

Controllo molecolare dello sviluppo dell'ovulo

INTRODUZIONE

Gli ovuli sono strutture molto specializzate costituiti da tre regioni morfologicamente e funzionalmente distinte: la nucella, la calaza e il funicolo. La nucella funziona da megasporangio e al suo interno si sviluppa la cellula madre delle megaspore che in seguito al processo di sporogenesi e gametogenesi formerà il gametofito femminile. La calaza costituisce la porzione centrale del primordio e da questa si originano uno o due tegumenti che circondano e racchiudono il gametofito femminile mantenendo una piccola apertura, il micropilo entro cui penetrerà il tubetto pollinico durante il processo di fecondazione. Infine, l'ovulo è connesso alla parete dell'ovario tramite il funicolo (Yadegari and Drews, 2004).

In *Arabidopsis*, quando il gametofito femminile raggiunge la maturità è composto da sette cellule: la cellula uovo, che è fiancheggiata dalle due cellule sinergidi, la cellula centrale diploide e tre cellule antipodali (fig. 1A). Al contrario, il granulo di polline consiste di sole tre cellule: una cellula vegetativa responsabile della formazione del tubetto pollinico, e due cellule germinative (fig. 1B). La formazione della generazione sporofitica successiva dipende dall'interazione tra il gametofito femminile e quello maschile.

Nelle Angiosperme il processo di fecondazione coinvolge entrambe le due cellule spermatiche, una feconda la cellula uovo per formare lo zigote da cui si svilupperà l'embrione, mentre l'altra feconda la cellula centrale diploide per dare origine all'endosperma, che protegge l'embrione e gli fornisce nutrimento durante il suo sviluppo (Sundaresan et al., 2010).

* *Dipartimento di BioScienze, Università di Milano*

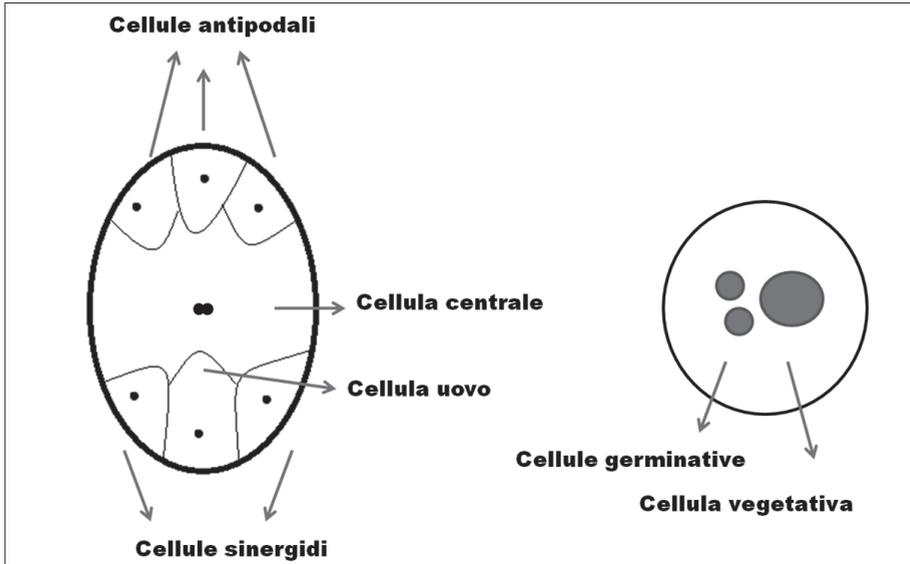


Fig. 1 (A) Rappresentazione schematica del sacco embrionale e (B) di un granulo pollinico di «*Arabidopsis thaliana*»

È noto che i membri della famiglia di fattori trascrizionali MADS-box svolgono un ruolo cruciale nello sviluppo del fiore. I geni MADS-box codificano per fattori di trascrizione che presentano tutti lo stesso dominio di legame con il DNA. Il dominio MADS (acronimo derivato dai nomi dei geni in cui esso è stato individuato per la prima volta), riconosce sempre una particolare sequenza di DNA: la CArG-box, caratterizzata dalla presenza del motivo $CC[A/T]_6GG$. In *Arabidopsis* sono stati identificati più di 100 geni MADS-box, che controllano funzioni fondamentali dello sviluppo quali la formazione dei fiori, e lo sviluppo dei semi e la transizione florale.

