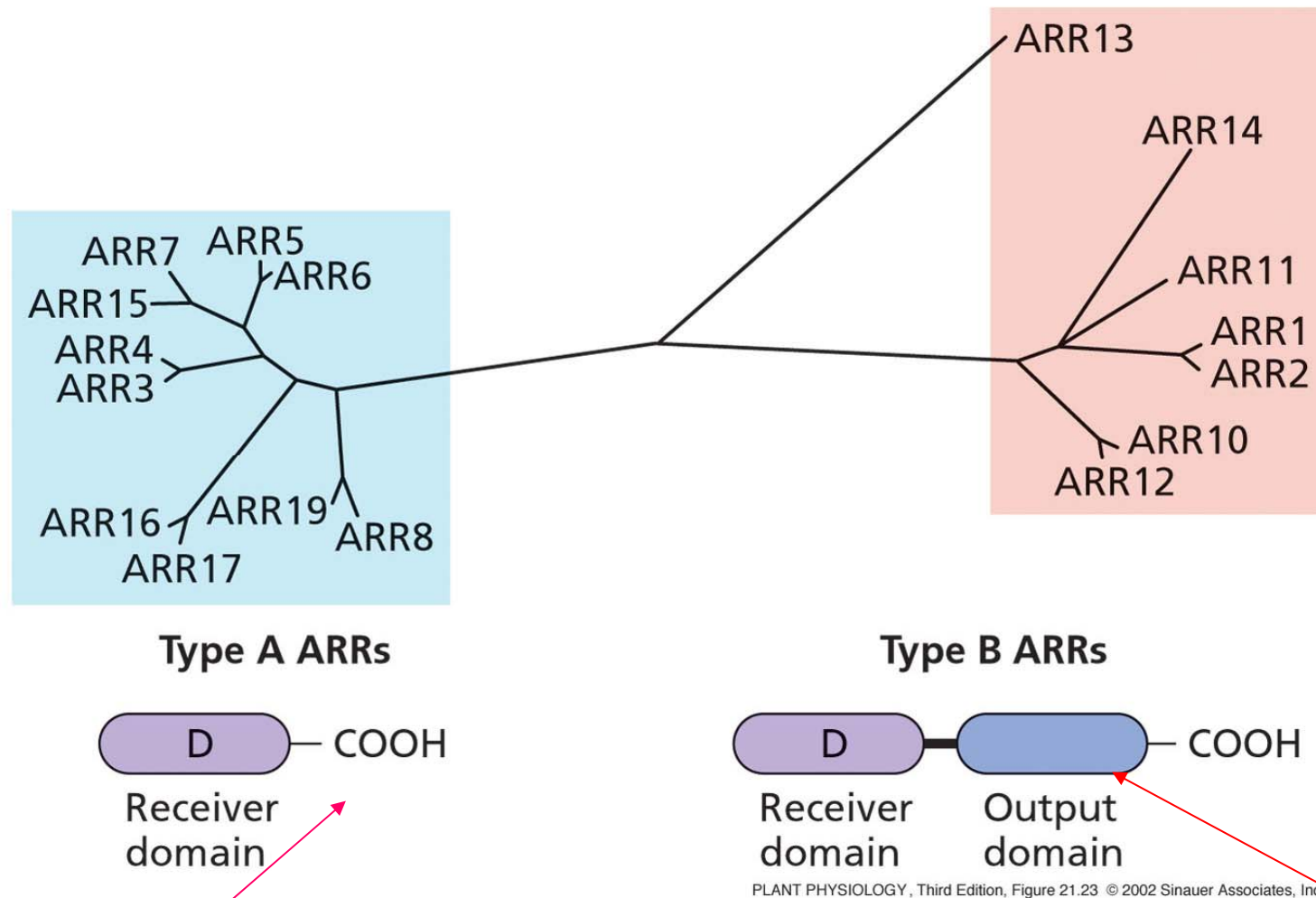
CRE1: RECETTORE DELLE CITOCHININE

omologo alle istidina chinasi BATTERICHE

Nei batteri: sistema a due componenti



Esistono due tipi di proteine ARR con opposte funzioni



**ARR6 reprime le divisioni cellulari
indotte da citokinine**

**ARR2 stimola le divisioni cellulari
Indotte da citokinine**

ARR2 stimola la proliferazione e la formazione di germogli in assenza di citochinine

ARR2 ritarda la senescenza in piante transgeniche (arabidopsis)

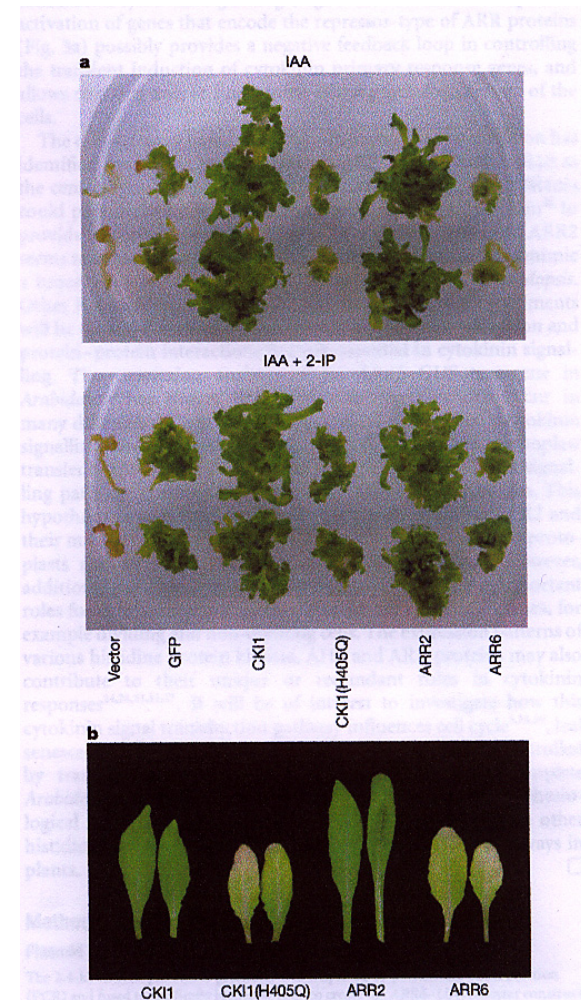
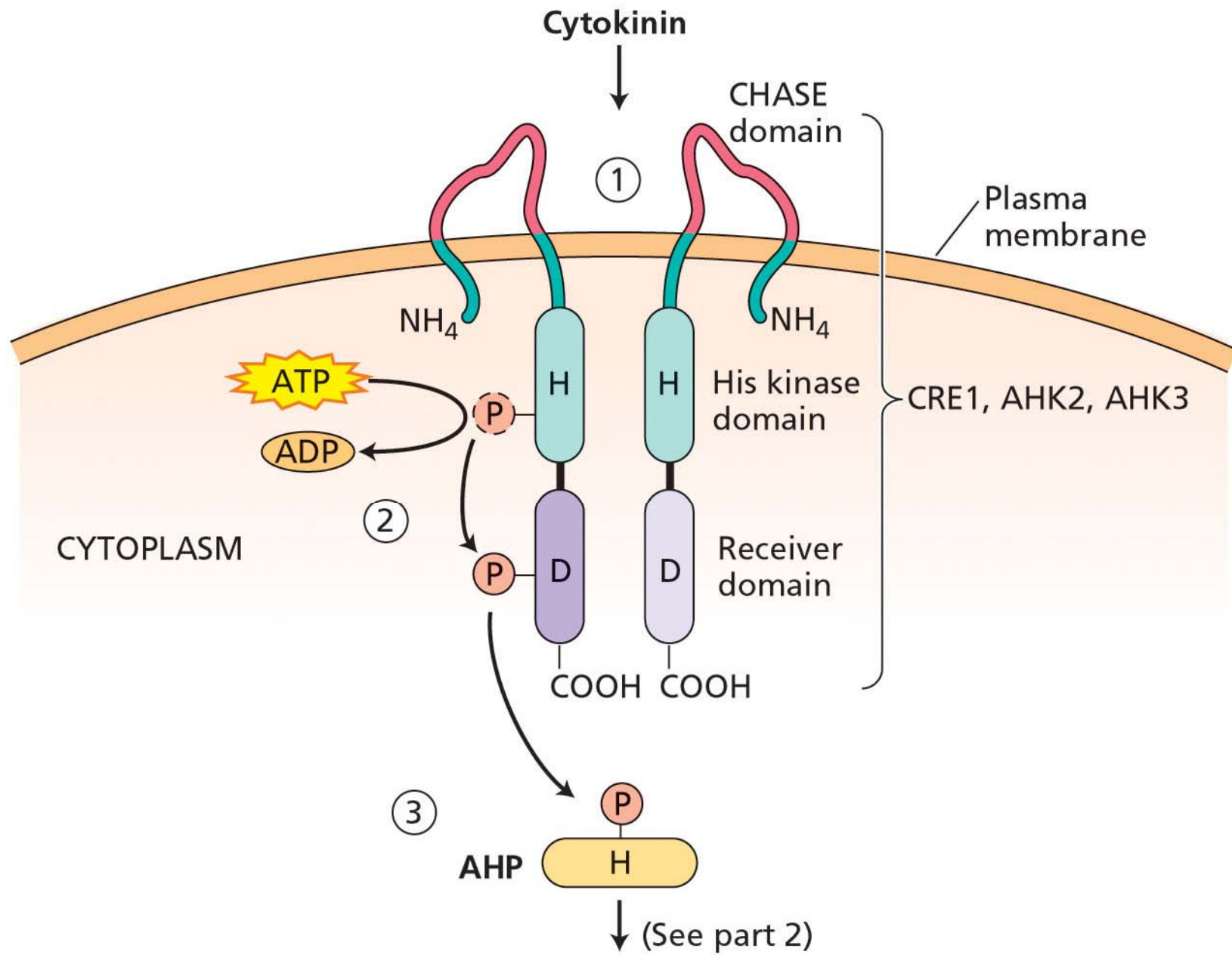
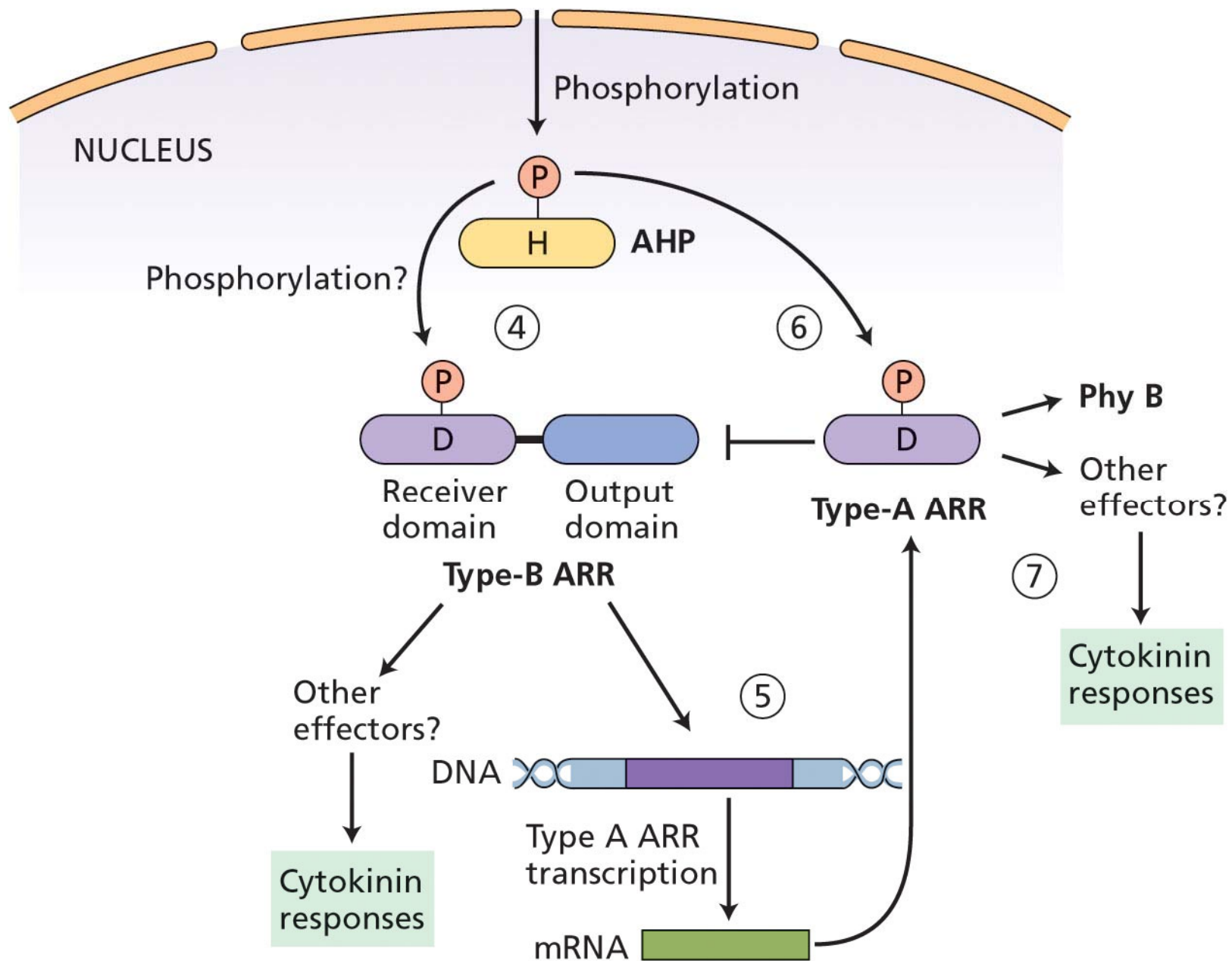


Figure 4 Ectopic expression of ARR2 is sufficient to promote cytokinin responses in transgenic tissues and plants. **a**, ARR2 stimulates cell proliferation and shoot formation in the absence of cytokinin. *Arabidopsis* seedlings were transformed with *Agrobacterium* carrying a binary vector with various constructs, including CK1, CK1(H405Q), ARR2, ARR6 and GFP. Seedlings that were transformed with the *Agrobacterium* carrying the binary vector pCB301 without a bar selection marker were used as a negative control. The transformed seedlings were maintained on the selection medium with auxin (IAA) only (top) or with auxin and cytokinin (2-IP) (bottom) for 14 days. The GFP control showed green callus formation with exogenous IAA but promoted shoot formation with exogenous cytokinin. **b**, Analysis of dark-induced senescence in transgenic *Arabidopsis* plants. The fully expanded fourth leaves from the transgenic plants expressing CK1, CK1(H405Q), ARR2 or ARR6 were detached and floated on distilled water in the dark for 4 days.





