

L'eterosi nelle piante:

dall'ipotesi genetica di Jones all'era genomica

Parte 2^a

Gianni Barcaccia*, Silvia Lorenzetti** e Mario Falcinelli**

Blocchi cromosomici e basi genetiche dell'eterosi

Le azioni e le interazioni dei geni associati nei blocchi cromosomici possono spiegare l'eterosi dei diploidi, l'eterosi fissata negli allopoliploidi di specie autogame, nonché l'eterosi progressiva negli autoploiploidi di specie allogame.

L'ipotesi formulata da Alfred H. Sturtevant e Thomas H. Morgan agli inizi del secolo scorso, secondo cui i *crossing-over* avvengono in siti casuali lungo i cromosomi, attualmente viene considerata valida solo parzialmente. Sono stati infatti acquisiti moltissimi dati, per lo più in organismi modello di funghi, piante, insetti e mammiferi, che dimostrano l'esistenza nei cromosomi di *hot spots*, cioè di siti caldi di ricombinazione corrispondenti a regioni caratterizzate da frequenze di *crossing-over* nettamente più alte rispetto a quelle di altre regioni (Lichten e Goldman, 1995; Schnable *et al.*, 1998; Allers e Lichten, 2001; Petes, 2001; Steiner e Smith, 2005).

In linea generale, la dimensione dei cromosomi riflette comunque la frequenza dei *crossing-over* che possono verificarsi. La relazione tra la frequenza media di ricombinazione e la distanza genetica tra loci lungo il cromosoma, così come la

relazione tra la frequenza media dei chiasmi e la dimensione genetica dei cromosomi, consentono di derivare la lunghezza complessiva delle mappe genetiche (**Tabella 1**). Benché queste relazioni risultino piuttosto affidabili, in un genoma esistono in realtà regioni cromosomiche più frequentemente soggette di altre all'insorgenza di *crossing-over* che condizionano negativamente la corrispondenza tra una mappa genetica e quella fi-

evidenziata per la prima volta nel 1992 quando venne completato il sequenziamento di uno dei 17 cromosomi del corredo di base del lievito di birra (*Saccharomyces cerevisiae*). Il confronto tra la mappa fisica così ottenuta e quella genetica precedentemente determinata consentì di svelare discrepanze considerevoli relativamente alle distanze reciproche tra loci nonché differenze riconducibili a geni posizionati in maniera errata. In ef-

Tabella 1 – Frequenza degli eventi di ricombinazione e lunghezza stimata dei cromosomi di riso.

Cromosoma	Eventi di ricombinazione		Lunghezza (cm)
	Media	Varianza	
1	3,56	2,64	182
2	3,01	1,89	155
3	3,25	2,17	167
4	2,49	1,43	130
5	2,31	1,61	120
6	2,40	1,58	125
7	2,30	1,16	117
8	2,32	1,17	119
9	1,76	0,94	96
10	1,62	0,94	83
11	2,31	1,38	119
12	2,06	1,00	110
Totale	29,43	23,87	1.522

sica (Puchta e Hohn, 1996; Rafalski e Morgante, 2004). Conseguentemente, le distanze genetiche, misurate in cM (unità di ricombinazione), non sempre corrispondono con precisione alle distanze fisiche, misurate invece in Mb (milioni di paia di basi). L'accuratezza limitata delle mappe genetiche fu

fatti, in tutte le specie le estremità dei cromosomi – telomeri – così come le regioni adiacenti al centromero sono di regola meno interessate da eventi di scambio rispetto ad altre regioni sparse lungo i bracci cromosomici. In una mappa genetica le regioni fisiche meno interessate dalla ricombina-

*Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali - Università degli Studi di Padova

**Dipartimento di Biologia Vegetale e Biotecnologie Agroambientali e Zootecniche - Università degli Studi di Perugia

zione risultano compresse, mentre quelle maggiormente coinvolte da eventi di ricombinazione appaiono espanse. Comunque, anche se la relazione tra mappa fisica e mappa genetica dei cromosomi non può ritenersi uniforme, le mappe genetiche e quelle fisiche di un cromosoma sono generalmente colineari, nel senso che i loci conservano lo stesso ordine. Il recente sequenziamento di interi genomi vegetali, oltre a quelli di *Arabidopsis* e riso, consentirà di acquisire informazioni di rilievo anche sulla sintenia tra mappe di specie diverse. Ciò significa che, oltre all'ordine dei geni, potrà essere analizzata anche la composizione dei geni lungo i cromosomi e nell'ambito dei genomi.

Nel genoma dei lieviti e dei mammiferi, ma anche in quello di alcune piante, come ad esempio il mais, è stata dimostrata l'esistenza di particolari elementi genetici, detti *cis-* e *trans-genetic modifiers* (Guo e Birchler, 1996; Petes, 2001; Yao *et al.*, 2002), in grado di regolare gli eventi di ricombinazione meiotica. In aggiunta a specifiche sequenze riscontrate in fase di associazione *cis* all'interno o nelle vicinanze dei punti caldi di ricombinazione, corrispondenti ad elementi di regolazione del *crossing-over*, sono state individuate anche sequenze polimorfiche dislocate in fase di associazione *trans* e dovute a riarrangiamenti consistenti come delezioni, inserzioni e traslocazio-

ni (Modrich e Lahue, 1996; Schnable *et al.*, 1998) oppure a cambiamenti riguardanti la struttura della cromatina (Rhoades, 1978; Robertson, 1984). Entrambi i tipi di fattori "modificatori" condizionano sia il grado di ricombinazione per unità di lunghezza fisica dei cromosomi che la distribuzione dei siti di ricombinazione nei singoli cromosomi (Yao *et al.*, 2002). In mais, Timmermans *et al.* (1997) hanno riscontrato la presenza di un elemento genetico, probabilmente un trasposone, nella regione compresa tra i loci *sh1* e *bz1*, che determina localmente un aumento degli eventi di ricombinazione. Sempre in mais è stato, inoltre, dimostrato che l'inserzione di trasposoni non autonomi nei loci *a1* e *bz1* è in grado di sopprimere totalmente gli eventi di ricombinazione (Dooner e Martinez-Ferez, 1997; Dooner, 2002). L'esistenza di siti preferenziali di ricombinazione in questa specie è stata recentemente confermata analizzando gli eventi di ricombinazione nella regione compresa tra i loci *a1* e *sh2* (Yao e Schnable, 2005).

