

Da *Arabidopsis* alle piante coltivate: l'era della “translational plant biology”

Le piante hanno rappresentato, in una fase storica per lo sviluppo della genetica moderna, un sistema biologico di grande importanza. Gli esperimenti effettuati da Mendel sull'ereditarietà dei caratteri genetici rappresentano tuttora le basi della genetica e del miglioramento genetico delle piante coltivate. Ciò che Mendel non avrebbe potuto studiare è invece la natura della mutazione che causava il fenotipo rugoso dei piselli studiati dal monaco genetista. Solo nel 1990 l'origine di tale mutazione è stata infatti svelata. Si tratta infatti di una mutazione verosimilmente causata da un trasposone. Anche la scoperta dei trasposoni, tratti di DNA in grado di spostarsi lungo un cromosoma o addirittura da un cromosoma all'altro, è avvenuta grazie a studi di biologia vegetale. I trasposoni furono infatti descritti da Barbara McClintock studiando il mais e le sue peculiari mutazioni che causano la colorazione delle pannocchie. Per questa scoperta la McClintock ha ricevuto il premio Nobel nel 1983.

L'importanza delle piante per l'esistenza del genere umano è stata enfatizzata, circa 10 anni fa, dalla National Science Foundation (NSF). Le piante, infatti, forniscono l'ossigeno per la nostra respirazione, il cibo per l'alimentazione, le fibre tessili per l'abbigliamento, materiale per costruzione e medicinali. La NSF lamenta però il “gap” esistente tra le conoscenze scientifiche disponibili per specie viventi quali l'uomo, il topo, la *Drosophyla*, i batteri intestinali e le piante, queste ultime scarsamente studiate a livello genomico. Le ragioni di questo ritardo della genomica vegetale è principalmente dovuto alla dispersione delle risorse finanziarie ed umane in mille rivoli di ricerca scientifica sulle più disparate specie vegetali. Infatti, se la biologia animale ha saputo individuare sistemi “modello” (per l'uomo il topo ed alcuni primati, per la micro-

* Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

biologia alcuni lieviti ed *Escherichia coli*), i ricercatori attivi nel settore delle “plant sciences” hanno, per secoli, disperso i loro sforzi di ricerca su centinaia di specie vegetali diverse, senza trovare un accordo su quale dovesse essere la pianta su cui concentrare le attenzioni degli scienziati. Il livello di conoscenza sulla biologia delle piante in generale non è sufficientemente elevato da rendere accettabili lo studio di specificità di singole specie, mentre solo uno sforzo comune di tutta la comunità scientifica è necessario per definire con chiarezza i processi biologici alla base della crescita e differenziamento delle specie vegetali. In altri termini, la nostra conoscenza di processi di base come l'accrescimento e il differenziamento delle piante è talmente incompleto da richiedere una semplificazione di approccio (l'impiego di una specie modello) per chiarire il processo, e solo successivamente verificare se e come altre specie vegetali differiscano dal comportamento della specie modello. Con la constatazione del costante incremento del gap scientifico tra biologi vegetali ed animali, circa 20 anni fa la comunità dei ricercatori in “plant sciences” è finalmente giunta alla convergenza su di un unico sistema modello: *Arabidopsis thaliana*. Questa è stata una decisione di importanza storica, siccome sino ad allora le specie studiate erano di prevalente interesse per l'agricoltura, mentre *Arabidopsis* è priva di qualsiasi interesse commerciale. Se infatti prima dell'“era di *Arabidopsis*” la scelta della specie da studiare era prevalentemente legata alla importanza economica della specie (che condizionava anche fortemente il flusso di finanziamenti per la ricerca), con *Arabidopsis* la priorità si sposta verso altri criteri, primo fra tutti l'esigenza di giungere finalmente ad una comprensione esaustiva dei meccanismi molecolari alla base della crescita e sviluppo delle piante. Peraltro, *Arabidopsis* si sviluppa, riproduce e risponde agli stress ed alle malattie similmente alle piante coltivate, consentendo di trarre rapidi indizi traducibili in preziose informazioni per lo studio delle specie coltivate.

