

L'IMPIEGO DEGLI ERBARI NELLA SISTEMATICA MOLECOLARE

Sommario

1. Presentazione - che cos'è la sistematica molecolare
2. Gli strumenti della sistematica molecolare
 - 2.1 I metaboliti secondari
 - 2.2 Le proteine
 - 2.3 Gli acidi nucleici
 - 2.3.1. Caratteristiche generali
 - 2.3.2. Metodi e tecniche
3. **Potenzialità e limiti inerenti all'impiego di campioni di erbario per analisi molecolari.**
4. Compiti e responsabilità del conservatore dell'erbario.

1. Presentazione - Che cos'è la sistematica molecolare.

La biologia sistematica è nata e si è sviluppata storicamente come disciplina “morfologica”, nel senso che la caratterizzazione dei taxa, il loro riconoscimento, e la definizione dei loro mutui rapporti, storicamente sono stati basati sull'analisi morfologica del fenotipo.

Dal primo sistema di classificazione naturale redatto da Andrea Cesalpino nel XVI secolo, a Bauhin, a Tournefort, a Linneo, fino ai grandi sistematici dell'Ottocento, ed a Cronquist (1968) nel secolo appena terminato, i taxa sono sempre stati riconosciuti e raggruppati in sistemi fondati esclusivamente o sostanzialmente su caratteri morfologici macroscopici, od al massimo osservabili con la lente di ingrandimento (“*oculo armato*” dei classici).

A partire dall'Ottocento, il campo dei caratteri utilizzati è stato gradualmente ampliato all'uso di caratteri osservabili solo con il microscopio. I “microcaratteri” però non hanno mai avuto, nella sistematica delle Spermatofite, un'importanza centrale (il discorso è ben diverso nel caso delle Crittogame), e comunque, al di là dall'aspetto dimensionale, il carattere microscopico rientra sempre nella morfologia del fenotipo, e quindi è del tutto equivalente, dal punto di vista metodologico, al carattere macroscopico.

Un salto di qualità si è avuto con lo sviluppo di metodi di analisi chimica e biochimica, che hanno aperto la via all'esplorazione di nuove terre prima ignote. A partire dai primi decenni del Novecento sono state messe a punto tecniche via via più efficaci per il riconoscimento e l'analisi di quei composti organici comunemente indicati come metaboliti secondari, poi delle proteine, ed infine degli acidi nucleici.

Dal punto di vista dell'impiego sistematico, si tratta di tre complessi di sostanze che offrono possibilità radicalmente diverse:

- I metaboliti secondari rappresentano prodotti terminali di vie di biosintesi ; la loro presenza dipende quindi dall'esistenza di enzimi che catalizzano una serie di reazioni che portano alla sintesi di un certo metabolita. Pertanto, essi fanno parte a tutti gli effetti del fenotipo.
- Le proteine, ed in particolare gli enzimi, costituiscono invece l'anello intermedio fra genotipo e fenotipo : sintetizzate direttamente dal genoma ne rappresentano il primo prodotto, ed in certo qual modo l'immagine.
- Gli acidi nucleici infine costituiscono il genoma stesso, nel caso del DNA, o sono comunque macromolecole che evolvono e si ereditano direttamente (RNA), e si pongono alla radice della struttura genetica dell'individuo.

Significato sistematico, metodi e tecniche sono quindi radicalmente diversi nei tre casi, e li tratteremo in modo separato.

2. Gli strumenti della sistematica molecolare

2.1 I metaboliti secondari.

Sotto questo nome si raccolgono molecole organiche di natura affatto diversa, che vanno dagli alcaloidi ai terpenoidi, ai chinoni, ai flavoni, agli aminoacidi non proteici, ecc.

Lo studio di queste sostanze ha ricevuto un forte impulso principalmente per motivi pratici, in quanto si tratta delle sostanze da cui derivano le proprietà officinali delle piante.

Al di là dell'uso pratico, tuttavia, i metaboliti secondari sono in molti casi marcatori tassonomici di grande interesse. Si possono citare come esempio gli alcaloidi derivati dalla benzil-isochinolina che caratterizzano la sottoclasse Magnoliidae in senso lato (incluse le Ranunculidae). La famiglia Papaveraceae, che la sistematica tradizionale (per esempio di Engler e Prantl, 1888) avvicinava alle Cruciferae in virtù di alcuni caratteri fiorali, è stata trasferita alla Magnoliidae, proprio in considerazione del fatto che gran parte delle sue specie contengono alcaloidi benzilisoquinolinici, mentre non sintetizzano mai i glucosinolati, a loro volta marcatori tassonomici delle Cruciferae. Questa classificazione delle Papaveraceae è stata successivamente corroborata da molti altri elementi, ed è ora universalmente accettata.