Il fatto che i processi di *crossing-over* non coinvolgano regioni casuali lungo i cromosomi, ma che invece esistano siti preferenziali per la formazione dei chiasmi e per lo scambio di parti corrispondenti tra cromatidi di cromosomi omologhi ha dato concretezza all'ipotesi avanzata qualche decennio fa che l'eredità dipenda dalla ricombinazione di "blocchi cromosomici" (*chromosome blocks*) e non dalla ricombinazione di singoli geni.

Nelle specie a riproduzione sessuale i blocchi cromosomici rappresenterebbero le unità genomiche della trasmissione ereditaria. L'attività di miglioramento genetico agirebbe pertanto non sui singoli geni quanto invece sui blocchi cromosomici, intesi come complessi di geni associati nei segmenti risultanti dal *crossing-over*

(Bingham, 1998). Secondo tale interpretazione ogni cromosoma *crossover* sarebbe costituito dalla successione di blocchi di origine materna e paterna, il cui numero dipende dagli eventi di scambio verificatisi tra omologhi durante la meiosi. Nei blocchi cromosomici si possono trovare associati geni che controllano caratteri qualitativi e complessi di poligeni per caratteri quantitativi (QTL, *quantitative trait loci*). Il miglioramento dei caratteri complessi, controllati da molti geni, implica che con la selezione è necessario agire contemporaneamente su più blocchi cromosomici. Anche quando si è interessati all'introgresione di caratteri controllati da un singolo gene ciò che viene trasmesso è in realtà un blocco cromosomico più o meno esteso. Normalmente, di tale tratto cromosomico non si conosce la quantità di materiale genetico indesiderato che risulta associato col gene di interesse e che il miglioratore si porta necessariamente dietro (situazione nota come *linkage drag*).

Il numero di blocchi cromosomici di un organismo varia in funzione del numero delle coppie di cromosomi e della frequenza con la quale interviene lo scambio. Entrambi i fattori dipendono dalla specie, ma è verosimile che il numero dei blocchi cromosomici sia piuttosto limitato in ogni genoma. In generale, la ricombinazione dei geni associati si considera esplicita con uno o due eventi di scambio (*crossing-over*) conseguenti alla formazione di altrettanti chiasmi tra cromosomi di una coppia di omologhi. Poiché le posizioni interessate dal *crossing-over* possono variare in ciascuna meiosi, anche le associazioni geniche possono risultare diverse, ma ciò non influenza il numero complessivo di blocchi cromosomici che risulterà simile in tutti i gameti prodotti.

Nelle linee pure omozigoti a tutti i loci così come nelle linee inbred,

Tabella 2 – Numero di chiasmi osservati a livello citologico e di scambi totali determinati a livello molecolare, e numero medio di blocchi per ciascuno dei cromosomi del complemento aploide.

Specie	No. di chiasmi (intervallo)	Crossover	
		Totale	Medio
<i>Brassica oleracea</i>	10,0-18,5	29,6	3,3
<i>Hordeum vulgare</i>	13,5-15,6	22,7	3,2
<i>Lactuca sativa</i>	14,6-20,7	28,1	3,1
<i>Lycopersicon esculentum</i>	16,2-17,0	25,5	2,2
<i>Oryza sativa</i>	18,9-27,6	36,7	3,1
<i>Pisum sativum</i>	10,3-18,1	29,3	2,4
<i>Solanum tuberosum</i>	13,2-14,1	20,7	1,7
<i>Zea mays</i>	17,4-25,0	35,8	3,6

la posizione del *crossing-over* non ha alcun effetto sulle associazioni tra geni e neanche sulle combinazioni di geni nei gameti. Nei materiali eterozigoti, invece, sia l'ordine dei geni nei gruppi di associazione che la composizione in alleli nei gameti risultano influenzati dalla posizione del *crossing-over*. Da un punto di vista pratico è importante conoscere quanti sono i blocchi cromosomici sui quali è possibile agire mediante la selezione nel corso di un programma di miglioramento genetico.

In mais ($2n=2x=20$), assumendo due *crossing-over* e quindi tre scambi tra cromosomi di una coppia di omologhi si avrebbero 30 unità di trasmissione genetica per gamete, cioè 3 blocchi per ciascuno dei 10 cromosomi del complemento aploide. In erba medica ($2n=4x=32$), assumendo un *crossing-over*, vale a dire due scambi, per coppia di cromosomi omologhi si avrebbero 2 blocchi per ciascuno dei 16 cromosomi del complemento aploide pari a 32 unità di trasmissione genetica per gamete. In **Tabella 2** è riportata la frequenza degli eventi di ricombinazione, in termini di numero di chiasmi, per alcune delle più importanti specie di interesse agrario. Bisogna comunque considerare che il numero esatto di blocchi cromosomici non è molto importante poiché in ogni caso il numero delle unità di trasmissione genetica è molto piccolo rispetto al

numero di geni presenti nel genoma di una specie (mediamente 30-40 mila).

I blocchi cromosomici influenzano la manifestazione dell'eterosi, condizionando l'azione e l'interazione genica. Nel 1917, Jones fu il primo ad ipotizzare e riconoscere il ruolo dei blocchi cromosomici, proponendo la teoria della dominanza di fattori associati per spiegare il fenomeno eterotico. In termini genetici, tale situazione si basa sull'effetto cumulativo di geni dominanti associati in blocchi cromosomici. Negli anni che seguirono si ebbe un acceso dibattito circa il tipo di azione genica ed il fenomeno eterotico venne da molti ritenuto espressione di vera e propria sovradominanza. Secondo questa teoria, l'azione genica ai singoli loci è tale che il fenotipo degli eterozigoti risulti superiore a quello di entrambi gli omozigoti. Le azioni geniche di tipo additivo, dominante e sovradominante con riferimento ad un ipotetico locus biallelico sono riassunte in **Figura 1**.