«ARABIDOPSIS THALIANA»

Arabidopsis thaliana è una piccola pianta erbacea che appartiene alla famiglia delle Brassicacee o Crucifere. È tipica delle regioni temperate dell'emisfero boreale e cresce spontanea su terreni incolti ed aridi.

Diverse specie appartengono al genere *Arabidopsis*, ma *Arabidopsis thaliana*, che fu scoperta nel sedicesimo secolo sulle montagne di Harz, in Germania, da Johannes Thal (da qui il nome *thaliana*), è la più conosciuta e la più impiegata ai fini della ricerca. Il suo genoma è organizzato in cinque cromosomi e risulta

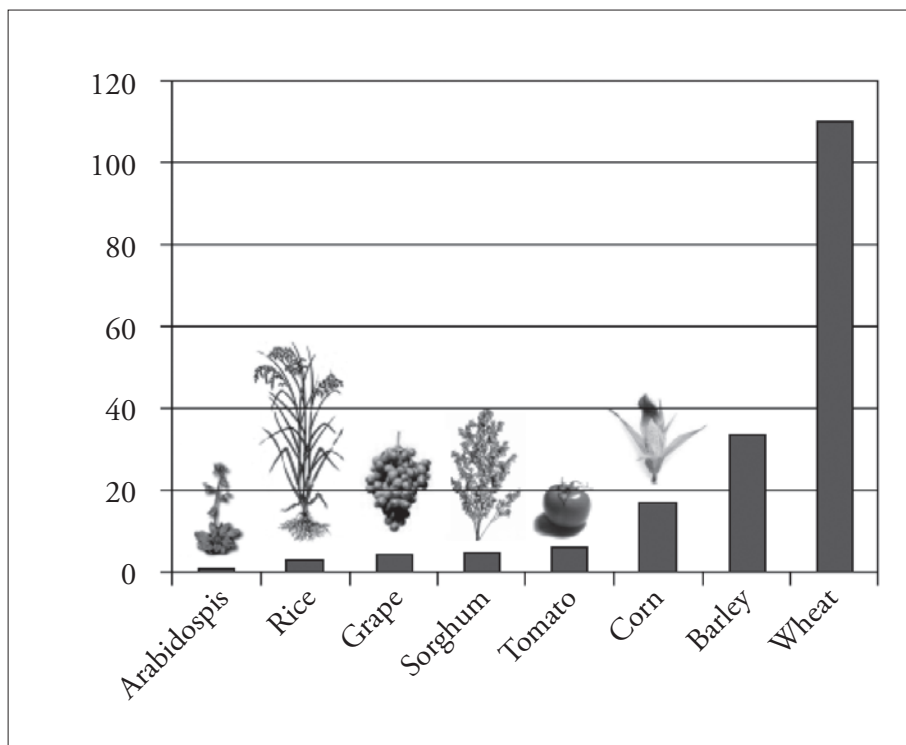


Fig. 1 *Dimensione relativa dei genomi di specie coltivate a confronto con Arabidopsis*

essere piccolo se confrontato con quello delle maggiori specie di interesse agronomico quali, ad esempio, riso, pomodoro, mais e frumento, i cui genomi sono rispettivamente tre, sette, venti e centoventi volte più grandi.

