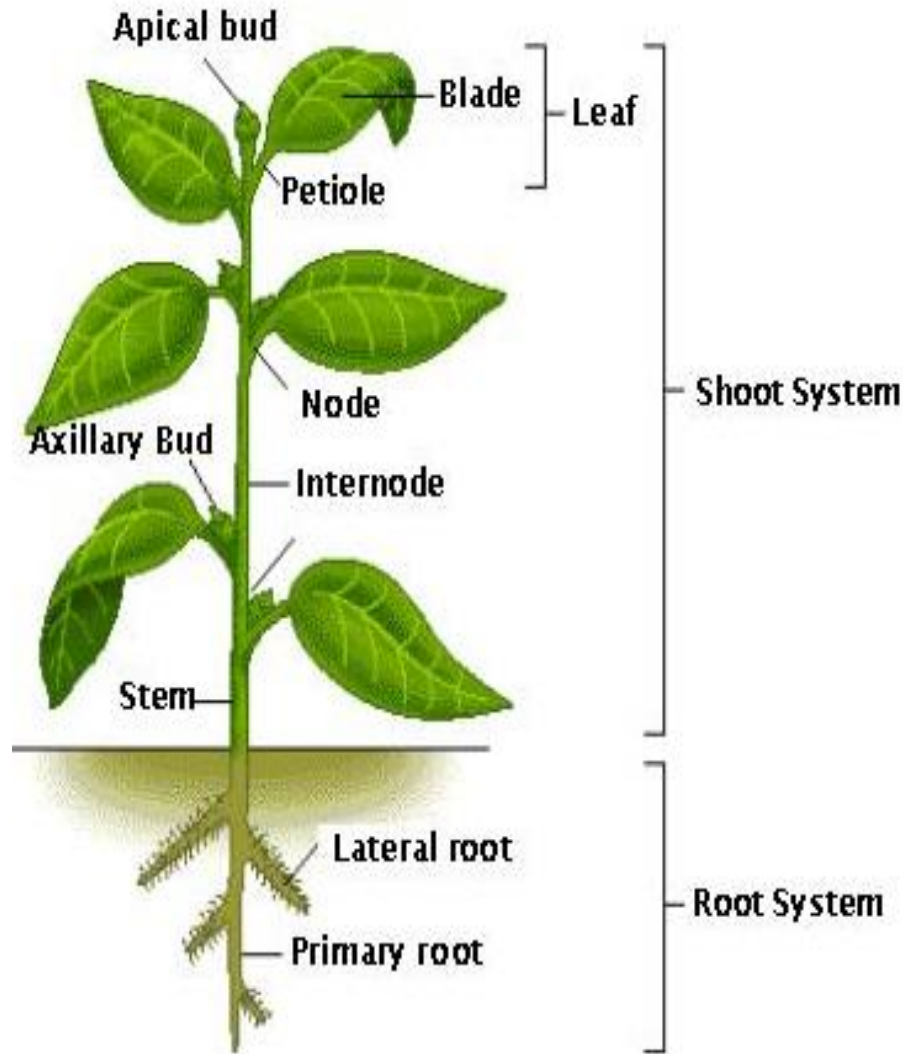


Organogenesi fogliare



La comparsa delle foglie rappresenta un enorme traguardo per l'evoluzione delle piante terrestri.

La **forma appiattita ed espansa** permette di catturare la luce in modo ottimale quindi è l'organo più efficiente per il processo fotosintetico ed il meglio adattato.

La foglia è considerata l'organo base dal quale si sono evolute tante altre strutture con specifiche funzioni.

Es. i viticci fogliari, la spine, ed i verticilli fiorali, sia quelli riproduttivi cioè antere e carpelli sia quelli sterili petali e sepali.

ORIGINE EVOLUTIVA DEI MACROFILLI

teoria di Zimmermann

In corrispondenza di una ramificazione un ramo sarebbe cresciuto più di altri, Ed i rami secondari si sarebbero disposti su uno stesso piano, appiattimento e formazione di un tessuto di fusione.



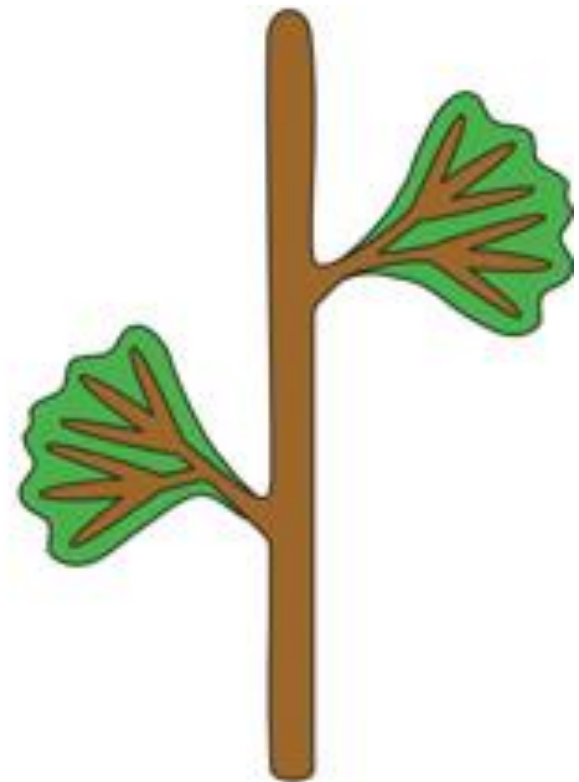
**Pianta
primitiva**



Sopravanzamento



Appiattimento



Fusione

Durante lo sviluppo post-embrionale l'apice svolge tre attività:

➤ **Forma il fusto**

➤ **Produce foglie e gemme (organogenesi caulinare in pianta)**

➤ **Mantiene se stesso.**

Più tardi si trasforma in apice infiorescenziale o direttamente florale, dando origine ai fiori.

Il meristema apicale del germoglio a differenza di quello radicale non ha un tessuto di rivestimento simile alla cuffia radicale. Del resto l'apice caulinare è protetto dai primordi delle foglie in via di differenziamento.

Le foglie si originano come protuberanze che quasi subito assumono una simmetria radiale.

Il differenziamento del primordio in foglia prevede l'acquisizione della simmetria dorsoventrale e la crescita definita.

Quando avviene la **determinazione** del primordio in foglia?

È stato dimostrato che coltivando *in vitro* primordi molto giovani di una felce questi sviluppavano germogli, ma la coltura di primordi ad uno stadio di sviluppo più avanzato porta alla formazione di foglie.

In tabacco invece giovanissimi primordi sono in grado di formare foglie se prelevati dalla pianta e coltivati *in vitro*.

Quindi ai primissimi stadi il primordio non è ancora determinato ed è possibile indurlo ad intraprendere una via di sviluppo diversa, tuttavia questo dipende dalla specie.

La determinazione del primordio si ha quando emerge dal doma e i caratteri tipici della foglia si acquisiscono durante lo sviluppo.

Le foglie, le gemme ascellari ed i fiori si formano mediante protuberanze nella Zona Periferica del meristema caulinare

La formazione di un primordio inizia quando un gruppo di cellule del doma intraprende un destino differenziativo diverso da quello del doma stesso. Queste cellule sono le **cellule fondatrici** dell'**organo** e il processo che determina l'insorgenza del primordio si chiama determinazione.