Una importante considerazione da fare affrontando il tema delle azioni geniche è quella che un allele avente dominanza completa a volte possiede anche un effetto additivo rispetto a quello recessivo (cioè il valore fenotipico dell'allele recessivo non sempre è nullo). Inoltre, gli effetti di più alleli di loci diversi ma responsabili del controllo di uno stesso carattere quan-

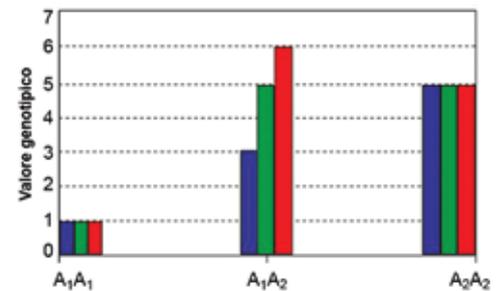


Figura 1 – Valori genotipici ad un locus teorico avente alleli A1 e A2 con azione genica additiva (-), dominante (-) e sovradominante (-).

titativo sono cumulativi a livello fenotipico. Sulla base di queste considerazioni, nel 1988 Hallauer e Miranda affermarono che "l'eterosi è dovuta agli effetti cumulativi di alleli favorevoli aventi dominanza parziale o completa".

Per la comprensione degli effetti genetici connessi ai blocchi cromosomici sono importanti i concetti di equilibrio genetico e equilibrio gametico ai quali sono legati l'equilibrio delle frequenze alleliche e l'equilibrio delle fasi gametiche.

L'equilibrio genetico, secondo la legge di Hardy-Weinberg, si ha quando in una popolazione numerosa le frequenze relative degli alleli ad un dato locus rimangono costanti nel corso delle generazioni e questo si realizza in assenza di fattori di disturbo (selezione, mutazione, migrazione) ed in presenza di unioni casuali. Nelle specie diploidi, così come in quelle allopoliploidi (organismi ad eredità disomica), l'equilibrio genotipico è viene raggiunto con una sola generazione di unioni casuali, vale a dire nella discendenza F₂ di un ibrido oppure nella generazione *Syn1* di una sintetica. L'equilibrio gametico, spesso indicato anche come equilibrio delle fasi gametiche, corrisponde invece ad una situazione di combinazione casuale nei gameti tra alleli di geni a loci diversi. Considerando due coppie alleliche e assumendo che le singole forme alleliche siano selettiva-

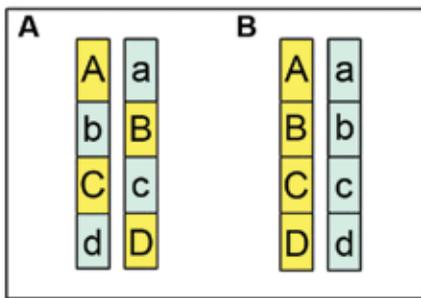


Figura 2 – Modelli teorici semplificati dei blocchi cromosomici associati in fase trans (A) ed in fase cis (B).

mente neutrali, cioè non esercitano alcuna influenza sulla *fitness* degli individui che compongono la popolazione, all'equilibrio si formeranno quattro tipi di gameti con uguale frequenza (25%) e le sedici possibili combinazioni genotipiche saranno presenti ciascuna con frequenza pari a 6,25%. L'equilibrio viene pertanto raggiunto quando i gameti si formano dalla combinazione casuale degli alleli e i genotipi derivano dall'unione casuale dei gameti. In presenza di segregazione indipendente, in un diibrido $AaBb$ i quattro tipi possibili di gameti AB , Ab , aB e ab si formeranno in proporzioni uguali fin dalla prima generazione, ma con i geni associati in fase *cis* (AB/ab) nelle prime generazioni dopo l'incrocio prevarranno i gameti AB e ab , così come nel caso di geni associati in fase *trans* (Ab/aB) prevarranno i gameti Ab e aB . Per alcune generazioni dopo l'incrocio, per effetto dell'associazione i quattro tipi di gameti possibili non si formeranno in proporzioni uguali ma prevarranno quelli parentali determinando quella situazione nota come disequilibrio di associazione. Pertanto se le due coppie alleliche sono associate, l'avvicinamento alla condizione di equilibrio è graduale. In alcuni casi può richiedere anche parecchie generazioni e, comunque, la velocità con cui viene raggiunto è funzione della frequenza di ricombinazione tra i due geni: maggiore è la distanza

tra due geni lungo il cromosoma e minore è il numero di generazioni richieste per raggiungere l'equilibrio. I geni localizzati nei blocchi cromosomici sono in una situazione di disequilibrio di associazione nelle prime generazioni segreganti: l'equilibrio di associazione è raggiunto all'incirca in F8, allo stato pratico, e in F16, a quello teorico (Gardner e Lonquist, 1959; Lonquist, 1980; Crow, 1993). Nelle specie autoploiploidi (organismi ad eredità polisomica), come erba medica e patata, l'equilibrio genotipico viene raggiunto in maniera asintotica approssimativamente alla generazione F12. L'equilibrio gametico è, invece, una situazione teorica poiché richiederebbe parecchie generazioni, molte più di quelle praticamente possibili nella maggior parte dei programmi di miglioramento genetico (Bingham, 1998).

Da un punto di vista storico, i blocchi cromosomici sono stati definiti anche in altro modo, come ad esempio "*effective factors*" da K. Mather e "*linkats*" da Y. Demarly. Il termine *effective factor* è generalmente usato in mais quando viene stimato il numero effettivo di fattori genetici che controllano un dato carattere. In erba medica, invece, è stato adottato il termine *linkat* per la descrizione delle azioni geniche nei blocchi cromosomici.

I modelli teorici dei blocchi cromosomici composti di loci associati con geni che manifestano dominanza e recessività sono riassunti schematicamente in **Figura 2**. In particolare, si possono riscontrare due distinte situazioni: associazioni in fase *cis* (o di appaiamento) e in fase *trans* (o di repulsione). Tali situazioni sono spesso riferite in letteratura come disequilibrio di associazione (LD, *linkage disequilibrium*) oppure pseudo-sovradominanza (POD, *pseudo-overdominance*). In entrambi i tipi di associazione, gli alleli dominanti ai diversi loci complementano tra

loro mascherando quelli recessivi nei loci corrispondenti. Questa azione genica complementare è una interazione genica di tipo non-allelico ed è quindi riconducibile all'epistasia.

Basi genetiche dell'eterosi: teorie della dominanza e della sovradominanza

Il termine "eterosi" è stato usato per la prima volta da George H. Shull nel 1916 come sinonimo di vigore ibrido, senza però fare riferimento ad alcun meccanismo in particolare. Ancora oggi l'eterosi è considerato il fenomeno biologico più straordinario esistente in natura sfruttato da oltre mezzo secolo senza conoscerne le basi genetico-molecolari.

