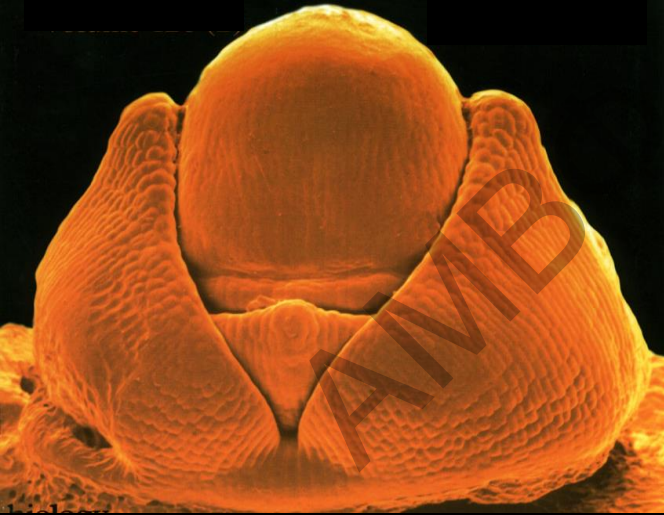


Αναπτυξιακή Μοριακή Βιολογία Φυτών...

...Ανάπτυξη των Φύλλων

Plant Molecular
Development

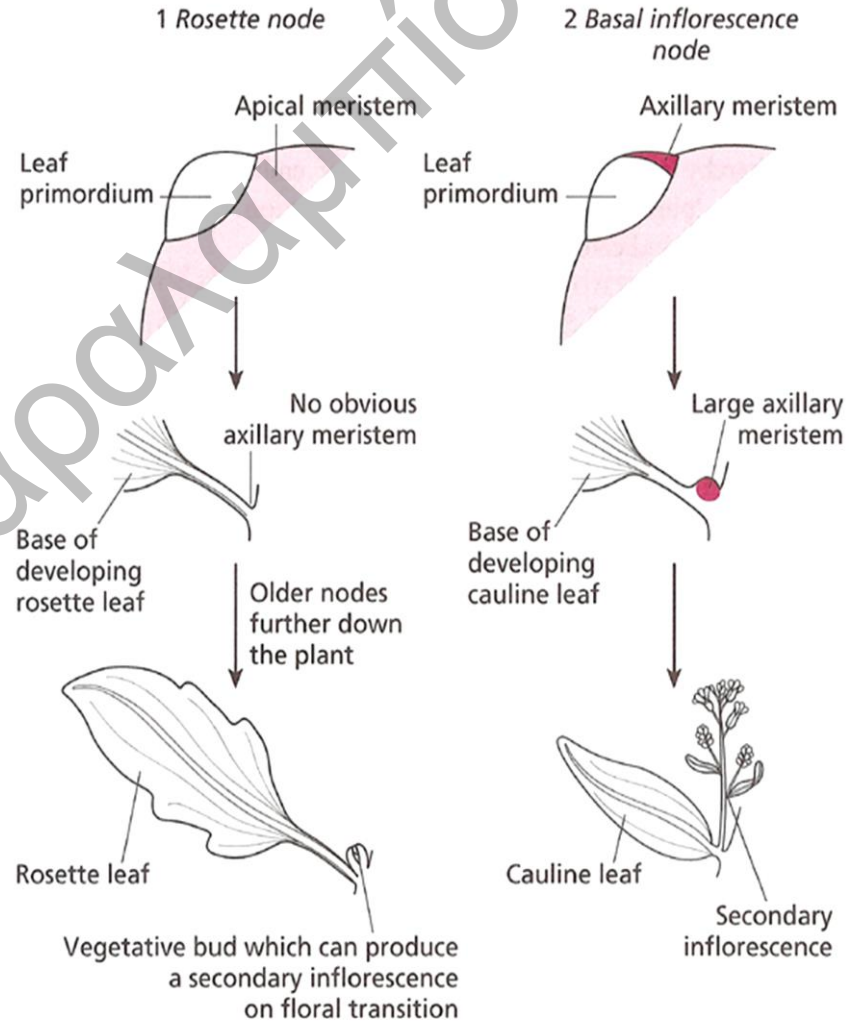
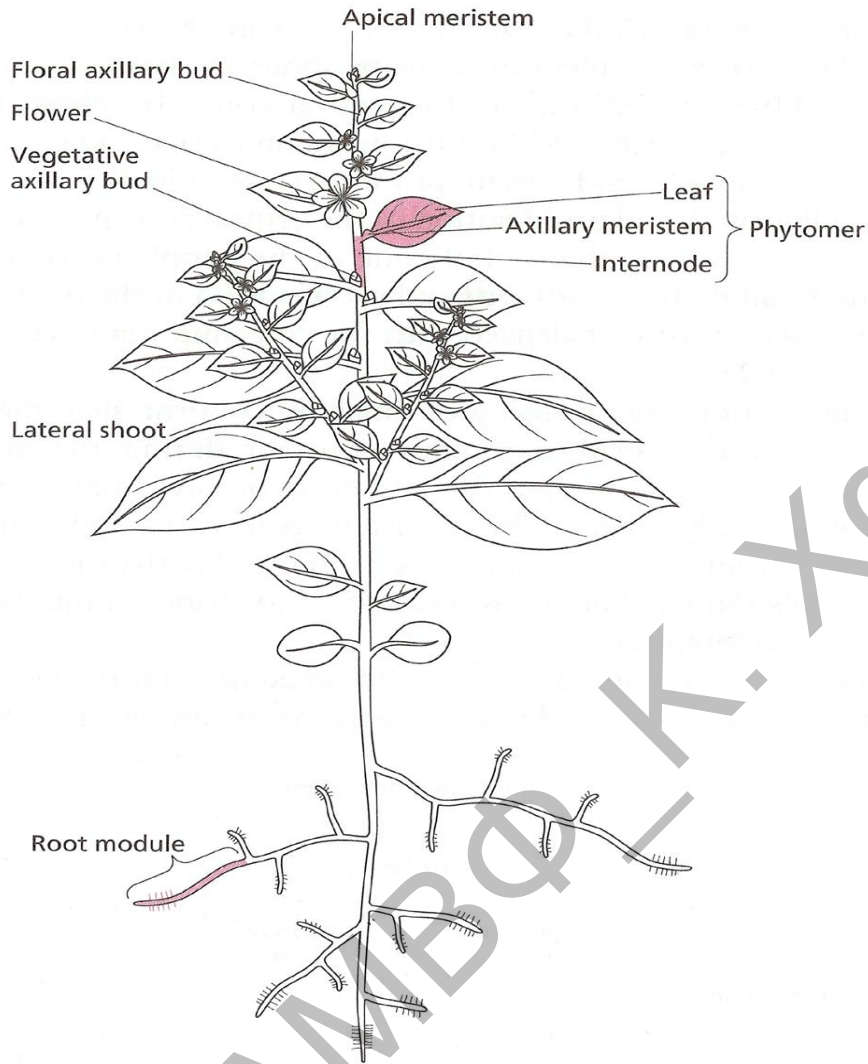


Τα φύλλα αποτελούν «όργανα ζωής»...

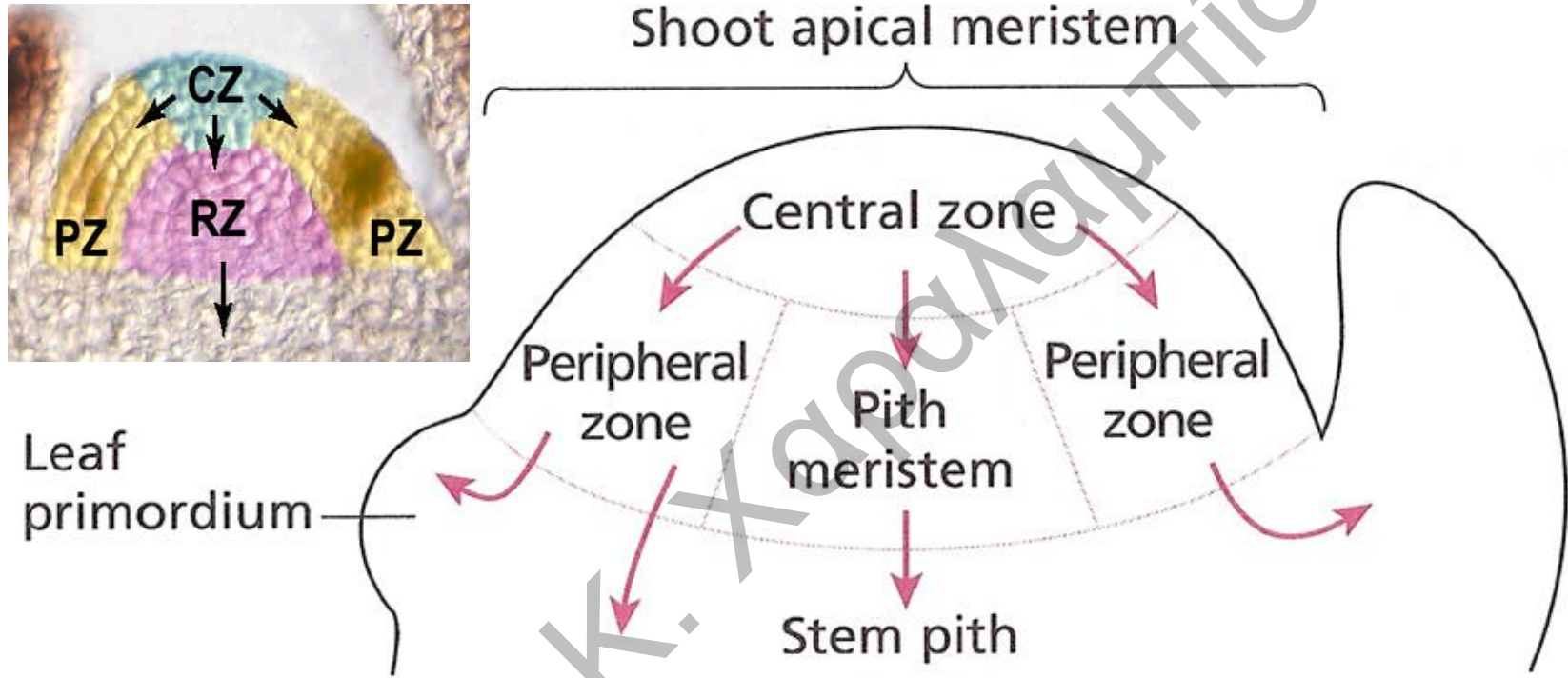
- Στα φύλλα των φυτών συντελείται ίσως η πιο σημαντική βιοχημική διεργασία στον πλανήτη... η **ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ**.
- Η φωτοσύνθεση επιτρέπει στα φυτά να αναπτυχθούν.
- Η ανάπτυξη των φυτών = **ΖΩΝΤΑΝΟΣ ΠΛΑΝΗΤΗΣ**.



Συντονισμός της ανάπτυξης στα φυτά



Διατήρηση και δράση του AMB



Προκειμένου το AMB να λειτουργήσει ως σημείο συνεχούς οργανογένεσης, είναι αναγκαία η διατήρηση μίας ισορροπίας μεταξύ της απώλειας βλαστικών κυττάρων λόγω διαφοροποίησης και της αντικατάστασης αυτών με κυτταρικές διαιρέσεις.

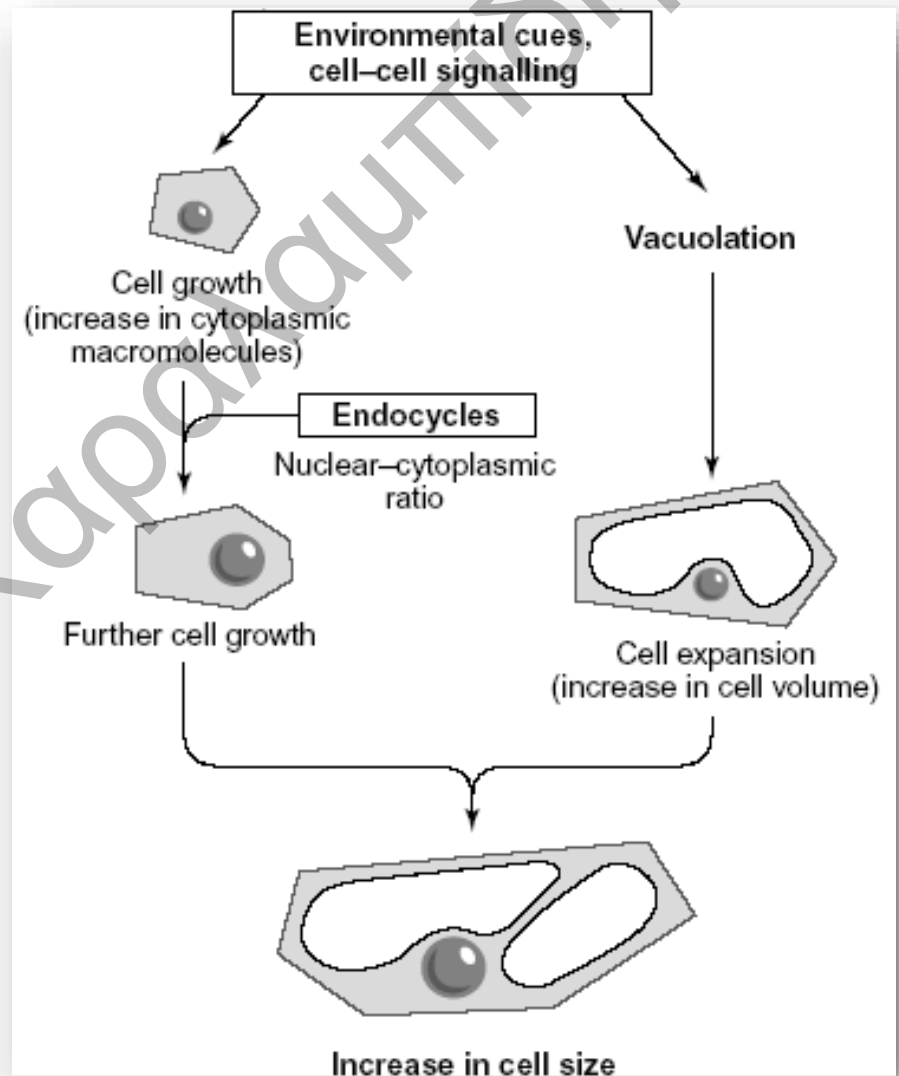
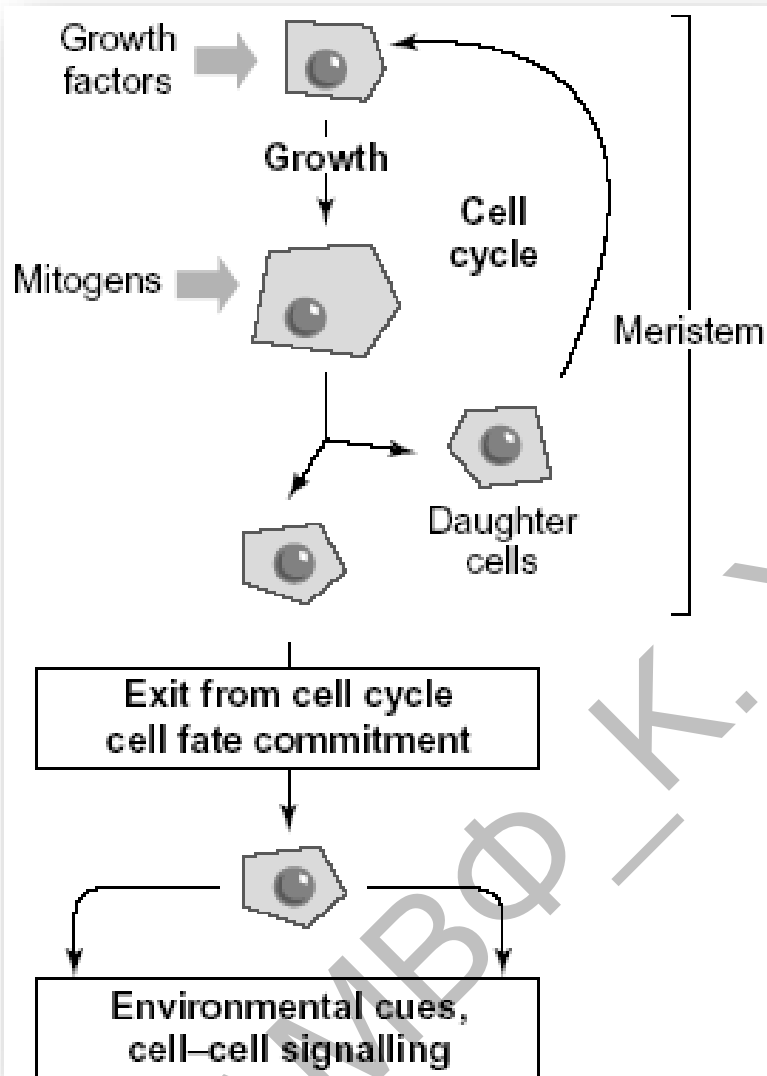


Μέγεθος φύλλου

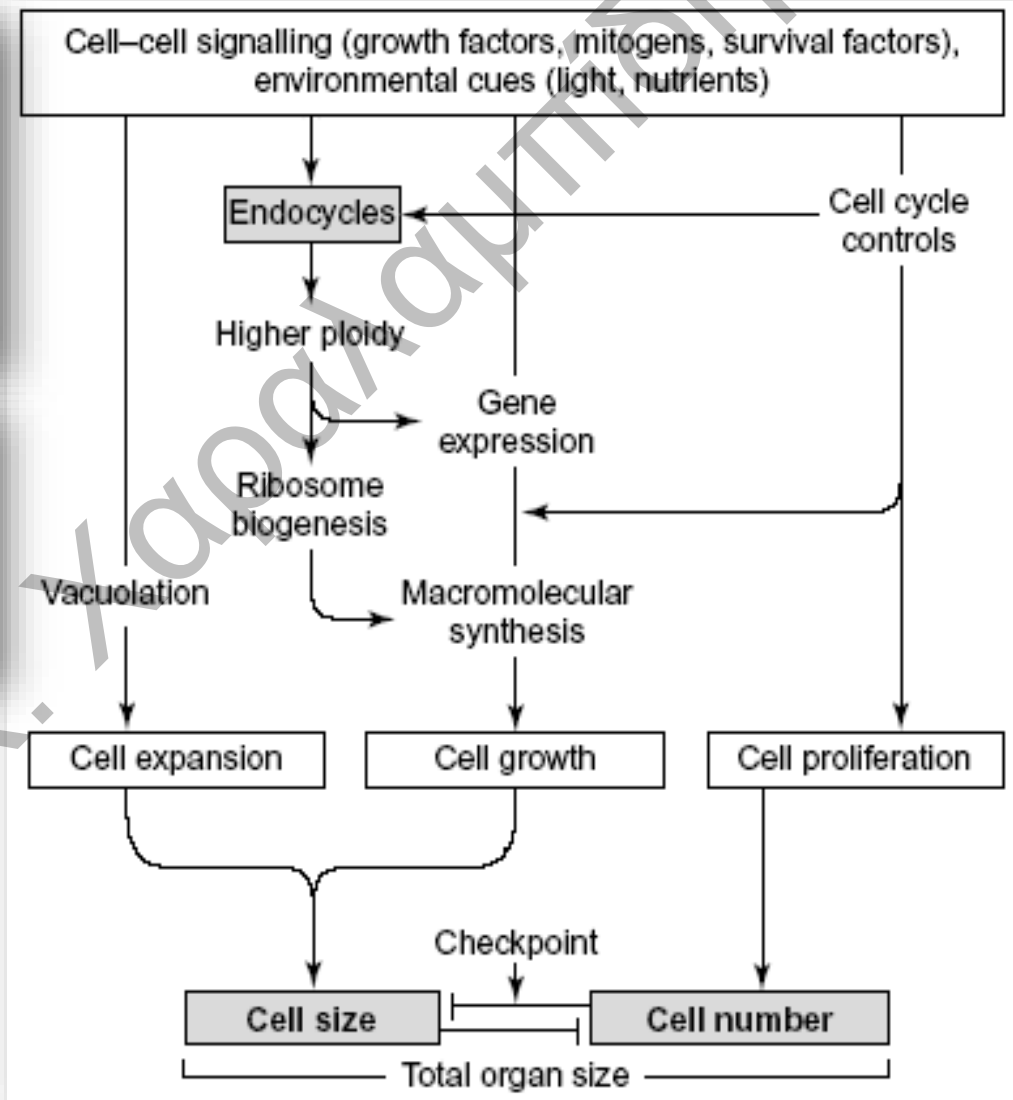
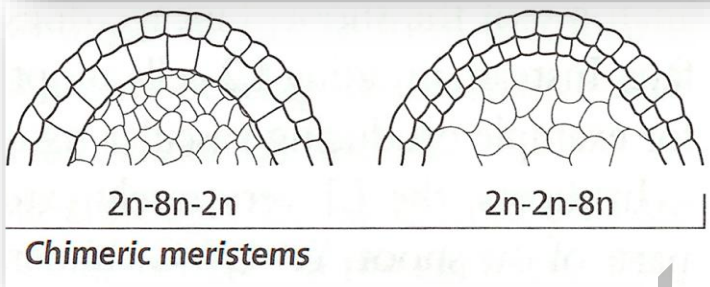
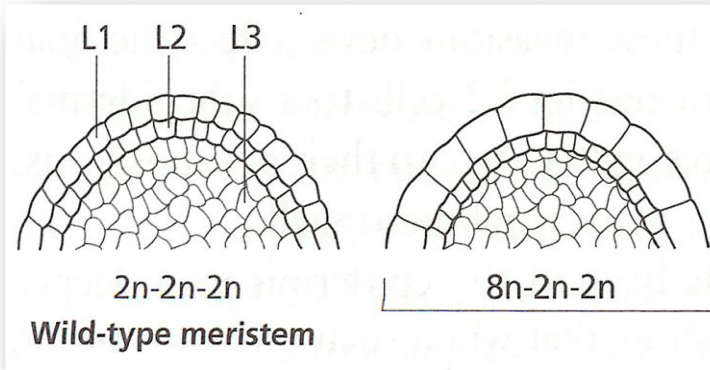
- Το τελικό μέγεθος του φύλλου και το σχήμα του εξαρτώνται από τη θέση του φύλλου πάνω στο βλαστό και από περιβαλλοντικούς παράγοντες (ενδογενείς και εξωγενείς πληροφορίες).
- Το αναπτυσσόμενο φύλλο ελέγχει το μέγεθος και το σχήμα του με σύνθετους μηχανισμούς γονιδιακής ρύθμισης, οι οποίοι καθορίζουν την απαιτούμενη κυτταρική αύξηση (αριθμός & όγκος) και επιμήκυνση.



