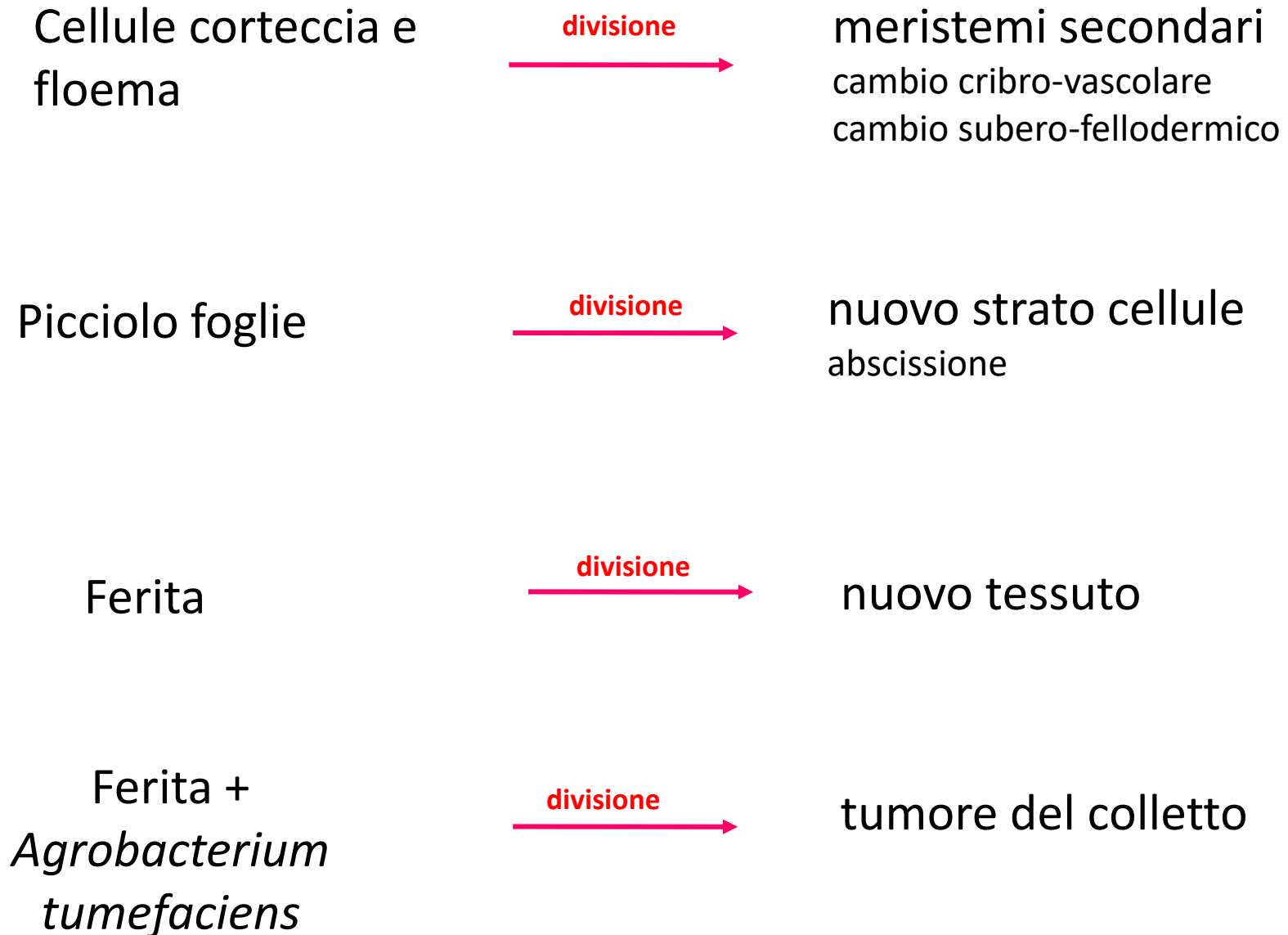


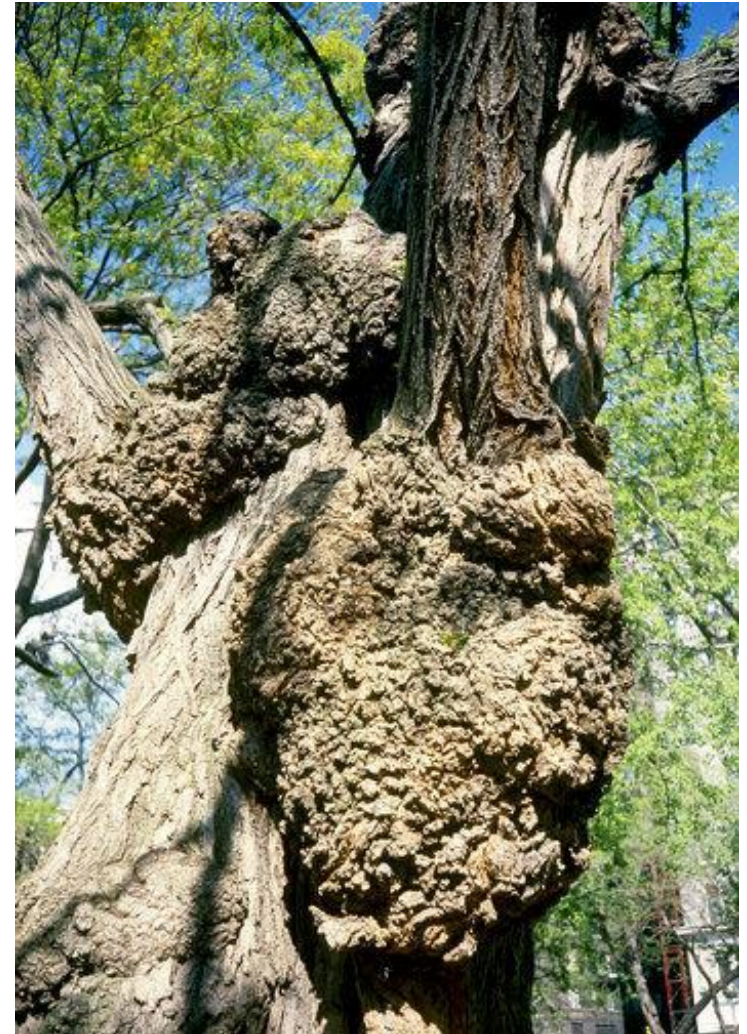
# LE CITOCHININE

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



Cellule già differenziate possono acquisire nuovamente la capacità di dividersi:





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

# Studi sulla coltivazione di organi e tessuti vegetali

## 1930 White

Tessuti da radici di pomodoro  crescono in terreno minimo (saccarosio + sali)

Tessuti da fusti  non crescono, anche in presenza di auxina

Quando il fusto radica  cresce anche il germoglio

Un fattore prodotto dalla radice regola la crescita del fusto

# Ricerca di sostanze in grado di stimolare la proliferazione cellulare

Succo di pomodoro  
Endosperma liquido noce di cocco (latte di cocco)

Mezzo di White: auxina + 30% latte di cocco



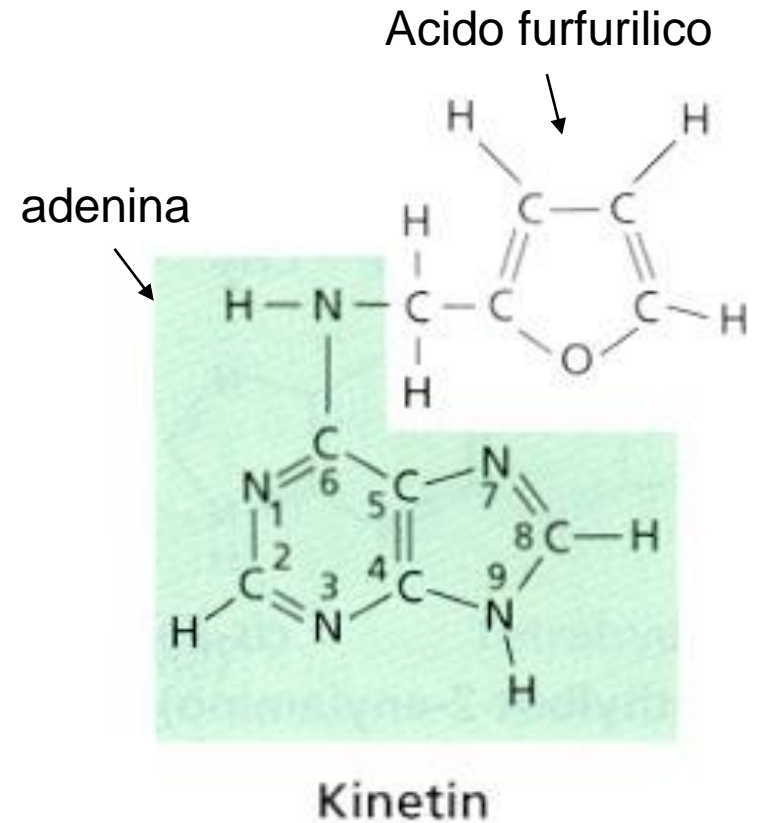
Efficace su molti tessuti:  
formazione di calli

Nel 1974 nel latte di cocco identificata la **Zeatina**

## La prima citochinina (sintetica) scoperta è stata la chinetina

Skoog (anni '50): DNA di aringa autoclavato stimolava la divisione cellulare in tessuti in coltura di tabacco

Chinetina  
(6-furfuril-aminopurina)



Esiste nelle piante una sostanza simile alla chinetina?