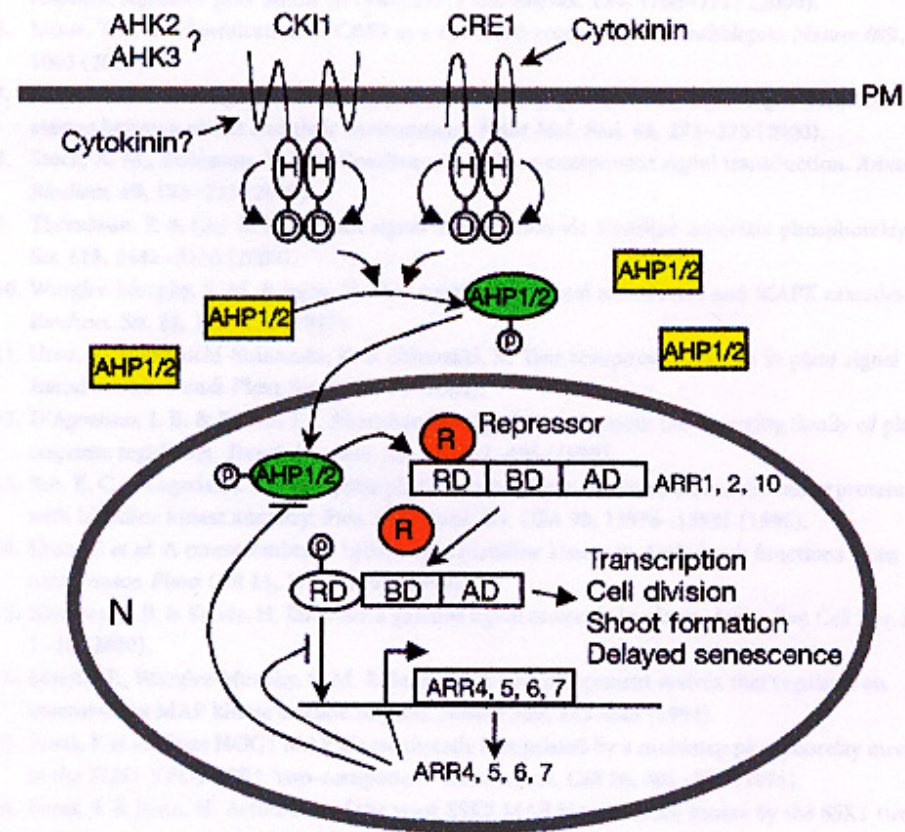
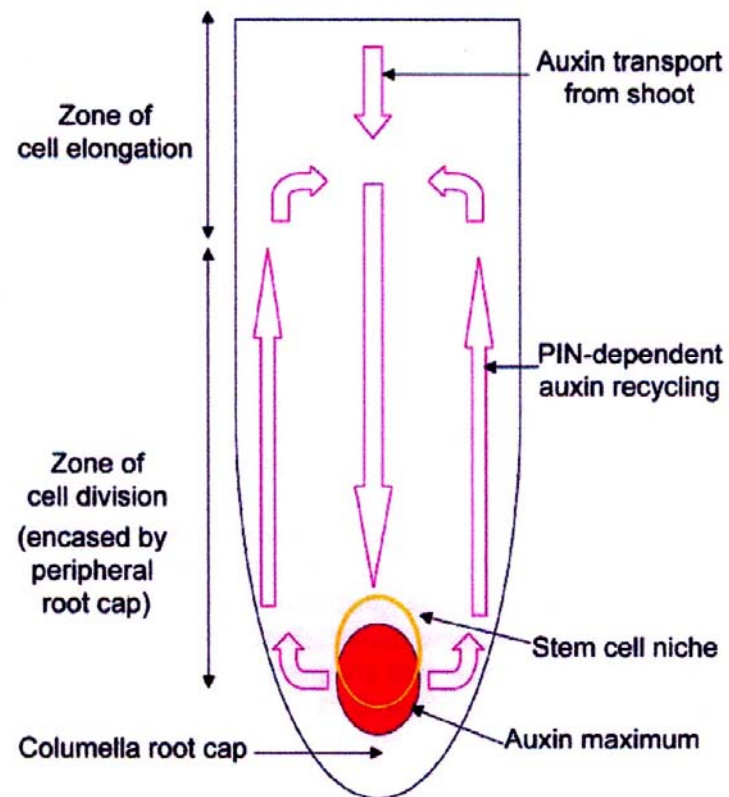


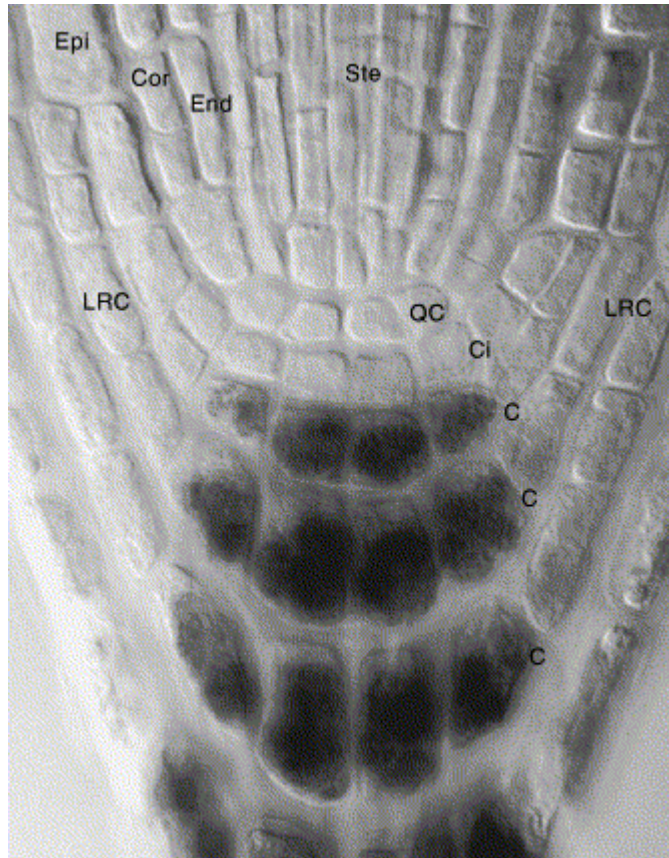
Figure 5 Model of the cytokinin signal transduction pathway in *Arabidopsis*. Cytokinin signal is perceived externally or internally by multiple histidine protein kinases at the plasma membrane. On perception of the cytokinin signal, histidine protein kinases initiate a signalling cascade through the phosphorelay that results in the nuclear translocation of AHP proteins from the cytosol. Activated AHP proteins interact with sequestered ARR proteins or ARR complexes, and release the activation type of ARR proteins from putative repressors in the nucleus. The liberated ARR proteins bind to multiple *cis* elements in the promoter of target genes. The transcription activation is essential for cell proliferation, shoot formation and delayed leaf senescence. Activation of the repressor-type of *ARR* genes as cytokinin primary response genes provides a negative feedback mechanism. RD, response domain; BD, DNA-binding domain; AD, transcription activation domain; PM, plasma membrane; N, nucleus; R, putative repressor; H, histidine; D, aspartate.

FORMAZIONE DEL MERISTEMA APICALE DELLA RADICE

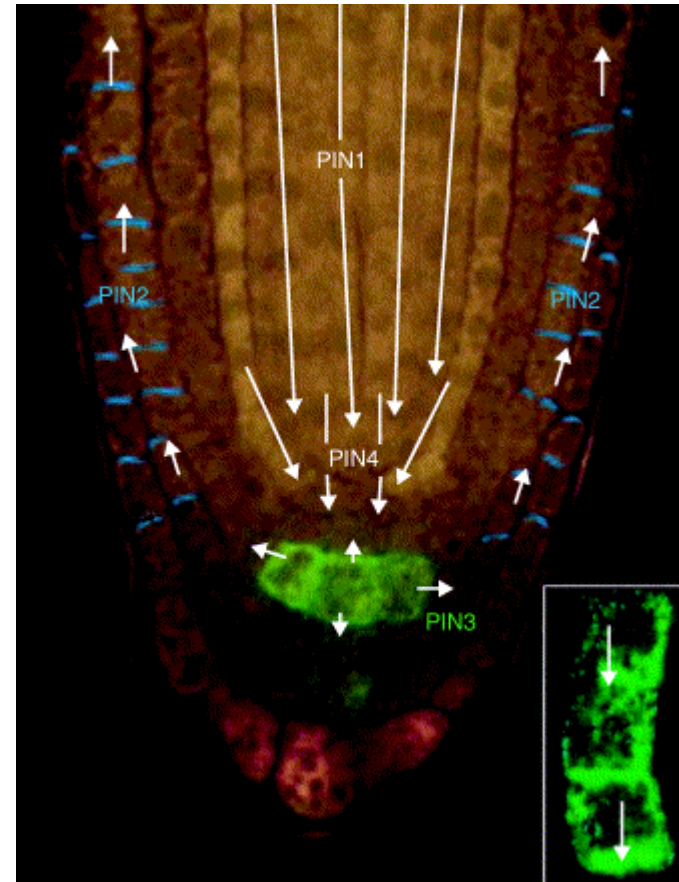
La determinazione del meristema apicale radicale è generata da alti livelli di IAA nella regione basale del proembrione

Elevati livelli di IAA sono causati dal trasporto polare di IAA mediato dalle proteine PIN





Current Opinion in Plant Biology



Current Opinion in Plant Biology

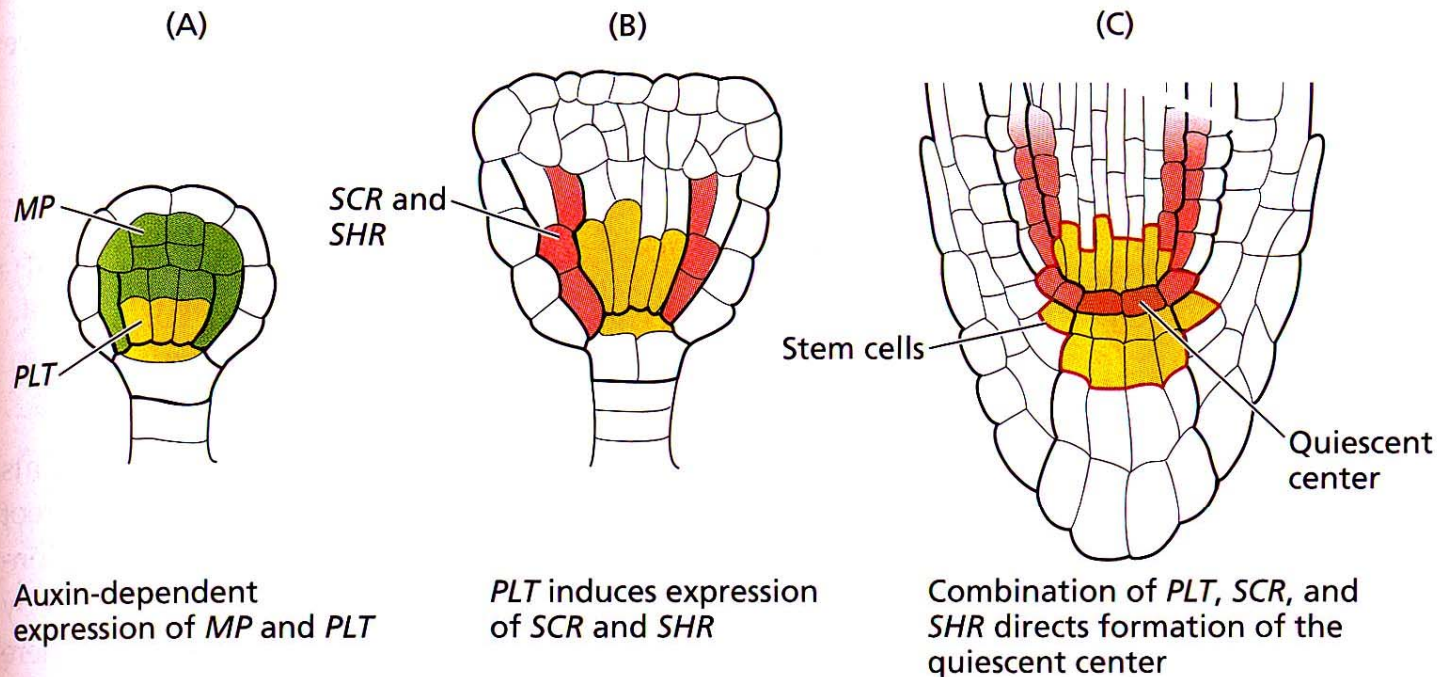
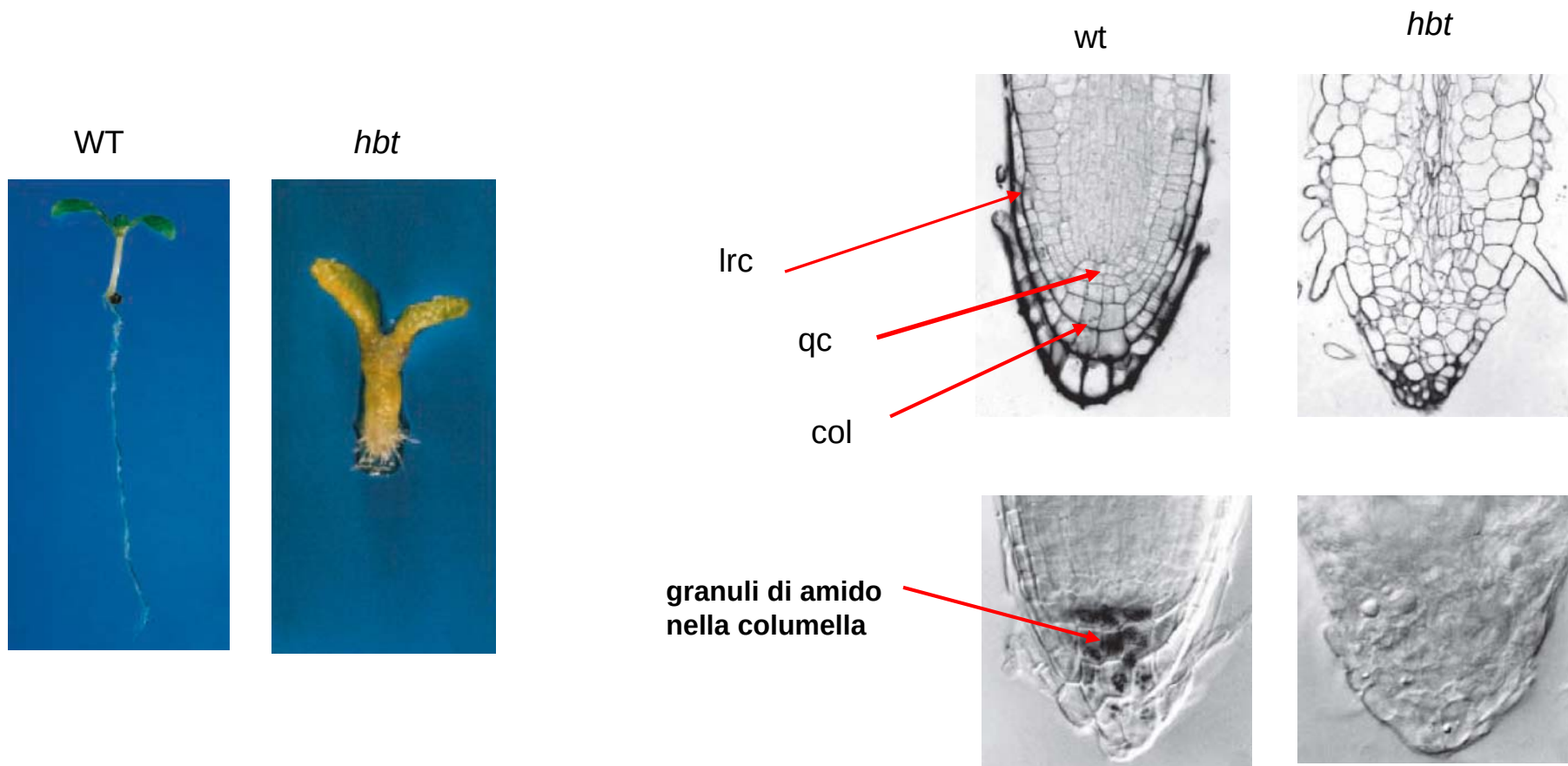