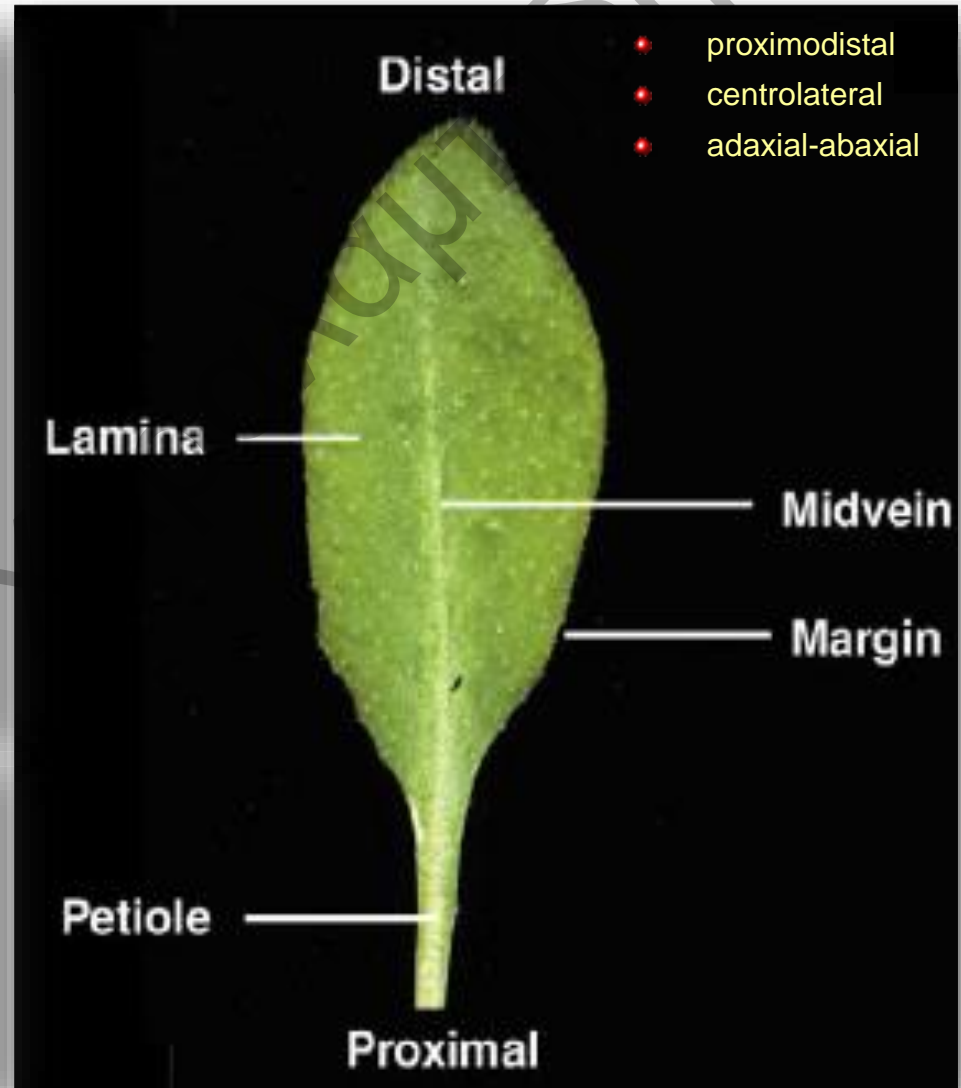
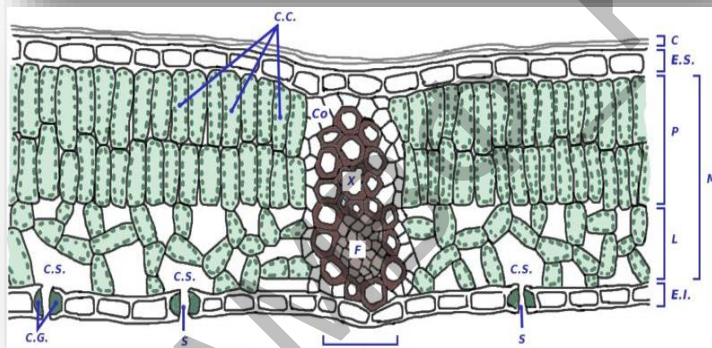
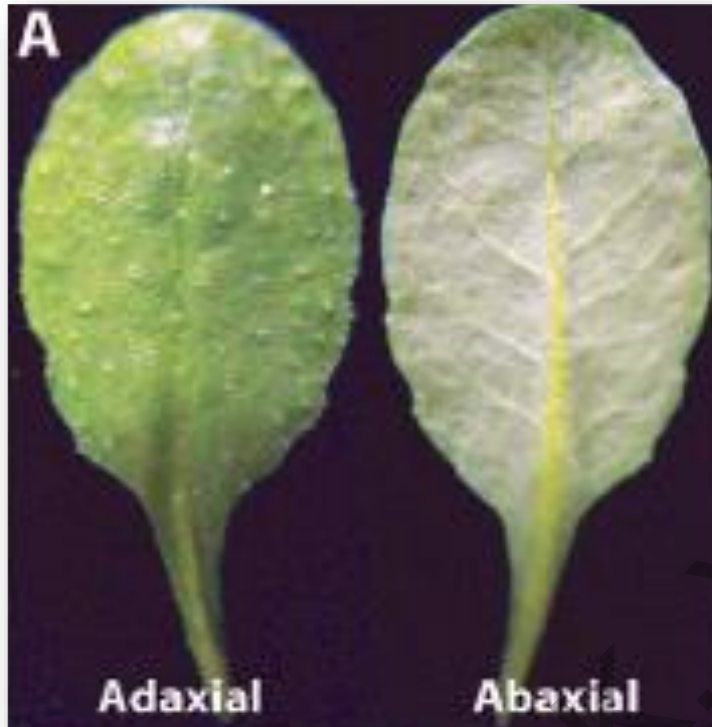
Cell growth and cell expansion



Model of some of the key processes that regulate cell size



Μορφολογία φύλλων



Μορφολογία φύλλων

Στα φύλλα διακρίνονται τρεις φάσεις ανάπτυξης ...

- Φάση πολλαπλασιασμού των κυττάρων (*organogenesis*)
- Φάση ανάπτυξης (α)συμμετρίας (*dev. of suborgan domains*)
- Φάση κυτταρικής διαφοροποίησης (*cell & tissue differentiation*)

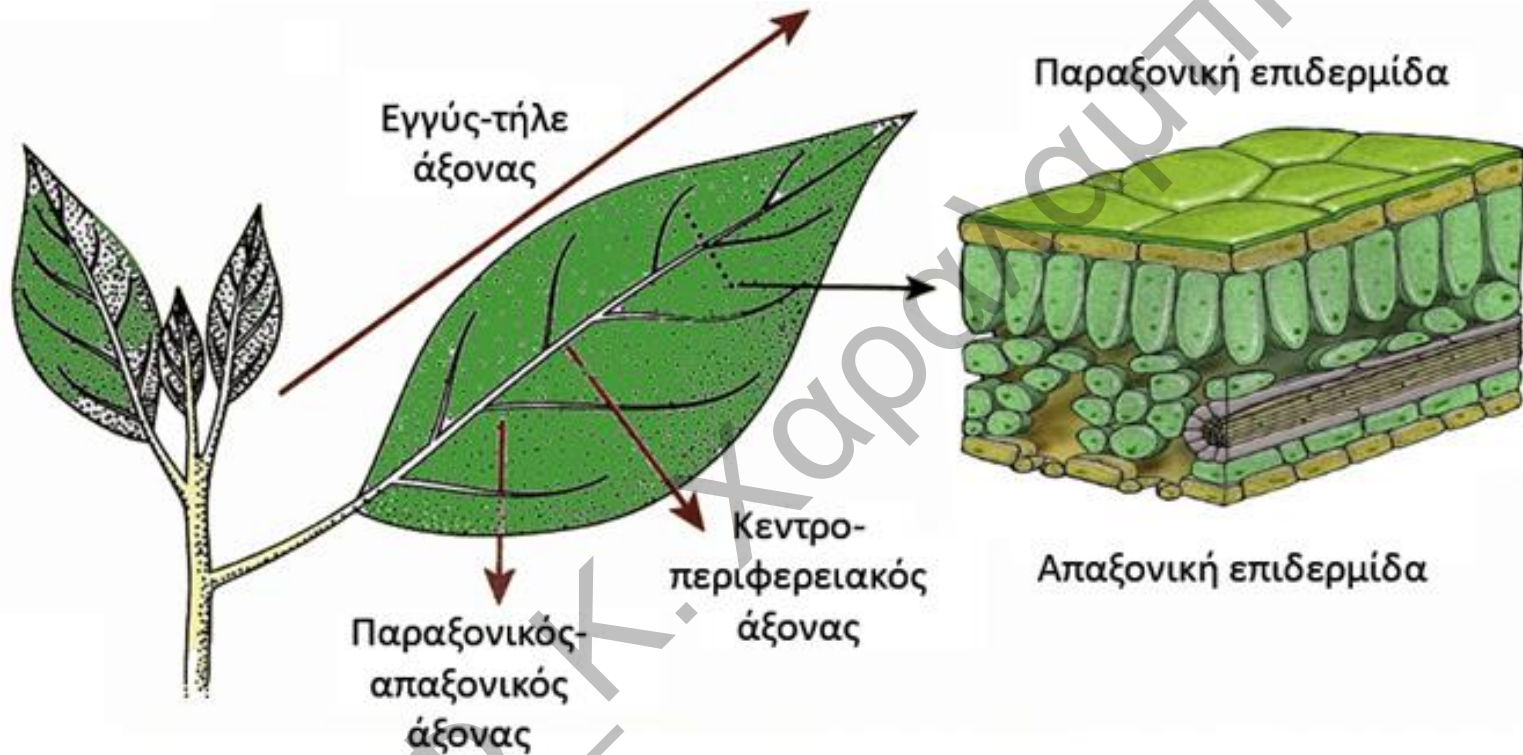
... και τρεις άξονες ασυμμετρίας...

- Ακραίο-βασικός ή εγγύς-τήλε άξονας (*proximodistal*)
- Κέντρο-περιφερειακός άξονας (*centrolateral*)
- Προσαξονικός-αποαξονικός (*adaxial-abaxial*)



Structural (a)symmetry in the leaf

simple leaves have three axes of symmetry or asymmetry



- Ακράιο-βασικός ή εγγύς-τήλε (proximodistal) άξονας
- Κέντρο-περιφερειακός (centrolateral) άξονας
- Προσαξονικός-αποαξονικός (adaxial-abaxial) άξονας



Stages of leaf development

Stage 1: Organogenesis

a few cells in L1 and L2 divide more rapidly than surrounding cells -> produce outgrowth = **leaf primordium**, which develops into leaf

Stage 2: Development of suborgan domains

primordia acquire identity as specific parts of leaf

this differentiation occurs along three

axes: **dorsiventral** (adaxial – abaxial) Προσαξονικός-αποαξονικός

proximodistal (basal – apical) Ακραιο-βασικός

lateral (margin – blade – midrib) Κέντρο-περιφερειακός

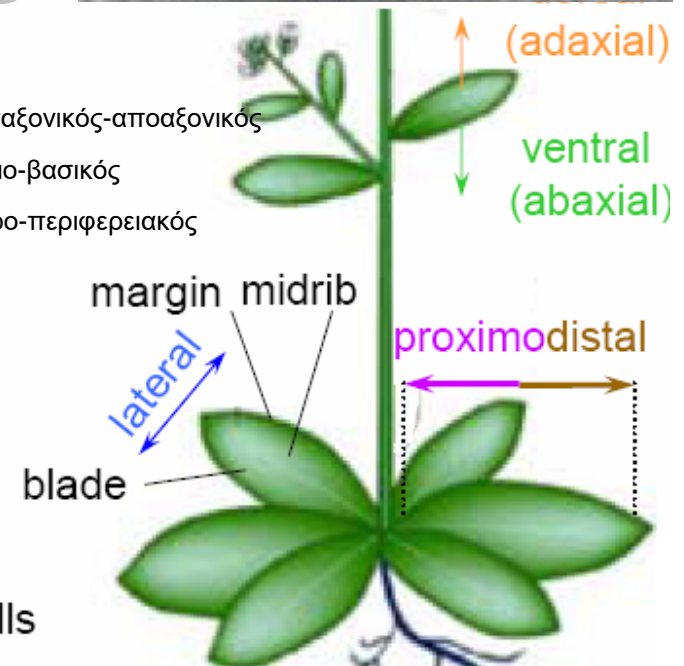
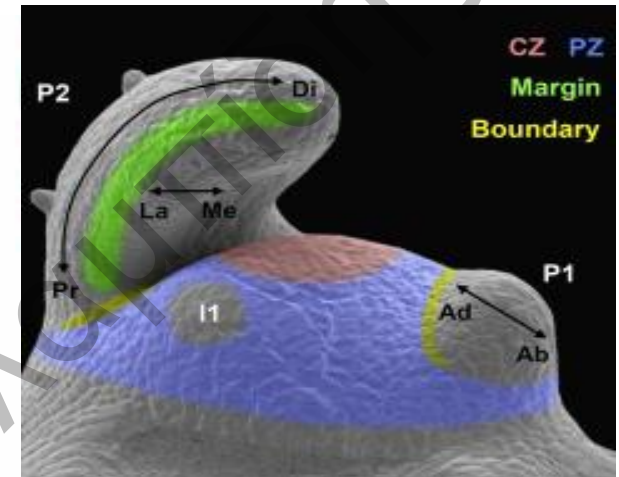
Stage 3: Cell and tissue differentiation

tissues and cells differentiate as leaf grows:

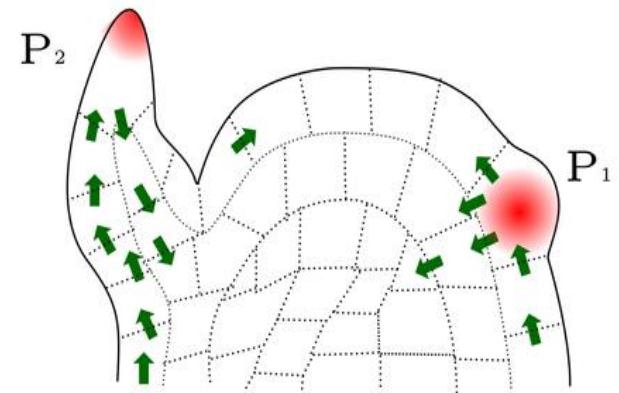
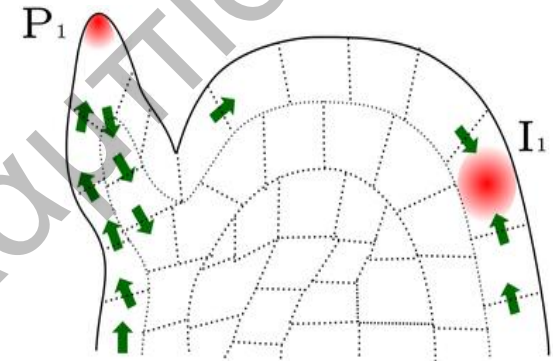
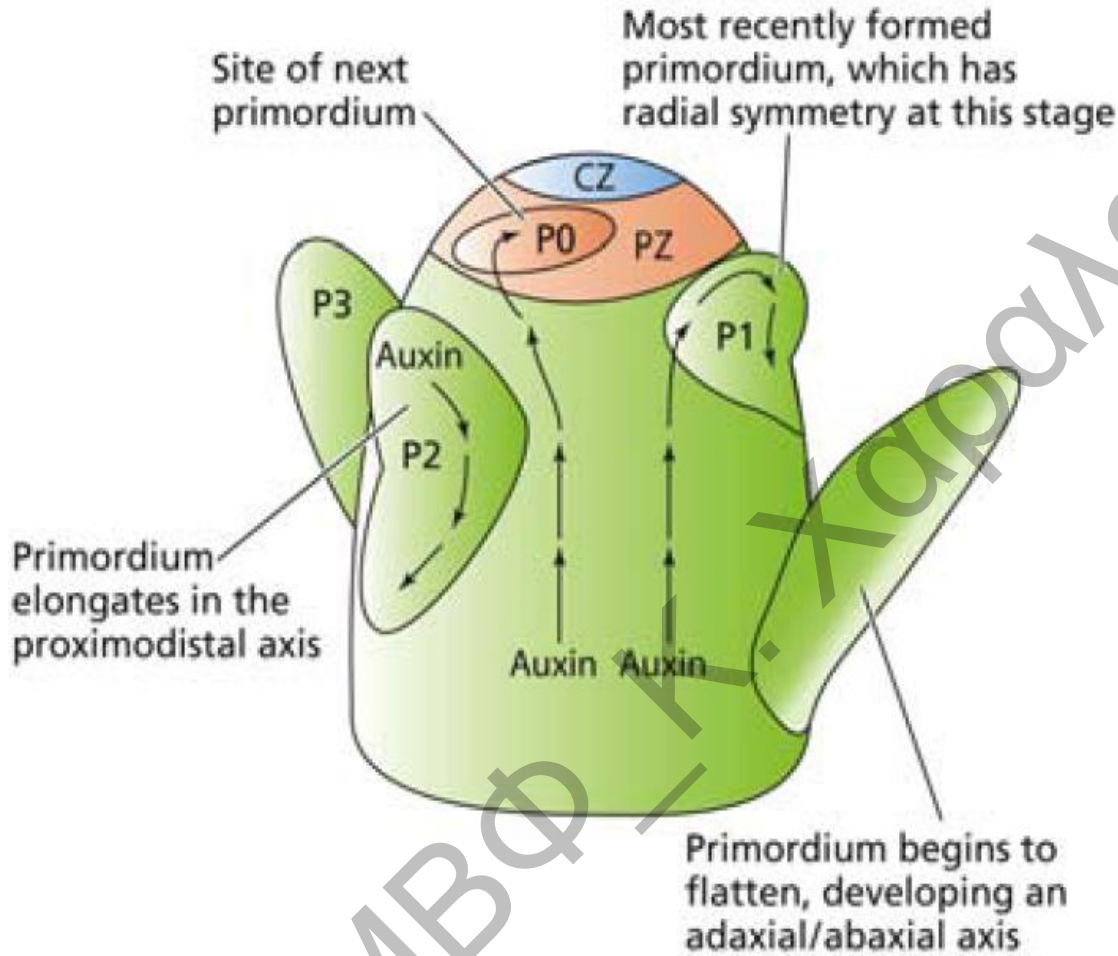
L1 -> epidermis with trichomes and guard cells

L2 -> mesophyll cells (palisade parenchyma)

L3 -> vascular elements, bundle sheath cells



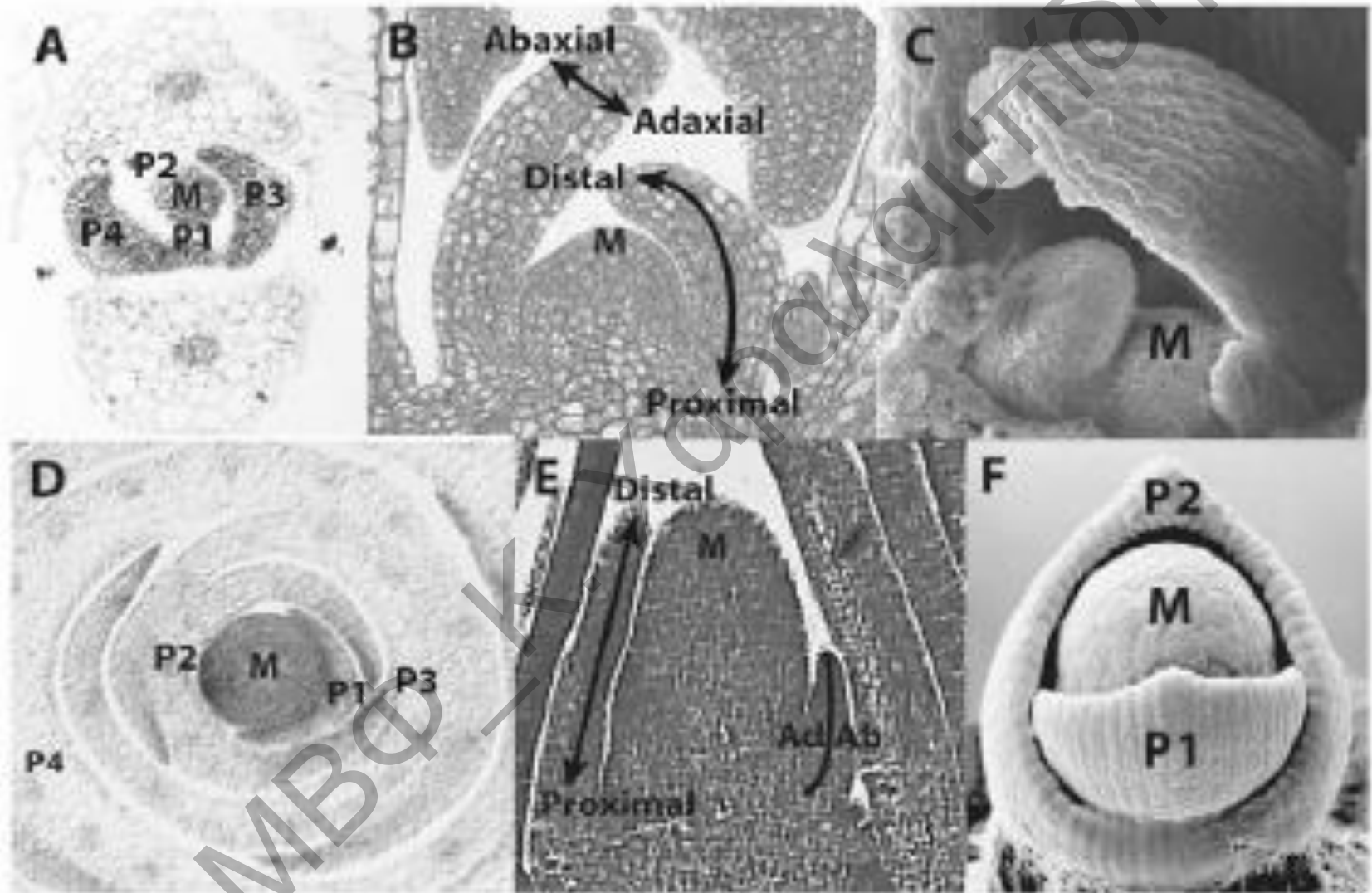
Origin of leaves at the shoot apex



(a)



Αρχιτεκτονική του μεριστώματος κατά την ανάπτυξη των φύλλων



Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ

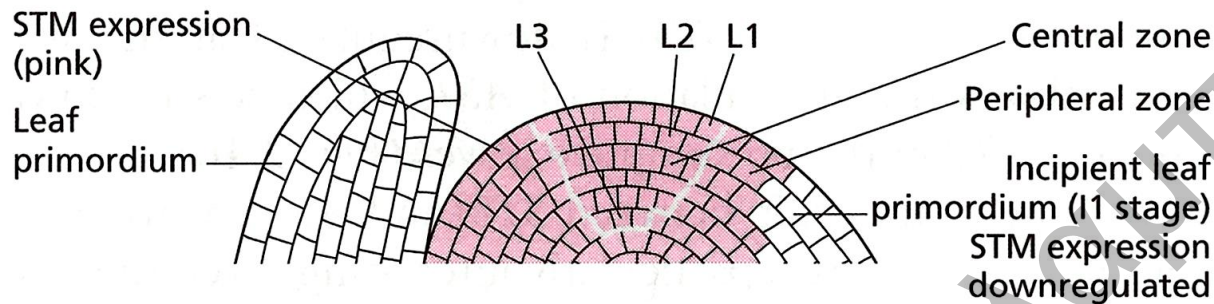


Πρέπει να έχουμε κατά νου...