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

**Zeatina** (derivato dell'adenina, con catena laterale isoprenica)

Simile alla chinetina

Configurazione

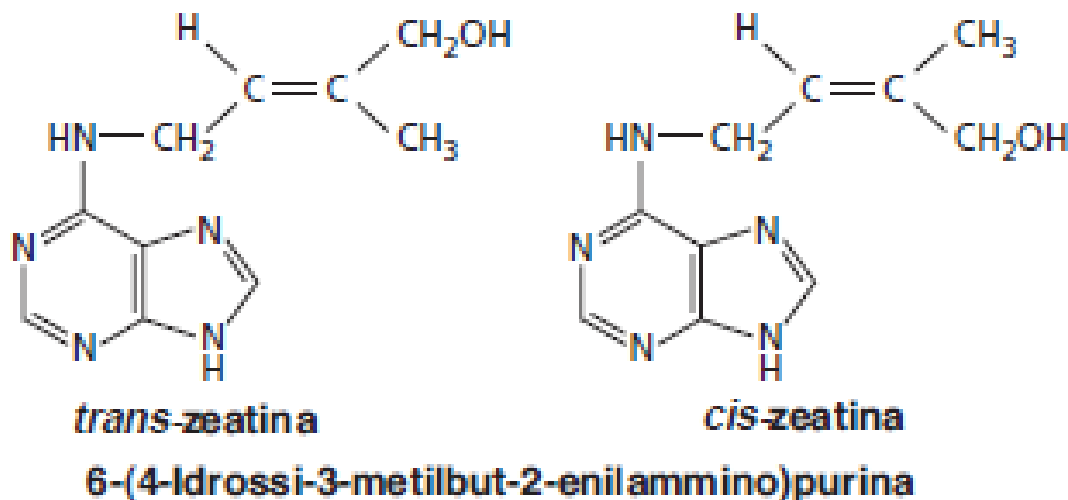
cis/trans

Inerconvertite

dalla Zeatina isomerasi

Ruolo biologico certo per

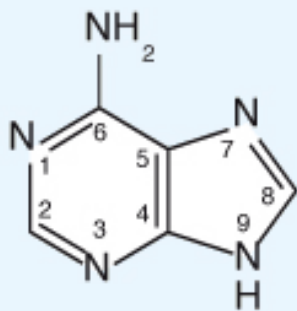
la forma trans



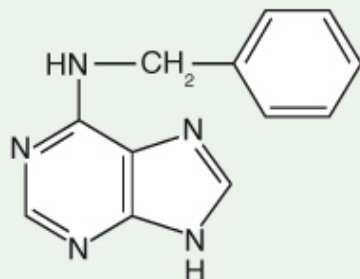


La zeatina è la citochinina principale nelle piante superiori ma altre citochinine sono state isolate da piante e batteri

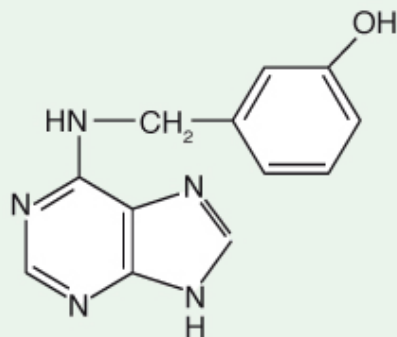
### Adenina



### Citochinine aromatiche

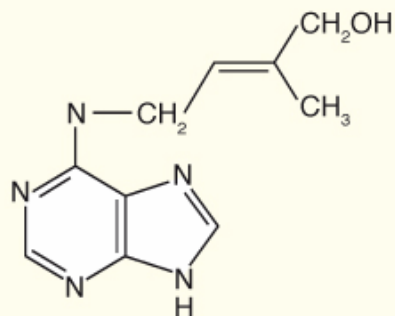


Benziladenina (BA)

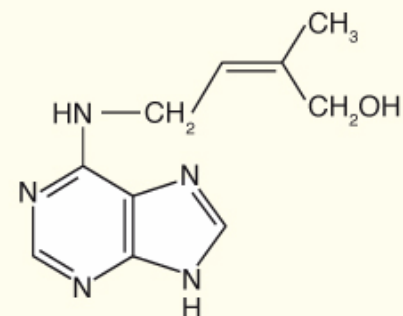


*meta*-topolina (mT)

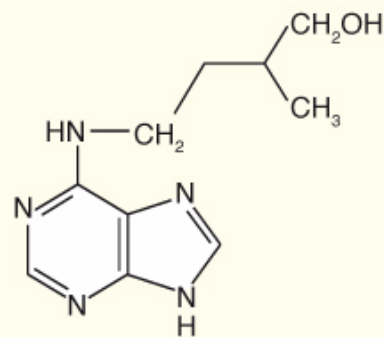
### Citochinine isoprenoidi



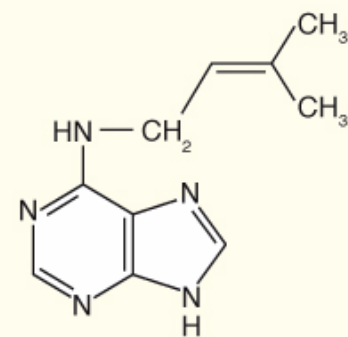
*Trans*-zeatina (tZ)



*Cis*-zeatina (cZ)



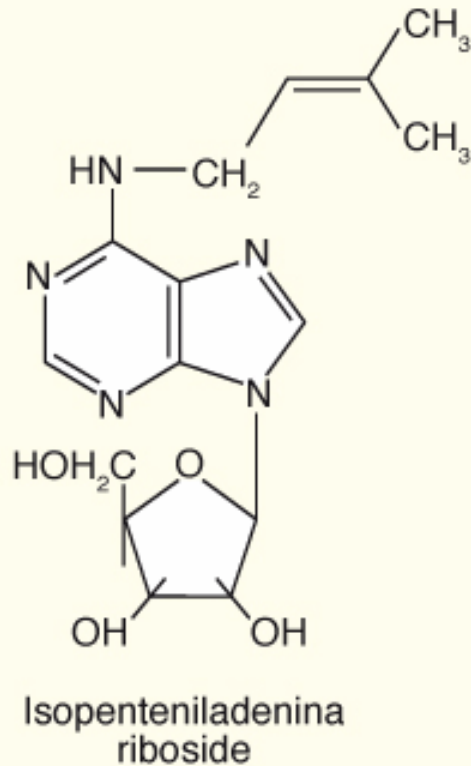
Diidrozeatina (DZ)



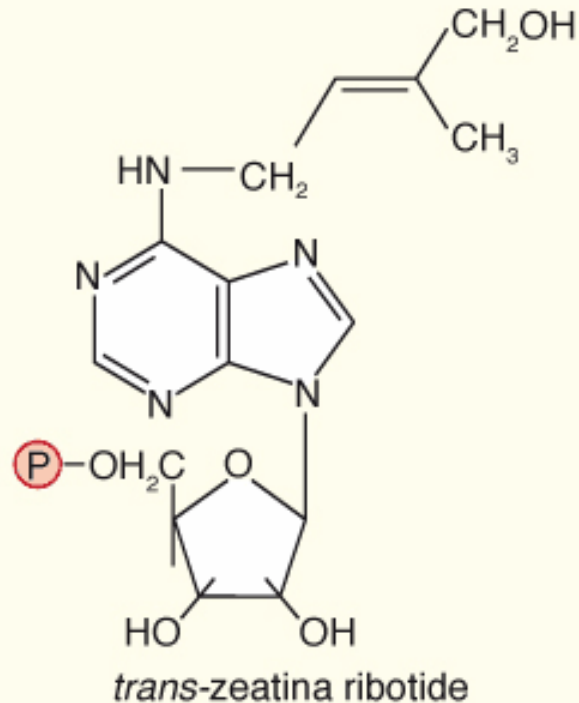
Isopenteniladenina (iP)

