



Introduzione: storia della genetica

«Presto qualsiasi scienza che abbia a che fare con animali e piante dovrà sfociare nella scoperta resa possibile dall'opera di Mendel».

William Bateson (1904)

La genetica è la scienza che studia i fenomeni dell'eredità e della variabilità biologica. Il nome è stato dato da W. Bateson nel 1906, ma la disciplina esisteva già anteriormente ed era chiamata scienza dell'ereditarietà (in tedesco *Vererbungslehre*). Con gli esperimenti di G. Mendel e la sua pubblicazione del 1866 relativa ai risultati ottenuti sull'ibridazione delle piante (*Versuche über Pflanzenhybriden*) ha davvero inizio la scienza della genetica ed è per questo che oggi egli è considerato il padre della genetica. La teoria generale dell'eredità, applicata dapprima ai vegetali e successivamente agli animali, studia le manifestazioni visibili delle unità ereditarie, definite *geni* da W. Johannsen nel 1909.

Secondo la teoria cellulare, elaborata ed enunciata indipendentemente negli anni 1838 e 1839 da due biologi tedeschi, J.M. Schleiden e T. Schwann, gli organismi viventi sono organizzati in cellule. È nelle cellule che avvengono tutti i processi che rendono possibile l'accrescimento corporeo degli individui e la loro riproduzione. La riproduzione, con la formazione di nuovi individui, assicura la continuità della vita e quindi l'evoluzione. Nel passaggio da una generazione all'altra si osservano due fenomeni caratteristici di tutti gli organismi viventi che si possono indicare come *eredità* e *variabilità*: i figli sono infatti somiglianti in una certa misura ai genitori e tra di loro, ma nello stesso tempo mostrano delle differenze più o meno marcate rispetto ai genitori ed ai fratelli. Questa continuità nella diversità costituisce una prerogativa di carattere universale e di prima importanza del mondo vivente il cui studio è il compito prevalente della Genetica.

1.1 Tappe fondamentali della Genetica

Fin dall'antichità classica, molti medici, naturalisti, filosofi si erano posti alcuni problemi relativi alla trasmissione ereditaria dei caratteri. Aristotele aveva osservato la reciproca indipendenza di alcuni caratteri, nelle unioni tra persone di razze diverse, mentre Ippocrate aveva perfino formulato una teoria della trasmissione ereditaria, che fu più volte ripresa in considerazione in tempi successivi, fino al XIX secolo.

Nel Settecento il problema dell'eredità interessa parecchi studiosi: il matematico e filosofo francese, nonché studioso newtoniano, **Pierre-Louis Moreau de Maupertuis** (1698-1759), in seguito ad osservazioni sulla trasmissione dei caratteri nell'uomo e nei cani, giunge ad ammettere l'esistenza di particelle materiali che stanno alla base dei fenomeni ereditari (*Vénus phisique*, 1745). Maupertuis scriveva che il caso aveva creato un numero enorme di individui, ma che solo pochi avevano potuto sopravvivere e divenire le specie che abitavano la terra. Nella sua visione, maschio e femmina contribuiscono in misura uguale alla determinazione dei tratti della generazione suc-

cessiva. Maupertuis anticipava così di più di un secolo alcune delle idee centrali del pensiero di Gregor Mendel: lo stesso contributo dei genitori nella produzione dei figli, la natura casuale delle combinazioni e la trasmissione di specifiche caratteristiche da una generazione all'altra. Pochi anni più tardi, un altro nobiluomo francese, **Georges-Louis Leclerc de Buffon** (1707-1788), pubblicò un libro altrettanto presciente (*Histoire naturelle*, 1749), questa volta anticipatore delle idee di Charles Darwin. Buffon scriveva che una forma ancestrale di un particolare organismo poteva divergere in un certo numero di specie e che la migrazione nelle diverse parti del mondo poteva essere la causa di tale divergenza, poiché l'ambiente è in grado di agire direttamente sulle caratteristiche dell'organismo. Mentre Maupertuis pensava che le forze d'attrazione newtoniane potessero congiungere la corretta porzione del "seme fluido" dei parentali, imponendo così la struttura dell'embrione, Buffon credeva nella "generazione spontanea" ritenendo perciò che l'organizzazione embrionale potesse venire rintracciata in un modello interno o sagoma.

Nello stesso periodo molti furono gli studiosi che eseguirono esperimenti di incrocio nelle piante allo scopo di condurre valutazioni a carico dei caratteri nelle discendenze. Tuttavia, l'indagine sulla eredità e sulla variabilità divenne un'esigenza imprescindibile soltanto in seguito alla formulazione delle prime teorie evoluzionistiche, che richiamarono l'attenzione dei biologi sulle differenze, piuttosto che sulle similitudini fra gli organismi.

Fu senza dubbio merito delle teorie evoluzionistiche di aver portato in primo piano il problema dell'eredità e della variabilità, aprendo così la via alla sua indagine metodica. Le teorie dell'evoluzione, infatti, concentrarono l'attenzione non solo sulle somiglianze ma anche sulle differenze tra genitori e figli. Era cioè importante stabilire se e quanto i figli potessero somigliare ai genitori e soprattutto se le differenze rispetto ai genitori potessero sommarsi di generazione in generazione in modo da dar luogo ad una graduale trasformazione della specie.

Una prima concezione evoluzionistica fu elaborata dal naturalista francese **Jean-Baptiste Monet de Lamarck** (1744-1829) sulla base del "principio dell'eredità dei caratteri acquisiti" per azione dell'ambiente (**Fig. 1.1**). Lamarck sosteneva che gli organismi a diversi livelli di complessità fossero sorti in diversi momenti del tempo e continuassero a crearsi per generazione spontanea di forme di vita molto semplici: più in alto sulla scala si trovava un organismo, più tempo era passato dalla comparsa del suo antenato e più tempo aveva avuto a disposizione per evolversi. Secondo la scuola di pensiero conosciuta come *lamarckismo*, le nuove caratteristiche sono provocate dalla costante influenza esercitata dall'ambiente sulla struttura degli individui e vengono ereditate poiché i cambiamenti possono essere acquisiti in modo permanente. Pertanto, impiegando una espressione di Lamarck: il bisogno crea l'organo, l'uso continuo lo perfeziona, mentre il mancato uso l'atrofizza. Le discussioni che la sua pubblicazione *Philosophie zoologique* (1809) sollevò furono fortemente contrastate fino ad essere completamente represses dalla grande autorità di un altro naturalista francese, Georges Cuvier (1769-1832), che si dichiarò nettamente antievoluzionista.

Cinquant'anni dopo, **Charles Darwin** (1809-1882), naturalista inglese, basandosi su osservazioni e studi condotti nell'arco di quasi trent'anni a partire dal 1831, elaborò la "teoria della discendenza con modificazione attraverso la variazione e la selezione naturale" per spiegare l'evoluzione degli organismi viventi (**Quadro 1.1**). Tale teoria, descritta nell'opera *On the origin of the species by means of natural selection* [L'origine della specie per mezzo della selezione naturale], del 1859, si basa sulla selezione naturale, cioè sulla concezione della sopravvivenza, nel corso della lotta per l'esistenza, degli individui più adatti e della eliminazione di quelli meno adatti. Ne consegue che l'individuo meglio dotato trasmette ai suoi discendenti le proprie caratteristiche, determinando nel tempo un miglioramento delle specie. Darwin partì



Fig. 1.1 – Jean-Baptiste Monet de Lamarck (1744-1829).

dalla considerazione che quasi tutti gli essere viventi hanno la capacità di originare una discendenza eccessivamente numerosa, dando vita a più figli di quanti in realtà ne possano sopravvivere. Un principio guida coinvolto nel determinare quali sarebbero sopravvissuti e quali sarebbero morti poteva essere l'adattamento. Darwin sapeva, infatti, che in ogni specie per un determinato carattere esisteva in natura una forte variazione casuale, anche se non era in grado di spiegarne il motivo. L'ulteriore passo logico fu considerare la selezione naturale come il meccanismo che discriminava e separava le modificazioni favorevoli, che tendono ad essere conservate, da quelle non favorevoli, che tendono invece ad essere eliminate.