FIGURE 16.26 Model for the specification of stem cell identity in the root. (A) Early auxin-dependent expression of the *MONOPTEROS* (*MP*) and *NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 4* (*NPH4*) genes. *MP* and *NPH4* expression promote *PLETHORA* (*PLT*) expression in a basal domain. (B) *PLT* expression promotes the expression of *SCARECROW* (*SCR*) and *SHORTROOT* (*SHR*). (C) The combination of *PLT*, *SCR*, and *SHR* gene expression directs centrally positioned cells to become the quiescent center, which signals surrounding cells to maintain their stem cell activity. (After Aida et al. 2004.)

Mutanti *HOBBIT* (*HBT*):

Il gene *HOBBIT* può essere considerato un marcatore precoce del **meristema radicale**

I mutanti *hbt* mostrano difetti nella formazione della radice embrionale, (non si forma il centro quiescente, la columella e le cellule laterali della cuffia)



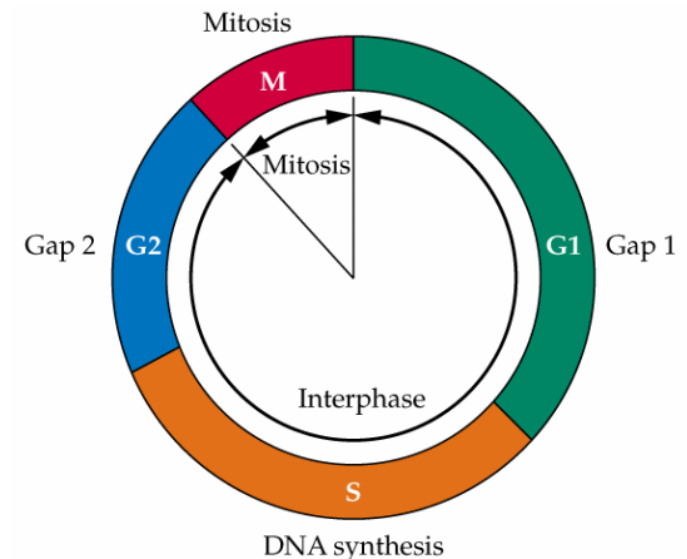
Funzione del gene *HOBBIT* (*HBT*):

È un omologo di CDC27 una subunità dell'APC
(anaphase promoting complex)

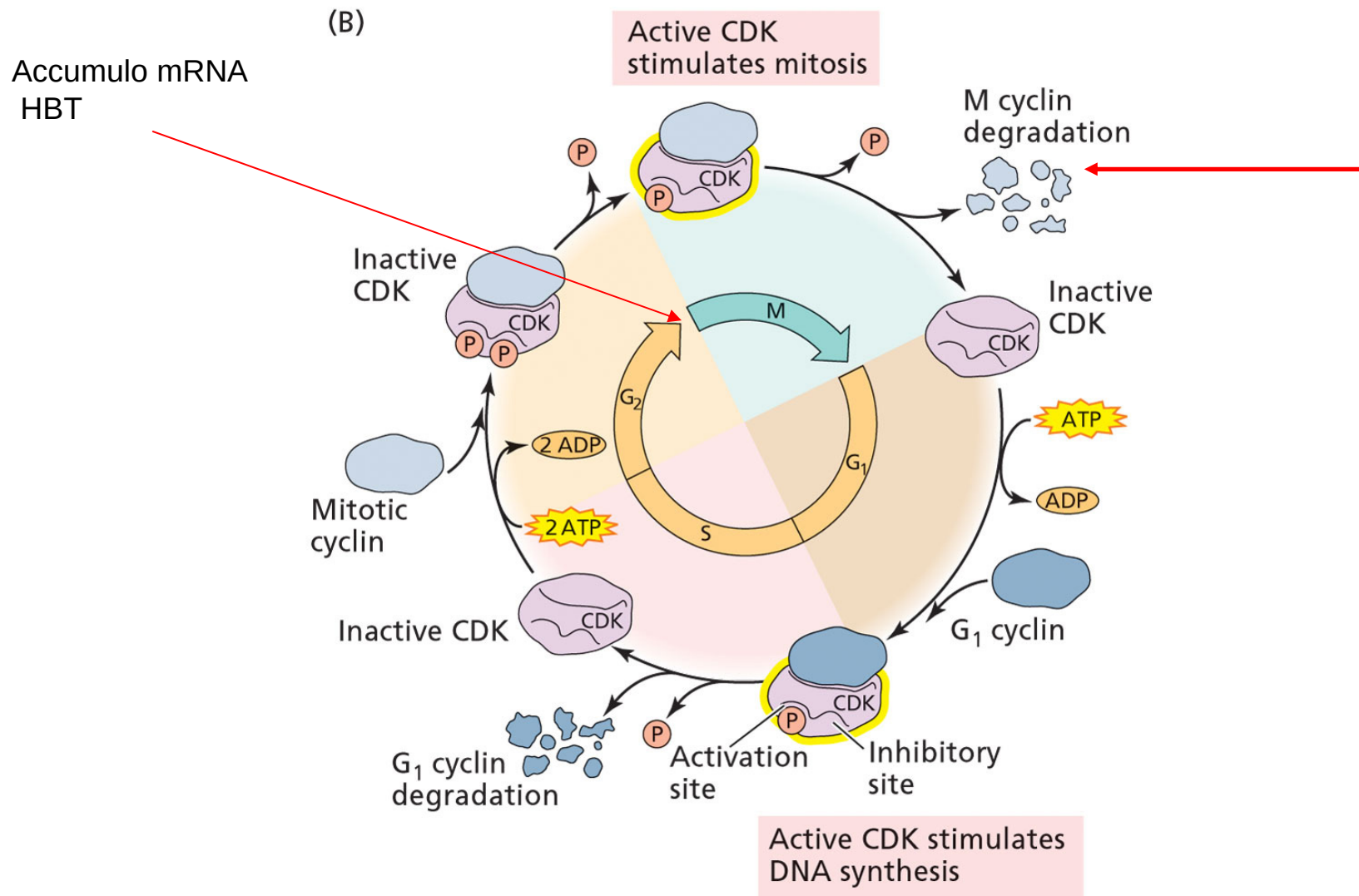
APC promuove il passaggio nella fase M del ciclo cellulare
attraverso la degradazione (proteosoma) di cicline

APC è una ubiquitina ligasi (enzima E3)

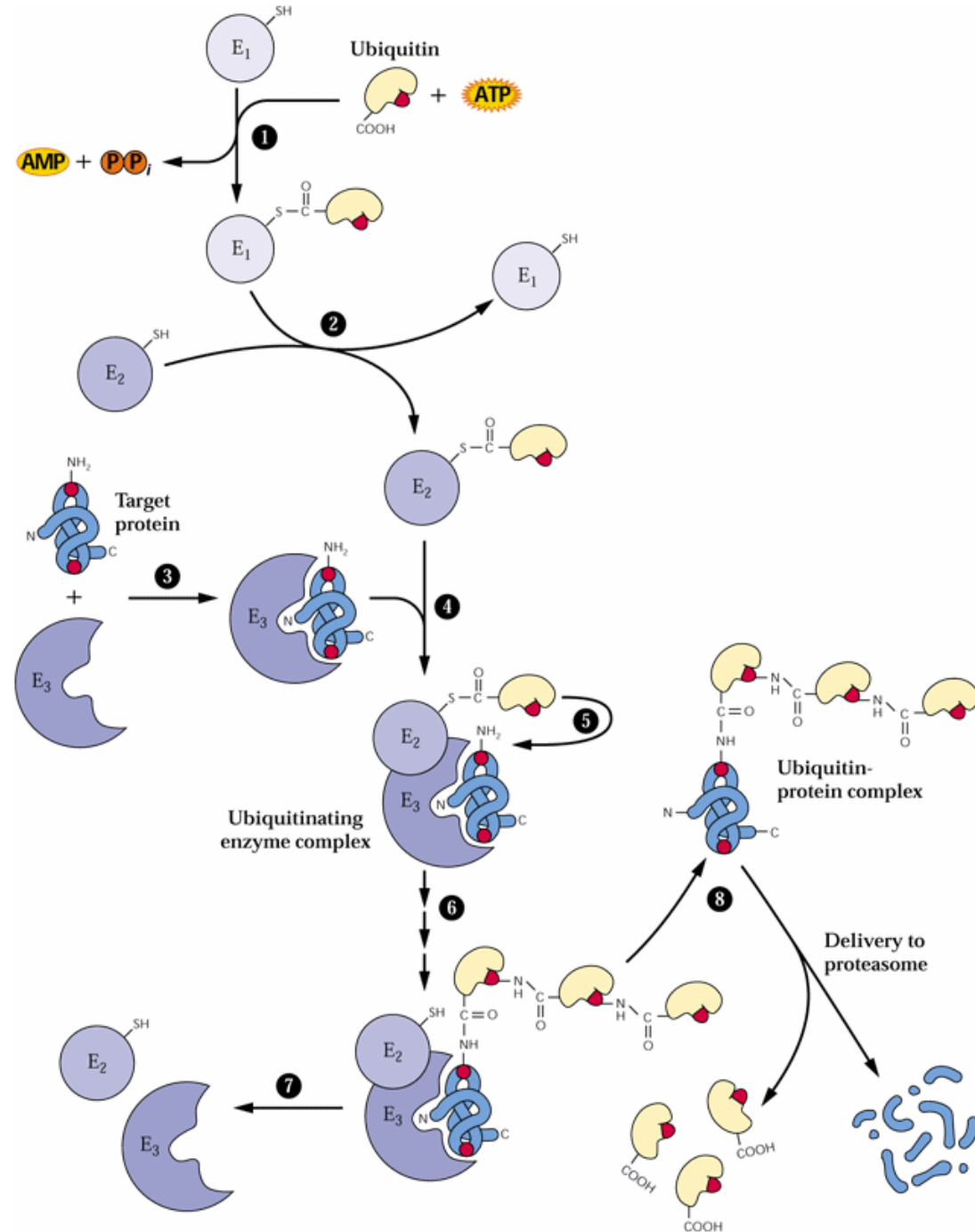
CDC27 è un enzima E2-C (enzima che coniuga l'ubiquitina)



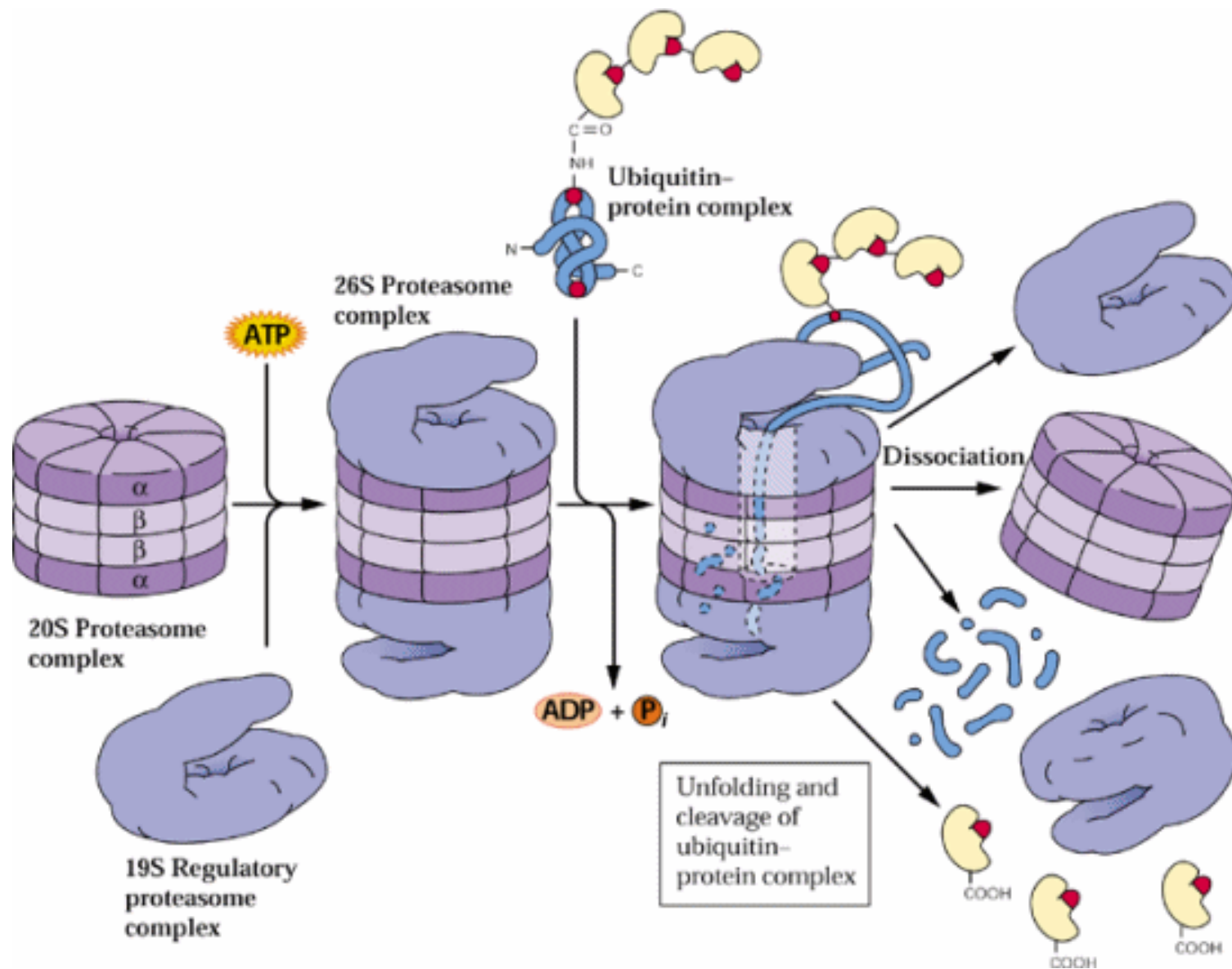
Regolazione del ciclo cellulare da parte delle CDK



