

L'eterosi nelle piante: dall'ipotesi genetica di Jones all'era genomica.

Parte 3^a

Analisi dell'eterosi a livello molecolare

Con l'avvento dell'era genomica e delle biotecnologie, si cominciano ad acquisire informazioni determinanti per la comprensione dell'eterosi. La scoperta delle sue basi genico-molecolari appare a portata di mano

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

Allo stato attuale delle conoscenze sembra importante sottolineare che un contributo importante, forse definitivo, alla comprensione dell'eterosi possa venire dallo studio delle situazioni geniche, chimiche e metaboliche reso possibile dalle moderne tecnologie. In sostanza quello che fino ad oggi ha potuto essere discusso solo in via ipotetica potrà essere considerato all'origine analizzando i fatti genico-molecolari che differenziano le varie situazioni.

I termini dominanza e sovradominanza che sono alla base delle teorie che hanno dominato la scena fino ad oggi non sottintendono ovviamente alcun meccanismo genico-molecolare perché entrambe le teorie sono state formulate molto prima che il materiale ereditario venisse identificato negli acidi nucleici.

Un primo contributo che la genetica moderna ha potuto fornire per la comprensione dell'eterosi riguarda lo studio dei loci che controllano i caratteri quantitativi (QTL, *quantitative trait loci*). Nuove

informazioni, probabilmente determinanti per la comprensione dell'eterosi, vengono acquisite attraverso lo studio dei modelli di espressione genica, in relazione al dosaggio allelico e all'azione o all'interazione di fattori regolatori.

QTL (*Quantitative Trait Loci*) e eterosi

Fino a pochi anni fa, a causa del limitato numero di marcatori genetici disponibili, era estremamente difficile determinare i meccanismi ereditari alla base della trasmissione e della manifestazione dei caratteri quantitativi. Attualmente, la disponibilità di mappe genetiche sature di marcatori molecolari consente di identificare e localizzare con precisione le regioni cromosomiche dove risiedono i geni che determinano un carattere quantitativo. Quasi tutti i QTL descritti nelle specie vegetali in realtà non riflettono un singolo locus mendeliano ma un tratto cromosomico che verosimilmente si identifica, in tutto o in parte, con quelli che ab-

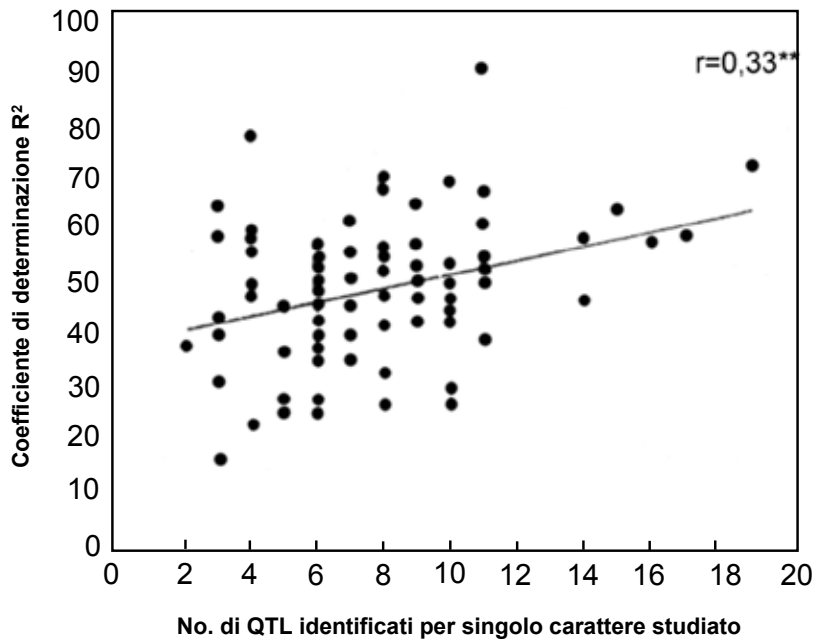
biamo chiamato blocchi cromosomici. Inoltre, secondo recenti acquisizioni riguardanti una serie di marcatori molecolari strettamente associati a QTL in specie diverse, una stessa regione cromosomica è in grado di controllare più caratteri quantitativi (Paterson et al., 1988; Tanksley, 1993; Melchinger et al., 2000; Morgante e Salamini, 2003). I risultati in favore di una proprietà pleiotropica di alcuni QTL, capaci di influenzare due o più caratteri diversi ed apparentemente non correlati tra loro, suggeriscono che la selezione naturale abbia portato alla creazione di regioni cromosomiche con geni strettamente associati che raramente ricombinano e che verosimilmente determinano la capacità adattativa e riproduttiva. Il dato più sorprendente è che per la maggioranza dei caratteri quantitativi studiati il numero di QTL è piuttosto basso (**Figura 1**), compreso tra 2 e 18 con un numero medio pari a 8 (Melchinger et al., 2000). Poiché è improbabile che caratteri complessi come sono molti caratteri quantitativi possa-

*Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali - Università degli Studi di Padova - gianni.barcaccia@unipd.it

**Dipartimento di Biologia Vegetale e Biotecnologie Agroambientali e Zootecniche - Università degli Studi di Perugia
La prima e la seconda parte dell'articolo sono pubblicate sul n.1 di Dal Seme

La bibliografia dell'articolo è pubblicata sul sito: www.dalseme.it

Figura 1 – Statistiche relative al numero di QTL identificati per singolo carattere studiato.



no dipendere da così pochi geni, si può ipotizzare che nei materiali geneticamente migliorati attualmente disponibili molti alleli favorevoli risultino fissati in tutte le linee esaminate. In questo modo l'azione degli alleli ai QTL di maggiore rilevanza agronomica risulterebbe sottostimata ed il vigore ibrido chiamerebbe in causa la dominanza di alleli ad altri loci, magari più direttamente coinvolti nell'espressione dell'eterosi.

