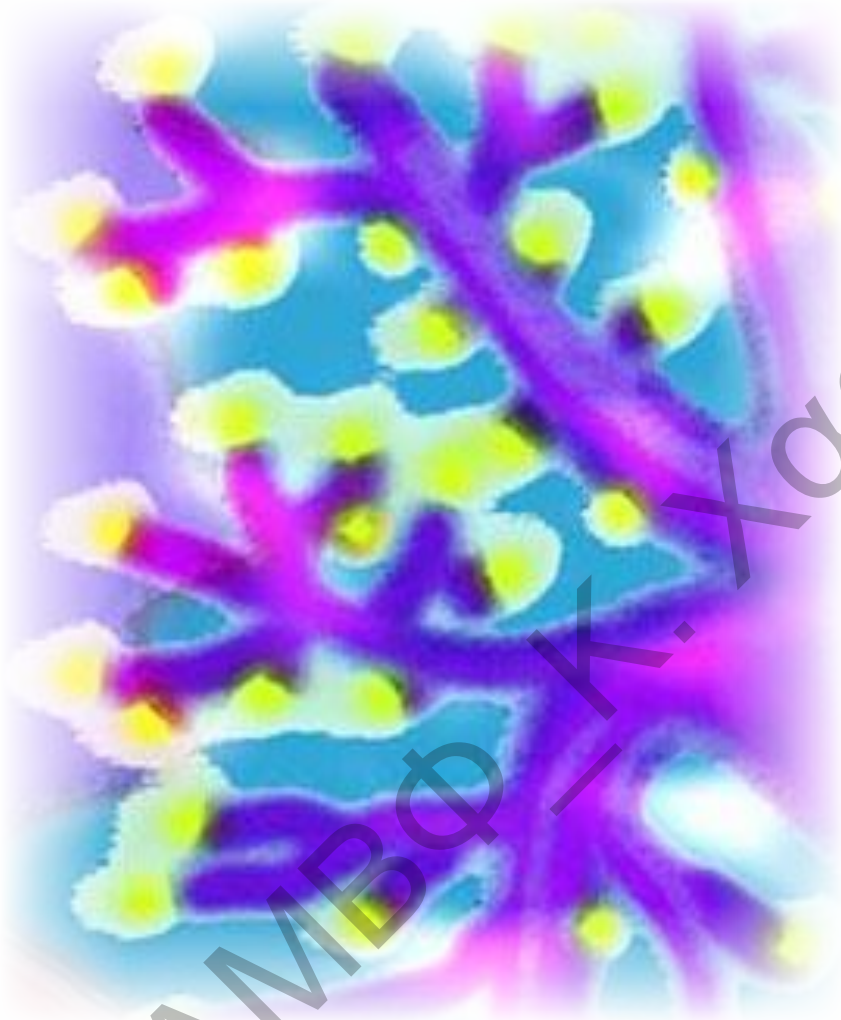


ROOT DEVELOPMENT





ROOT DEVELOPMENT

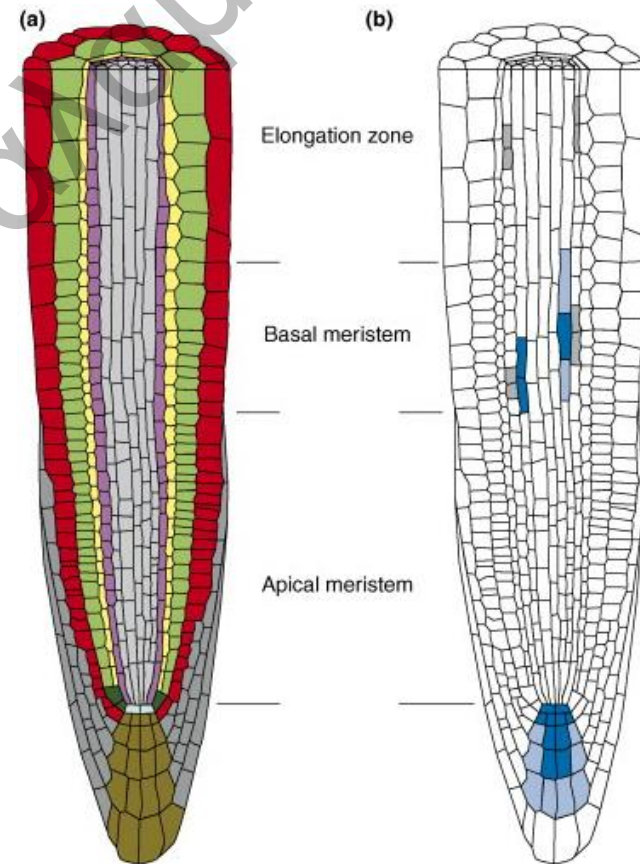
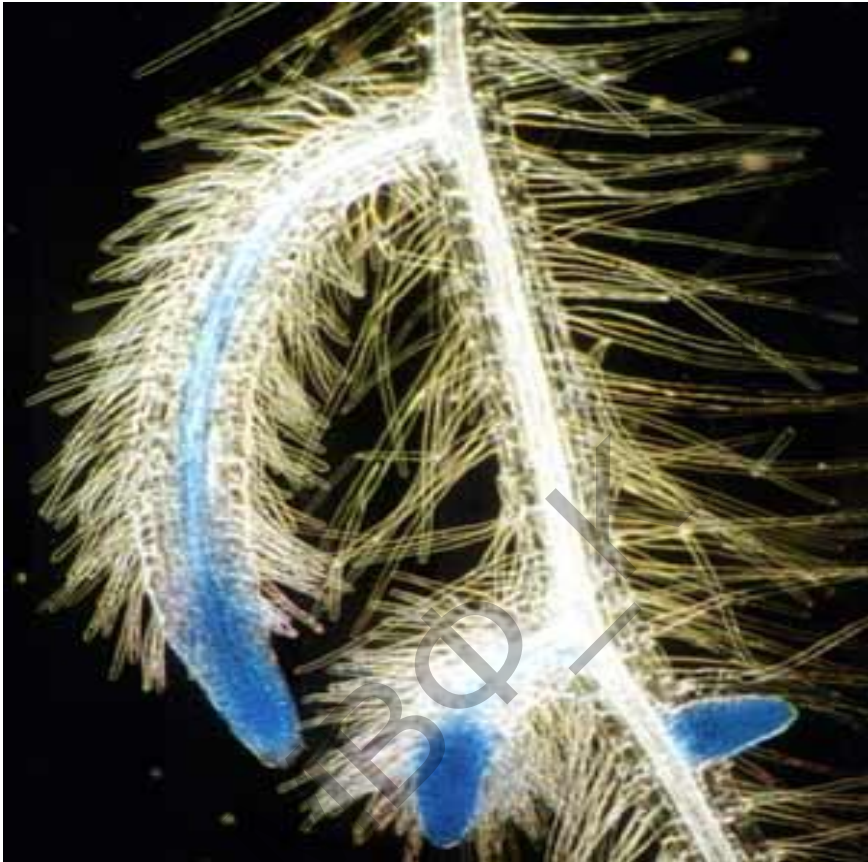
Ανάπτυξη της ρίζας στο *Arabidopsis thaliana*

- Εξαιτίας της απλής οργάνωσης της, η ρίζα του *Arabidopsis* είναι ένα από τα πλέον κατάλληλα συστήματα μελέτης της **οργανογένεσης** στα φυτά.
- Μία σειρά πειραμάτων μοριακής γενετικής οδήγησαν στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν:
 - A) Το **πρότυπο οργάνωσης του ακτινωτού σχεδίου** (radial patterning)
 - B) Την τοπολογία και δράση του **κέντρου οργάνωσης της ρίζας** (root organizing centre)
 - Γ) Τη **διαφοροποίηση των επιδερμικών κυττάρων της ρίζας** (root epidermal cell differentiation)

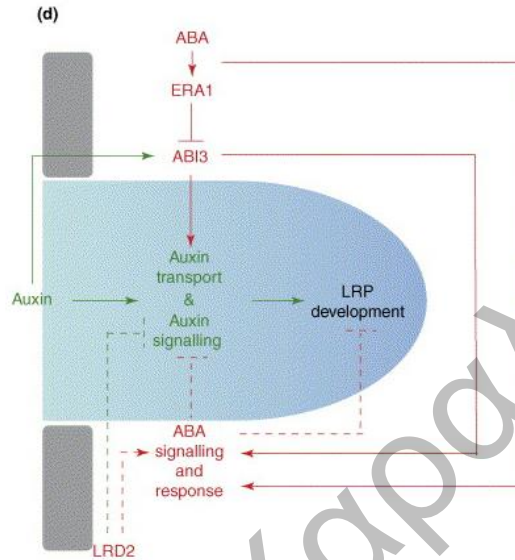
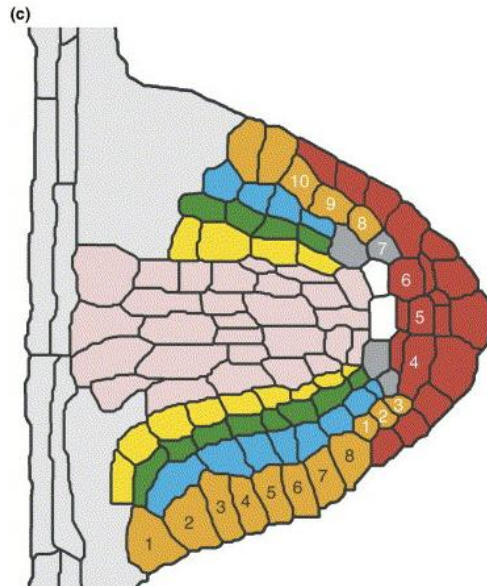


Ανάπτυξη της ρίζας στο *Arabidopsis thaliana*

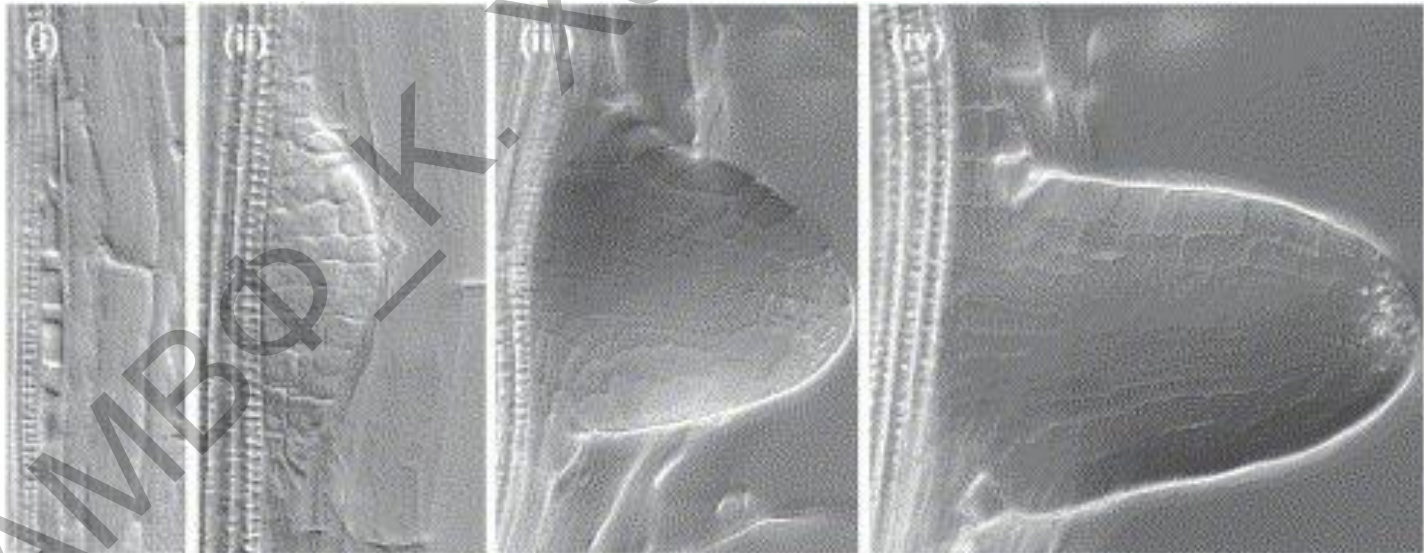
Σε αντίθεση με το βλαστό, το ακραίο μερίστωμα τις ρίζας – AMP (root apical meristem) δεν δημιουργεί άλλα πλάγια όργανα. Ενώ η πρωτογενής ρίζα δημιουργεί δευτερογενείς πλάγιες ρίζες, αυτές δεν προκύπτουν από το ακραίο αναπτυσσόμενο άκρο της, αλλά από πιο ώριμα τμήματα αυτής.



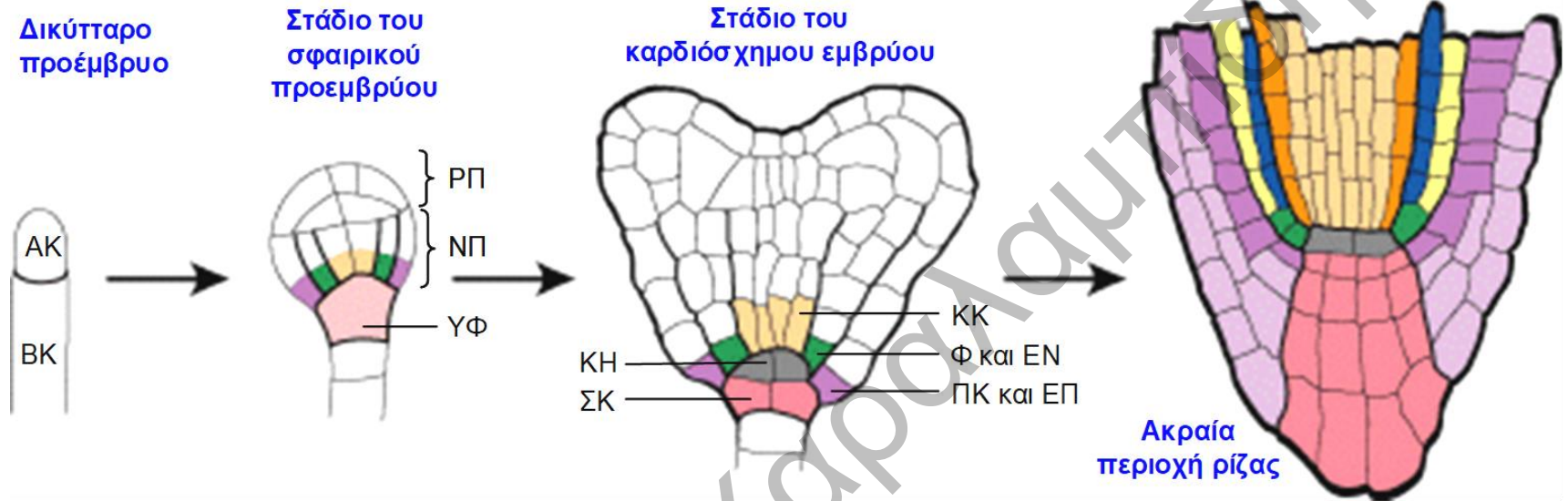
Ανάπτυξη δευτερογενών ριζών στο *Arabidopsis thaliana*



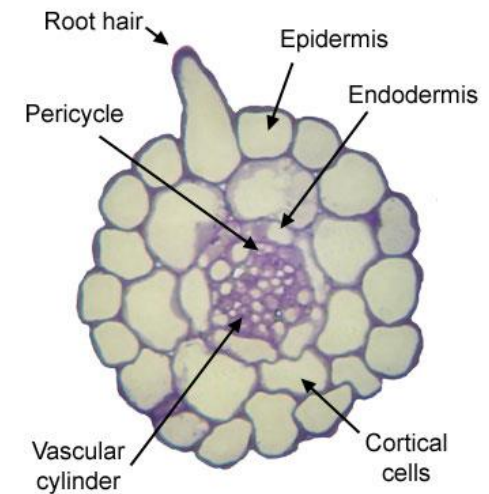
Auxin transport and signaling directly regulate the development of a lateral root primordium from the pericycle.