Le citochinine esistono anche in forma coniugata

Ribosidi



Ribotidi

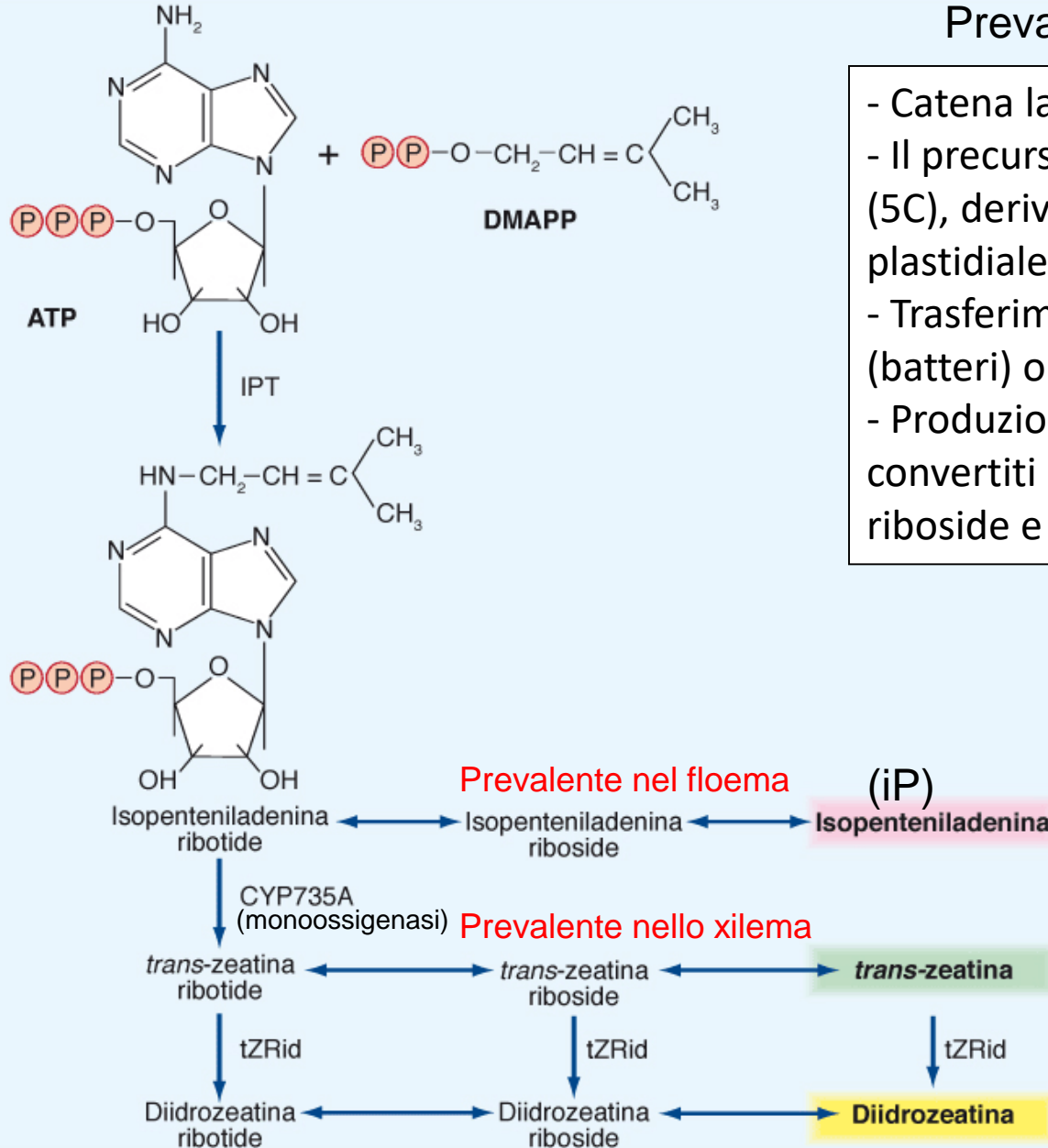


Possono funzionare da forme di riserva/trasporto dell'ormone, ma le forme biologicamente attive sono le basi libere!

# BIOSINTESI DELLE CITOCHININE ISOPRENOIDI

Prevalentemente nei plastidi

- Catena laterale derivata da isoprene
- Il precursore è il dimetil-allil-difosfato (5C), derivato da via biosintetica plastidiale.
- Trasferimento unità isoprenica su AMP (batteri) o ATP/ADP (piante)
- Produzione di isopentenil-ribotidi, convertiti poi a zeatina-ribotide, zeatina riboside e infine nella forma libera



Il passaggio chiave della via biosintetica è catalizzato da

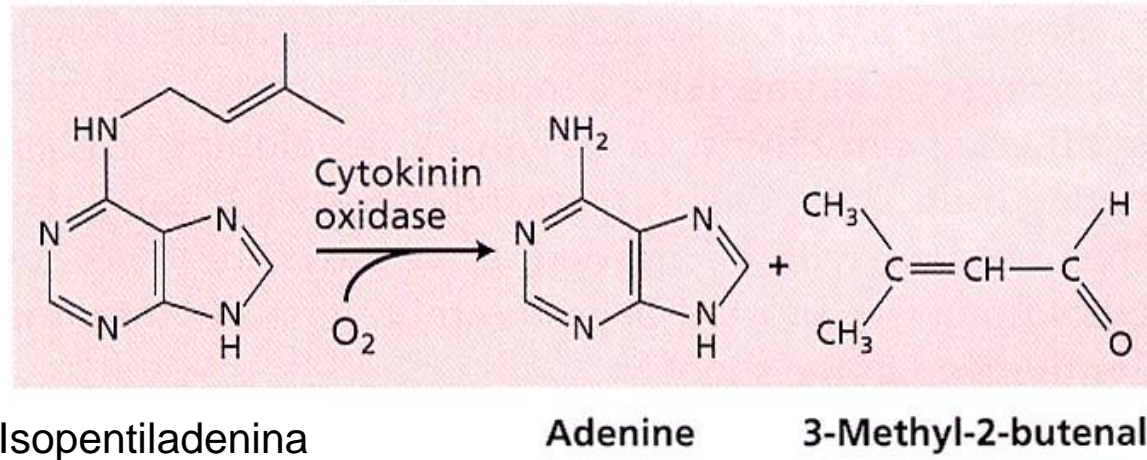
**IPT: Isopentenil transferasi**  
(citochinina sintasi)



**La sintesi delle citochinine avviene principalmente nella radice**

## Inattivazione delle citochinine

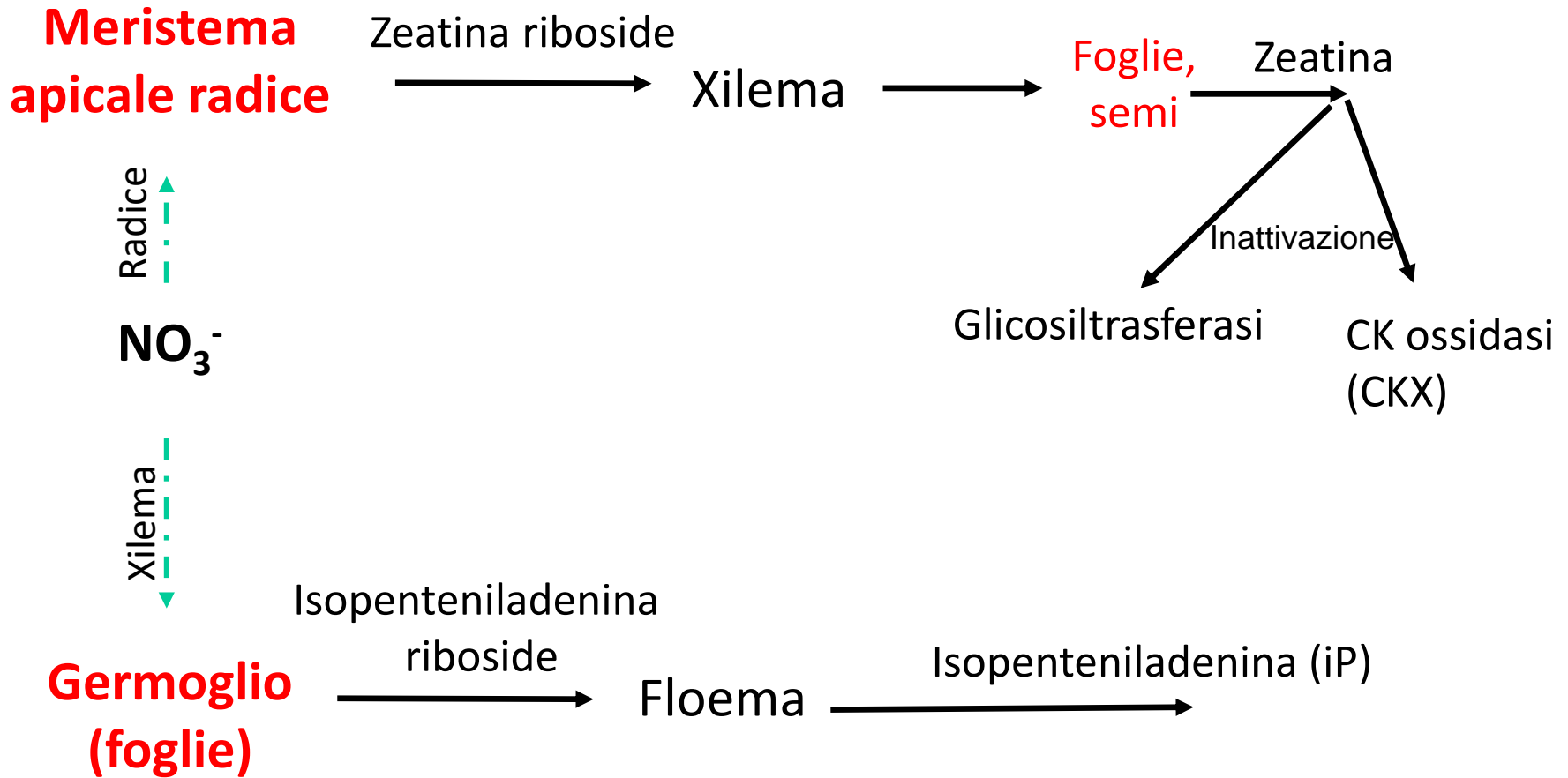
**Irreversibile**  
(catabolismo):



Gene citochinina ossidasi  $\longrightarrow$  indotto da citochinine (feedback negativo)

**Reversibile:** per glucosilazione (coniugazione con zuccheri) su N<sup>3</sup> o su OH della catena laterale. Glicosiltransferasi