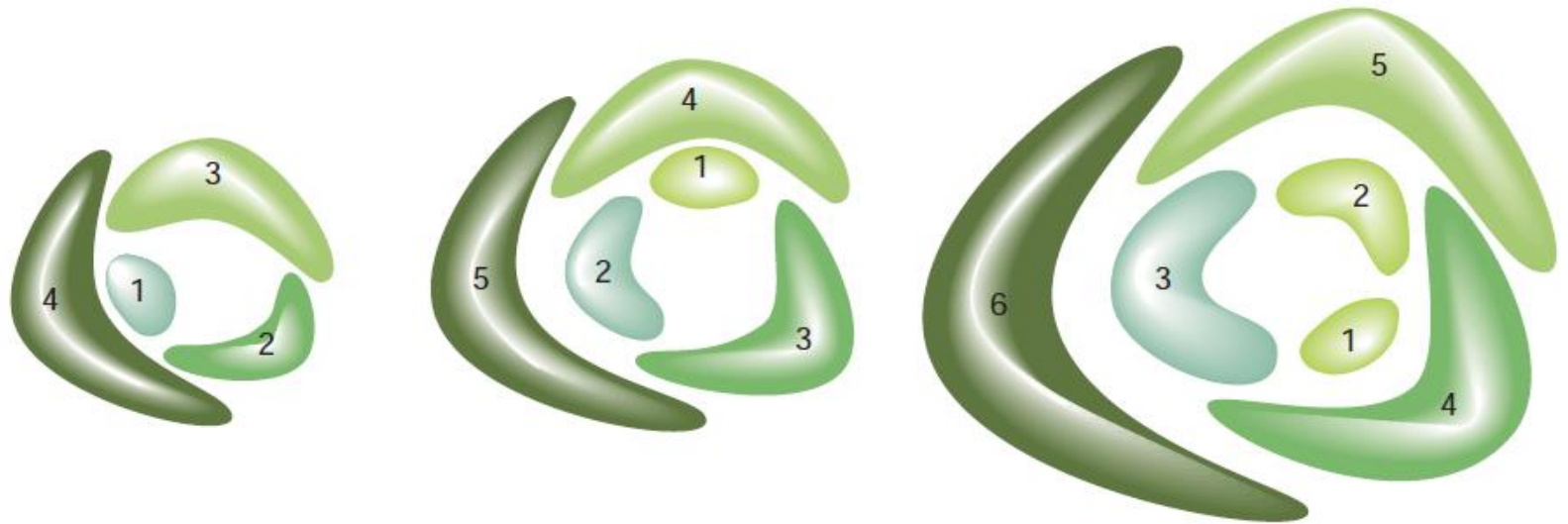
L'origine dei primordi fogliari è definita **esogena** perchè avviene mediante ripetute divisioni inizialmente pericline di un gruppo di cellule degli strati più esterni del doma.

La distanza dall'estremità dell'apice a cui si formano i primordi fogliari varia da specie a specie.

Dopo che si è formata la bozza del primordio fogliare, l'apice si allunga e quando ha raggiunto una certa lunghezza si forma un nuovo primordio (quindi esiste un **controllo spazio-temporale** nell'insorgenza dei primordi).

Il lasso di tempo che intercorre tra la formazione di un primordio fogliare ed il successivo è detto **plastrocrone** ed è costante per la specie.

I primordi si formano in successione acropeta cioè i più giovani sono quelli più vicino al meristema apicale, nel rispetto della **fillotassi** della specie.

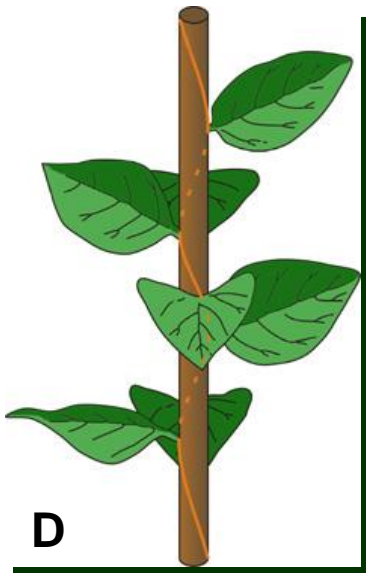


Dal Libro di testo: Elementi di
Biologia dello Sviluppo delle Piante,
ed. EdiSES



FILLOTASSI

La disposizione delle foglie lungo il fusto, detta **fillostassi**, può variare notevolmente da specie a specie.



alternata (una foglia per nodo)

opposta (due foglie per nodo)

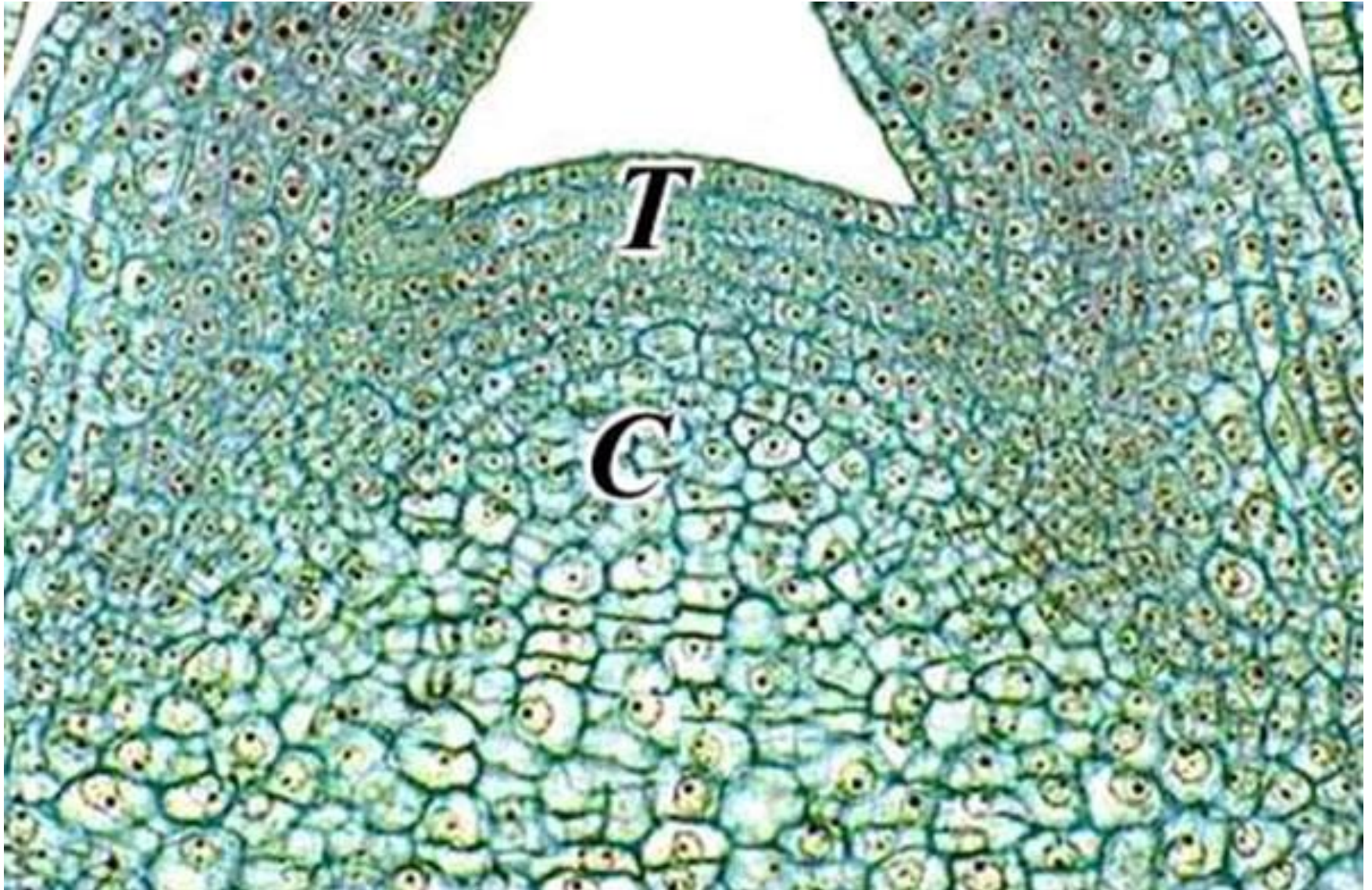
verticillata (più di due foglie per nodo)

elicoidale (una foglia per nodo e foglie inserite a spirale intorno al fusto)