Le regioni genomiche sequenziate (114.5 Mb delle 125 Mb complessive) contengono circa 26000 geni, con una densità media di circa un gene per 4.5 Kb. Le funzioni di circa il 69% dei geni sono state classificate in base a similarità di sequenza con proteine a funzione nota di altri organismi e solo il 9% dei geni è stato caratterizzato sperimentalmente. Il restante 30% dei predetti prodotti genici, comprendente sia proteine vegetali specifiche sia proteine con similarità a geni di altri organismi la cui funzione non è ancora nota, non è stato assegnato ad alcuna categoria funzionale (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Caratteristica molto interessante del suo genoma è la presenza di un numero insolitamente alto di sequenze uniche (tra il 50% ed il 55%). Del rimanente 45-50%, solo il 10-15% è caratterizzato da sequenze altamente ripetute (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

RUOLO DI «ARABIDOPSIS» NELLA RICERCA

I vantaggi offerti dall'utilizzo di *Arabidopsis thaliana* sono molteplici. Innanzi tutto, nonostante sia una dicotiledone, presenta molte analogie genetiche anche con monocotiledoni, quali i cereali; dal suo studio perciò si possono ottenere informazioni riguardo le maggiori specie coltivate.

Ha un tempo di germinazione molto breve (2 o 3 giorni), una crescita rapida ed un ciclo vitale da seme a seme che varia dalle 8 alle 16 settimane a seconda delle condizioni di crescita, in particolare del fotoperiodo. Ha un ciclo vitale da seme a seme molto breve, si sviluppa e risponde a stress e malattie in maniera molto simile alla maggior parte delle piante coltivate. È piccola, pertanto adatta a crescere in spazi ristretti come quelli di un laboratorio, ed una singola pianta è in grado di produrre fino 10000 semi dalle dimensioni molto ridotte (0.5 mm di lunghezza), prestandosi dunque bene ad esperimenti genetici su ampia scala. La possibilità di una efficiente trasformazione *in planta* (che consente di evitare i passaggi di messa in cultura delle cellule vegetali e di rigenerazione dei tessuti con tutti i problemi connessi a tali procedure) tramite l'impiego di *Agrobacterium tumefaciens* l'ha definitivamente consacrata come pianta d'elezione per gli studi di biologia molecolare e vegetale.

Inizialmente, però, l'accettazione di una specie come *Arabidopsis* da parte della comunità scientifica non è stata semplice. Gli scienziati non erano convinti sulla previsione di un positivo impatto di queste ricerche sullo sviluppo della ricerca applicata in biologia vegetale e si sono registrate contrarietà circa il re-indirizzamento di risorse finanziarie verso *Arabidopsis*. I risultati ottenuti negli ultimi anni evidenziano come *Arabidopsis* sia stata la scelta giusta. Le pubblicazioni scientifiche aventi *Arabidopsis* come oggetto di studio sono aumentate vertiginosamente, da meno di 100 nel 1990 a quasi 1800 nel 2005, una conseguenza della decisione di molti governi di finanziare sostanziosamente questo settore della ricerca di base. Negli Stati Uniti d'America, i dipartimenti dell'agricoltura e dell'energia, il National Institutes of Health, e la National Science Foundation hanno finanziato la ricerca scientifica su *Arabidopsis* con 7.5 milioni di dollari nel 1990 sino ai 22 milioni di dollari del 1993. Si tratta di cifre impressionanti, ed anche la Unione Europea ha investito risorse in questo settore, anche se in misura molto minore. Attualmente la maggior parte dei laboratori di biologia vegetale usa *Arabidopsis* come sistema modello.

La nascita di una comunità scientifica internazionale impegnata nello studio di *Arabidopsis* ha una sua storia. Diverse piante furono inizialmente proposte come possibili candidate a "specie modello", ad esempio mais, pomodo-

ro, pisello, riso, orzo, petunia, bocca di leone, ma la comunità scientifica non raggiunse un accordo riguardo quale di queste fosse la più rappresentativa per studiare processi comuni a tutte le piante (Meinke, 1998).

Verso la fine degli anni settanta l'attenzione della comunità scientifica si focalizzò su *Arabidopsis*, che era stata per la prima volta adottata come modello genetico da Laibach in Europa nel 1943 e successivamente studiata in dettaglio da Rédei negli Stati Uniti (Rédei, 1970).