Anche a livello specifico e sottospecifico i metaboliti secondari forniscono interessanti informazioni. In molti casi è stata dimostrata una grande variabilità di qualità e quantità di metaboliti presenti in diverse popolazioni della stessa specie. A questo proposito, è stato coniato il termine "chemiotipo", che indica in complesso di popolazioni caratterizzate da uno o più metaboliti particolari.

L'impiego di metaboliti secondari come marcatori di grandi linee evolutive ha avuto un notevole sviluppo in passato, specialmente per merito di Dahlgren (Ehrendorfer e Dahlgren, 1982 ; Dahlgren et al., 1985). Negli anni più recenti questo impiego è diminuito, soprattutto a vantaggio dell'uso delle macromolecole.

Il motivo principale, per cui oggi i metaboliti secondari sono meno usati è da ricercarsi nel fatto che l'interpretazione di questo tipo di dati è spesso dubbia: ad esempio, il fatto che composti di una data classe siano assenti in un dato gruppo tassonomico, può indicare assenza dei geni che presiedono alla loro biosintesi, ma può anche significare che i geni, pur presenti, non si esprimono, a causa dell'azione di geni regolatori.

L'impiego dei metaboliti secondari a livello specifico e sottospecifico è anch'esso problematico, perché spesso l'espressione di un determinato metabolita dipende dalle condizioni ambientali : di conseguenza, mentre la presenza di un certo composto indica con certezza la presenza dei geni che ne controllano la biosintesi, l'assenza del medesimo composto può significare sia l'assenza di uno o più dei geni coinvolti nella via biosintetica, sia la loro mancata espressione dovuta a motivi ambientali. Molto spesso poi lo stesso metabolita è riscontrabile in alcuni organi e non in altri, oppure è sintetizzato in quantità molto modeste, per cui sfugge alla rilevazione.

Per questi motivi l'uso sistematico dei metaboliti secondari, che ha avuto un grande impulso alcuni decenni fa, ora è alquanto marginale, mentre prevalgono studi di ecologia biochimica, focalizzati sulla correlazione fra metaboliti secondari e condizioni ambientali.

SCHEDA

L'interpretazione sistematico-filogenetica della distribuzione dei metaboliti secondari è spesso ambigua.

Le *Centrospermae* (= *Caryophyllidae pro maxima parte* nel senso di Takhtadjan) sono caratterizzate da un importante marcatore tassonomico: la presenza di betalaine, composti di colore rosso-violaceo, che vicariano gli antociani, diffusi in tutte le altre Angiosperme, ma assenti da questa linea evolutiva.

Fanno eccezione le *Caryophyllaceae*, famiglia notevolmente evoluta che si colloca nel cuore delle *Centrospermae*: queste possiedono antociani e mancano di betalaine.

La spiegazione più lineare e più economica di questa distribuzione anomala è che i geni che presiedono alla via di biosintesi degli antociani siano presenti in tutte le

Centrospermae, ma la loro espressione sia inibita. Solo nelle *Caryophyllaceae* si avrebbe inibizione dell'espressione delle betalaine e disinibizione degli antociani. Ogni altra spiegazione richiedere di assumere che complesse vie di biosintesi si siano evolute più volte, in modo parallelo ed indipendente.

2.2 Le proteine

Le proteine sono il prodotto diretto della trascrizione del genoma, ed in quanto tali ne sono un'immagine. Diverse tecniche sono state utilizzate, da un secolo in qua, per stimare in modo più o meno diretto la somiglianza di proteine omologhe estratte da specie o da popolazioni diverse.

L'impiego dell'analisi di proteine nella ricerca sistematica dal livello di genere in su ha ormai solo un'importanza storica, perché è stata soppiantata dall'analisi degli acidi nucleici. Mantiene invece ancora intatto il suo valore lo studio del polimorfismo enzimatico ("isoenzimi") per lo studio della diversità genetica a livello individuale, popolazionale ed intraspecifico.