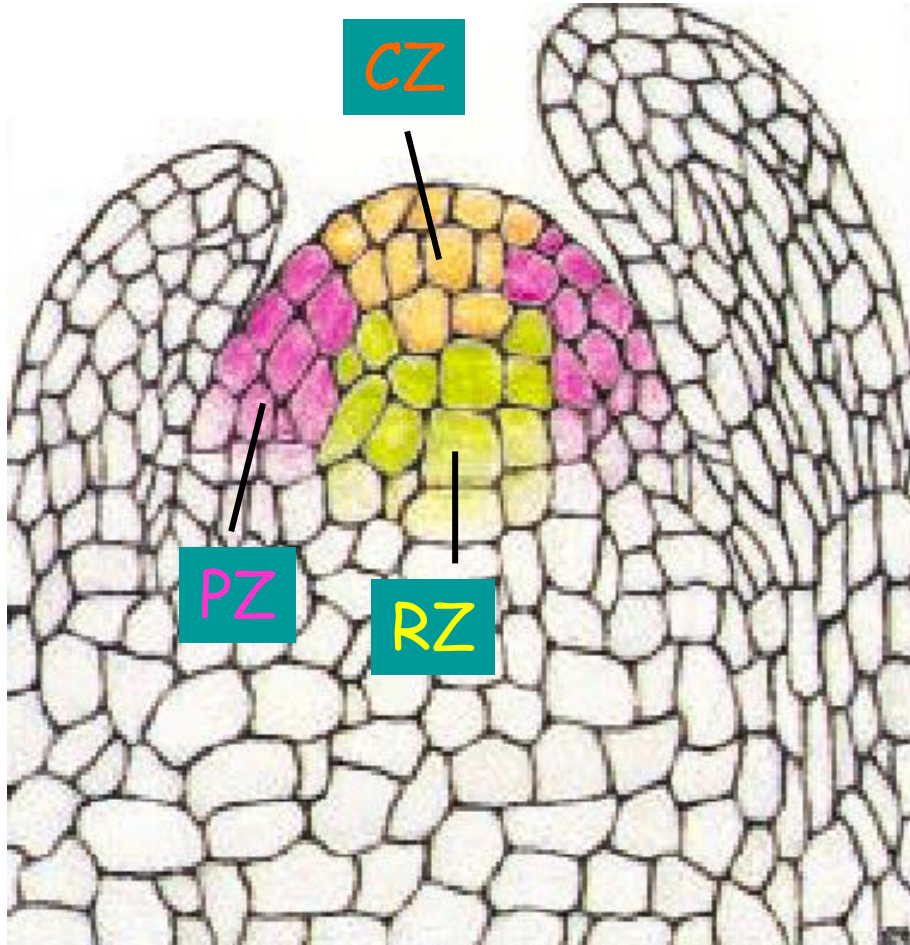
distica (su due file)

decussata (90° tra le foglie di un nodo e quelle del nodo successivo)

CONO VEGETATIVO

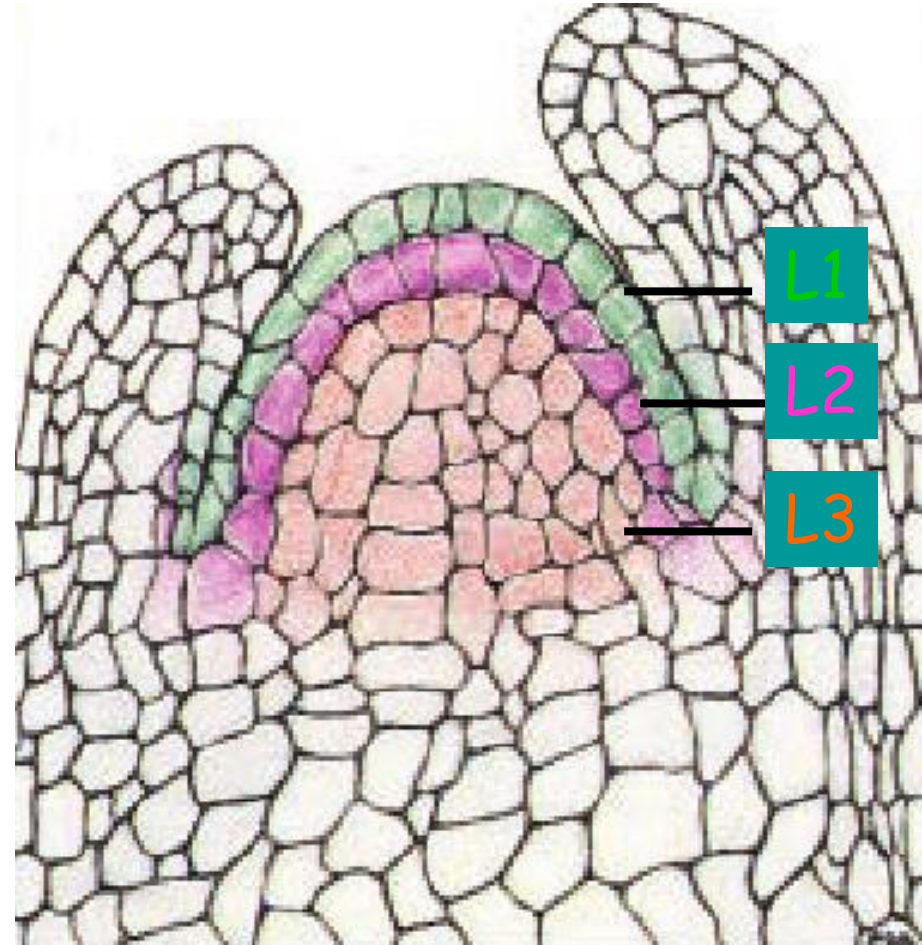


Organizzazione del meristema apicale



Zones

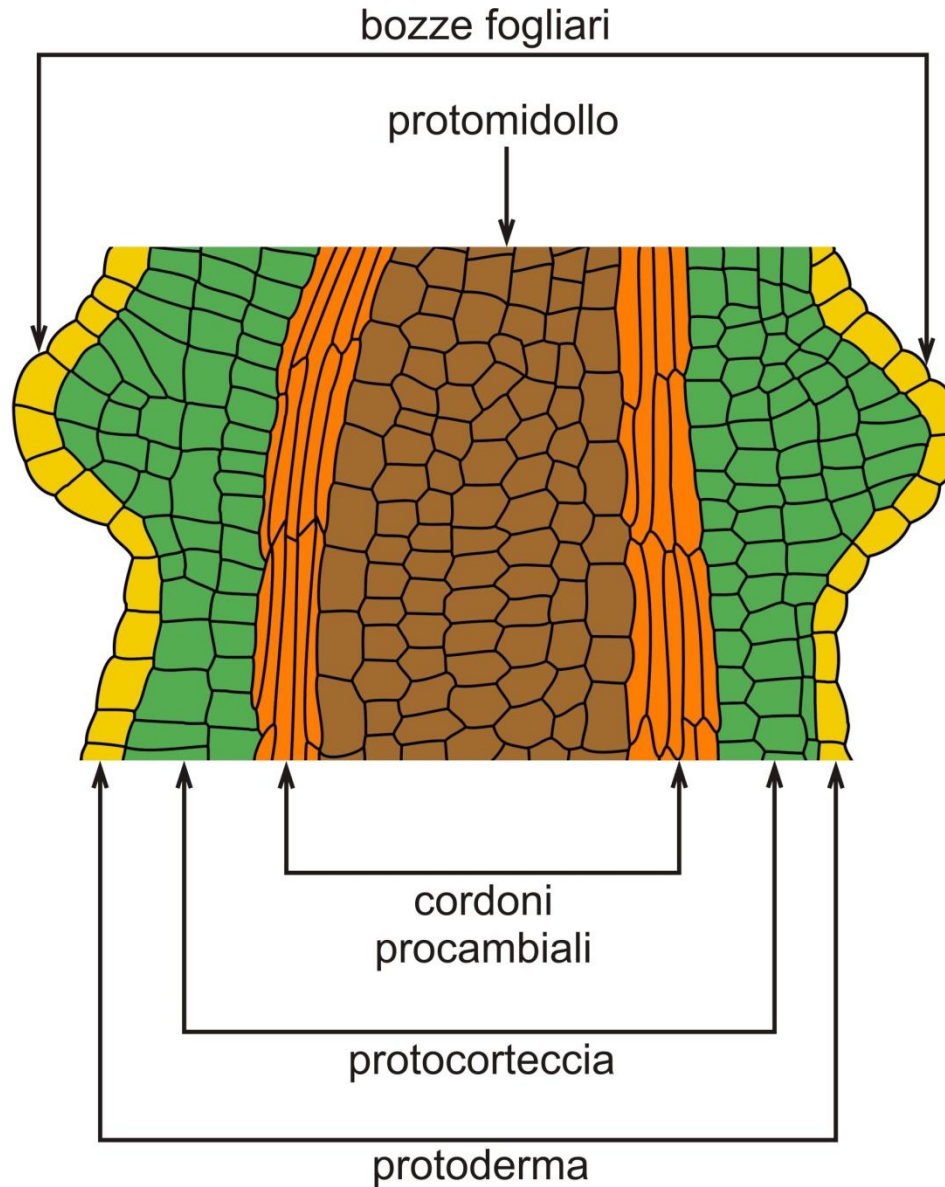
CZ = central zone > maintenance
PZ == peripheral zone > leaf primordia
RZ = rib zone > core of shoot