Le azioni geniche evocate per spiegare l'azione dei geni compresi nei QTL vanno dall'additivi-

tà, alla dominanza e all'epistasia; è possibile che tutte contribuiscano alle manifestazioni eterotiche ma resta alla biologia molecolare chiarire quali sono i processi biochimici che stanno dietro questi termini.

In mais, la specie allogama maggiormente studiata per la comprensione dell'eterosi, l'individuazione di una pluralità di QTL che controllano un singolo carattere resa possibile dal mappaggio effettuato con l'uso di marcatori molecolari strettamente associati a questi loci ha messo in evidenza l'esistenza di azioni geniche di-

verse, prevalentemente intralocus dovute a dominanza sia completa che parziale, ma anche a sovradominanza e pseudo-sovradominanza (Stuber et al., 1992). Tuttavia, l'esistenza di sovradominanza è stata molto spesso ricondotta a fenomeni di pseudo-sovradominanza, derivanti da alleli dominanti associati in fase *trans* (Crow, 1999). In un limitato numero di casi sono stati, infine, riscontrati anche effetti di epistasia attribuibili soprattutto ad interazioni tra alleli di loci associati (Melchinger et al., 1998).

In riso l'analisi dei QTL mediante marcatori molecolari ha messo in evidenza che in questa specie la principale base genetica dell'eterosi è costituita dalla dominanza, sia totale che parziale: gli individui ibridi con i loci allo stato eterozigote hanno mostrato, per i singoli caratteri quantitativi presi in esame, un fenotipo uguale o intermedio rispetto a quello delle rispettive linee pure parentali (Xiao et al., 1995). La mancanza di correlazione tra il valore fenotipico dei caratteri quantitativi studiati e il grado di eterozigosi, così come la presenza di alcune linee pure della generazione F_8 aventi valori fenotipici per tutti i caratteri quantitativi esaminati superiori a quelli degli ibridi F_1 hanno permesso di escludere qualsiasi azione genica prevalente di sovradominanza. Infine, non è mai stata rilevata epistasia tra le regioni cromosomiche dove sono stati mappati i marcatori molecolari strettamente associati ai QTL.

In frumento, un'altra specie autogama, i dati sperimentali sui QTL acquisiti ricorrendo all'uso dei marcatori molecolari, suggeriscono che l'eterosi è compatibile con l'ipotesi della dominanza, con effetti di interazione tra geni di loci associati (Pickett e Galway, 1997).

Espressione genica ed eterosi

Sulla espressione genica negli ibridi si possono immaginare due livelli distinti riconducibili alle teorie genetiche che sono state qui discusse. Nel primo modello, si può ritenere che quando due alleli diversi di un dato gene, ciascuno trasmesso da una linea parentale, sono ereditati insieme nell'ibrido ciò determini una espressione simile a quella di uno dei genotipi omozigoti (dominanza completa) o compresa tra quelle dei genotipi omozigoti (additività o dominanza incompleta). Nel secondo modello, invece, si può pensare che la presenza di due alleli diversi allo stesso locus comporti una loro interazione in grado di innescare una espressione genica deviante rispetto a quella prevista sulla base dei dati relativi alle linee parentali omozigoti (sovradominanza). Tra le questioni che si pongono a livello molecolare quelle indicate qui di seguito sembrano avere un'importanza preminente per le conseguenze che possono provocare negli ibridi

In che misura differiscono, dal punto di vista nucleotidico, le forme alleliche alternative di un gene

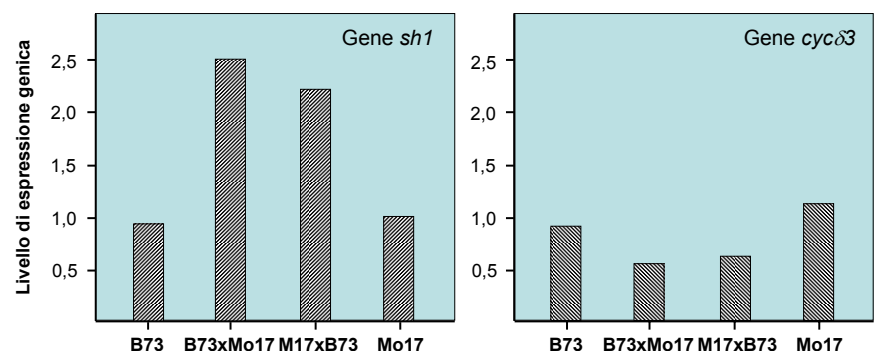
e, soprattutto, quali sono i livelli di efficienza trascrizionale? Quale è il livello funzionale delle proteine codificate dalle possibili varianti alleliche ad un dato locus? Tutti gli alleli possono essere considerati trascrizionalmente attivi e in grado di presiedere alla sintesi di proteine metabolicamente funzionali? Oppure è verosimile che alcuni alleli di specifici geni possano non venire trascritti e/o tradotti oppure che il prodotto di questi alleli non sia funzionale?