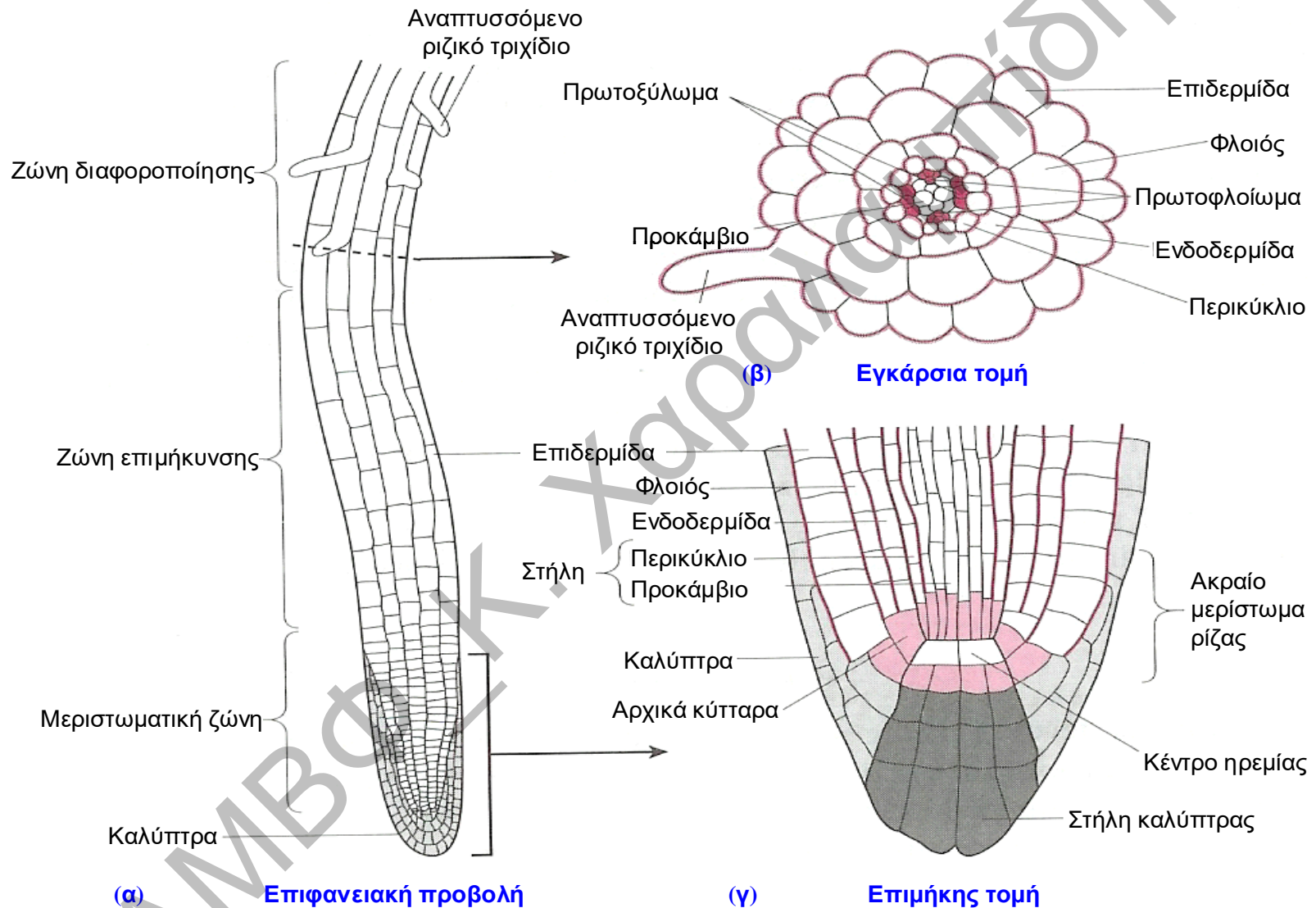
Προέλευση του πρωτογενούς μεριστώματος της ρίζας



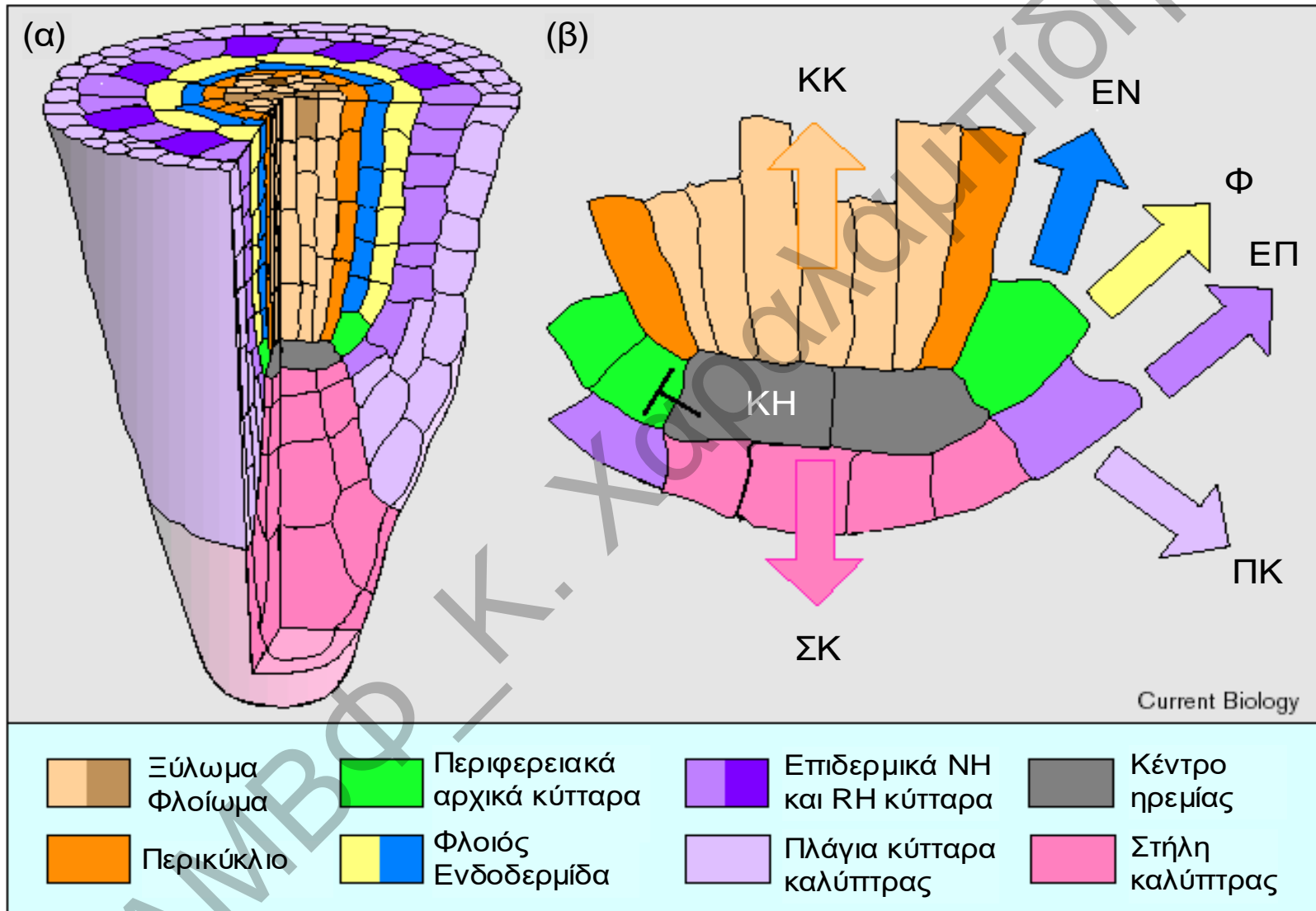
- Το κέντρο ηρεμίας (ΚΗ) και τα αρχικά κύτταρα της στήλης της καλύπτρας (ΣΚ) προέρχονται από την υπόφυση (ΥΦ)
- Τα αρχικά κύτταρα του μεριστώματος που δίνουν γένεση στις κυτταρικές σειρές της αναπτυσσόμενης ρίζας προέρχονται από το κατώτερο (νωτιαίο) τμήμα του προεμβρύου
- Το μερίστωμα της ρίζας καθίσταται ενεργό στο έμβρυο στο στάδιο της καρδιάς (heart stage)



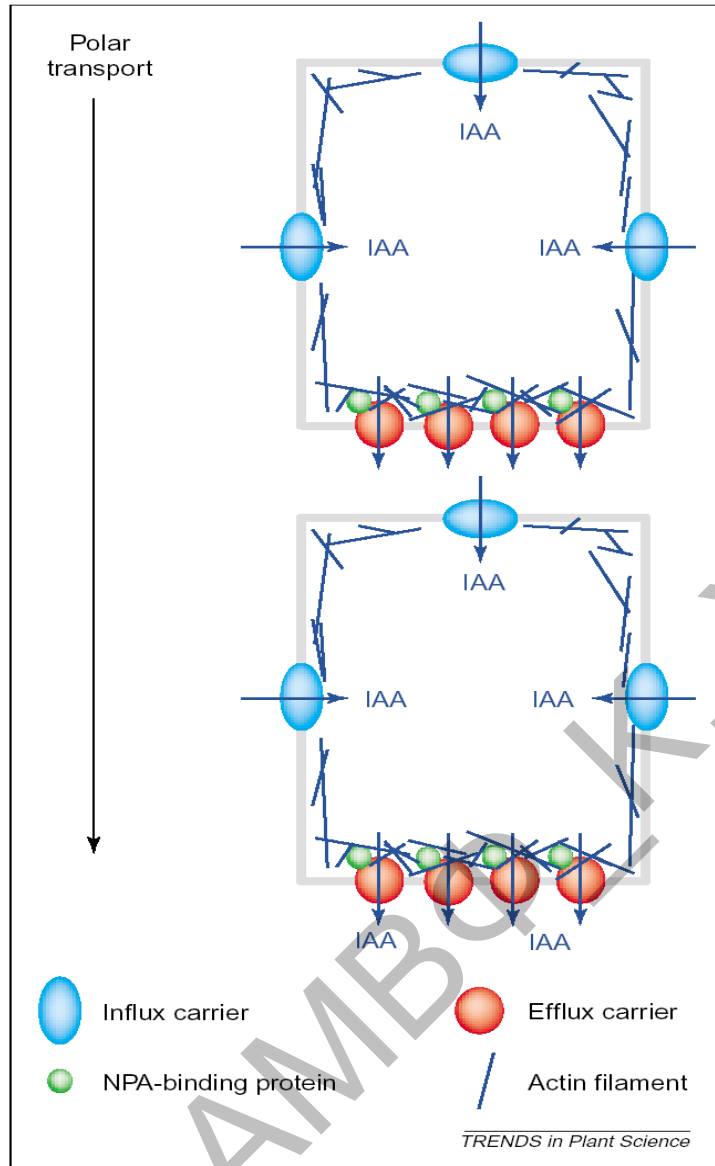
Ανατομία και οργάνωση της ρίζας στο *Arabidopsis*



Οργάνωση του ακραίου μεριστώματος της ρίζας (AMP) στο *Arabidopsis*



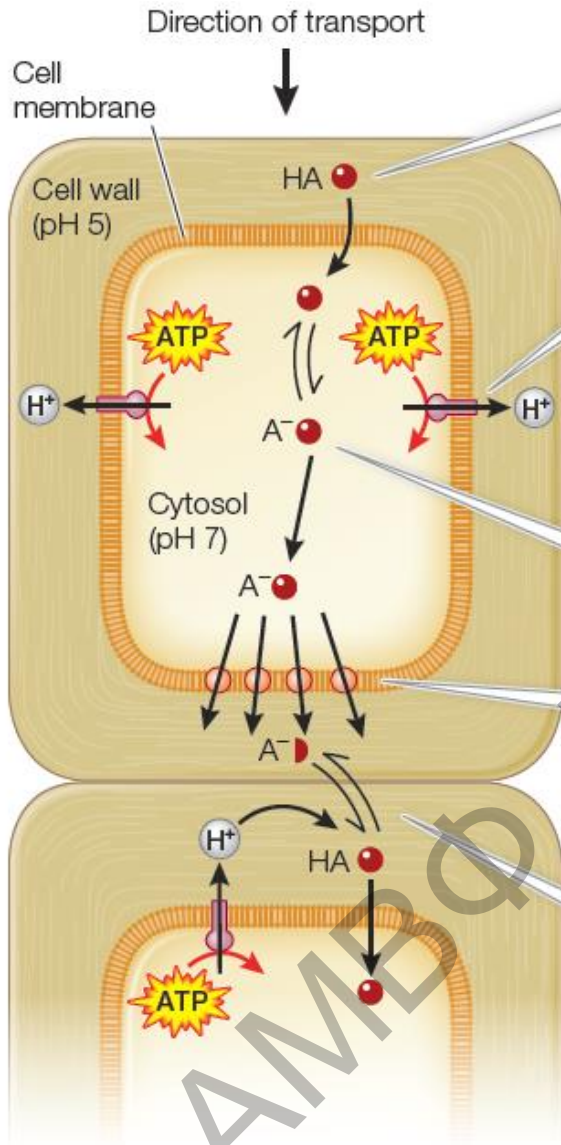
Ο ρόλος της αυξίνης στην οργάνωση του AMP



- Η οργάνωση και τοπολογική διεύθυνση του ακραίου μεριστώματος της ρίζας (AMP) εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την αυξίνη.
- Η ορμόνη IAA προσλαμβάνεται από τα κύτταρα μέσω ειδικών μεταφορέων εισροής (influx carrier), ή παθητικά υπό μορφή proton-associated (HA) μορφή αυξίνης.
- Το IAA (IAA^- ή A^-) εξέρχεται από το κύτταρο μέσω των ειδικών συμπλόκων εκροής (efflux carrier complex). Τα σύμπλοκα αυτά αποτελούνται από το προϊόν του γονιδίου *PIN* και μίας ρυθμιστικής υπομονάδας που δεσμεύει NPA (ornaphthylphthalamic-acid-binding subunit).
- Η ακραίο-βασική ροή της αυξίνης στο έμβryo οδηγεί σε μία διαβάθμιση της συγκέντρωσης της με μέγιστο στα αρχικά κύτταρα της στήλης της καλύπτρας, γεγονός που προάγει την ανάπτυξη του AMP.



polar transport of auxin



1 Auxin enters the cell by passive diffusion as an uncharged acid (HA).

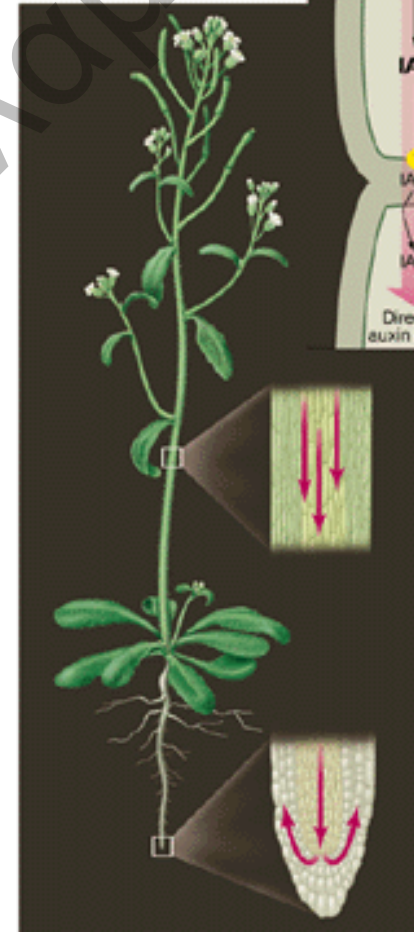
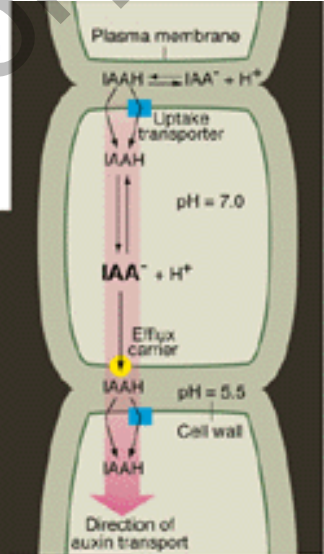
2 Proton pumps in the cell membrane maintain the cell wall at an acidic pH and set up a chemiosmotic gradient to drive the transport of HA.