Layers

L1 > epidermis
L2, L3 > subepidermal tissues
oriented cell divisions

ZONA DI DIFFERENZIAMENTO



Alcuni marcatori molecolari dell'organogenesi sono fattori di trascrizione. Nel doma esistono geni i cui trascritti si accumulano in modo specifico nella tunica, nel corpus, alcuni in ZC altri in ZP

Es. in riso *SHOOT ORGANIZATION (SHO)* controlla l'organizzazione delle cellule fondatrici del primordio. I mutanti *sho* presentano la ZP con un numero maggiore di cellule rispetto al wild type ed una disordinata formazione dei primordi fogliari. Il gene probabilmente controlla la velocità con cui le cellule passano dalla ZC alla ZP.

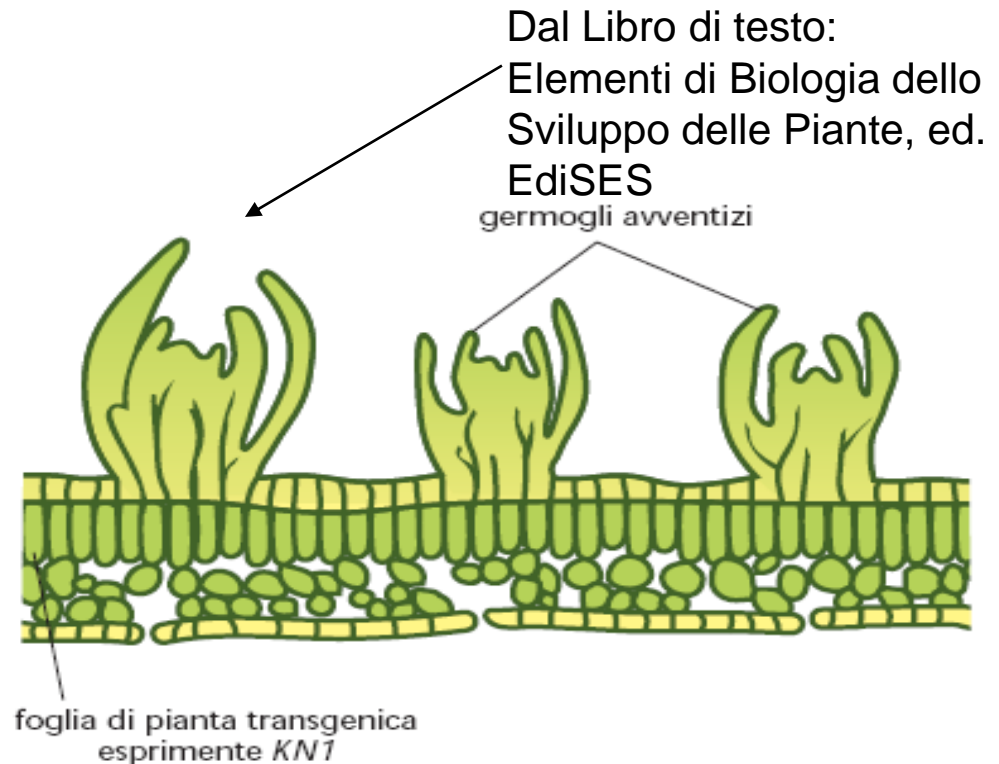
SHOOT MERISTEMLESS (STM), attivo nelle cellule del meristema apicale del germoglio di *Arabidopsis*, dove ne controlla la capacità proliferativa attivando alcune cicline, è bloccato ai lati del doma, dove inizia lo sviluppo del primordio fogliare. Questo gene esercita un controllo negativo perchè la sua non espressione permette l'espressione di *AS1* che regola la definizione delle cellule fondatrici del primordio.

Altri geni regolano positivamente il destino delle cellule fondatrici, come *PHAN* di *Antirrhinum* e *Aintegumenta (ANT)* di *Arabidopsis*, che si esprimono solo nei primordi. Nel mutante *PHAN* il meristema caulinare è bloccato quindi sono i primordi fogliari ad inviare un segnale per avviare attività del meristema caulinare

La **crescita determinata** delle foglie è dovuta all'espressione di specifici geni.

In particolare sembrano coinvolti i geni *KNOX*. Se si induce l'espressione ectopica di questi geni nelle foglie di tabacco o in *Arabidopsis* si ha una prolungata attività meristemica che determina la formazione di protuberanze sulle foglie stesse che nei casi più severi dà origine a interi germogli avventizi.

Il gene *KNOX*, *KNOTTED1*, è espresso solo nel doma apicale e non nei primordi fogliari o nelle foglie in via di sviluppo.



L'espressione zona-specifica di questi fattori di trascrizione potrebbe a sua volta indurre l'espressione di geni che codificano per molecole direttamente coinvolte nello sviluppo dei primordi, ad es. di molecole che controllano **l'orientamento delle prime divisioni cellulari** del primordio. Gli mRNA si spostano da cellula a cellula attraverso i plasmodesmi.

In particolare alcune **espansine**.

Le **espansine** sono proteine della parete cellulare implicate nella distensione cellulare.

L'espressione dei geni che codificano per queste proteine è associata alla crescita.

Prove sperimentali sostengono il ruolo positivo di queste proteine durante lo sviluppo del primordio fogliare.

Infatti applicando expansine nella ZPeriferica del doma del pomodoro, dove normalmente non si forma il primordio, si può indurre la formazione di strutture simili a primordi fogliari.

Il gene dell'espansina di pomodoro (*LeEXP18*) è espresso proprio nei siti in cui si formeranno i primordi, prima ancora che avvengano le prime divisioni.

L'espressione di questo gene è sotto controllo dell'auxina ed è possibile che l'ormone abbia come bersaglio proprio *LeEXP18* durante l'organogenesi fogliare.

Ibridazioni *in situ* con la sonda del gene che codifica per l'espansina indicano la zona del doma, dove non sono ancora evidenti modificazioni citologiche che precedono la formazione del primordio fogliare ma la sua espressione indica un coinvolgimento precoce.

L'auxina svolge un ruolo importante anche nell'organogenesi fogliare.

Somministrando inibitori del trasporto polare dell'auxina (NPA - l'acido 1-Naftilftalmico) ad apici di pomodoro **non** si formano le foglie anche se il doma rimane inalterato e la crescita del fusto continua.

Fornendo auxina esogena dopo il trattamento con l'inibitore si ripristina l'organogenesi. L'auxina però deve essere applicata **solo** nella ZP del doma. Ciò sta ad indicare che in questa zona ci sono le cellule competenti per l'organogenesi fogliare.

È chiaro il ruolo dell'auxina nell'organogenesi, ma dove viene prodotta e dove viene traslocata?

Monitorando il movimento della proteina PIN1 è stato possibile stabilire che **l'ormone si produce nel doma vegetativo e si accumula alla sommità del doma negli strati L1 e L2.**

Non appena le cellule lasciano la ZC ed entrano nella ZP si ha una veloce trascrizione di *PIN1* in queste cellule cioè le cellule fondatrici del primordio.

Nei siti di formazione dell'organo, la proteina *PIN1* si localizza nelle membrane delle cellule che delimitano il primordio. Infatti durante la crescita della foglia l'auxina va dai tessuti meristemati del doma verso il primordio in formazione dove si raggiungono alti livelli dell'ormone.