Dati acquisiti sull'espressione genica indicano che negli ibridi il livello dei trascritti di molti geni è significativamente diverso dalla media dei livelli dei trascritti osservati nelle corrispondenti linee parentali (Song e Messing, 2003; Osborn et al., 2003). Dati simili sono stati riscontrati anche per il livello delle proteine (Romagnoli et al., 1990; Leonardi et al., 1991), dimostrando pertanto che nell'ibrido insorgono realmente cambiamenti sostanziali rispetto alle linee inbred. In mais, l'analisi del-

l'espressione di una decina di geni codificanti per zeine dell'endosperma ha evidenziato nella maggior parte degli ibridi un livello di espressione genica due volte superiore oppure inferiore rispetto al livello medio delle linee parentali (Romagnoli et al., 1990).

Risultati analoghi sono stati ottenuti sempre in mais da Guo et al. (2003) studiando i profili di espressione di migliaia di geni nell'endosperma. Ancora più recentemente, l'analisi condotta sull'espressione di 30 geni in ibridi di mais ha confermato che una quota consistente di questi geni non mostra livelli di trascrizione riconducibili ad un modello additivo e che negli ibridi l'espressione dei geni è risultata frequentemente repressa oppure potenziata (Auger et al., 2005). A titolo di esempio, in **Figura 2** sono riportati i livelli di espressione dei geni saccarosio sintasi *sh1* (*Shrunken 1*) e ciclina $\delta 3$ (*Cyclin delta-3*) nelle linee inbred e nei loro ibridi. Adams et al. (2003) hanno messo in evidenza contri-

Figura 2 – Modelli di espressione genica non additivi riscontrati per i geni saccarosio sintasi *sh1* e ciclina *d3* nelle linee inbred B73 e Mo17 di mais e nei loro ibridi (B73 x Mo17 e reciproco) stimati mediante analisi di ibridazione tipo Northern blot. Il livello dei trascritti negli ibridi è, nel primo caso, oltre due volte superiore alla media dei trascritti delle linee inbred, mentre nel secondo caso risulta pari a circa la metà.



buti ineguali dei genomi parentali anche negli allopoliploidi di nuova sintesi di cotone, suggerendo che quando due diversi genomi sono riuniti insieme in un ibrido i livelli di espressione dei geni non sono prevedibili sulla base dei livelli di espressione degli stessi geni nei parentali.

Guo et al. (2004) hanno studiato i livelli di mRNA trascritti da specifici alleli in plantule e spighe immature di ibridi di mais in momenti diversi del loro sviluppo, in condizioni normali e di stress idrico ed in relazione a diverse densità di coltivazione. Dei 15 geni studiati, 11 hanno mostrato differenze significative dei livelli di mRNA, variabili dall'espressione ineguale di entrambi gli alleli (espressione biallelica) all'espressione di un singolo allele (espressione monoallelica). L'origine materna o paterna non ha influenzato, o ha influenzato in misura molto modesta, il rapporto tra le quantità di trascritti degli alleli. Uno dei risultati più importanti di questo studio è quello emerso dal confronto tra varietà ibride costituite in epoche diverse: gli ibridi più moderni, derivanti da un'intensa attività di miglioramento genetico, hanno mostrato quasi esclusivamente una espressione di tipo biallelico mentre quelli più vecchi hanno evidenziato frequentemente una espressione di tipo monoallelico. Ancora più interessante è la risposta fatta registrare nelle diverse condizioni di stress abiotico (densità e siccità): negli ibridi i due alleli ai diversi loci studiati hanno

evidenziato sempre una espressione differenziata (Guo et al., 2004).

Benché la modulazione dell'espressione genica negli ibridi rappresenti un'acquisizione che ha trovato molte conferme, anche in organismi diversi dal mais come, ad esempio, in *Drosophila* (Hämmerle e Ferrús, 2003), ciò che non appare ancora chiaro è la sua relazione con l'eterosi: questi cambiamenti consistenti, sia in positivo che in negativo, dei livelli di espressione genica sono la causa dell'eterosi oppure sono la sua conseguenza?

Fino ad oggi gli studi di espressione comparativa tra linee inbred e ibridi sono stati limitati ad un numero ridotto di geni e ad uno o pochi organi. Per la comprensione a livello genetico-molecolare dell'influenza dei livelli di espressione genica sull'eterosi appare determinante la possibilità di valutare un numero di geni rappresentativo dell'intero genoma e più organi vegetativi e riproduttivi a diversi livelli di sviluppo.

La sfida sperimentale è quella di definire quali cambiamenti nell'espressione genica sono cruciali per promuovere il vantaggio dell'eterozigote. Poiché i caratteri che manifestano eterosi negli ibridi sono sotto controllo genetico complesso e solo raramente sono aumentati più di due volte in termini di valore fenotipico, cambiamenti relativamente modesti di molti geni possono giocare un ruolo importante in contrapposizione a cambiamenti consistenti di

pochi geni (Birchler et al., 2003).

Significativi al riguardo sono anche i dati che si vengono accumulando sulla struttura del genoma che fanno intravedere insospettite differenze tra i materiali che si incrociano.