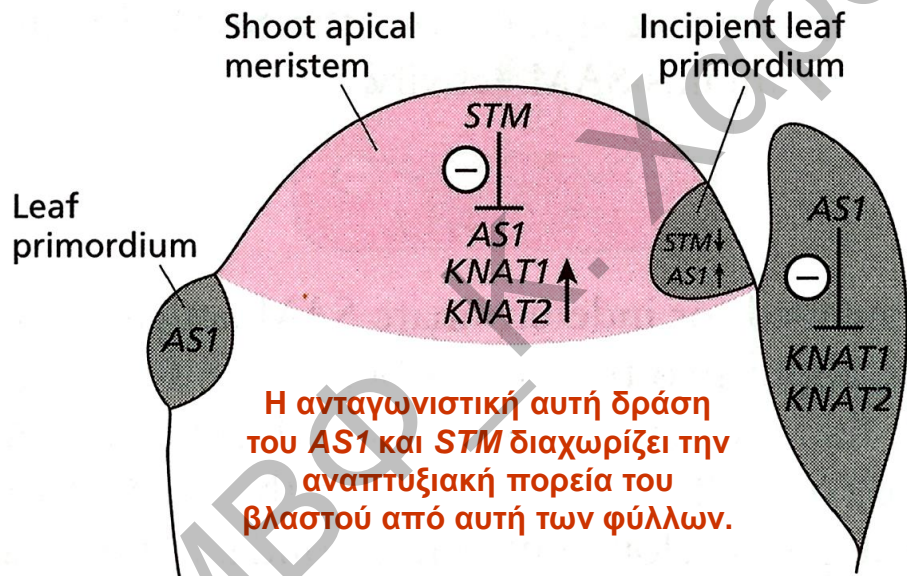
1. Η ανάπτυξη των φύλλων είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη δράση του AMB και των μασχαλιαίων μεριστωμάτων.
2. Γονίδια που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μεριστωμάτων επηρεάζουν συνήθως και την ανάπτυξη των φύλλων.
3. Η δράση/οργάνωση του AMB και η ανάπτυξη του αρχέφυτρου του φύλλου μπορούν ωστόσο να διαχωριστούν, καθώς γονίδια που επηρεάζουν εξειδικευμένα την ανάπτυξη των φύλλων δεν επηρεάζουν αναγκαστικά και το AMB.



Αλληλεπίδραση του *STM* με το *AS1/PHAN* και τα *KNAT*



(a) *STM* expression in the shoot apical meristem



(b) The interactions between *AS1* and the *KNOX* genes

Class I KNOX genes

KNAT1

KNAT2

STM

MYB TFs

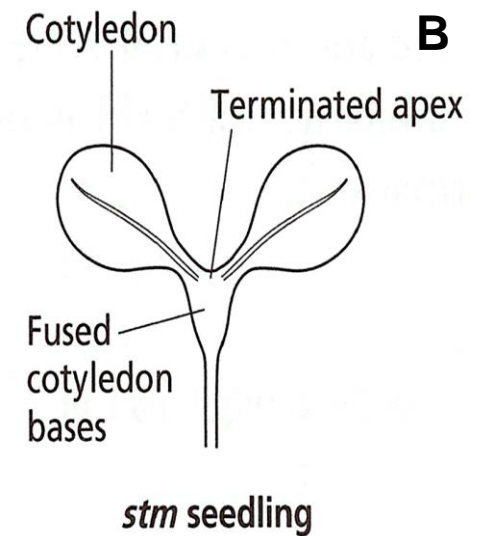
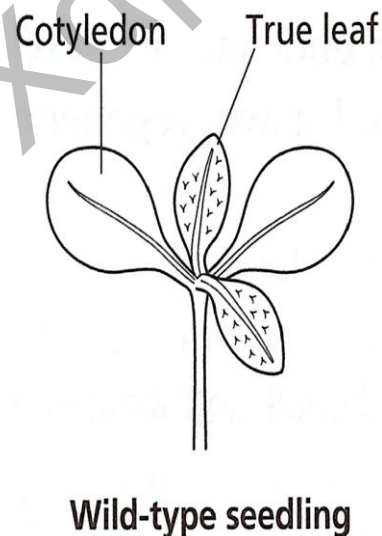
AS1/PHAN

AS2

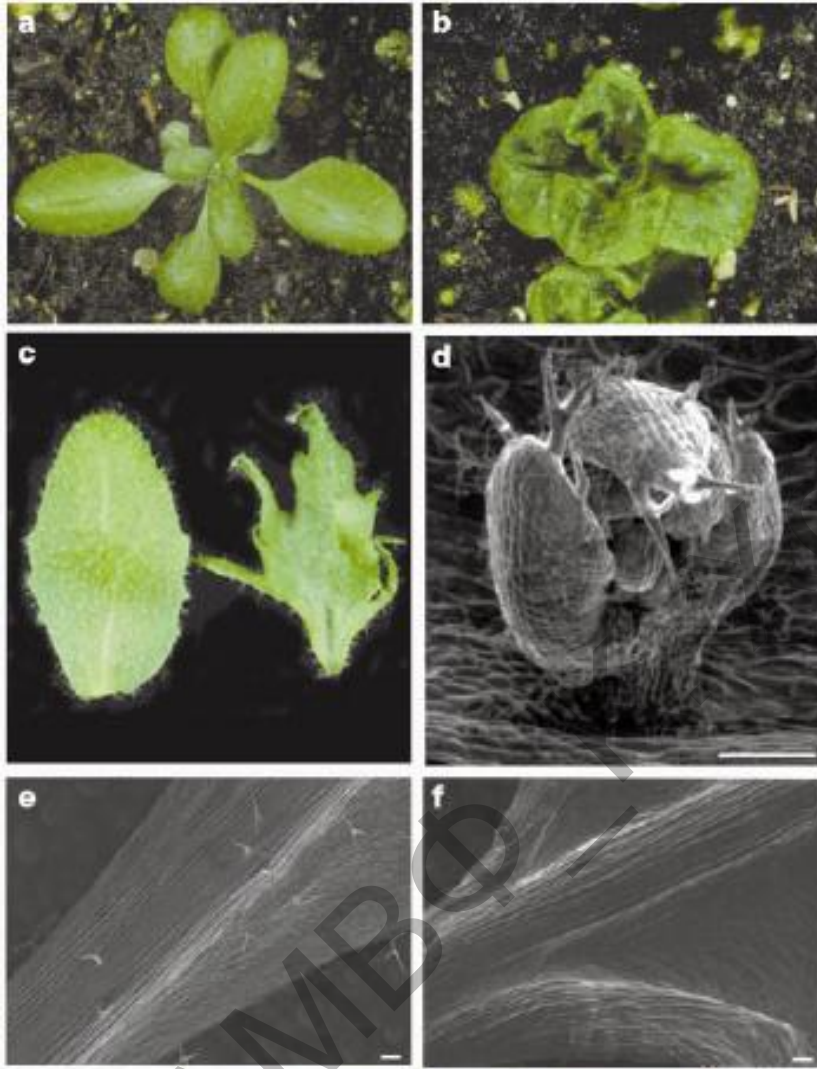


Το γονίδιο *SHOOTMERISTEMLESS (STM)*

- Το γονίδιο *STM* κωδικοποιεί για έναν **ομοιοδομικό μεταγραφικό παράγοντα** (homeodomain transcription factor) της οικογένειας *KNOX*.
- Τα ολικής απώλειας λειτουργίας *stm* μεταλλαγμένα αρτίβλαστα δεν αναπτύσσουν AMB και παρουσιάζουν σύμφυση κοτυληδόνων. Παρόμοιο τερματισμό της ανάπτυξης έχουμε και στους ασθενείς φαινότυπους σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια.



Φαινότυπος *as1* μεταλλαγμένων σειρών *Arabidopsis thaliana*



- a) Φυτό αγρίου τύπου με επιμήκη και σπαθωτά, ωειδή φύλλα.
- b) *as1* μετάλλαγμα με κοντύτερα και διπλωμένα φύλλα.
- c) Άμισχα φύλλα (cauline) αγρίου τύπου και *as1* με λοβούς στο περιθώριο.
- d) Επαγωγή εκτοπικού βλαστού.
- e) Επιμηκυμένα κύτταρα του κεντρικού νεύρου φύλλου φυτών αγρίου τύπου.
- f) Επιμηκυμένα κύτταρα του κεντρικού νεύρου εμφανίζονται σε πολλαπλές σειρές στο *as1* μετάλλαγμα.



Μορφολογία φύλλων με επηρεασμένα *KNOX* γονίδια (*Knotted1*-like homeobox)



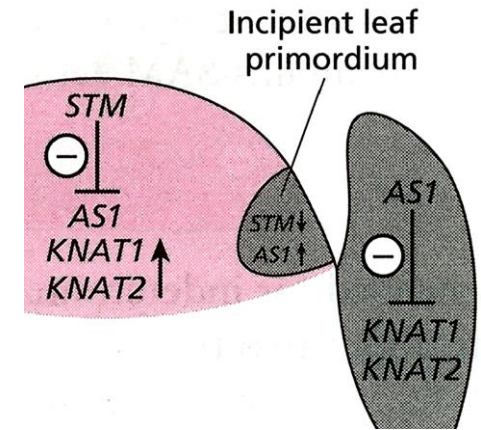
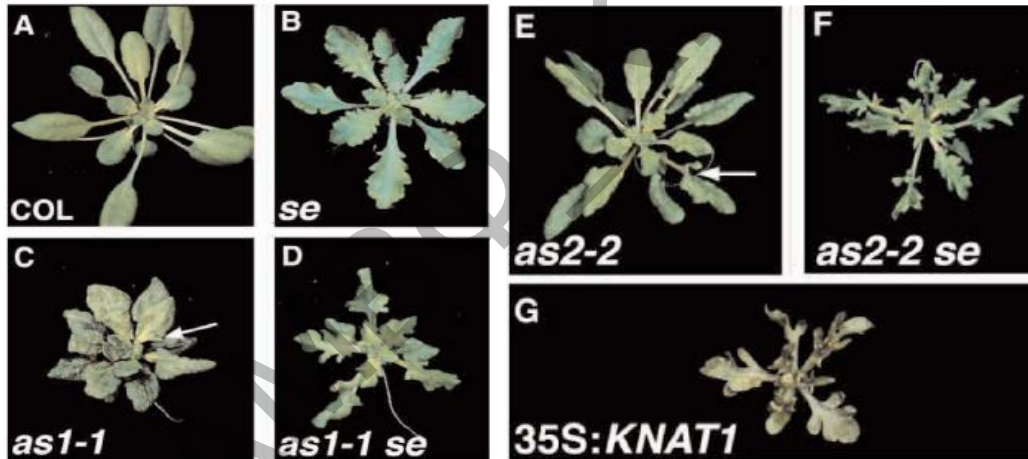
WT

as1

as2

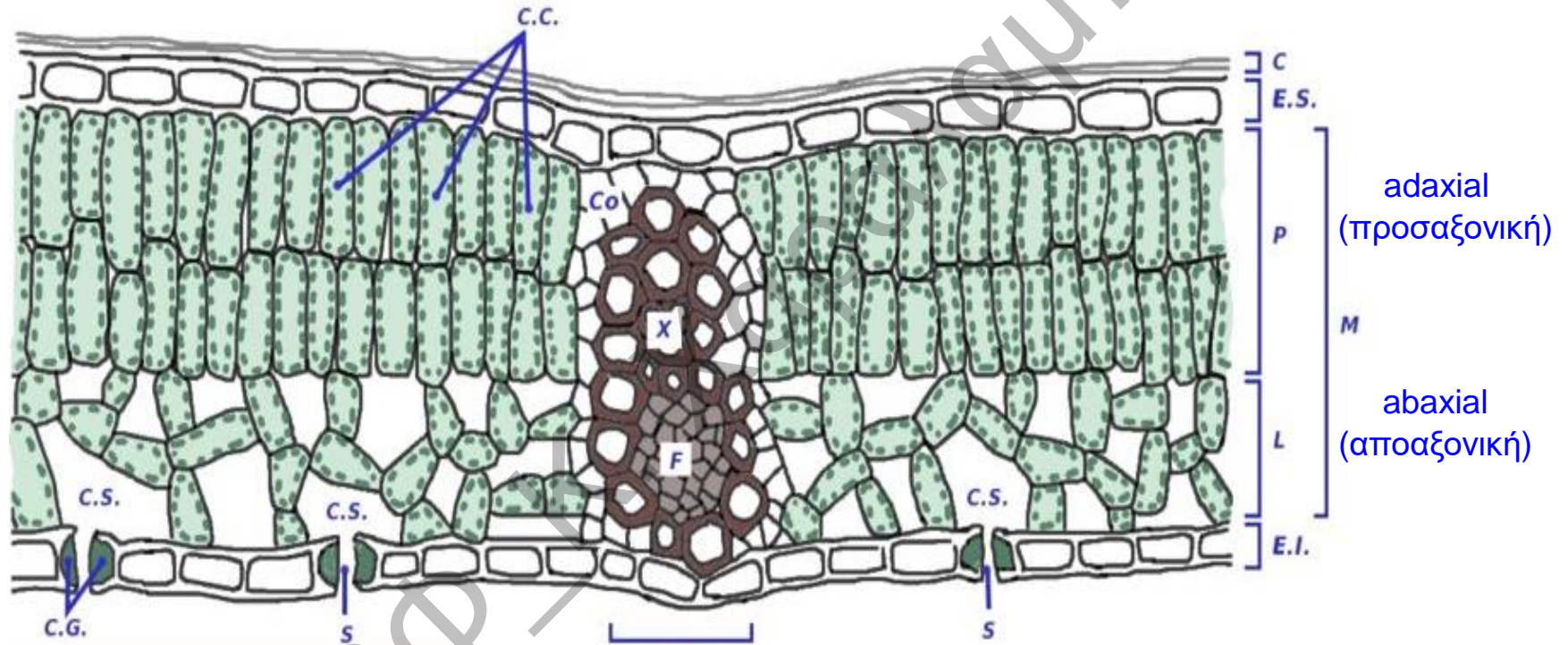
bop1

35SKNAT1

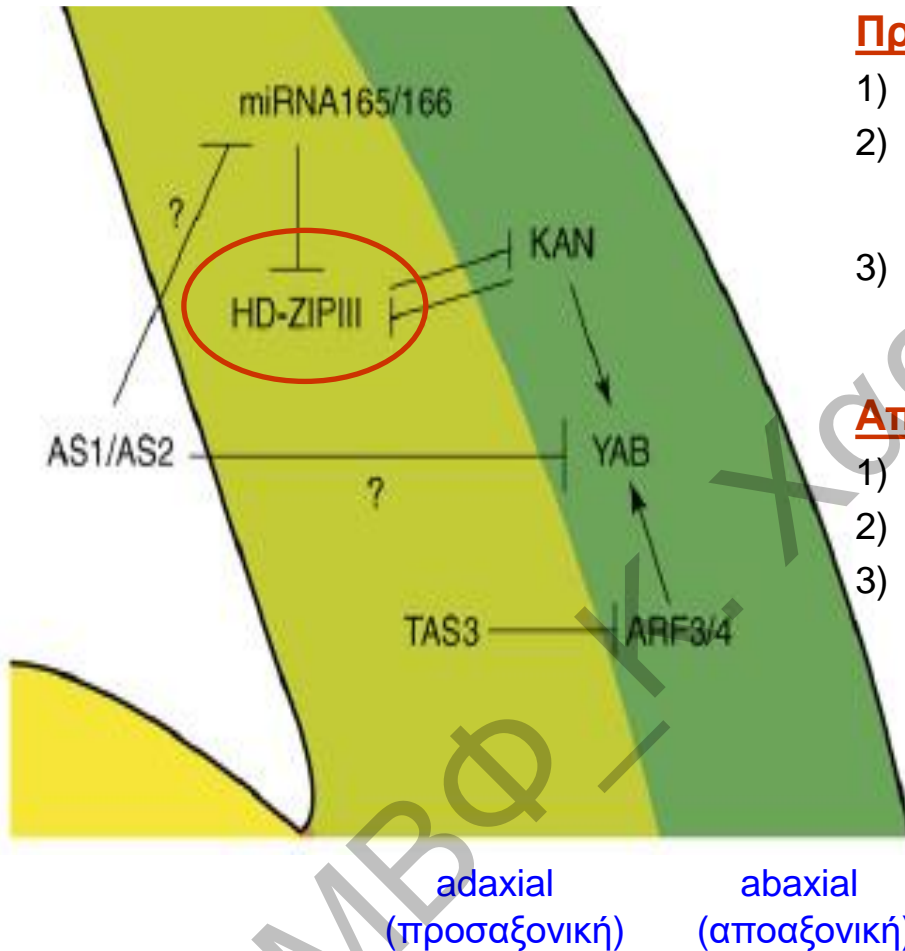


Καθορισμός προσαξονικής-αποαξονικής ασυμμετρίας

Τι είναι αυτό που καθορίζει την (α)συμμετρία ?



Καθορισμός προσαξονικής-αποαξονικής ασυμμετρίας



Προσαξονική ταυτότητα

- 1) Έκφραση *AS1/AS2* και καταστολή των *YABBY*.
- 2) Έκφραση γονιδίων HD-ZIP κλάσης III, *PHABULOSA*, *PHAVOLUTA*, *REVOLUTA* και καταστολή των *KANADI (KAN)*.
- 3) Έκφραση των *TAS3* (ta-siRNAs) και καταστολή των *ARF3/ETT* και *ARF4*.

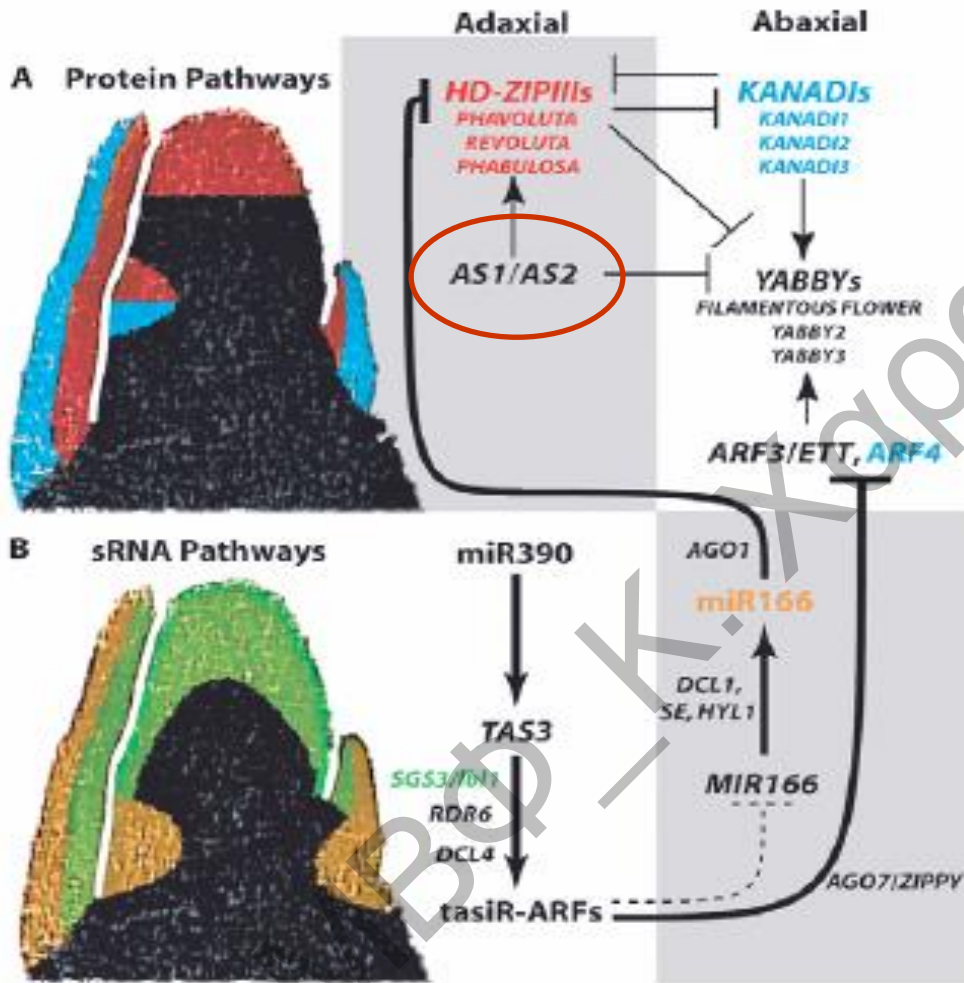
Αποαξονική ταυτότητα

- 1) Έκφραση των *ARF3/ETT* και *ARF4*.
- 2) Έκφραση των *YABBY* γονιδίων.
- 3) Έκφραση των *KANADI (KAN)* και καταστολή των HD-ZIP κλάσης III.