È stato inoltre dimostrato che i fattori MADS-box agiscono formando complessi multimerici come, ad esempio i fattori STK, SHP1, SHP2 e SE-PALLATA (SEP) che promuovono lo sviluppo dell'ovulo e del carpello (Favaro et al., 2002).

Recentemente sono stati resi noti dati d'immunoprecipitazione della cromatina che hanno evidenziato come i fattori di trascrizione di tipo MADS-box si leghino a centinaia di regioni nel genoma di *Arabidopsis*. Questi fattori sembrano agire come regolatori globali dell'espressione genica durante i vari stadi di sviluppo del fiore (Smaczniak et al., 2011, Kaufmann et al., 2009).

Per esempio STK regola la trascrizione di geni, non solo coinvolti nella

determinazione dell'identità dell'ovulo, ma anche coinvolti nel metabolismo delle cellule di cui determina l'identità (Mizzotti et al., 2012). In questo manoscritto si presentano i risultati ottenuti relativamente alla caratterizzazione di uno dei target di *STK*, *VERDANDI*, un gene codificante per un fattore di trascrizione appartenente alla superfamiglia B3, coinvolto nella determinazione dell'identità delle sinergidi e della loro funzionalità (Matias-Hernandez et al., 2010).

RISULTATI

VDD è necessario per l'apoptosi delle sinergidi

Il pattern di espressione di *VDD* è stato studiato mediante esperimenti di real-time PCR e di ibridazione *in situ*. Queste analisi hanno evidenziato che *VDD* è espresso nelle infiorescenze e nel meristema florale. Durante la formazione dell'ovulo, *VDD* è espresso in tutti gli stadi dello sviluppo.

Allo scopo di studiare la funzione del gene *VDD*, è stato studiato l'allele mutante *vdd-1*; l'analisi di segregazione nella progenie di piante eterozigoti dei *VDDvdd-1* ha mostrato un rapporto di segregazione 1:1 con totale assenza di individui omozigote per l'allele *vdd-1*. Le silique di piante eterozigoti *VDDvdd-1* mostrano circa il 50% di ovuli non fecondati (Matias-Hernandez et al., 2010).

Per esaminare se il difetto di fecondazione osservato fosse dovuto a un difetto durante lo sviluppo del sacco embrionale, sono state eseguite analisi mediante microscopia a contrasto interferenziale su piante eterozigoti *VDDvdd-1*. L'analisi di ovuli maturi non fecondati ha evidenziato che tutti gli ovuli in piante eterozigoti *VDDvdd-1* sono morfologicamente indistinguibili dagli ovuli di piante wild type (fig. 2).

Ulteriori analisi per mezzo di incroci di piante *VDDvdd-1* con linee marker specifiche per i diversi tipi di cellule del gametofito, hanno mostrato che le identità della cellula centrale e della cellula uovo sono specificate come nel wild type, mentre circa metà dei gametofiti delle piante *VDDvdd-1* presentano cellule sinergidi e antipodali non si differenziate correttamente (Mattias-Hernandez et al., 2010).

Per verificare che la perdita dell'identità delle sinergidi comprometta l'attrazione del tubetto pollinico i pistilli di piante *VDDvdd-1* sono stati impollinati manualmente e in seguito colorati mediante blue di anilina per eviden-

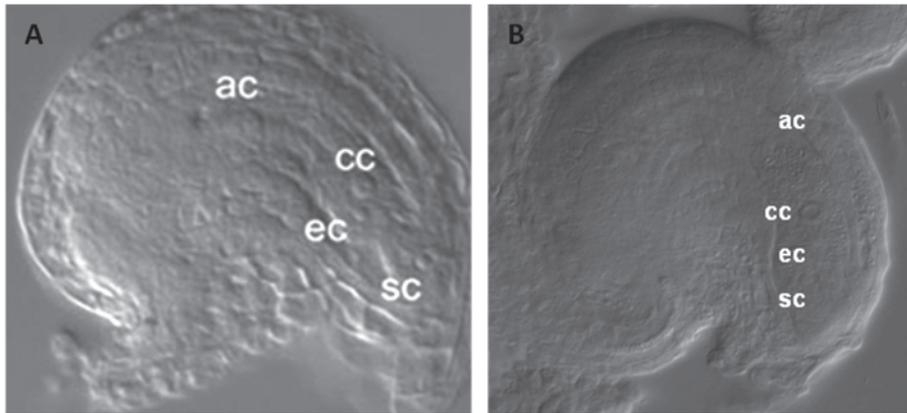


Fig. 2 (A) Ovulo maturo di una pianta wild-type. (B) Ovulo maturo di pianta *vdd-1*

ziare i tubetti pollinici. Inaspettatamente i tubetti pollinici arrivano a tutti gli ovuli delle piante *VDDvdd-1* ed entrano correttamente a livello del micropilo (fig. 3).