3 A⁻ predominates in the cytosol, which has a neutral pH.

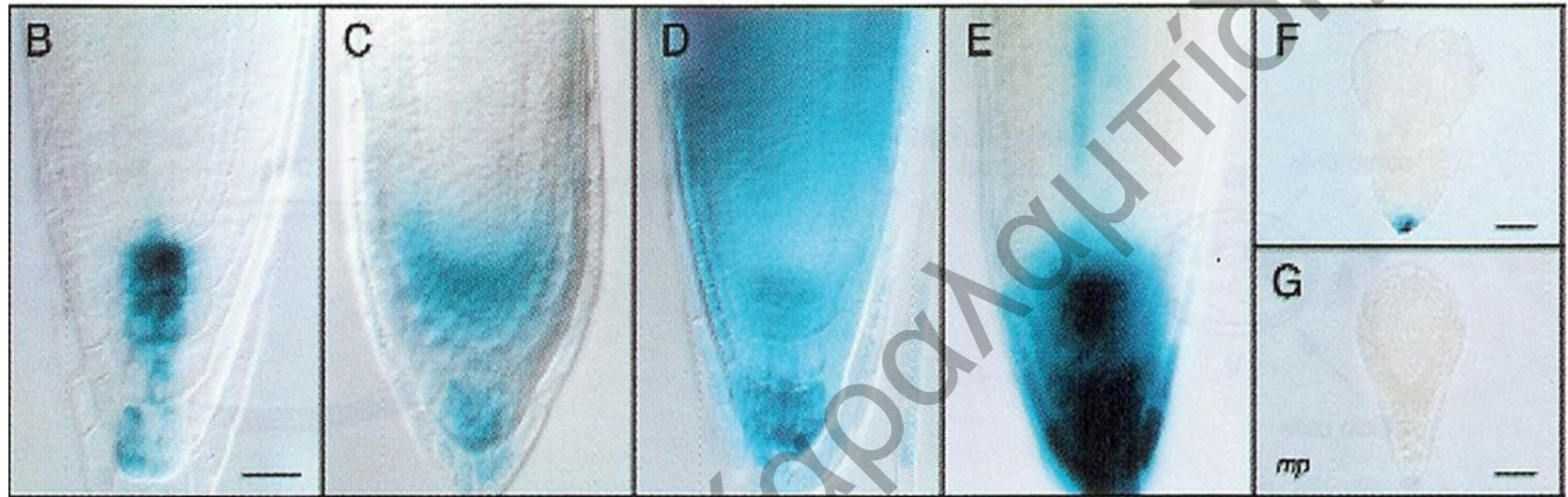
4 A⁻ exits the cell via auxin anion efflux carriers that are concentrated at the basal end of each cell.

5 In the cell wall, the lower pH causes A⁻ to become HA, which diffuses into the next cell.

Dissociated (anionic, A⁻)
Proton-associated (HA)



Ο ρόλος της αυξίνης στην οργάνωση του AMP

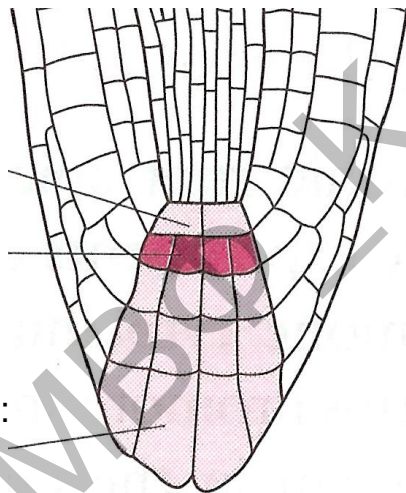


A

Κέντρο ηρεμίας:
μέτρια έκφραση

Αρχικά κύτταρα
καλύπτρας:
υψηλή έκφραση

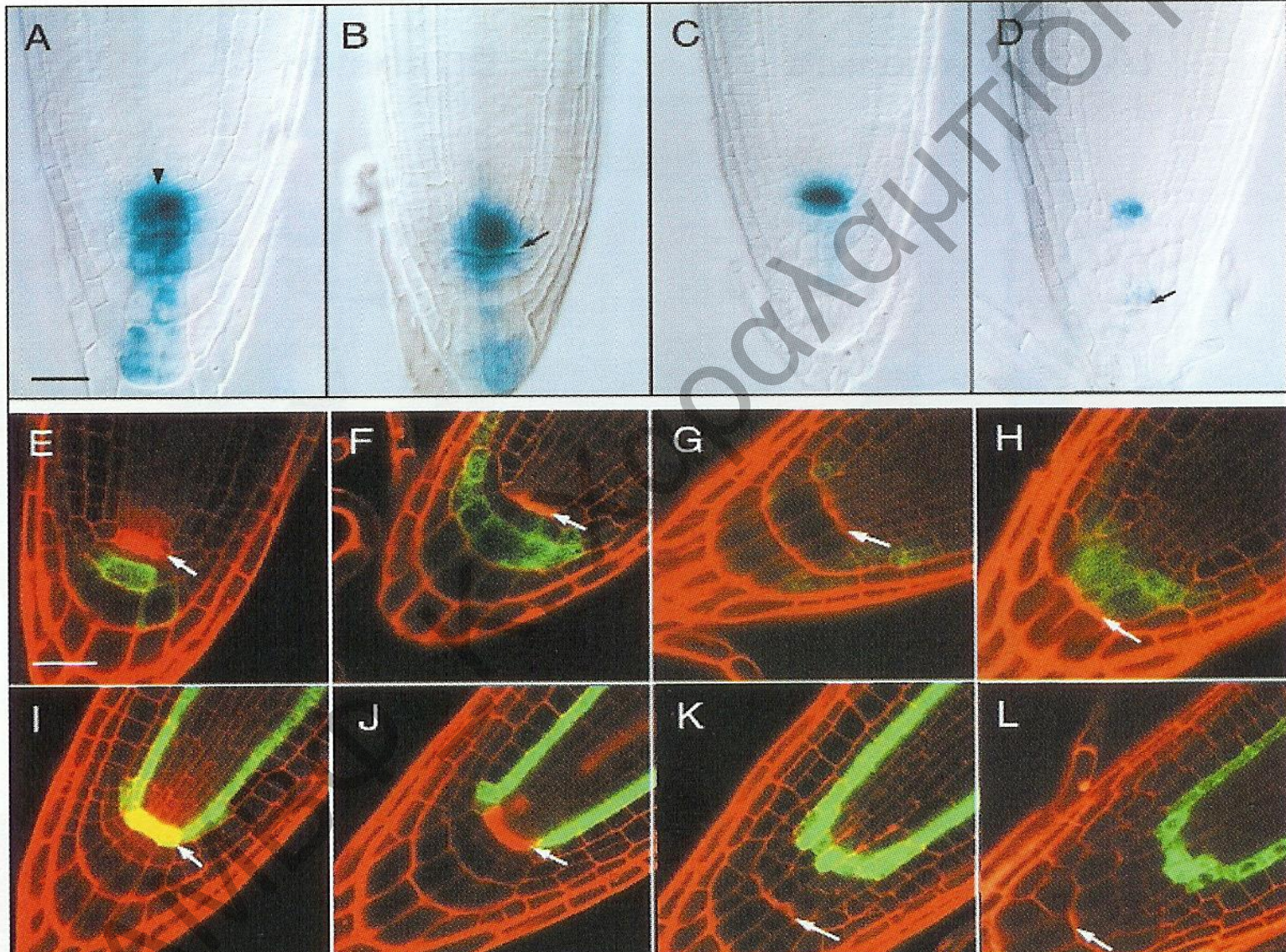
Στήλη καλύπτρας:
μέτρια έκφραση



Παρουσία αναστολέα πολικής μεταφοράς της αυξίνης παρεμποδίζεται η ροή της παραγόμενης από το βλαστό αυξίνης προς τη ρίζα. Το γεγονός αυτό αναγκάζει τα κύτταρα που περιβάλλουν το κέντρο ηρεμίας και τα αρχικά κύτταρα της καλύπτρας να λειτουργήσουν ως σημεία *de novo* βιοσύνθεσης της αυξίνης (C)



Ικανότητα αναγέννησης του κέντρου ηρεμίας στο AMP



Μοριακή γενετική της ανάπτυξης της ρίζας

root meristemless1 και *meristemless2* (*rml1* και *rml2*)

Χαρακτηρίζονται από πολύ κοντή πρωτογενή ρίζα. Η εμβρυονική ωστόσο ρίζα παρουσιάζει φυσιολογική ανάπτυξη και κατ' αυτό τον τρόπο διαφέρουν από τα εμβρυονικά μεταλλάγματα *monopteros* (*mp*), στα οποία απουσιάζει πλήρως τόσο η εμβρυονική όσο και η πρωτογενής ρίζα.

wooden leg (*wol*) και *gollum* (*glm*)

Χαρακτηρίζονται από ανώμαλο σχέδιο ανάπτυξης του αγωγού ιστού. Το γονίδιο *WOL* κωδικοποιεί για έναν υποδοχέα κυτοκινίνης, γεγονός που υποδηλώνει την σημασία της ορμόνης αυτής στην ανάπτυξη του ακτινωτού σχεδίου της ρίζας.

short root (*shr*), το *scarecrow* (*scr*), το *pinocchio* (*pic*), και το *fass* (*fs*).

Στα μεταλλάγματα *shr*, *scr* και *pic* είναι διαταραγμένο το ακτινωτό σχέδιο του θεμελιώδους ιστού καθώς απουσιάζουν συγκεκριμένες κυτταρικές στιβάδες, ενώ το μέταλλαγμα *fs* έχει χοντρή ρίζα λόγω της διόγκωσης του κεντρικού κυλίνδρου και της εναπόθεσης υπέρμετρου αριθμού κυτταρικών στρωμάτων φλοιού.

hobbit (*hbt*)

Στο *hbt* (CDC27 ομόλογη πρωτεΐνη) είναι επηρεασμένη η ανάπτυξη του AMP από το στάδιο του σφαιρικού προεμβρύου και έπειτα. Οι κυτταροδιαιρέσεις της υπόφυσης και των θυγατρικών της κυττάρων πραγματοποιούνται ανώμαλα, οδηγώντας σε ένα ανοργάνωτο σχέδιο κυττάρων στο κέντρο ηρεμίας και στην στήλη της καλύπτρας του μεριστώματος

superroot (*sur1*)

Μετάλλαγμα που σχετίζεται με την αύξηση της ρίζας. Παράγει υπερβολικά μεγάλο αριθμό δευτερογενών ριζών. Ο φαινότυπος αυτός, που οφείλεται στην υπερπαραγωγή αυξίνης, είναι ίδιος με αυτόν της ανάπτυξης φυτών άγριου τύπου σε περίσσεια αυξίνης.

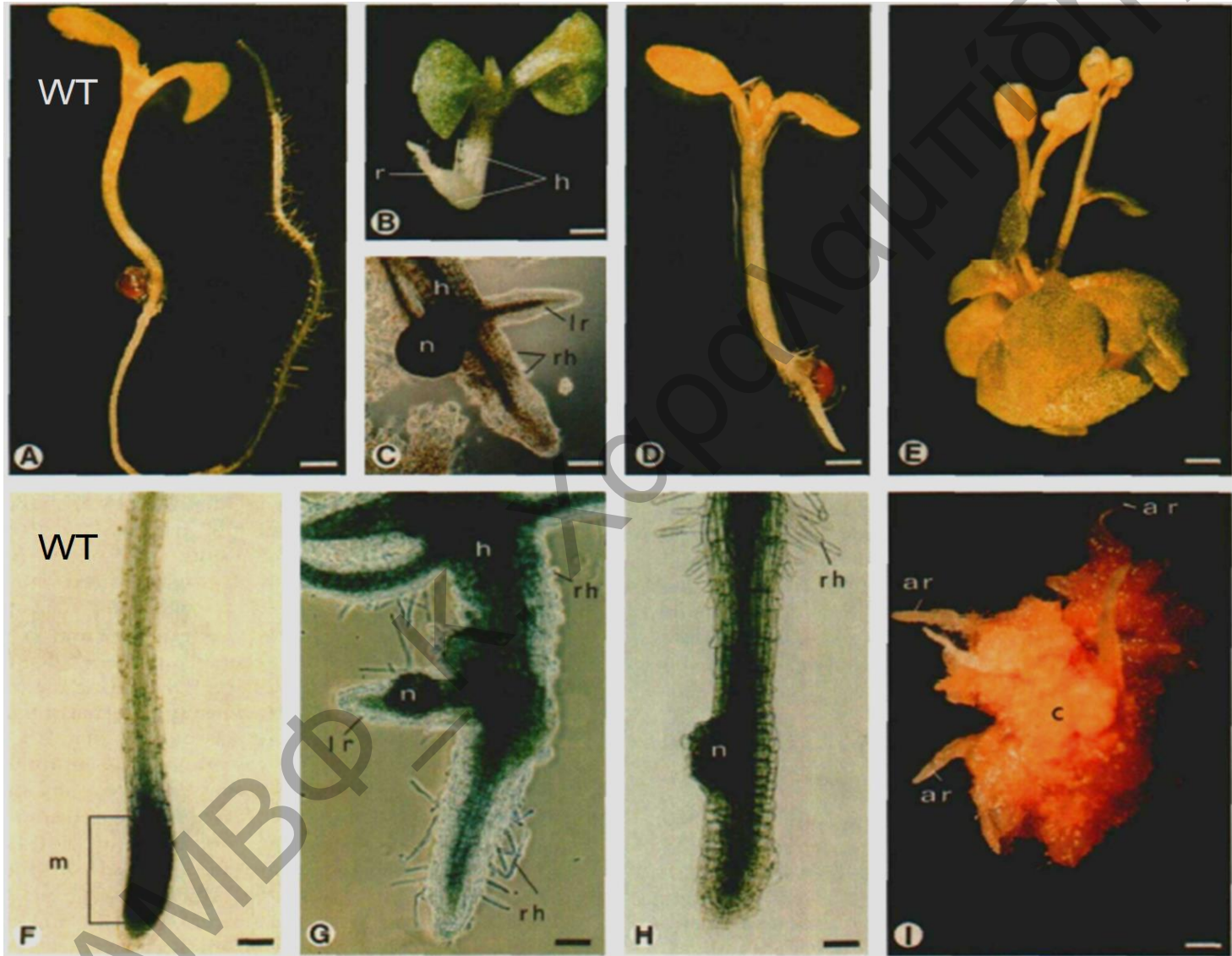


root meristemless1 και *meristemless2 (rml1 και rml2)*

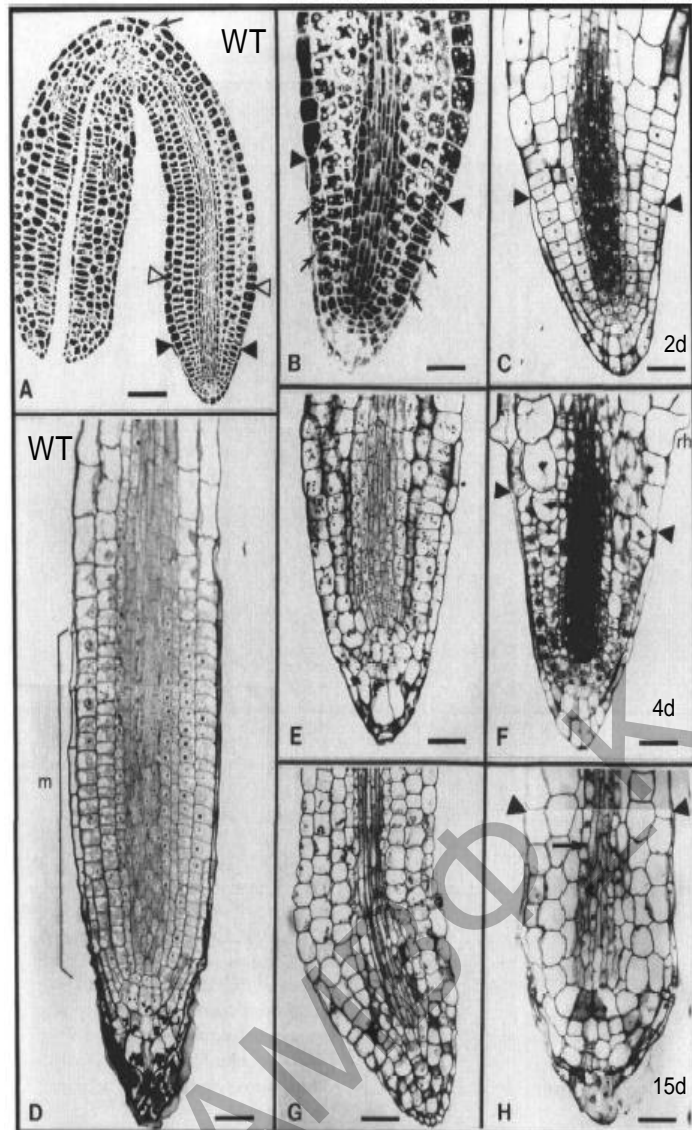
- Το γονίδιο *RML1* έχει χαρτογραφηθεί ότι εδράζει στο χρωμόσωμα IV, ενώ το *RML2* στο χρωμόσωμα III.
- Τα μεταλλάγματα αυτά παρουσιάζουν κανονική εμβρυονική ρίζα, στην οποία όμως παρατηρούνται μετά την βλάστηση περιορισμένης έκτασης κυτταρικές διαιρέσεις,
- Οι πλάγιες ρίζες των *rml1* και *rml2* μεταλλαγμάτων αναπτύσσονται αρχικά σε μέγεθος ίσο με αυτό της εμβρυονικής ρίζας και στη συνέχεια η ανάπτυξη σταματά.
- Ούτε η προσθήκη ορμονών, αλλά ούτε η αφαίρεση του υπέργειου τμήματος είναι ικανά να επαναφέρουν τον φαινότυπο του άγριου τύπου, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι μεταλλάξεις δεν οφείλονται σε έλλειψη κάποιου ορμονικού ρυθμιστή ή στη μεταφορά από το βλαστό κάποιου αναστολέα αύξησης.
- Η παρουσία κανονικών κυτταρικών διαιρέσεων στο έμβryo, στο βλαστό και στα κύτταρα κάλλων, που προέρχονται από τα μεταλλάγματα αυτά, υποδηλώνει ότι τα *RML* γονίδια δεν εμπλέκονται στον γενικότερο μηχανισμό της κυτταρικής διαίρεσης αλλά στην εξειδικευμένη ενεργοποίηση αυτού, στα κύτταρα του ακροριζίου κατά την μετα-εμβρυονική ανάπτυξη της ρίζας.