Le basi genetiche dell'eterosi sono state oggetto di ampia discussione fin dai tempi delle prime osservazioni sui mais (Shull, 1908; Bruce, 1910; Jones, 1917). Le evidenze sperimentali disponibili a quel tempo per formulare ipotesi genetiche erano sostanzialmente due: i) l'eterosi si manifesta come vigore ibrido in conseguenza dell'unione tra individui geneticamente diversi; ii) l'ibrido F1 risultante dall'incrocio tra individui omozigoti per alleli diversi evidenzia a livello fenotipico una media superiore a quella calcolata tra le due linee parentali o uguale alla media della migliore linea parentale (dominanza parziale o completa), e in qualche caso addirittura superiore alla media della migliore linea parentale (sovradominanza).

Già allora per spiegare l'eterosi furono avanzate due teorie basate su ipotesi contrapposte. Dapprima East nel 1908 e Shull nel 1912 ritennero che germoplasma geneticamente differenziato potesse determinare uno "stimolo fisiologico allo sviluppo tanto maggiore quanto più diversi sono i gameti coinvolti nella fecondazione". Secondo questa interpreta-

zione, nota come ipotesi o teoria della sovradominanza, l'eterosi è connessa con la quota di eterozigosi dell'individuo ibrido che determina un vantaggio rispetto ad entrambi gli omozigoti. Alternativamente, l'eterosi venne considerata la conseguenza del mascheramento di alleli recessivi deleteri trasmessi da uno dei parentali da parte delle forme dominanti, sia a livello parziale che totale, trasmesse dall'altro parentale dell'incrocio. Questa interpretazione, nota come ipotesi o teoria della dominanza, è stata formulata da Bruce nel 1910, con l'affermazione che "gli effetti di geni recessivi deleteri tendono ad essere annullati dalla dominanza negli eterozigoti", anche se Keeble e Pellew, sempre nel 1910, sono stati in realtà i primi a parlare esplicitamente di ipotesi della dominanza.

Da un punto di vista storico, la tendenza costante è stata quella di attribuire il vigore eterotico che si manifesta nella progenie ibrida all'eterozigosi e quindi alle differenze nella composizione allelica tra i genotipi omozigoti delle linee parentali. Ancora oggi l'eterosi viene ritenuta un fenomeno biologico estremamente complesso e difficile da spiegare in termini genetico-molecolari, soprattutto a causa della sua natura multigenica. Le teorie classiche di genetica quantitativa formulate attorno ai concetti di dominanza e sovradominanza sono state riesaminate ed affinate da Crow (1948) e da Dobzhansky (1952) verso la metà del secolo scorso.

Secondo l'ipotesi originale della dominanza, l'eterosi si manifesta quando nell'ibrido, ad una serie di loci, l'allele dominante favorevole trasmesso da una linea parentale maschera quello recessivo sfavorevole trasmesso dall'altra linea parentale. Ciò significa che alcune linee potranno integrarsi molto bene producendo ibridi migliori rispetto alla media delle possibili

combinazioni di incrocio, mentre altre non saranno in grado di complementarsi a causa della sovrapposizione delle loro situazioni alleliche. A sostegno di questa idea c'è l'osservazione che l'eterosi è molto evidente quando si incrociano linee provenienti da popolazioni differenziate e meno evidente quando si incrociano linee imparentate. Secondo l'ipotesi della sovradominanza, l'eterosi è invece attribuibile a particolari interazioni alleliche a singoli loci presenti nell'ibrido e non possibili nelle linee parentali.

Entrambe le ipotesi genetiche consideravano effetti di dominanza, anche se di grado diverso, e non prevedevano effetti additivi. La lunga controversia tra l'ipotesi della dominanza e quella della sovradominanza quale principale spiegazione genetica dell'eterosi è stata molto spesso risolta tenendo conto di entrambe, pesandone l'importanza relativa a seconda del carattere considerato e della specie studiata (Sprague, 1983). In mais, la specie allogama maggiormente studiata per la comprensione dell'eterosi, numerose evidenze sperimentali acquisite in anni recenti da Hallauer e collaboratori indicano che la base genetica dell'eterosi è riconducibile prevalentemente alla complementazione funzionale di alleli con elevati effetti di dominanza. Questo significa che le due linee inbred usate nell'incrocio contengono alleli deleteri ad un certo numero di loci e che nell'ibrido tali alleli vengono complementati da alleli superiori agli stessi loci trasmessi alternativamente dall'una e dall'altra linea parentale.

La teoria della dominanza implica che i geni recessivi siano meno favorevoli di quelli dominanti determinando così effetti negativi nelle linee inbred e il loro mascheramento comporterebbe l'espressione del vigore eterotico negli ibridi. A sostegno di questo modo

di vedere c'è il diverso effetto della selezione naturale e il diverso livello di eterosi che si osserva nelle specie autogame ed in quelle allogame. In tutte le popolazioni sia di specie autogame che allogame, gli alleli deleteri vengono rapidamente eliminati se dominanti. Gli alleli deleteri recessivi, invece, nelle specie autogame vengono eliminati dalle popolazioni perchè raggiungono la condizione omozigote, mentre nelle specie allogame vengono conservati nelle popolazioni in condizione eterozigote. Ciò spiegherebbe perchè l'eterosi, nelle specie autogame, non è un fenomeno così frequente e rilevante come nelle specie allogame.