# Trasporto delle citochinine: sono trasportate nello xilema e nel floema

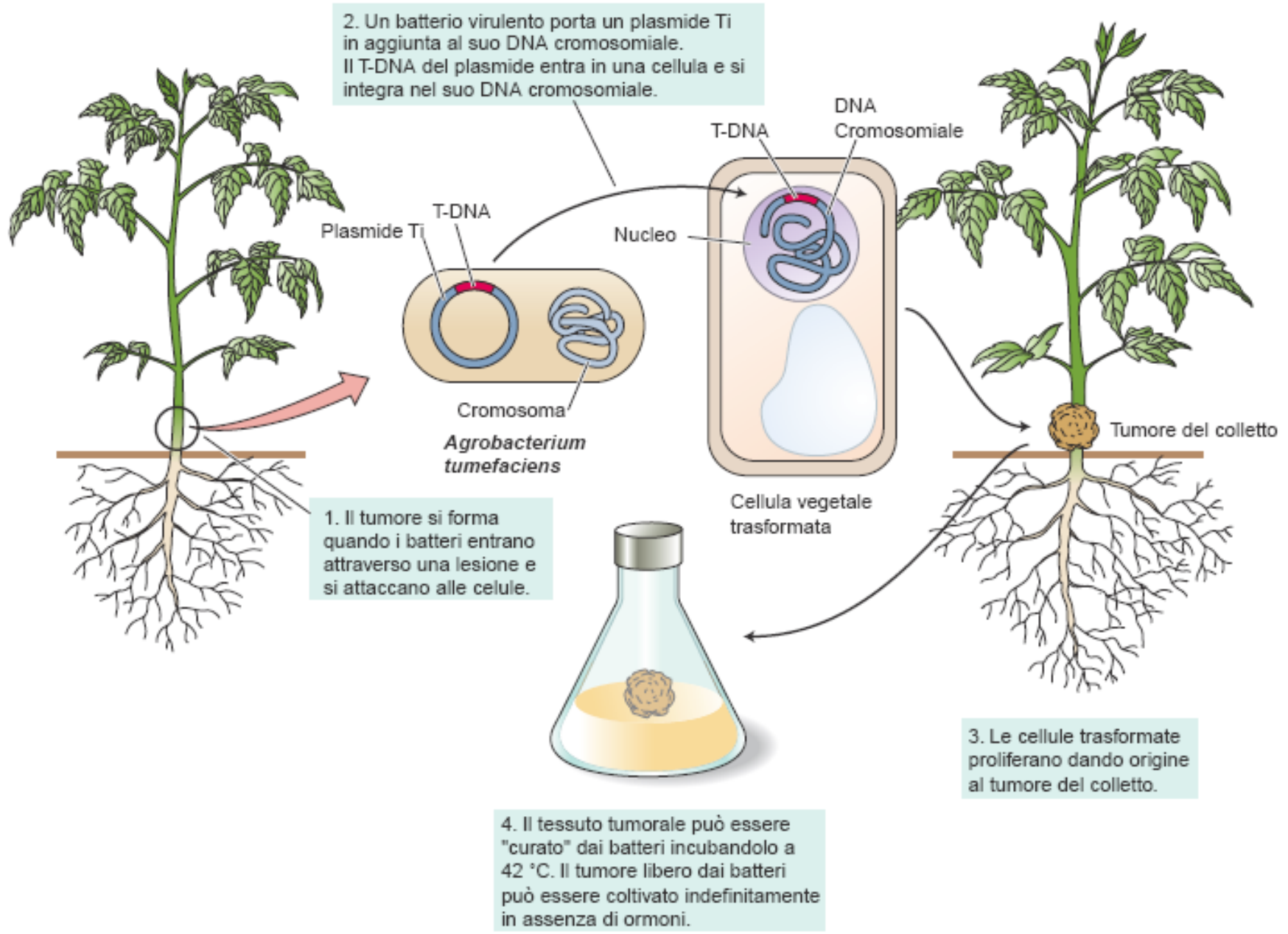


Regolazione della crescita e sviluppo della pianta tramite segnalazione a lunga distanza dello **stato di nutrizione azotata**

Tumore del colletto: causato da infezioni di *Agrobacterium tumefaciens*

Il tessuto infettato prolifera e produce una massa di cellule indifferenziate (callo)







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

Nel mezzo si ritrovano notevoli quantità di auxine e citochinine

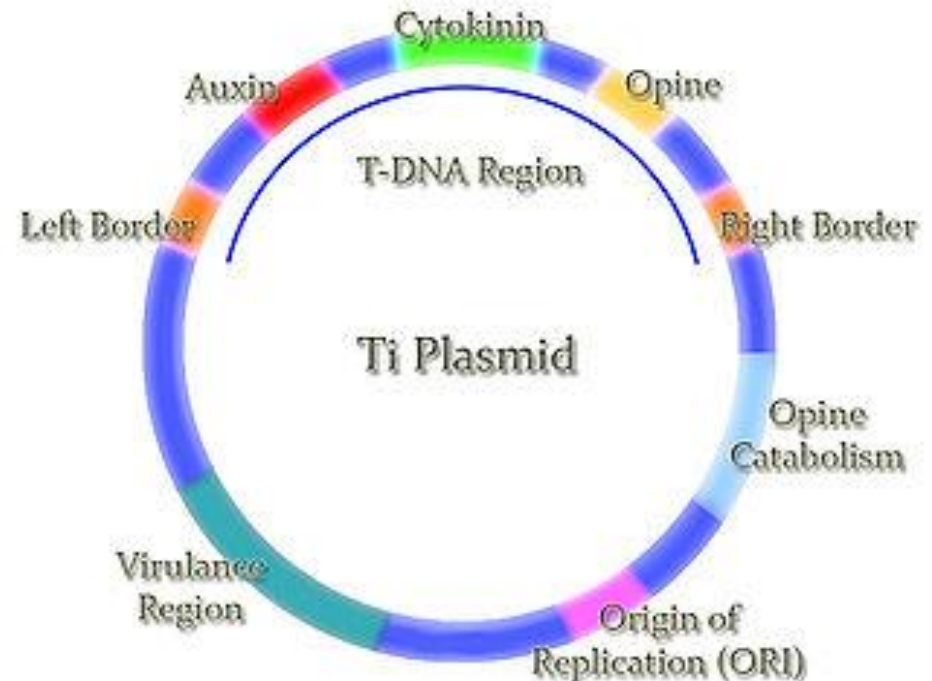
*Agrobacterium* trasferisce nel genoma della pianta il **T-DNA** contenuto nel **plasmide Ti**

### **T-DNA:**

**Gene Ipt (Isopenteniltransferasi)  
batterico**

**2 geni sintesi IAA**

**Gene sintesi opina**

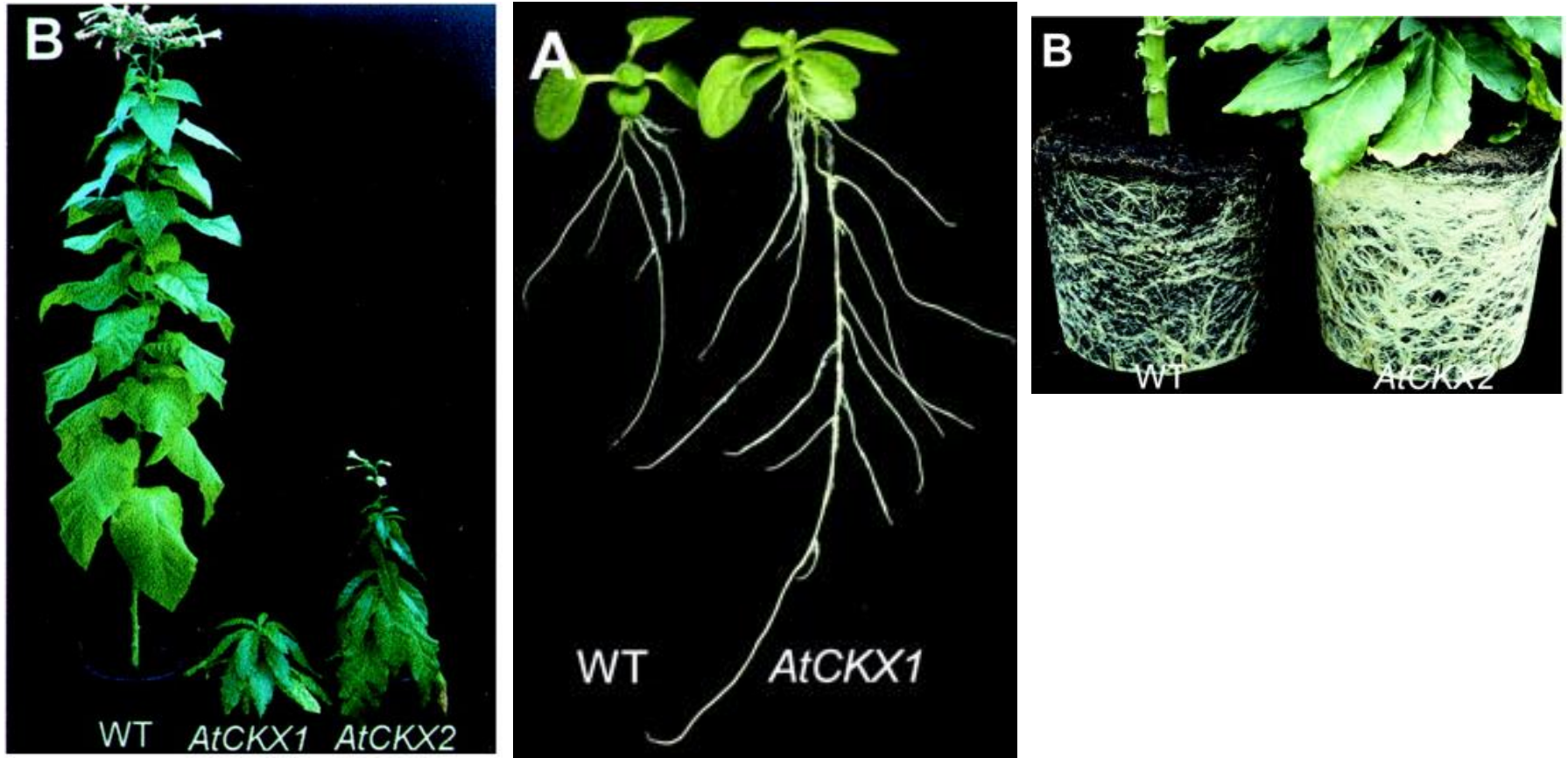


# Effetti delle citochinine su accrescimento e sviluppo

- Regolano la divisione cellulare
- Regolano la dominanza apicale
- Ritardano la senescenza fogliare
- Promuovono il movimento di nutrienti
- Promuovono la differenziazione dei cloroplasti