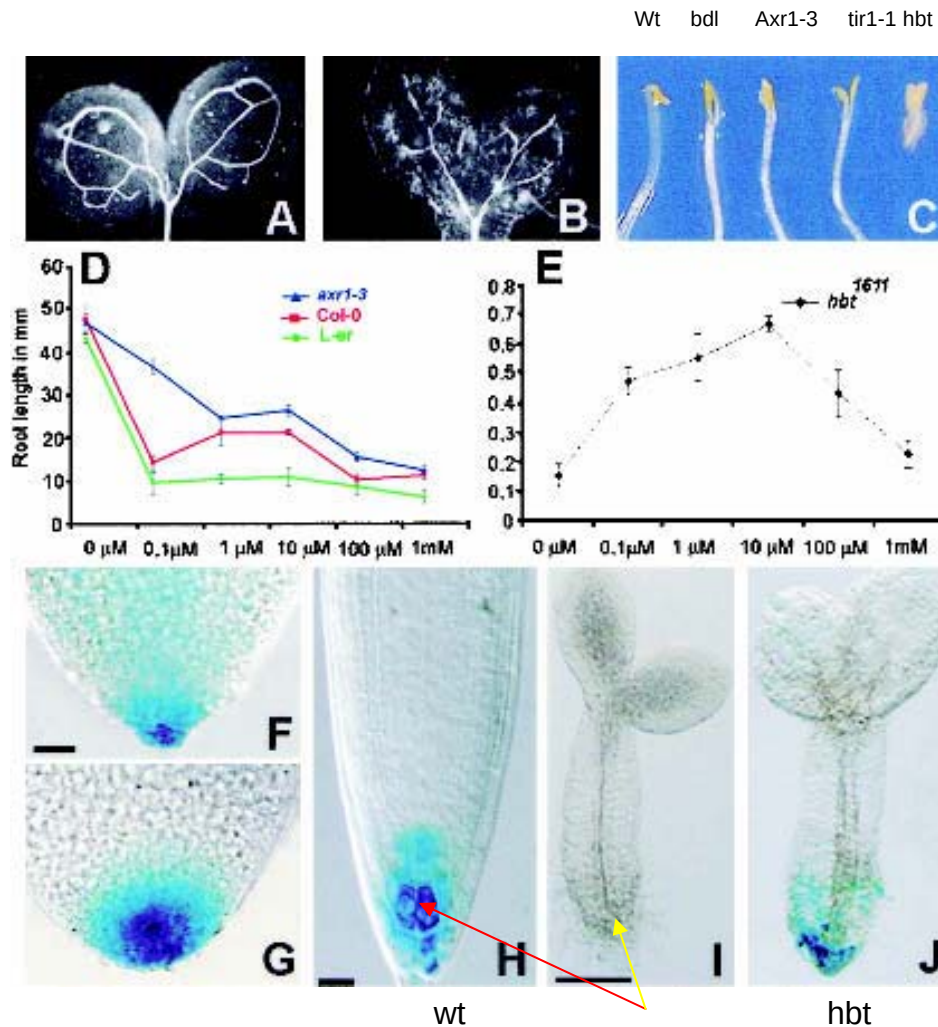
Sistema dell'ubiquitina



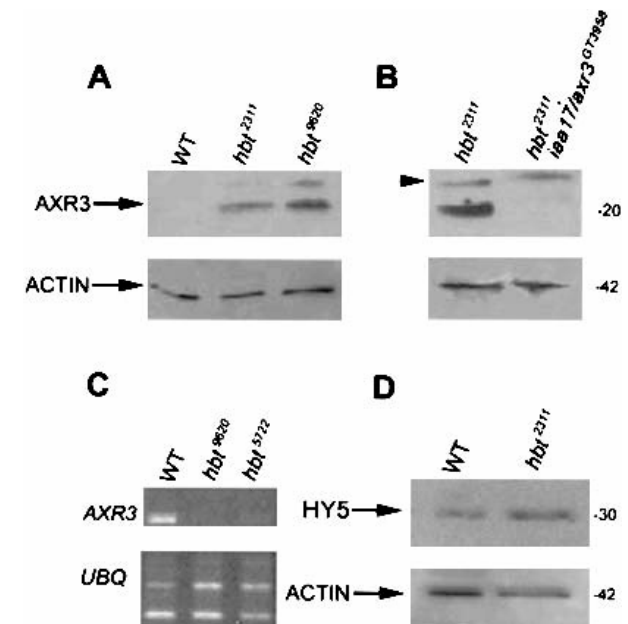
II Proteosoma



I mutanti *hobbit* mostrano una riduzione nella sensibilità alla auxina (IAA)
e accumulano la proteina AXR3/IAA17, repressore della risposta all'auxina



A;B) Differenziamento vascolare incompleto
C) Mancanza uncino
D;E) inibizione crescita radicale
F-J) espressione del gene reporter per IAA
DR5::GUS



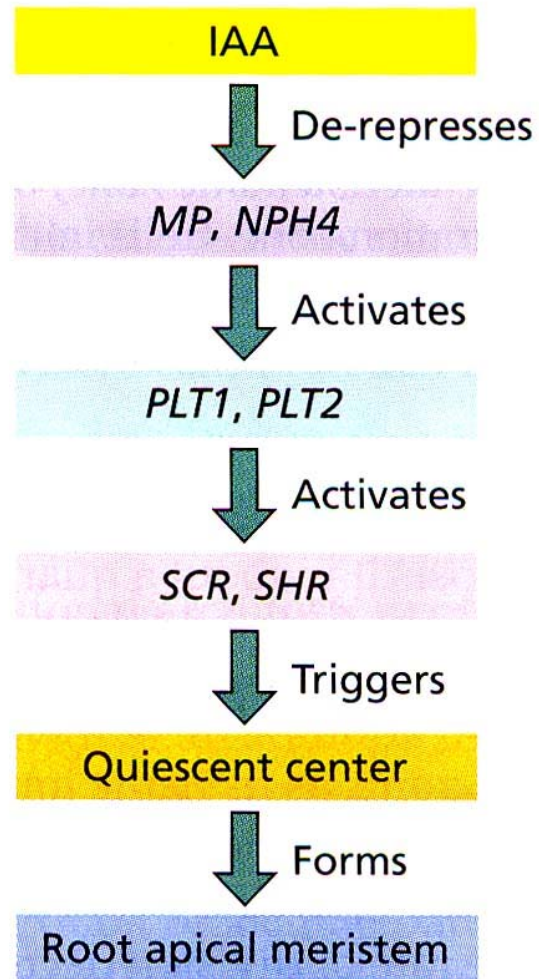


FIGURE 16.27 During embryogenesis, auxin stimulates root formation via several intermediate steps. The diagram illustrates the hierarchy of genes involved in organogenesis.

LA RADICE

Aspetto affusolato, il meristema non produce organi laterali

Funzione di penetrazione nel suolo

Le radici laterali si formano in regioni mature in cui la crescita è terminata

4 ZONE DI SVILUPPO

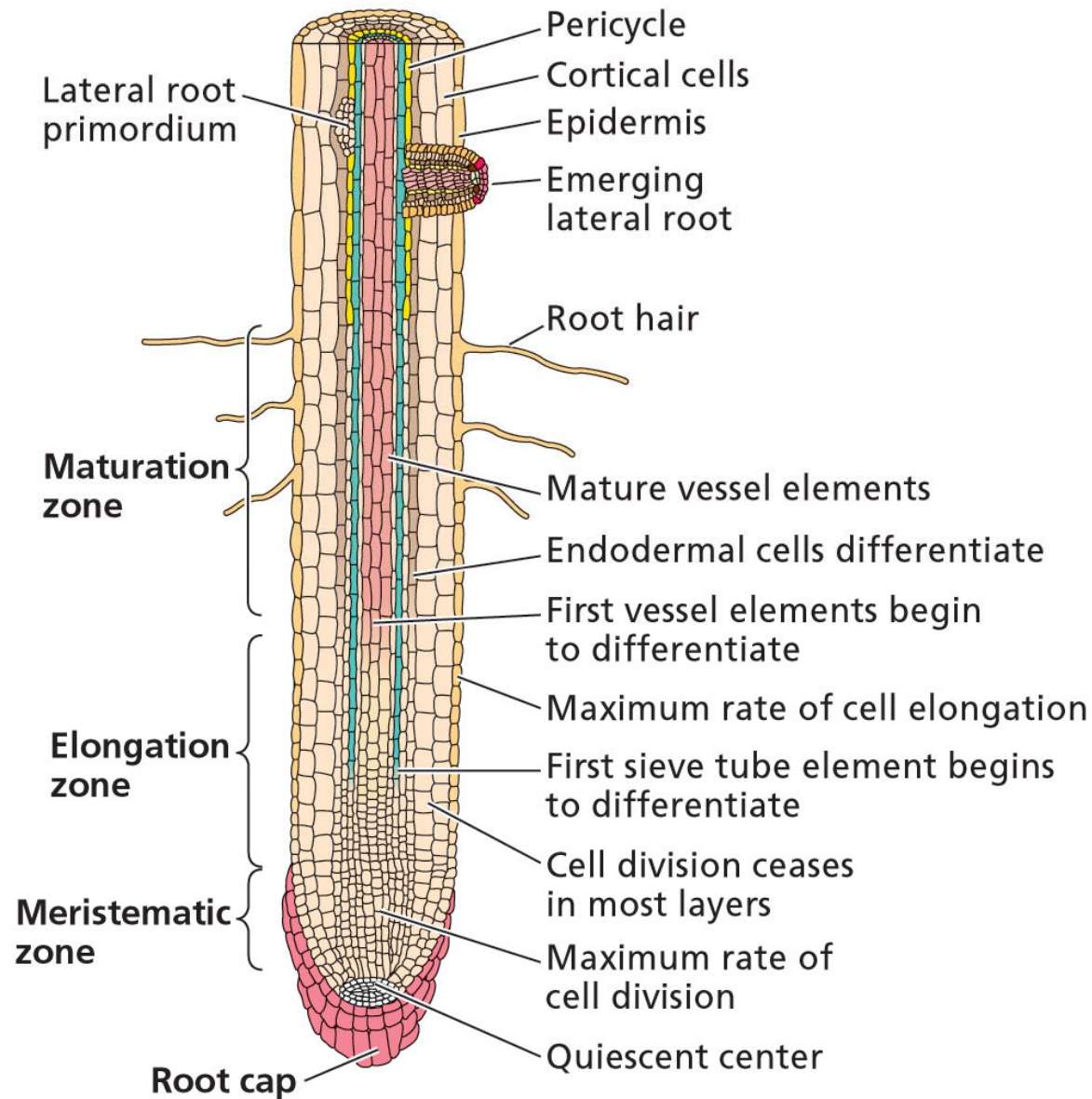
➤ CUFFIA: protegge il meristema apicale; le cellule della cuffia si formano da iniziali specializzate. Percezione dello stimolo gravitazionale

➤ ZONA MERISTEMATICA: Situata sotto la cuffia, genera solo un organo la radice primaria

➤ ZONA DI ALLUNGAMENTO: zona di allungamento cellulare. La velocità di divisione decresce progressivamente, all'aumento della distanza dal meristema

➤ ZONA DI MATURAZIONE: le cellule acquisiscono le loro caratteristiche finali. Cessate divisioni e allungamento cellulare. Appare evidente il pattern radiale.