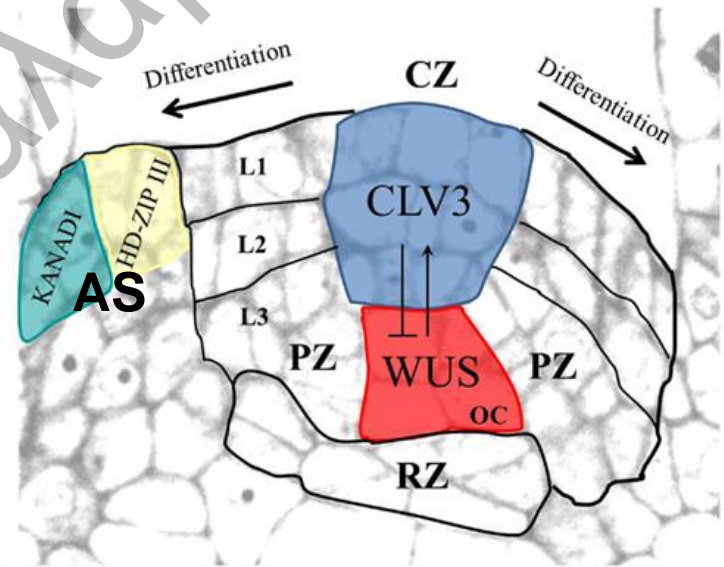


Εγκαθίδρυση της προσαξονικής-αποαξονικής πολικότητας στα φύλλα

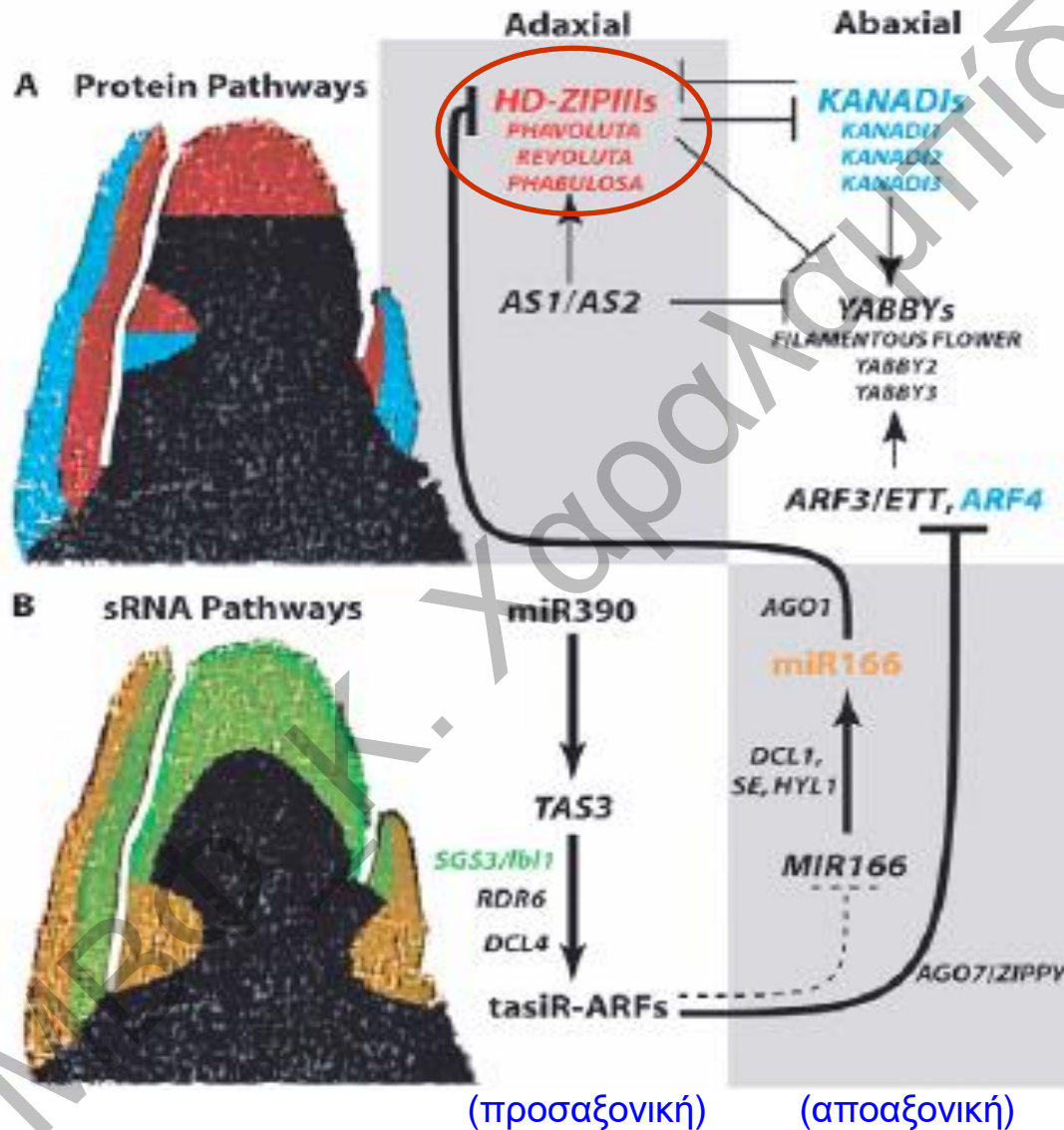
(προσαξονική) (αποαξονική)



(προσαξονική) (αποαξονική)



Εγκαθίδρυση της προσαξονικής-αποαξονικής πολικότητας στα φύλλα



HD-ZIP III γονίδια στον καθορισμό της προσαξονικής ταυτότητας

HOMEODOMAIN-LEUCINE ZIPPER transcription factors in *A. thaliana*

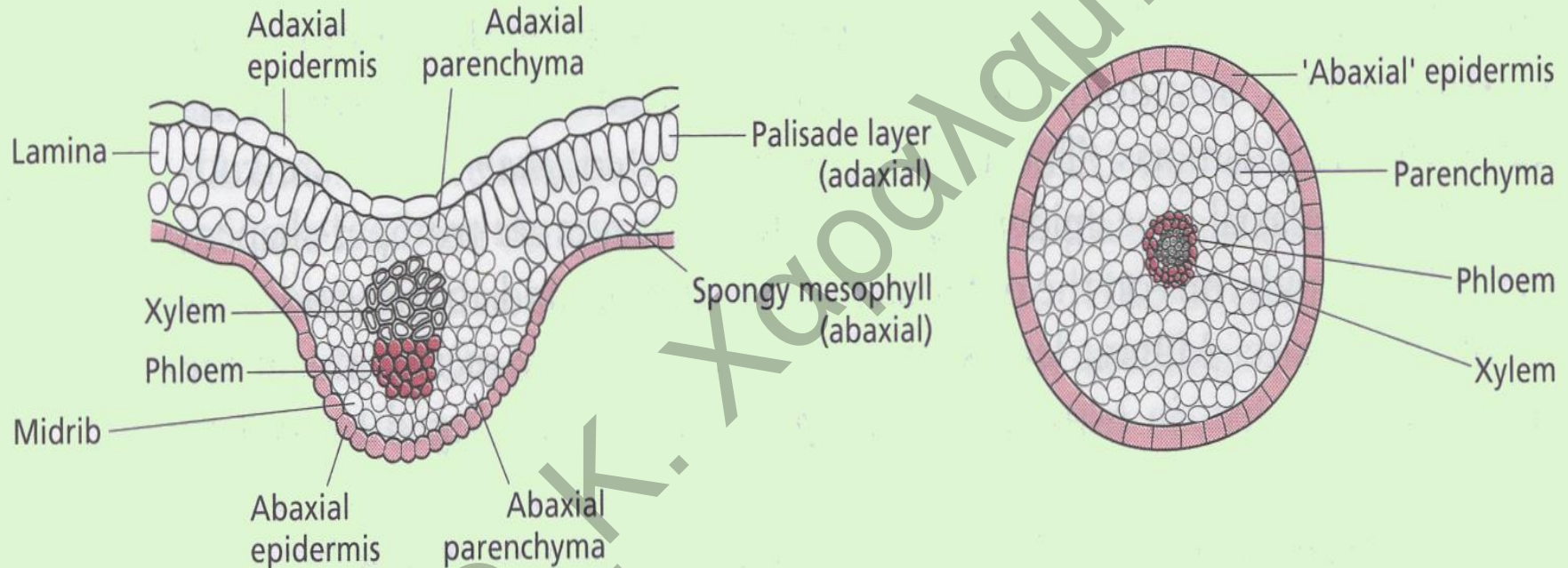
- PHABULOSA (**PHB**)
 - PHAVOLUTA (**PHV**)
 - REVOLUTA (**REV**)
- Τα μονά μεταλλαγμένα στελέχη απώλειας λειτουργίας για τα παραπάνω γονίδια δεν παρουσιάζουν εμφανή φαινότυπο.
 - Το τριπλό μετάλλαγμα ωστόσο **phb phv rev** εμφανίζει έναν δριμύ φαινότυπο με ανάπτυξη μίας μόνο ακτινωτής αποαξονικής κοτυληδόνας.



PHANTASTICA (from *Antirrhinum*)

Wild type *Antirrhinum*

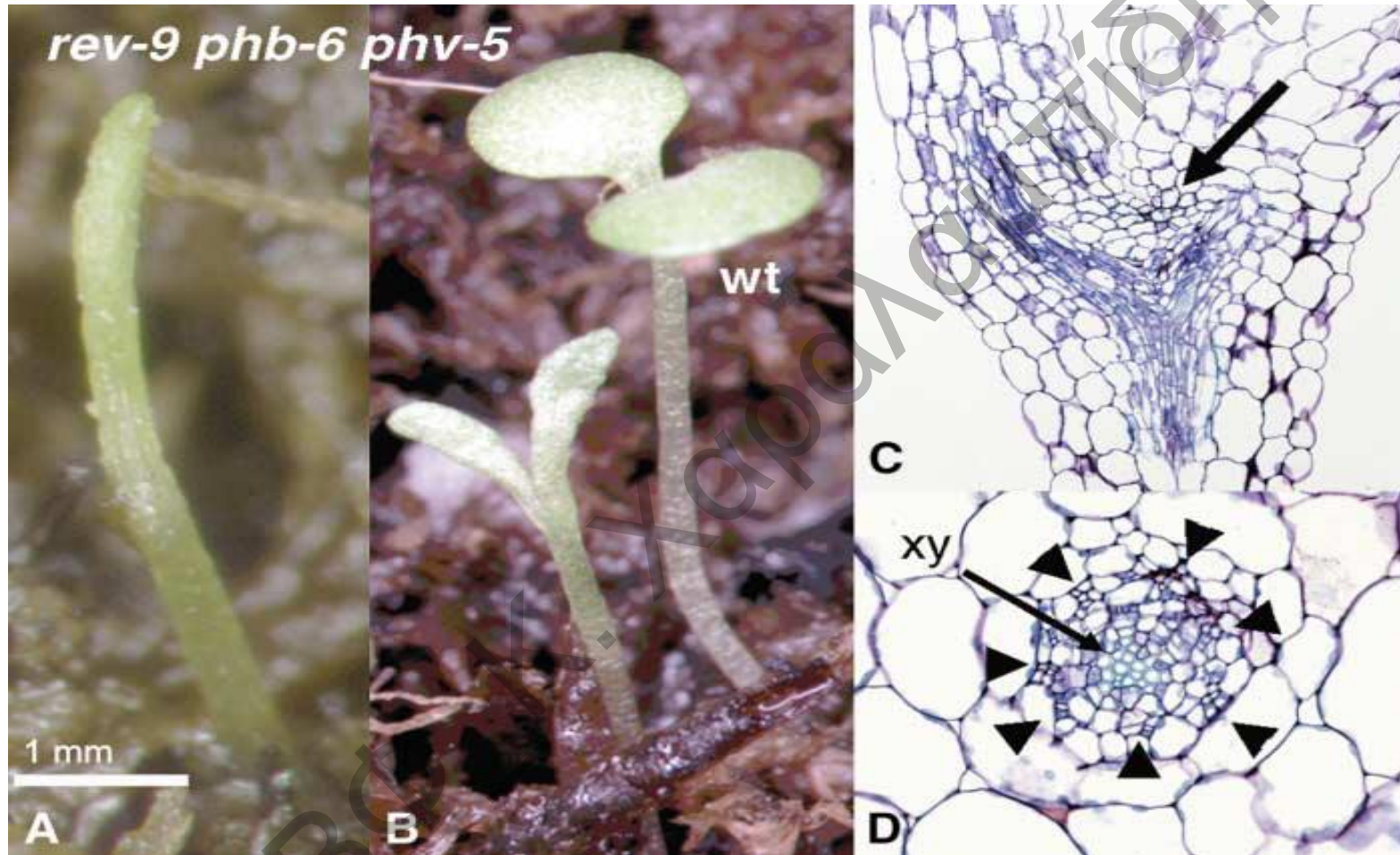
Radially symmetric *phan* leaf



- loss-of-function *phan* mutants develop leaves with variable loss of adaxial-abaxial asymmetry.



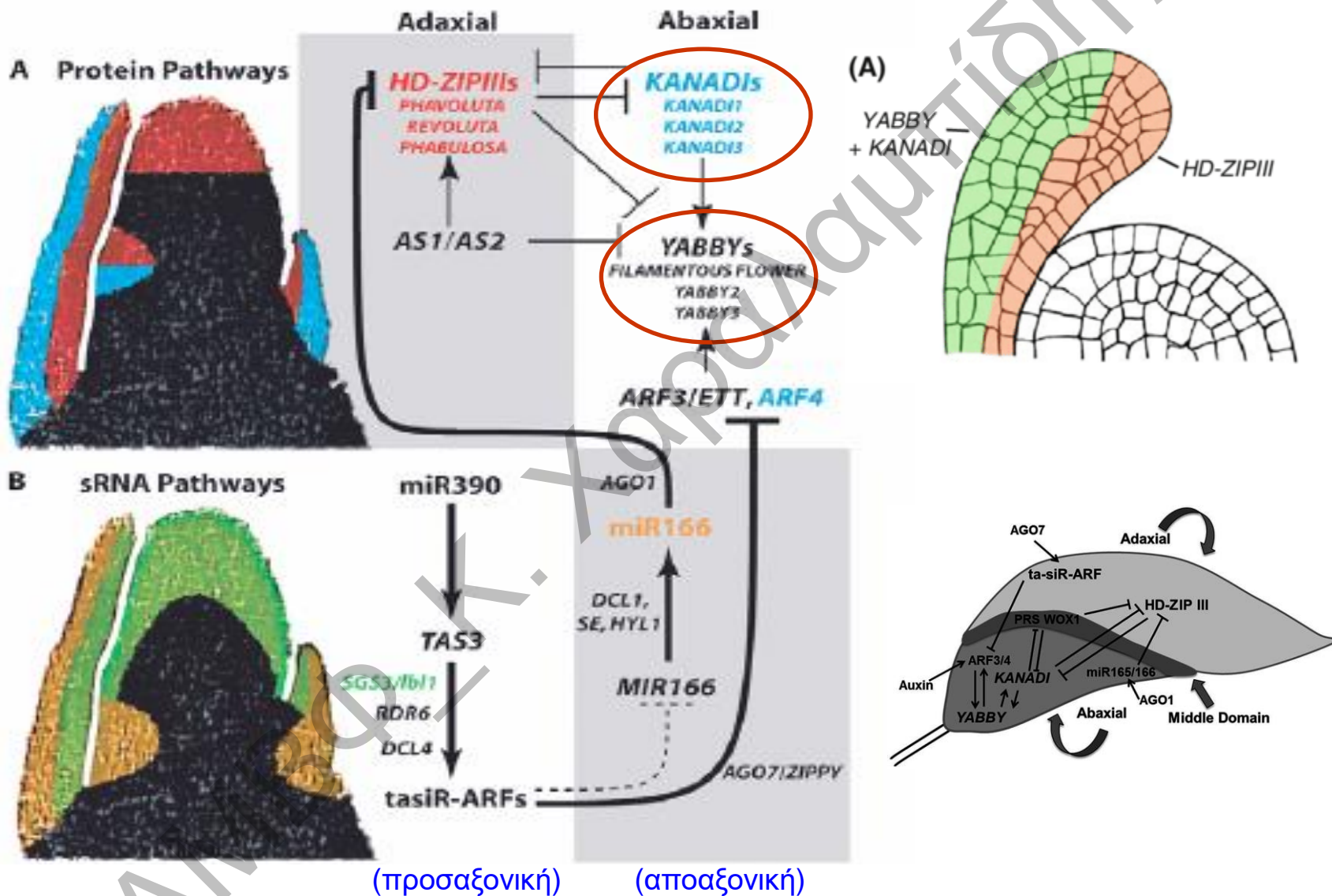
Τα τριπλά μεταλλάγματα *phb phv rev* έχουν αποαξονικά φύλλα



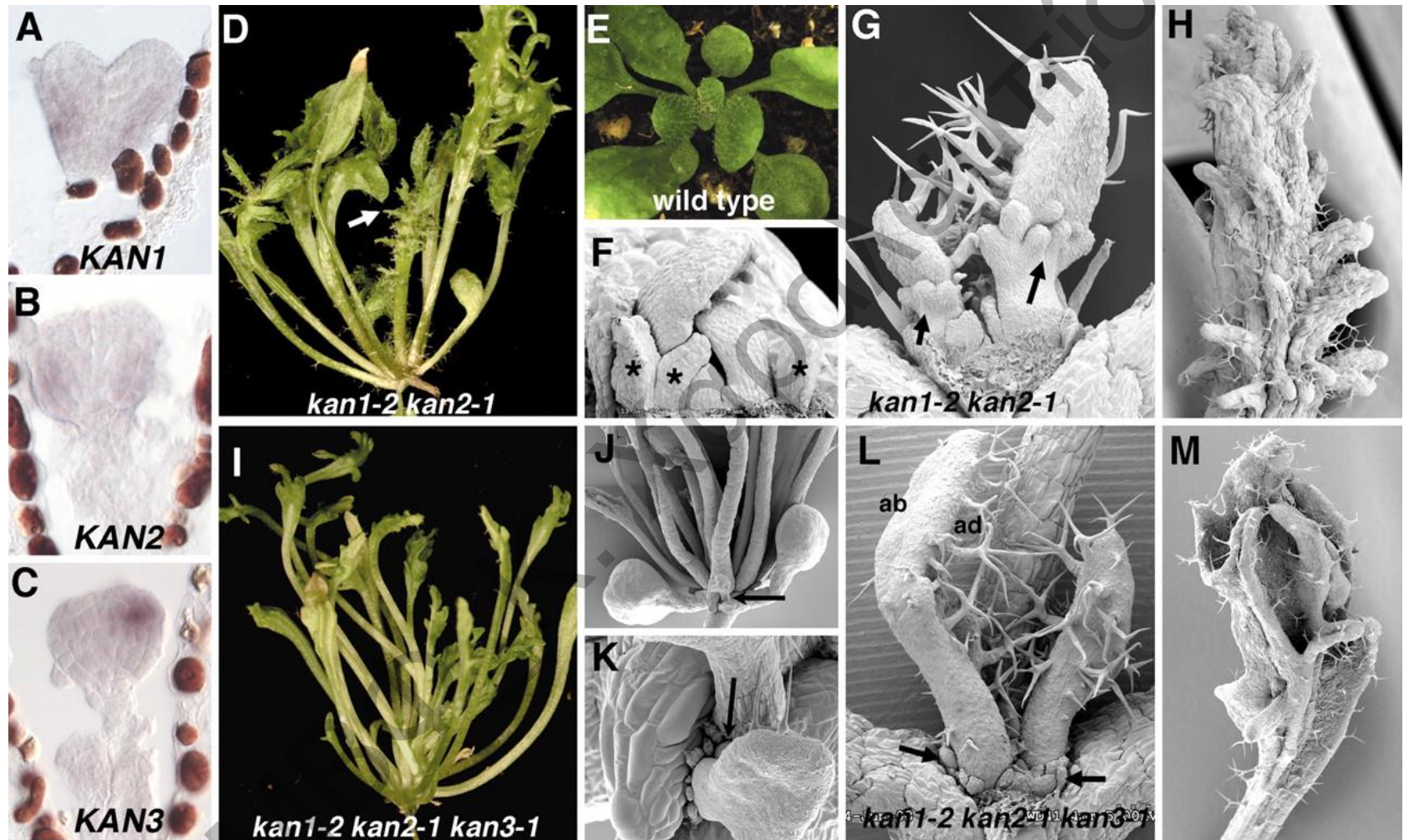
- Εμφάνιση τελείως ακτινωτών, αποκλειστικά αποαξονικών δομών (A) ή επίδραση στην επέκταση του ελάσματος (B).
- Στις ακτινωτές κοτυληδόνες τα αγωγά στοιχεία είναι επίσης ακτινωτά με το φλοιώμα να περιβάλλει το ξύλωμα (D).
- Δυσλειτουργία του AMB (C).