## Regolazione della divisione cellulare

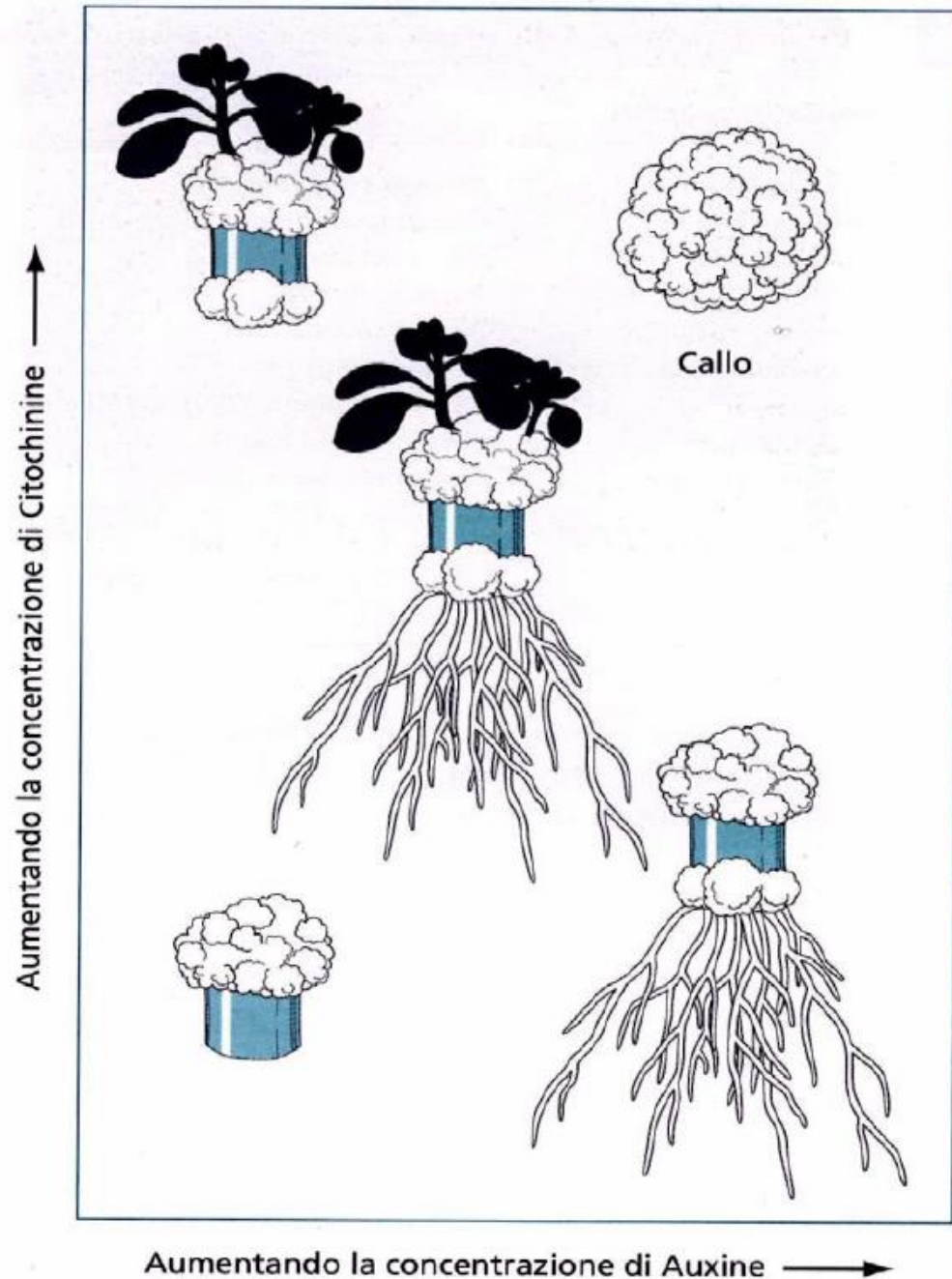
Piante che sovraesprimono il gene della Citochinina ossidasi hanno uno sviluppo ridotto del germoglio e un'aumentata crescita delle radici laterali



**Le citochinine stimolano la crescita del germoglio** (stimolazione divisioni cellulari meristema apicale) **ma reprimono la crescita della radice** (stimolazione differenziamento tessuto vascolare e riduzione dimensioni meristema, meno radici).

Il rapporto auxina/citochinina regola la morfogenesi di tessuti in coltura

(anche lo stato nutritivo di una pianta regola i livelli di citochinine: il rapporto auxina:citochinina regola anche il tasso di crescita relativo di radice e germoglio)



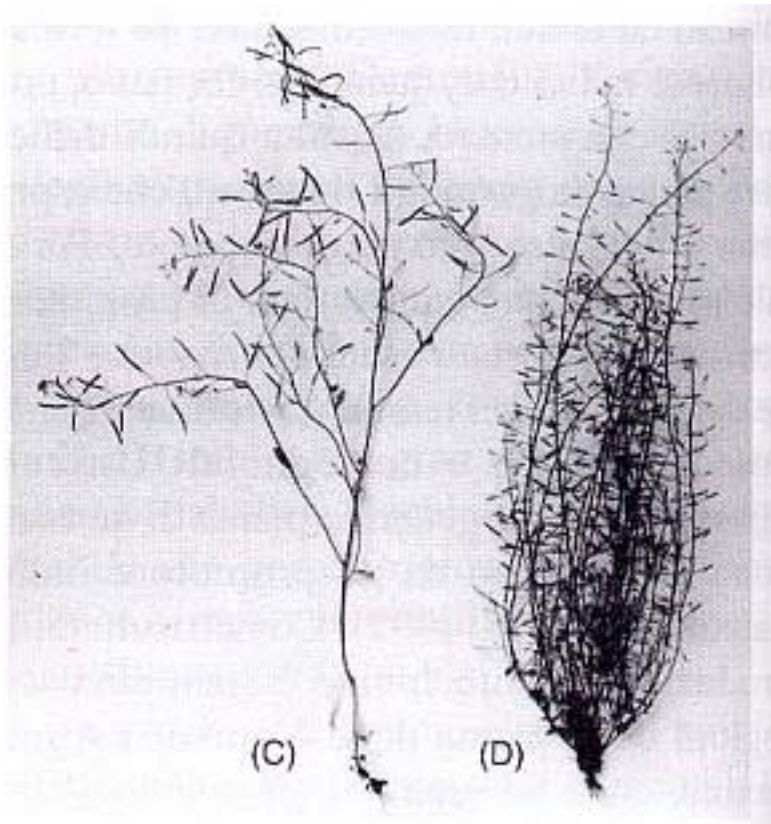
# Pianta trasformata con isopenteniltransferasi (ipt) batterica

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

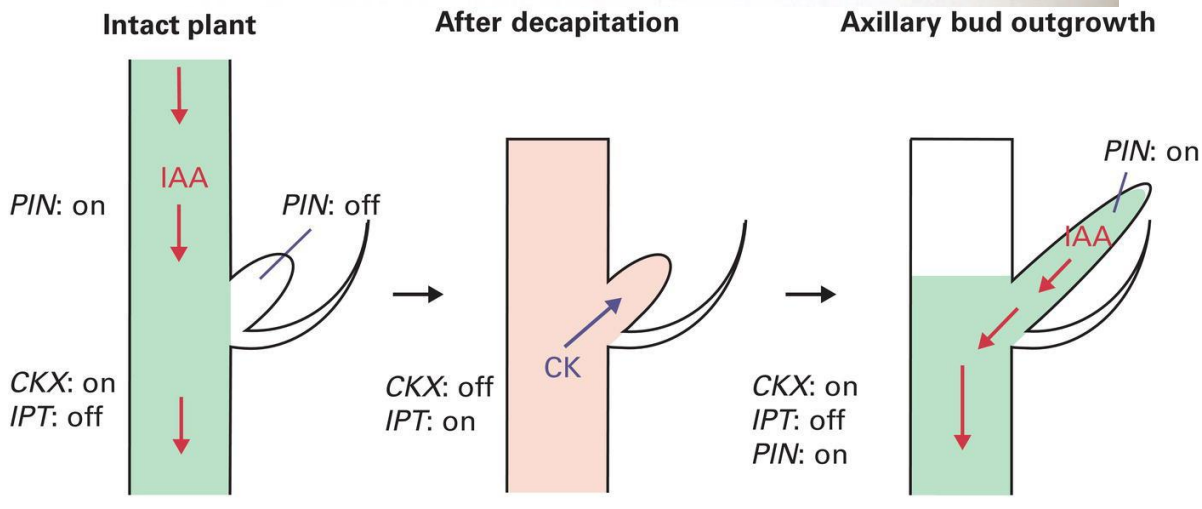
## Ridotta dominanza apicale:

le citochinine promuovono la crescita delle gemme laterali,  
in antagonismo all'auxina