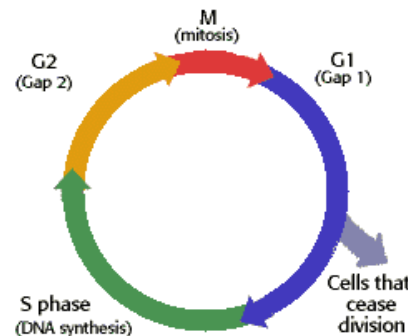
Φαινότυπος *rtl* μεταλλαγμένων στελεχών



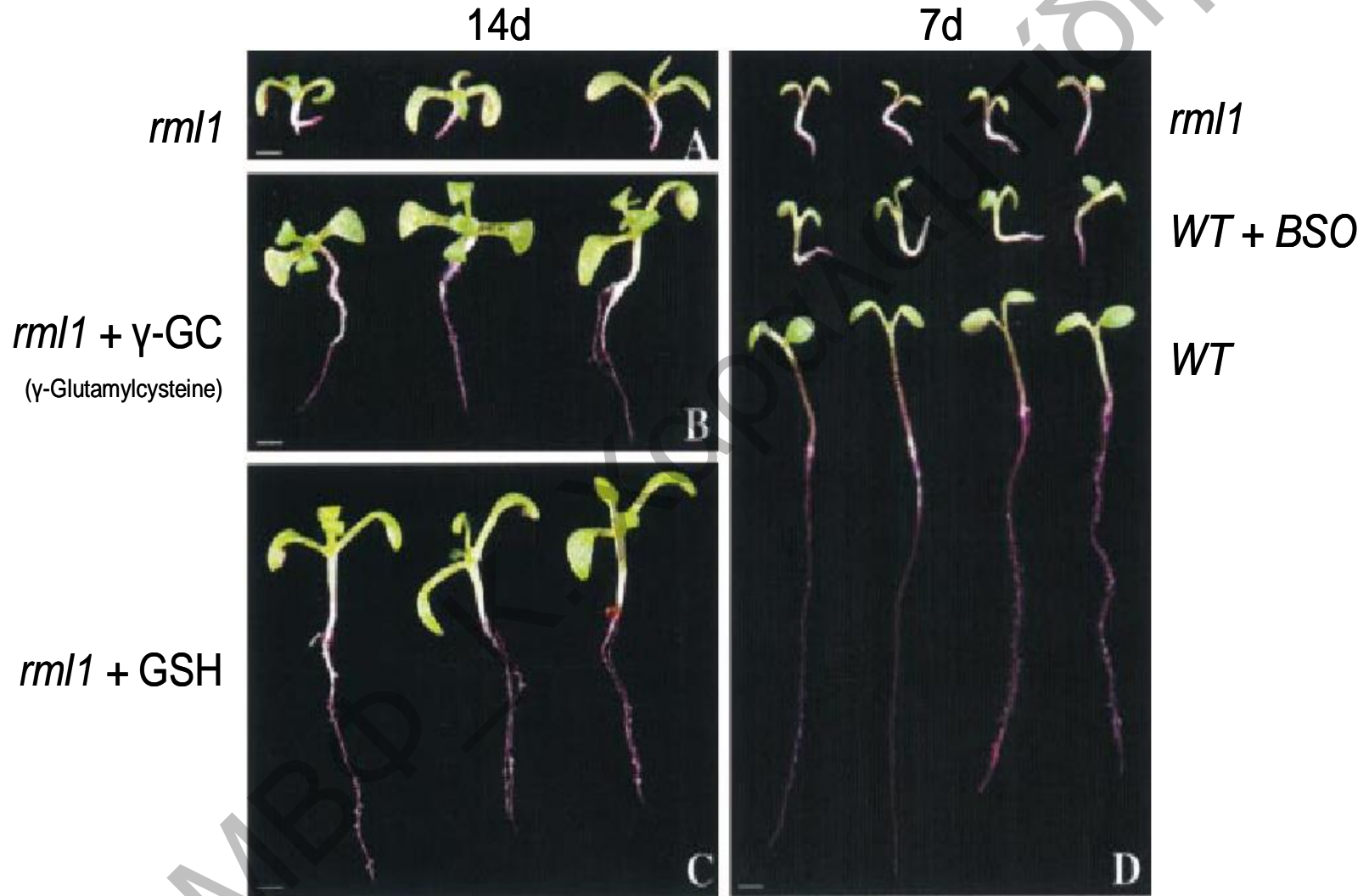
Φαινότυπος *rml* μεταλλαγμένων στελεχών



- Το *RML1* γονίδιο κωδικοποιεί για την συνθάση της γ-γλουταμυλ-κυστεΐνης (γ -GCS), του πρώτου ενζύμου στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης (GSH) και είναι αλληλόμορφο του γονιδίου *CADMIUN SENSITIVE2 (CAD2)*
- Η γλουταθειόνη σχετίζεται με τη μεταφορά των αμινοξέων διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης και την οξειδοαναγωγική ομοϊόσταση του κυττάρου. Η έλλειψη γλουταθειόνης οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου στο στάδιο της G1 φάσης με αποτέλεσμα την αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης.



Αναστολή του κυτταρικού κύκλου λόγω απουσίας γλουταθειόνης



rml1 (μετάλλαξη G σε A -> aa258) / *cad2* (έλλειψη 6nt -> aa237-238)

Ομόζυγο *cad* μετάλλαγμα

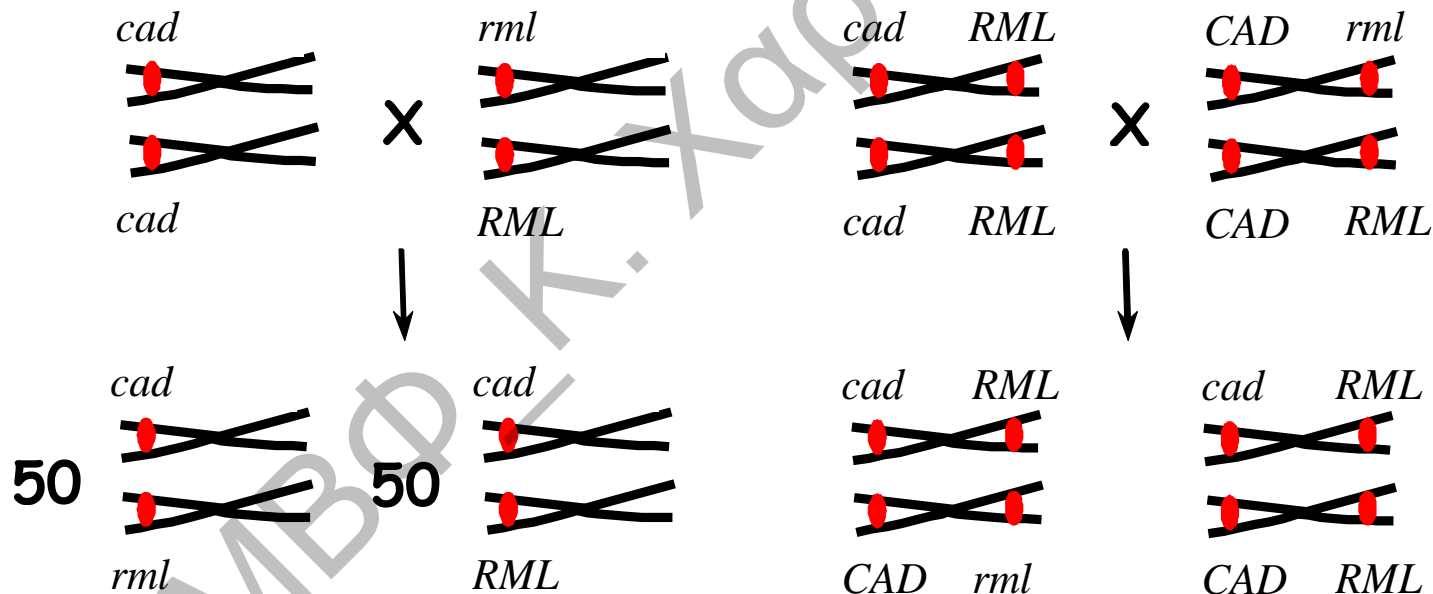
- κανονική ρίζα
- ευαίσθητο στο Cd

Ετερόζυγο *rml* μετάλλαγμα

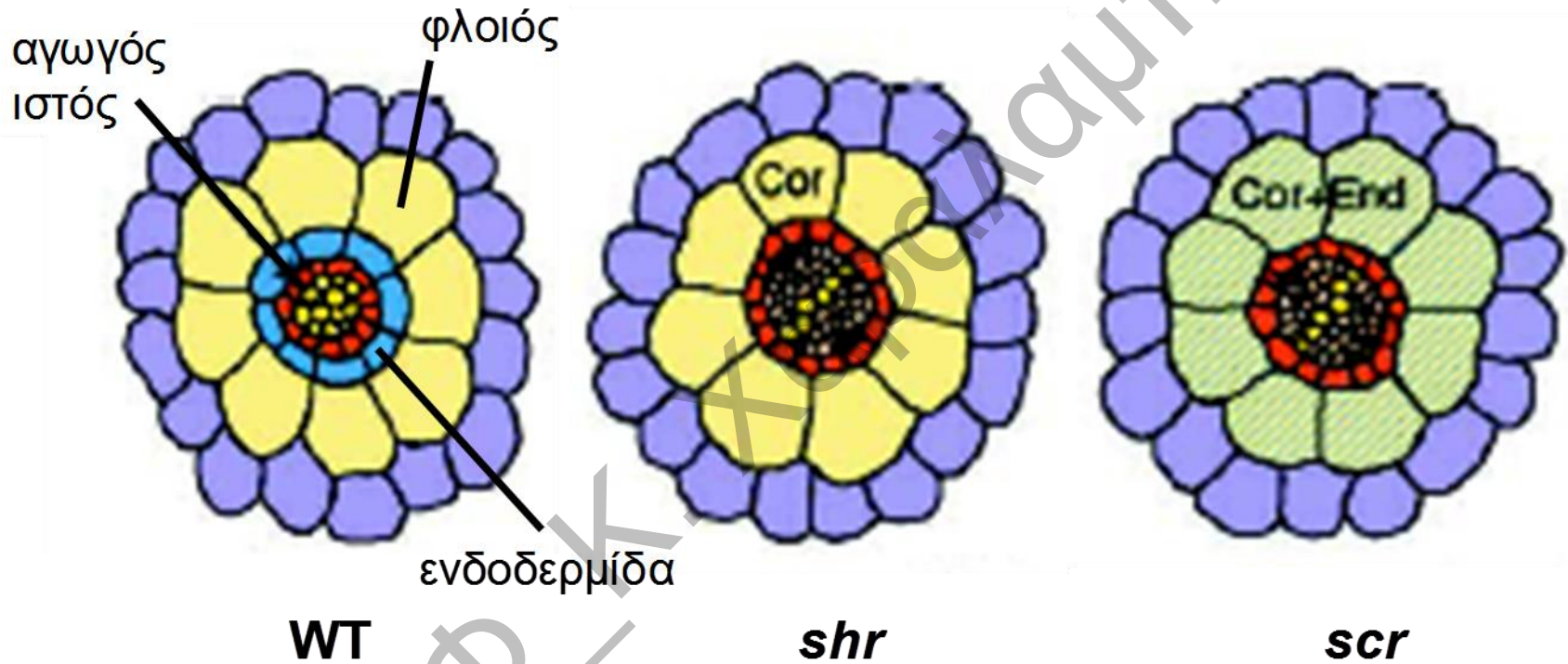
- κανονική ρίζα
- μη ευαίσθητο στο Cd

αλληλόμορφα

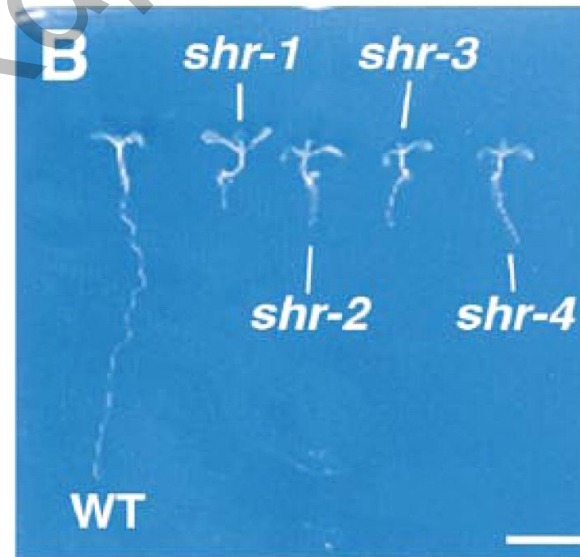
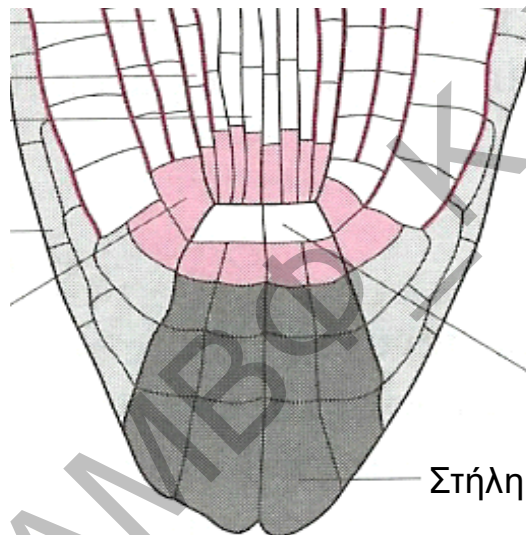
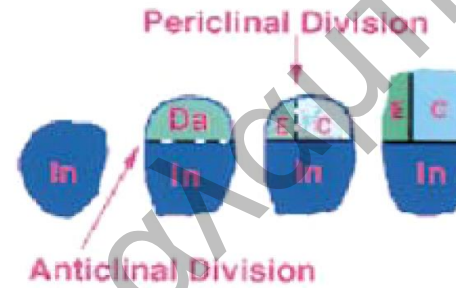
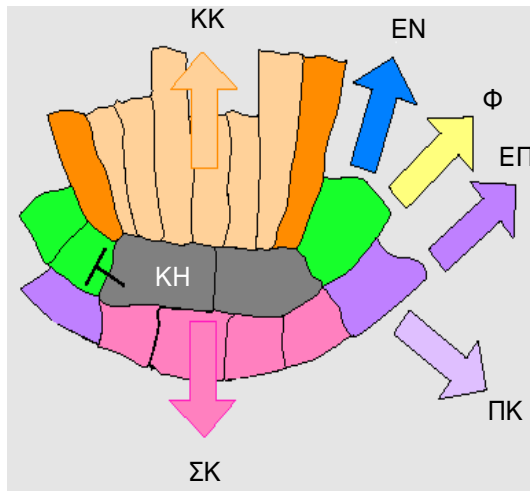
μη αλληλόμορφα



