APPUNTI

DI

FISIOLOGIA VEGETALE MOLECOLARE E PIANTE TRANSGENICHE

AA 2016/2017

Corso di Biotecnologie Molecolari

Prof. F. Licausi

PARTE SUGLI ORMONI

master COPY

DISCLAIMER: Questi appunti riguardano la parte sugli ormoni ed alcune tecniche di laboratorio. Si consiglia di integrarle con slides, materiale didattico ed il resto del programma (parte di sviluppo e parte sulle piante transgeniche).

AUXINE

Le **auxine** sono un'insieme di composti chimicamente simili all'**acido indol-3-acetico (IAA)**, prima molecola ad essere stata scoperta della categoria.

EFFETTI FISIOLOGICI

DISTENSIONE CELLULARE – Uno dei ruoli pi importanti delle auxine è la crescita per distensione nei giovani steli e coleoptili.

RADICAZIONE AVVENTIZIA – Formazione di radici da tessuti che normalmente non produrrebbero radici. Le auxine sono molto usate per produrre radici in vitro da un espianto vegetale.

DOMINANZA APICALE – Normalmente le piante si sviluppano in altezza, ma se viene rimosso l'apice si sviluppano germogli laterali. L'apice tramite le auxine segnala alle gemme ascellari di rimanere dormienti.

PRODUZIONE DEI PRIMORDI FOGLIARI DAL MERISTEMA APICALE DEL GERMOGLIO – L'auxina è responsabile della disposizione delle foglie lungo l'asse della pianta.

TROPISMI – Nello specifico: gravitropismo, tigmotropismo, fototropismo. Sono causati da un gradiente auxinico che provoca un allungamento asimmetrico della parte interessata.

DIFFERENZIAMENTO DEI VASI – L'auxina è coinvolta nel differenziamento di xilema e floema (si è visto con esperimenti che più ce ne sono, maggiormente si ha formazione dei vasi).

COINVOLTE NEL RITARDO DELL'ABSCISSIONE DELLE FOGLIE

L'auxina pi comune in natura è l'**acido indol-3-acetico,** ma vi sono anche altre auxine naturali prodotte dal mais, dai legumi e da certi frutti (IBA, 4Cl-IAA, PPA). Le auxine possono essere specie-specifiche o tessuto-specifiche.

Normalmente negli studi di laboratorio si preferiscono degli **analoghi sintetici** perché non vengono degradati dalla pianta, in modo da restare più a lungo in circolo.

-Come si può studiare se la sintesi delle auxine è legata al triptofano?-

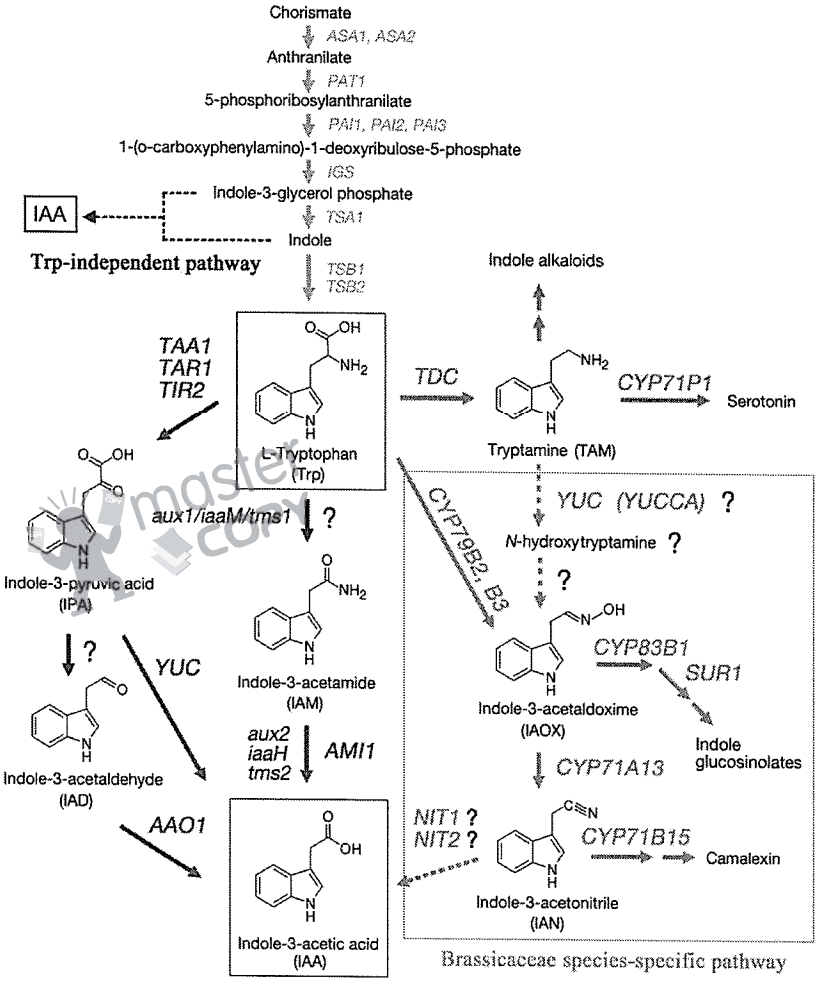
Si può provare bloccando la sintesi di triptofano, per vedere se viene sintetizzata auxina (di fatto, vedo che un po' è prodotta)