Piante che sovraproducono citochinine  
hanno una ridotta dominanza apicale



Abete infettato da *Rhodococcus fascians*

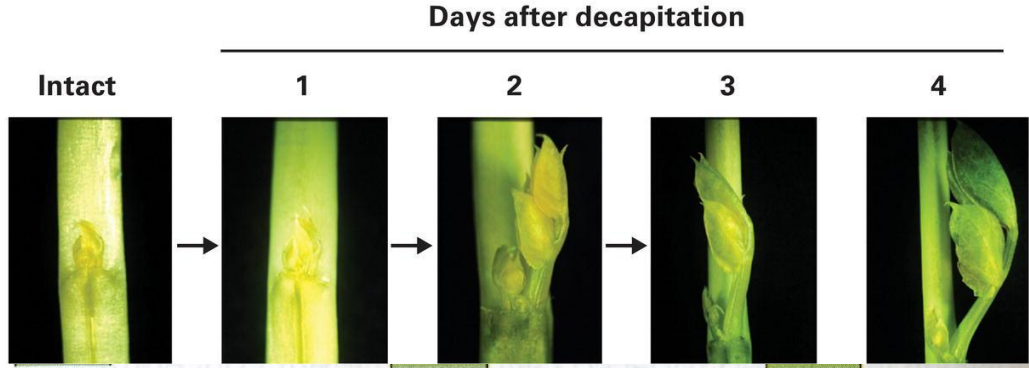


IAA prodotta da germoglio apicale

A livello del nodo reprime espressione di IPT e stimola espressione di CKX

IAA mantiene bassi i livelli di citochinine nelle gemme laterali

Rimozione germoglio, meno auxina nelle regioni nodali, aumento produzione citochinine, crescita gemma laterale



Removal of the apical meristem cuts off supply of auxin. *IPT* genes are activated and *CKX* (cytokinin oxidase) genes are turned off. Cytokinin moves into the adjacent bud.

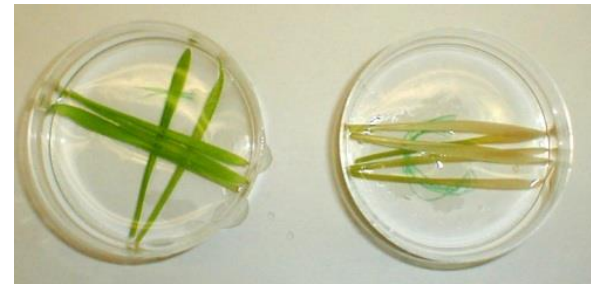
Cytokinin activates bud growth. The branch meristem starts producing auxin.

Nota: nei primi modelli si ipotizzava che l'auxina bloccasse la sintesi di citochinine solo a livello radicale; recente dimostrazione della sintesi di citochinine anche nelle regioni nodali.

# Le citochinine ritardano la senescenza fogliare

Applicazione citochinine  $\longrightarrow$  ritardo senescenza:

- Aumento attività di enzimi antiossidanti (catalasi, perossidasi)
- Aumento influsso di nutrienti nella foglia e funzionalità dei cloroplasti



ipt C

$\longleftarrow$  Piante trasformate con un «gene chimerico» (Gene ipt + gene promotore senescenza-specifico):  
Blocco della senescenza

«Isole verdi»:





## Prolungata durata delle colture

Gene promotore della senescenza (SAG12) + gene IPT

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

Piante di lattuga di controllo



**Figura 21.25** La senescenza fogliare è ritardata in piante transgeniche di lattuga che esprimono il gene per la biosintesi della citochinina *ipt* al tempo della senescenza. Le piante azigotiche (le cinque piante in alto) mancano del transgene; le piante *SAG12-IPT* (le cinque piante di sotto) utilizzano un gene promotore "associato alla senescenza" (*SAG12*) per guidare l'espressione di *ipt* all'inizio della senescenza. (Da McCabe *et al.* 2001).

Gibberelline:  
regolatori dell'altezza delle piante  
e della germinazione dei semi

## BAKANAE

(malattia del “germoglio sciocco”)

Malattia del riso diffusa in

Asia causata dal fungo

*Gibberella fujikuroi*



- **1930** (Giappone) Isolamento di cristalli impuri di composti attivi (gibberellina A)
- **1950** (USA, GB) Struttura chimica acido gibberellico ( $GA_3$ )
- **1950** (Giappone) dalla GA A isolate e caratterizzate  $GA_1$ ,  $GA_2$ ,  $GA_3$
- **1958** Identificazione e purificazione nelle piante ( $GA_1$ ) (in semi di fagiolo immaturi)

**ATTUALMENTE SONO NOTE 136 GIBBERELLINE naturali** (presenti in piante, funghi, batteri; 12 presenti in *G. fujikuroi*)

<https://agrikaido.com/plant-hormones/gibberellins/>

**NOMENCLATURA:** GA<sub>x</sub>, a seconda dell'ordine cronologico della scoperta

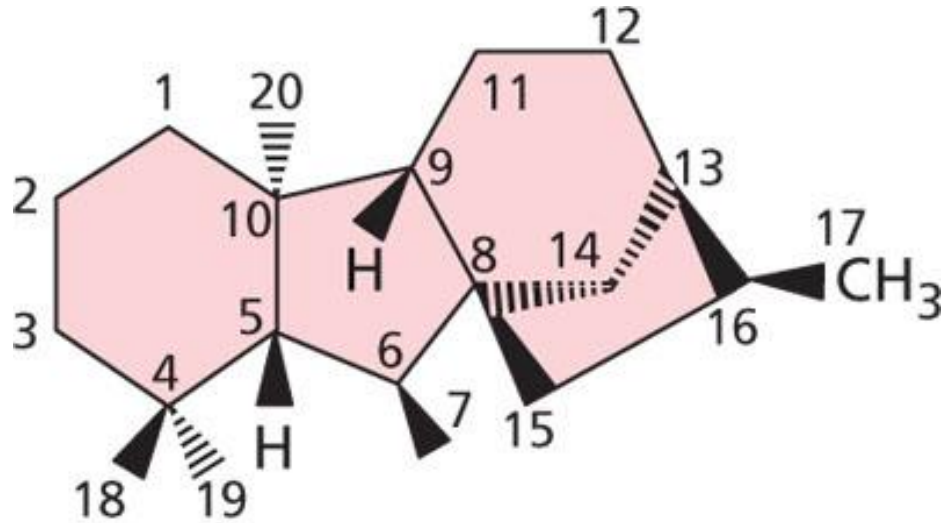
Insieme di composti definiti in base alla loro struttura

chimica e non rispetto alla loro attività biologica

Sono note molte gibberelline,  
ma solo poche di queste sono biologicamente attive

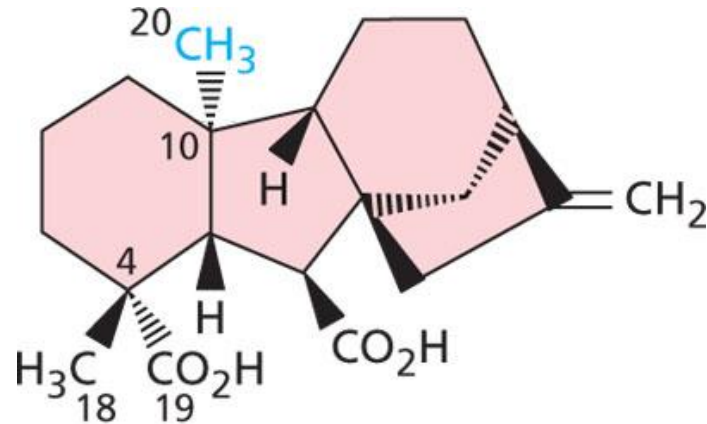
# STRUTTURA BASE DELLE GIBBERELLINE

Diterpeni tetraciclici, 4 unità isoprenoidi, 20 o 19 C



*ent*-Gibberellano

Le gibberelline contengono 19 o 20 atomi di carbonio

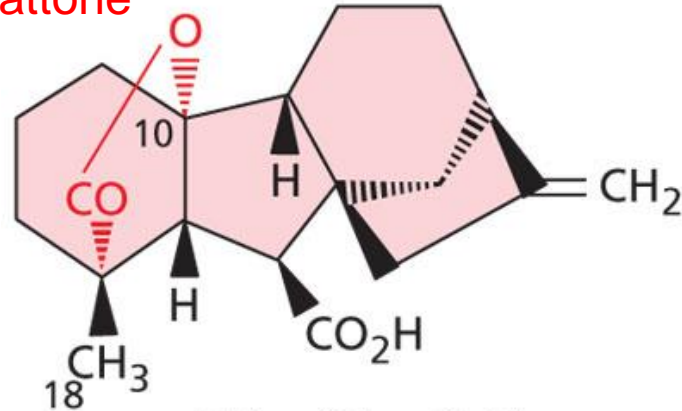


GA<sub>12</sub>

(C<sub>20</sub>)

GA<sub>12</sub> (C<sub>20</sub>-GA)

lattone



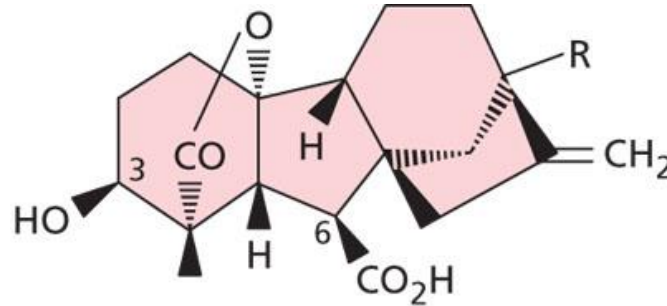
GA<sub>9</sub>

(C<sub>19</sub>)