L'analisi morfologica delle fasi successive ha permesso di verificare che nelle piante *VDDvdd-1* solo la metà degli ovuli presenta degenerazione delle sinergide in seguito alla penetrazione del tubetto pollinico, evento necessario al fine di portare a termine il processo di doppia fecondazione (fig. 4). Questo dato suggerisce che *VDD* sia coinvolto nel processo di apoptosi della sinergide in seguito all'entrata del tubetto pollinico nel sacco embrionale.

DISCUSSIONE

L'importanza dei fattori di trascrizione MADS-box nei differenti stadi di sviluppo della pianta è stata discussa ampiamente negli anni passati. In questo lavoro è stata evidenziata l'importanza del complesso STK-SEP3 nella regolazione di un processo molto specifico ma estremamente importante per il processo riproduttivo.

In particolare grazie a questo studio è stato possibile comprendere la grande importanza rivestita dal complesso STK-SEP3 durante il processo di doppia fecondazione in *Arabidopsis thaliana*. Questo complesso regola direttamente *VDD*, un membro della famiglia B3, che gioca un ruolo essenziale nel processo di fecondazione.

VDD è coinvolto nella specificazione dell'identità e nella funzionalità delle sinergidi. Nel mutante *VDDvdd-1* le cellule sinergidi nel 50% dei gametofiti hanno

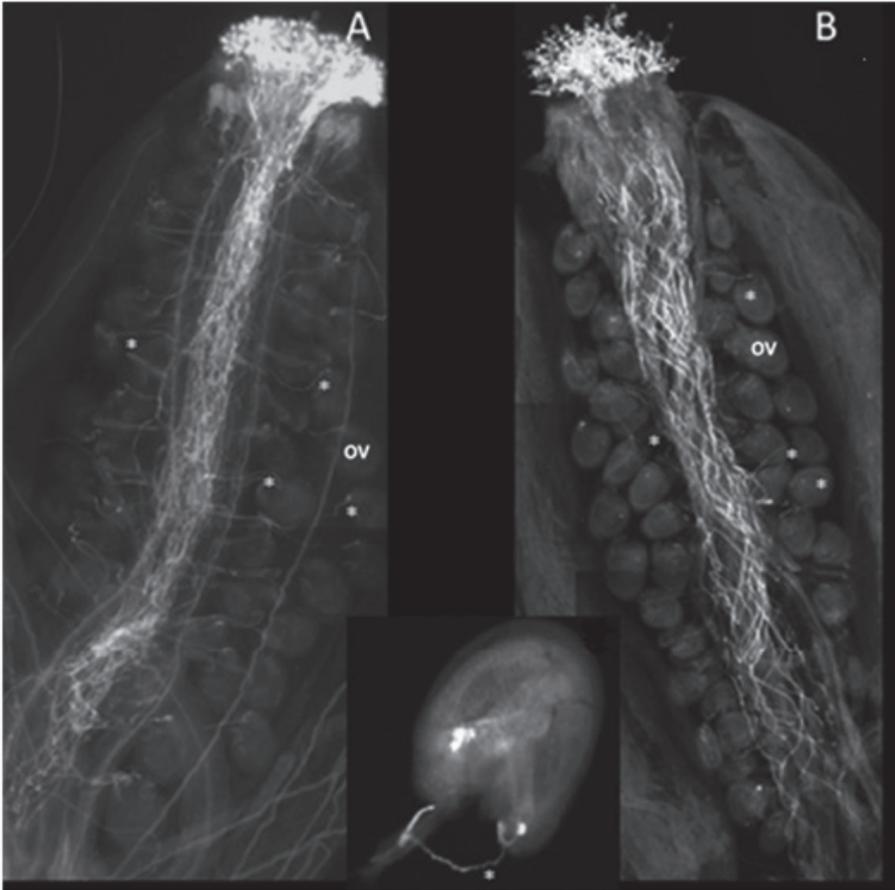


Fig. 3 Nelle piante *wild-type* (A) e nelle piante *vdd-1* (B) il tubetto pollinico (*) arriva a tutti gli ovuli. (C) Nel dettaglio, è possibile vedere un ovulo *wild-type* e il tubetto pollinico. Abbreviazioni: *ov*, ovulo