Tuttavia, non tratteremo qui questo argomento, perché le proteine vanno incontro a degradazione irreversibile (denaturazione, idrolisi, ed altri processi degenerativi) durante l'essiccamento delle piante, per cui i campioni d'erbario non possono essere impiegati in analisi che si basano sulla struttura delle proteine.

2.3 Gli acidi nucleici

2.3.1. Caratteristiche generali

Gli acidi nucleici contenuti in strutture permanenti delle cellule vegetali sono il DNA nucleare, il DNA plastidiale, il DNA mitocondriale, l'RNA ribosomale. Altre forme di RNA (messaggero, transfer) sono ripetitori di sequenze già contenute nel DNA, e quindi non hanno interesse in questo contesto.

L'RNA ribosomale è fortemente conservativo : pertanto, esso ha trovato un impiego del massimo interesse nella costruzione di sistemi filogenetici che riguardano le grandi divisioni dei viventi (per esempio, la filogenesi di Procarioti è stata ricostruita principalmente analizzando e comparando le sequenze dell'RNA ribosomale), ma per lo stesso motivo non trova impiego utile nella sistematica a livello di famiglie od inferiore.

Attualmente lo strumento di elezione della sistematica molecolare a livello generico, specifico ed infraspecifico è il DNA.

I vantaggi offerti dall'analisi del DNA sono numerosi :

- 1) È molto stabile, e si conserva in modo sostanzialmente inalterato anche in campioni essiccati ; con qualche difficoltà, il DNA è stato estratto ed analizzato anche da campioni d'erbario vecchi di decenni.
- 2) L'estrazione da tessuti vegetali è relativamente semplice, e comunque molto meno problematica di quel che non sia l'estrazione di proteine.
- 3) L'analisi richiede una quantità molto piccola di DNA (e quindi un pezzetto minuscolo di tessuto). Questa caratteristica deriva dal fatto che sono state messe a punto tecniche di "amplificazione" (PCR = Polymer Chain Reaction) che, partendo da una quantità assolutamente esigua di "DNA - stampo", permettono di produrre una grande quantità di DNA uguale all'originale. Questa proprietà è particolarmente importante quando si debba lavorare su campioni di piccole dimensioni, su specie rare, ed in genere su campioni di elevato valore che non devono essere danneggiati.
- 4) Esistono nel genoma settori di DNA molto conservativi (principalmente settori vincolati a particolari funzioni e quindi praticamente invariati), come pure settori altamente variabili (ad esempio, settori di DNA non codificante). Di conseguenza, a seconda del problema da trattare, e del livello tassonomico delle entità da comparare, si impiegheranno segmenti diversi, un po' come al microscopio si usano obiettivi a diverso ingrandimento a seconda delle dimensioni dell'oggetto da osservare.

2.3.2. Metodi e tecniche

La trattazione di questo argomento è necessariamente molto succinta. Per trovare un'esposizione completa delle basi metodologiche si può vedere, ad esempio, Crawford (1990).

Le tecniche di analisi degli acidi nucleici sono piuttosto complesse, ed accenneremo qui soltanto alle linee generali.

Il DNA deve anzitutto venire estratto e purificato, e la tecnica sarà diversa a seconda che si operi sul genoma nucleare, su quello plastidiale o su quello mitocondriale.

Si procede poi alla selezione ed all'amplificazione di un settore del DNA (vedi scheda).

A questo scopo si può procedere (a) alla ricerca selettiva di un settore noto (ad esempio un gene, uno spaziatore intergenico, un tratto microsatellitare) ed alla sua amplificazione, oppure (b) all'amplificazione di segmenti campionati in modo casuale, identificati per la loro contiguità con una determinata sequenza di basi (RAPDs = Random Amplified Polymorphic DNA, AFLP= Amplified Fragment Length Polymorphism).

~~Il segmento di DNA amplificato potrà poi venire digerito per mezzo di enzimi di restrizione, che sono particolari DNAasi che riconoscono ciascuno una determinata sequenza, e tagliano il DNA in corrispondenza di questa.~~

Nel caso dei RAPDs, e dei frammenti generati da enzimi di restrizione, la forma più consueta di analisi è l'elettroforesi, che permette di separare i frammenti ottenuti in base al loro peso molecolare (cioè in base al numero di paia di basi che li costituiscono).