Inoltre l'auxina determina un confine, con l'aumento della concentrazione, intorno al primordio in formazione inibendo in queste cellule il gene *CUP SHAPED COTYLEDON2* (*CUC2*). Quest'ultimo gene si esprime attorno ai primordi in formazione disegnandone i confini.

Nell'organo maturo l'auxina si muove in direzione basipeta.

Regione di espressione di *CUC* (CUP-SHAPED COTYLEDON) con ridotta presenza di auxina. In questa zona non è possibile iniziare un nuovo primordio.

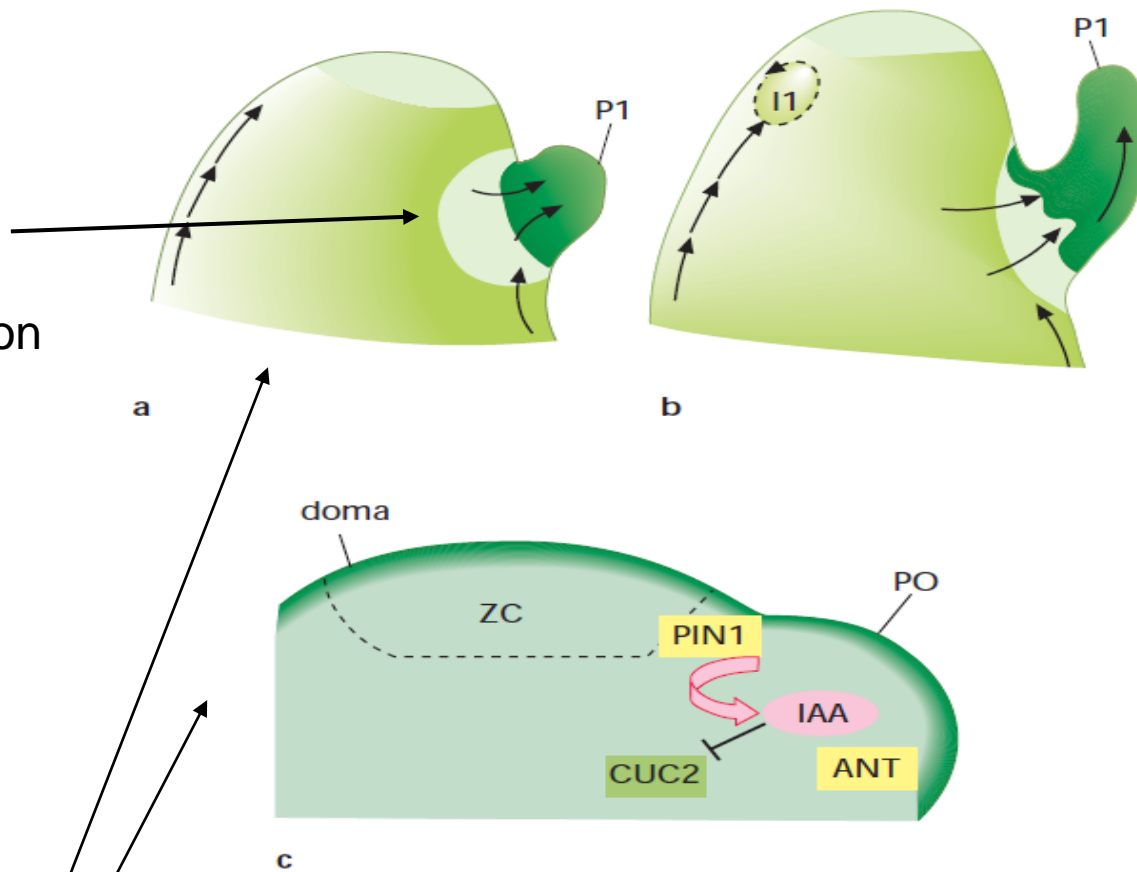


Fig. 5.21 → (a-c) (a) Apice caulinare con un giovane primordio (P1). Le frecce indicano il flusso polare di auxina che, attraverso l'epidermide e il sottoepidermide, raggiunge il doma. L'intensità del colore indica la presunta concentrazione dell'ormone. Iniziativa l'organogenesi, l'auxina fluisce verso il primordio, depauperando la zona circostante dell'ormone, e rendendo impossibile l'organogenesi nelle vicinanze del primordio stesso. (b) A una certa distanza e al di sopra del primordio pre-esistente, la concentrazione di auxina supera una certa soglia rendendo possibile la formazione di un altro primordio (I1 = zona d'inizio del primordio successivo). (c) Secondo il modello proposto, l'auxina crea un confine attorno al sito di formazione del primordio attraverso l'inibizione dell'espressione di *CUC2*. All'interno del primordio in crescita, la presenza di auxina, il cui trasporto polare dipende da PIN1, associata all'espressione di *ANT*, ne promuove l'accrescimento.

Dal Libro di testo:
Elementi di Biologia
dello Sviluppo delle
Piante, ed. EdiSES

Evidenze sperimentali dimostrano anche l'azione del citoscheletro (**microtubuli corticali** e fuso mitotico) nel regolare l'organogenesi fogliare.

La prima attività citologica evidente all'inizio della formazione dei primordi fogliari è infatti l'aumentata attività mitotica delle cellule fondatrici.

Questo necessita di un controllo del ciclo cellulare e di un preciso orientamento dei piani di divisione cellulare.

Il giusto orientamento di queste cellule dipende dalla disposizione delle **microfibrille di cellulosa della parete cellulare** che è a sua volta regolato dall'orientamento dei **microtubuli corticali**, ossia dai componenti del citoscheletro.

Il citoscheletro svolge un ruolo importante nella distensione cellulare, evento questo regolato dalle espansine.

Quindi: l'espansina ed il citoscheletro sono implicati nella formazione del primordio fogliare, ma l'auxina è il principale protagonista.

Frequenza mitotica, orientamento delle divisioni e distensione cellulare devono agire in modo coordinato per una normale organogenesi fogliare.

In che misura i diversi fattori, cioè geni, ormoni, citoscheletro possano controllare l'organogenesi fogliare?

E' molto difficile da stabilirsi, perchè intervengono **meccanismi di compensazione** che la pianta attua quando o la divisione cellulare o la distensione vengono alterate.

Infatti in piante di tabacco transgeniche che mostrano ridotta attività mitotica le foglie si formano ugualmente ed hanno la **stessa** dimensione delle foglie delle piante wt. In questo caso le foglie hanno **poche** cellule, ma sono molto più grandi del normale proprio per compensare il ridotto numero cellulare.

Cioè: **forma cellulare che compensa il ridotto numero cellulare.**

Il ruolo delle citochinine

È da tempo noto che le **citochinine (CK)** stimolano lo sviluppo dei germogli sia *in planta* che *in vitro*.

Nella pianta esse contrastano la dominanza apicale **stimolando lo sviluppo dei germogli ascellari.**

In vitro un elevato rapporto CK-auxina, applicate per via esogena, o la sola CK, inducono la formazione di germogli avventizi.

Come è stato dimostrato?

Piante transgeniche che sovra-esprimono il gene *ipt* di *Agrobacterium tumefaciens* (gene che codifica per un enzima responsabile della sintesi di CK) hanno più alti livelli di CK endogena e formano **gemme avventizie** sulle foglie.

Cosa fanno le citochinine nel doma?



Nel doma di *Antirrhinum* i livelli di trascritto di due geni (*D-cyclin*) correlati alla divisione cellulare aumentano in risposta alla somministrazione di CK, è stato così suggerito che l'ormone promuova l'**entrata** nel ciclo cellulare delle **cellule meristematiche**.

Piante transgeniche che sovraproducono CK, quali quelle sovraesprimenti *ipt* di *Agrobacterium tumefaciens* (gene che codifica per un enzima responsabile della sintesi delle citochinine) presentano più gemme avventizie nelle foglie e doma più grande.

Quindi quantità definite di CK hanno un ruolo nel mantenimento del doma, forse agendo a monte del gene STM.