Una delle prime critiche formulate alla teoria della dominanza sosteneva che in presenza di effetti di dominanza doveva essere possibile ottenere linee omozigoti con alleli dominanti a tutti i loci responsabili dell'eterosi e pertanto tanto vigorose quanto gli ibridi. Oltre al fatto che linee inbred di questo tipo non sono mai state ottenute sperimentalmente, ai sostenitori di tale critica venne anche fatto notare che nel caso di molti geni coinvolti sarebbe risultato teoricamente impossibile accumulare tutte le forme alleliche migliori in una singola linea inbred a causa dell'associazione nei cromosomi di alleli deleteri di alcuni geni con alleli superiori di altri geni. La ricombinazione necessaria per concen-

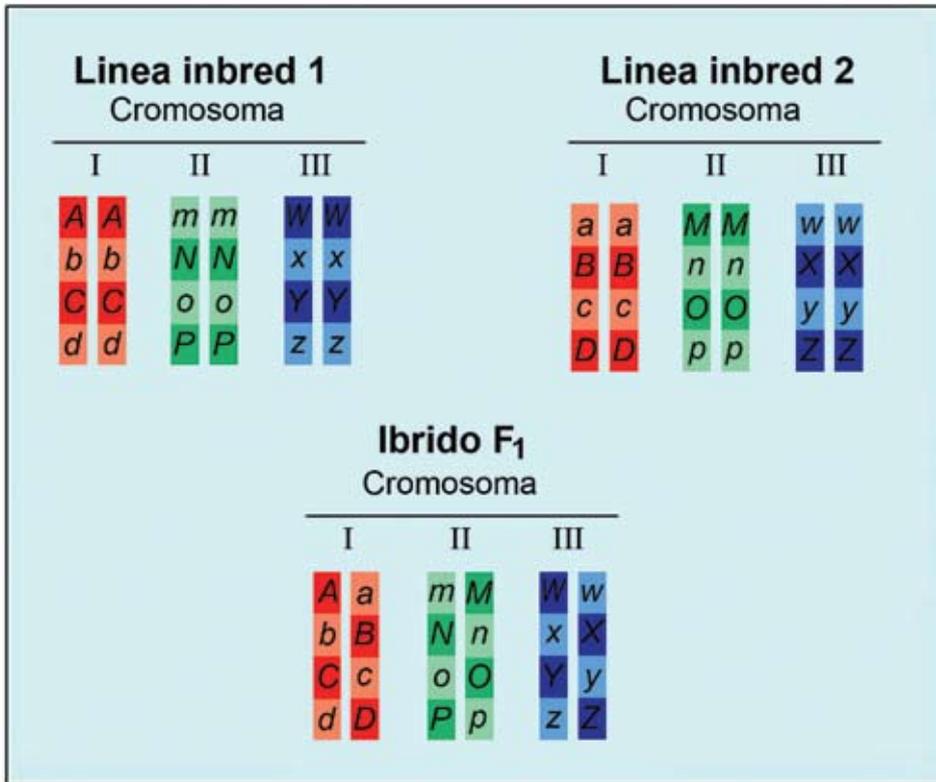


Figura 3 – Modello dei fattori genetici dominanti associati in blocchi cromosomici, secondo D.F. Jones (1917). Una linea inbred avente sei loci omozigoti per alleli dominanti e altrettanti loci omozigoti per alleli recessivi associati tra loro in fase trans quando incrociata con un'altra linea inbred avente agli stessi loci alleli complementari produce un ibrido F₁ con tutti e 12 i loci considerati che presentano alleli dominanti.

trare nei singoli cromosomi tutti gli alleli favorevoli avrebbe infatti richiesto una serie numerosa di *crossing-over*, peraltro non facili da controllare o anche semplicemente da verificare.

Un'altra critica all'ipotesi della dominanza muoveva dalla considerazione che nelle popolazioni F₂ la distribuzione dei genotipi in base al vigore non era distorta come invece atteso per effetto della presenza di $\frac{3}{4}$ di dominanti e di $\frac{1}{4}$ di recessivi.

In risposta alle obiezioni sollevate dalla comunità scientifica, nel 1917 Jones asserì che in presenza di associazione stretta tra geni le due ipotesi non sarebbero tra loro distinguibili, così come nel caso di molti geni coinvolti, anche in assenza di associazione. In altri termini, ciò che è riconducibile alla sovradominanza può in realtà essere un effetto spiegabile anche con la dominanza di geni strettamente associati. La frase "la dominanza di fattori genetici asso-

ciati può spiegare l'eterosi" scritta da Jones quasi un secolo fa si può considerare ancora valida nei contenuti. Il modello di geni associati in blocchi cromosomici postulato da Jones è schematizzato in **Figura 3** assumendo due distinte linee inbred omozigoti per alleli diversi a dodici distinti loci di tre ipotetici cromosomi. In questo modello, ogni cromosoma delle tre coppie di omologhi possiede due loci con alleli dominanti ed altrettanti con alleli recessivi, associati in fase *trans*. Gli alleli ai loci considerati risultano tra loro complementari, nel senso che se in una linea ad un dato locus si ha omozigosi per l'allele dominante, nell'altra linea allo stesso locus si ha omozigosi per l'allele recessivo. L'ibrido F₁ ottenuto dall'incrocio di queste linee inbred mostra così un allele dominante in ciascuno dei loci considerati per un totale di dodici loci aventi alleli dominanti. L'effetto complessivo è che nell'ibrido si hanno alleli dominanti a un nume-

ro di loci che è doppio rispetto a quello si osserva in ciascuna delle linee parentali. Pertanto, anche in presenza di dominanza semplice ai singoli loci, il risultato è che l'ibrido appare superiore a entrambi i genotipi omozigoti di partenza. Il fenomeno per il quale il valore fenotipico dell'eterozigote supera quello di entrambi gli omozigoti a causa della complementazione di alleli recessivi deleteri associati ad alleli dominanti in fase *trans* è stato indicato con il termine di pseudo-sovradominanza (Stuber *et al.*, 1992).

L'ipotesi di Jones è elegante, riconosce l'esistenza di blocchi cromosomici come unità genomica della trasmissione ereditaria ed attribuisce il vigore eterotico all'effetto cumulativo di geni con azione dominante. In tempi recenti è stato dimostrato che il *crossing-over* non è un fenomeno pienamente casuale e che nei cromosomi esistono realmente blocchi delimitati da "punti caldi" caratterizzati da eventi preferenziali di *crossing-over*, dei quali per lungo tempo si è negata l'esistenza.