Εγκαθίδρυση της προσαξονικής-αποαξονικής πολικότητας στα φύλλα

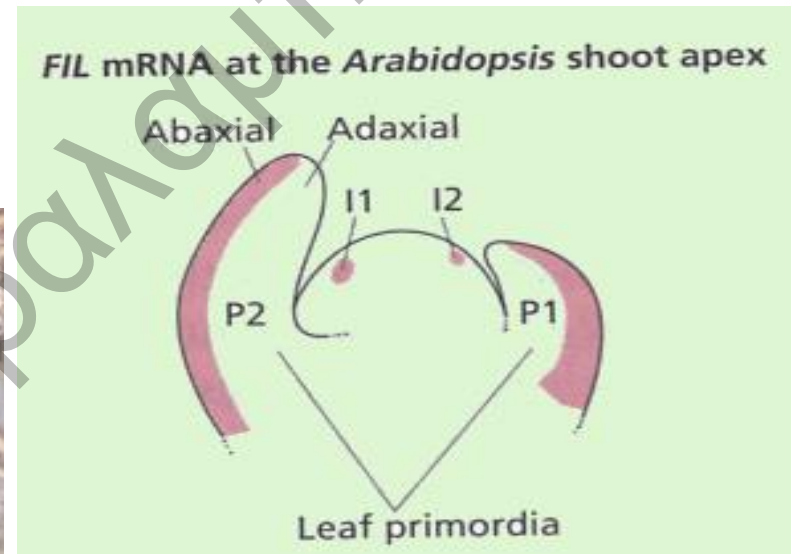
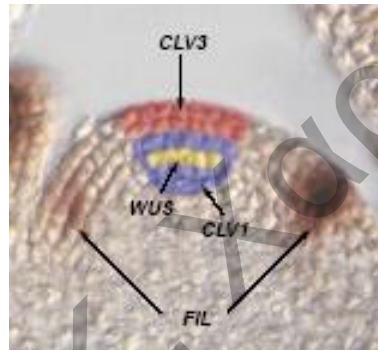


Τα *kanadi* μεταλλάγματα έχουν προσαζονικά φύλλα



YABBY (transcription factors)

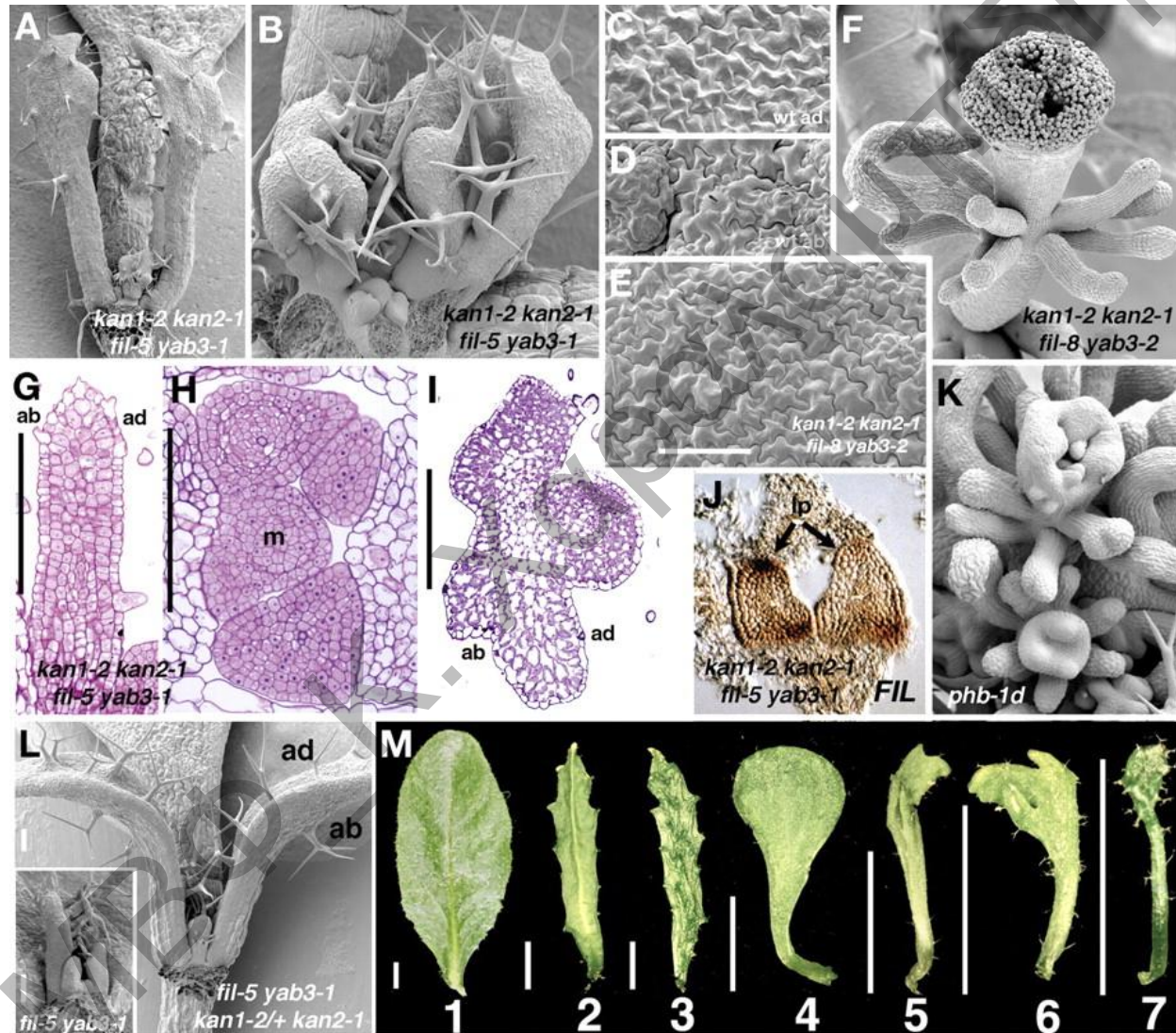
- *YABBY* gene family is required for the development of abaxial leaf tissue in *Arabidopsis*:
 - *FILAMENTOUS FLOWER (FIL)*
 - *YABBY2 (YAB2)*
 - *YABBY3 (YAB3)*



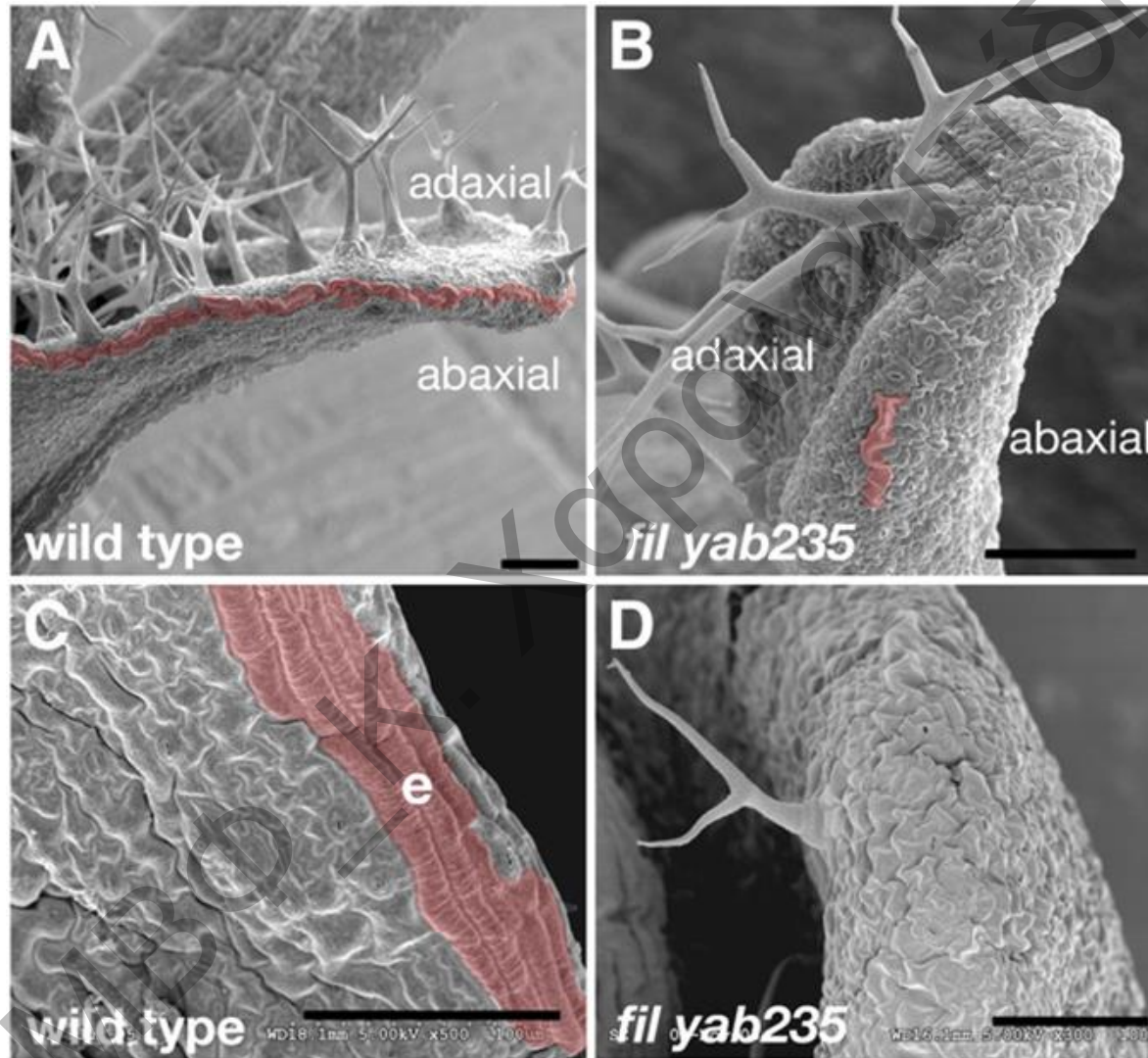
- Uniform expression begins at I2 in subepidermal cells but at P1 expression becomes restricted to the abaxial side. **Expression disappears in the mature leaf.**
- Signal from apical meristem promoting adaxial leaf fate inhibits directly or indirectly *YABBY* gene family expression in adaxial tissues.



Τα *fill yabi* μεταλλάγματα έχουν προσαξονικά φύλλα



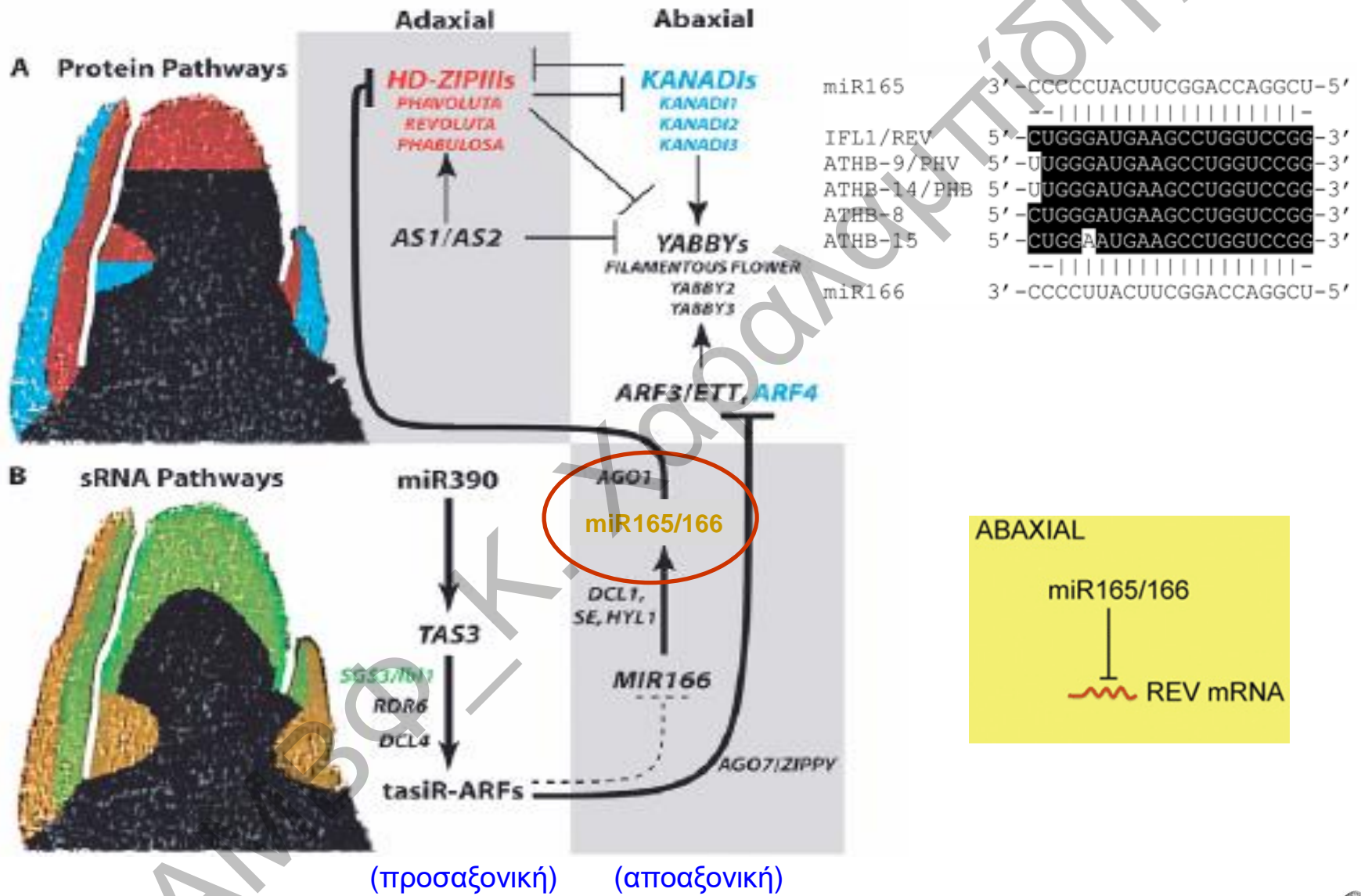
Loss of YABBY Function Is Associated with a Loss of Leaf Margin Cells



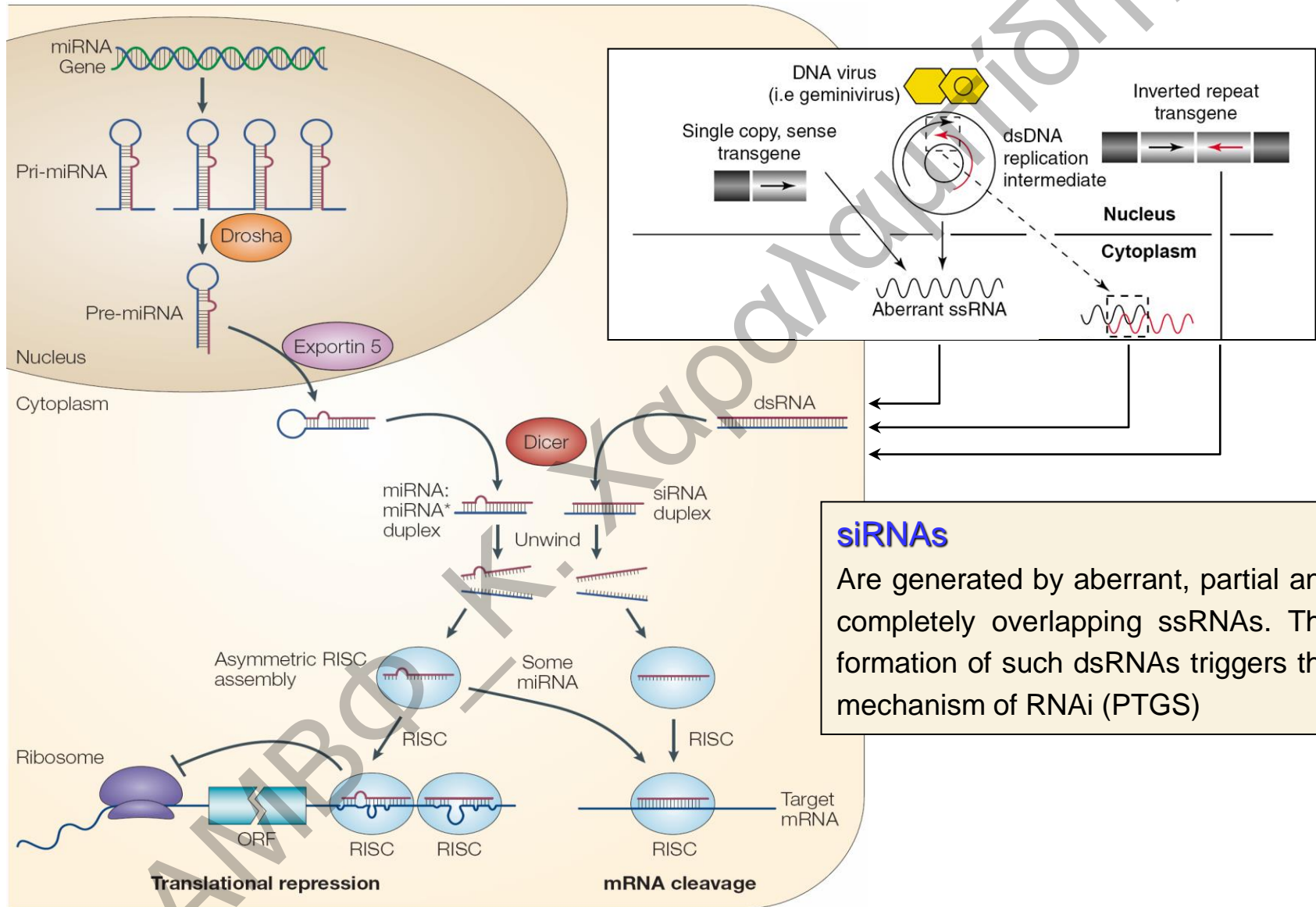
Sarojam R et al. Plant Cell 2010;22:2113-2130



Εγκαθίδρυση της προσαξονικής-αποαξονικής πολικότητας στα φύλλα



miRNA vs. siRNA



siRNAs
 Are generated by aberrant, partial and completely overlapping ssRNAs. The formation of such dsRNAs triggers the mechanism of RNAi (PTGS)

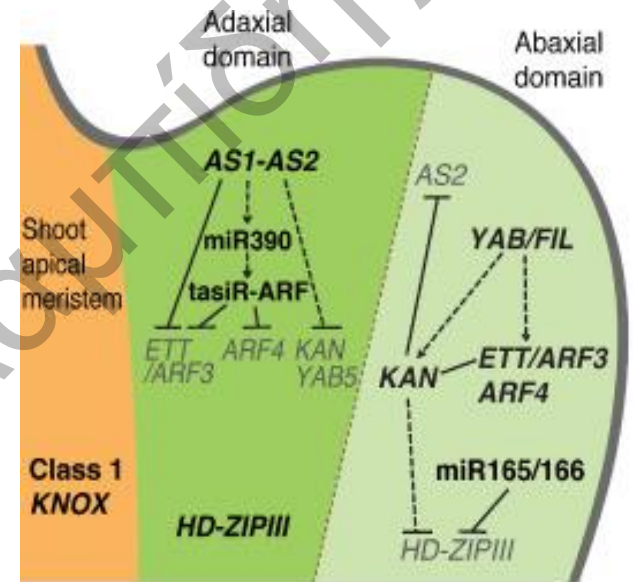
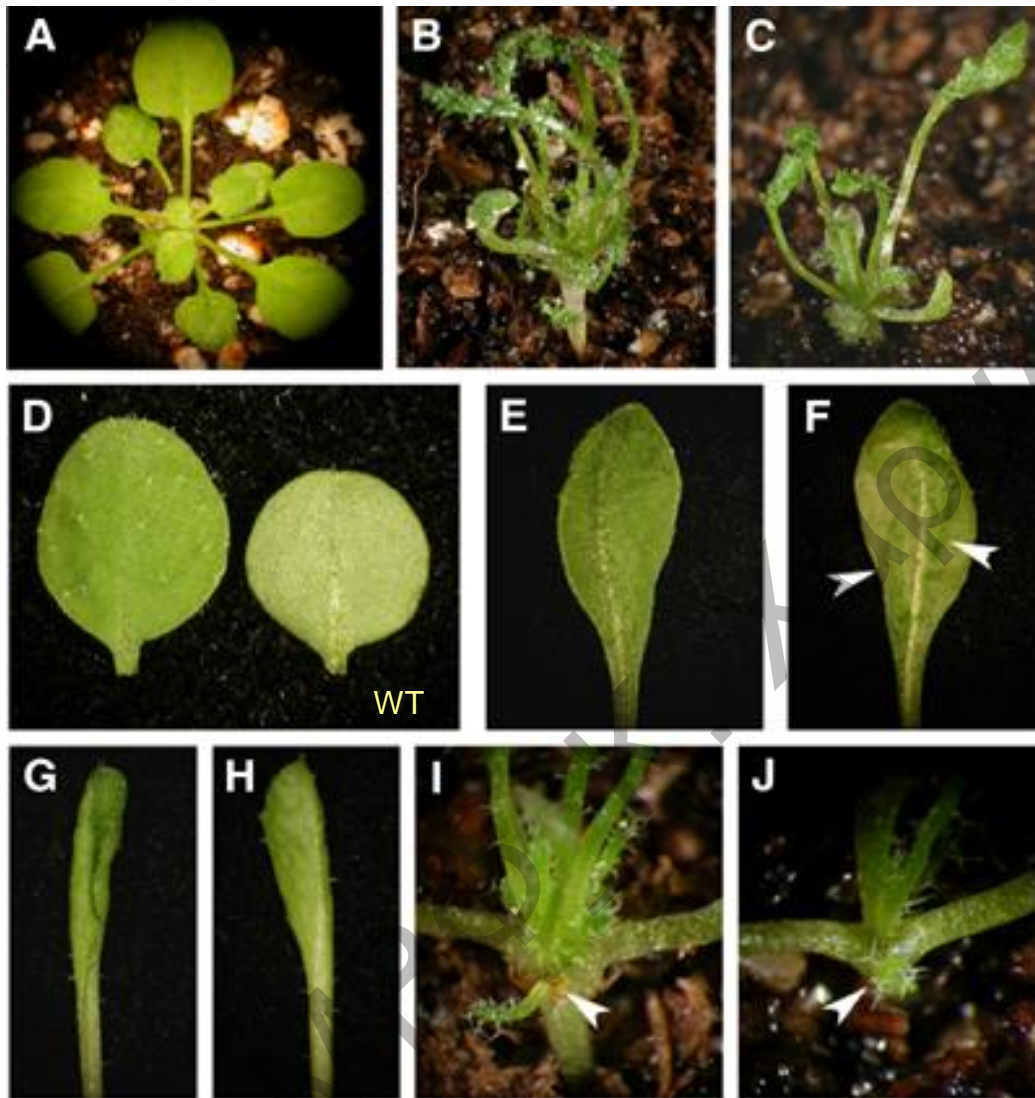


Few miRNA are understood functionally

| microRNA | Organism | Function |
|--------------|----------|--|
| lin-4 | worm | Early larval development transitions |
| let-7 | worm | Late larval development transitions |
| lsey-6 | worm | Left/right asymmetry of chemoreceptor expression |
| bantam | fly | Growth control during development |
| miR-14 | fly | Apoptosis and fat metabolism |
| miR-165/-166 | plant | Axial leaf development |
| miR-172 | plant | Flower development |
| miR-181 | mouse | Hematopoietic differentiation |
| miR-375 | mouse | Glucose metabolism |
| miR-15/-16 | human | Hematopoietic cell fate/CLL |



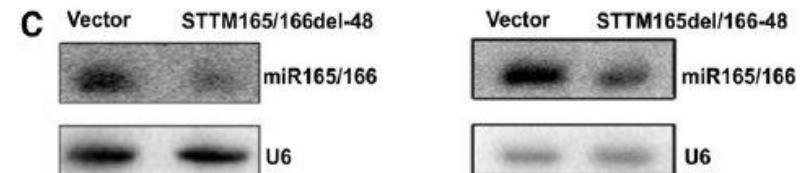
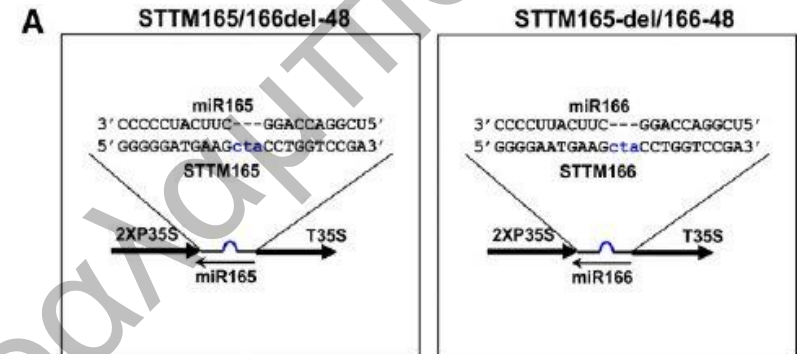
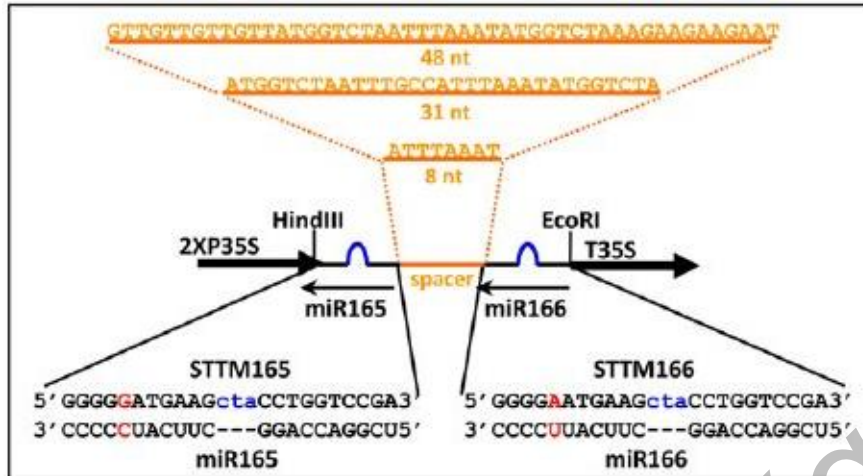
Dominant phenotypes caused by mutations in the miR165/166



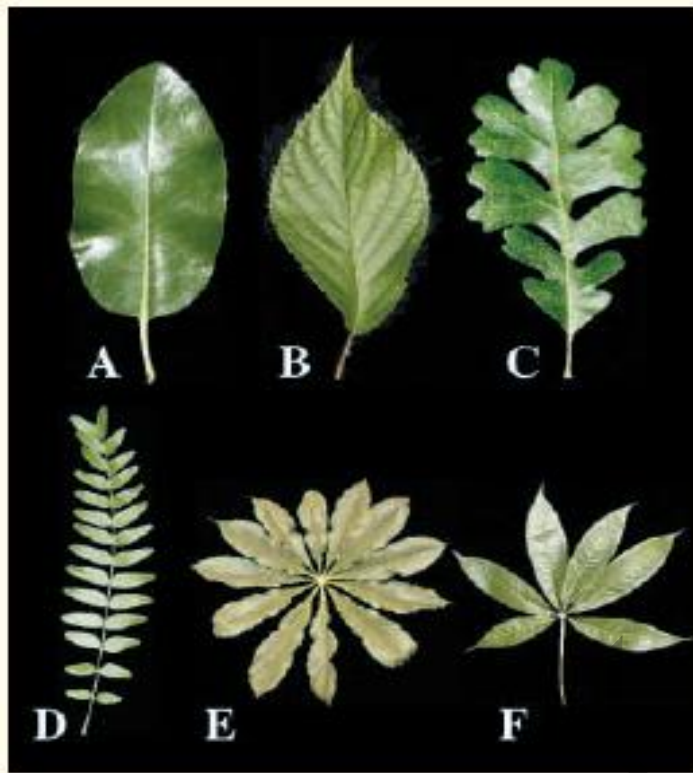
- Severe mutant plants have radialized, reduced leaves with adaxial (προσαξονική) characteristics all around the circumference of the leaf (B and C).
- Less severely affected plants than those in (B) can have normal adaxial (προσαξονική) surfaces (E) but ectopic regions of adaxial tissue (arrowheads) on the abaxial (αποαξονική) surface (F).