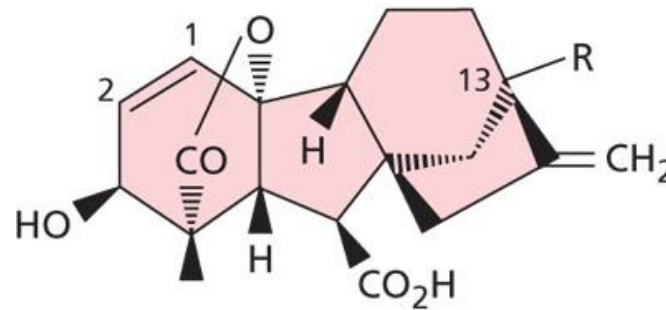
GA<sub>9</sub> (C<sub>19</sub>-GA)

# DIFFERENZE NEL NUMERO E NELLA POSIZIONE DI -OH

**Firme bioattive**  
(> affinità per il recettore):  
**-COOH sul C6**  
**-OH sul C3**



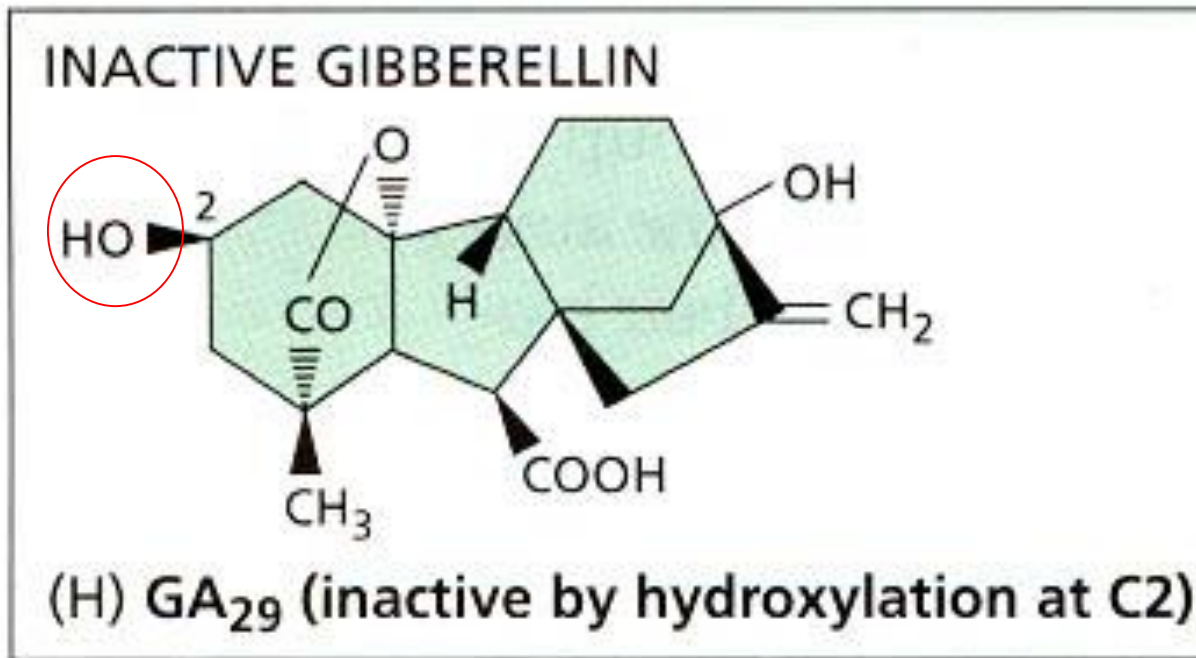
**GA<sub>4</sub>**    R = H  
**GA<sub>1</sub>**    R = OH



**GA<sub>7</sub>**    R = H  
**GA<sub>3</sub>**    R = OH



Idrossilazione in C2 abolisce l'attività biologica  
(impedisce legame GA con il recettore)



La maggior parte delle gibberelline sono dei precursori di quelle biologicamente attive

Nella maggior parte delle piante  
le gibberelline attive sono  $GA_1$  e  $GA_4$

Altre GA attive:

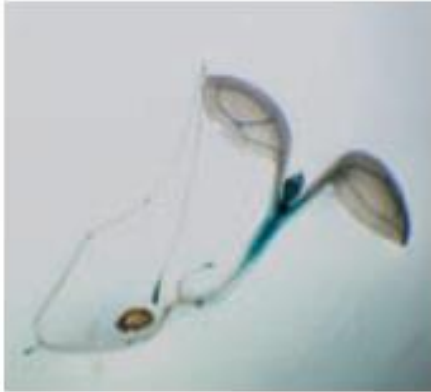
$GA_3$

$GA_7$

$GA_9$

La biosintesi di GA avviene in molti tessuti e in tutti gli stadi di vita della pianta  
Precursore: GGPP

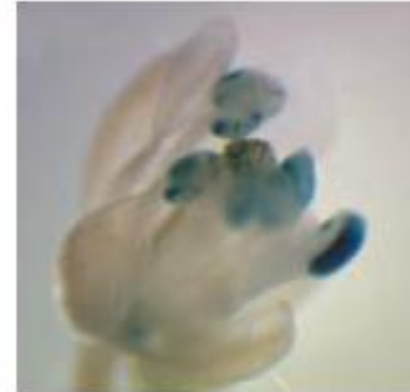
(A) Pianticella di 5 giorni



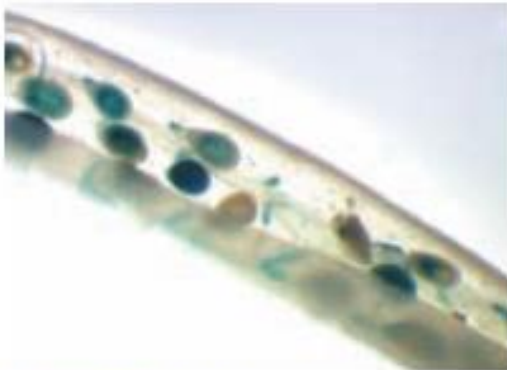
(B) Pianticella di 3 settimane



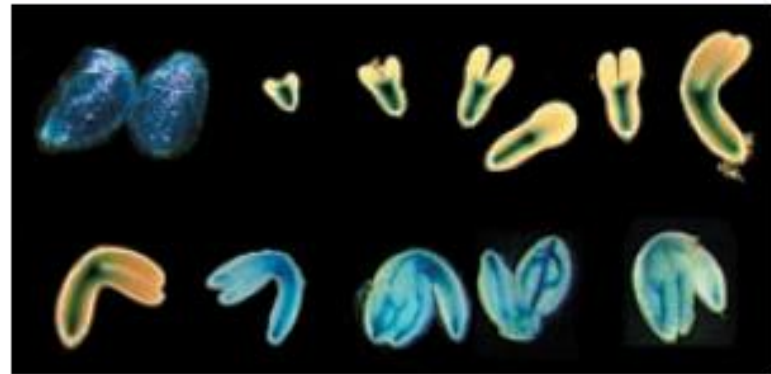
(C) Fiore aperto



(D) Siliqua matura con semi



(E) Embrioni in sviluppo



Attività del gene promotore GA1:  
codifica per CPS (ent- coparyl-difosfato sintasi,  
presente nel plastidio)

## PRIMI STUDI SULL'ATTIVITA' DELLE GIBBERELLINE

Effetto  $GA_3$  sulla crescita dello  
stelo fiorale del cavolo  
(condizioni sd non induttive)

Allungamento degli internodi su piante a  
rosetta

Stimolazione divisione cellulare e crescita per  
distensione



## Effetti delle gibberelline su accrescimento e sviluppo

- **Stimolano l'accrescimento del fusto**
- Sostituiscono il segnale fotoperiodico (giorno lungo) nelle specie longidiurne
- **Regolano la transizione dalla fase giovanile alla fase adulta**
- Influiscono sulla formazione dei fiori
- Promuovono l'accrescimento del tubetto pollinico
- **Promuovono fruttificazione e partenocarpia**
- **Promuovono lo sviluppo e la germinazione del seme**

# Effetto di GA<sub>1</sub> su mais nano



+ GA



Mutante nano

normale

## Regolano la transizione dalla fase giovanile ad adulta

(A) Abete bianco



(C) Pianticella di sequoia gigante



L'applicazione di  $GA_4+GA_7$  o  $GA_3$  induce conifere giovanili ad entrare in fase riproduttiva producendo coni precocemente

Avviene il contrario e.g. in *Edera*

# Promuovono la fruttificazione e la partenocarpia

Figure 39.11 The effect of gibberellin treatment on seedless grapes



L'applicazione di GA promuove l'accrescimento del frutto

La fruttificazione indotta da GA può avvenire anche in assenza di impollinazione portando alla formazione di frutti senza semi

Uva Thompson senza semi



## Promuovono lo sviluppo e la germinazione dei semi (interruzione della dormienza)

Mutanti carenti di GA hanno un tasso elevato di semi abortiti

In semi che richiedono luce (semi fotoblastici) o vernalizzazione per germinare le GA possono indurre la germinazione in assenza di stimolo ambientale

Nei cereali le GA inducono la produzione di  $\alpha$ -amilasi per la degradazione dell'amido dell'endosperma

# APPLICAZIONI COMMERCIALI

**GA<sub>3</sub>:**

- Produzione di frutti
- Accelerazione produzione di malto da orzo (birra)
- Aumento rese canna da zucchero



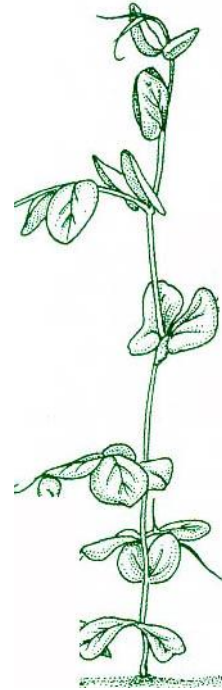
## **Ritardanti della crescita (antigibberelline)**

- Allevamento piante ornamentali (conifere, chiome più compatte)
- Cereali : minore crescita vegetativa (>produttività)





+GA



Le gibberelline sono dei regolatori di crescita naturali?