La semplice complementazione di alleli recessivi e dominanti non dà comunque ragione dei risultati pratici ottenuti fino ad ora. Negli ultimi decenni le linee inbred sono state considerevolmente migliorate e nonostante ciò il grado di manifestazione dell'eterosi non è diminuito ma è lentamente e progressivamente aumentato (East,

1936; Duvick, 1999). Se l'eterosi fosse effettivamente dovuta al mascheramento di alleli deleteri da parte di alleli dominanti, assumendo che nell'arco di oltre mezzo secolo di selezione le linee inbred siano state purificate dalla maggior parte delle forme alleliche negative, l'ammontare assoluto dell'eterosi manifestata dagli ibridi avrebbe dovuto mostrare un certo declino. L'attività di selezione delle linee inbred ha permesso invece un netto incremento del vigore ibrido. In sostanza, il miglioramento genetico delle linee inbred ha aumentato il divario produttivo tra linee inbred e ibridi, anziché diminuirlo come era logico attendersi. L'attenzione dei breeder è rimasta pertanto concentrata nel miglioramento delle linee inbred (Figura 4) e molto meno è stato fatto per incidere direttamente sulle manifestazioni eterotiche. In ogni caso, il valore di due linee inbred non consente di predire il valore dell'ibrido in termini di eterosi poiché questo può essere determinato unicamente valutando le prestazioni del loro prodotto di incrocio. Infatti, solo attraverso l'incrocio semplice è possibile avere indicazioni sull'attitudine alla combinazione specifica (ACS) delle linee inbred. La conoscenza di tale attitudine, che indica il comportamento di un genotipo in una particolare combinazione di incrocio, è fondamentale per la selezione del-

le linee inbred da utilizzare nella costituzione di una varietà ibrida.

Nel complesso, le osservazioni condotte in mais sul miglioramento del vigore ibrido ottenuto nel corso degli anni suggeriscono due possibili interpretazioni genetiche:

1. accumulazione nelle linee inbred di alleli favorevoli ad un certo numero di loci dove risiedono geni fondamentali, non direttamente coinvolti nell'espressione dell'eterosi;
2. sostituzione nelle linee inbred degli alleli deleteri con quelli superiori ai loci che controllano direttamente processi fisiologici alla base dell'eterosi.

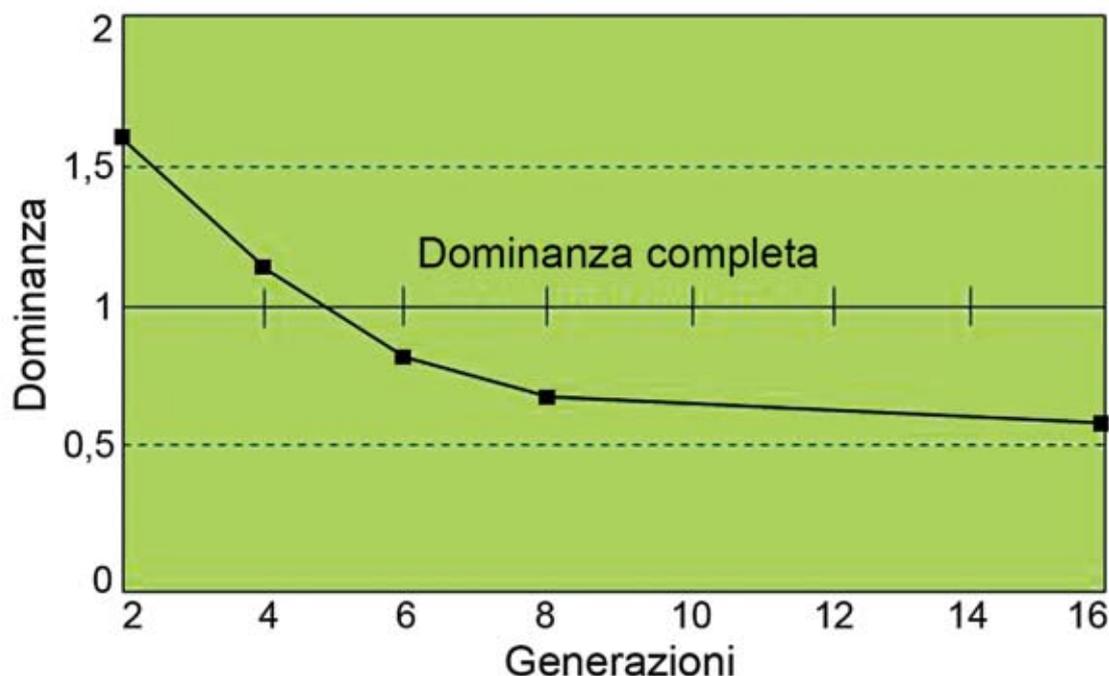
La contrapposizione tra la teoria della dominanza e quella della sovradominanza non è ancora risolta. Molto spesso si parla ancora oggi di sovradominanza ma molti ricercatori hanno messo in evidenza nel mais che le stime della varianza genetica attribuibile alla dominanza che superano quelle teoriche potrebbero essere dovute sia alla sovradominanza che al disequilibrio di associazione di alleli favorevoli in fase *trans* a loci localizzati in blocchi cromosomici (pseudosovradominanza). Il confronto tra i livelli di dominanza stimati in popolazioni F₂, in disequilibrio, con quelli stimati in popolazioni comprese tra la F₈ e la F₁₆, in equi-



Figura 4 – Confronto tra linee inbred di mais selezionate in epoche diverse: al centro (indicate dalla freccia) una vecchia linee inbred, ai lati due linee inbred moderne.

librio, ha evidenziato che l'effetto della dominanza si riduce rapidamente nelle prime generazioni segreganti ed in modo più lento, ma progressivo, avvicinandosi alla situazione di equilibrio gametico. In Figura 5 sono riassunti i risultati che mostrano il decremento delle stime degli effetti di dominanza sulla produzione di granella in mais con l'approssimarsi alla condizione di equilibrio gametico. Tali risulta-

Figura 5 – Risultati relativi al progressivo decremento delle stime degli effetti di dominanza in mais con l'approssimarsi alla condizione di equilibrio gametico (da: Gardner e Lonquist, 1959; Lonquist, 1980; Gardner, 1992). La generazione 0 corrisponde a quella dell'ibrido F₁.



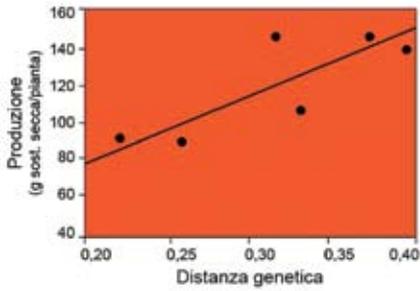


Figura 6 – Relazione esistente tra distanza genetica e produzione di sostanza secca in erba medica tetraploide ($r=0,82^*$, significativo per $P>0,05$).

ti avvalorano l'ipotesi della dominanza, dimostrando che l'eterosi nelle prime generazioni segreganti è verosimilmente dovuta a fattori genetici dominanti in condizione di disequilibrio di associazione.