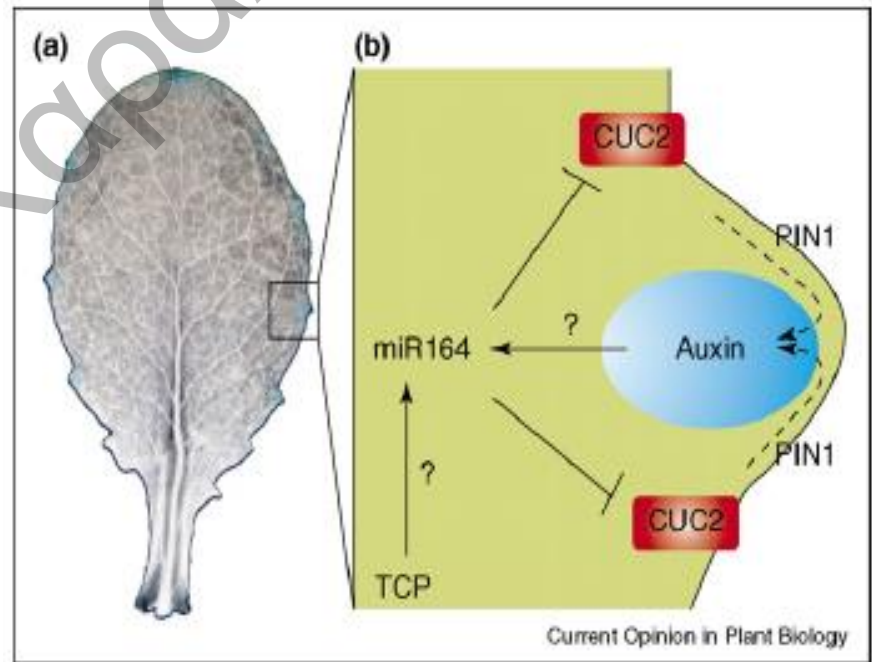
Spacer between miR165/166 affects phenotype



Έλεγχος του σχήματος του φύλλου



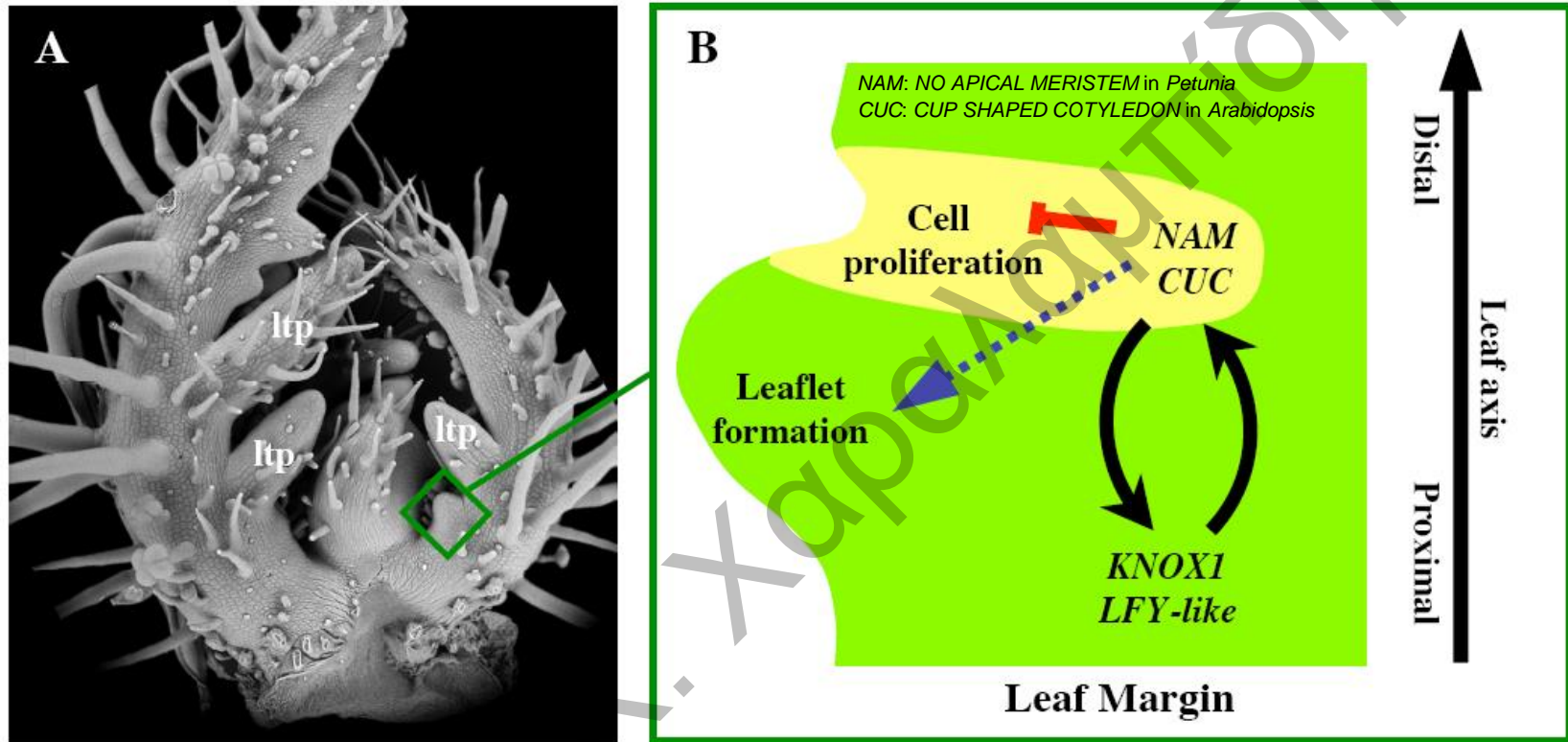
- Τα απλά φύλλα έχουν ομαλά περιθώρια (α), με οδοντώσεις (β) ή λοβούς (γ).
- Τα σύνθετα φύλλα αποτελούνται από φυλλάρια και στηρίζονται στη ράχη με ποικίλες διαμορφώσεις.



- Μέγιστο της αυξίνης εντοπίζεται στο άκρο των αναπτυσσόμενων οδοντώσεων. Τα miRNA164 και CUC2 εκφράζονται στις σχισμές των οδοντώσεων και ελέγχονται από τις TCP πρωτεΐνες (TEOSINTE BRANCHED1/CYCLOIDEA/PCF).



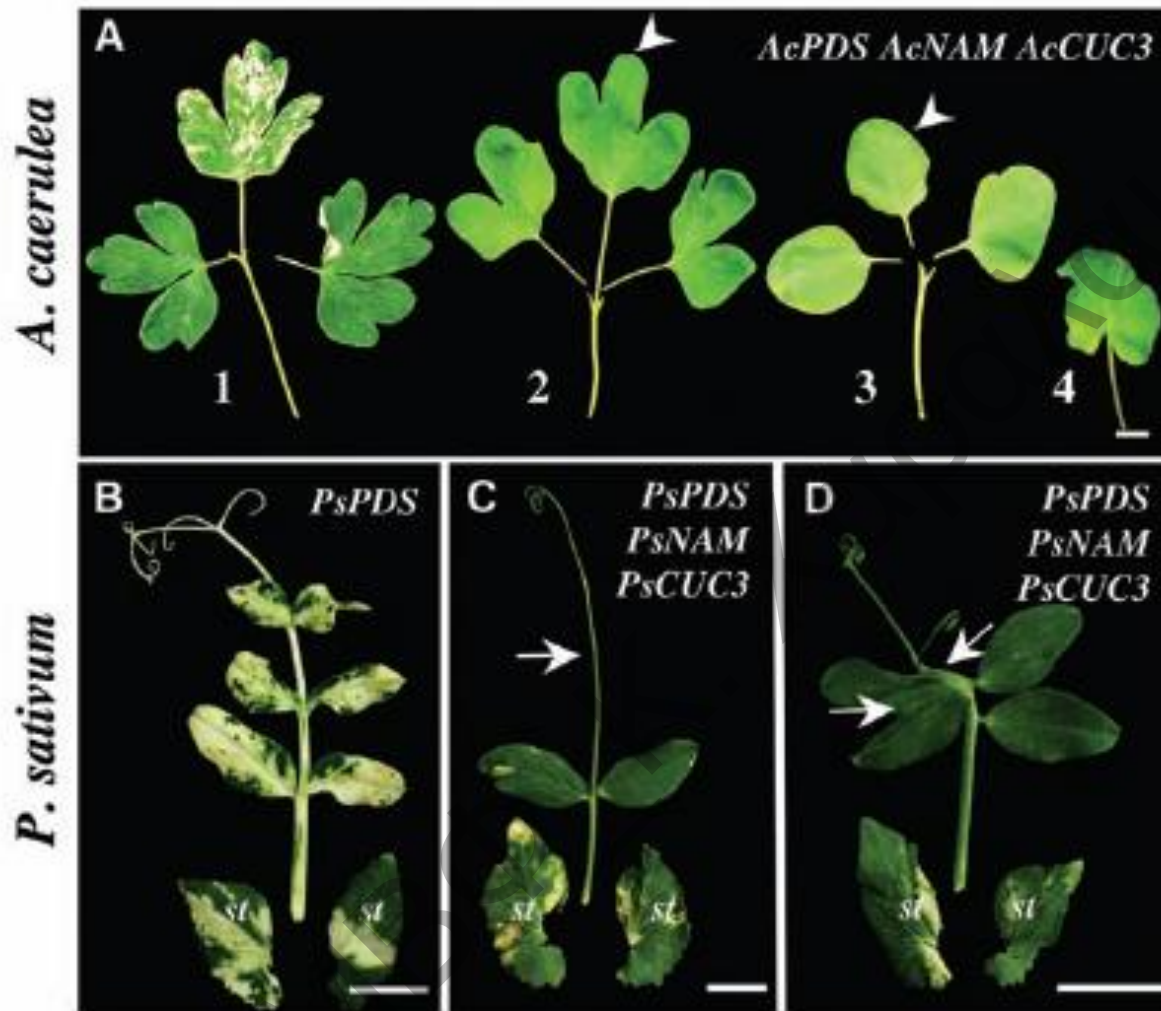
Ρόλος των *NAM/CUC* γονιδίων κατά τη διαμόρφωση των φυλλαρίων



Τα γονίδια *NAM/CUC* εκφράζονται σε καθορισμένες λεπτές ζώνες κατά μήκος των περιθωρίων του αρχεφύτρου του φύλλου. Συγχρόνως τα γονίδια προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα κύτταρα που βρίσκονται σε εγγύτητα με τις περιοχές έκφρασής τους με αποτέλεσμα την προαγωγή της δημιουργίας του φυλλαρίου. Τα γονίδια *KNOX* και *LFY-like* ενεργοποιούνται και ενεργοποιούνται από τα *NAM/CUC*.



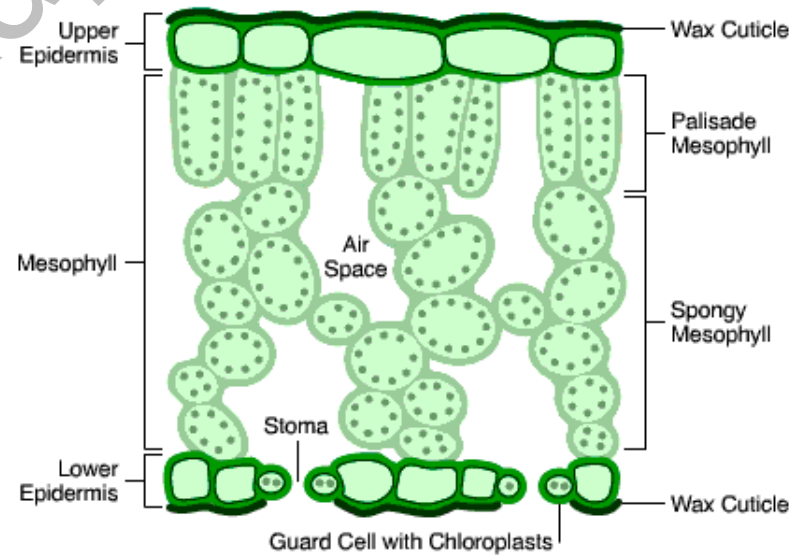
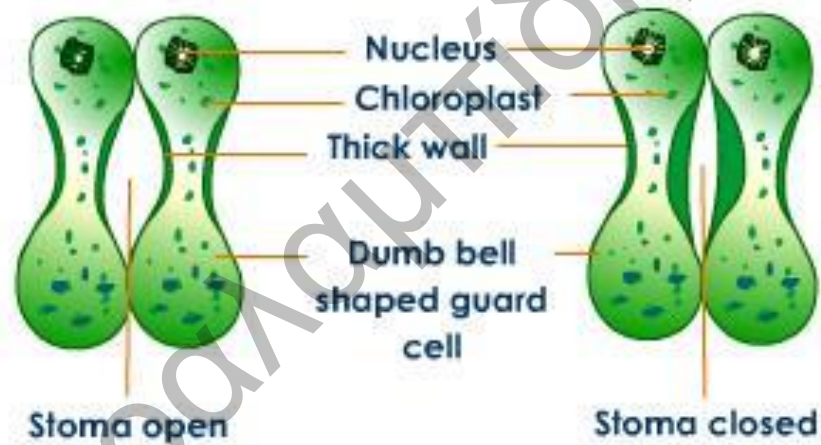
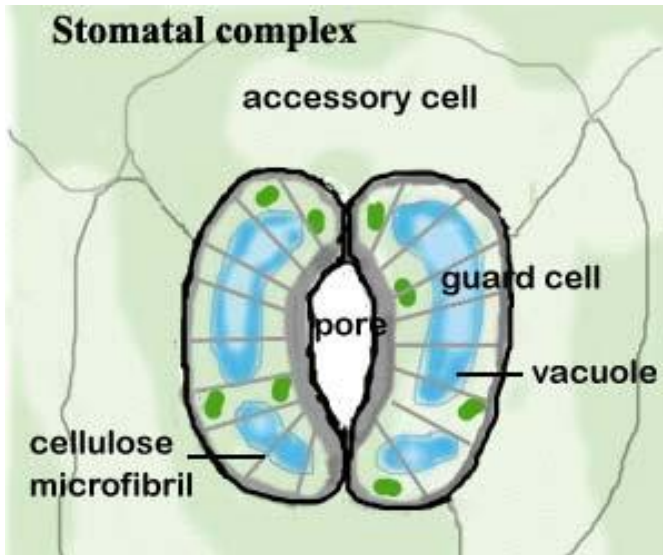
Σίγηση (PTGS) των NAM/CUC μετατρέπει τα σύνθετα φύλλα σε απλά



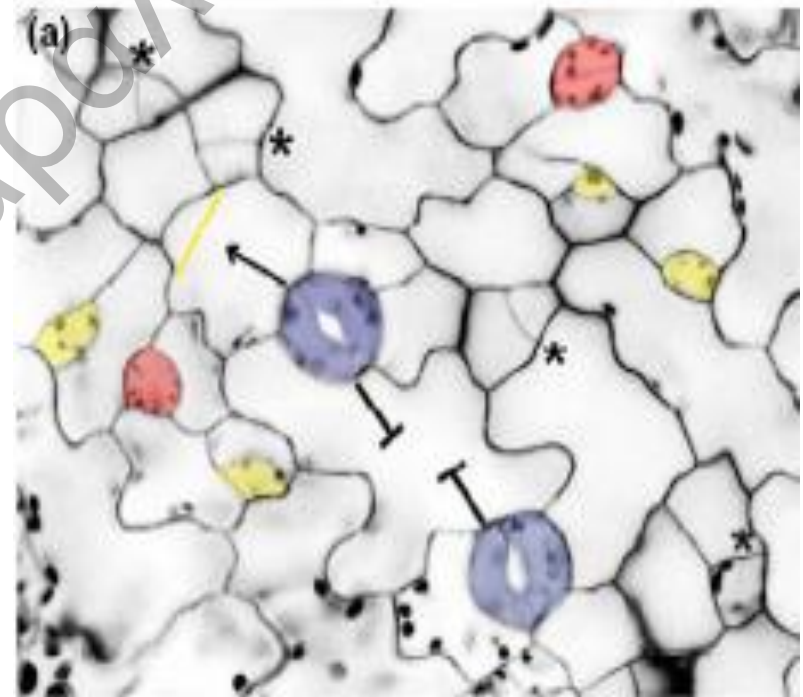
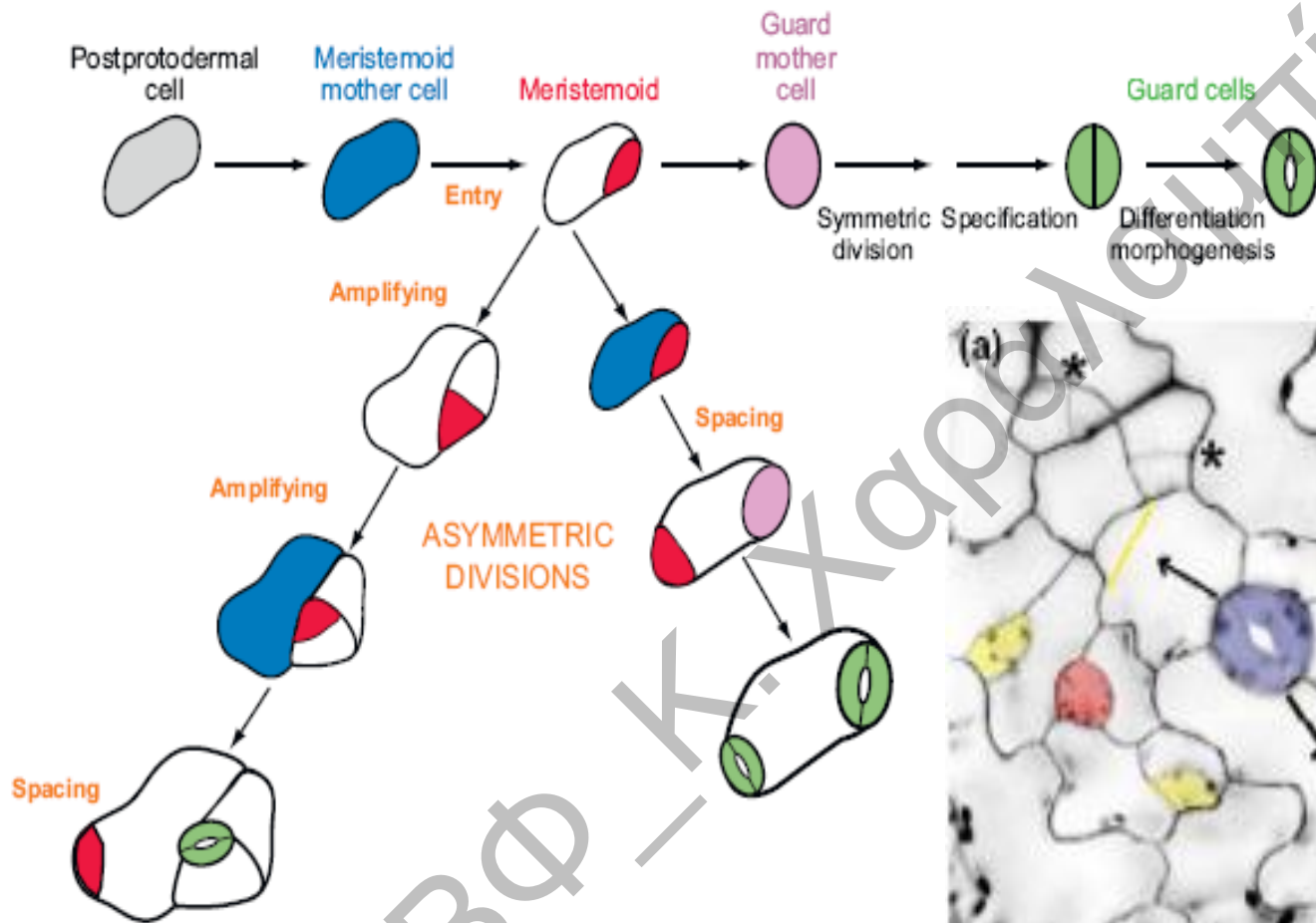
- Η σταδιακή ελάττωση μέσω γονιδιακής αποσιώπησης (PTGS) της δραστηριότητας των *NAM/CUC* γονιδίων μετατρέπει τα σύνθετα φύλλα σε απλά σε διάφορα φυτά.
- Φυτά *Aquilegia caerulea* (ΑΚΟΥΪΛΕΓΚΙΑ) όπου παρατηρείται σταδιακή ομαλοποίηση των περιθωρίων.
- Φυτά *Pisum sativum* αγρίου τύπου και φυτά όπου με PTGS παρατηρείται σχηματισμός μόνο ενός φυλλαρίου και ενός ζεύγους ελίκων, και σύντηξη φυλλαρίων και ράχης.