Il confronto della struttura genomica del locus *bronze1* (Bz1) in diverse linee inbred di mais ha messo in evidenza che le regioni intergeniche contengono tipi e combinazioni di trasposoni e retrotrasposoni diversi, e in posizioni diverse. Tale confronto ha, inoltre, evidenziato che le linee inbred sono diverse anche in termini di composizione genica: alcuni loci di una linea presentano geni non rinvenibili ai loci corrispondenti di un'altra linea, violando così la colinearità intraspecifica (Fu e Dooner, 2002). Recentemente, Brunner et al. (2005) attraverso il confronto a livello genomico del contenuto genico di BAC *contigs* alleliche relative alle linee inbred B73 e Mo17 hanno documentato il grado ed il tipo di diversità intraspecifica esistente in mais, e riportato che i polimorfismi coinvolgono almeno 10.000 sequenze e sono dovuti soprattutto ad inserzioni di DNA. Questo lavoro ha, inoltre, dimostrato che il genoma di mais è in continua evoluzione poiché certi elementi trasponibili sono in grado di provocare variazioni a livello sia delle regioni codificanti che di quelle regolative attraverso meccanismi di duplicazione di singoli geni e di integrazione di porzioni di geni diversi. Tenendo conto

di queste nuove acquisizioni, oltre ad un effetto dovuto al dosaggio genico come possibile ipotesi alla base dell'eterosi, un'altra ipotesi possibile per il mais è quella che si basa sull'esistenza di regioni regolative nei trasposoni e nei retrotrasposoni in grado di fornire ampie e diversificate possibilità di espressione genica e/o di determinare silenziamento genico per effetto della presenza o meno di sequenze ripetute.

Un altro aspetto che è stato considerato recentemente in merito alla modulazione dell'espressione genica riguarda l'eventuale presenza negli ibridi di particolari effetti epigenetici. Tra questi la metilazione del DNA, i cambiamenti strutturali delle proteine istoniche e le variazioni del grado di impacchettamento della cromatina sono in grado di ripercuotersi profondamente sull'espressione genica. Tuttavia, i risultati di alcuni esperimenti recentemente condotti in mais dal gruppo di James A. Bircheler e basati sull'analisi dell'espressione allelica al *locus r1 (red color)* tendono ad escludere qualsiasi componente o azione epigenetica sul vigore eterotico degli ibridi e sulla depressione di vigore conseguente all'autofecondazione (Auger et al., 2004).

Dosaggio genico ed eterosi

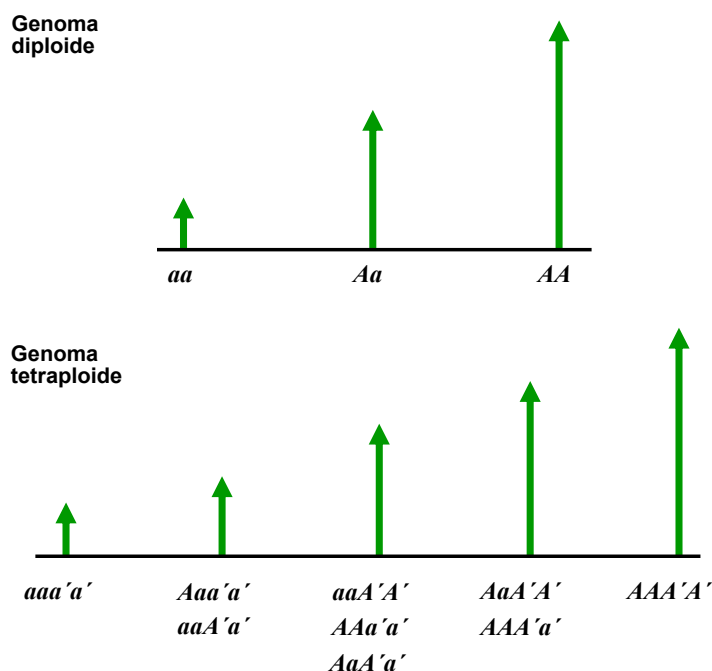
Un ruolo chiave sulle manifestazioni eterotiche può essere svolto anche dal dosaggio genico. Lo studio dei livelli di espressioni

di geni nucleari e mitocondriali in aneuploidi di mais ha messo in evidenza effetti consistenti sui caratteri quantitativi (Lee et al., 1996; Auger et al., 2001). Su questo punto può essere molto interessante il confronto tra quanto accade nei diploidi e nei poliploidi, in particolare autopoliploidi di nuova sintesi.

La poliploidia, come effetto generale, determina un aumento dei livelli di espressione genica in proporzione al dosaggio genico conferito dal livello di ploidia, come è stato dimostrato per molti geni in serie euploidi (monoploidi, diploidi, triploidi e tetraploidi) di mais (v. citazioni in Osborn et al., 2003). Nei diploidi, le conseguenze del dosaggio sono state analizzate per molti geni regolatori di processi di sviluppo, come quelli che controllano l'architettura della pianta (*tbl* in mais), la dimensione del frutto (*fw2.2* in pomodoro) e l'epoca di fioritura (*FLC* in *Arabi-*

dopsis e Brassica). Nel complesso, i risultati conseguiti suggeriscono che i dosaggi genici svolgono un ruolo chiave nel controllo dei caratteri quantitativi. Effetti di dosaggio sono stati osservati in genotipi eterozigoti che presentano livelli intermedi di espressione genica e di manifestazione fenotipica, rispetto ai genotipi omozigoti caratterizzati da espressione nulla o molto bassa e da espressione alta. Pertanto, nel caso di geni che risentono del numero di copie, la poliploidia è in grado di aumentare la variazione potenziale dei loro livelli di espressione e, conseguentemente, della manifestazione fenotipica dei caratteri corrispondenti (Figura 3). Ai tre possibili genotipi a livello diploide si contrappongono nove possibili genotipi a livello tetraploide. Anche gli effetti fenotipici aumentano da tre, nei diploidi, a cinque, nei tetraploidi (i genotipi marcati nei quali ognuno dei genomi diploidi con-