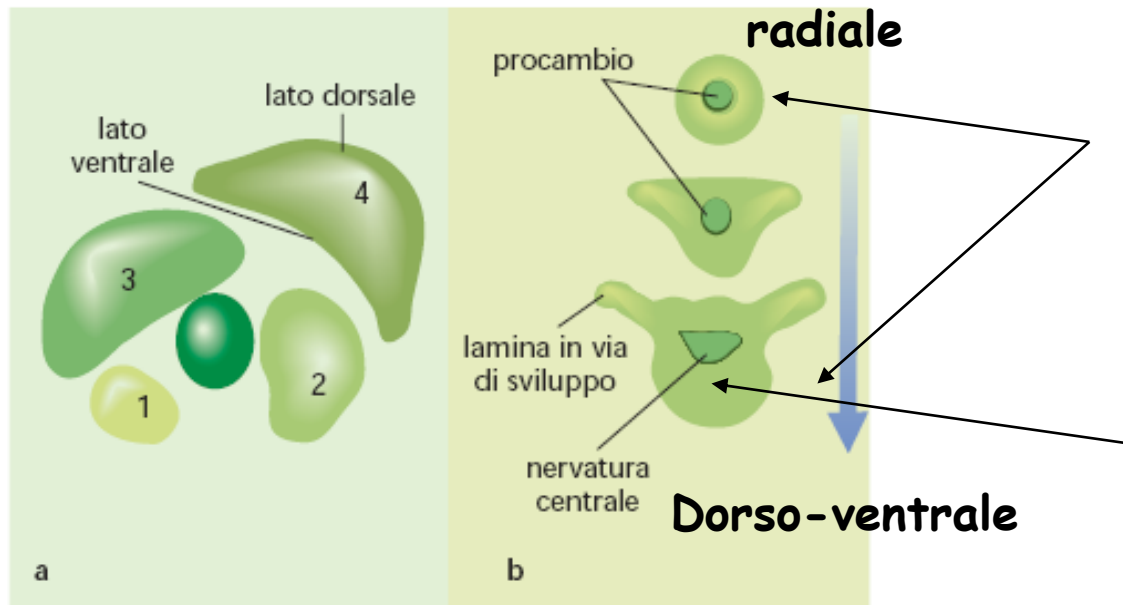
Come un primordio a simmetria radiale diventi una foglia a simmetria dorso-ventrale è oggetto di studio da molto tempo.

Isolando un primordio dall'apice caulinare e coltivandolo *in vitro* è stato osservato che il primordio cresceva, però conservava la simmetria radiale e si formava un organo costituito da un cilindro centrale composto da tessuto vascolare circondato da un anello di parenchima e dall'epidermide di tipo abassiale.

Questo ci dice che la **condizione di dorso-ventralità** è controllata dal soma della pianta in particolare mediante **segnali** che da esso vengono inviati all'organo in formazione.

Il primordio fogliare inizialmente ha una simmetria radiale, man mano che cresce si allunga e acquista una polarità apice-base o simmetria prossimale-distale. La **regione distale ha una crescita limitata**.

Il primordio subisce anche cambiamenti nella forma, si appiattisce nel lato rivolto verso il doma e assume una simmetria dorso-ventrale.



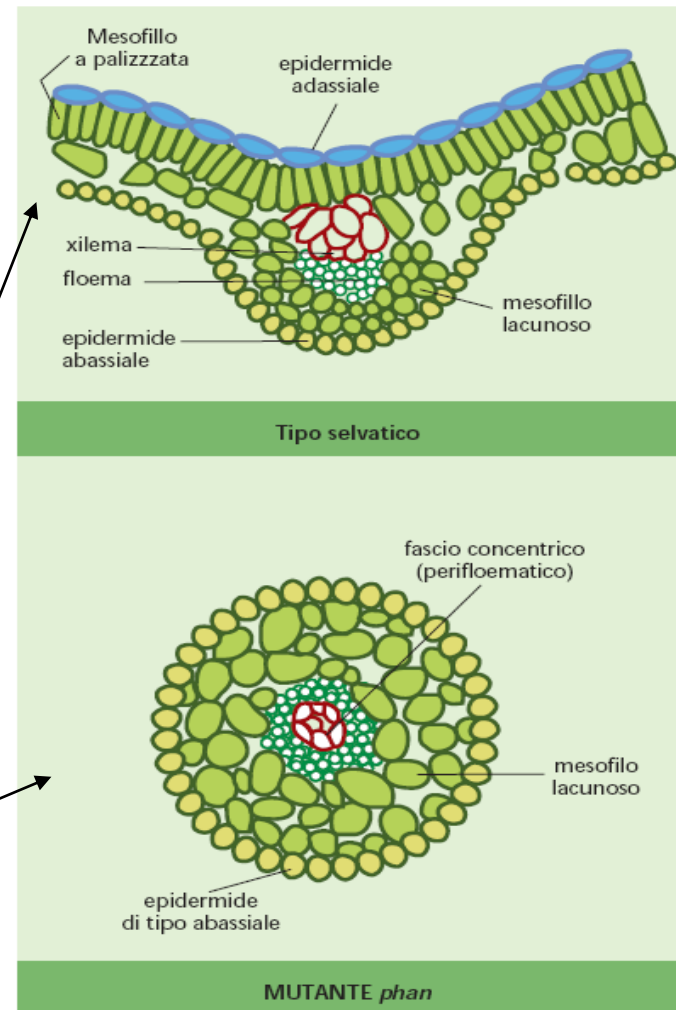
Cambiamenti di simmetria durante la crescita del primordio fogliare.

Dal Libro di testo: Elementi di Biologia dello Sviluppo delle Piante, ed. EdiSES

In *Anthirrinum* la dorsoventralità della foglia è controllata dal gene *PHAN* (di cui l'ortologo in *Arabidopsis* è **ASI**). *PHAN* è espresso in tutte le cellule del giovane primordio. Sembra che *PHAN* sia necessario per consentire alle cellule della foglia di rispondere ad un segnale che proviene dal doma.

I mutanti *phan* hanno foglie a simmetria radiale.

Dal Libro di testo: Elementi di Biologia dello Sviluppo delle Piante, ed. EdiSES



Nella maggior parte delle piante l'accrescimento della lamina fogliare avviene ad opera di cellule dislocate in tutta la regione fogliare e non per l'attività di un meristema localizzato.

Nelle dicotiledoni la localizzazione delle divisioni cellulari cambia durante lo sviluppo della foglia.

Inizialmente le cellule in divisione sono distribuite **uniformemente** su tutta la lamina, per questo motivo è stato utilizzato il termine "**plate meristem**" o meristema piatto.

Al procedere del differenziamento le cellule situate all'estremità della giovane foglia (in posizione distale) non si dividono più, e la regione fogliare a più intensa attività mitotica rimane solo la zona basale (regione prossimale).

Si è giunti alla definizione di questo modello mediante prove sperimentali che prevedono l'utilizzo del gene reporter *uidA* fuso al promotore di un gene che codifica per una ciclina (che si esprime durante il ciclo cellulare). Viene così monitorata l'attività mitotica nella foglia in formazione.

Le divisioni cellulari non sono il solo processo responsabile della crescita e differenziamento fogliare.

Nello sviluppo della foglia gioca un ruolo importante anche la distensione cellulare polarizzata, ad esempio nei tricomi fogliari e nelle cellule del tessuto a palizzata.

Una crescita intercalare dovuta a cellule della lamina che si dividono e si ingrossano in seguito a processi di distensione determina in massima parte la crescita in larghezza e lunghezza della lamina fogliare.

Differenze nella velocità di divisione e di distensione cellulare nei vari strati della lamina danno origine a numerosi **spazi intercellulari**.

Durante la crescita della lamina fogliare le cellule possono ingrandirsi moltissimo, la distensione può avvenire in tutte le direzioni dello spazio, nel senso della lunghezza, nel senso della larghezza o nel senso dello spessore.

La polarità della crescita delle cellule determina la forma della foglia.

Dall'analisi di due mutanti di *Arabidopsis*, *angustifolia* (*an*) e *rotundifolia* (*rot*), con alterata morfologia fogliare è stato dedotto che la distensione cellulare lungo le direzioni dello spazio è controllata geneticamente ed un ruolo importante è svolto dal citoscheletro e dalla parete cellulare.