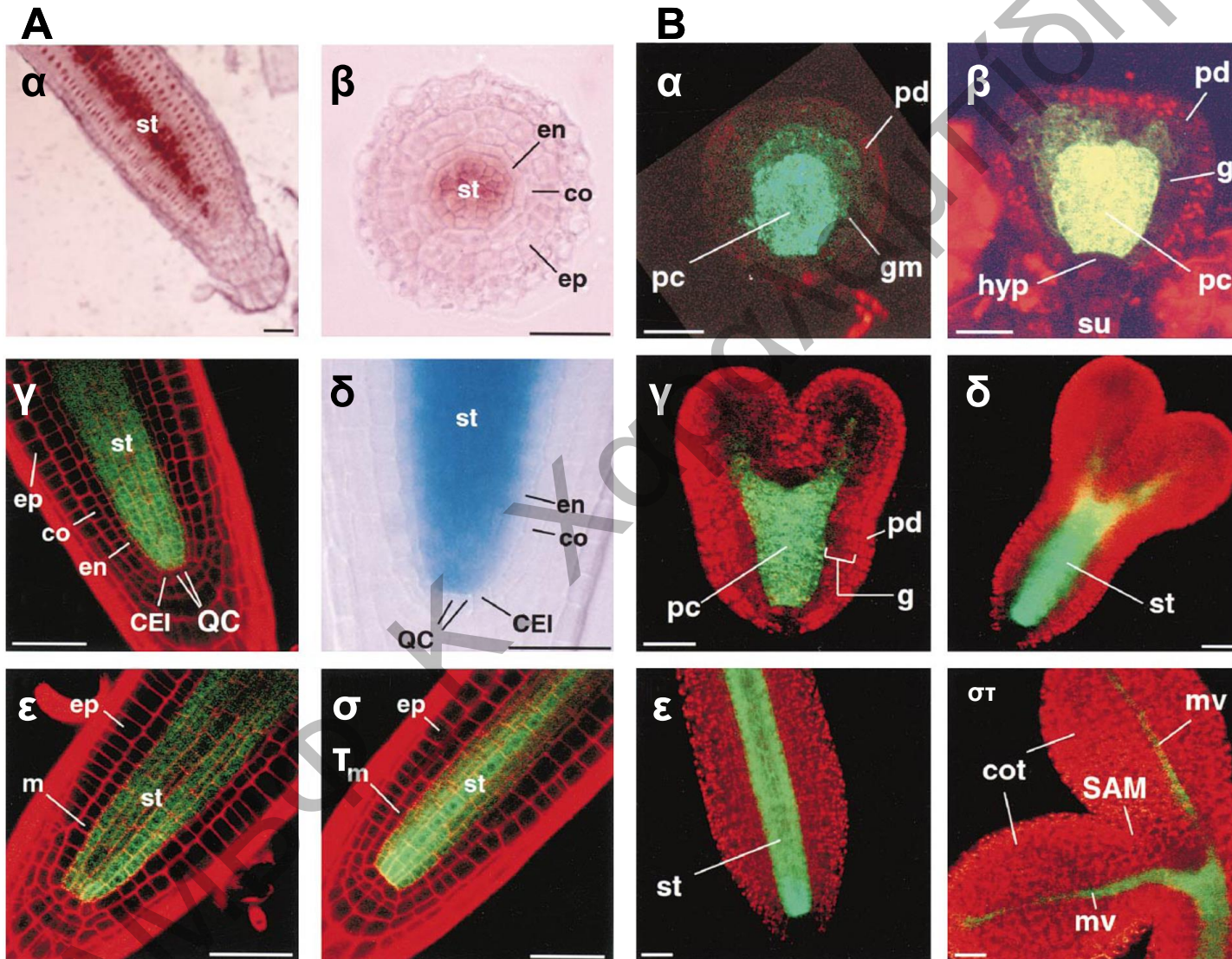
short root (shr) και *scarecrow (scr)*



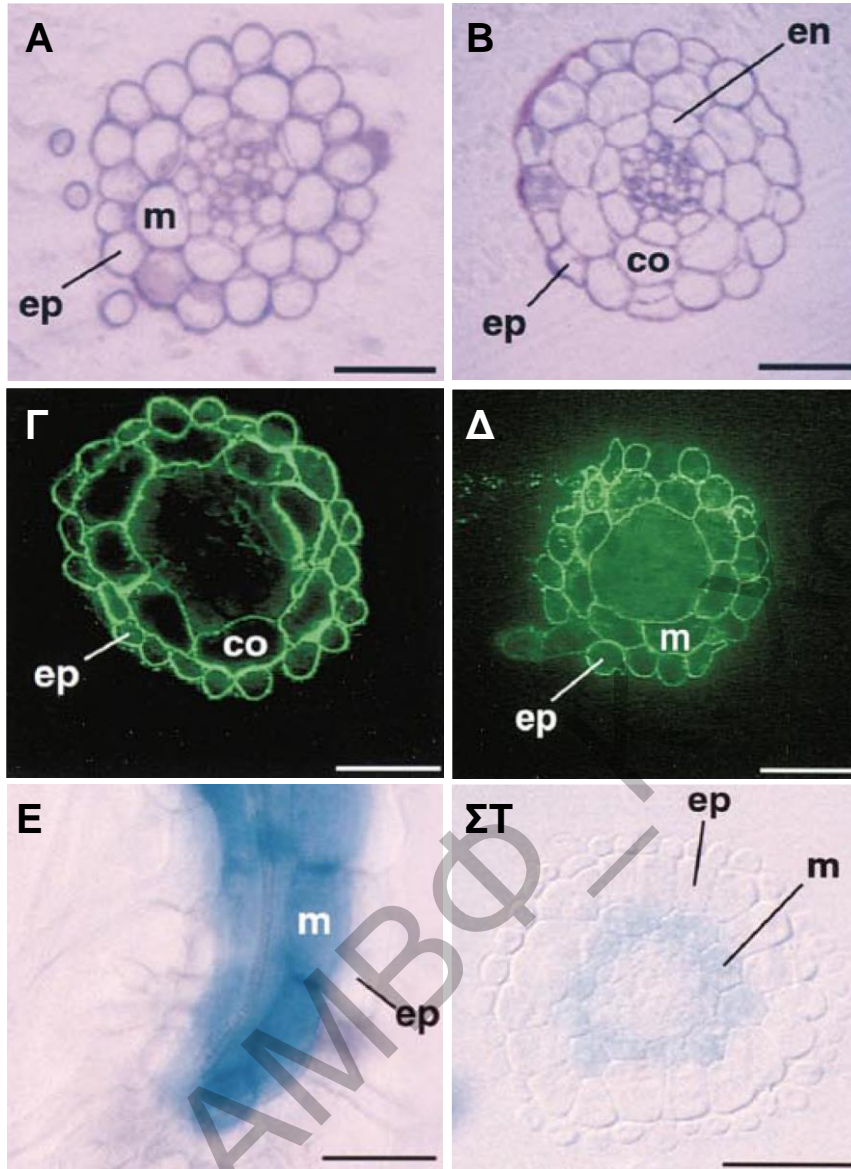
Φαινότυπος στελέχους *short root* (*shr*) και *scarecrow* (*scr*)



Ιστοειδική έκφραση του *SHR* στο *Arabidopsis thaliana*

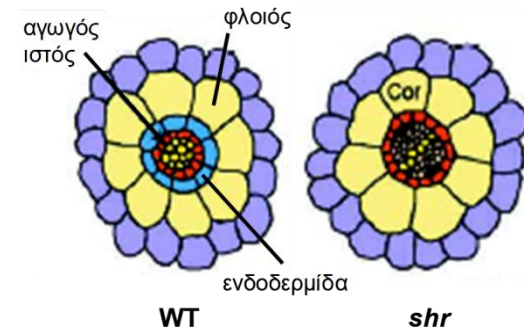


Η μεταλλαγμένη στιβάδα έχει χαρακτηριστικά φλοιού



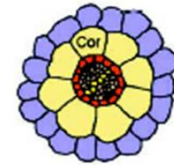
• Ο πρώτος δείκτης αφορούσε το αντίσωμα **CCRC-M2**, το οποίο συνδέεται με τα επιτόπια των υδατανθράκων των κυτταρικών τοιχωμάτων της επιδερμίδας και του φλοιού. Στα *shr-1* μεταλλάγματα, η παρουσία του CCRC-M2 αντισώματος ανιχνεύθηκε τόσο στην επιδερμίδα όσο και στην μεταλλαγμένη θεμελιώδη κυτταρική στιβάδα.

• Ο δεύτερος δείκτης αφορούσε την κατασκευή **AX92::GUS**, η έκφραση του οποίου εντοπίζεται σε φυτά άγριου τύπου **εξειδικευμένα στον φλοιό**. Στις μεταλλαγμένες σειρές *shr-1* ο δείκτης αυτός εκφράζεται επίσης στη μεταλλαγμένη θεμελιώδη κυτταρική στιβάδα.

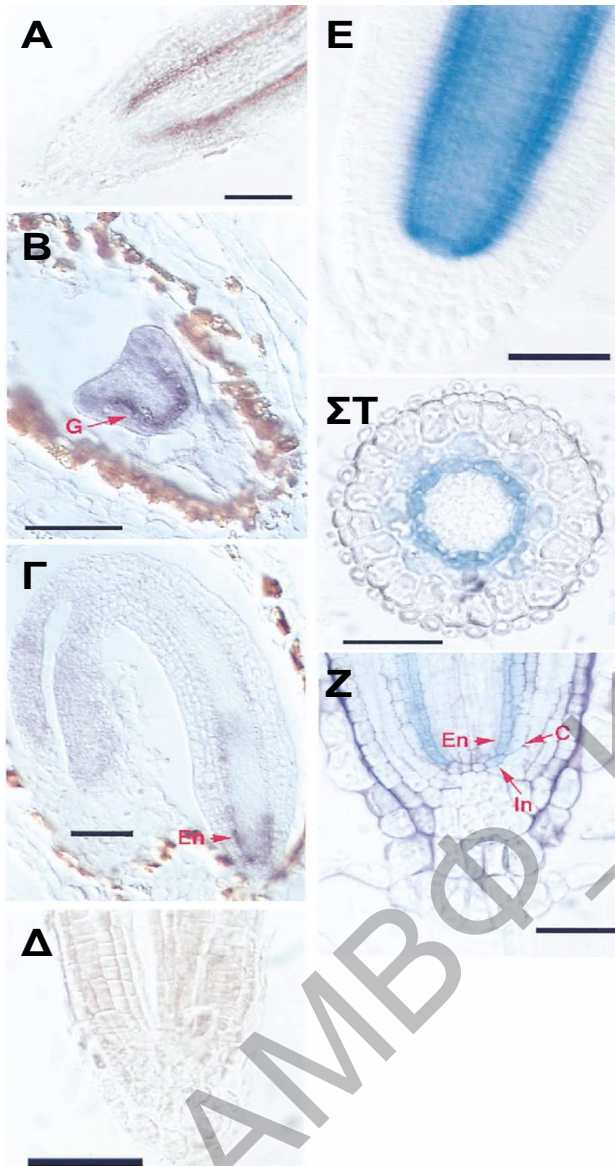


SHORT ROOT (SHR) regulates asymmetric cell division and specification

- *SHR encodes a putative transcription factor*
- *SHR is required for the asymmetric cell division responsible for formation of ground tissue as well as specification of endodermis in the *Arabidopsis thaliana* root*
- *shr results in roots that are missing the endodermis cell layer*
- *shr mutant plants display only the cortex cell layer*
- *SHR plays a key role in regulating the radial organization of the root in *Arabidopsis* and functions upstream of SCR*
- *Ectopic expression of SHR results in supernumerary cell divisions and abnormal cell specification in the root meristem*



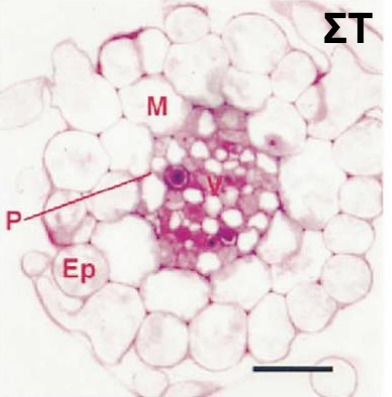
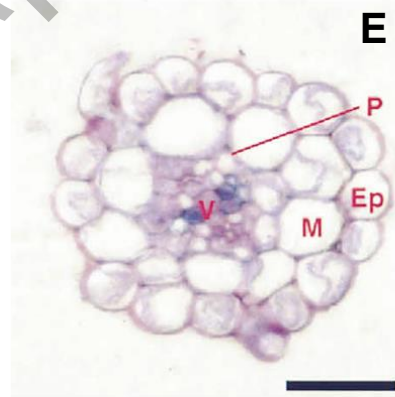
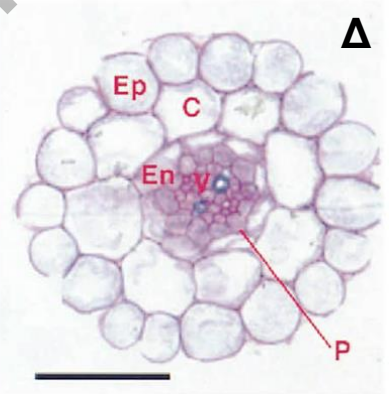
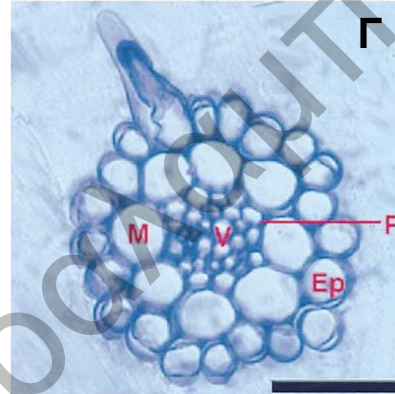
Ιστοειδική έκφραση του *SCR* στο *Arabidopsis thaliana*



- Στο ανώριμο έμβρυο, πριν την δημιουργία της ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης του αρχικού κυττάρου φλοιού/ενδοδερμίδα, το *SCR* γονίδιο εκφράζεται στο θεμελιώδη ιστό.
- Μετά την ασύμμετρη διαίρεση η έκφραση του εντοπίζεται αποκλειστικά και μόνο στην ενδοδερμίδα.
- Στην μετα-εμβρυακή ρίζα το γονίδιο εκφράζεται εκτός από την ενδοδερμίδα στα κύτταρα του κέντρου ηρεμίας και στα μητρικά κύτταρα φλοιού/ενδοδερμίδα.
- Σε μεταγενέστερους ιστούς η έκφραση του γονιδίου *SCR* εντοπίζεται μόνο στα κύτταρα της ενδοδερμίδα.