perso la loro identità ma questo non ha compromesso l'attrazione del tubetto pollinico; questi risultati suggeriscono che l'attrazione del tubetto pollinico e la degenerazione delle sinergidi sono due processi completamente separati anche se entrambi regolati dalle sinergidi (fig. 5). Questo è un chiaro esempio di come i complessi di fattori MADS box siano coinvolti non solo nella determinazione dell'identità degli organi, ma anche nel regolare il funzionamento degli organi stessi.

A conferma di questo, recentemente si è scoperto che molti dei target diretti dei complessi costituiti da questi fattori di trascrizione sono, geni che codificano per enzimi fondamentali del metabolismo cellulare (Kaufmann et al., 2010; Kaufmann et al., 2009).

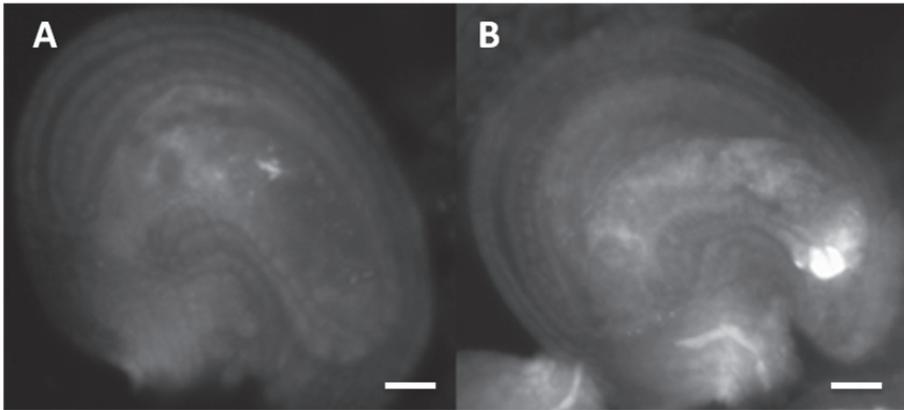


Fig. 4 (A) Ovulo wild-type prima della degenerazione (B) Ovulo wild-type dopo la degenerazione

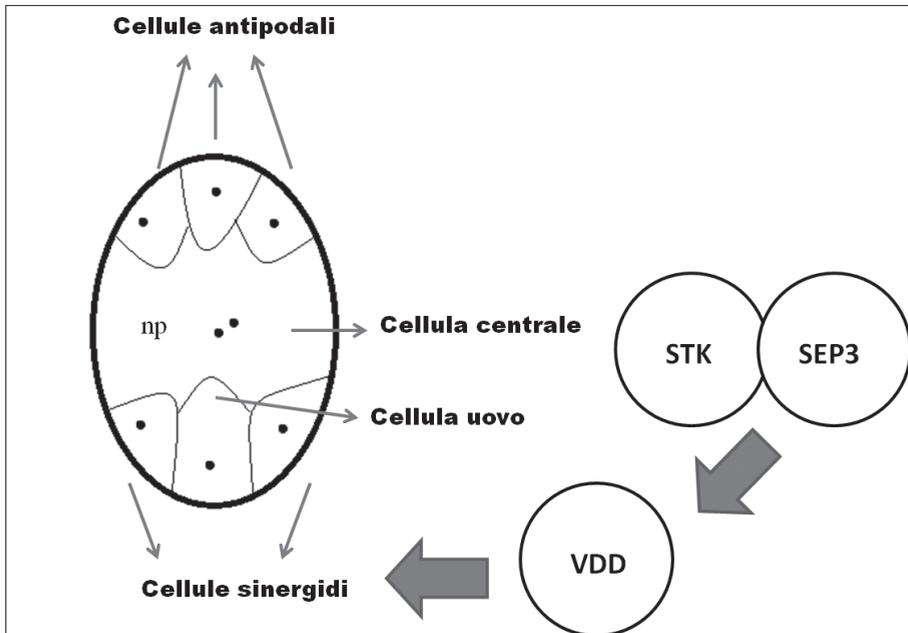


Fig. 5 Il complesso composto dalle proteine SEEDSTICK (STK) e SEPPALLATA3 (SEP3) regola direttamente il gene VERDANDI (VDD) il quale svolge un ruolo essenziale nello sviluppo delle cellule sinergidi

MATERIALI E METODI

Materiale vegetale e crescita delle piante

Piante wild-type di *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia e piante transgeniche sono state cresciute a 22° C in condizioni di fotoperiodo lungo (16h di luce/ 8h di buio). Le linee marker per le cellule del gametofito sono quelle descritte in Matias Hernandez et al., 2010.