Secondo la teoria *darwiniana*, le forze evolutive perpetuavano le variazioni della specie fornendo ciò che Darwin chiamava un "vantaggio selettivo", cioè un beneficio alla pianta o all'animale che permetteva di produrre una progenie più numerosa rispetto ad un organismo in competizione sprovvisto di tale variazione. Questa teoria, nota come "discendenza con modificazioni", elaborata anche attraverso un'analogia con la selezione artificiale nella coltivazione delle piante e nell'allevamento degli animali, fu successivamente ridimensionata ed il neodarwinismo negò la trasmissione ereditaria dei caratteri acquisiti per azioni ambientali. Anche tra coloro che alla fine accettarono la nozione di "trasmutazione" – il termine allora usato per indicare ciò che oggi chiamiamo evoluzione – era fervido il dibattito riguardo a quali specie cambiassero gradualmente e quali invece improvvisamente, come le caratteristiche adattative venissero trasmesse nel corso delle generazioni e secondo quali meccanismi agisse la selezione naturale.

Un altro naturalista inglese, **Alfred Russel Wallace** (1823-1913) ebbe l'intuizione della variazione della specie e del concetto di lotta per l'esistenza, descrivendo in due brevi saggi pubblicati nel 1855 e nel 1858 i meccanismi alla base dell'evoluzione (**Fig. 1.2**). Wallace affermò che gli individui meglio adattati ad un particolare ambiente, di necessità ottengono e mantengono una superiorità nella popolazione.

Nel 1858, due articoli, uno di Darwin e uno di Wallace, furono pubblicati a Londra nel *Journal of the Proceedings of the Linnean Society*, ma non ebbero grande seguito. Solo dopo l'uscita del libro di Darwin, che diede inizio ad un fervore di discussioni e ricerche che si protrassero per oltre un secolo, vennero tratte dall'oblio, per opera soprattutto dello zoologo tedesco Ernst Haeckel (1834-1919), le teorie del suo massimo precursore e antagonista, Lamarck. Da questo momento, le opinioni dei biologi circa le cause dell'evoluzione si divisero fra le due tendenze principali, a cui venne dato il nome, rispettivamente, di neodarwinismo e di neolamarckismo. I neodarwinisti, con a capo il biologo tedesco August Weismann (1834-1914), il massimo teorico dell'eredità, sostenevano che le variazioni ereditarie su cui agisce la selezione derivano tutte da cause interne e che l'ambiente esterno non ha alcuna influenza nel determinarle. I neolamarckisti, invece, credevano che l'azione dei fattori dell'ambiente, capace di modificare le caratteristiche morfologiche cioè il soma degli organismi, potesse far sentire la sua influenza sul germe, determinando variazioni ereditarie. La separazione fra soma e germe costituisce, tra l'altro, il concetto più importante stabilito da Weismann, che sotto questo punto di vista costituisce il più acuto e perspicace precursore della genetica.

In questo stesso periodo, il naturalista e statistico inglese **Francis Galton** (1822-1911) eseguì una serie di osservazioni con l'intento di studiare e definire quantitativamente i fenomeni ereditari (**Fig. 1.3**). Tra le sue opere più importanti si possono citare *Hereditary genius* (1869) e *Natural inheritance* (1889). Egli giunse a formulare la "legge dell'eredità ancestrale", che al momento risultò innovativa da un punto di vista descrittivo, ma che nella parte interpretativa venne ben presto superata dalla concezione mendeliana. Secondo tale legge, ciascun genitore (indicato come *p*, abbreviazione di *parent*) forniva al figlio un quarto del suo patrimonio ereditario;

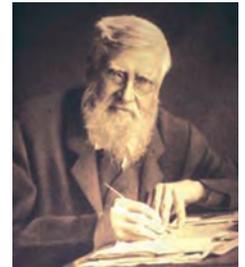


Fig. 1.2 – Alfred Russel Wallace (1823-1913).

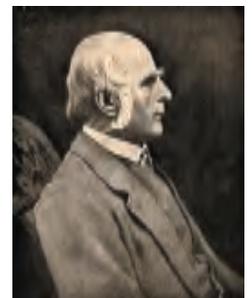


Fig. 1.3 – Francis Galton (1822-1911).

ciascun nonno (*pp*), un ottavo; ciascun bisnonno (*ppp*), un sedicesimo e ciascun bis-bisnonno (*pppp*), un trentaduesimo. In questo modo, lungo una discendenza lineare un tratto non veniva mai perduto, ma soltanto diluito.

Darwin non abbracciò la teoria di Galton né quella di altri, ma nel 1868 ne elaborò una propria, nota come la “pangenesi delle gemmule” poiché la chiamò pangenesi e affermò che implicava unità definite gemmule. Le gemmule, generate da corpi cellulari, nell’uomo come negli animali potevano muoversi verso i gameti attraverso il flusso sanguigno mentre, nel caso delle piante, attraverso un sistema di trasporto interno (il floema): una volta giunte a destinazione potevano attendere in uno stato dormiente il momento della fecondazione e venire trasmesse così ad una nuova generazione. In sostanza, Darwin considerava le gemmule come le unità alla base della trasmissione ereditaria delle caratteristiche acquisite e riteneva che queste rappresentassero anche il meccanismo per la loro miscelazione.

Di fatto la nozione di “eredità miscelata”, secondo cui i discendenti assumono una forma intermedia rispetto ai genitori, prevalse fino al tempo di Mendel ed oltre. Benché tale concezione creasse non pochi problemi alla sua teoria sulla selezione naturale, anche Darwin fu un suo convinto sostenitore.

In un primo tempo, in realtà, non vennero studiati da vicino i fenomeni ereditari. Sugli indizi forniti dalla paleontologia, dall’anatomia comparata e dall’embriologia, nonché sulla base delle osservazioni degli effetti della domesticazione sugli animali e sulle piante, si sviluppò la teoria dell’evoluzione che diede una nuova impronta a tutte le scienze biologiche. Dopo di che fu tracciato a grandi linee il quadro evoluzionistico e quando si trattò di delinearne i particolari e di spiegarne i meccanismi, si cominciò ad affermare una corrente di studi e di ricerche sperimentali che, portando l’indagine sul problema specifico della trasmissione dei caratteri, segnò l’origine di un nuovo ramo delle scienze biologiche. È nata in questo modo una disciplina a sé: la scienza dell’eredità (*Vererbungslehre*).

Si deve attendere il 1866, anno in cui **Gregor Johann Mendel** (1822-1884) pubblicò un lavoro nel quale descrive i principi basilari dell’eredità che hanno portato alla teoria della segregazione dei geni (**Fig. 1.4**). L’idea di “unità soggiacenti ai tratti” – ora noti come geni – introdotta da Mendel divenne in seguito il concetto basilare per lo studio dell’eredità dei caratteri. Nel suo lavoro *Versuche über Pflanzenhybriden*, egli fece uso di due termini: il primo, *merkmal*, implica una qualità visibile e riconoscibile, ciò che di solito si definisce tratto o carattere, mentre il secondo, *elemente*, si può tradurre come unità, elemento o fattore. Mendel dedusse le unità a seconda di come i caratteri che aveva osservato erano passati da una generazione all’altra. In questo modo, egli fece il primo passo verso un concetto che non sarebbe stato del tutto chiarito per altri cinquant’anni: la differenza tra fenotipo (il modo in cui un individuo appare, il suo aspetto) e genotipo (la particolare combinazione di geni che spiega quell’aspetto). Tra le innovazioni sperimentali apportate da Mendel, si devono ricordare il tipo di materiale parentale usato negli incroci, rappresentato da varietà pure, la necessità di non soffermarsi soltanto all’analisi degli ibridi ma di prostrarre gli incroci ad una seconda e terza generazione, e soprattutto l’unità sperimentale: egli fu il primo che concentrò l’attenzione verso le singole caratteristiche o parti delle piante anziché alla pianta nel suo insieme, come avevano invece fatto fino a quel momento i suoi predecessori.