Nel caso dei poliploidi la situazione emersa è del tutto simile a quella illustrata per i diploidi. L'attenzione dei ricercatori si è concentrata soprattutto sugli autoploidi, in particolare autotetraploidi, anche se sarebbe interessante conoscere l'effetto eterotico di interazioni tra alleli omologhi presenti in genomi differenti degli allopoliploidi (come, ad esempio, il colza, allotetraploide, e il frumento tenero, alloesaploide).

La specie autotetraploide più studiata è l'erba medica (*Medicago sativa* L., $2n=2x=32$). Come tutti i poliploidi ad eredità tetrasomica è caratterizzata dalla possibilità di riunire ad ogni singolo locus fino a quattro differenti forme alleliche (allelismo multiplo) con conseguente aumento del numero di possibili interazioni intralocus e interlocus. In questa specie, l'esistenza dei blocchi cromosomici che includono effetti di dominanza e di epistasia venne postulata nel 1963 da Demarly e successivamente ripresa da Mather (Demarly, 1963; Mather e Jinks, 1973; Demarly, 1979). I dati sperimentali acquisiti suggeriscono che l'eterosi per la produzione di foraggio è attribuibile all'effetto cumulativo di alleli dominanti

localizzati in blocchi cromosomici e che anche le interazioni tra alleli possano avere un certo peso (Bingham *et al.*, 1994; Jones e Bingham, 1995). Kidwell *et al.* (1994) hanno, inoltre, dimostrato che anche in questa specie il vigore ibrido è correlato positivamente con il livello di eterozigosi: la produzione di foraggio in progenie ibride ottenute incrociando linee inbred parziali è risultata infatti associata in modo significativo alla diversità genetica esistente tra le linee parentali (Figura 6). Si ritiene pertanto che per massimizzare il vigore ibrido sia necessario massimizzare il numero degli alleli diversi ad ogni singolo locus, allo scopo di incrementare il numero di interazioni possibili. Da questo punto di vista, la situazione presente negli autotetraploidi è diversa da quella vista per i diploidi. A livello diploide in un certo locus possono essere presenti al massimo due forme alleliche (ad esempio, A_1 e A_2) mentre in un poliploide ad eredità tetrasomica le varianti possibili ad un locus sono più di due: così negli autotetraploidi, che posseggono quattro omologhi per ciascun cromosoma, si possono trovare fino a quattro forme alleliche (ad esempio, $A_1A_2A_3A_4$). Ovviamente accanto a situazioni tetraalleliche si possono avere altri eterozigoti con grado minore di complessità: eterozigoti di tipo diallelico (ad esempio, $A_1A_1A_2A_2$ e $A_1A_2A_2A_2$) o triallelico (ad esempio, $A_1A_1A_2A_3$ e $A_2A_3A_3A_4$), oltre che omozigoti (ad esempio, $A_1A_1A_1A_1$, $A_3A_3A_3A_3$). Quelle riferite sono solo un piccolo campione delle molte combinazioni possibili ai quattro loci e danno luogo ad un altissimo numero di interazioni alleliche. La situazione tetra-allelica determina ad esempio sei interazioni alleliche di primo ordine quali sono quelle tra due alleli (A_1A_2 , A_1A_3 , A_1A_4 , A_2A_3 , A_2A_4 , A_3A_4), quattro di secondo ordine tra tre alleli ($A_1A_2A_3$, $A_1A_2A_4$, $A_1A_3A_4$ e $A_2A_3A_4$) ed una di terzo

ordine tra i quattro alleli ($A_1A_2A_3A_4$) per un totale di ben 11 interazioni alleliche per ogni singolo locus.

Questa complessità dà ragione dei gravi e rapidi effetti dell'autofecondazione, da un lato, e di quel fenomeno particolarmente studiato in erba medica e patata quale è l'eterosi progressiva, dall'altro (Figura 7). L'eterosi progressiva che si osserva in tutti gli autotetraploidi è caratterizzata dal fatto che il massimo vigore ibrido non si ottiene nella generazione F1 perché ma aumenta passando dalle linee parentali agli ibridi semplici e agli ibridi doppi (Busbice e Wilsie, 1966; Levings *et al.*, 1967). In erba medica è stato dimostrato che gli ibridi diallelici *duplex* (ad esempio, $A_1A_1A_2A_2$), ottenuti dall'incrocio tra linee inbred con genotipo *quadruplex-nulliplex* omozigoti per alleli diversi (ad esempio, $A_1A_1A_1A_1$ x $A_2A_2A_2A_2$), manifestano sì eterosi, ma inferiore a quella osservabile incrociando questi ibridi F1 con altri ibridi F1 portatori di altri alleli (ad esempio, $A_3A_3A_4A_4$) che porta all'ottenimento di genotipi triallelici e tetraallelici (Groose *et al.*, 1989; Bingham *et al.*, 1994).

Anche negli alloesaploidi, come ad esempio il frumento tenero (*Triticum aestivum* L., $2n=6x=42$), gli ibridi prodotti incrociando linee pure selezionate da germoplasma diversificato manifestano eterosi

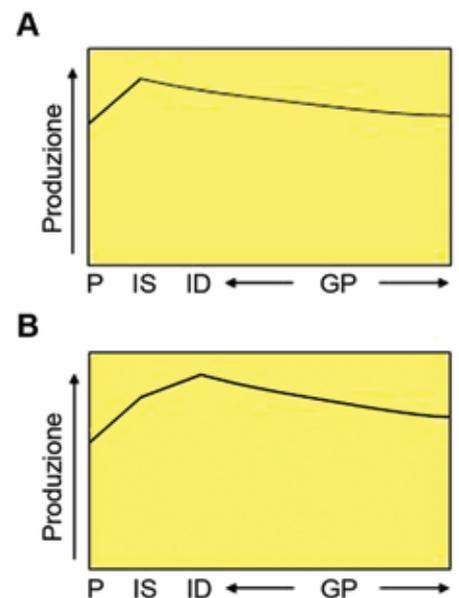


Figura 7 – Eterosi nei diploidi (A) ed eterosi progressiva negli autotetraploidi (B). P=linee parentali; IS=ibridi semplici; ID=ibridi doppi; GP=generazioni panmitiche.