Tutte le linee marker per il gametofito femminile codificano per un segnale di localizzazione nucleare che è in frame con il gene reporter GUS. Il mutante *VDDvdd-1* proviene dalla collezione Syngenta Arabidopsis Insertion Library (SAIL 50_C03) e contiene l'inserzione di un T-DNA nel primo introne, 44pb a monte del secondo esone.

Analisi del genotipo

L'identificazione dell'allele mutante *VDDvdd-1* è stata eseguita mediante analisi PCR usando i primers 5'-GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC-3(TDNA) e 5'-CGAAGGAGAGAAGCAGAGATG-3'. L'allele wild-type di *VDD* è stato identificato usando il primer 5'-TGAAGTACCGGCTTCAGAGTC-3'.

Analisi di microscopia

Per analizzare lo sviluppo dell'ovulo in piante eterozigoti *vdd-1* fiori a differenti stati di sviluppo sono stati posti nella soluzione di clearing per una notte usando una soluzione composta da 160 g di cloro idrato (C-8383; Sigma-Aldrich), 100mL di acqua e 50 mL di glicerolo. Gli ovuli sono stati osservati mediante un microscopio Zeiss Axiophot D1.

Per la colorazione mediante blu di anilina, piante eterozigoti *VDDvdd-1* sono state emasculate e impollinate 24h dopo l'emasculazione. Dopo, 16-18 h i pistilli sono stati raccolti e fissati in una soluzione composta da acido acetico e etanolo assoluto (1:3), in seguito trattati con NaOH 8N e colorati con blu di anilina (Sigma).

Per l'analisi di degenerazione della cellula sinergide, piante wild type eterozigoti *VDDvdd-1* sono state impollinate con una linea marker specifica per il tubetto pollinico e delle cellule spermatiche (contenente il transgene

pAKV::H2B-GFP). Dopo 16h i pistilli sono stati raccolti e osservati al microscopio ottico Zeiss®Axiophot D1 10X, 20X, 40X e 100X a immersione munito di obiettivo a contrasto interferenziale. Le fotografie sono state scattate utilizzando una camera Zeiss Axiocam MRc5 e il programma Axiovision (versione 4.1).

RIASSUNTO

Negli ultimi anni si è compiuto uno sforzo notevole per capire quali siano i fattori che controllano lo sviluppo dell'ovulo e gli eventi che precedono e seguono il processo di doppia fecondazione, necessari alla formazione dei semi. Gli aspetti più interessanti, da un punto di vista applicativo sono il controllo del numero degli ovuli all'interno dell'ovario e la possibilità di avere un'efficiente fecondazione anche in condizioni di stress ambientali che normalmente influiscono negativamente sull'efficienza del processo stesso. La scelta di numerosi gruppi di ricerca è stata quella di focalizzarsi sullo studio dei processi di riproduzione in specie modello quali *Arabidopsis* o riso, tenendo conto dell'elevato grado di conservazione dei meccanismi molecolari che stanno alla base dello sviluppo degli organi riproduttivi e del processo di fecondazione.

In particolare in *Arabidopsis* sono stati identificati i geni che controllano lo sviluppo dell'ovulo e del gametofito femminile. I fattori trascrizionali appartenenti alla famiglia MADS-box quali *STK*, *SHP1*, *SHP2* e *SEP* formano un complesso multimerico in grado di regolare centinaia di geni targets coinvolti nelle diverse fasi di sviluppo dell'ovulo e del seme di *Arabidopsis*. Uno di questi target è *VERDANDI(VDD)* un fattore che svolge un ruolo essenziale nello sviluppo del gametofito femminile ed è coinvolto nella determinazione dell'identità delle cellule accessorie del sacco embrionale (cellule sinergiche e antipodali).