Φαινότυπος στελέχους *scarecrow* (*scr*)

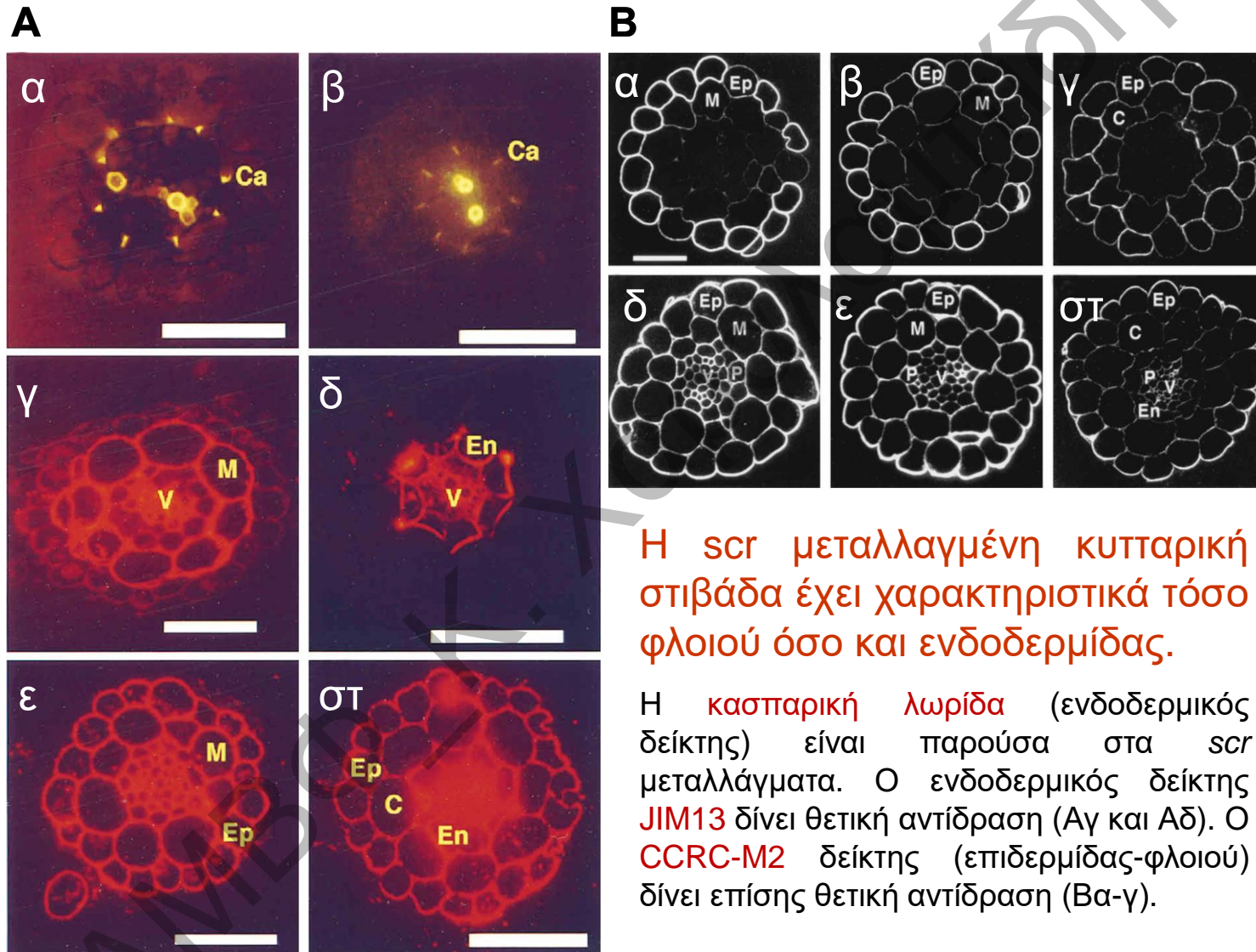


ΧΑΡΟΛΑΜΟΥ ΠΑΤΡΙΩΝΙΔΗΣ

ΑΜΒΦ



Χαρακτηρισμός της ταυτότητας της μεταλλαγμένης στιβάδας στα *scr*



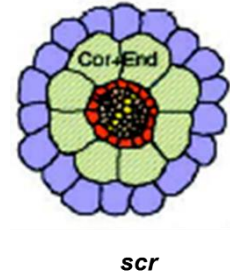
Η *scr* μεταλλαγμένη κυτταρική στιβάδα έχει χαρακτηριστικά τόσο φλοιού όσο και ενδοδερμίδας.

Η **κασπαρική λωρίδα** (ενδοδερμικός δείκτης) είναι παρούσα στα *scr* μεταλλάγματα. Ο ενδοδερμικός δείκτης **JIM13** δίνει θετική αντίδραση (Αγ και Αδ). Ο **CCRC-M2** δείκτης (επιδερμίδας-φλοιού) δίνει επίσης θετική αντίδραση (Βα-γ).

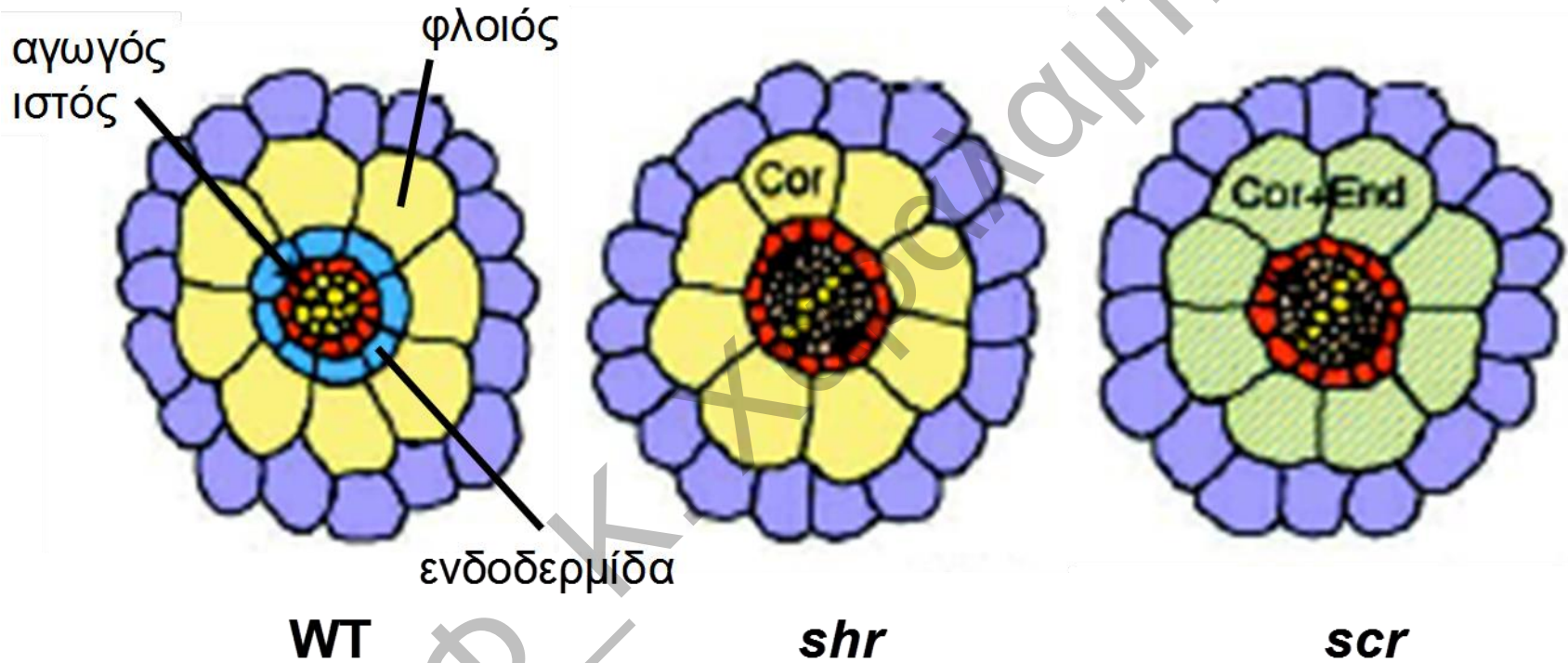


SCARECROW (SCR) regulates asymmetric cell division

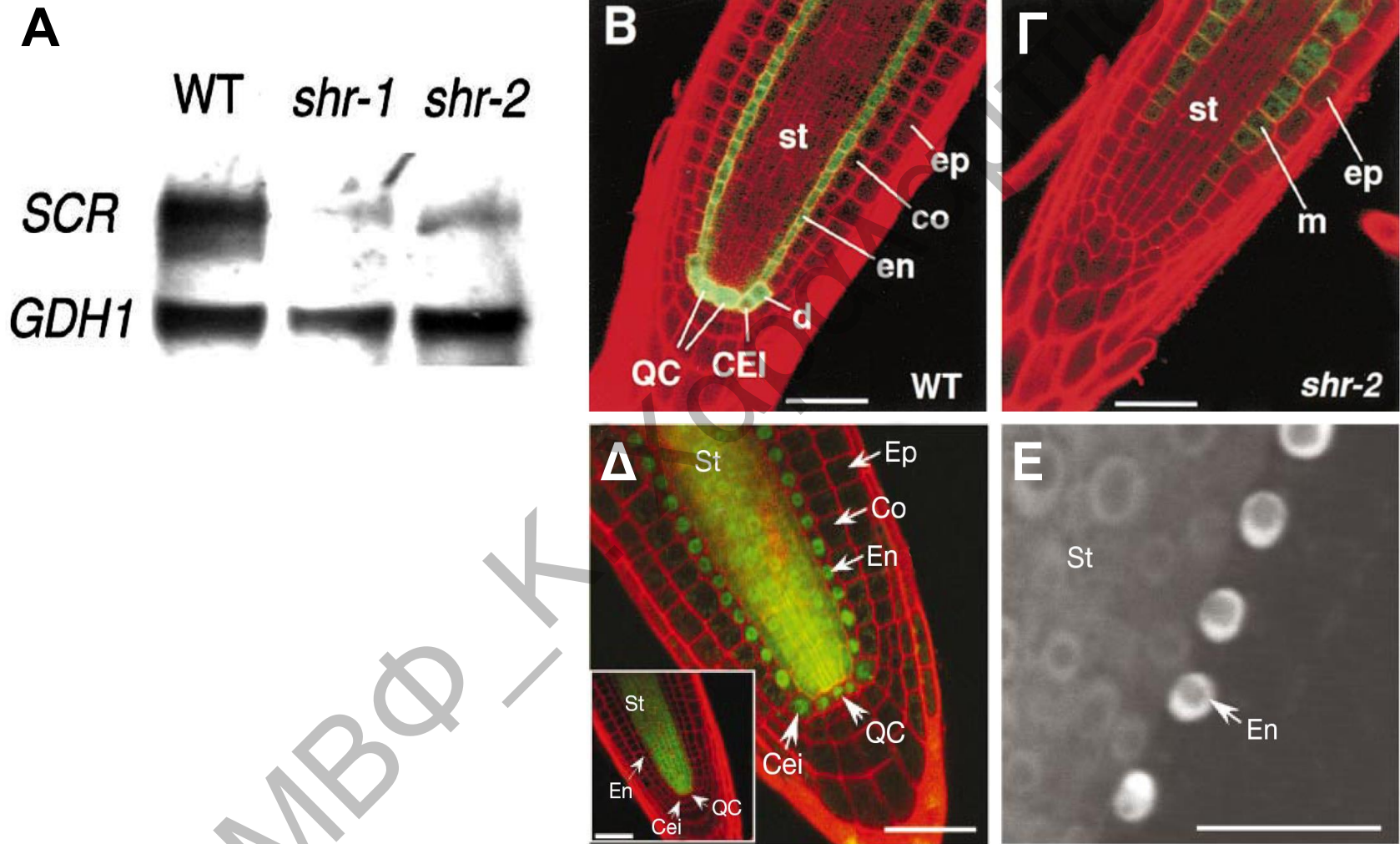
- SCR is a member of a novel leucine zipper transcription factor
- SCR regulates the asymmetric division of the initial cell that normally generated cortex and endodermis
- *scr* results in roots that are missing one cell layer
- *scr* mutant plants display a mutant Cor-End cell layer
- SCR plays a key role in regulating the radial organization of the root in *Arabidopsis thaliana*



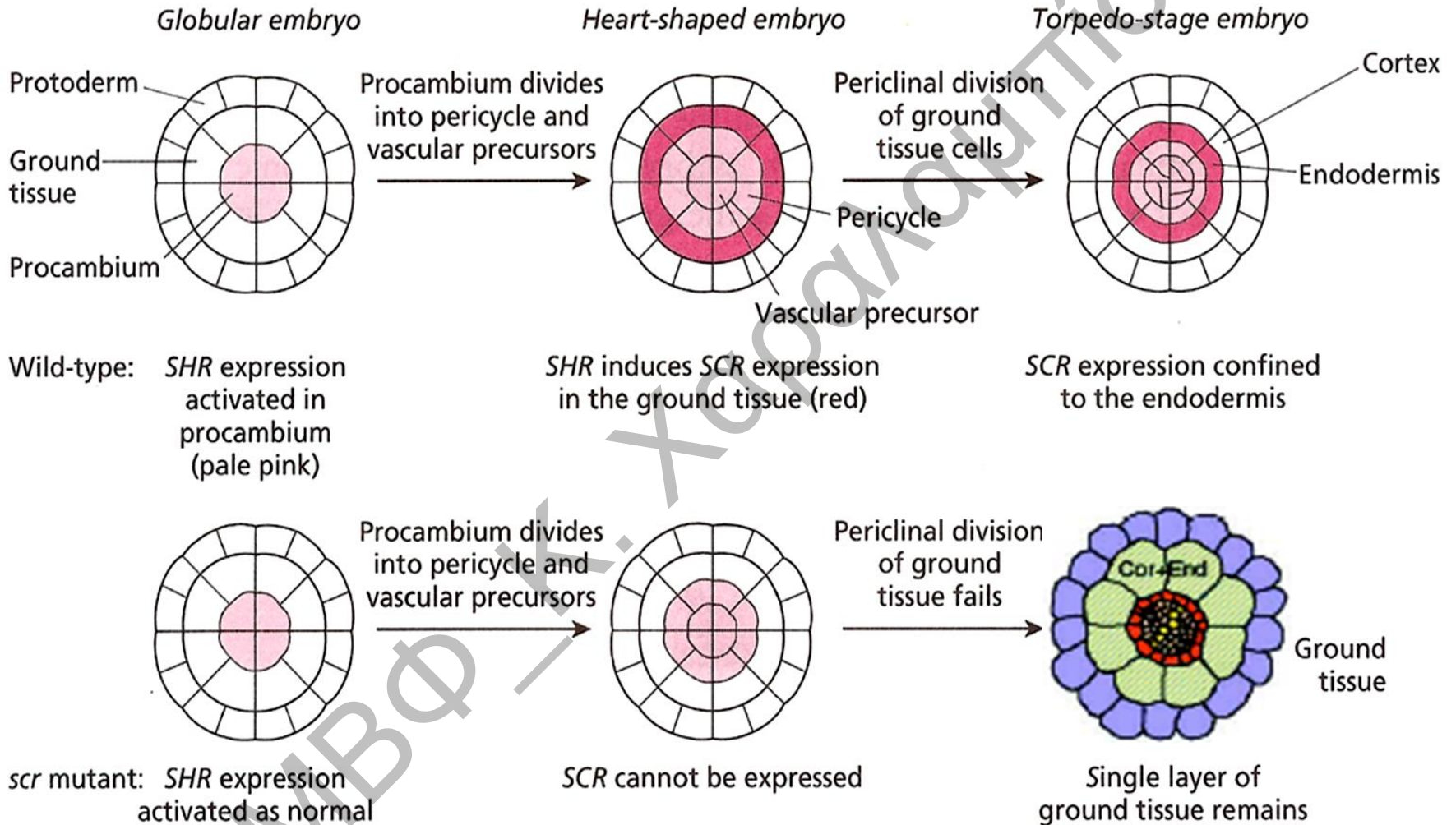
short root (shr) και *scarecrow (scr)*



Αλληλεπίδραση SHR/SCR - Ακτινωτή μεταγωγή σινιάλου

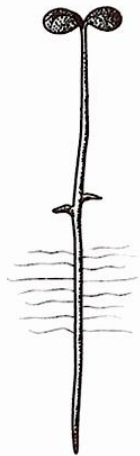


Λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ SHR και SCR



Φαινότυπος στελέχους *fass* (*fs*)