Molti naturalisti, prima di Mendel, avevano cercato di trovare una regola nella trasmissione dei caratteri ereditari ed avevano perciò incrociato animali e piante appartenenti a specie e razze differenti. Tra questi si devono ricordare, per gli esperimenti realizzati nell’arco di oltre un secolo, tra il 1761 e il 1865, soprattutto J.G. Kölreuter, C. Sprengel, T. Knight, W. Herbert, K.F.V. Gärtner, M. Wichura e C. Naudin. A Joseph Kölreuter va riconosciuto il merito di aver segnato, con i suoi esperimenti e le sue



Fig. 1.4 – Gregor Mendel (1822-1884) con un fiore di fucsia in mano.

Quadro 1.1 – Charles Darwin

Charles Robert Darwin (**Fig. 1.5**) nacque il 12 febbraio 1809 in Inghilterra, a Shrewsbury nello Shropshire, ai confini con il Galles. Dopo aver studiato medicina a Edimburgo, nel 1828 si trasferì a Cambridge con l'intenzione di diventare pastore anglicano, ma dopo avere trascorso tre anni nel Christ's College, dove si appassionò più alla botanica e all'entomologia che alla teologia, su consiglio del botanico Henslow, decise di imbarcarsi sulla Beagle e di partire come naturalista al seguito della spedizione del capitano Robert Fitzroy che doveva compiere delle ricerche nell'Atlantico e nel Pacifico. La missione durò quasi cinque anni – dal 27 dicembre 1831 al 2 ottobre 1836 – e costituì l'avvenimento più importante nella sua formazione, in quanto egli ebbe la possibilità di effettuare numerose osservazioni naturalistiche, antropologiche ed etnologiche. Tale viaggio, che portò Darwin a visitare le isole di Capo Verde, il Brasile, la Pampa, la Patagonia, la Terra del Fuoco, tutta la costa del Cile e del Perù, le isole Galápagos e le isole coralline dell'Oceano Indiano, è oggi considerato il più famoso nella storia della scienza. Tornato in Inghilterra, Darwin elaborò e pubblicò il diario del viaggio, e qualche anno più tardi abbandonò Londra e con la famiglia andò ad abitare nel Kent, nel piccolo villaggio di Down, dove si dedicò totalmente alle proprie meditazioni scientifiche e all'elaborazione della teoria dell'evoluzione. Le osservazioni condotte sulle variazioni che gli animali e i vegetali

subiscono in conseguenza della selezione, portarono Darwin a concepire l'idea della modificazione naturale delle specie per effetto della selezione naturale. Solo nel 1859, dopo molti anni di lavoro, pubblicò *On the origin of species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. Le prime 1.250 copie furono vendute il giorno stesso della pubblicazione: il libro suscitò vivaci controversie e fu attaccato particolarmente dai teologi. Trascorse gli ultimi anni di vita proseguendo le numerosissime indagini naturalistiche, spegnendosi a Down il 19 aprile 1882, due anni prima di Mendel. Per le concezioni esposte nel suo libro è da considerarsi il fondatore della teoria evolutiva (*darwinismo*) che ebbe influenza determinante soprattutto sullo sviluppo delle scienze biologiche.



Fig. 1.5 – Charles Darwin (1809-1882).

pubblicazioni, l'inizio dello studio sistematico e sperimentale dell'ibridazione vegetale, mentre Karl Friedrich von Gärtner va ricordato per l'enorme quantità di ibridazioni che condusse su oltre 700 specie e che descrisse con grande meticolosità in un massiccio volume intitolato *Esperimenti e osservazioni riguardanti l'ibridazione nel regno vegetale* (1849). Egli tra l'altro mostrò che tutti i membri della prima generazione di piante ibride somigliavano ad uno o all'altro genitore, anticipando così la "legge della dominanza" di Mendel. Nessuno di tali studiosi approdò comunque a risultati di valore generale e riuscì nell'intento di fornire spiegazioni concrete sull'eredità, tranne forse Charles Naudin, un botanico francese che si avvicinò moltissimo alle conclusioni raggiunte da Mendel e che perciò viene ricordato come un suo precursore. Infatti, benché riteneva che gli ibridi fossero forme devianti e innaturali, Naudin ebbe brillanti intuizioni circa il comportamento dei suoi ibridi di primula e forse solo a causa della sua cecità matematica non arrivò ad enunciare la "legge della segregazione" prima di Mendel.

1.2 Esperimenti di ibridazione

I primi studi sistematici sugli incroci furono condotti tra il 1761 e il 1766 dal botanico tedesco Joseph Gottlieb Kölreuter (1733-1806). Egli creò la prima pianta ibrida a fini sperimentali incrociando due specie del genere *Nicotiana* (*N. rustica* e *N. panicolata*), osservando che le progenie avevano di solito un aspetto intermedio rispetto ai due genitori. Tali risultati, compatibili con la teoria dell'eredità per mescolamento, allora prevalente, spinsero Kölreuter a concludere che le piante incrociate contribuivano in modo uguale alla determinazione dei caratteri dei loro discendenti. In sostanza, secondo questa teoria, erano i caratteri mescolati che venivano trasmessi alla generazione successiva.



Fig. 1.6 – Gregor Mendel e il suo stemma abbaziale composto di una immagine diversa per ogni quadrante: un mughetto a simbolo della costanza, un aratro e una croce a simboleggiare le sue origini contadine e il credo agostiniano della carità.

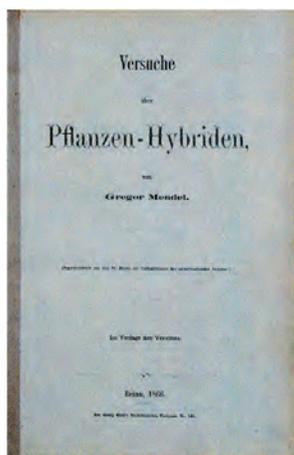


Fig. 1.7 – Prima pagina del lavoro *Versuche über Pflanzen-hybriden* di Gregor Mendel pubblicato nel 1866 negli Atti della Società di Scienze Naturali di Brno.