Se il settore di DNA analizzato è sufficientemente variabile, lo spettro di frammenti riconosciuti ("DNA fingerprint") permette di distinguere gli individui l'uno dall'altro, e quindi di compiere analisi di diversità genetica non solo nell'ambito di specie ma anche all'interno di popolazioni.

Se invece la tecnica prescelta è quella dell'isolamento ed analisi di un frammento noto (un gene, od uno spaziatore intergenico, una sequenza microsatellitare) il metodo d'elezione è il sequenziamento, oggi reso possibile e veloce grazie ad apparecchiature automatizzate alquanto efficienti.

La lettura della sequenza di un segmento di DNA permette di paragonare specie e generi diversi, ed è particolarmente utile al fine di studi sistematici e filogenetici.

Le sequenze ottenute vengono analizzate per mezzo di tecniche cladistiche, che permettono di formulare ipotesi filogenetiche.

Le sequenze vengono depositate in banche dati ("gene bank") liberamente accessibili in rete: quindi, ottenuta una o più sequenze, queste potranno essere paragonate con sequenze già ottenute da altri autori.

Un esempio di applicazione su vasta scala dell'informazione molecolare si trova nel recente trattato di Botanica Sistemica di Judd & al.(1999).

SCHEDA

In che modo da una quantità minuscola di materiale vegetale si può ottenere molto DNA?

Il processo, chiamato di "amplificazione", procede come segue.

1. Si preleva un piccolo frammento da un campione d'erbario (p.es. 0.5 cm² di lamina fogliare)
2. Il frammento è tritato e posto in un opportuno mezzo per l'estrazione del DNA. La tecnica è diversa, a seconda che si voglia estrarre DNA nucleare, plastidiale o mitocondriale.
3. Il DNA estratto è posto in una soluzione, in presenza di una miscela di nucleotidi liberi, di una DNA polimerasi, e di una coppia di oligonucleotidi sintetici ("primers"). I primers riconoscono una sequenza di DNA ad essi omologa e le si appaiano. Partendo dai primers, la DNA polimerasi, utilizzando i nucleotidi liberi, sintetizza una catena di DNA complementare al segmento che è stato marcato, il quale funge da "stampo".

4. Un innalzamento della temperatura denatura il DNA, distaccando la catena di DNA di nuova sintesi dalla catena di DNA "stampo".

5. La temperatura viene nuovamente abbassata: i primers si associano nuovamente alle sequenze omologhe del DNA (sia quello dello "stampo" originario, sia quello appena sintetizzato nella fase precedente), ed ha luogo una nuova sintesi di DNA ad opera della polimerasi.

6. Le fasi 4 e 5 vengono ripetute molte volte: ogni volta raddoppia il numero di frammenti di DNA di nuova sintesi, la cui sequenza corrisponde a quella originariamente marcata.

Questo processo, detto PCR (Polymerase Chain Reaction) consente di "amplificare" il DNA, cioè di ottenere una quantità virtualmente illimitata di frammenti di una determinata sequenza, a partire da una quantità infinitesima.

Benché si tratti di una tecnica piuttosto sofisticata, le apparecchiature altamente automatizzate disponibili in tutti i laboratori di sistematica molecolare permettono di compiere l'intero ciclo in tempi brevi, con un'alta resa e con risultati ripetibili.

3. Potenzialità e limiti inerenti all'impiego di campioni di erbario per analisi molecolari.

Abbiamo visto che il principale impiego di campioni di erbario ai fini di studi di sistematica molecolare riguarda l'estrazione di DNA.

A questo fine, bisognerà tenere presenti alcuni limiti oggettivi, che ne sconsigliano un uso illimitato.

In primo luogo, la quantità di DNA estraibile da essiccata è sempre molto minore della quantità estraibile da campioni freschi; in secondo luogo, bisogna sempre fare i conti con un certo tasso (non noto) di degradazione; in terzo luogo, il rispetto necessariamente dovuto ai campioni essiccati dovrà indurre a campionare sul numero minimo necessario di esemplari.

Il fatto che il campionamento deva limitarsi a pochissimi esemplari, comporta che sarà sconsigliabile amplificare e sequenziare settori di DNA altamente variabili a livello individuale (ad esempio microsattelliti), ma bisognerà privilegiare piuttosto settori più conservativi.