ABSTRACT

In the last years an effort has been made to understand the regulatory network that controls ovule development and the fertilization process. The events that occur before and after the double fertilization are extremely important because they assure seed set and thereby the next plant generation. One of the most important economical aspects of this process is the control of the number of ovules that are produced in each carpel and the possibility to optimize the fertilization process. The choice of various research groups to use model species like *Arabidopsis* or rice, is due to the fact that the molecular mechanisms controlling the fertilization process seems to be widely conserved in the plant kingdom and therefore the use of these model species provides a benefit to study this process.

In *Arabidopsis* three MADS-box genes, *SEEDSTICK (STK)*, *SHATTERPROOF1 (SHP1)* and *SHP2*, redundantly control ovule development. Furthermore, genetic and protein interaction studies have shown that these ovule identity factors are able to interact with the *SEPALLATA (SEP)* MADS domain factors. The interaction between these MADS proteins has shown to be essential for ovule development. Our lab identified the first target gene of the *STK-SEP3* complex, which is *VERDANDI (VDD)*, a putative

transcription factor that belongs to the poorly characterized REM family. *VDD* has a role during female gametophyte development and is involved in the determination of the identity of the embryo sac accessory cells, which are important in the fertilization process.

BIBLIOGRAFIA

- BRAMBILLA V., BATTAGLIA R., COLOMBO M., MASIERO S., BENCIVENGA S., KATER M.M., AND COLOMBO L. (2007): *Genetic and molecular interactions between BELL1 and MADS-box factors support ovule development in Arabidopsis*, «Plant Cell», 19, pp. 2544-2556.
- FAVARO R., IMMINK R.G.H., FERIOLO V., BERNASCONI B., BYZOVA M., ANGENENT G.C., KATER M.M., COLOMBO L. (2002): *Ovule-specific MADS-box proteins have conserved protein-protein interactions in monocot and dicot plants*, «Mol. Genet. Genomics», 268, pp. 152-159.
- KAUFMANN K., MUIÑO J.M., JAUREGUI R., AIROLDI C.A., SMACZNIAK C., KRAJEWSKI P., ANGENENT G.C. (2009): *Target genes of the MADS transcription factor SEPALLATA3: integration of developmental and hormonal pathways in the Arabidopsis flower*, «PLoS Biology», 21, 7 (4).
- KAUFMANN K., WELLMER F., MUIÑO J.M., FERRIER T., WUEST S. E., KUMAR V., SERRANO-MISLATA A., MADUEÑO F., KRAJEWSKI P., MEYEROWITZ E. M., ANGENENT G.C., RIECHMANN J. L. (2010): *Orchestration of Floral Initiation by APETALA1*, «Science», 238.
- MATIAS-HERNANDEZ L., BATTAGLIA R., GALBIATI F., RUBES M., EICHENBERGER C., GROSSNIKLUS U., KATER M.M., COLOMBO L. (2010): *VERDANDI Is a Direct Target of the MADS Domain Ovule Identity Complex and Affects Embryo Sac Differentiation in Arabidopsis*, «The Plant Cell», 22, pp. 1702-1715.
- MIZZOTTI C., MENDES M.A., CAPORALI E., SCHNITTGER A., KATER M.M., BATTAGLIA R., COLOMBO L. (2012): *The MADS-box genes SEEDSTICK and ARABIDOPSIS BSISTER play a maternal role in fertilization and seed development*, «The Plant Journal», 70, pp. 409-420.
- NURRISH S.J., TREISMAN R. (1995): *DNA binding specificity determinants in MADS-box transcription factors*, «Mol. Cell. Biol», 15, pp. 4076-85.
- SMACZNIAKA C., IMMINK R., MUIÑO J., BLANVILLAIN R., BUSSCHERB M., BUSSCHER-LANGEBDINHB J.P., LIUH S., WESTPHALI A., BOERENI S., PARCY F., XUH L., CRISTEL C., ANGENENT G. AND KAUFMANN K. (2012): *Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in Arabidopsis flower development*, PNAS 1560-1565.
- SUNDARESAN V., ALANDETE-SAEZ M. (2010): *Pattern formation in miniature: the female gametophyte of flowering plants*, «Development», 137, pp. 179-189.
- YADEGARI R., DREWS G.N. (2004): *Female gametophyte development*, «The Plant Cell», 16, pp. 133-141.