L'interesse verso questa pianta crebbe enormemente all'inizio degli anni ottanta con la pubblicazione di numerosi articoli che ne sottolineavano il potenziale valore per la ricerca (Meinke e Sussex, 1979), con la pubblicazione della prima mappa dettagliata dei suoi 5 cromosomi (Koornneef, 1983), con la dimostrazione che *Arabidopsis* aveva un genoma piccolo e quindi estremamente adatto per analisi genetiche (Meyerowitz e Pruitt, 1985) e con la realizzazione di protocolli di trasformazione genetica (Feldmann e Marks, 1987).

L'era di *Arabidopsis* inizia ufficialmente nel 1987 con la *Terza Conferenza Internazionale di Arabidopsis*, tenutasi presso l'Università Statale del Michigan.

Negli anni novanta l'entusiasmo per *Arabidopsis* ne determina la sua elezione quale pianta modello per la fisiologia, la biologia e la genetica vegetale. In quegli anni sono stati delineati diversi importanti obbiettivi da raggiungere mediante collaborazione internazionale, quali la saturazione del suo genoma con mutazioni inserzionali ed il sequenziamento dell'intero genoma entro la fine del decennio (Meinke, 1998).

Con l'*Arabidopsis Genome Initiative* (AGI), che ha iniziato la sua attività nel 1996 ed ha coinvolto 15 laboratori tra Europa, Stati Uniti e Giappone, si è arrivati alla pubblicazione nel 1999 della sequenza dei cromosomi 2 e 4 per finire nel dicembre 2000 con la sequenza completa dei cromosomi 1, 3 e 5, facendo di *Arabidopsis* il primo organismo vegetale di cui sia stato completato il sequenziamento del genoma (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Negli ultimi anni sono state prodotte in modo indipendente da numerosi laboratori grandi collezioni di linee di mutanti inserzionali di T-DNA (Krysan et al. 1999) o trasposoni. Molte di queste linee sono state inviate ai principali centri di raccolta, *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC) dell'Università di Stato dell'Ohio e il *Nottingham Arabidopsis Stock Center* (NASC) (<http://nasc.nott.ac.uk>), i quali già da diversi anni stanno organizzando la collezione, la conservazione e la distribuzione dei semi ottenuti dalle varie fonti.

L'obbiettivo dell'utilizzo di una pianta modello è quello di estendere alle

altre piante le conoscenze acquisite grazie ad essa, ed ove possibile sfruttarle a fini pratici, ad esempio per il miglioramento delle specie coltivate.

LA POST-GENOMICA DI «ARABIDOPSIS THALIANA»

Il sequenziamento del genoma di *Arabidopsis* ha colmato in parte il “gap” che separa la biologia animale da quella vegetale. La conoscenza della sequenza del genoma ha infatti consentito lo sviluppo di strumenti per la post-genomica vegetale. Come è noto, la post-genomica studia gli eventi che sono diretta conseguenza delle sequenze genomiche, e quindi *in primis* l’insieme degli mRNA presenti in un sistema biologico in un particolare stato fisiologico (transcriptoma), il conseguente insieme di proteine (proteomica) ed infine l’insieme dei metaboliti risultanti dall’attività metabolica svolta dalle proteine nell’ambito cellulare (metaboloma). Lo sviluppo di tecnologie (microarray) che consentono lo studio del livello di RNA messaggeri (i “trascritti”, copie del gene che verranno tradotti in proteine) non più affrontando lo studio di singoli trascritti, ma dell’intero insieme dei trascritti presenti nel sistema biologico allo studio.