STRUTTURA DELLA RADICE



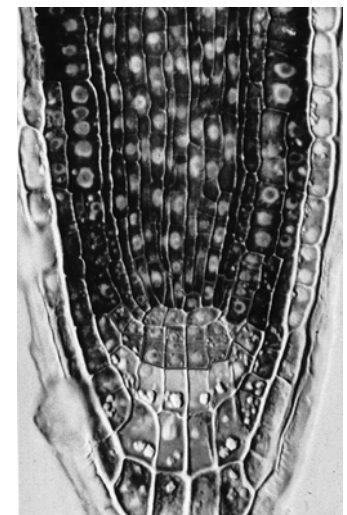
LE CELLULE INIZIALI MERISTEMATICHE GENERANO LUNGHE FILE DI CELLULE

CELLULE CHE DERIVANO DALLA STESSA LINEA CLONALE

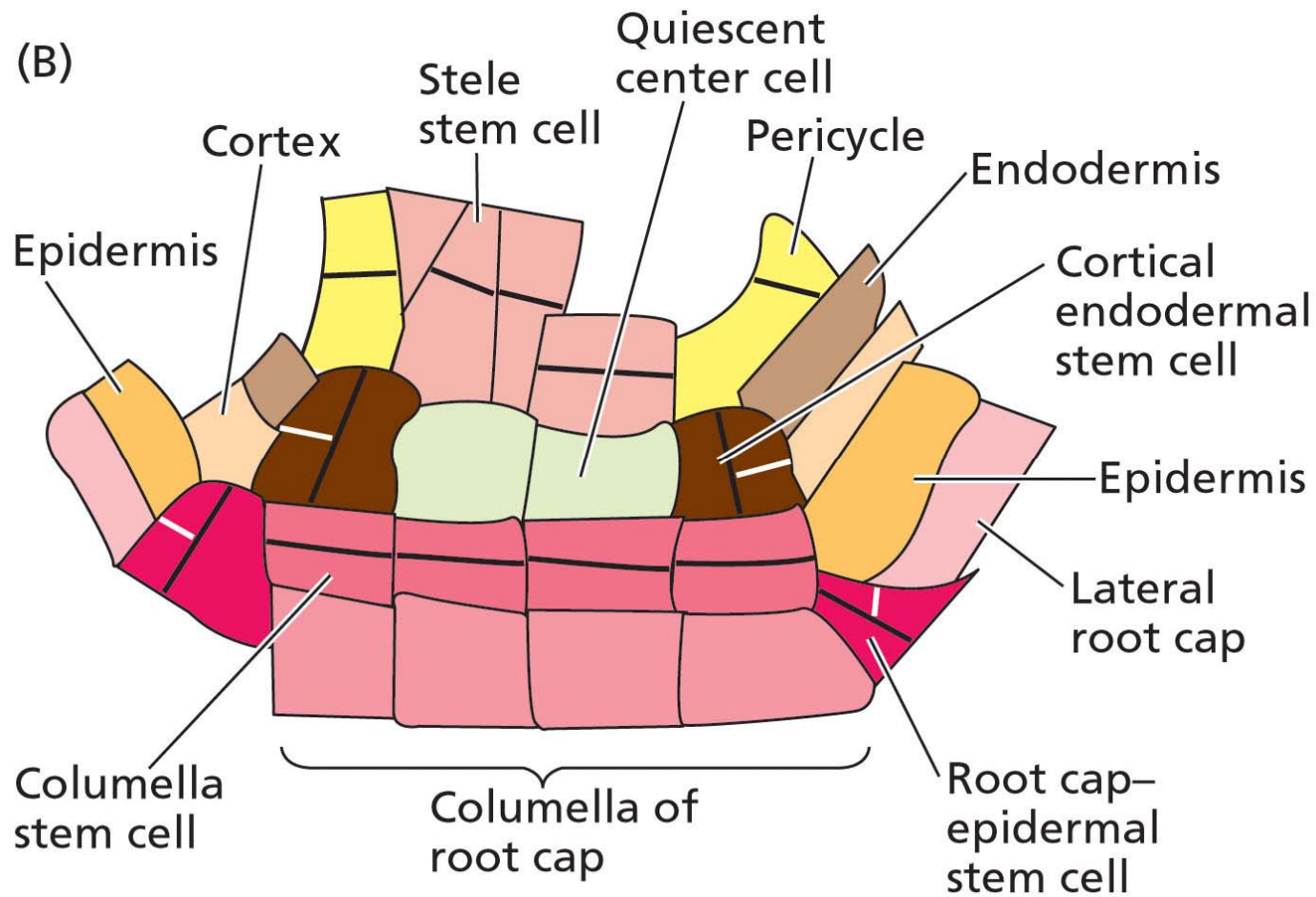
IN TEORIA SI POTREBBE RINTRACCIARE LA CELLULA MERISTEMATICA DA CUI SI ORIGINA UNA SINGOLA CELLULA MATURA

DOVUTO al fatto che nella radice le divisioni sono per lo più anticlinali (trasversali all'asse della radice) in modo da produrre un aumento di lunghezza
Poche divisioni periclinali (aumento del diametro della radice)

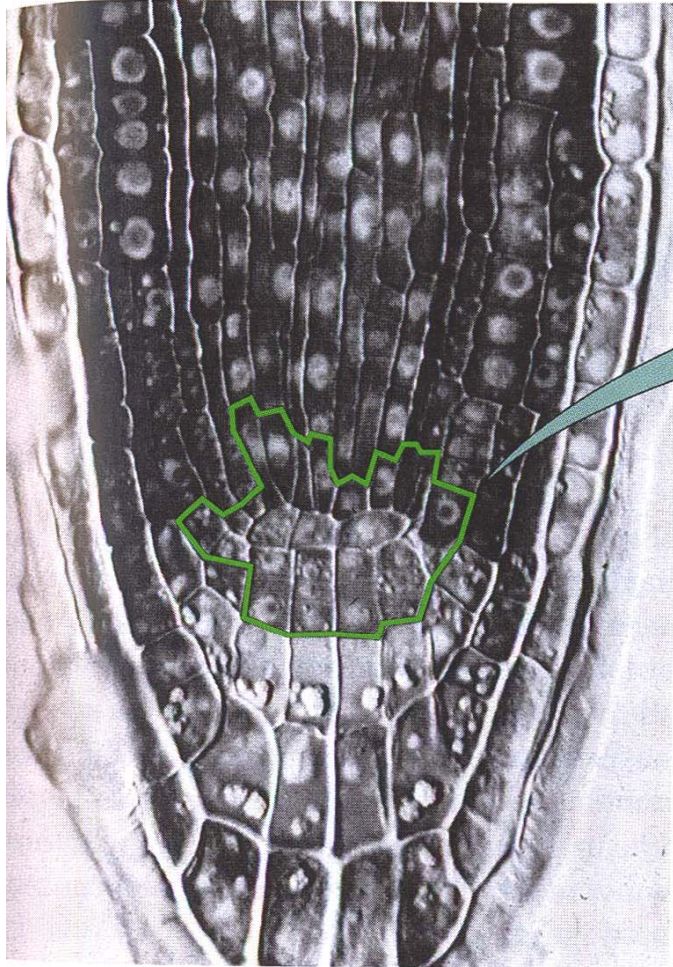
Le divisioni periclinali hanno luogo soprattutto nell'apice radicale e generano nuove file di cellule



IL MERISTEMA APICALE DELLA RADICE CONTIENE DIVERSI TIPI DI CELLULE INIZIALI



(A)



(B)

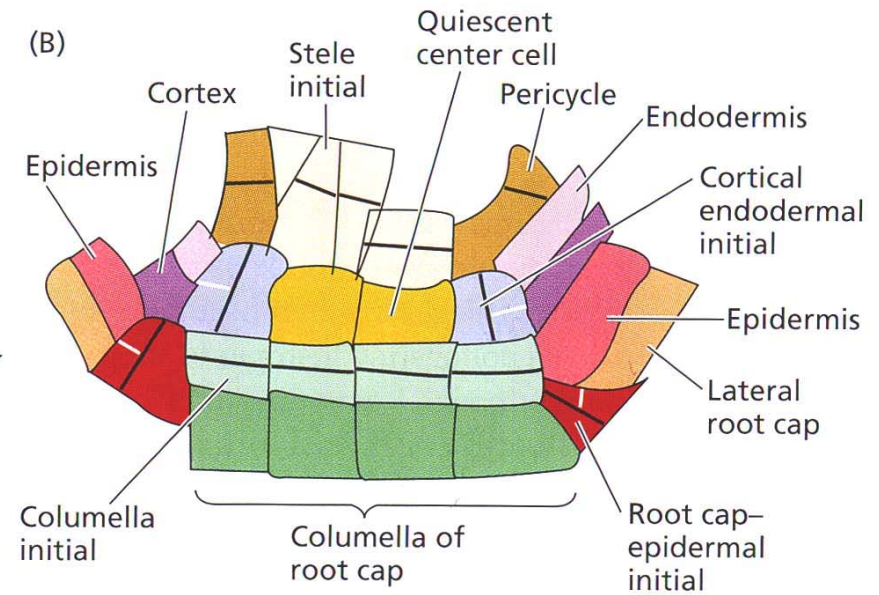


FIGURE 16.29 All the tissues in the *Arabidopsis* root are derived from a small number of stem cells in the root apical meristem. (A) Longitudinal section through the center of a root. The promeristem containing the stem cells that give rise to all the tissues of the root is outlined in green. (B) Diagram of the promeristem region outlined in A. Only two of the four quiescent-center cells are depicted in this section. The heavier black lines indicate the cell division planes that occur in the stem cells. White lines indicate the secondary cell divisions that occur in the cortical-endodermal and lateral root cap-epidermal stem cells. (A from Schiefelbein et al. 1997, courtesy of J. Schiefelbein, © the American Society of Plant Biologists, reprinted with permission.)

Arabidopsis

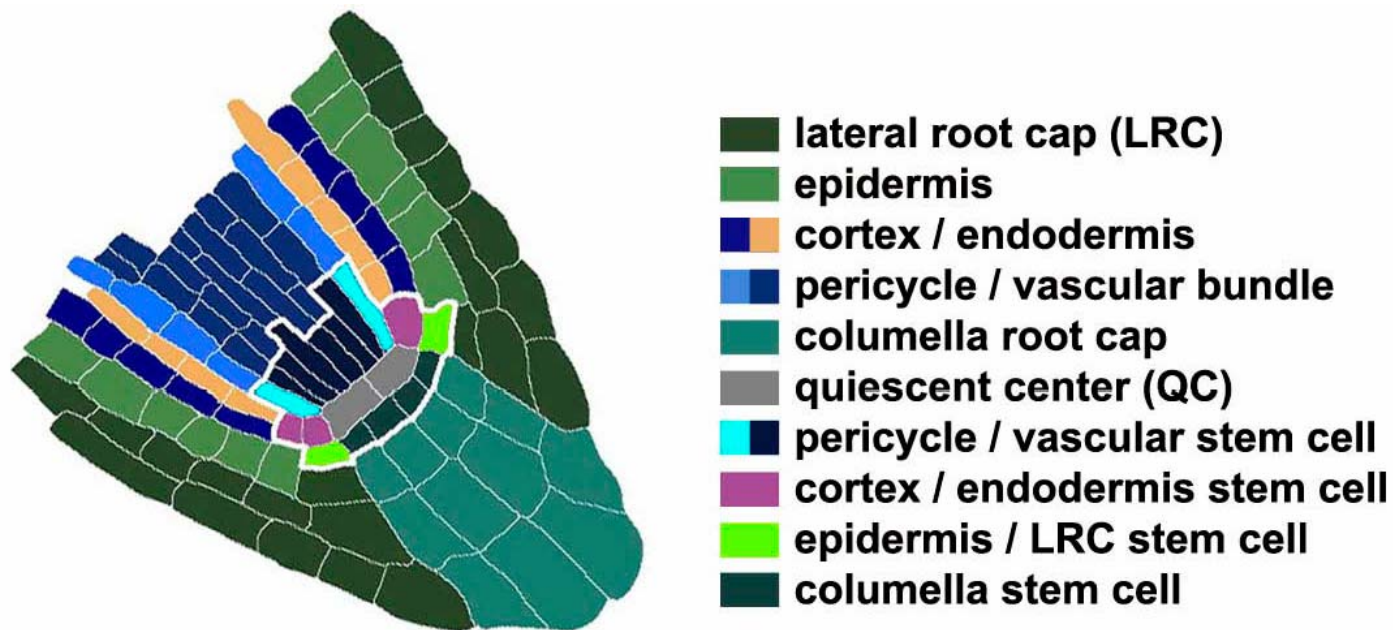
CENTRO QUIESCENTE: composto da quattro cellule. Possono generare le iniziali Meristematiche durante l'embriogenesi. Dopo l'embriogenesi non si dividono

INIZIALI DEL CORTEX/ENDODERMIDE: anello che circonda il centro quiescente: Danno luogo a una divisione anticlinale e poi a divisioni periclinali generando le file di cellule che differenzieranno in cortex ed endoderme.

INIZIALI DELLA COLUMELLA: cellule situate sopra il centro quiescente. Si dividono anti e periclinamente per generare la columella (settore della cuffia)

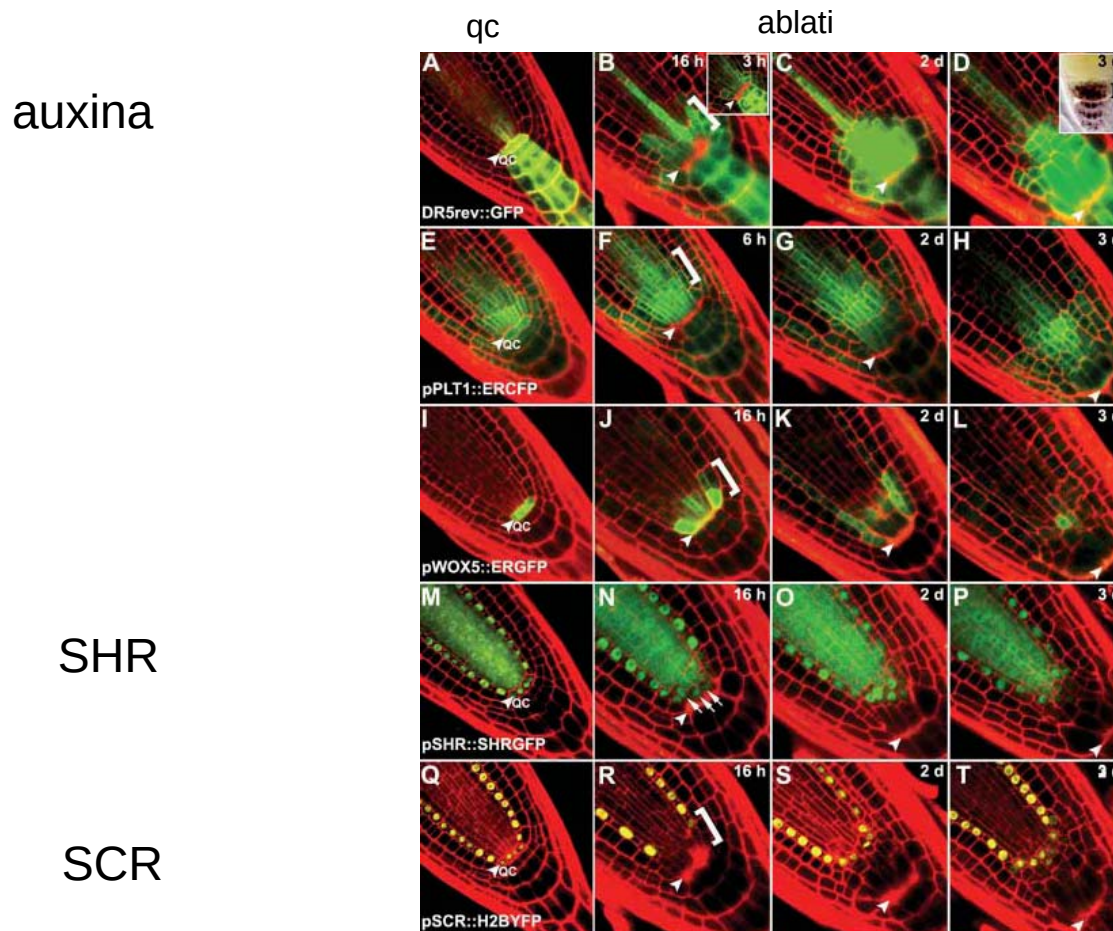
INIZIALI DELLA CUFFIA/EPIDERMIDE: formano un anello che circonda la columella Danno luogo a divisioni anticlinali che generano le cellule dell'epidermide. Oppure a divisioni prima periclinali e poi anticlinali per generare le cellule laterali della Cuffia.

