

Il gruppo di *Flow Cytometry in Genomics and the Environment* in Casaccia

M. Iannetta

Le capacità analitiche e preparatorie della citometria a flusso erano già chiare in ENEA grazie al lavoro pionieristico di Francesco Mauro, Marcello Spanò ed altri colleghi, che in questo settore di ricerca sin dalla fine degli anni '70 avevano creato in ENEA un punto di riferimento nazionale, grazie all'installazione dei migliori strumenti dell'epoca ed a una base scientifico-tecnologica multidisciplinare unica, derivata dell'impianto tecnologico nucleare, allora necessaria per utilizzare al meglio una tecnologia complessa come la citofluorimetria a flusso.

In questo contesto avanzato, le attività di citometria a flusso in pianta e organismi non animali nascono in Casaccia alla fine degli anni '80.

Il primo rationale per applicare la citofluorimetria a flusso su cellule vegetali fu la comprensione dei vantaggi sia scientifici che pratici che potevano derivare dall'applicazione della citofluorimetria alle cellule vegetali, che in condizioni sperimentali controllate, davano luogo al fenomeno della totipotenza, ossia erano in grado di rigenerare un organismo completo e identico a quello di partenza partendo da una cellula differenziata di un qualsiasi organo della pianta. Questa capacità *in vitro* dei vegetali era già nota durante gli anni '20-'30 (Haberland) e rendeva quindi disponibile ai ricercatori un materiale sperimentale estremamente plastico ed in grado di fissare eventuali alterazioni indotte sul patrimonio genetico andandone a verificare gli effetti direttamente nella pianta completa rigenerata, come dimostrato alla fine degli anni '50 in sospensioni cellulari di carota (Steward). Le cellule staminali animali, ad oggi, non si sono dimostrate così plastiche e totipotenti come quelle vegetali, ed esperimenti sempre più al limite delle conoscenze, e dell'etica scientifica, stanno comunque cercando di replicare in umano le capacità rigenerative degli "esseri verdi".

Nel 1989 fu installato in Casaccia il primo citofluorimetro a flusso e cell sorter a doppio laser italiano, uno dei pochi al mondo, completamente dedicato ad applicazioni biotecnologiche vegetali.

Con esso furono sviluppate metodologie per consentire non solo l'analisi di nuclei e cromosomi, ma anche di alghe, protoplasti e micro-aggregati cellulari (microcalli) e polline, sviluppando di concerto con la Becton Dickinson adattamenti strumentali che ampliarono il range dimensionale (0,5 - 100µm) di particelle analizzabili e ne consentissero l'analisi e la separazione.

Furono anni di grande attività e collaborazione con esperti soprattutto esteri, come Andrew Lister, Jaroslav Dolezel e David Galbraith, collaborazioni che continuano ancor oggi quando la citofluorimetria a flusso sta finalmente adempiendo a quelle promesse di versatilità e capacità analitiche multiparametriche ad alta processività nel campo biotecnologico, microbiologico e ambientale, come sarà dato ampio cenno oggi nelle relazioni che andremo ad ascoltare.

In particolare, il gruppo di citofluorimetria a flusso del Laboratorio Biotecnologie ha contribuito allo sviluppo di una branca della citofluorimetria denominata *flow molecular cytogenetics* fondata sull'utilizzo della metodologia FISHIS (Fluorescent in situ Hybridization

in suspension) sviluppata presso la Casaccia che sta consentendo l'applicazione degli strumenti di fine caratterizzazione del DNA con marcature molecolari in ambito citofluorimetrico con la possibilità di separare specifiche componenti cellulari in base alle caratteristiche molecolari costitutive.

Alla luce della rivoluzione metodologica generata dalla disponibilità di tecniche analitiche su singola cellula la capacità unica ed esclusiva della citofluorimetria a flusso e *cell sorting* di individuare e selezionare separatamente singole cellule ed elementi cellulari per manipolazioni successive, rende questa tecnica sempre più attuale e di valore assoluto per il progredire delle conoscenze in ambito biologico. Un esempio concreto di applicazione è già evidente nell'esplorazione del patrimonio di biodiversità presente nelle popolazioni cellulari, come quelle tumorali o quelle presenti in fioriture algali complesse, o nell'analisi di singoli cromosomi in sospensione.

L'ENEA ha ricominciato recentemente ad investire in questo settore, con nuova strumentazione e risorse di personale, per costituire una *facility* che metta a disposizione della comunità scientifica ed imprenditoriale una risorsa in grado di fornire risposte alle crescenti necessità di innovazione e sostenibilità in campo biotec e agroalimentare.

Il contributo principale del gruppo di citofluorimetria del Laboratorio di Biotecnologie Verdi ha fornito le basi per ***l'approccio cromosomico alla genomica***:

1992: sviluppo di una efficiente metodologia di isolamento cromosomi in sospensione

1993: primo isolamento di tutti i cromosomi di una pianta con cariotipo complesso (*V. faba*, cariotipo ricostruito)

1997: primo isolamento di cromosomi di pianta tramite colorazione differenziale AT/CG

1999: prima analisi del ciclo cellulare vegetale con precursori del DNA fluorescenti

2013: sviluppo della FISH in sospensione e prima analisi e separazione di tutti i cromosomi di una pianta "non modello", grano duro e grano tenero

- 1992: sviluppo di una efficiente metodologia di isolamento cromosomi in sospensione - Dolezel, J., Cihalikova, J. and Lucretti, S. "A high-yield procedure for isolation of metaphase chromosomes from root tips of *Vicia faba* L." *Planta*(1992) , 188:93-98.
- 1993: primo isolamento di tutti i cromosomi di una pianta di interesse (*V.faba*. linea traslocata) - Lucretti, S. Dolezel, J., Schubert, I., and J.Fuchs "Flow-karyotyping and sorting of *Vicia faba* chromosomes" *Theor.Appl.Genet.*(1993) 85:665-672.
- 1997: primo isolamento di cromosomi di pianta tramite colorazione differenziale AT/CG -Lucretti, S., Dolezel, J. (1997). Bivariate flow-karyotyping in broad bean (*Vicia faba*). *Cytometry*: 28 (3), 236-242.
- 1999: prima analisi del ciclo cellulare vegetale con precursori del DNA fluorescenti - Lucretti, S., Nardi, L., Trionfetti Nisini, P., Moretti, F., Gualberti, G., Dolezel, J. Bivariate flow cytometry DNA/BrdUrd analysis of plant cell cycle. *Methods in Cell Science – Special issue on Synchronization in Plant Systems*. Ed. S.H. Sharma, Vol. 21, 155-166 (1999)
- 2013: sviluppo della prima marcatura molecolare in sospensione FISH e prima analisi e separazione di tutti i cromosomi di una pianta "non modello" - Giorgi D, Farina A, Grosso V, Gennaro A, Ceoloni C, Lucretti S.(2013) FISHIS: Fluorescence In Situ Hybridization in Suspension and Chromosome Flow Sorting Made Easy. *PLoS ONE* 8.