I microarray utilizzano infatti migliaia di sonde di DNA disposte su una superficie solida, di ridotte dimensioni (spesso una superficie quadrata di meno di 1 centimetro di lato). Tale tecnica consente di valutare la presenza e l’abbondanza di specifici mRNA in un estratto biologico. Le sonde di DNA presenti in un DNA-microarray (cDNA o oligonucleotidi) reagiscono con le sequenze complementari dei rispettivi RNA messaggeri consentendone la quantizzazione, e quindi la misura del livello di presenza di ogni specifico trascritto nel campione vegetale analizzato.

I microarray sono stati inoltre sviluppati quasi in contemporanea per l’uomo, il topo ed *Arabidopsis thaliana*, a dimostrazione che il divario tra biologia animale e vegetale è in parte colmato. Una tipologia particolare di microarray è rappresentato dai “GeneChip”, microarray basati sulla sintesi “in situ” di oligonucleotidi (sequenze target). Tale tecnologia è di fatto uno standard per quanto concerne i microarray di specie modello. Confrontando il primo GeneChip di *Arabidopsis*, progettato nel 2000, con il più recente GeneChip ATH1 si può constatare come il numero di sequenze target su unità di superficie di un singolo GeneChip microarray si è raddoppiato. Il GeneChip “ATH1”, un “genome-wide” GeneChip contiene infatti sequenze target in grado di coprire il 90% del genoma di *Arabidopsis* (Redman *et al.* 2004).

Anche se l’analisi del transcriptoma tramite i microarray è ancora nelle sue fasi iniziali, sono evidenti le potenzialità di tale approccio, impiegato per carat-

terizzare l'espressione genica regolata da ormoni o altri trattamenti; per determinare gli elementi regolatori di geni; per caratterizzare le funzioni geniche.

DA «ARABIDOPSIS» ALLE SPECIE COLTIVATE

Al sequenziamento del genoma di *Arabidopsis* è seguito il sequenziamento di una importante specie coltivata, il riso (Goff *et al.* 2002; Yu *et al.* 2002) e della prima specie arborea, il Pioppo (Tuskan *et al.* 2006). Il sequenziamento di una specie la fa entrare di diritto nell'esclusivo *club* delle specie passibili di un approccio di studio genomico e post-genomico, e questo ha un forte impatto sulla "appetibilità" della specie da parte dei ricercatori. Come sopra discusso, la disponibilità delle sequenze genomiche rende possibile lo sviluppo di strumenti di analisi post-genomica delle specie vegetali, quali i microarray e le collezioni di mutanti. Alla lista delle specie il cui genoma è stato sequenziato si aggiungerà a breve una specie di grande interesse agronomico per l'Italia: il pomodoro. Il progetto genoma del pomodoro è infatti iniziato e il nostro paese contribuisce a questo sforzo con il sequenziamento di uno dei 12 cromosomi di questa *Solanacea*. Il pomodoro rappresenta una specie di grande interesse non solo per gli agricoltori, ma anche per gli studiosi di biologia vegetale. La relativa semplicità di allevamento di questa specie anche in ambiente controllato, la disponibilità di varietà nane quale *Microtom*, la semplicità con la quale può essere trasformata ne fanno una specie ideale per lo studio di un processo quale lo sviluppo e maturazione di un frutto carnoso, processo certo non studiabile impiegando *Arabidopsis*. L'uso della varietà *Microtom* rende possibile la coltivazione di ben 1357 piante di pomodoro per metro quadrato, una densità simile a quella ottenibile con *Arabidopsis* in grado di rendere possibili studi di genetica, anche tramite tecnologie transgeniche, in ambiente climatizzato controllato (Meissner *et al.* 1997). *Microtom* è però un mutante multiplo, essendo mutato nel gene *SELF PRUNING*, nel gene *DWARF* oltre ad una alterata resistenza a patogeni. Questo limita il suo impiego allo studio di fenomeni non influenzati dalle mutazioni sopra citate (Martì *et al.* 2006).