Tutte le concezioni erronee radicate a quel tempo vennero smentite dai risultati ottenuti da Mendel nell'arco di otto anni di sperimentazione, dal 1857 al 1865, condotta seguendo un approccio rigoroso ed analitico. Le sue innovazioni sperimentali e concettuali, nonché la capacità di interpretare i suoi risultati in modo da trarne i principi dell'eredità rimangono fra le ammirevoli conquiste della mente umana. **Gregor Johann Mendel** non era un botanico di professione, bensì un monaco del monastero agostiniano di S. Tommaso a Brünn, Austria (oggi Brno, Repubblica Ceca). Nato nel 1822 a Hynčise, un piccolo villaggio vicino a Heinzendorf (nella Moravia settentrionale, allora territorio asburgico) da una famiglia di agricoltori, Mendel entrò in monastero nel 1843 e, subito dopo essere stato ordinato sacerdote, nel 1847, lavorò per breve tempo come insegnante supplente di scienze (**Fig. 1.6**). Per proseguire quella attività doveva, però, ottenere un'abilitazione dalla pubblica amministrazione. Fatto sorprendente, non riuscì a superare l'esame a causa delle risposte insufficienti in fisica e storia naturale. Perciò, nel 1851 venne inviato dal suo ordine a studiare scienze naturali all'Università di Vienna. Egli tornò al Collegio Reale di Brno nel 1853 dedicandosi all'insegnamento delle scienze naturali e ad alcune ricerche indipendenti. Nel 1857 cominciò a raccogliere le varietà di pisello (*Pisum sativum* L.) in commercio e a studiarne le differenze morfologiche, il comportamento degli ibridi e delle loro discendenze. Per otto anni egli coltivò ed incrociò migliaia di piante di pisello nell'orto del monastero proponendosi di determinare di quale tipo fossero i figli di genitori differenti fra loro per una o più coppie di caratteri in grado di escludersi a vicenda e quale fosse la proporzione numerica delle diverse classi di caratteri. In occasione di due riunioni della Società di Scienze Naturali di Brno, tenutesi nei giorni 8 febbraio e 8 marzo del 1865, Mendel presentò i risultati delle sue ricerche, insieme con le conclusioni generali. Il suo lavoro, intitolato *Versuche über Pflanzenhybriden* [Esperimenti sugli ibridi delle piante], venne pubblicato negli Atti della Società che comparvero e furono distribuiti alle biblioteche d'Europa e d'America nel 1866 (**Fig. 1.7**). Tra coloro che ascoltarono la comunicazione di Mendel o lessero la sua pubblicazione nessuno seppe coglierne il significato. I suoi risultati, così come le sue conclusioni teoriche, rimasero sconosciute alla maggior parte degli scienziati di quel tempo. Tuttavia, benché la sua opera passò completamente inosservata, di certo era nota ad alcuni affermati scienziati dell'epoca che ebbero corrispondenza epistolare con Mendel, come **Karl Wilhelm von Nägeli** (1817-1891), botanico svizzero, sostenitore della teoria che attribuiva a fattori protoplasmatici le principali cause dell'eredità. In linea con la teoria della miscelazione dei caratteri, Nägeli propose che ciascun figlio potesse ricevere un elemento di informazione ereditaria, che chiamava "idioplasma", dalla madre ed un altro elemento dal padre, esprimendoli in forma intermedia tra i due. Poiché ritenuto uno dei più importanti ed influenti botanici del tempo, Mendel scrisse molte lettere a Nägeli affinché costui potesse sostenere la validità dei suoi risultati in *Pisum*, offrendosi anche di ripetere i suoi esperimenti di ibridazione in *Hieracium*, una delle specie più studiate dal botanico svizzero (**Fig. 1.8**). Alla fine Nägeli accettò la proposta di Mendel invitandolo a condurre esperimenti di ibridazione su questa specie utilizzando i semi che nel frattempo aveva provveduto a spedirgli. Nel 1869 uscì la sua seconda pubblicazione riguardante i risultati ottenuti con le nuove esperienze di ibridazione: *Über einige aus künstlicher Befruchtung gewonnene Hieracium Bastarde* [Su alcuni incroci di *Hieracium* ottenuti da fecondazioni artificiali]. Con *Hieracium* Mendel non fu affatto in grado di confermare i risultati ottenuti in *Pisum* poiché era incappato in una specie apomittica, capace di formare seme autonomamente in assenza di fecondazione, dando luogo perciò a progenie esclusivamente materne o che mostravano soltanto raramente caratteri paterni. Questa esperienza negativa convinse Nägeli ad ignorare il lavoro precedentemente condotto dal monaco agostiniano e spinse Mendel ad abbandonare definitivamente gli esperimenti di ibridazione con le piante. Da quel

momento Gregor Mendel dedicò buona parte del suo tempo alle passioni originarie, l'allevamento delle api e la raccolta di osservazioni meteorologiche, e al monastero di San Tommaso di cui nel frattempo (30 marzo 1868) era stato eletto abate.

Di fatto, il lavoro di Mendel venne conosciuto ed apprezzato dal mondo scientifico solo 35 anni dopo. Nel 1900, infatti, i “principi della segregazione”, basata su entità fisiche chiamate allora unità ereditarie (oggi geni), vennero riscoperti quasi simultaneamente da tre diversi botanici: l'olandese **Hugo de Vries** (1848-1935), il tedesco **Karl Erich Correns** (1864-1933) e l'austriaco **Erich von Tschermak** (1871-1962) (**Fig. 1.9**). I tre, che ottennero gli stessi risultati di Mendel lavorando con diverse specie, tra cui pisello, fagiolo e mais, riesumarono le sue pubblicazioni proclamandone l'importanza. Bastarono pochi anni perché le conclusioni a cui egli era pervenuto fossero riconosciute in diversi Paesi e confermate con esperimenti estesi a varie specie di piante ed animali. Mendel era morto nel 1884, molto prima che l'influenza del suo lavoro scientifico si facesse sentire in tutto il mondo.

Alla fine dell'ottocento, uno dei più noti difensori delle teorie di Darwin fu Galton, il quale di Mendel ignorava perfino l'esistenza. All'inizio del XX secolo, con la riscoperta dei suoi lavori si assistette alla tempestosa nascita di una nuova scienza, la genetica. Specialmente in Inghilterra, si contrapposero due fazioni che, dichiarando ciascuna Galton come proprio ispiratore, sostenevano di essere autentici rappresentanti di Darwin da un lato e di Mendel dall'altro.

William Bateson (1861-1926), professore di biologia al St. John's College di Cambridge, assunse il ruolo di primo apostolo delle teorie di Mendel e si accollò la missione di portare la sua opera all'attenzione del mondo anglosassone. D'altro canto egli sosteneva che una esatta comprensione delle leggi dell'eredità avrebbe cambiato la visione che l'uomo ha del mondo e del proprio potere sulla natura più che non qualsiasi altro progresso nelle scienze naturali. Bateson tradusse l'articolo di Mendel in inglese e lo pubblicò nel 1902, criticando nella prefazione i “biometristi”, cioè coloro che credevano, seguendo Darwin, nel cambiamento evolutivo lento e continuo, come conseguenza dell'eredità per miscelazione. Bateson e i suoi sostenitori, che aveva preso a chiamare “mendeliani”, credevano che l'evoluzione fosse il risultato di cambiamenti grandi e discontinui da una generazione alla successiva. In quell'epoca, la controparte di Bateson era guidata da Walter Franck Raphael Weldon (1860-1906), capo spirituale dei biometristi, sostenitore di Galton e della sua teoria dell'eredità ancestrale: secondo Weldon nessun contributo di un antenato, per quanto distante, poteva mai andare perduto. Il matematico e statistico Karl Pearson (1857-1936) si schierò dalla parte dei biometristi optando quindi per la continuità, mentre lo zoologo **Reginald Crundall Punnett** (1875-1967) iniziò a collaborare con Bateson, dalla parte dei mendeliani.

Pearson è oggi conosciuto per aver fornito un indice di dispersione, il test statistico del χ^2 (chi-quadrato), usato per saggiare l'accordo tra le segregazioni osservate e quelle attese, mentre Punnett è ricordato soprattutto per l'invenzione di ciò che in principio chiamò *checkerboard* (oggi nota come “quadrato di Punnett”), la matrice organizzata in modo da mostrare, per ciascun riquadro filiale, il contributo gametico femminile in orizzontale e quello maschile in verticale (**Fig. 1.10**).

1.3 Terminologia genetica

Con la conferma sperimentale delle leggi di Mendel, Bateson avvertì la necessità di creare una terminologia universale che potesse venire usata ed essere compresa dagli scienziati di tutto il mondo. Pensò di cominciare coniato, all'inizio del 1905, la parola “genetica” che derivava dal greco *gheneticós* e che significa origine, fertile

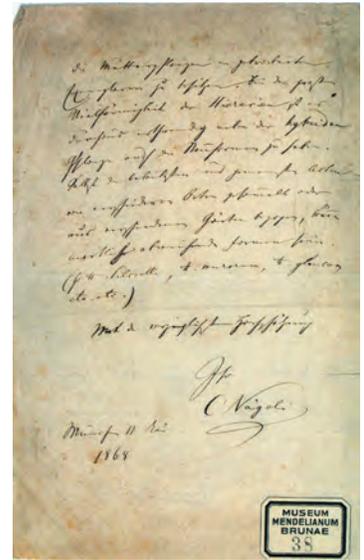
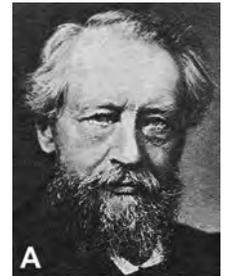
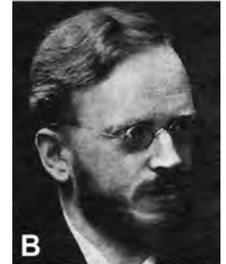


Fig. 1.8 – Lettera di Karl Nägeli a Gregor Mendel datata 11 maggio 1868 riguardante l'ibridazione nelle piante, Mendel's Museum of Genetics, Brno.