RAM produce cellule della cuffia dal lato distale e diversi tipi cellulari dal lato prossimale
Il CQ (cellule mitoticamente inattive)-necessario per il mantenimento delle iniziali -
si trova tra le due popolazioni di cellule iniziali

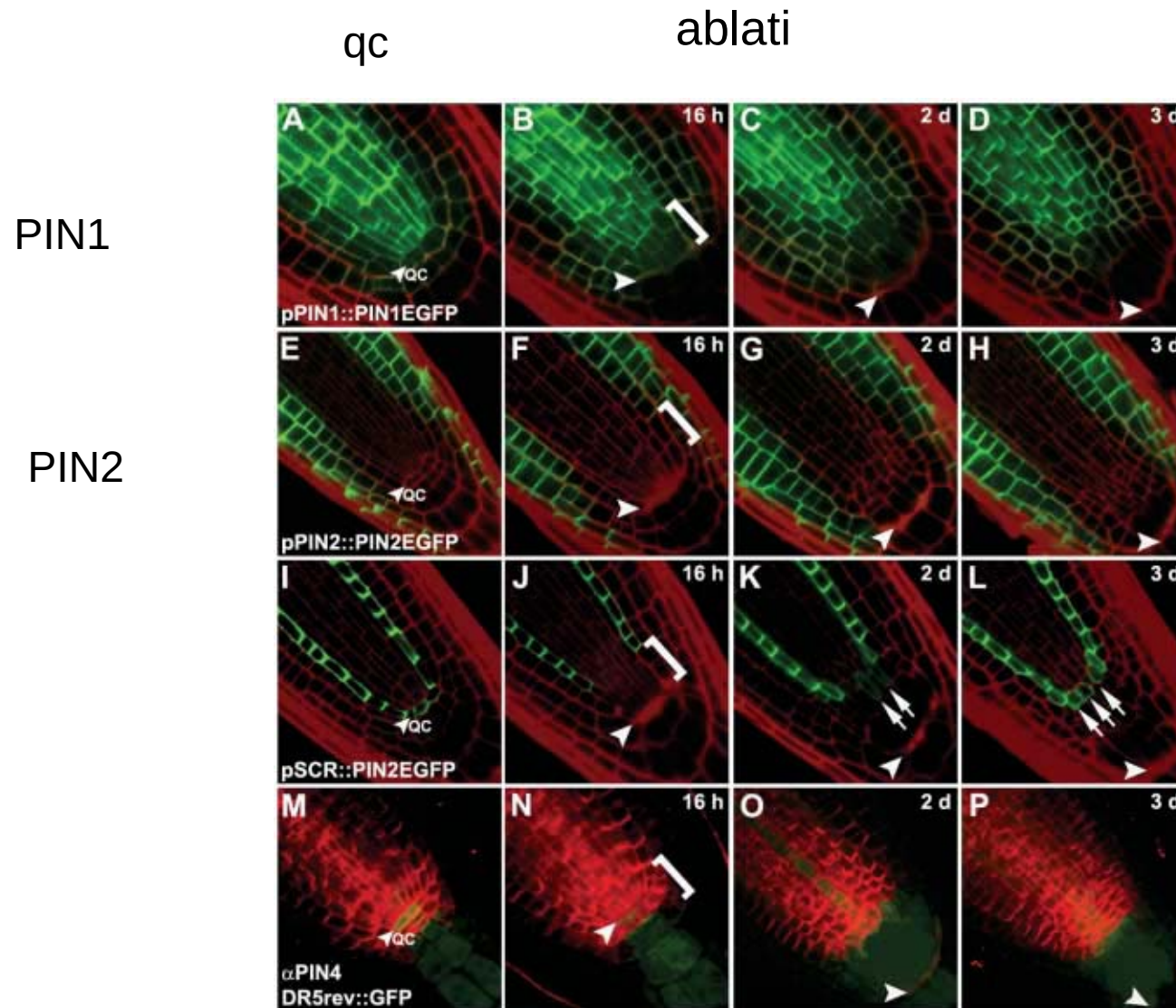


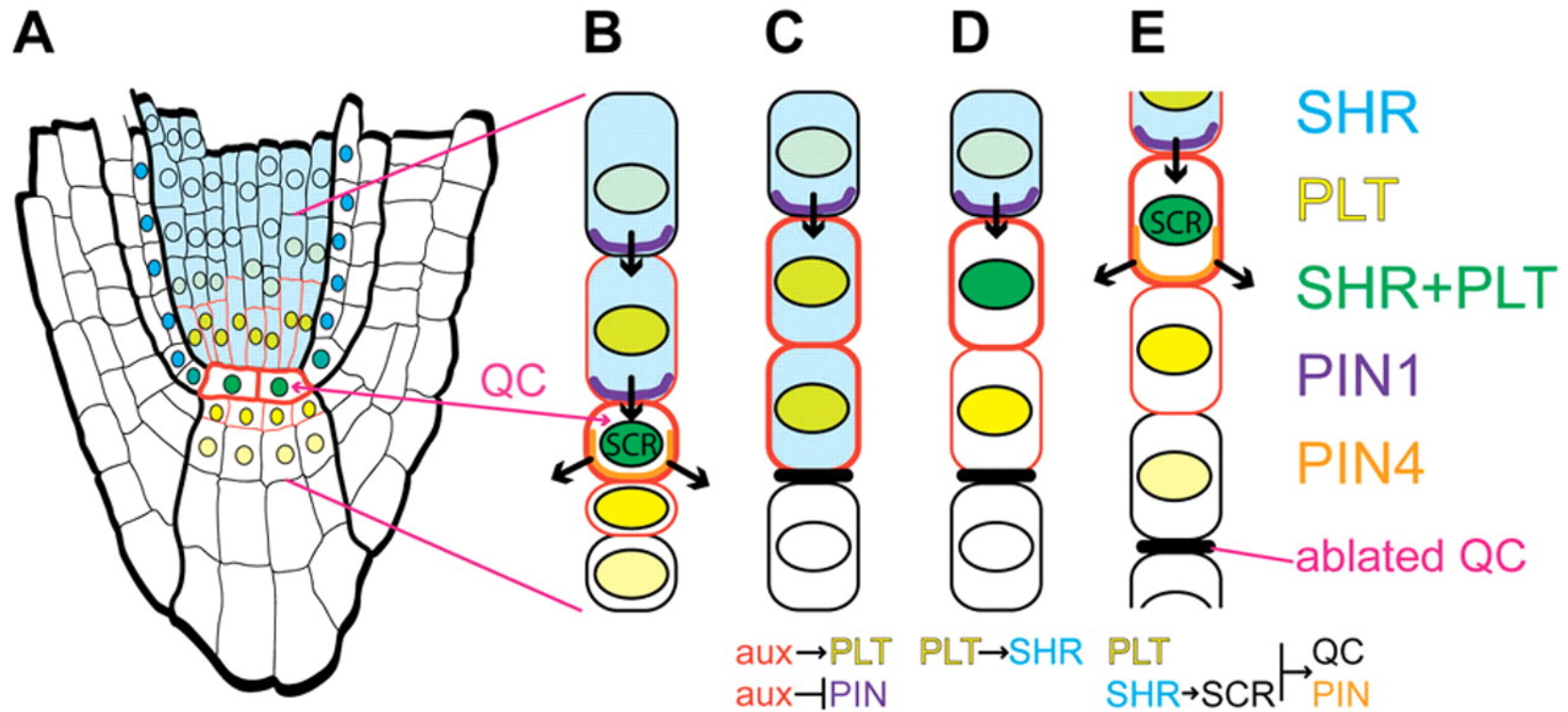
Esperimenti di rigenerazione in radici di arabidopsis mediante ablazione con laser del centro quiescente

- alterazione dei flussi auxinici
- espressione dei geni SHR SCR (PLETHORA)
- regolazione della espressione e localizzazione dei carrier auxinici PIN
- rispecificazione del centro quiescente e degli altri tipi cellulari



SCR e SHR influenzano l'espressione e la localizzazione dei carrier di efflusso dell'auxina (PIN1 PIN2)





Ablazione: shift gradiente auxinico; espressione PLT; inibizione espressione PIN;
Loc nucleare di SHR; promozione espressione SCR

Maturazione dell'embrione

Maturazione dell'embrione

L'embrione di *arabidopsis* entra in dormienza dopo aver generato circa 20.000 cellule

Si ha perdita di acqua e l'arresto di trascrizione e sintesi proteica non solo nell'embrione ma in tutto il seme

Per l'adattamento alle particolari condizioni della dormienza è necessaria l'espressione di geni specifici

L'espressione di tali geni è controllata dall'acido abscissico (ABA)

FUSCA3

ABI3

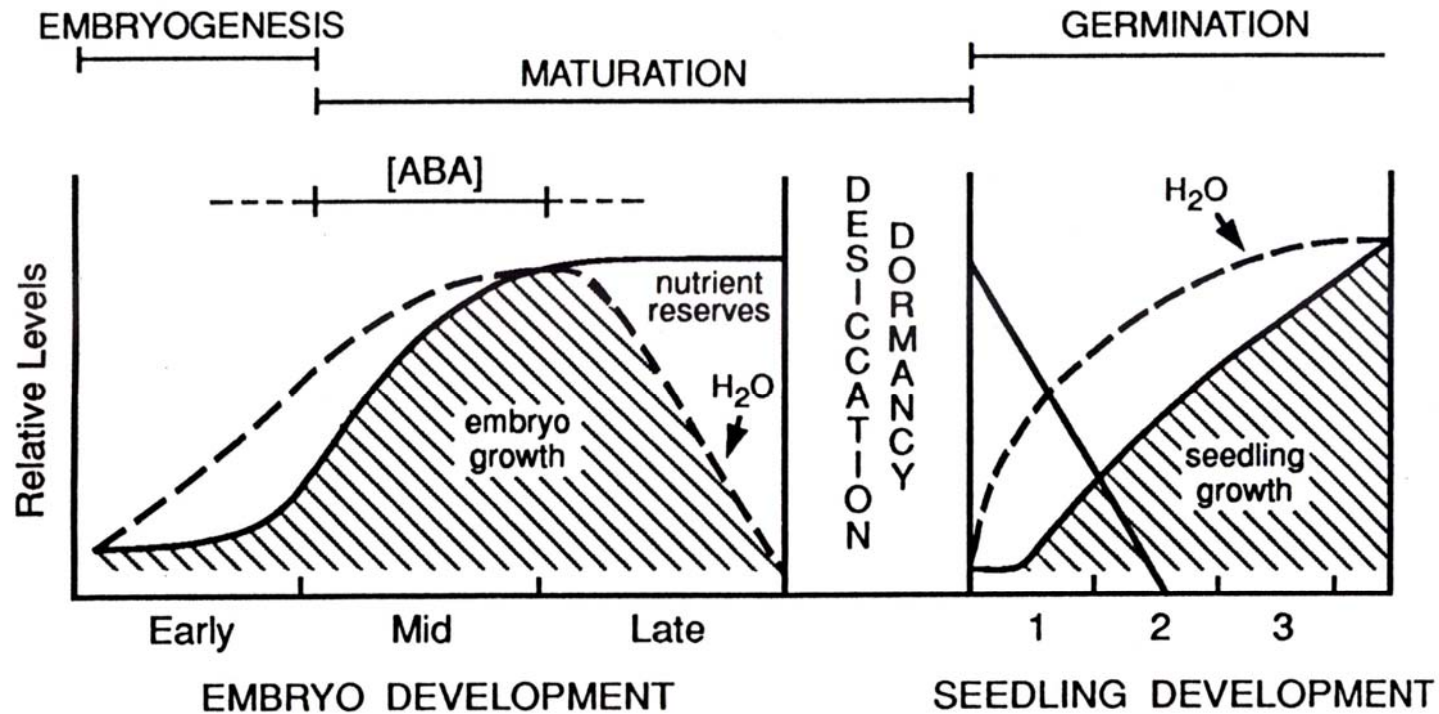


Fig. 1. A generalized graph showing the relative levels of nutrient reserves, water content and growth during the embryogenic, maturation and germination stages of embryo and seedling development. Time periods of embryo development vary with species and are not included. Times stated for seedling development are in days. Desiccation separates the end of maturation from the initiation of seedling growth; dormancy is not found in all species. High ABA levels are temporally correlated with the onset of maturation and prevention of precocious germination during mid-embryo development.