Si da alla pianta del triptofano marcato (C_{14}) e poi si vede se ci sono delle auxine marcate (se ne trovo, so che, bene o male, un certo contributo lo fornisce).

Nelle piante esistono più vie di sintesi per la produzione delle auxine, di cui una è **triptofano-dipendente**, l'altra no -> si pensa che queste ultime consentano la sintesi a partire dall'**indolo.**

A partire dal triptofano, sono state proposte quattro vie alternative: la via dell'acido indol-3-piruvico, la via dell'indol-3 acetammide, la via della triptamina e la via dell'indol-3-acetaldossima.

Non tutti i passaggi di queste vie biosintetiche sono noti ad oggi: in alcuni casi, sembra che siano i batteri parassiti a produrre gli enzimi necessari per catalizzare queste reazioni (*es. Agrobacterium tumefaciens o rhizogenes*) o batteri simbionti che comunque traggono un vantaggio dalla crescita della pianta (magari perché possono nutrirsi meglio).



Il futuro delle auxine, una volta prodotte, dipende dalle molecole con cui sono coniugate:

Acido aspartico o acido glutammico -> degradazione

Gruppi glicosidici -> immagazzinamento e trasporto

TRASPORTO

Le auxine sono prodotte a livelli basali da tutte le cellule, ma i siti di produzione maggiore sono gli **apici meristematici** -> da qui avviene il trasporto, che può avvenire in due modi:

1) DIFFUSIONE ATTRAVERSO MEMBRANA E PARETE CELLULARE **(trappola ionica)**
   L'apoplasto (ossia l'insieme delle pareti cellulari e degli spazi intercellulari) ha un pH più basso rispetto al citosol, in quanto ci vengono traslocati attivamente ioni H^+. Quando l'auxina si trova nell'apoplasto, risulta essere in forma indissociata per il 20% ed è quindi **apolare** -> riesce a diffondere passivamente dentro il citosol.
   Una volta dentro, il pH neutro favorisce la **dissociazione** in IAA^- ed H^+. La forma deprotonata però non è in grado di diffondere attraverso la membrana, e **rimane intrappolata**, a meno che non intervengano dei trasportatori.

2) MEDIANTE TRASPORTATORI
   I trasportatori per le auxine si dividono in 3 tipi:
   - Trasportatori **AUX/LAX** (mediano l'influsso di auxine).
   - **ABCB** (mediano l'efflusso, usando ATP).
   - **PIN** proteines (mediano l'efflusso).

master COPY

TRASPORTATORI AUX/LAX

Le molecole di auxina possono sia entrare passivamente, sia mediante l'attività di simporto dei trasportatori AUX/LAX. *Arabidopsis* codifica per una AUX1 e tre trasportatori "AUX1-like", chiamati LAX1, LAX2 e LAX3 (sono simili per circa l'80% degli amminoacidi).

I mutanti privi di questi trasportatori hanno un fenotipo particolare: le radici non hanno molte ramificazioni laterali, e l'effetto più rilevante è la mancanza di gravitropismo.

AUX1: è importante principalmente per l'assorbimento di auxina a livello degli apici della radice (i mutanti di Arabidopsis senza AUX1 mostravano mancanza di gravitropismo). È espresso sia nelle regioni della cuffia laterale, sia nella stele.

LAX3: è importante per l'emersione delle radici laterali a partire dalla radice primaria. È collocato a livello di cellule che stanno sopra al primordio della radice appena abbozzata -> serve per far accumulare auxina.

Si pensa che questo tipo di influsso addizionale serva per quelle cellule che hanno bisogno di un rapido uptake di auxina.

master copy

-Come valuteresti la collocazione delle proteine AUX/LAX in un tessuto?-

Potrei fondere alla proteina un gene-reporter (es. *GFP, Green Fluorescent Protein. YFP, Yellow, Fluorescent Protein)* e vedere dove mi si va a collocare. Ovviamente devo sperare che il reporter non mi vada ad alterare troppo la struttura della proteina, o potrei avere dei problemi (tipo che non mi si mette dove dovrebbe).