A



B



C

Fig. 1.9 – Hugo de Vries (A), Karl Correns (B) e Erich von Tschermak (C).

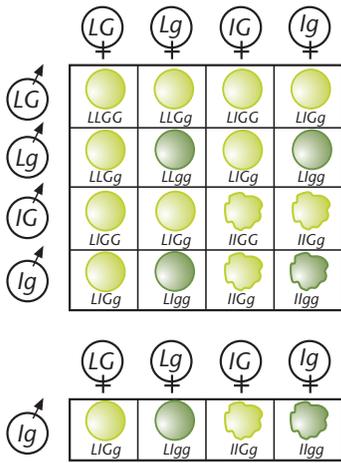


Fig. 1.10 – Quadrato di Punnett relativo all’autofecondazione e al reincontro di un diibrido (LlGg).

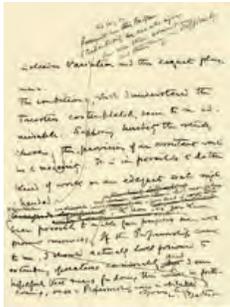


Fig. 1.11 – Lettera in cui W. Bateson conia il termine “Genetics”, John Innes Foundation, Historical Collections.

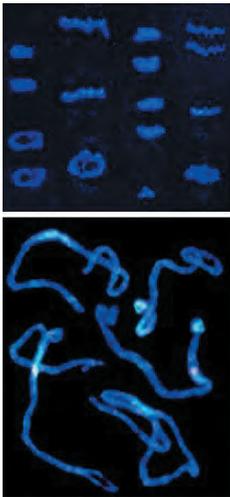


Fig. 1.12 – Materiale genetico in cellule somatiche di *Medicago sativa* durante la mitosi e in una cellula gametica di *Arabidopsis* risultante dalla meiosi.

o produttivo (**Fig. 1.11**). Bateson promosse l’introduzione del termine genetica in occasione della terza conferenza internazionale sull’ibridazione e la coltivazione delle piante, tenutasi a Londra nel luglio del 1906, sostenendo che fosse sufficiente ad indicare il lavoro dedicato all’elucidazione del fenomeno dell’eredità e della variazione. Benché si adatti perfettamente a “gene”, quest’ultimo termine venne coniato solo alcuni anni più tardi, nel 1909, da **Wilhelm L. Johannsen** (1857-1927), professore di fisiologia vegetale al Collegio di Agricoltura di Copenaghen. Johannsen affermò che non si trattava di una abbreviazione di genetica, bensì di un richiamo alla teoria di Darwin della pangenesi, basandosi sulla quale de Vries aveva creato a sua volta la parola “pangene”. In effetti, nel 1889, de Vries, uno dei riscopritori del lavoro di Mendel, aveva pubblicato una teoria dell’eredità, che chiamò “pangenesi intracellulare”, un dichiarato riepilogo e miglioramento delle idee di Darwin sulla pangenesi. De Vries enfatizzò i singoli caratteri individuali piuttosto che i caratteri delle specie, come invece faceva la maggior parte dei botanici di quel periodo, affermando che venivano trasmessi attraverso unità materiali, che chiamò pangeni, un perfezionamento delle gemmule darwiniane. Egli promuoveva l’idea che un particolare pangene fosse responsabile di un particolare carattere, indipendentemente dalla specie in cui appariva. Questa nozione conteneva la base dell’odierna ricerca che utilizza specie modello di animali e piante per trarre conclusioni di carattere generale. Assieme a gene, Johannsen introdusse due altre parole che si sarebbero ben presto dimostrate centrali nel nascente dizionario: “fenotipo”, per indicare l’aspetto di un organismo e “genotipo”, riferito alla sua costituzione genetica, distinzione che Mendel aveva intuito mezzo secolo prima.

Ancora adesso un gene è spesso indicato come “fattore mendeliano” con il significato di determinante genetico di una caratteristica di un organismo. In termini molecolari un gene può invece essere definito come una entità o unità ereditaria funzionale costituita da una frazione della molecola del DNA che codifica per uno specifico RNA o che presiede alla sintesi di una particolare catena polipeptidica. Il sito specifico dove il gene è localizzato nel cromosoma prende il nome di *locus*. Il termine “cromosoma” è antecedente sia alla scoperta dei fattori mendeliani che della concatenazione genica: questo termine venne infatti introdotto nel 1888 dall’anatomista tedesco W. von Waldeyer. Li chiamò cromosomi per la loro sensibilità verso i coloranti usati per le analisi al microscopio. In realtà i cromosomi erano stati individuati al microscopio da diversi botanici, tra cui Nägeli, intorno al 1840, ma nessuno capì esattamente cosa stava osservando (**Fig. 1.12**).

Bateson introdusse anche altri termini: “zigote” (dal greco *zygotós*, con significato di aggiogato) per descrivere l’uovo fecondato, cioè l’organismo risultante dalla fusione dei gameti; “omozigote” (da *homós*, lo stesso) e “eterozigote” (da *eteros*, differente) per descrivere rispettivamente forme pure e ibride; e “allelomorfo” (un composto di *allélon*, di un altro, e *morphé*, forma) per descrivere le diverse versioni di un particolare carattere. In seguito questo termine venne abbreviato in allele, la parola tuttora usata per descrivere le molte possibili forme di un gene. Per differenziare le generazioni in un esperimento – che Mendel chiamava prima generazione ibrida, seconda generazione ibrida e così via – Bateson introdusse una nuova notazione utilizzata ancor oggi: la lettera P per indicare l’ascendenza (P₁ per i genitori, P₂ per i nonni e P₃ per i bisnonni) e la lettera F a rappresentare la discendenza (F₁ per i figli, cioè per la prima generazione filiale, F₂ per i nipoti, cioè per la seconda generazione filiale, F₃ per i pronipoti, ecc.).

Fu, invece, Mendel ad introdurre i termini “dominatore” e “recessivo” per discriminare le due forme antagoniste di ognuno dei caratteri che stava studiando. Il carattere dominatore – che oggi è chiamato dominante – era quello mostrato da tutti gli ibridi e da tre quarti della loro discendenza, mentre il carattere recessivo era quello

completamente scomparso nella prima generazione filiale che riappariva in un quarto della seconda. Considerando un carattere alla volta, Mendel lo rappresentò con una lettera dell'alfabeto: fece uso di una singola lettera per rappresentare ciascuna caratteristica, con una lettera maiuscola (A) per indicare dominanza, una lettera minuscola (a) per indicare recessività e una di ciascuna (Aa) per indicare l'ibrido. Mentre altri botanici, compreso Nägeli nel 1865, avevano usato lettere per rappresentare determinate caratteristiche, Mendel fu il primo ad utilizzare lettere binomiali per gli ibridi: in questo modo segnalò di aver compreso che un ibrido possedeva due fattori (*elemente*) di differenziazione per ciascuno dei caratteri (*merkmale*), provenienti ognuno da un genitore, uno dei quali però risultava nascosto e riappariva in generazioni successive (**Fig. 1.13**). Tuttavia, egli non avvertì alcuna necessità di raddoppiare le lettere nelle piante pure parentali (AA e aa).

$$\begin{aligned}
 &ABC + ABc + 2ABCc + \\
 &2AbCc + 2aBCc + 2abCc + 2ABbC + 2ABbc + 2aBbC + 2aBbc + \\
 &2AaBC + 2AaBc + 2AabC + 2Aabc + 4ABbCc + 4aBbCc + \\
 &4AaBCc + 4AabCc + 4AaBbC + 4AaBbc + 8AaBbCc.
 \end{aligned}$$

Fig. 1.13 – Terminologia binomiale usata da Mendel nella pubblicazione del 1866, *Mendel's Museum of Genetics*, Brno.