Figura 3 – Confronto tra un genoma diploide (A) e uno tetraploide (B) in termini di variazione della manifestazione fenotipica, assumendo un'azione genica di tipo additivo (A/A' alleli plus e a/a' alleli minus) ed una espressione genica proporzionale al dosaggio.



tribuisce con due alleli (A/a e A'/a') potrebbero venire fissati in specie autogame tetraploidi ad eredità disomica). Questo fenomeno potrebbe anche non allargare l'intervallo di variazione fenotipica rispetto ai diploidi, benché nei poliploidi sia possibile che il dosaggio genico più alto e quello più basso diano origine a fenotipi antagonisti ancora più estremi, ma ciò che conta sembra essere la creazione di più classi fenotipiche intermedie alcune delle quali potrebbero manifestare un vantaggio selettivo. In teoria, sia gli autopoliploidi che gli allopoliploidi sono in grado di beneficiare di questo effetto, sebbene le classi genotipiche intermedie verrebbero stabilizzate nei poliploidi ad eredità disomica e non in quelli ad eredità polisomica, peraltro solo in presenza di sistema riproduttivo autogamo.

Un chiaro effetto del dosaggio è stato riscontrato anche studiando i profili di espressione di migliaia di geni nell'endosperma di mais.

I dati acquisiti dimostrano che il livello di espressione genica nel tessuto triploide dell'endosperma è dipendente principalmente dal dosaggio poiché in termini quantitativi i trascritti rispettano il contributo genomico dei parentali, evidenziando una proporzione di 2:1, materno contro paterno. Tuttavia, circa l'8% dei geni analizzati ha fatto registrare deviazioni significative, mostrando una espressione non additiva. Negli ibridi i livelli di espressione di questi geni sono risultati molto simili a quelli

osservati in una delle due linee parentali. Inoltre, i geni con livello di espressione simile a quello materno sono risultati nettamente superiori ai geni con livello di espressione simile a quello paterno (Guo et al., 2003).

Qualora l'eterosi nei poliploidi sia realmente condizionata da effetti di dosaggio genico ad un certo numero di loci, tale dato potrebbe essere messo in relazione anche con quanto accade nei diploidi dal momento che molti dei loci per i caratteri quantitativi mostrano assenza di dominanza o effetti di semi-dominanza (Tanksley, 1993). Ciò significa che il genotipo eterozigote per uno specifico QTL manifesta un fenotipo diverso da quello dei due omozigoti e spostato verso l'uno o l'altro degli omozigoti, benché sia stato dimostrato che il più delle volte l'eterozigote possiede un valore intermedio tra i due omozigoti (Figura 4). La variazione modulata dell'espressione genica dovuta ad effetti di dosaggio in combinazione con la crea-

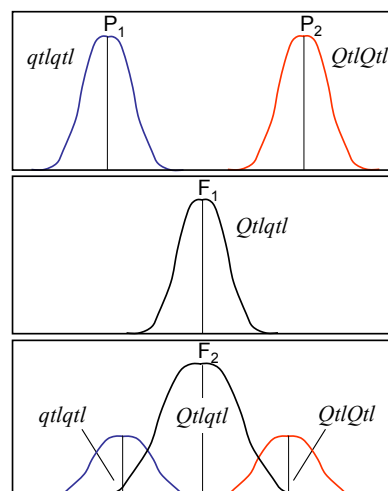
zione di varianti alleliche è attualmente ritenuta responsabile della manifestazione di caratteri nuovi e più vantaggiosi nei poliploidi (Osborn et al., 2003).

Fattori regolatori, reti regolatorie ed eterosi

L'espressione della maggior parte dei geni è controllata da una rete complessa di fattori regolatori, come ad esempio i fattori di trascrizione.

In generale, il meccanismo di controllo può essere positivo o negativo a seconda che il prodotto del gene regolatore sia in grado di promuovere oppure reprimere l'espressione di uno o più geni strutturali. La regolazione trascrizionale può comprendere il potenziamento (controllo positivo) o il silenziamento (controllo negativo) di un promotore per mezzo di proteine regolatrici. Tali proteine sono dei veri e propri fattori di trascrizione che esercitano il loro effetto direttamente sull'attività della RNA polimerasi o di altre proteine regolatrici riconoscendo specifiche sequenze del DNA. Quando un fattore regolatore è in grado di promuovere il legame dei fattori di trascrizione generici e quello della RNA polimerasi con la regione specifica del promotore, intensificando il livello di trascrizione, viene definito fattore di attivazione della trascrizione. In caso contrario, qualora l'intervento del fattore regolatore induca un silenziamento della trascrizione, viene definito

Figura 4 – Semidominanza dei QTL. Manifestazione di un carattere quantitativo in due linee inbred parentali P1 e P2 antagoniste per le forme alleliche presenti al locus per il carattere quantitativo (qtl qtl contro Qtl Qtl), nel corrispondente ibrido F1 (Qtl qtl) e nella discendenza segregante F2.



fattore di repressione della trascrizione. Nelle piante sono stati clonati numerosi geni che codificano per proteine aventi funzione di fattori di trascrizione generici, richiesti per l'inizio della trascrizione da parte di una delle RNA polimerasi, oppure di fattori di trascrizione regolativi, coinvolti nell'intensificazione o nella repressione della trascrizione.