La foglia cresce finchè non raggiunge la forma e le dimensioni tipiche della specie. Tuttavia la morfologia finale di una foglia è il risultato dell'interazione di diversi fattori, ambientali, disposizione sulla pianta e genetici.

Secondo la teoria cellulare la forma e le dimensioni di ogni singola cellula influenzano la forma e le dimensioni dell'intera foglia (meccanismo compensatorio fra forma e dimensione citato prima).

**Epidermide
pluristratificata**



**Cripte
stomatiche
con peli**

Es: Foglia di ambiente mediterraneo

I tricomi iniziano a differenziarsi precocemente sull'epidermide e il loro differenziamento avviene in direzione basipeta.

Il differenziamento dei tricomi o peli in molte piante, tra cui *Arabidopsis*, avviene in relazione al **tipo** di epidermide, abassiale o adassiale.

La distribuzione dei tricomi sembra essere controllata dal movimento di **Fattori di Trascrizione** che si spostano attraverso i plasmodesmi. **I geni coinvolti nel differenziamento dei peli della foglia e del caule sono gli stessi che controllano il medesimo processo nella radice.**

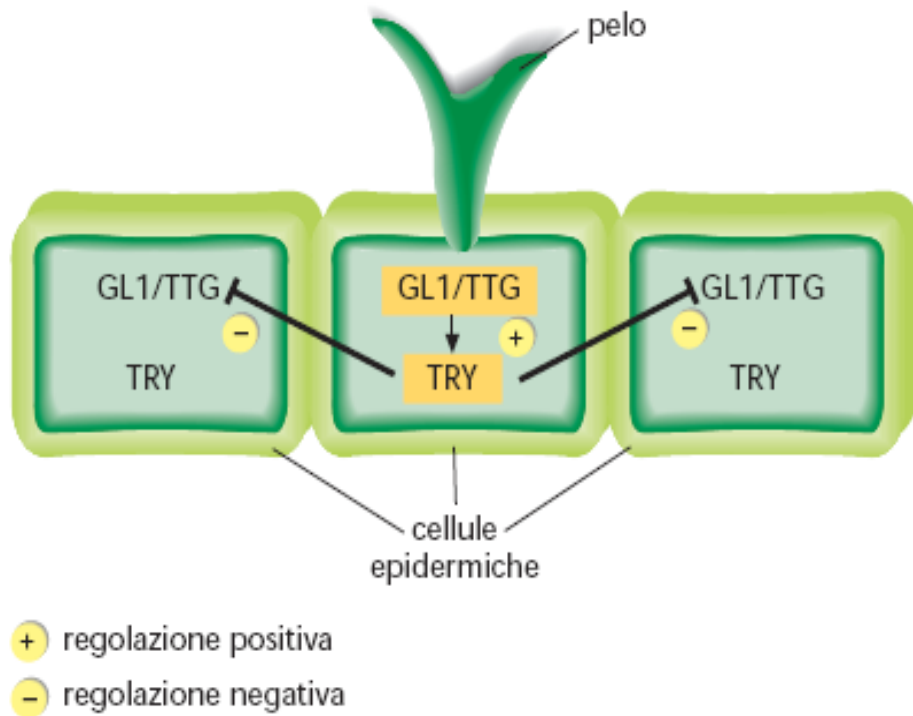
In *Arabidopsis* i geni **GLABRA1** (*GL1*) e **TRASPARENT TESTA GLABRA1** (*TTG1*) sono infatti coinvolti direttamente nel differenziamento dei tricomi, sia nella radice che nella foglia che nel fusto.

Anche nella foglia i tricomi si formano ad una determinata distanza l'uno dall'altro (in genere ogni 3 - 4 cellule).

Molecole che diffondono fra le cellule possono reprimere o attivare un particolare processo.

Così una cellula epidermica che differenzia un pelo lo fa in seguito ad una variazione dell'espressione di alcuni geni che promuovono l'evento, al contrario l'espressione di geni inibitori bloccano il differenziamento nelle cellule vicine.

Il gene **CAPRICE** svolge il ruolo di inibitore.



La variazione dell'espressione di GL1 e TTG in una cellula epidermica porta al differenziamento del pelo al tempo stesso stimolerà l'espressione di TRY con la produzione di un fattore inibitorio del differenziamento tricoblastico nelle cellule vicine. **Meccanismo di Turing: interazione tra sostanze diffusibili che promuovono o reprimono un determinato processo**

Triptycon (TRY)= regolatore negativo dello sviluppo dei tricomi

Il differenziamento dei tricomi è **anche sotto il controllo ormonale**, attualmente sembra che le **gibberelline** siano coinvolte in questo processo nelle foglie.

Piante carenti in gibberelline non presentano peli e applicando l'ormone esogenamente si può ripristinare la loro formazione.

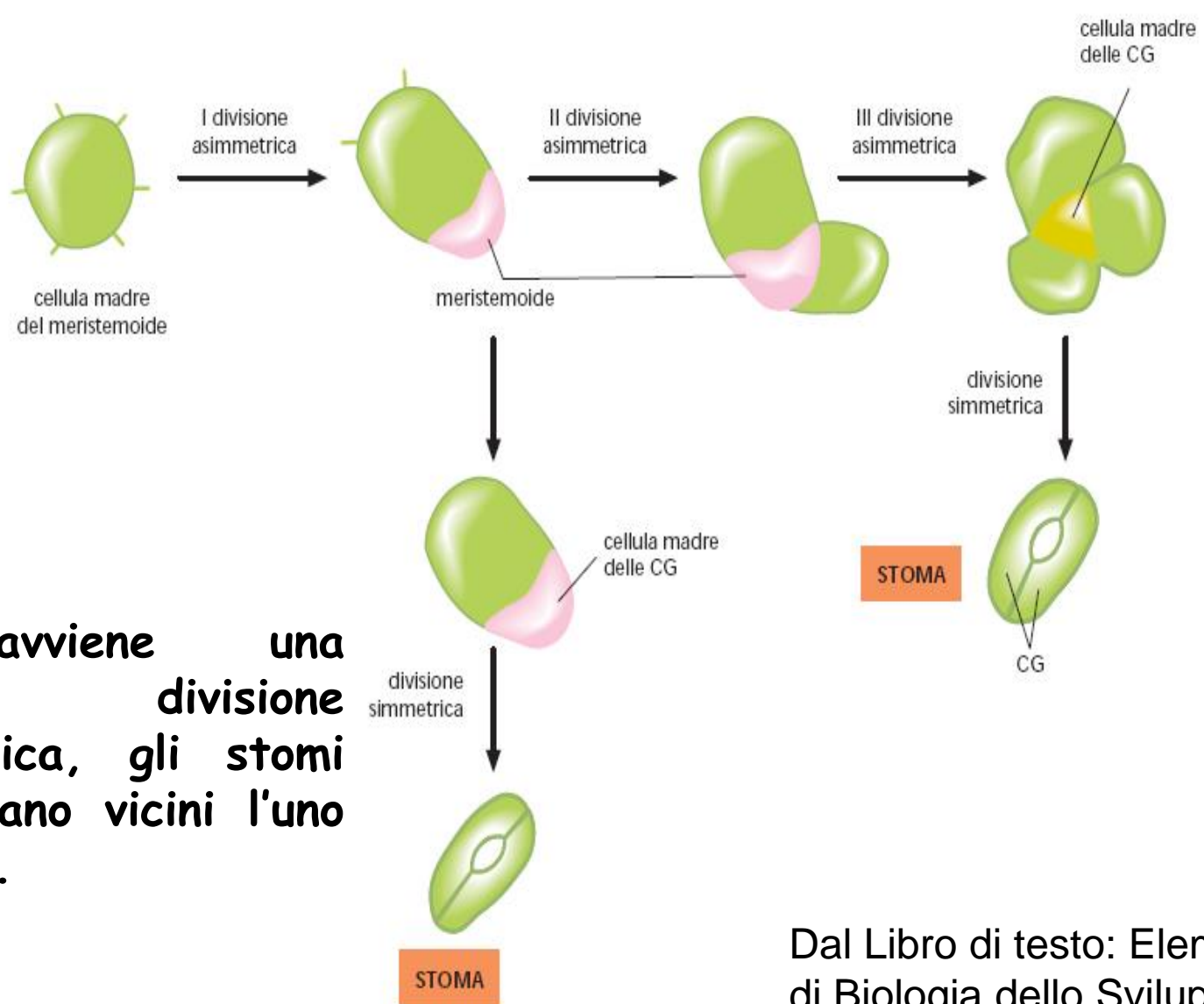
Probabilmente questi ormoni regolano l'attività dei geni responsabili del differenziamento dei tricomi, ad es. di *GL1*.