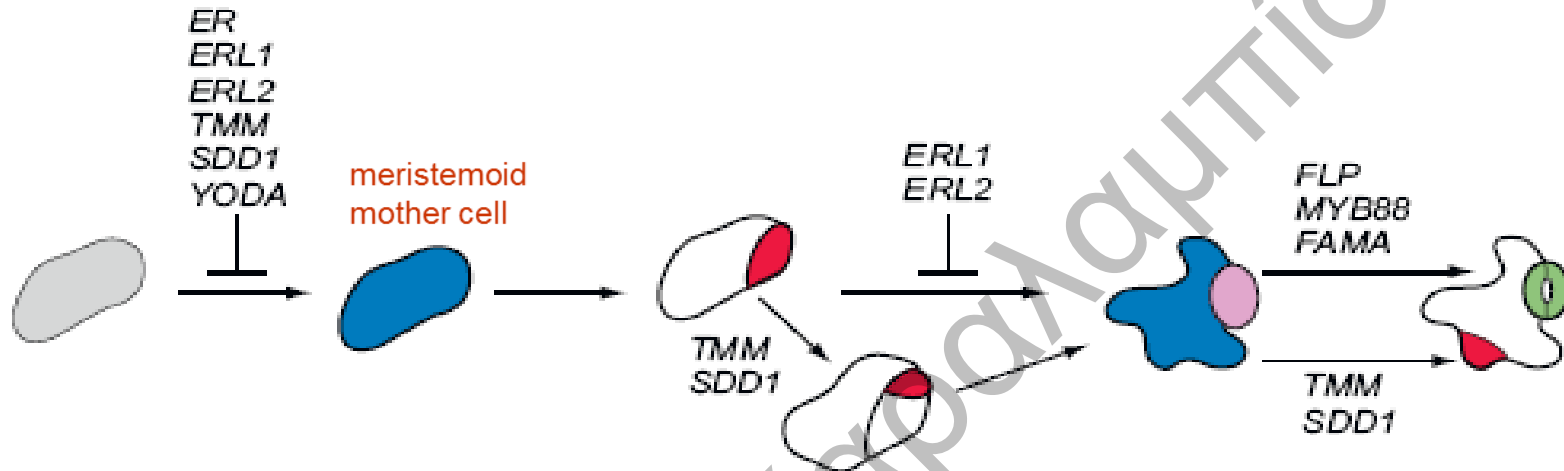
Επιδερμικά εξαρτήματα - στόματα



Σχηματισμός των επιδερμικών εξαρτημάτων - στόματα



Γονίδια που εμπλέκονται στο σχηματισμό των στομάτων

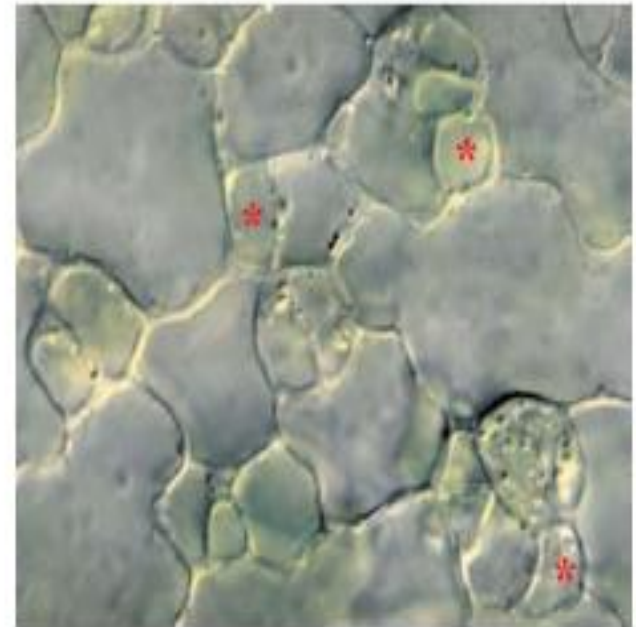
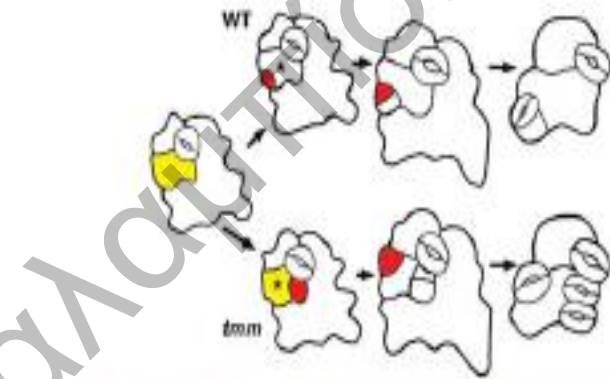
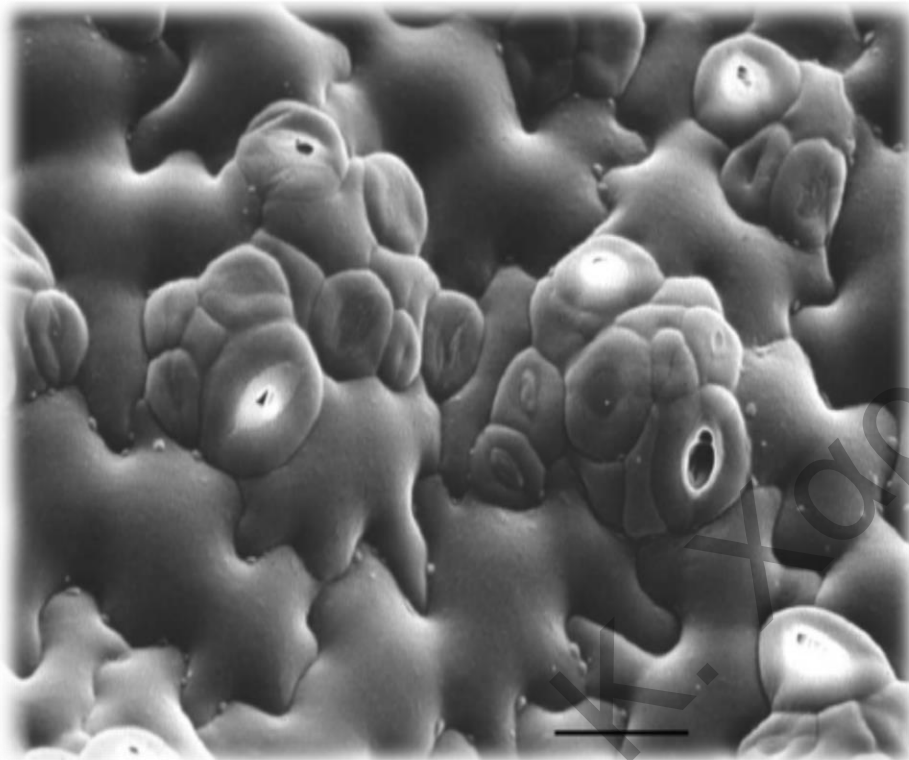


- **TMM: TOO MANY MOUTHS** (μεμβραν. υποδοχέας LRR-RLPs μεταγωγής σήματος)
- **ER και ERL: ERECTA και ERECTA LIKE** (LRR-RLK υποδοχείς)
- **YODA: MAP kinase kinase kinase (MAPKKK)**
- **SDD1: STOMATA DENSITY AND DISTRIBUTION 1** (εκκρινόμενη πρωτεάση)
- **FLP: FOUR LIPS1** (R2R3 MYB μεταγραφικός παράγοντας)

- **SPEECHLESS: bHLH μεταγραφικός παράγοντας**
- **MUTE: bHLH μεταγραφικός παράγοντας**
- **FAMA: bHLH μεταγραφικός παράγοντας**



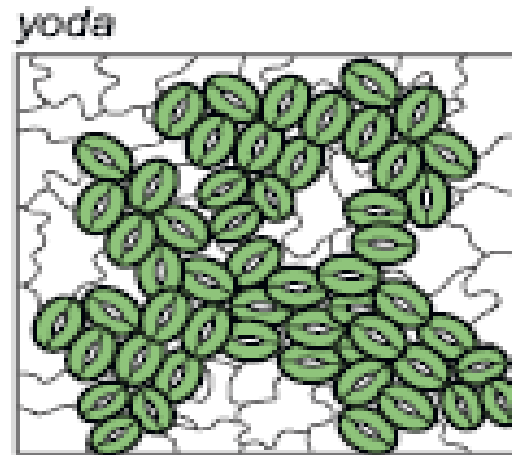
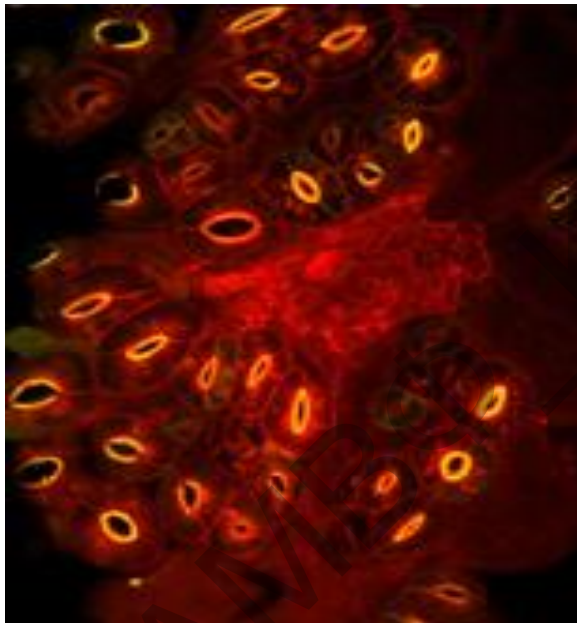
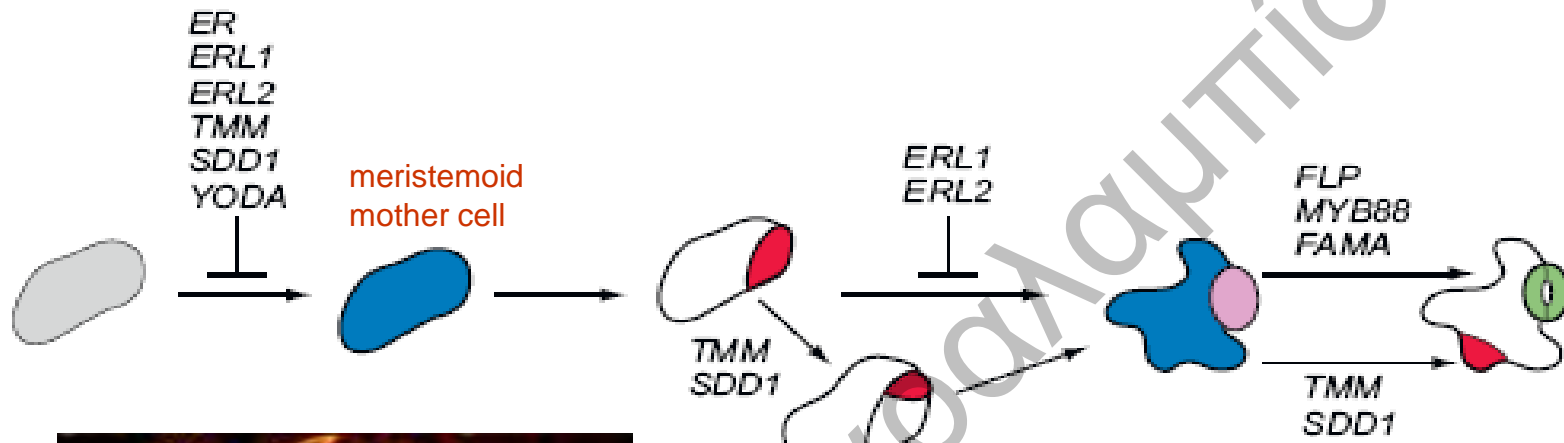
Φαινότυπος *tmm* μεταλλαγμάτων



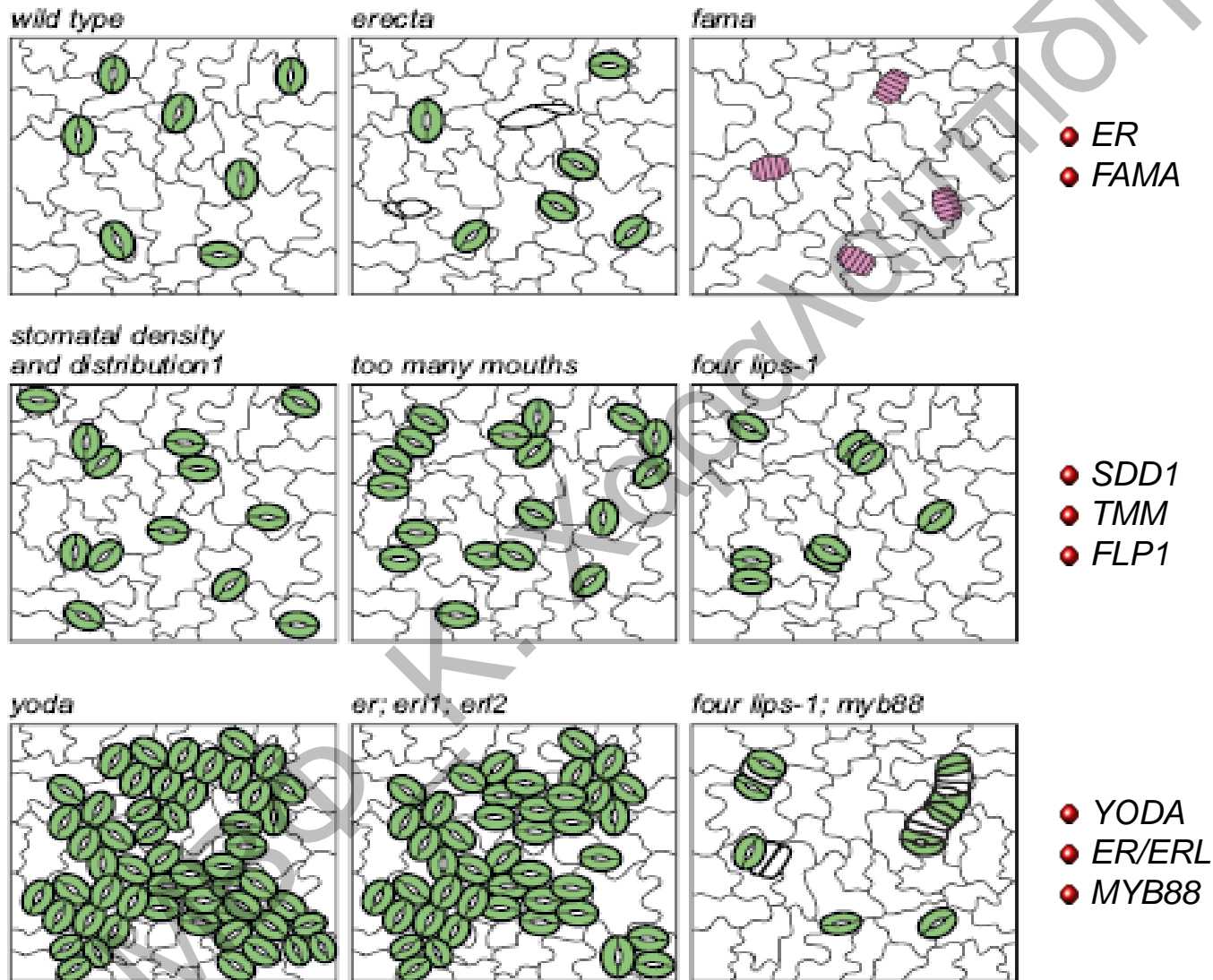
Η ομαδοποίηση των στομάτων οφείλεται στη τυχαία διεύθυνση των ασύμμετρων διαιρέσεων, στη διαίρεση των κυττάρων που γειτνιάζουν σε στόματα και στη διαφοροποίηση και των δύο θυγατρικών κυττάρων σε μητρικά κύτταρα καταφρακτικών.



Φαινότυπος YODA: MAP kinase kinase kinase (MAPKKK)

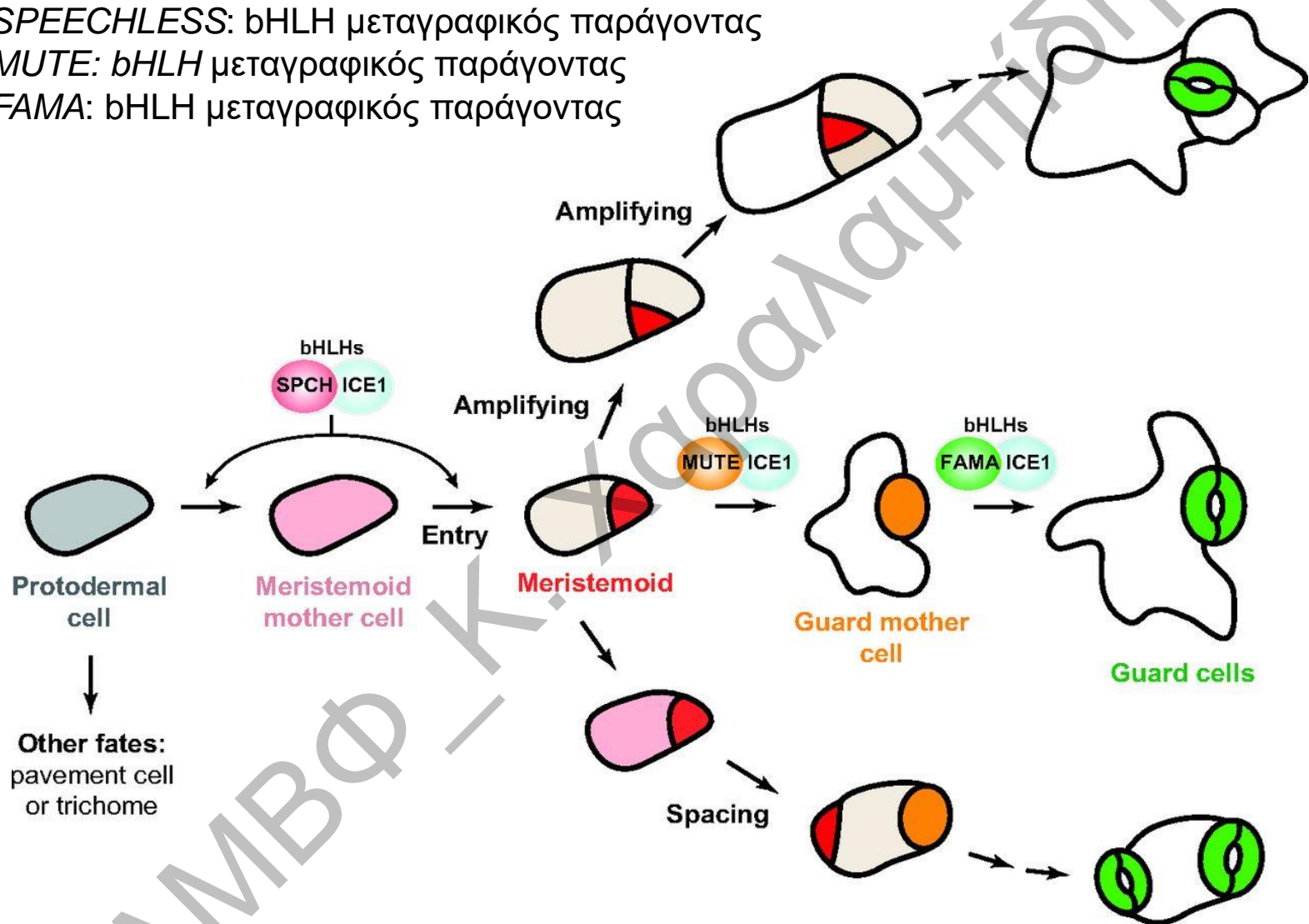


Φαινότυποι μεταλλαγμάτων με μη κανονικό πρότυπο επιδερμίδας

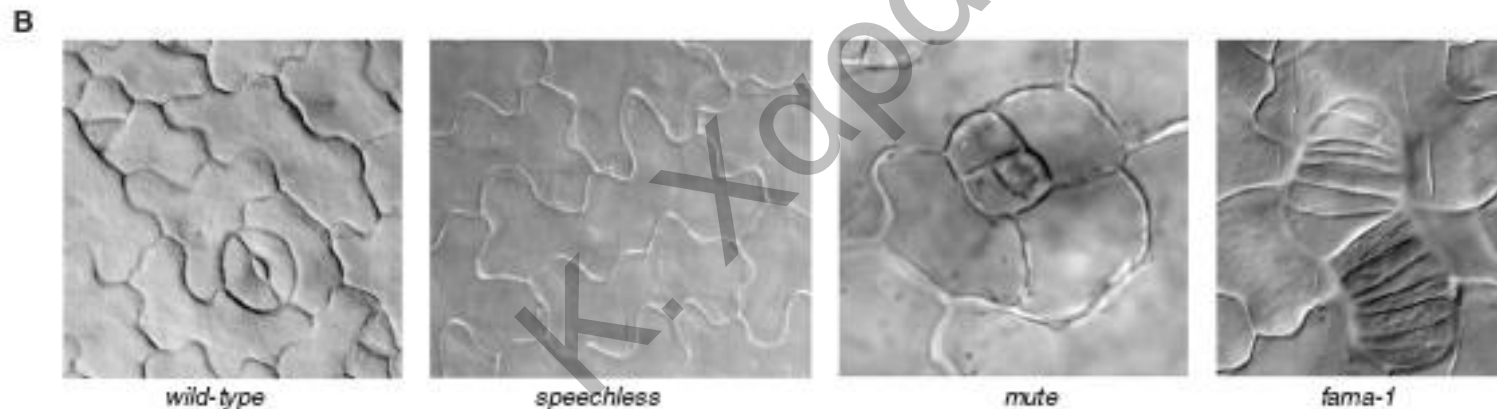
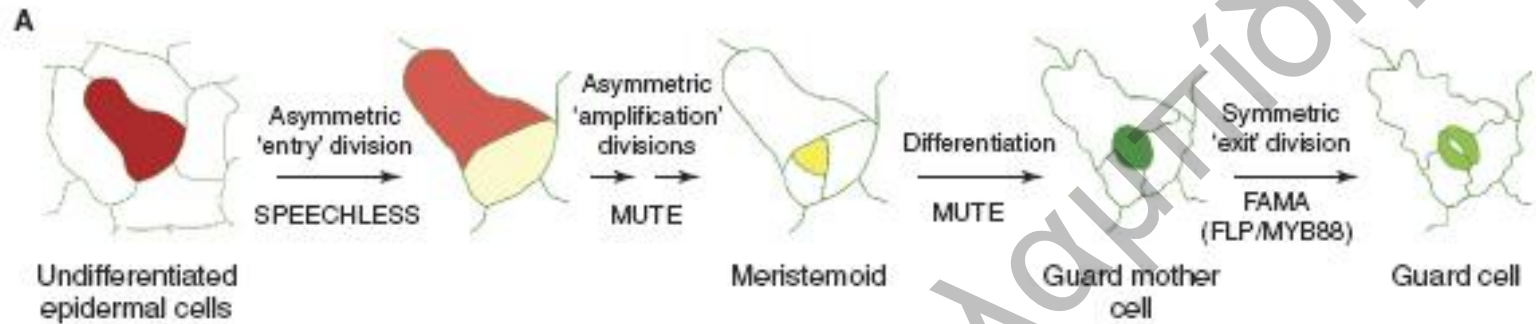