Wild-type and *fass Arabidopsis* seedlings



Wild-type seedling

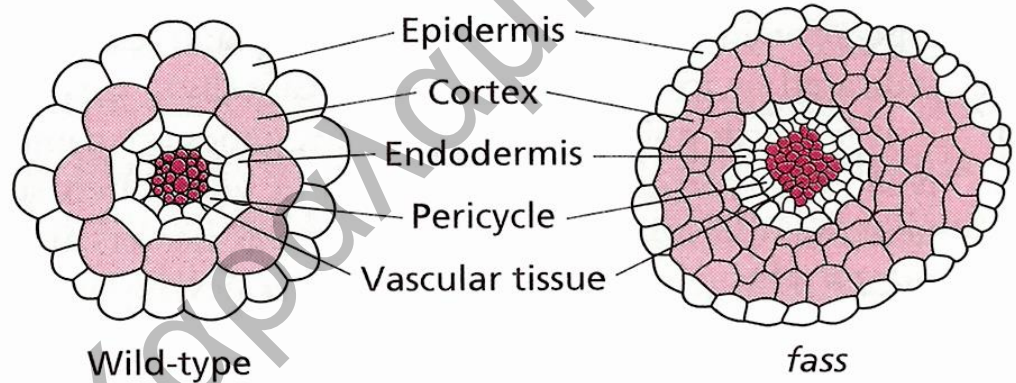


fass seedling (weak allele)



fass seedling (strong allele)

Wild-type and *fass* radicles

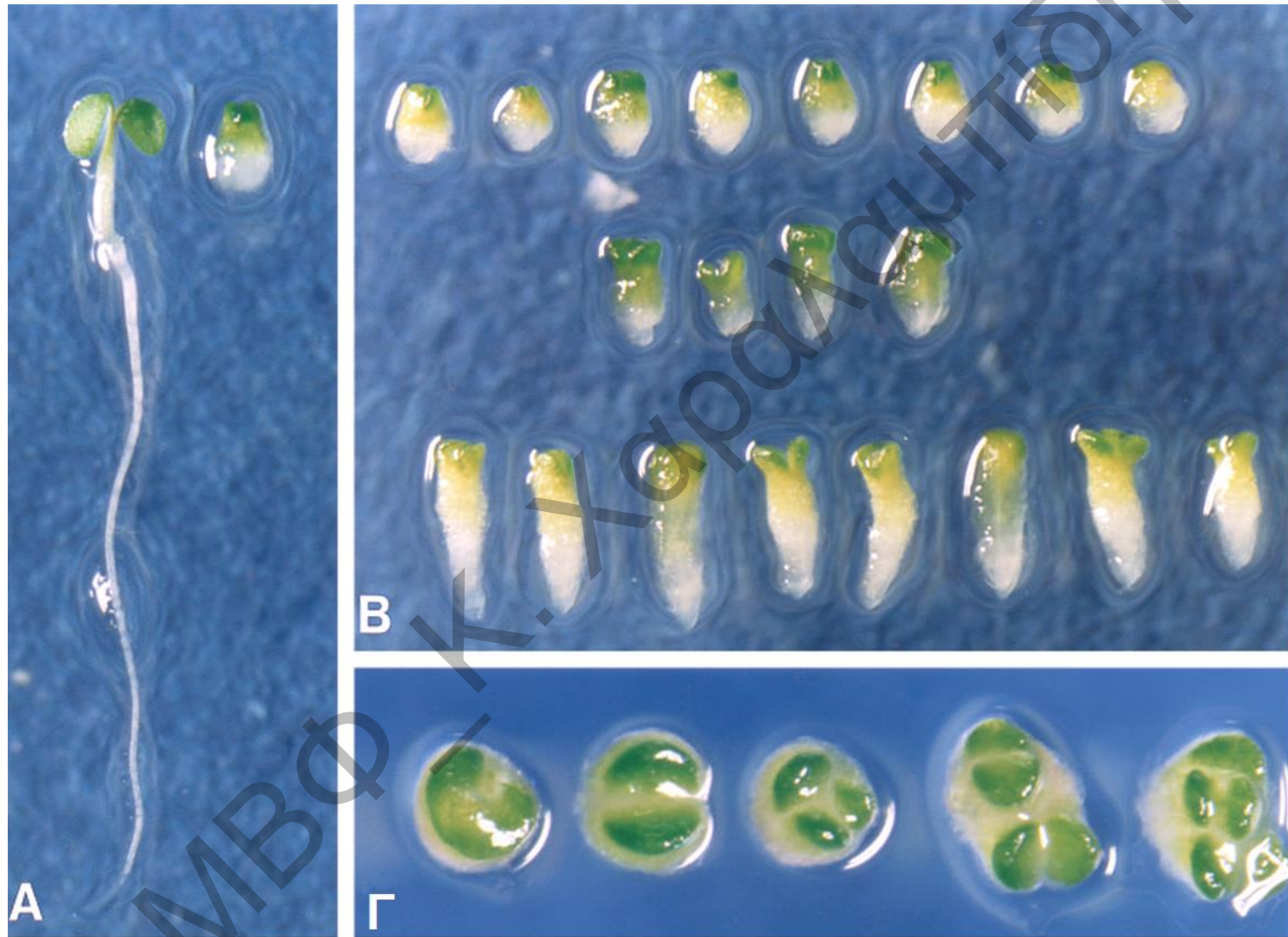


Το γονίδιο *FASS*, έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 5 του *Arabidopsis*.

Τα *fass* μεταλλαγμένα στελέχη έχουν αυξημένα επίπεδα αυξίνης και αιθυλενίου που πιθανότατα οφείλεται στη δυσλειτουργία ενός αρνητικού ρυθμιστή των επιπέδων των ορμονών αυτών.



Φαινότυπος στελέχους *fass* (*fs*)



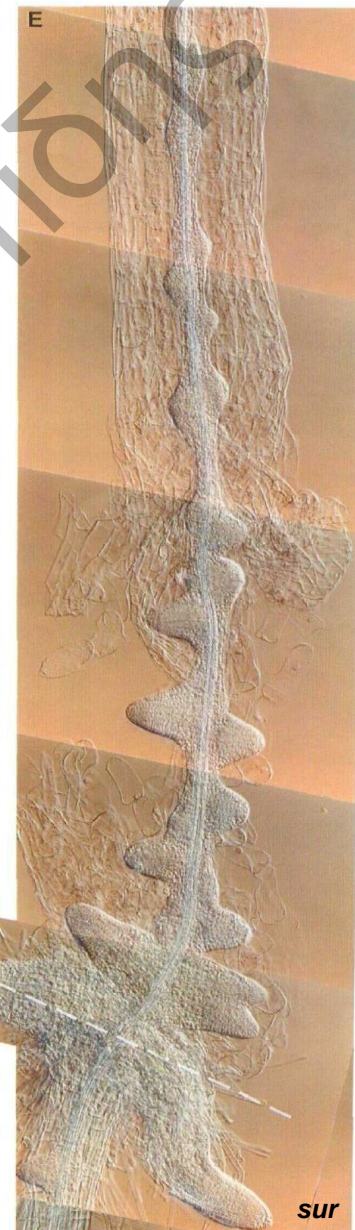
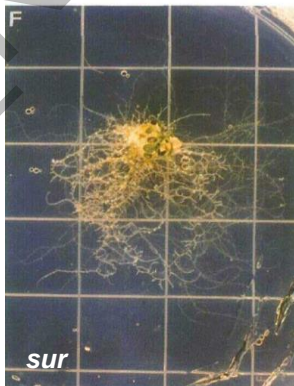
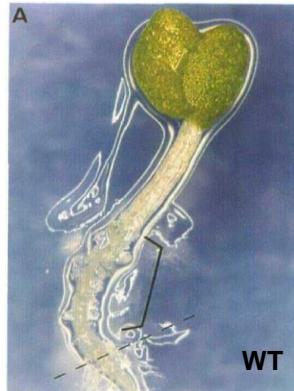
SUPERROOT (SUR1) confers auxin overproduction

- *sur1-1* to *sur1-7* are allelic recessive Arabidopsis mutants
- *sur* mutant plant overproduce auxin and display several auxin dependent abnormalities like:
 - small cotyledons
 - elongated hypocotyls
 - excess adventitious and lateral roots
 - reduced number of leaves and
 - absence of inflorescence
- The *SUR1* gene has been mapped on chromosome II and encodes a lyase involved in glucosinolate biosynthesis
- The *SUR2* gene encodes the cytochrome P450 CYP83B1, a modulator of **auxin homeostasis**.



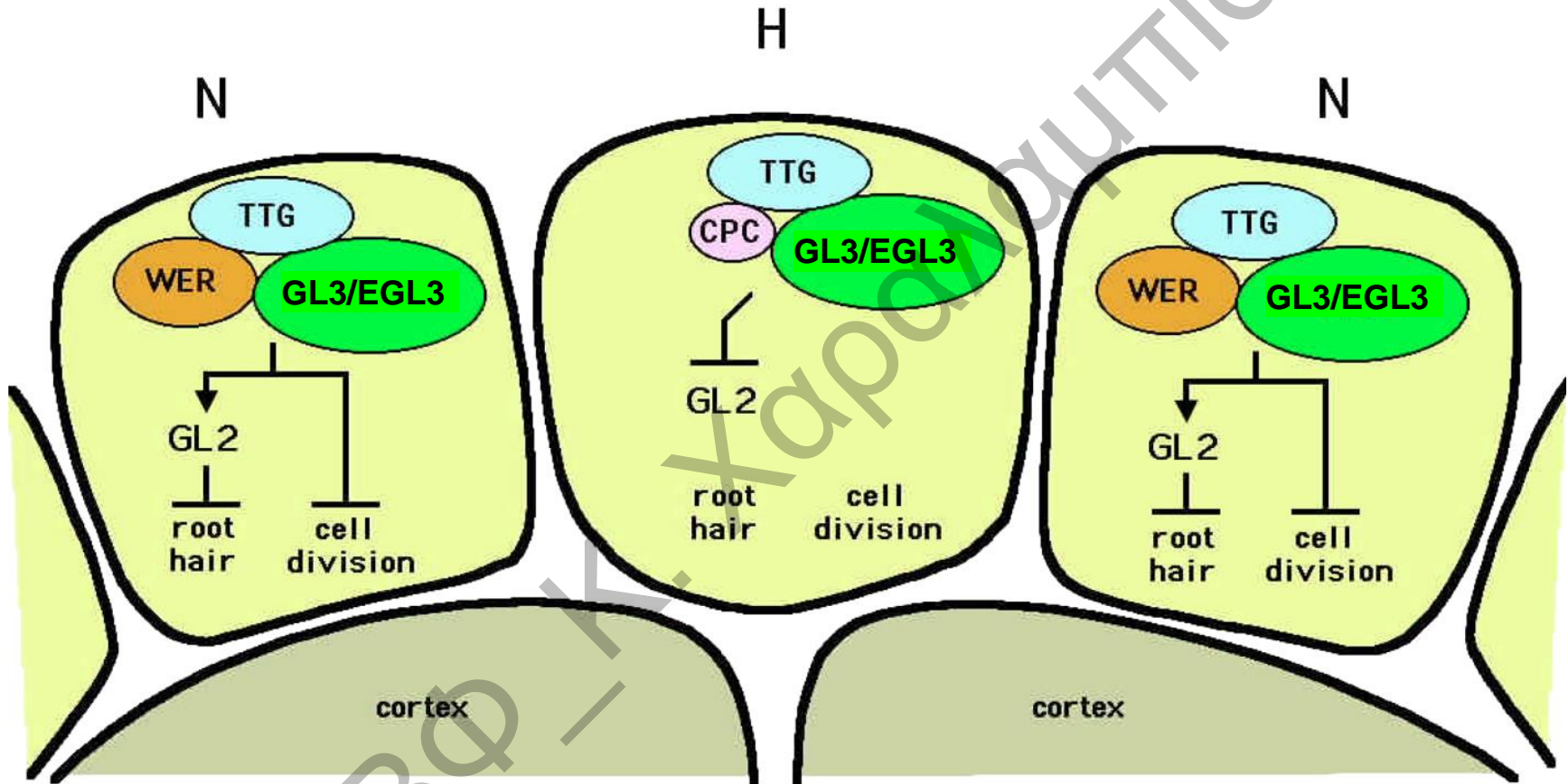
SUPERROOT phenotype

(Wout Boerjan et al. Plant Cell 1995)



Μοντέλο εξειδίκευσης και διαφοροποίησης των τριχοβλαστών...

...και ατριχοβλαστών στο *Arabidopsis thaliana*

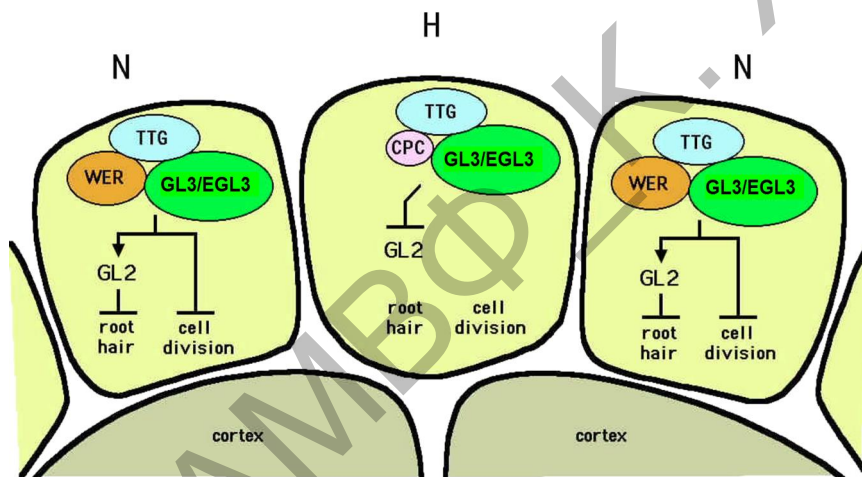
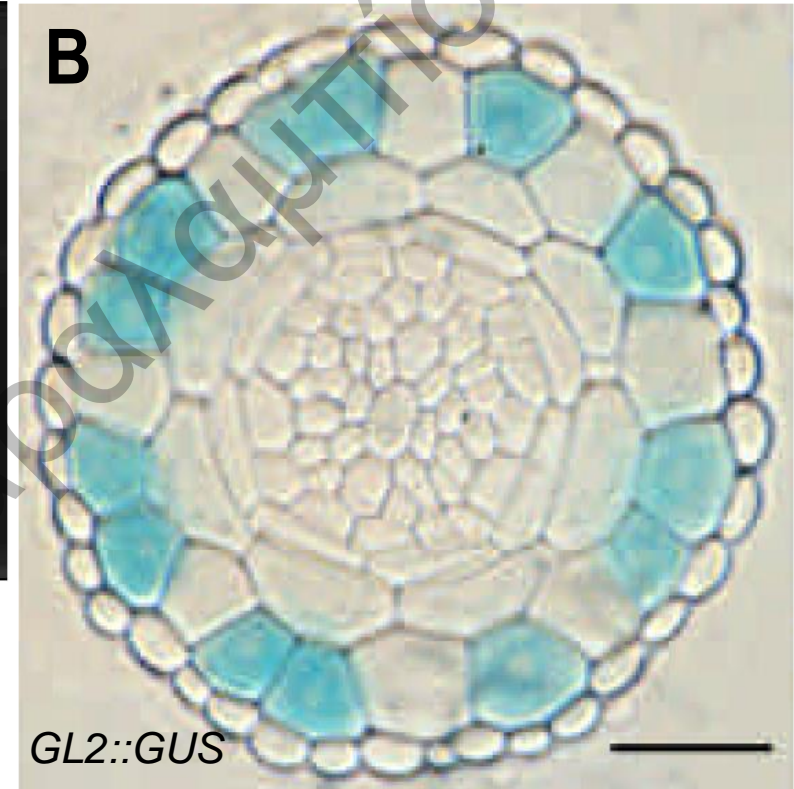
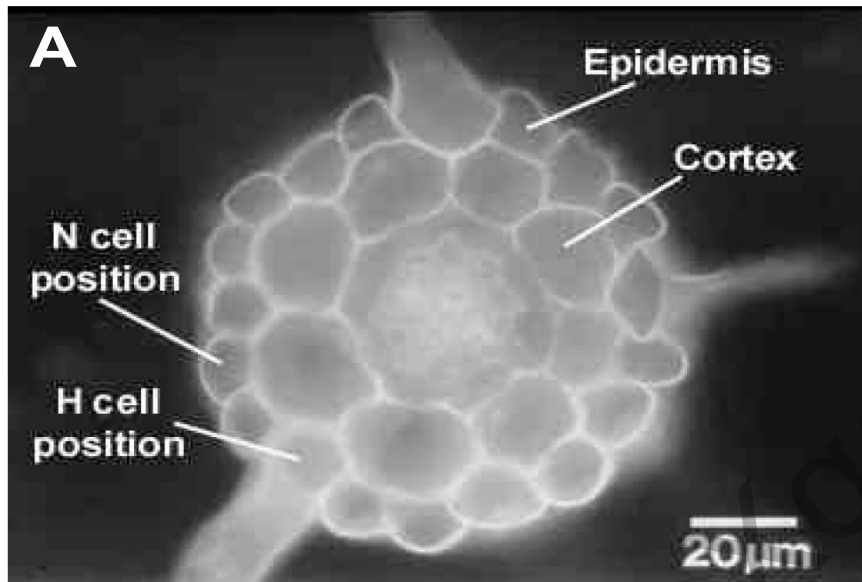