TRASPORTATORI ABCB

Sono trasportatori che richiedono ATP e generano un gradiente fino al centro quiescente. I tipi 1 e 4 sono coinvolti nella ridistribuzione per evitare accumuli. Non hanno una distribuzione polarizzata.

Secondo alcuni studi potrebbero avere un ruolo come trasportatori di auxina basale, visto che sono localizzati uniformemente in diverse specie di piante, indipendentemente da stimoli interni ed esterni. *(Cho M, Cho H-T. The function of ABCB transporters in auxin transport. Plant Signaling & Behavior. 2013)*

PIN PROTEINS

Sono un'importante famiglia di proteine transmembrana, capaci di **trasportare la forma anionica dell'auxina**. Sono classificate in base alla presenza o meno di un loop di circa 80 amminoacidi che sporge nel versante citoplasmatico.
Il nome *PIN* deriva dall'aspetto "a puntina" dei mutanti defettivi.

PIN1, 2, 3, 4, 6 e 7: Possiedono il loop, comprende gli aa. 298-377
PIN5, 8: Hanno un loop, ma molto minore, che comprende gli aa. 27-46.

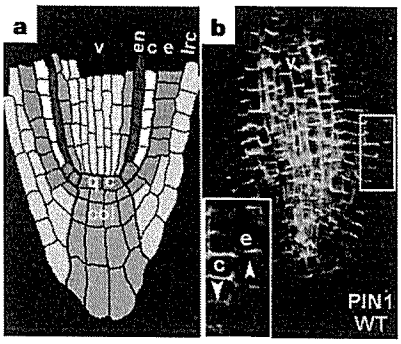
master copy

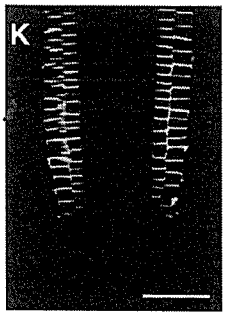
TECH-ZOOM: La tecnologia GATEWAY.

master copy

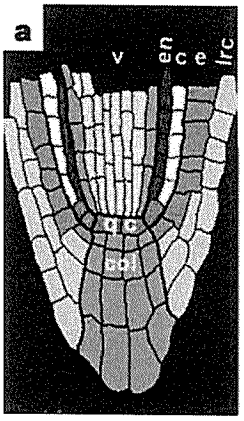
Le proteine PIN risultano essere **distribuite in modo polare asimmetrico** lungo la membrana cellulare. La diversa dislocazione delle PIN determina un **gradiente auxinico** nella radice e nel meristema del germoglio (nb. -> il centro quiescente è importante per determinare l'attività meristematica delle cellule intorno). Ogni PIN ha una sua localizzazione, anche in relazione al tessuto.

PIN1: è espressa soprattutto nella stele, a livello delle membrane basali, e poco nella cuffia. Confrontando corteccia ed epidermide, si nota che nella prima la localizzazione è basale, mentre nell'epidermide è apicale. *[Figura B]*



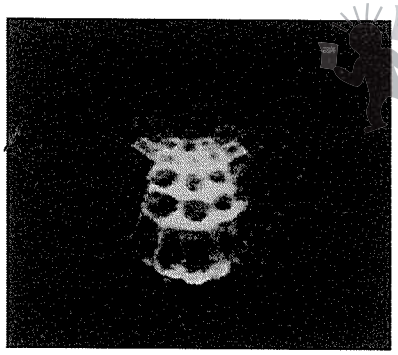


PIN2: Nella corteccia ha localizzazione basale, nell'epidermide apicale. Non risulta essere espressa nella stele. *[Figura K]*

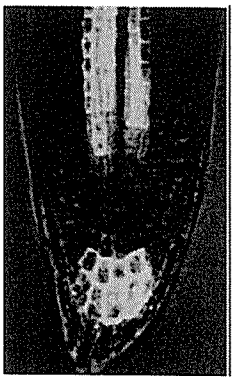




PIN3: Si localizza nella parte basale nella stele, mentre nell'epidermide è pseudo-laterale. È anche localizzata nelle cellule sottostanti il centro quiescente (che sarebbero le cellule iniziali della cuffia). *[Figure H, I]*



PIN4: è espressa praticamente ovunque a livello della stele, vicino alla regione meristematica.
[Figura a lato]



PIN7: è localizzata nella porzione basale della stele, ed è in posizione pseudo-apicale della cuffia. *[Figura a lato]*

Assemblando tutte queste informazioni circa i trasportatori di efflusso, possiamo localizzare l'auxina nella stele, in prossimità del centro quiescente e delle cellule sottostanti. Si forma quindi un modello a fontana: i flussi di auxina grazie a PIN2 nell'epidermide si allontanano, per tornare poi al centro della stele con PIN3.