Fin dai primi incroci tra piante ibride per un carattere ottenute impollinando, ad esempio, varietà pure di pisello a semi lisci con altre a semi rugosi, oppure varietà pure di pisello a semi gialli con altre a semi verdi, Mendel notò che un rapporto numerico poteva descrivere la proporzione tra piselli con carattere dominante e quelli con carattere recessivo: il rapporto di 3:1. Continuando gli esperimenti di ibridazione per altre generazioni, Mendel poté raffinare tale rapporto, osservando che otteneva un dominante puro e un recessivo puro per ogni due ibridi, secondo la sua terminologia: $A : 2Aa : a$.

Mendel, tra gli altri, fece incroci tra piante antagoniste non per uno, ma per due caratteri, scegliendo ad esempio piante che differivano per forma e colore del seme: i doppi dominanti erano tondi-gialli e i doppi recessivi rugosi-verdi. L'ipotesi di Mendel era che gli ibridi trasportassero in sé i determinanti dei loro genitori recessivi, cioè per il rugoso e il verde.

In un primo momento, effettuò incroci tra le piante diibride ($AaBb$) della discendenza. Nella generazione filiale di questi incroci, risalì dapprima alla sua serie originale di combinazioni, quella derivata dai singoli incroci monoibridi, cioè $Aa \times Aa$ e $Bb \times Bb$. Il prodotto della prima combinazione, per Mendel, $A + 2Aa + a$, poteva poi venire moltiplicato per il prodotto della seconda combinazione riguardante l'altra caratteristica, rappresentato, sempre secondo la terminologia di Mendel, da $B + 2Bb + b$. Era una semplice algebra che faceva uso della proprietà distributiva della moltiplicazione, per giungere ad un'espressione che rappresentava un incrocio tra piante che erano ibride per due caratteri distinti. Quella espressione, derivata da $(A + 2Aa + a) \times (B + 2Bb + b)$, era: $AB + Ab + aB + ab + 2ABb + 2aBb + 2AaB + 2Aab + 4AaBb$. Il tutto sarebbe stato semplificato nel rapporto 9:3:3:1 molto tempo dopo. Il rapporto significava che, basandosi sulla sola apparenza, per ogni nove individui che mostrano caratteri dominanti sia per A che per B , se ne hanno tre che sono dominanti per A e recessivi per b , tre che sono dominanti per B e recessivi per a e uno che è recessivo sia per a che per b . Di fatto, non fu Mendel ad esprimere questo rapporto, ma uno dei suoi riscopritori, Correns.

In seguito Mendel utilizzò i suoi doppi ibridi, o diibridi ($AaBb$), per effettuare incroci a ritroso, o reincroci, sia sui piselli puri dominanti che su quelli puri recessivi. Metà dei diibridi li incrociò con polline proveniente dai doppi dominanti (AB per Mendel, o $AABB$, come viene scritto adesso) e metà con polline proveniente dai doppi

recessivi (*ab* per Mendel, o *aabb*, in versione attuale). Secondo l'ipotesi di Mendel, i diibridi avrebbero dovuto produrre quattro tipi di gameti in proporzioni uguali: *AB*, *Ab*, *aB* e *ab*. Reincrociati con i genitori con doppia dominanza omozigote (*AABB*), gli individui della progenie sarebbero dovuti apparire tutti uguali, indipendentemente da quale gamete dell'ibrido era stato coinvolto. Questo perché in ogni caso il gamete *AB* fornito dal doppio dominante avrebbe nascosto qualsiasi carattere recessivo celato da un ibrido. Per contro, un reincrocio con i genitori con doppia recessività (*aabb*) avrebbe dovuto portare a quattro tipi di progenie, ciascuno diverso nell'aspetto, il quale avrebbe rivelato immediatamente quale gamete ibrido era coinvolto nella sua formazione, perché il genitore puro non contiene nessuno dei caratteri dominanti. In questo caso Mendel usò il rapporto 1:1:1:1 per indicare i risultati del reincrocio con doppi recessivi.

Nel suo lavoro Mendel descrisse due principi centrali che sarebbero poi passati alla storia come leggi portanti il suo nome. Prima vennero le osservazioni su ciò che fu in seguito definita segregazione: alcuni fattori, non ancora identificati, nelle cellule germinali erano in grado di trasmettere i caratteri dai genitori ai figli, fattori che erano in grado di separarsi attraverso i gameti dei genitori e passare così alla generazione successiva. Deduceva, inoltre, che le cellule sessuali in qualche modo subivano un cambiamento, poiché se prima possedevano una doppia dose di fattori ereditari, in seguito ne avevano una soltanto. Altre osservazioni collegate, che sarebbero poi state riassunte nella legge dell'assortimento indipendente, erano che ciascun fattore che passa dal genitore al figlio è trasmesso in modo indipendente da ogni altro fattore. Correns, forse il più perspicace dei riscopritori del lavoro di Mendel, fu il primo ad usare la terminologia “leggi di Mendel”, e ad assegnare a tali principi i nomi di “legge della segregazione” e “legge dell'assortimento indipendente”. Egli scovò, inoltre, un termine ancora migliore di quelli usati da Mendel per indicare l'unità discreta che poteva venire trasmessa da genitore a figlio: *anlage*, che significa “determinante” e che implica un'associazione responsabile non della caratteristica come tale, ma del codice che porta a quella caratteristica.

Fu tuttavia compito di un genetista americano, **Thomas Hunt Morgan** (1866-1945), della Columbia University, più di dieci anni dopo, separare definitivamente i due concetti (Fig. 1.14). E pensare che egli in principio era un antimendeliano dichiarato, sostenitore del motto “una volta incrociati, per sempre mischiati”! La sua concezione sull'eredità cambiò radicalmente all'inizio del 1910, quando tra tutti i suoi individui di *Drosophila* dagli occhi rossi, ne comparve uno con gli occhi bianchi. Morgan incrociò il maschio dagli occhi bianchi con femmine dagli occhi rossi ed ottenne milletrecentoventisette ibridi, tutti con occhi rossi. Il risultato era coerente con la legge di Mendel della dominanza: il carattere recessivo (occhi bianchi) spariva negli ibridi della prima generazione filiale. Quando questi ibridi vennero incrociati tra loro, nella seconda generazione filiale si ottennero risultati che confermavano la legge di Mendel della segregazione: circa tre quarti dei moscerini aveva occhi rossi e un quarto occhi bianchi secondo un rapporto mendeliano di circa 3:1 (Fig. 1.15). Queste scoperte costituiscono una svolta determinante per la neoformata scienza della genetica. In omaggio alla “teoria della mutazione” di de Vries, Morgan chiamò il carattere occhi bianchi una “mutazione” anche se il termine nascondeva una differenza sostanziale nell'intenzione. Per de Vries, una mutazione era interessante solo per ciò che poteva dirgli circa l'evoluzione, mentre per Morgan una mutazione era interessante solo per quanto poteva indicargli sul gene, inteso come unità ereditaria della variazione discontinua alla base di un cambiamento drastico di forma visibile.

Nel 1904, **Walter Sutton** (1877-1916) e **Theodor Boveri** (1862-1915), un americano e un tedesco che non si conobbero mai, trovarono i loro nomi uniti in una delle più sconvolgenti acquisizioni della biologia di inizio Novecento: la “teoria cromosomica



Fig. 1.14 – Thomas Hunt Morgan (1866-1945).