Il numero dei fattori regolatori che agiscono nei diploidi è alto, benché inferiore a quello dei fattori regolatori che agiscono nei poliploidi. La complessità dei fattori regolatori è sicuramente maggiore negli eterozigoti che negli omozigoti (Figura 5). Tale complessità aumenta, ad esempio, di tre volte per i fattori regolatori corrispondenti a proteine dimeriche (ad esempio, A_1A_1 o A_2A_2 nelle linee inbred contro A_1A_1 , A_1A_2 e A_2A_2 dell'ibrido). L'azione e l'interazione dei fattori regolatori, ciascuno dei quali è codificato da un gene distinto e agisce sul livello di espressione di geni fondamentali in ma-

niera gerarchica, negli omozigoti è diversa rispetto agli eterozigoti. Il funzionamento delle reti regolatorie negli ibridi dipende da come effettivamente i fattori codificati dai singoli genomi interagiscono tra loro: è verosimile che tale funzionamento nel genoma ibrido sia piuttosto modificato rispetto ai singoli genomi parentali e che i cambiamenti siano più marcati negli ibridi prodotti incrociando linee inbred geneticamente divergenti. La condizione omozigote tipica delle linee inbred può semplificare il funzionamento di queste reti per la presenza di alleli identici a molti loci. Negli ibridi il funzionamento delle reti regolatorie dovrebbe essere meno soggetto ad alterazioni quando le linee inbred sono geneticamente simili. Gli effetti complessivi sulla espressione dei geni sono comunque difficili da predire dal momento che alcuni fattori di regolazione agiscono come promotori ed altri come inibitori dell'espressione genica.

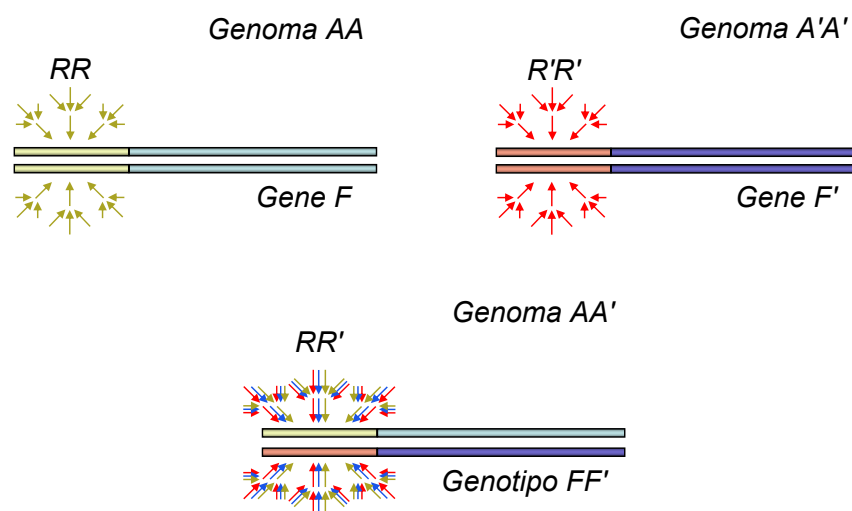
Oggi si ritiene che le interazio-

ni tra fattori regolatori giochino un ruolo importante nell'aumento di vigore associato con la condizione eterozigote. Tanto i diploidi quanto i poliploidi possiedono meccanismi specifici per il mantenimento di alti livelli di variabilità allelica ai singoli loci: in entrambi i casi, infatti, il vigore complessivo delle piante è positivamente correlato con l'eterozigosi o con la diversità dei genomi.

Alcuni autori ipotizzano che il modello di espressione non additivo rinvenibile negli ibridi possa essere attribuito alla interazione di fattori regolatori codificati da alleli diversi ereditati dai singoli genomi parentali, determinando nella condizione eterozigote nuovi livelli di espressione dei geni da questi controllati (Hämmerle e Ferrús, 2003; Auger et al., 2005).

Sulla base delle informazioni sinora acquisite, si ritiene che la combinazione di genomi divergenti della stessa specie (*Zea mays*) o di specie diverse dello stesso genere (*Drosophila*) possa determinare alterazioni a carico di geni regolatori con conseguenti modulazioni dell'espressione di geni fondamentali. I cambiamenti dell'espressione genica potrebbero essere dovuti non solo ad effetti di dosaggio di alleli (Lee et al., 1996; Auger et al., 2001) e/o di interazione tra alleli (Osborn et al., 2003), di geni regolatori ma anche ad effetti connessi a specifici elementi associati in fase di repulsione, i cosiddetti *trans-acting elements*, in grado di agire sull'espressione di buona

Figura 5 – Funzionamento delle reti regolatorie a livello omozigote (genomi AA e A'A') ed in un genoma ibrido (AA'). Le frecce rappresentano l'azione e l'interazione dei fattori regolatori codificati dai geni R/R'. Nell'ibrido il meccanismo regolativo di un gene fondamentale (F/F') risulta più complesso rispetto alle linee inbred parentali in quanto i fattori regolatori codificati dai singoli genomi A e A' interagiscono in condizione eterozigote AA'. Tale complessità aumenta di tre volte per i fattori regolatori corrispondenti a proteine dimeriche (↔ e → omodimeri e → eterodimeri).



parte dei geni di un dato genoma (Guo e Birchler, 1996; Birchler et al., 2001), come dimostrato dagli studi condotti negli aneuploidi (Birchler e Newton, 1981; Matzke et al., 2003). Si può ipotizzare che la riduzione dell'espressione genica che si osserva normalmente nelle linee monosomiche e trisomiche rappresenti un fattore pregiudizievole per il vigore e responsabile delle alterazioni a livello fenotipico associate all'aneuploidia.