In attesa che le specie coltivate quali il pomodoro divengano "sistemi modello", quali evidenze abbiamo circa l'utilità di *Arabidopsis* per il chiarimento della fisiologia delle specie coltivate? È stato dimostrato che geni di riso legati alla tolleranza al freddo esplicano la stessa funzione in *Arabidopsis*, confermando la ipotesi che prevede una sostanziale conservazione dei meccanismi molecolari di risposta a stress ambientali tra *Arabidopsis* e specie evolutivamente distanti

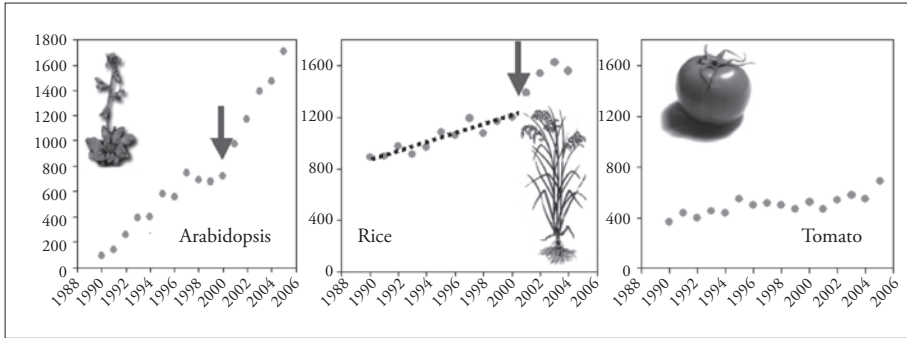


Fig. 2 *Impatto del sequenziamento genico sulla produzione scientifica mondiale. Le pubblicazioni aventi Arabidopsis come oggetto di studio erano meno di 100 nel 1990 ed hanno raggiunto il numero di circa 700 all'anno nel periodo 1997-2000. Con la pubblicazione della sequenza del genoma di Arabidopsis nel 2000 (freccia nel grafico), il numero di pubblicazioni è aumentato notevolmente, sino a raggiungere le 1800 pubblicazioni nell'anno 2005. Un fenomeno simile è stato osservato per il riso: la pubblicazione della sequenza del genoma (indicata dalla freccia) ha comportato un aumento del tasso di pubblicazioni sul riso. È probabile ipotizzare che il sequenziamento del pomodoro porterà ad un simile effetto*

quale il riso (Vannini et al., 2004). Inoltre, geni di Arabidopsis sono in grado di controllare la sintesi degli antociani in pomodoro, nuovamente confermando come le evidenze sperimentali ottenute in Arabidopsis consentano di identificare rapidamente il corrispondente fenomeno in una specie coltivata come il pomodoro (nostre evidenze sperimentali non pubblicate).

CONCLUSIONI

La scelta di Arabidopsis come sistema modello *unico* da parte della comunità scientifica ha consentito di colmare il divario che per anni ha separato la biologia degli organismi animali dalla biologia delle piante. Esiste oggi una consolidata comunità di studiosi che impiegano Arabidopsis come primario modello di studio ed è evidente che ancora molto resta da scoprire. L'obiettivo è l'attribuzione sperimentale di una funzione a tutti i geni che compongono il genoma di Arabidopsis, obiettivo forse troppo ambizioso per poter essere realizzato nei prossimi anni, ma che potrebbe essere raggiunto entro il 2020. Appare quindi evidente che Arabidopsis resterà sistema di elezione per ancora molti anni. Al tempo stesso, i progetti di sequenziamento di altri genomi vegetali renderanno possibile un approccio di studio genomico e post-genomico su molte nuove specie di interesse applicativo. In particolare il pioppo potrà diventare un eccellente sistema modello per lo studio della sintesi di cellulosa e lignina, tematica di grande interesse per i risvolti