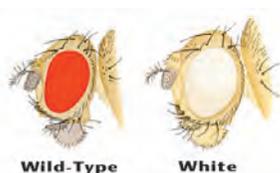


Fig. 1.15 – Colore dell'occhio in *Drosophila melanogaster*: occhi rossi (tipo normale, *wildtype*) e bianchi (mutante, *white*).

dell'eredità" (**Fig. 1.16**). Sutton, ancora studente della Columbia University, fu in grado di individuare al microscopio determinati cromosomi prima della divisione cellulare e poté mostrare che quegli stessi cromosomi comparivano, con caratteristiche immutate, ogni volta che una cellula si divideva. La divisione delle cellule somatiche era nota come "mitosi" (dal greco *mítos*, che significa filo, come appare un cromosoma durante la divisione di una cellula). Sutton vide anche che gli stessi cromosomi ricomparivano dopo ogni divisione riduzionale o "meiosi" (dal greco *meiosis*, diminuzione): il processo che crea cellule con numero cromosomico dimezzato, che diventano infine gameti maschili o femminili. Egli concluse, nel 1902, che l'associazione di cromosomi materni e paterni in coppie – quelli che oggi conosciamo come "cromosomi omologhi" aventi le stesse dimensioni, la stessa morfologia e gli stessi geni nella stessa posizione o *locus* – e la loro successiva separazione durante la divisione per riduzione, possono costituire la base fisica della legge mendeliana dell'eredità. Più o meno nello stesso periodo, Boveri, professore di zoologia e anatomia comparata all'Università di Würzburg osservò che il numero delle coppie di cromosomi è prefissato nell'uomo così come è invariabile per ciascun organismo vivente, sia animale che vegetale. Considerate insieme, le due scoperte indicarono che importanti informazioni ereditarie risiedevano nei cromosomi e che venivano trasportate, come aveva suggerito l'articolo di Mendel, come unità o fattori.



Fig. 1.16 – Walter Sutton (1877-1916) e Theodor Boveri (1862-1915).

1.4 Teoria cromosomica dell'eredità

Un decisivo avanzamento delle conoscenze nel settore della genetica fu possibile in seguito alla spiegazione concettuale di come i cromosomi portano e trasmettono i determinanti genetici che governano la manifestazione dei caratteri. La relazione fra la trasmissione dei cromosomi ed il meccanismo di eredità dei caratteri di un individuo, nota come teoria cromosomica dell'eredità fu proposta all'inizio del XX secolo in conseguenza dello sviluppo di diverse linee di indagine scientifica.

Sappiamo che Mendel analizzò la trasmissione dei caratteri dai genitori alla discendenza dimostrando l'esistenza di precisi modelli di eredità riconducibili alla segregazione e all'assortimento indipendente. Qualche anno più tardi, un altro settore di ricerca riguardò la base materiale dell'eredità. A. Weismann e K.W. Nägeli sostenevano che l'eredità avesse una base chimico-fisica ben precisa e formularono l'ipotesi che all'interno delle cellule viventi esistesse una sostanza responsabile della trasmissione dei caratteri dai genitori alla discendenza. Nägeli, in particolare, ipotizzò che i due individui parentali potessero fornire uguali quantità di tale sostanza alla discendenza. La possibile esistenza di un materiale genetico, chiamato "idioplasma" da Nägeli e "plasma germinale" da Weismann, indusse molti scienziati a cercare all'interno delle cellule la parte e la base materiale dove era localizzato il materiale genetico. Nella seconda metà del XIX secolo parecchi scienziati rivolsero la loro attenzione a questo quesito. Tra questi particolare merito è stato riconosciuto al biologo tedesco **Oscar Hertwig** (1849-1922), al botanico tedesco **Eduard Strasburger** (1844-1912) ed al biologo tedesco **Walter Flemming** (1843-1905) i quali, tra il 1884 e il 1885, dimostrarono che i nuclei contengono i cromosomi e ipotizzarono che i portatori del materiale genetico fossero proprio i cromosomi (**Fig. 1.17**).

Nel XIX secolo i progressi compiuti nella microscopia permisero ai biologi di osservare e studiare la struttura e lo sviluppo della cellula, dei tessuti e degli organi. Una serie di studi dimostrò che i caratteri dipendono dalla continuità delle cellule non solo durante il ciclo vitale di un organismo, ma anche nel passaggio da una generazione a quella successiva. La prova finale a favore della teoria cromosomica dell'eredità venne fornita dalle indagini microscopiche dei processi di formazione dei gameti (meiosi), di

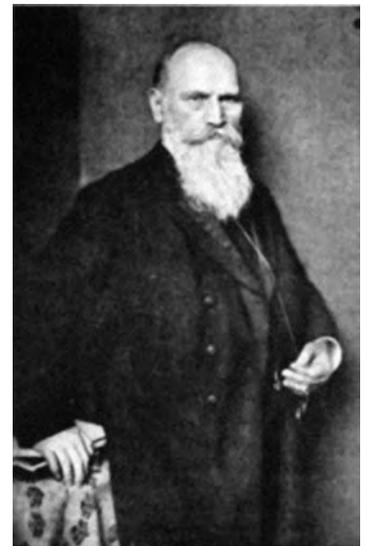
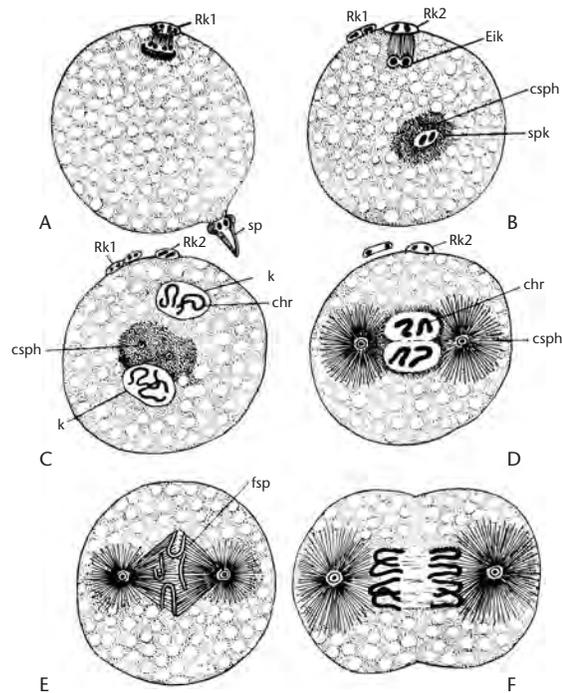


Fig. 1.17 – W. Waldeyer, nel 1888 coniò il termine "cromosoma": deriva dal greco e significa corpo colorato.

Fig. 1.18 – Schema della fecondazione in *Parascaris equorum* (sin. *Ascaris megalocephala*), verme intestinale dei cavalli, da T. Boveri.



divisione cellulare (mitosi) e di fecondazione (**Fig. 1.18**). Nel 1876, Hertwig osservò che il nucleo dello spermatozoo entra nell’uovo durante la fecondazione negli animali. Un anno dopo, Strasburger osservò che anche nelle piante, durante la fecondazione, è il solo nucleo spermatico che penetra nella cellula uovo. Determinante fu poi la descrizione del processo mitotico da parte di Flemming nel 1878 che in seguito condusse studi molto particolareggiati sulla cariocinesi delle cellule animali.

Dopo la brillante intuizione di Wilhelm Roux – che individuò nella ripartizione in parti uguali delle “qualità nucleari” alle cellule figlie l’evento più importante della mitosi – determinante ai fini della formulazione della teoria cromosomica dell’eredità fu la dimostrazione che Edouard van Beneden fornì nel 1883 circa il numero cromosomico dimezzato (aploide) nei gameti capace di essere ripristinato a numero diploide normale dalla fecondazione. È stato tale risultato che spinse Hertwig, Strasburger e Flemming a formulare l’ipotesi che i cromosomi siano i portatori del materiale genetico ereditario.

Agli inizi del 1900, quando fu riscoperta l’opera di Mendel, parecchi scienziati notarono parallelismi sorprendenti tra la segregazione e l’assortimento indipendente dei caratteri, da un lato, ed il comportamento dei cromosomi durante la meiosi, dall’altro. Nel 1904, W. Sutton e T. Boveri proposero indipendentemente l’uno dall’altro la teoria cromosomica dell’eredità che, mettendo in relazione il comportamento dei cromosomi con l’eredità dei caratteri descritta da Mendel, rappresentò un passo determinante per lo sviluppo della genetica. Due principali componenti del progresso in biologia furono probabilmente decisive al riguardo. Innanzitutto, i citologi, esaminando le cellule al microscopio, avevano accumulato informazioni sufficienti per spiegare la trasmissione ed il comportamento degli astratti “fattori” mendeliani. Inoltre, i biologi avevano cominciato ad apprezzare la matematica come un importante strumento per l’analisi dei dati registrati in forma numerica a supporto della ricerca sperimentale.