La maggior parte dei geni regolatori ha evidenziato un'azione fortemente condizionata dagli effetti di dosaggio allelico, mentre i loro geni bersaglio hanno solitamente mostrato normali relazioni di dominanza/recessività tra le possibili varianti alleliche (Birchler e Auger, 2003). Una possibile spiegazione della dicotomia tra relazioni di dominanza ed effetti di dosaggio è fornita dalle analisi condotte sui geni di lievito la cui espressione è condizionata dal numero di copie (Papp et al., 2003). I geni che a livello aploide esercitano un'azione insufficiente per lo sviluppo delle cellule, in condizione diploide codificano per polipeptidi che partecipano alla formazione di complessi molecolari funzionali. Nelle piante è noto che i geni con azione regolatoria molto spesso presiedono alla sintesi di polipeptidi che entrano nella costituzione di complessi proteici formati da più subunità. Sulla base di alcune osservazioni sperimentali, si può supporre che anche negli organismi multicellulari i geni regolatori

esercitino un'azione dipendente dal loro dosaggio così come i geni costitutivi che controllano funzioni metaboliche siano meno condizionati da effetti di dosaggio (Birchler et al., 2001). Conseguentemente, la manifestazione dei caratteri quantitativi potrebbe essere controllata in larga misura da geni ad una pluralità di loci la cui azione è dipendente dal dosaggio. Secondo questa ipotesi, l'eterosi sarebbe determinata dall'efficienza di specifici alleli presenti nei loci di differenti geni regolatori che a loro volta controllano l'espressione dei geni ai QTL più direttamente responsabili della manifestazione dei caratteri quantitativi (Birchler et al., 2003).

Un aspetto che è stato recentemente considerato riguarda l'inattivazione di alleli materni e/o paterni durante la formazione dei gameti (*imprinting* genomico). Il meccanismo molecolare che controlla tale fenomeno in mais è ritenuto responsabile delle deviazioni quantitative di alcuni trascritti genici negli ibridi rispetto alle linee parentali (Guo et al., 2003).

Variazioni dell'espressione allelica di geni autosomici, non riconducibili però ad *imprinting* genomico, sono state recentemente documentate in ibridi di topo (Cowles et al., 2002). Tali variazioni in termini di livello di trascritti, considerati dei veri e propri meccanismi regolatori, sono state attribuite a polimorfismi riscontrati in regioni intergeniche, per lo più differenze a carico di sequenze di DNA non

codificanti, mentre fenomeni epigenetici non sono stati osservati. Al momento si ritiene che le differenze nucleotidiche presenti nelle regioni di regolazione di un gene possano condizionarne il modello di espressione ed essere la causa della variazione a livello fenotipico (Knight, 2004).

In conclusione, si pensi anche alla sovraespressione di molti geni fondamentali, tipo *housekeeping*, come ipotizzato da Birchler et al. (2003): l'eterosi si potrebbe ricondurre all'azione di geni regolatori o all'alterazione delle reti regolatorie (Song e Messing, 2003).

Prospettive e conclusioni

Da quando all'inizio del secolo scorso sono state formulate le prime ipotesi per spiegare il fenomeno dell'eterosi questo argomento è stato costantemente presente nella ricerca internazionale anche se per lungo tempo l'attenzione è stata rivolta più ai risvolti pratici che al chiarimento delle sue basi scientifiche. Fino a quando il meccanismo di azione dei geni è rimasto ignoto non si è potuti andare oltre l'enunciazione di teorie, dominanza e sovradinanza in primo luogo, le quali hanno cercato di dare un nome a ipotetici processi piuttosto che delucidarli nella loro essenza, rimasta a lungo ignota.

Con la nascita della genetica molecolare, che ha ormai mezzo secolo di vita, le possibilità offerte alla ricerca sono immensamente

cresciute specialmente dopo che questa ha superato la fase iniziale volta a mettere a fuoco il modo nuovo di affrontare i problemi e ad accumulare dati sulle relazioni fondamentali tra geni e biochimismo cellulare. Durante questo periodo il lavoro pratico per lo sfruttamento dell'eterosi ha proceduto alacremente e pur non potendo essere basato su puntuali conoscenze scientifiche ha dato i risultati prodigiosi che sono sotto gli occhi di tutti. La disponibilità di dati relativi a risultati pratici importanti e di materiali innovativi messi a punto affidandosi più all'intuito dei ricercatori che non alle conoscenze scientifiche da un lato e le nuove acquisizioni relative all'organizzazione dei genomi e al loro funzionamento dall'altro, hanno stimolato in tempi recenti un crescente interesse sull'eterosi. Si sta in sostanza verificando quello che tante volte si è verificato nella storia della genetica, questa scienza si è proposta spesso di dar conto di risultati pratici e da questo lavoro ha tratto essa stessa motivi di progresso. La pratica infatti pone domande che non sempre trovano risposta nelle conoscenze acquisite ma richiedono approfondimenti e verifiche di ipotesi nuove. In tema di eterosi, per lungo tempo si è dato credito all'ipotesi che gli ibridi mostrino complementazione dei differenti alleli trasmessi dai due genitori, in modo tale che i geni favorevoli di un genitore abbiano la capacità di compensare quelli sfavorevoli dell'altro genitore e vi-

ceversa. In termini di espressione genica sono state considerate due ipotesi alternative: 1) gli alleli possono operare nell'ibrido in modo completamente additivo e quindi mostrare un livello intermedio rispetto a quello dei parentali e 2) le interazioni tra i fattori regolatori dei due genitori alterano l'espressione genica ripercuotendosi sul fenotipo degli ibridi che non risulta intermedia rispetto a quella dei parentali. I risultati acquisiti supportano quest'ultima ipotesi.