(Briggle, 1963).

I dati acquisiti nei poliploidi suggeriscono che il vigore eterotico sia tanto più marcato quanto maggiore è la variazione allelica in uno stesso genoma (autopoliploidi) o la differenziazione genetica tra genomi diversi (alloploiploidi).

L'eterosi progressiva non può essere spiegata con i fenomeni di complementazione allelica perché questo implica che nel passaggio dagli ibridi semplici agli ibridi doppi vengano introdotti nuovi alleli superiori senza introdurne di deleteri. Tutto ciò sembra del tutto improbabile. D'altro canto il differente comportamento di diploidi e poliploidi non può essere spiegato in questo modo. Si ritiene allora che il fenomeno sia conseguente alla diversa frequenza delle situazioni monoalleliche e dialleliche che passando dagli ibridi semplici a gli ibridi doppi diminuisce a vantaggio di situazioni trialleliche e tetraalleliche. Nelle varietà di specie poliploidi si deve cercare pertanto di massimizzare le situazioni tri- e tetraalleliche allo scopo di incrementare le possibili interazioni intralocus ed interlocus. Questo approccio consente anche di spiegare la eccezionale depressione di vigore conseguente all'autofecondazione che sarebbe dovuta alla riduzione del numero degli alleli ai singoli loci e alla perdita di interazioni tra loci diversi (Bingham *et al.*, 1994). Le interazioni sia alleliche che non alleliche possibili entro e tra loci associati in blocchi cromosomici potrebbero, pertanto, essere chiamate in causa per spiegare le differenze osservate per attitudine combinatoria tra materiali isogenici a livello diploide e tetraploide. Di fatto, nei tetrasomici la presenza di alleli dominanti favorevoli associati in fase *trans* produce interazioni geniche che non sono possibili nei disomici (Figura 8).

L'accumulo di alleli dominanti favorevoli nei blocchi cromosomi-

ci sembra un prerequisito per ottenere manifestazioni eterotiche soddisfacenti attraverso il mascheramento degli alleli recessivi deleteri. I fenomeni osservati negli autotetraploidi dimostrano peraltro che le interazioni alleliche, intra ed interlocus, giocano un ruolo importante nel determinare il livello di queste manifestazioni. Si può pertanto concludere che la presenza di geni dominanti in particolari forme di associazione nei blocchi cromosomici possa spiegare, tenendo conto delle complesse interazioni cui danno luogo, sia l'eterosi nei diploidi che l'eterosi fissata allo stato omozigote negli alloploidi di specie autogame e l'eterosi progressiva negli autopoliploidi di specie allogame.

Con l'avvento dell'era genomica e delle biotecnologie, si cominciano ad acquisire informazioni determinanti per la comprensione dell'eterosi e la scoperta delle sue basi genetico-molecolari appare a portata di mano. Nel prossimo e conclusivo articolo saranno presi in rassegna i dati sinora acquisiti attraverso lo studio dei modelli di espressione genica, in relazione al dosaggio allelico e all'azione o all'interazione di fattori regolatori.

Abstract

Chromosome blocks are the genomic units of genetic transmission in sexually reproducing plants. Breeders work with chromosome blocks, not individual genes in their selection programs. Thus, chromosome blocks support heterosis and affect estimates of gene action and interaction. Chromosome blocks vary in size accor-

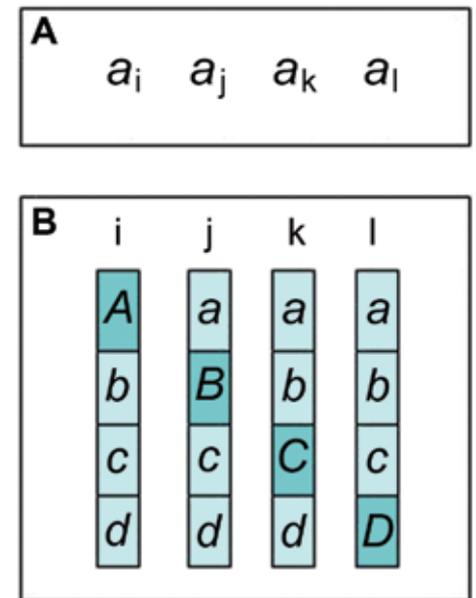


Figura 8 – Modello di locus tetraallelico (A) e di blocchi cromosomici ognuno con un allele dominante (B) negli autotetraploidi.

ding to the intensity of linkage and so the frequency of recombination, the number of sexual generations (i.e., the approach to linkage equilibrium) and the position of crossing-over sites. Even in the transfer of simple traits by backcross strategies, the amount of undesirable genetic material associated to the gene of interest is usually not known, situation often referred as linkage drag.

D.F. Jones clearly recognized the role of chromosome blocks in 1917 when he proposed the dominance of linked factors as a means of accounting for heterosis. The proposition is elegant because it acknowledges the cumulative effect of linked dominant genes as transmission units. In the following years there was much debate about gene action, and heterosis was sometimes interpreted as true overdominance, that is single loci at which the heterozygous phenotype exceeds that of both homozygotes.

Maize researchers were careful to point out that estimates of dominance variance exceeding that for straight dominance could be due to either overdominance or linkage disequilibrium of linked loci with favourable alleles in repulsion phase (pseudo-overdominance). Degrees of dominance in F_2 populations in linkage disequilibrium was compared with populations in F_8 through F_{16} in linkage equilibrium. Estimates for degree

of dominance decreased with the approach to linkage equilibrium indicating that the initial heterosis was more likely due to linked dominant factors in linkage disequilibrium than to true overdominance.

In autotetraploid alfalfa, E.T. Bingham reached the same conclusion from results indicating linked dominant factors in chromosome blocks, and not multiple gene interactions, as the basis for progressive heterosis. On the whole, genetic data so far collected indicate that superior dominant alleles at different loci complement each other by masking deleterious recessive alleles at the respective loci.

The cumulative action of genes in chromosome blocks not only explains the breeding behaviour of diploid crops, but also explains the fixation of transgressive traits in self-pollinated allopolyploids and the relatively high levels of heterosis maintained in cross-pollinated autopolyploids.

Thus, chromosome blocks provide an efficient model to explain heterosis and a unifying concept for all categories of plants.

La terza parte dell'articolo verrà pubblicata sul prossimo numero.