TRANSPARENT TESTA GLABRA (TTG)
GLABRA3 (GL3/EGL3)
GLABRA2 (GL2)

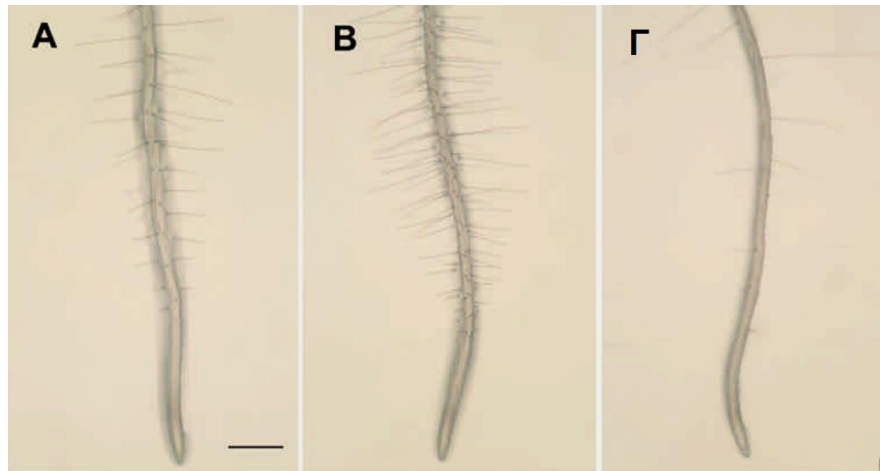
WEREWOLF (WER)
CAPRICE (CPC)



Ανάπτυξη ριζικών τριχιδίων στο *Arabidopsis thaliana*



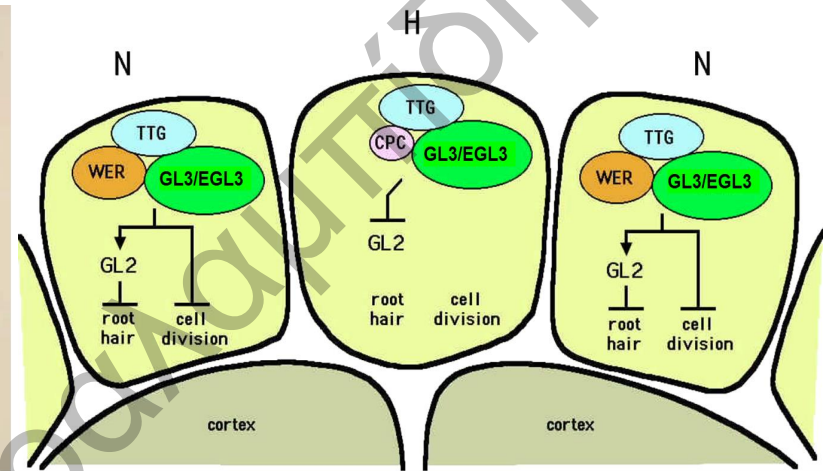
Φαινότυποι ριζικών τριχιδίων στο *Arabidopsis*



wt

wer-ttg

cpc



col

scm-2

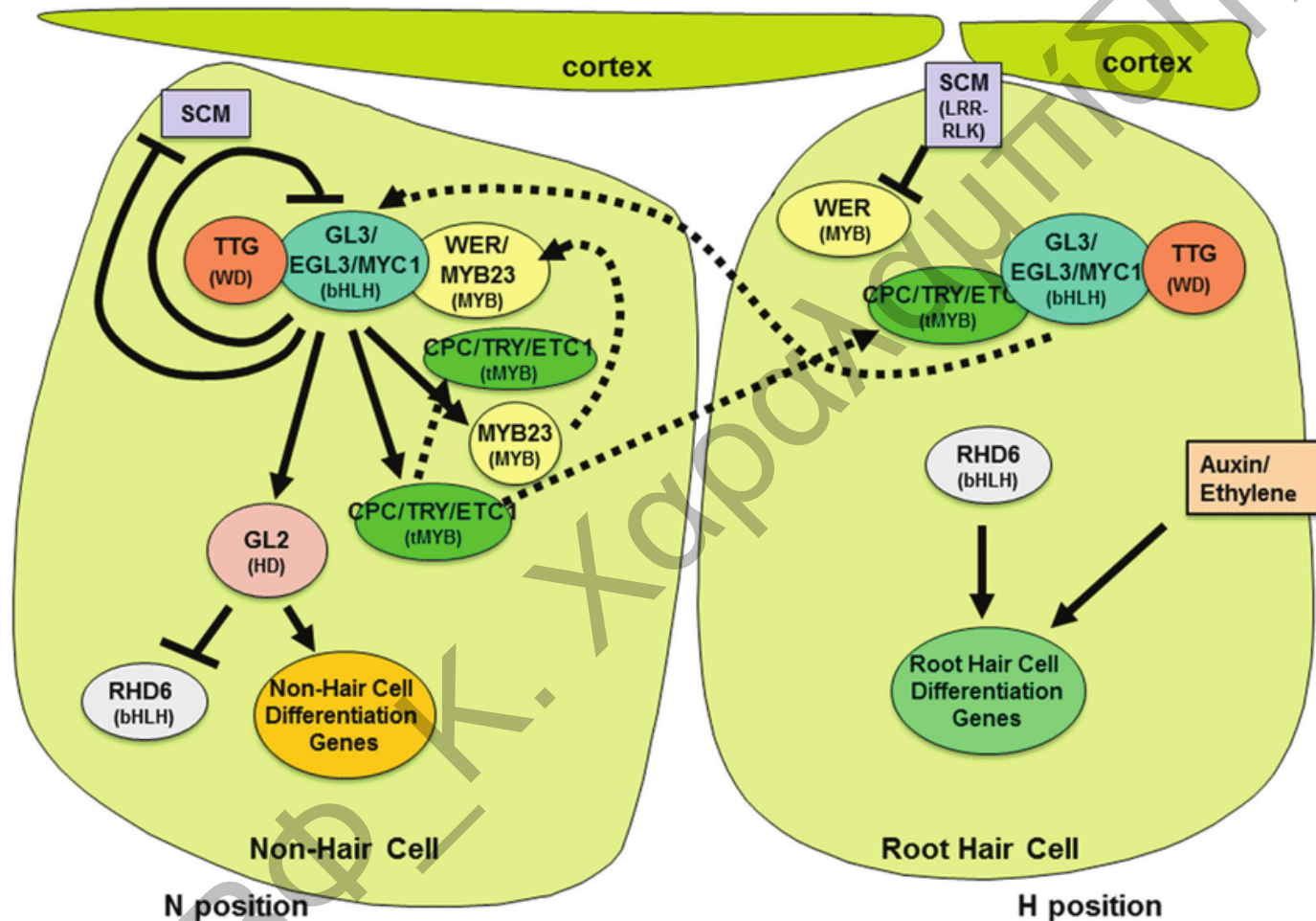
cpc-1

wer-1

gl3egl3



The default fate for an epidermal cell is to become a root hair cell

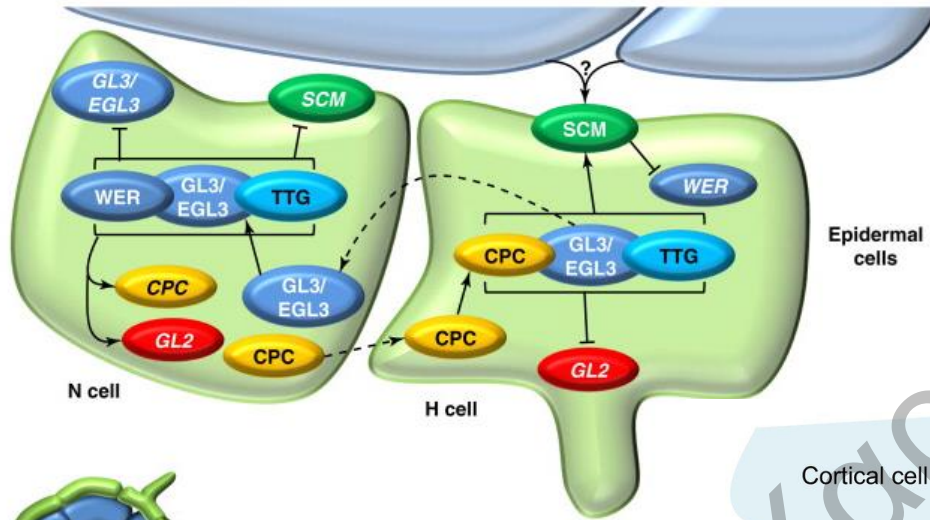


Arrows indicate positive control, blunted lines indicate negative regulation, and broken lines indicate intercellular or intracellular protein movement. The effects on the downstream genes is modified from Bruex et al., 2012.



Μοριακή γενετική της εξειδίκευσης των τριχοβλαστών

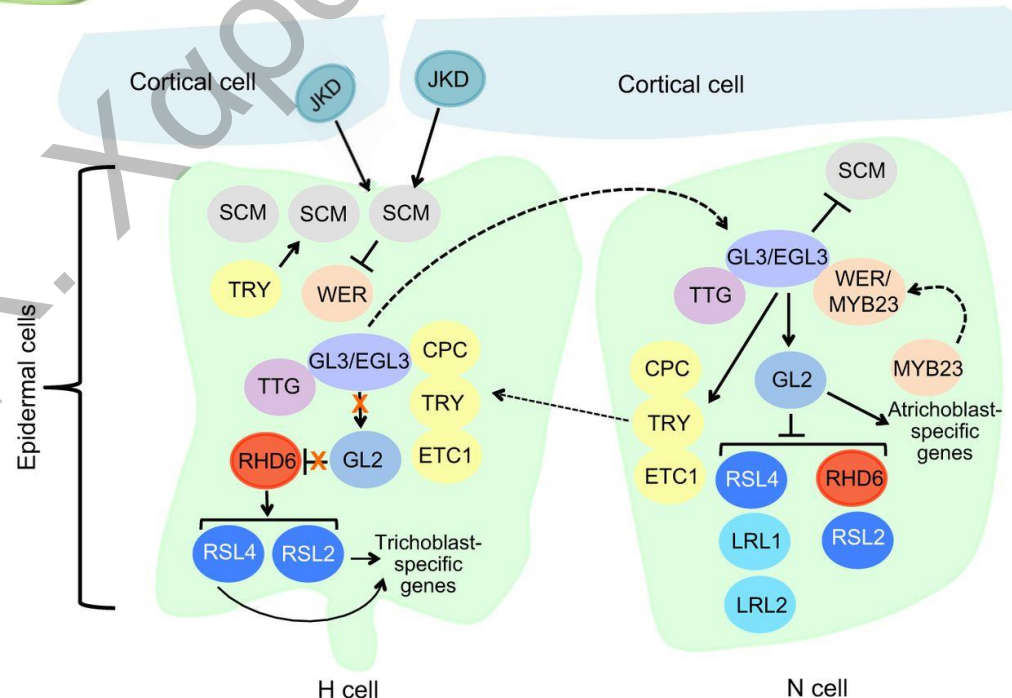
SCRAMBLED (SCM) is a LRR-Receptor Like Kinase



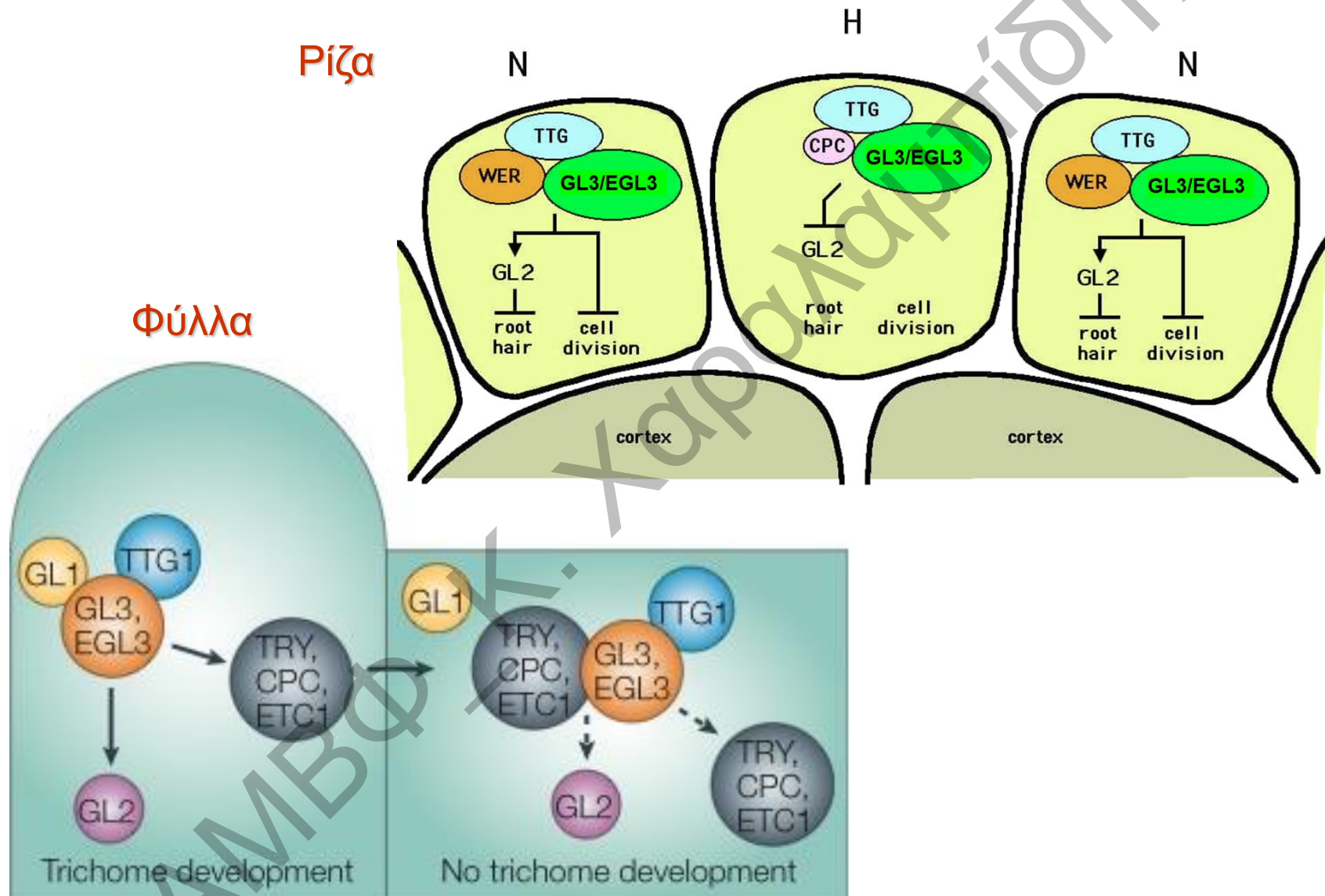
Schematic of a root cross section

Non-cell-autonomous action of JKD from the underlying cortex cell layer induces a signal in every cortex cell that is more abundant in the hair cell position.

JACKDAW (JKD) is a zinc finger protein that controls position-dependent signals that regulate epidermal-cell-type patterning.



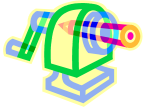
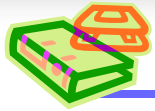
Διαφορική ρύθμιση επιδερμικών εξαρτημάτων ρίζας και φύλλου



General conclusions

- A variety of different genes affect root pattern formation and development
- A number of these are not root specific
- Transcriptional regulation of these genes involves hormonal signal transduction/activation pathways
- Many genes interact with others in order to specify action





Thanks for your attention

ΑΜΒΦ - Κ. Χαρολαμπτίδης