Sperimentalmente le moderne tecniche di genomica e trascrittomica potrebbero rivelarsi molto utili per misurare l'espressione genica di singoli alleli a specifici loci e quindi per verificare eventuali differenze in termini quantitativi, sia come espressione nei livelli assoluti dei prodotti genici nelle linee parentali e negli ibridi che come espressione modulata in relazione al tipo di tessuto o organo e al momento dello sviluppo. La tecnologia dei DNA *microarray* e quella della PCR *real-time* risultano infatti appropriate per determinare la capacità trascrizionale di complessi di geni o di singoli geni nelle linee inbred e la differenza assoluta esistente tra queste, nonché per prevedere la risposta eterotica negli ibridi in presenza di dominanza oppure per verificare e quantificare eventuali fenomeni di sovraddominanza. Inoltre, per i membri di famiglie multigeniche, tali tecnologie possono anche risultare utili per analizzare la presenza di effetti di dosaggio genico a livello

di espressione nelle linee inbred e nei loro rispettivi ibridi semplici o doppi.

Attenta considerazione va riservata alle recentissime acquisizioni in materia di evoluzione del genoma delle specie studiate perché i dati disponibili, se confermati, possono avere un impatto al momento non prevedibile.

L'opinione più diffusa vuole che la formulazione di un modello molecolare per l'eterosi dovrebbe iniziare con la verifica di ipotesi semplici ed alternative così che sia possibile escluderne alcune e formularne altre più specifiche sulla base dei dati acquisiti. Il punto di partenza dovrebbe essere rappresentato dall'analisi dell'espressione genica e della sua modulazione nei genomi di linee pure o di linee inbred al fine di effettuare valutazioni comparative con il comportamento dello stesso gruppo di geni nei genomi dei materiali ibridi. Al momento le informazioni disponibili su tali meccanismi non sono sufficienti per tentare di spiegare compiutamente l'eterosi a livello molecolare. Soltanto quando il fenomeno eterotico sarà pienamente delucidato risulterà possibile manipolarlo anche a livello biotecnologico e sfruttarlo nel migliore dei modi in agricoltura.

Il percorso, non certo compiuto, riguardante i fattori regolatori e le reti regolatorie cui danno luogo, spingono ad una visione olistica del fenomeno dell'eterosi che non può essere dovuto semplicemente alla somma di un numero, an-

che molto grande, di effetti genici, ma il prodotto finale di complesse azioni interattive (interattomica) e di specifiche reazioni metaboliche (metabolomica). Questo ragionamento vale non solo per l'eterosi ma per ogni organismo vivente preso nella sua interezza. Ciò non toglie nulla alla possibilità di integrare il patrimonio genetico di singole specie con uno o pochi geni capaci di presiedere alla sintesi di molecole che direttamente possono migliorare la qualità dei prodotti o promuovere la resistenza nei confronti di specifici patogeni.

Abstract

Heterosis in plants: analysis at molecular level

With the advent of the genomic era and biotechnology, the technical tools to establish the molecular basis of heterosis are at hand. Some important data are emerging from the fog. Studies at the genome, transcriptome and proteome levels in model species have led to unexpected results. Although allelic sequences can vary extensively in a given genome, it was generally assumed that each gene in one individual should have an allelic counterpart in another individual of the same species. Violation of genetic microcolinearity was reported in maize and potentially related both to the classification of heterotic groups and to the manifestation of hybrid vigor in this species. Moreover, allel-

ic expression variation of fundamental genes has recently been uncovered in mouse and maize hybrids. Most of the investigated genes showed differences at the messenger level, ranging from unequal expression of the two alleles (biallelic) to expression of a single allele (monoallelic). Changes in mRNA expression levels and allele-specific transcript ratios were attributed mainly to differences in noncoding DNA sequences (i.e. cis- and trans-acting elements). Epigenetic regulation and parental imprinting had minimal effects. One of the most important findings was that genetically improved modern hybrids of maize express both alleles at each locus, whereas less improved old hybrids frequently show monoallelic expression. Furthermore, the two alleles in the hybrids respond differently in plant tissues and to environmental conditions. The allele-specific expression and variation in different tissues in responding to stress suggest an unequal function of the parental alleles in the hybrids. Additional studies on gene dosage effects in either diploids or polyploids revealed that the expression of many genes, in terms of transcripts and proteins, does not exhibit the midparent value expected in case of additive gene action. Overall results indicated that allele dosage effects can play important roles in determining phenotypic diversity and have also impacts on hybrid vigor. Since

housekeeping genes that encode metabolic functions usually show a greater degree of dominant/recessive behaviour between allelic alternatives and are believed less influenced by dosage effects, it has been argued that dosage effects are a reflection of the dosage dependence of most regulatory genes. Following this train of thought, researchers are led to the idea that heterosis might be the result of different alleles being present at loci that contribute hierarchically to the regulatory networks controlling quantitative traits. Real-time PCR and DNA microarray analyses will shed light in this fascinating area and might be able to provide some answers about the spectrum of genes that show regulated changes of expression patterns in hybrids. An eventual molecular explanation of heterosis will determine whether it can be manipulated in crop plants for the benefit of agriculture.