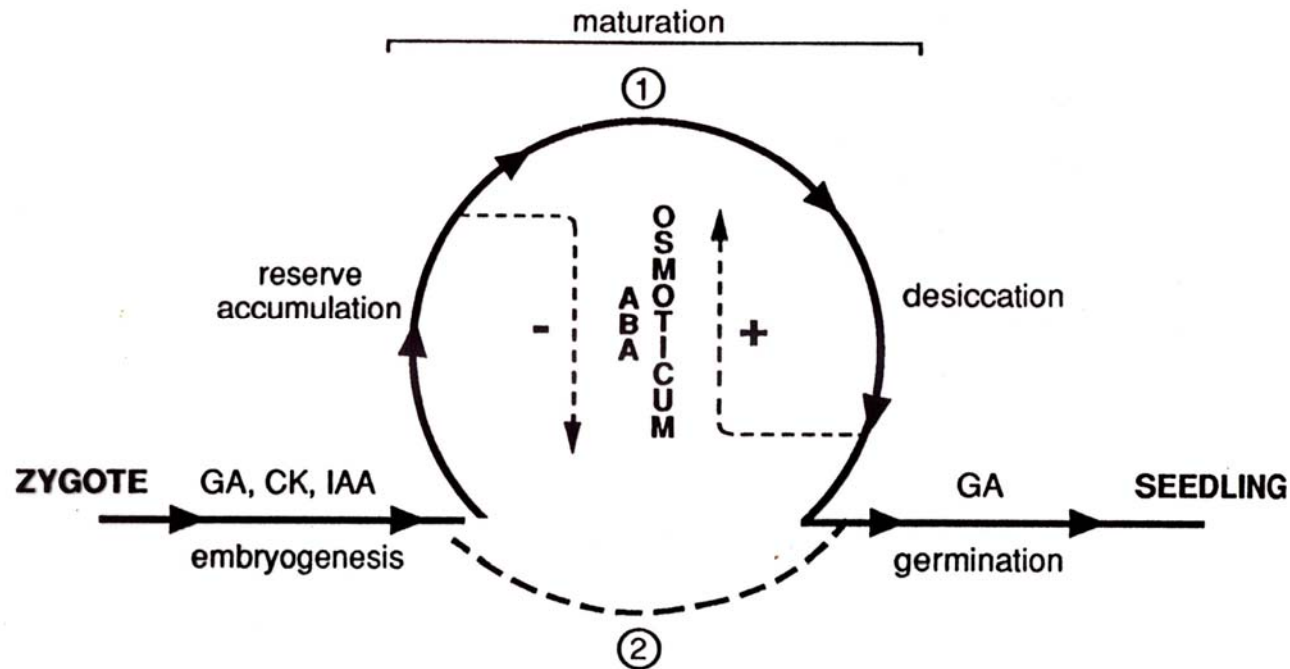


Fig. 2. A generalized representation of embryo development in angiosperms, showing three major stages from zygote to seedling: embryogenesis, maturation, and germination, and the importance of plant hormones in development. The maturation "loop" (1) can be by-passed in culture by precocious germination of embryos (2). This occurs in the absence of ABA and the presence of reduced nitrogen (e.g., glutamine) and carbon (e.g., sucrose), and in some cases by premature desiccation. In the presence of high osmoticum and/or ABA, maturation is promoted and precocious germination inhibited. Upon desiccation these processes are finalized, and normal germination will occur in response to imbibition. In culture, embryos can reversibly enter or leave the maturation loop by application (+) or removal (-), respectively, of high osmoticum or ABA.

Embrioni di grano in coltura (+ - ABA)

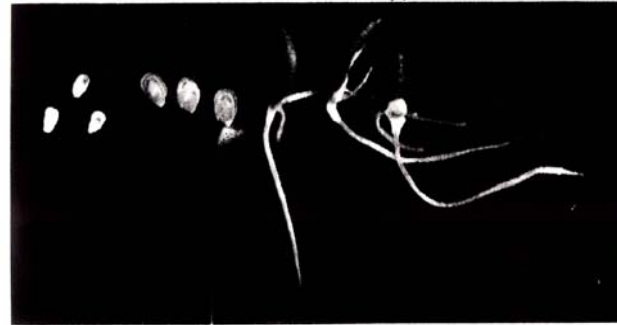
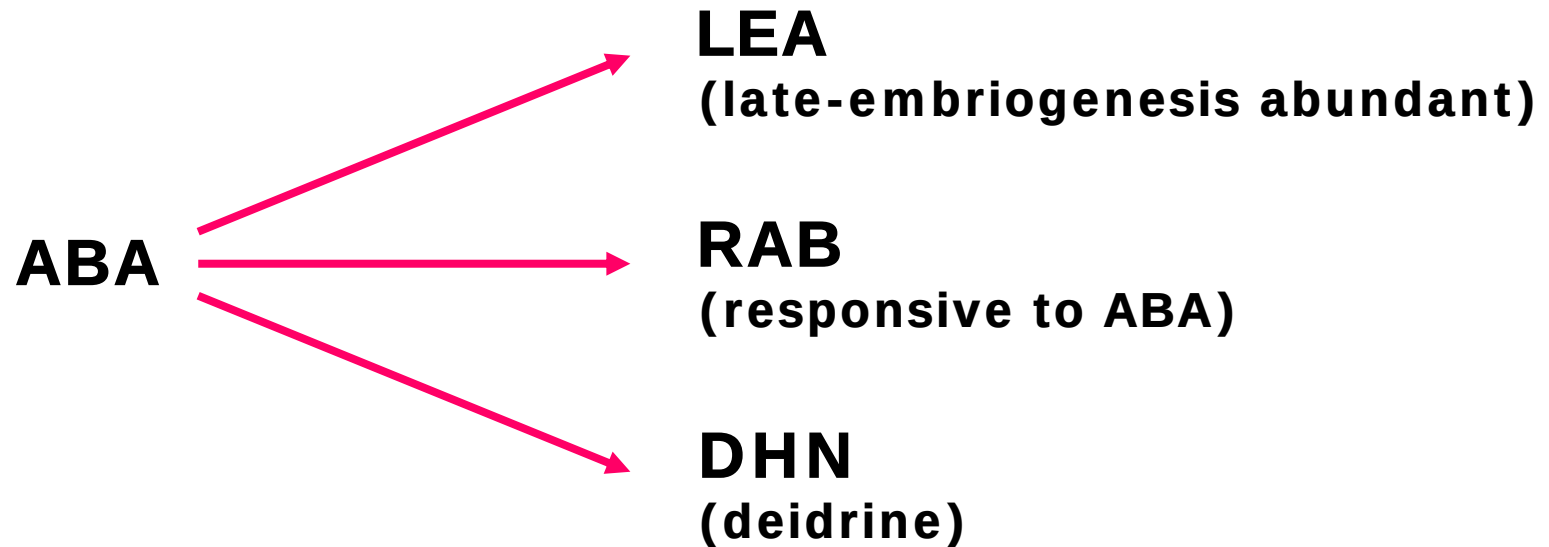


Fig. 3. Stage III wheat embryos (1.5 mm length) at the beginning of incubation (left), after 5 days in culture + 100 μ M ABA (middle), and after 5 days in culture - ABA (right). Note embryo growth and scutellum enlargement in + ABA embryos. From Rogers and Quatrano, *Am. J. Bot.* 70, 308-311 (1983).

Mutante *vp2* mais (viviparia)

PROMOZIONE DELLA TOLLERANZA AL DESSICCAMENTO DELL'EMBRIONE



**ricche in lisina
-no AA idrofobici**

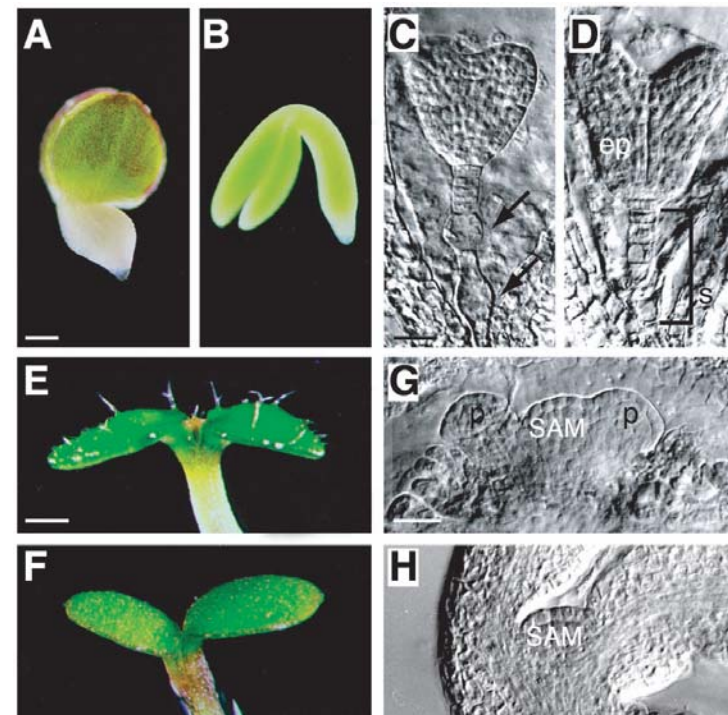
**Prevengono la
cristallizzazione dei
componenti cellulari**

GENI *LEAFY COTILEDON* (*LEC1*, *LEC2*, *FUSCA3*)

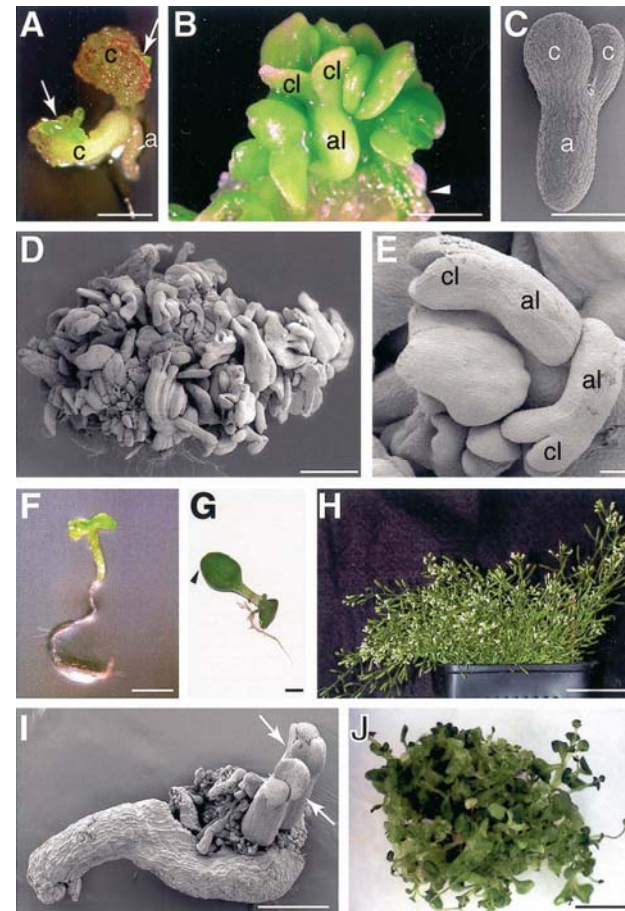
- Attivo nella fase tardiva dell'embriogenesi
- Mutanti *lec1* non sopravvivono al dessiccamento e non entrano in dormienza
- L'embrione isolato prima del dessiccamento è in grado di germinare e produrre piante fertili le quali mancano della proteina di riserva 7S e hanno cotiledoni simili a foglie, con tricomi

lec2

wt



L'espressione postembrionale, ectopica di *LEC1* e *LEC2* determina lo sviluppo di embrioni somatici nelle piante trasformate



Piante *lec2* trasformate con 35S::*LEC2*

LEC1, LEC2, (FUSCA3)

Diversamente da altri geni che funzionano in stadi specifici dell'embriogenesi, sembrano necessari per lo sviluppo normale sia durante la fase morfogenica che durante la fase di maturazione

Nella fase precoce necessari per stabilire l'identità delle cellule del sospensore e dei cotiledoni

Nella fase di maturazione necessari per l'acquisizione della tolleranza al deessiccamento e l'espressione di molti geni specifici della fase di maturazione

mRNA di LEC presente durante tutte le fasi dell'embriogenesi



Regolatore generale per il coordinamento delle fasi morfogenica e di maturazione

➤ *LEC1* omologo con la subunità HAP3 dei CCAAT-binding factors (CBFs).
Nei mammiferi (NF-Y) sono fattori generali di stimolo della trascrizione di numerosi geni

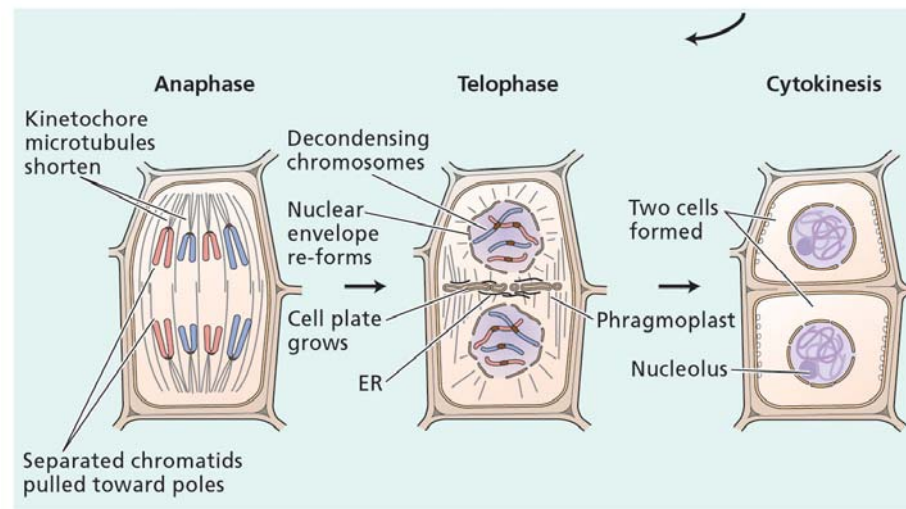
➤ *LEC2* elevata omologia con fattori di trascrizione esclusivi delle piante, contenenti il dominio DNA-binding B3, come *Viviparous1*, *ABI3*, *FUSCA3*, tutti fattori implicati nel controllo dello sviluppo del seme

Dominio B3 presente anche in ARF1 (auxin response factor1) e Monopteros

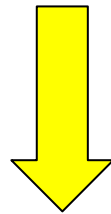
La citokinesi nella formazione del pattern tissutale

Ruolo della citokinesi nella formazione del pattern tissutale

- In *Arabidopsis* la formazione dei tessuti dipende da un pattern di divisioni cellulari specificamente orientate nello spazio, detto stereotipico
- E' rilevante per l'organizzazione tissutale della pianta la stereotipicità delle divisioni cellulari?