La formazione degli stomi

Come avviene?

Nelle dicotiledoni il differenziamento dello stoma inizia con una divisione asimmetrica di una cellula del protoderma, cellula madre del meristemoide. Una delle 2 cellule figlie assume identità di cellula epidermica, l'altra più piccola è l'iniziale dello stoma. Questa cellula si divide 2 -3 volte sempre in modo asimmetrico portando ad un complesso cellulare in cui il meristemoide viene circondato da 3 cellule. Il meristemoide diventa la cellula madre delle cellule di guardia che si divide in modo simmetrico. Gli stomi sono disposti in modo casuale e non in file e sono in numero maggiore rispetto alle monocotiledoni.

Nelle angiosperme monocotiledoni il meristemoide, ottenuto attraverso divisione asimmetrica della cellula madre del meristemoide, acquisisce subito il destino di cellula madre delle cellule di guardia. Gli stomi si dispongono secondo linee parallele. Nessun nuovo stoma si differenzia fra stomi persistenti.

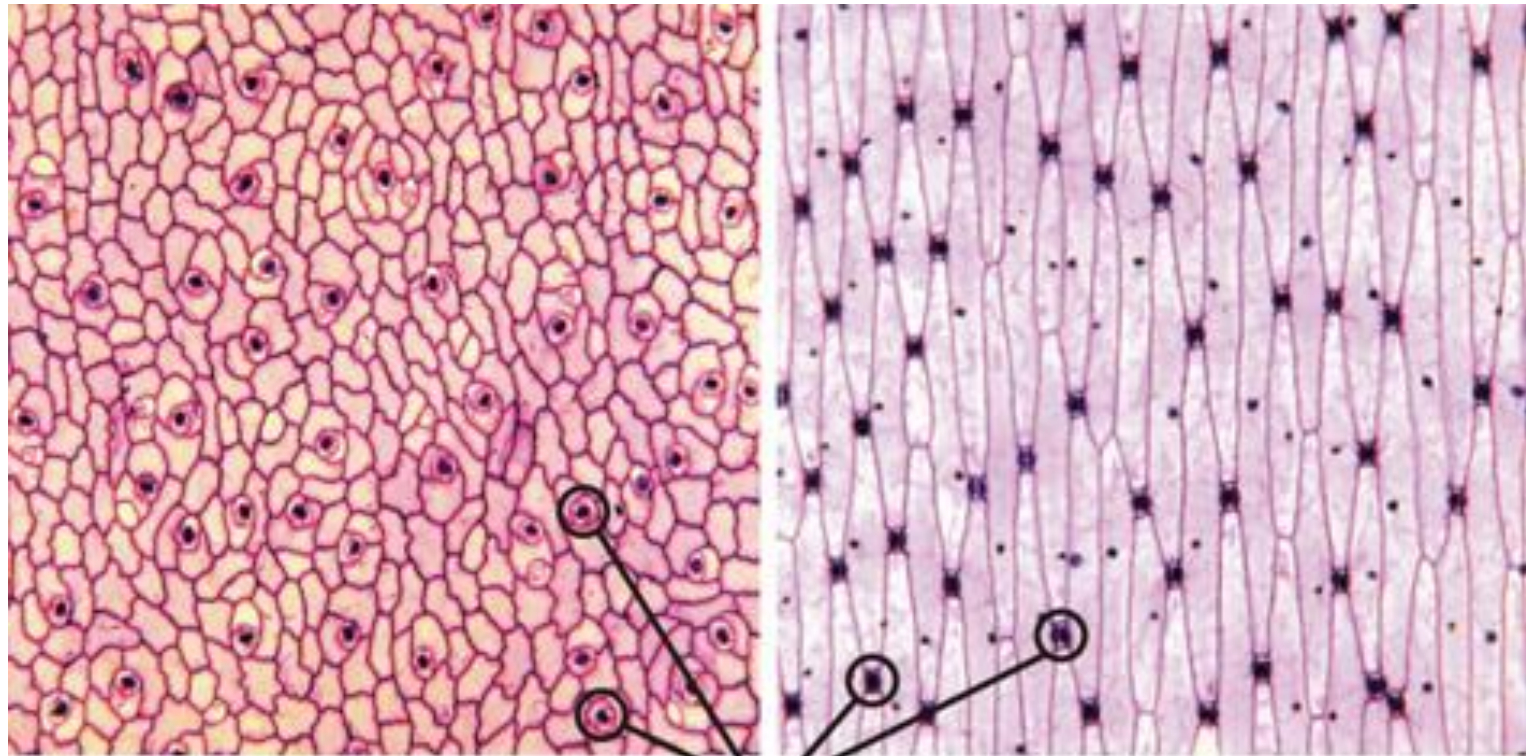


Se avviene una precoce divisione simmetrica, gli stomi si formano vicini l'uno all'altro.

Dal Libro di testo: Elementi di Biologia dello Sviluppo delle Piante, ed. EdiSES

STOMI NELLE DICOTILEDONI E MONOCOTILEDONI

epidermide fogliare osservata al microscopio ottico



Dicotiledoni

stomi

Monocotiledoni

La formazione di uno stoma determina in modo irreversibile il posizionamento di tutti gli altri all'interno di una foglia (processo a catena).

È stato dimostrato che la posizione di uno stoma è controllata sia dalla posizione sia dall'orientamento del piano di divisione cellulare.

Probabilmente i meristemoidi o le cellule di guardia in formazione producono fattori, forse segnali extracellulari, che inibiscono la formazione di altri stomi nelle loro vicinanze.

È plausibile l'implicazione di geni specifici, e l'attività di ormoni specifici (es. **brassinosteroidi**).

Il tessuto vascolare delle foglie delle Angiosperme inizia con il differenziamento del procambio della nervatura mediana. Questo si differenzia verso l'alto nel primordio come un'estensione del procambio della traccia fogliare.



I cordoni procambiali del fusto prendono origine in una posizione più bassa rispetto al meristema apicale, proprio al di sotto dei primordi fogliari in via di sviluppo.

A volte sono già presenti al di sotto dei siti di formazione delle foglie, ancora prima che gli abbozzi fogliari siano distinguibili.

Man mano che il primordio fogliare si allunga, i cordoni procambiali del fusto si differenziano verso l'alto dentro il primordio cosicché **fin dal primo momento, il sistema procambiale della foglia è continuo con quello del fusto.**

Tutte le grandi nervature si sviluppano verso l'alto e in direzione dei margini della foglia, in continuità con il procambio della nervatura mediana. Le nervature più piccole o minori iniziano a formarsi all'apice della foglia e si sviluppano dall'apice verso la base fogliare, sempre in continuità con le nervature più grosse.

Il margine apicale della foglia è quindi la prima regione fogliare a completare il sistema di conduzione. Questo andamento differenziativo riflette la direzione della maturazione dell'organo.

L'organizzazione dei cordoni procambiali probabilmente dipende dal **trasporto dell'auxina**, ma come ciò avvenga non è ancora chiaro.

La formazione delle nervature di diverse dimensioni dipende da una diversa durata dell'attività proliferativa delle cellule procambiali, cioè nelle nervature più piccole l'attività proliferativa termina prima rispetto alle nervature più grandi.

Le fasi precoci dello sviluppo del procambio sono sotto il controllo del fattore di trascrizione **ATHB8** che è anche implicato nel differenziamento del tessuto vascolare della radice e del fusto.

L'attività di questo gene è modulata dall'auxina.

La funzione di *ATHB8* durante il differenziamento vascolare sarebbe quella di mantenere le cellule in uno stato competente cioè in grado di rispondere all'auxina e di interagire con altri fattori di trascrizione.