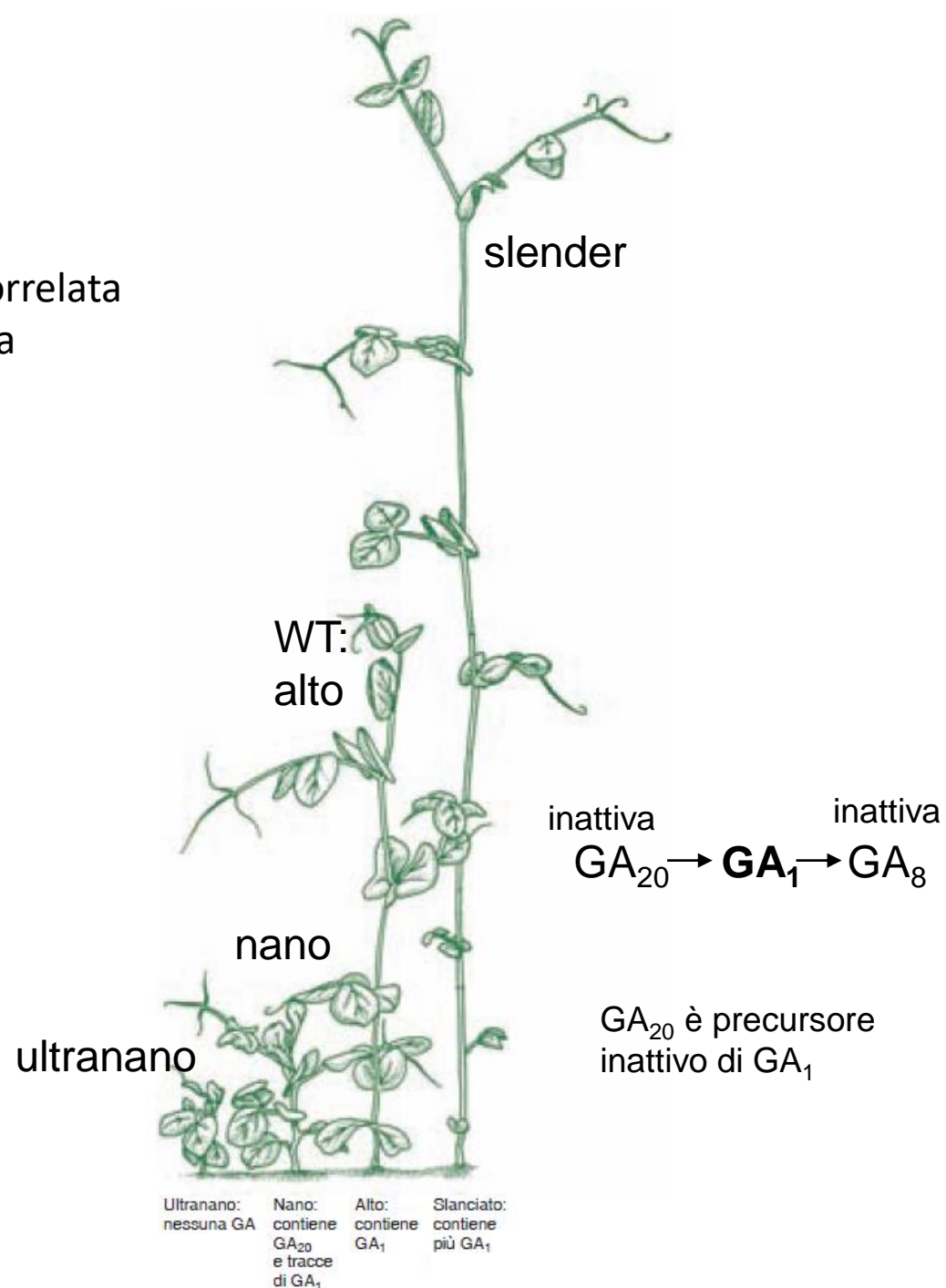
Le piante alte hanno più GAs delle piante nane?

La lunghezza del fusto è direttamente correlata alla quantità di GA attiva ( $GA_1$ ) endogena

Mutanti slender (*sln*): mancano gli enzimi di degradazione delle  $GA_1$

$GA_1$  è la principale gibberellina endogena bioattiva che regola la crescita dei fusti in mais e pisello

$GA_1$  e  $GA_4$  intrinsecamente bioattive per la crescita dei fusti

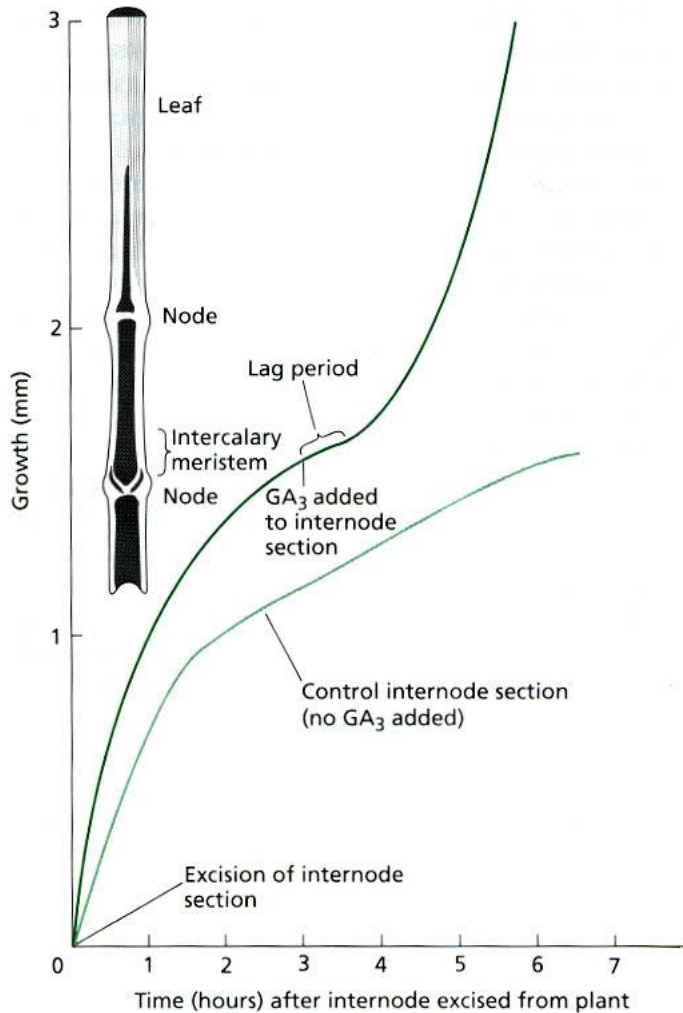


# Meccanismo di azione delle gibberelline

- Promozione della crescita del fusto  
(meristema intercalare del riso di acqua profonda)
  
- Degradazione dell'amido nell'endosperma  
(germinazione dei cereali)

# PROMOZIONE CRESCITA DEL FUSTO

(allungamento internodo superiore del riso)



➤ Aumento estensibilità parete cellulare

➤ No acidificazione apoplasto

➤ Lag time da 40 min a 3 ore

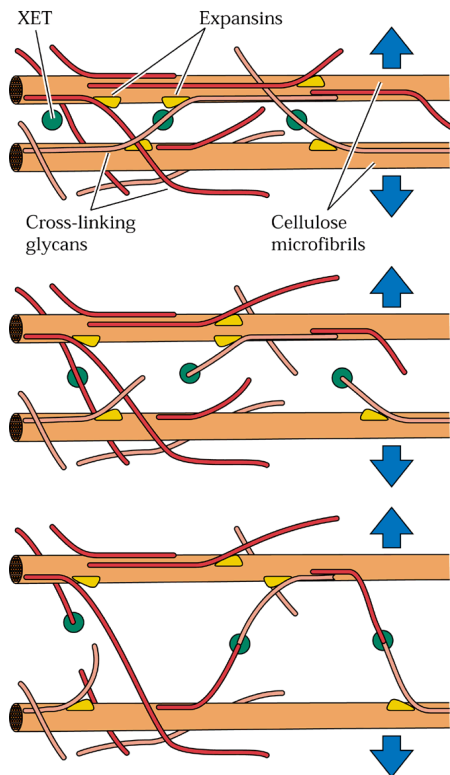
➤ Effetto additivo con IAA

=> meccanismo d'azione diverso da quello di IAA!

**Le GA stimolano sia l'espansione che la divisione cellulare**

## Azione delle GA sulla distensione cellulare (diversa da quella dell'auxina)

- aumento dei livelli di XET (xiloglucano endotransglicosidasi)
- aumento dei livelli di espressione del gene OsEXP4 (espansina)



sommersione:



Costrutto Antis. OsEXP4    Contr    Senso OsEXP4

knock-down genico

# Degradazione dell'amido nell'endosperma (dopo la germinazione delle cariossidi dei cereali)