In via di massima, il ricorso ai campioni di erbario va riservato alle situazioni in cui essi siano insostituibili: situazioni tipiche sono quelle in cui un ricercatore desidera rappresentare nel suo studio tutte le specie di un certo genere, e si scontri con la difficoltà pratica di raggiungere una determinata regione dove vive qualche specie endemica.

Altrettanto interessante è il caso in cui si vogliono caratterizzare dal punto di vista molecolare popolazioni scomparse in natura (ad esempio, a causa di cambiamenti nella destinazione d'uso del suolo), che siano documentate solo da erborizzazioni dei decenni passati.

Viceversa, l'impiego dell'analisi di campioni di erbario per documentare l'evoluzione di una specie nel tempo, è molto suggestivo ma, allo stato attuale, alquanto problematico, per più d'un motivo. Anzitutto, più antico è un campione, più difficile è estrarne quantità apprezzabili di DNA in "buone" condizioni; in secondo luogo, l'evoluzione nel breve intervallo di qualche secolo riguarda prevalentemente frequenze geniche, le quali si rilevano con studi su popolazioni, non su singoli individui. Per questi motivi, la possibilità di studi di impostazione "storica", benché spesso evocata, non ha ancora dato risultati di rilievo. Si tratta certo di una linea di ricerca molto promettente, che avrà probabilmente sviluppi interessanti in futuro ma, allo stato attuale dell'arte, ancora immatura.

4. Compiti e responsabilità del conservatore dell'erbario.

La sistematica molecolare è una disciplina altamente specialistica. Non sempre il sistematico molecolare, che si rivolge ad un erbario per ottenere del materiale per le analisi, ha alle spalle una

formazione tassonomica e possiede la necessaria preparazione e sensibilità in rapporto alla cura richiesta nell'uso dell'erbario. È quindi responsabilità del conservatore preservare l'erbario da possibili danni apportati da campionatori disinvolti o inesperti.

In particolare, il conservatore non dovrebbe mai consentire ad un estraneo di campionare direttamente dai pieghi di erbario. Spetta solo al conservatore il compito di procedere di persona al prelievo dei frammenti da impiegare, accertandosi di non privare l'esemplare di parti essenziali. Tenuto conto che il DNA è il medesimo in tutti i tessuti, non è mai necessario, ed è sempre sconsigliabile, prelevare parti di fiori o di infiorescenze. Parimenti sconsigliabile è il campionamento da scapi, fusti o piccioli fogliari, dove prevalgono gli elementi meccanici ricchi di cellulosa e lignina mentre è scarso il contenuto in DNA. Frammenti di lamine fogliari sono la sorgente migliore, allo scopo di avere il massimo risultato con il minimo danno.

Il campione da cui avviene il prelievo deve (1) essere stato identificato in modo critico, (2) venire contrassegnato, e (3) venire citato con precisione all'atto della pubblicazione dei risultati.

Infine, laddove possibile, si eviterà di campionare da esemplari Tipo, perché si compirebbe un danno inutile: il Tipo è tale per le sue caratteristiche morfologiche, ma non esiste nessun motivo teorico per attribuire particolare importanza alla sequenza del suo DNA (ed esistono invece molte controindicazioni pratiche). Eventuali eccezioni, in casi molto particolari ed eccezionali, andranno esaminate di volta in volta.

Opere citate

CRAWFORD D.J., 1990 - *Plant molecular systematics. Macromolecular approach*. D.Wiley & Sons, New York.

CRONQUIST A., 1968 - *The evolution and classification of flowering plants*. Houghton Mifflin, Boston.

DAHLGREN R.M.T., CLIFFORD H.T., YEO P.F., 1985 - *The families of Monocotyledons*. Springer Verlag, Berlin.

EHRENDORFER F. E DAHLGREN R.M.T. (editors), 1982 - New evidence of relationships and modern systems of classification of the Angiosperms. *Nord. Journ. Bot.* 3 :5-34.

ENGLER A. E PRANTL K., 1888 - *Die natürlichen Pflanzenfamilien*, 3,2. Verlag W.Engelmann, Leipzig.

JUDD W.S., CAMPBELL C.S., KELLOGG E.A., STEVENS P.F., 1999 - *Plant Systematics - A Phylogenetic Approach*. Sinauer Associates, Sutherland, Mass. **Versione italiana : Botanica Sistemica - un approccio filogenetico**. Piccin, Padova, 2002.