applicativi connessi con la produzione di biomasse ligneo-cellulosiche. Il recente annuncio del sequenziamento del genoma della vite suggerisce che gli studiosi delle specie legnose avranno a breve a disposizione nuovi strumenti di studio. Il pomodoro rappresenta già un eccellente modello per lo studio dei frutti carnosi, e il sequenziamento del suo genoma lo consacrerà sistema modello per lo studio delle solanacee, al pari del ruolo di *Medicago truncatula*, sempre più modello per lo studio delle leguminose. L'affiancarsi di nuovi sistemi modello ad *Arabidopsis* non sarà in alcun modo indipendente dagli studi su *Arabidopsis*. Il flusso di informazioni sulle funzioni geniche di *Arabidopsis* consentirà semplici verifiche della coerenza delle funzioni in specie vegetali diverse agendo quindi da acceleratore di conoscenza anche per le specie di interesse agrario (*translational biology*). Al contempo, la evidenziazione di differenze di comportamento tra *Arabidopsis* ed altre specie aprirà nuovi settori di studio sulle basi genetiche e fisiologiche della biodiversità vegetale.

BIBLIOGRAFIA

- A. A. (2002): *A Draft Sequence of the Rice Genome* (*Oryza sativa* L. ssp. japonica), «Science», 296, p. 92.
- A.A. (2002): *A Draft Sequence of the Rice Genome* (*Oryza sativa* L. ssp. indica), «Science», 296, p. 79.
- A.A. (2006): *The Genome of Black Cottonwood*, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray), «Science», 313, pp. 1596-1604.
- FELDMANN K. A. and MARKS M. D. (1987): Agrobacterium-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture approach, «Molecular Gene Genetics», 208, pp. 1-9.
- KOORNNEEF M. (1983): *The use of telotrisomics for centromere mapping in Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, «Genetica», 62, pp. 33-40.
- KRYSAN P. J., YOUNG J. C. and SUSSMAN M. R. (1999): *T-DNA as an Insertional Mutagen in Arabidopsis*, «Plant Cell», 11, pp. 2283-2290.
- MARTI E., GISBERT C., BISHOP G. J., DIXON M. S. and GARCIA-MARTINEZ J. L. (2006): *Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom*, «Journal Experimental Botany», 57, pp. 2037-2047.
- MEINKE D.W., CHERRY J.M., DEAN C., ROUNSLEY S.D. and KOORNNEEF M. (1998): *Arabidopsis thaliana: a model plant for genome analysis*, «Science», 282, pp. 662-682.
- MEINKE D.W., SUSSEX I.M. (1979): *Embryo-lethal mutants of Arabidopsis thaliana: a model system for genetic analysis of plant embryo development*, «Development Biology», 72, pp. 50-61.
- MEISSNER R., JACOBSON Y., MELAME S., LEVYATUV S., SHALEV G., ASHRI A., ELKIND Y., LEVY A. (1997): *A new model system for tomato genetics*, «Plant Journal», 12, pp. 1465-1472.
- MEYEROWITZ E.M. and PRUITT R.E. (1985): *Arabidopsis thaliana and plant molecular genetics*, «Science», 229, pp. 1214-1218.

- RÉDEI G. P. (1970): *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., a review of the genetics and biology, «Bibliographia Genetica», 20, pp. 1-151.
- REDMAN J.C., HAAS B.J., TANIMOTO G., TOWN C.D. (2004): *Development and evaluation of an Arabidopsis whole genome Affymetrix probe array*, «Plant Journal», 38, pp. 545-561.
- THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE (2000): *Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana*, «Nature», 408, pp. 796-815.
- VANNINI C., LOCATELLI F., BRACALE M., MAGNANI E., MARSONI M., OSNATO M., MAT-TANA M., BALDONI E., CORAGGIO I. (2004): *Overexpression of the rice Osmv4 gene increases chilling and freezing tolerance of Arabidopsis thaliana plants*, «Plant Journal», 37, pp. 115-127.

Giornata di studio su:

Comunicazione e Agricoltura.
Un esempio opportuno

Firenze, 4 maggio 2006