Γονίδια που εμπλέκονται στο σχηματισμό των στομάτων

- *SPEECHLESS*: bHLH μεταγραφικός παράγοντας
- *MUTE*: bHLH μεταγραφικός παράγοντας
- *FAMA*: bHLH μεταγραφικός παράγοντας



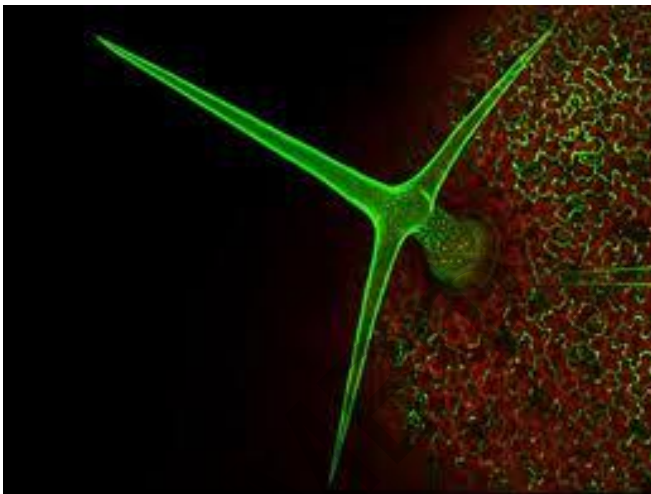
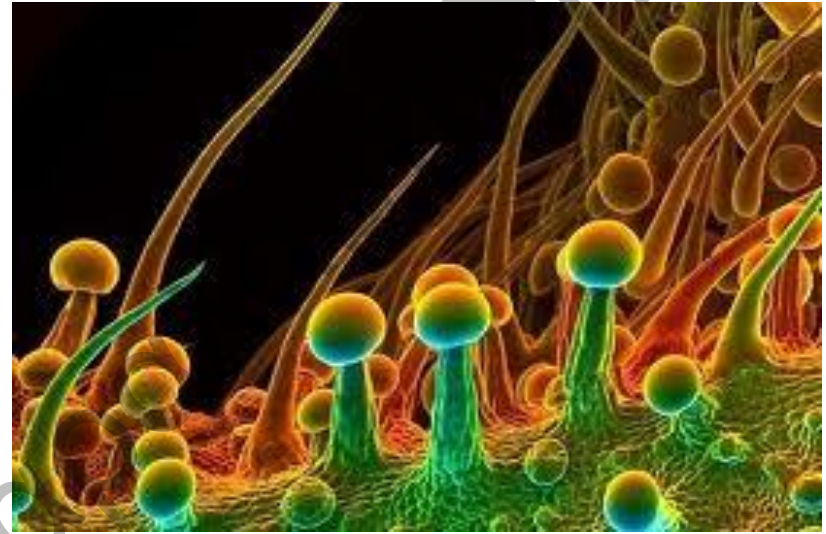
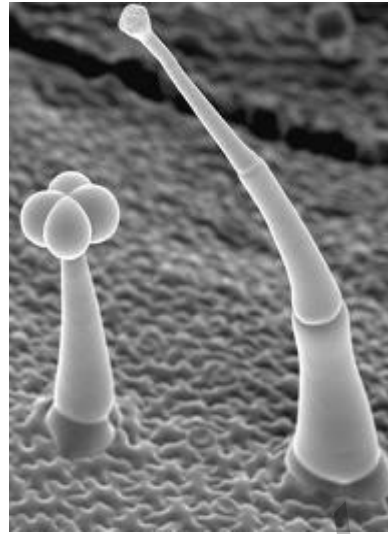
Φαινότυπος *speechless mute* και *fama* μεταλλάξεων



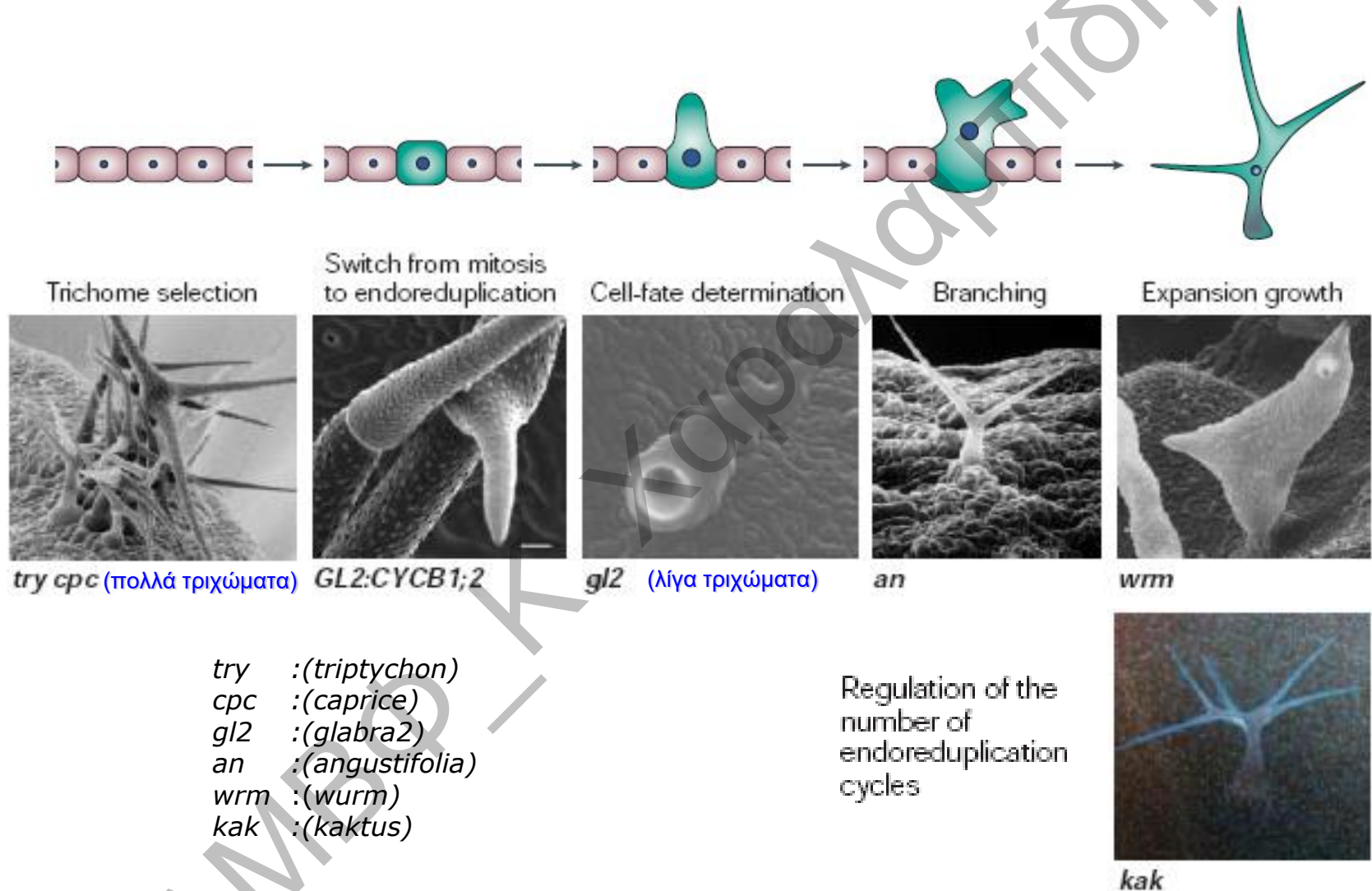
- **SPEECHLESS**: πρώτη ασύμμετρη διαίρεση που καθορίζει «τα κύτταρα της καταγωγής στόματος»
- **MUTE**: ασύμμετρη διαίρεση και διαφοροποίηση των μεριστωματοειδών
- **FAMA**: καθορίζει τα θυγατρικά κύτταρα ως καταφρακτικά και προάγει τη διαφοροποίησή τους



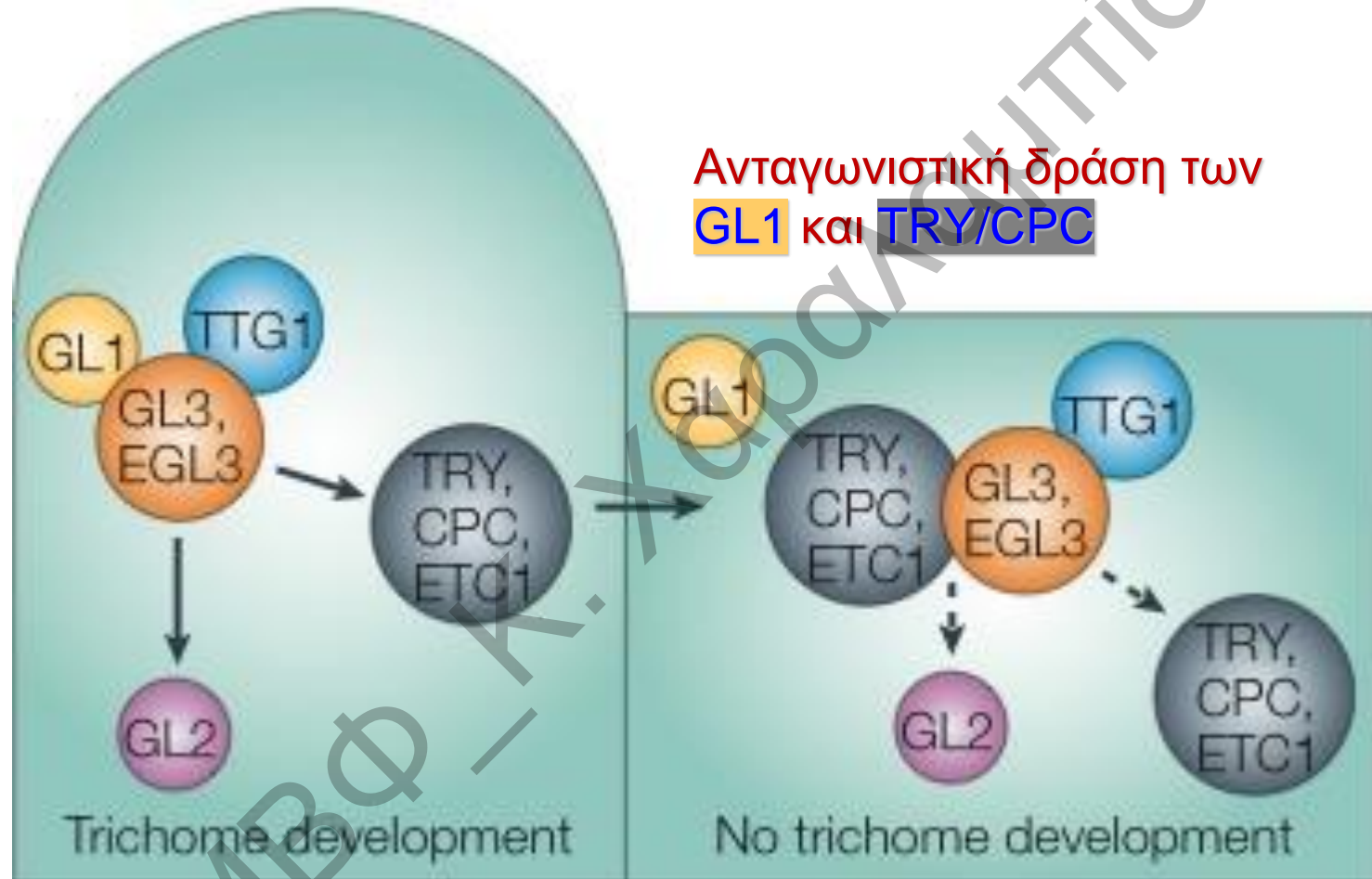
Επιδερμικά εξαρτήματα - τριχίδια



Σχηματισμός των επιδερμικών εξαρτημάτων – τριχίδια (trichomes)

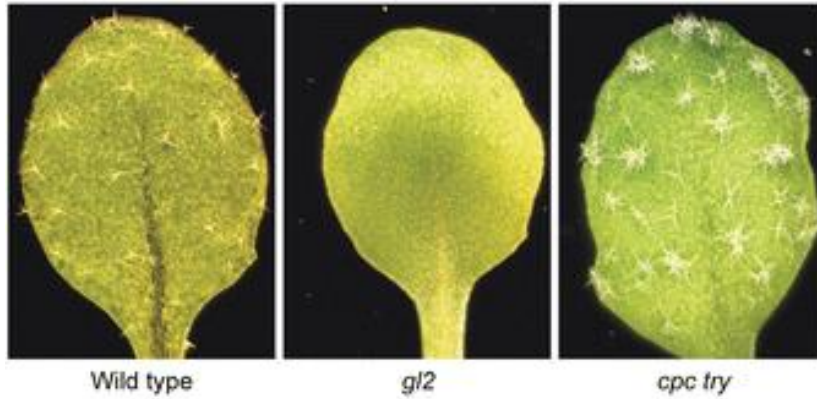


Γονιδιακή ρύθμιση σχηματισμού επιδερμικών εξαρτημάτων φύλλων

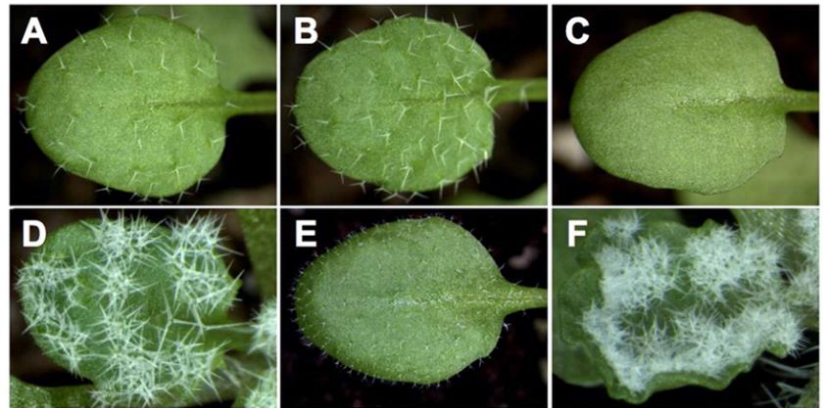
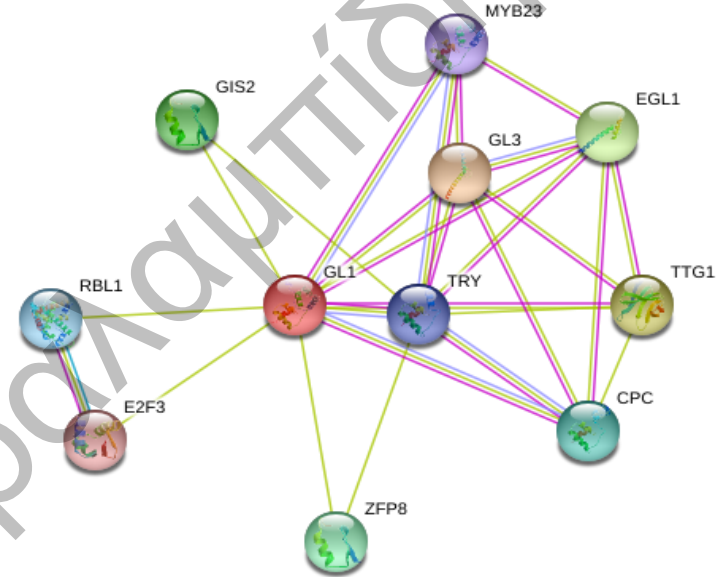
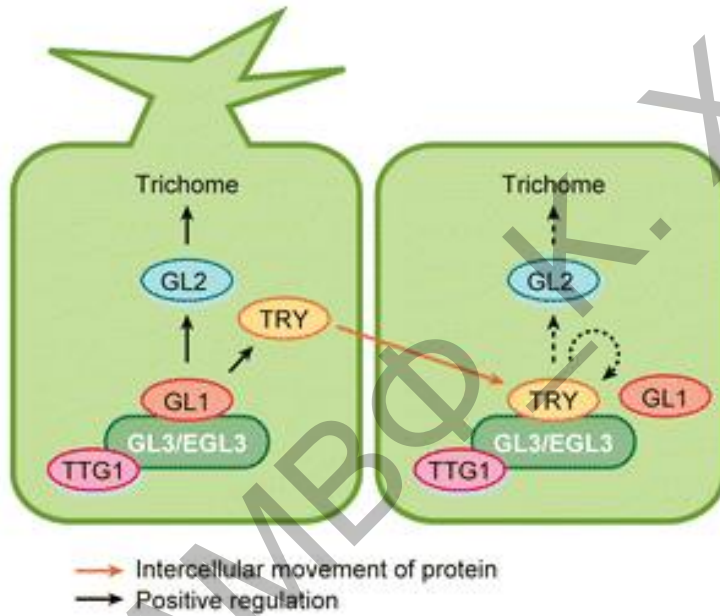


Σχηματισμός των επιδερμικών εξαρτημάτων – τριχίδια (trichomes)

a

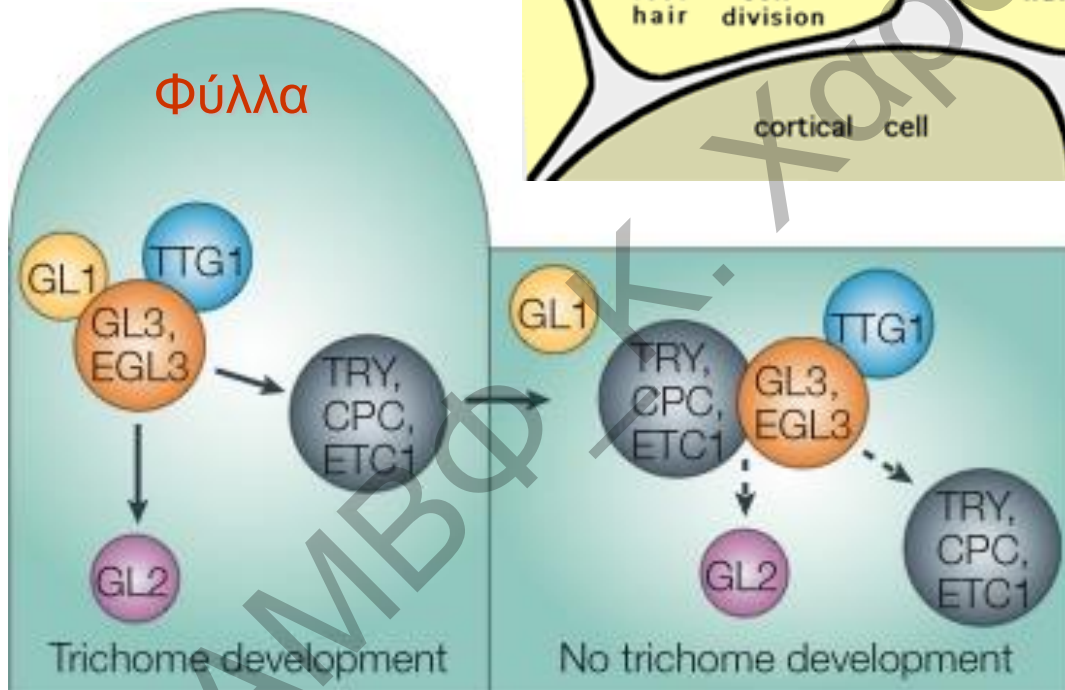
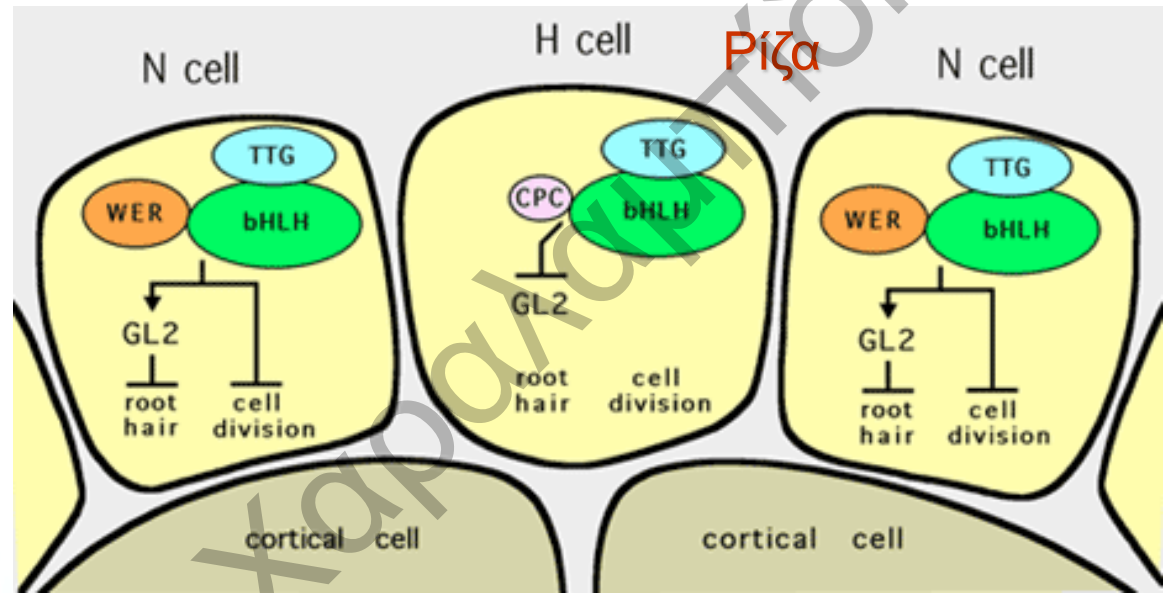


b



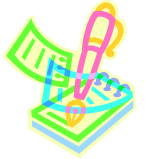
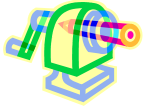
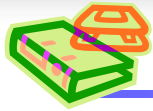
Διαφορική ρύθμιση επιδερμικών εξαρτημάτων ρίζας και φύλλου

Ανταγωνιστική δράση των **WER** και **CPC**



Ανταγωνιστική δράση των **GL1** και **TRY/CPC**





Thanks for your attention

ΑΜΒΦ - Κ. Χαρολαμπτίδης