**La stereotipicità delle divisioni cellulari non sembra fondamentale
per la formazione del pattern assiale e radiale**



mutanti *fass* e *ton* di *Arabidopsis*

(probabilmente mutazioni sullo stesso gene)

Gene *TON (FASS)*

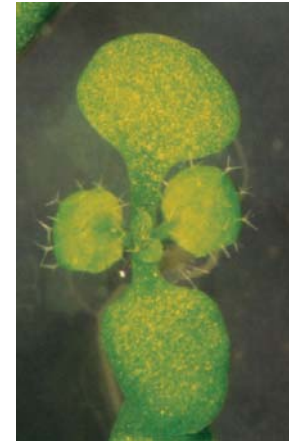
Nei mutanti *ton (fass)* mancano le divisioni stereotipiche;
Non si forma la banda preprofasica, essenziale per
l'orientamento del fragmoplasto durante la citokinesi

Le piante sono deformate a causa della irregolarità dei piani
di divisione cellulare

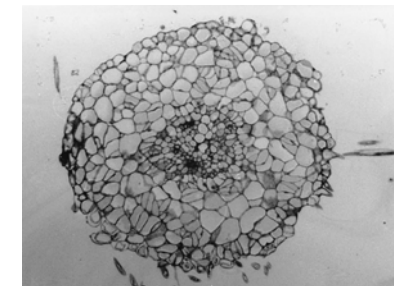
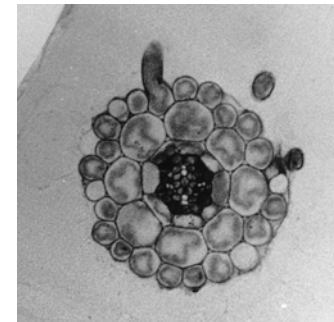
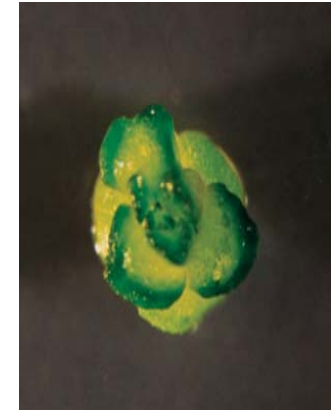
tuttavia formano tessuti riconoscibili e nelle posizioni corrette

Non è alterata la formazione dei pattern
assiale e radiale

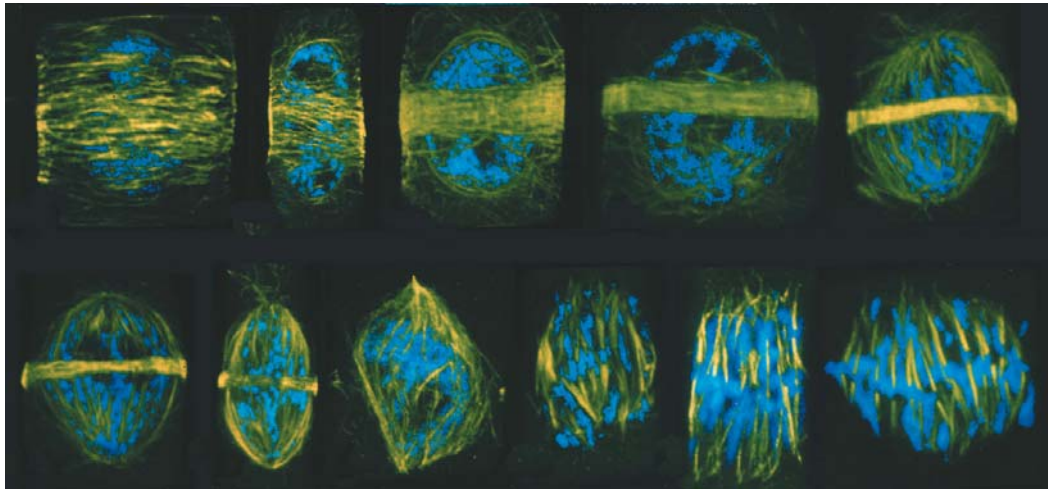
WT



ton

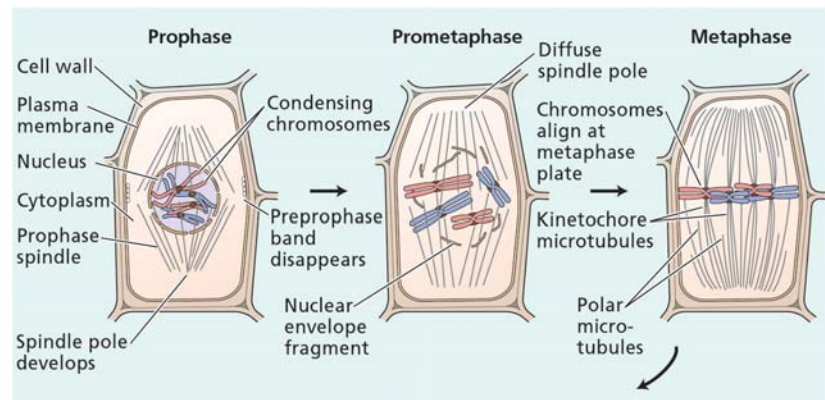


Cellula meristemica di grano (microscopio confocale)

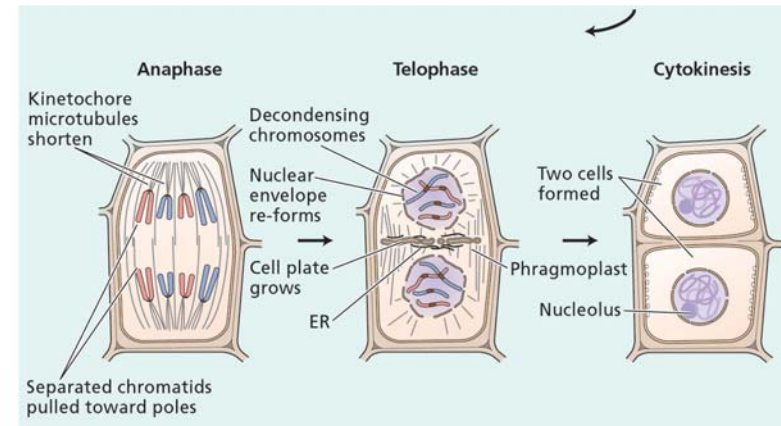


Banda preprofasica

Blu= DNA
Giallo/verde = microtubuli



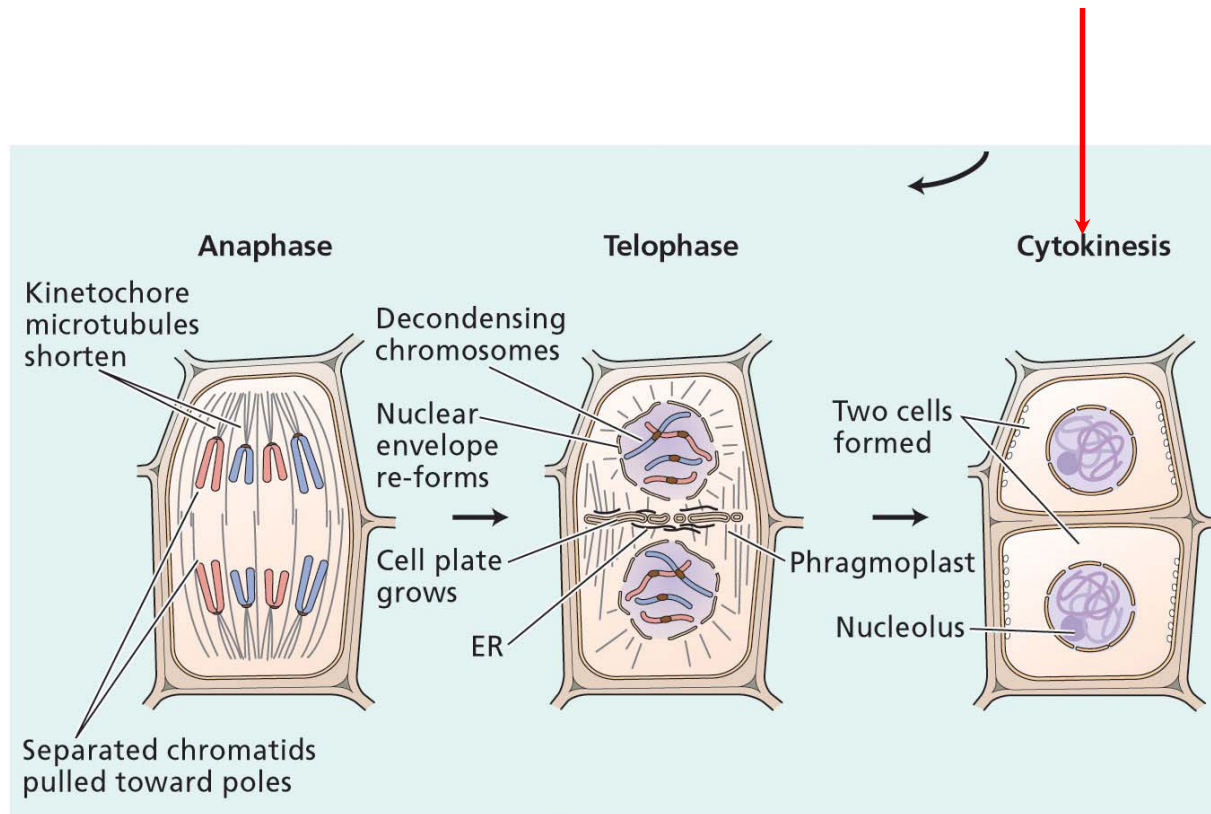
PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 1.24 (Part 1) © 2002 Sinauer Associates, Inc.



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 1.24 (Part 2) © 2002 Sinauer Associates, Inc.

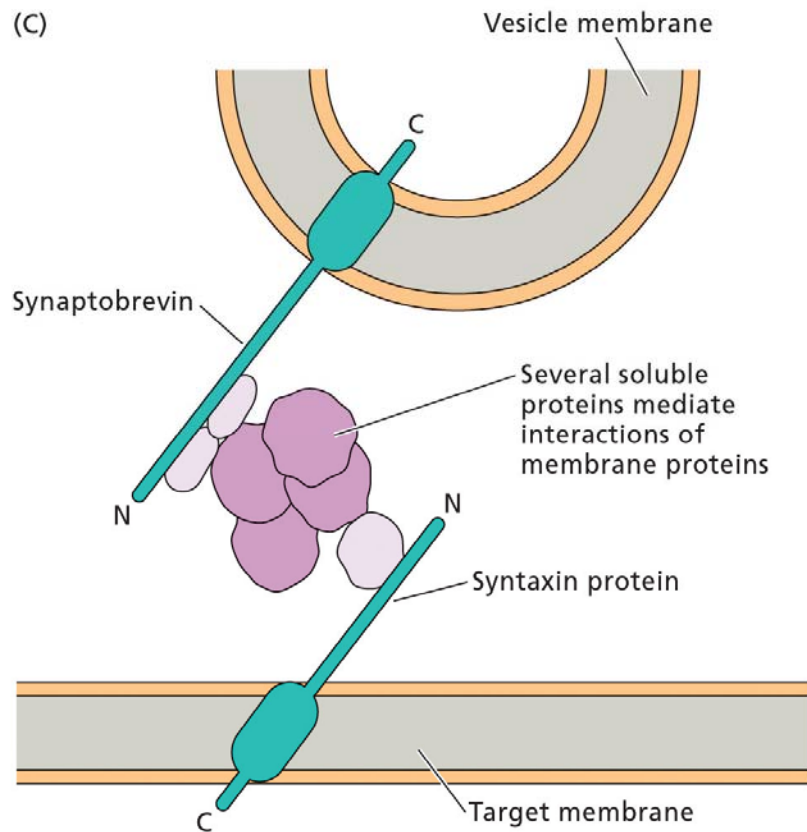
Gene *KNOLLE*

Mutanti *knolle* di *arabidopsis* mostrano difetti nella citokinesi



Funzione del gene *KNOLLE*

***KNOLLE* codifica per una proteina simile alla syntaxina (T-SNARE proteins) indispensabile per il processo di fusione delle vescicole**



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 16.11 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

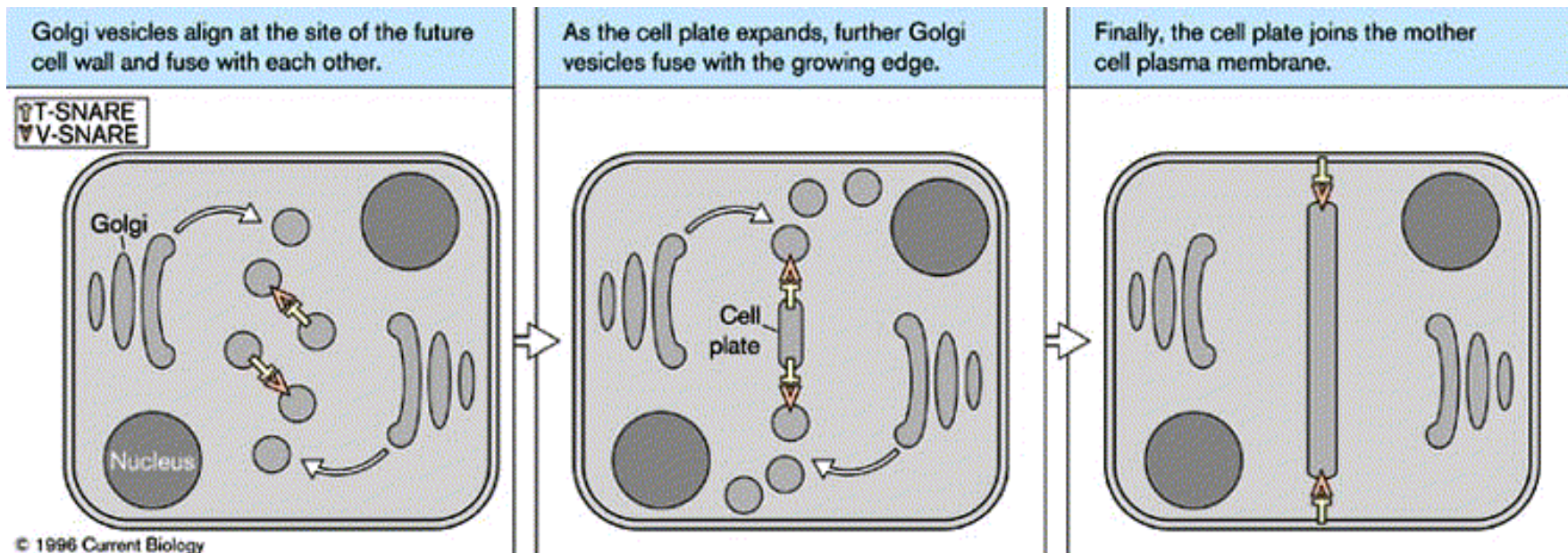
**La divisione cellulare avviene
ma è spesso incompleta o irregolare**

**Piani di divisione irregolari, cellule non
completamente separate**

**Disgregazione del pattern radiale
(ma non di quello assiale)**

Le proteine T-SNARE determinano la specificità del traffico di vescicole interagendo con specifiche V-SNARE proteins

Citokinesi



Poiché spesso cellule di embrioni *kn* non completano la divisione cellulare
KNOLLE indispensabile per la CITOKINESI

Studi su *ton* e *knolle* in contraddizione

- **Entrambi interferiscono con il normale pattern di divisioni cellulari sia nell'embrione che nella pianta**
- **la formazione del pattern radiale è alterata in *knolle* ma non in *ton***
- **Differenze: la mutazione *knolle* porta alla incompleta separazione delle cellule a differenza di *ton***
- **forse riflette l'importanza della comunicazione (e perciò della separazione) cellula-cellula**
- **I mutanti *ton* sarebbero in grado di percepire correttamente l'informazione posizionale mentre i mutanti *knolle* no**