La riscoperta del mendelismo coincide con la pubblicazione della seconda edizione di *The cell in development and heredity* [La cellula nello sviluppo e nell’eredità], da parte di **Edmund B. Wilson** (1856-1939). Tale volume, pubblicato per la prima volta nel 1896 ed incentrato sulla citologia animale, costituì per molti anni un testo

di riferimento ed è considerato una pietra miliare per la nascita della genetica poiché per la prima volta vennero messe in relazione le cellule con l'eredità.

È interessante rimarcare ancora una volta che le osservazioni e le intuizioni di Sutton e Boveri permisero di formulare la teoria cromosomica dell'eredità un paio di anni dopo che de Vries, Correns e Tschermak avevano confermato i principi mendeliani dell'eredità. Tale teoria dette la spiegazione citologica della segregazione e dell'assortimento indipendente e costituì la prima moderna interpretazione della relazione tra cromosomi, geni e caratteri. In particolare, secondo la teoria cromosomica dell'eredità, il meccanismo di eredità dei caratteri è spiegabile con le modalità di trasmissione dei cromosomi durante la gametogenesi e la fecondazione. Ritenendo, a ragione, che il materiale genetico fosse contenuto nei cromosomi, Sutton e Boveri riuscirono a fornire una spiegazione dei principi dell'eredità di Mendel, rendendosi conto che la segregazione e l'assortimento indipendente dei caratteri corrispondevano al comportamento dei cromosomi durante la meiosi. In sostanza, la teoria cromosomica dell'eredità fu in grado di spiegare come la trasmissione cellulare dei cromosomi sia alla base del passaggio dei fattori mendeliani cioè dei geni, dai genitori alla discendenza. I principi fondamentali sui quali venne basata questa teoria sono i seguenti: i) i cromosomi contengono il materiale genetico ereditario; ii) i cromosomi vengono replicati e trasmessi da cellula a cellula durante lo sviluppo pluricellulare di un organismo e di generazione in generazione dai genitori alla discendenza; iii) ogni cromosoma conserva la sua individualità durante la divisione cellulare e la formazione dei gameti; iv) nella maggior parte degli eucarioti, il nucleo delle cellule somatiche ha un numero cromosomico diploide, cioè i cromosomi sono presenti in coppie omologhe: un membro di ciascuna coppia viene ereditato dalla madre e l'altro membro dal padre; v) durante la meiosi, i due membri di ciascuna coppia di omologhi si separano, cioè segregano, andando a finire in due distinti nuclei figli: ciò significa che i gameti sono aploidi, cioè contengono una sola serie di cromosomi; vi) durante la gametogenesi le coppie di cromosomi di tipo diverso si comportano autonomamente l'una dall'altra e pertanto segregano in modo indipendente; vii) ciascun genitore fornisce una sola serie di cromosomi alla sua discendenza: la serie di cromosomi omologhi di origine materna e quella di origine paterna sono funzionalmente equivalenti, e ciascuna serie possiede un corredo completo di determinanti genetici.

In quegli stessi anni, molti biochimici avevano cominciato a studiare le vie metaboliche delle cellule, cioè quelle serie di conversioni di una molecola in un'altra con ogni singolo passaggio controllato da una diversa proteina enzimatica capace di catalizzare specificatamente una particolare reazione chimica. Nel 1902, un medico inglese, **Archibald Garrod** (1857-1936) scoprì la prima malattia genetica dell'uomo, mettendo così in relazione il materiale ereditario con particolari reazioni chimiche (**Fig. 1.19**). Garrod studiò pazienti con un difetto riguardante la capacità di metabolizzare certi composti e si interessò in modo particolare della malattia chiamata alcaptonuria. Questa malattia è determinata dall'accumulo nel corpo di quantità elevate di acido omogentisinico (detto anche alcaptone), escreto poi con le urine che diventano nere quando esposte all'aria. Egli suggerì che il difetto fosse dovuto alla mancanza di un enzima, una ossidasi specifica, e studiando gli alberi genealogici dei pazienti mise anche in evidenza il modello di eredità, riconducibile ad un carattere recessivo. In seguito a queste osservazioni, Garrod propose l'esistenza di una relazione tra l'eredità della malattia e l'eredità dell'enzima difettoso, ipotizzando l'esistenza di un collegamento tra fattori mendeliani e produzione di enzimi responsabili della manifestazione del carattere (**Fig. 1.20**). Dato che a quell'epoca la



Fig. 1.19 – Archibald Garrod (1857-1936).

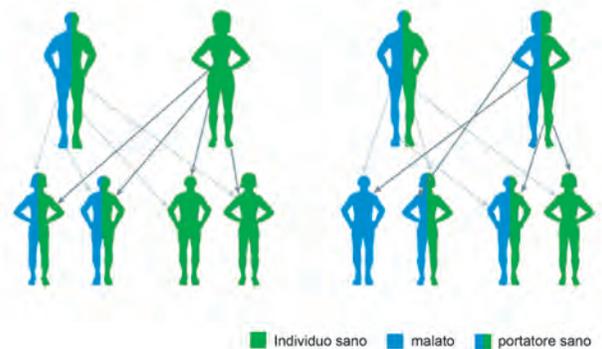


Fig. 1.20 – Eredità dell'alcaptonuria nell'uomo.

struttura e la funzione del materiale genetico erano del tutto sconosciute, la sua idea fu particolarmente perspicace.

Nel frattempo, W. Bateson, seguendo il nuovo impulso dato dalla riscoperta del lavoro di Mendel, dimostrò che il mendelismo poteva essere applicato anche agli animali e nel 1902 riportò i risultati dei suoi esperimenti condotti sui polli. A Bateson va riconosciuto il grande merito di aver introdotto il termine *genetica* per indicare la scienza dell'eredità. Negli anni successivi al lavoro di Bateson, molti ricercatori dimostrarono l'applicabilità generale delle leggi di Mendel a tutti gli organismi eucarioti che si riproducono per via sessuale.

Con la formulazione della teoria cromosomica dell'eredità nacque una nuova disciplina: la citogenetica, originatasi proprio dalla combinazione della citologia con la genetica. Di fatto, la citologia prese avvio molto prima della genetica quando l'inglese **Robert Hooke** (1635-1703) e l'italiano **Marcello Malpighi** (1628-1694) dimostrarono che i tessuti animali e vegetali possedevano una struttura di base comune rappresentata dalla cellula. Le conoscenze acquisite nell'arco di un secolo portarono nel 1838 alla formulazione della teoria cellulare da parte di T. Schwann e M. Schleiden. Molti anni dopo, intorno al 1910-11, furono gli studi di Thomas H. Morgan e collaboratori ad avviare in modo definitivo verso la dimostrazione che le unità ereditarie soggiacenti ai caratteri erano ubicate sui cromosomi. E la citogenetica nacque proprio quando venne provata la localizzazione dei geni sui cromosomi. Da allora lo sviluppo di questa disciplina è proseguito ininterrottamente, seguendo il perfezionamento della microscopia



Fig. 1.21 – Cariotipo umano: 22 coppie di autonomi e due cromosomi sessuali, X e Y (www.genome.org).

ottica, prima, e della microscopia elettronica, poi, e di tecniche sempre più fini per l'analisi dell'organizzazione e della composizione dei cromosomi. Ad esempio, fu scoperto che nei procarioti (batteri) il materiale genetico si trova organizzato in un unico cromosoma la cui struttura è molto semplice se paragonata a quella del cromosoma degli eucarioti (**Quadro 1.2**). Nelle cellule di questi ultimi, invece, il materiale genetico si trova organizzato in più cromosomi localizzati all'interno del nucleo: l'insieme di tutti i cromosomi di una cellula venne definito *cariotipo* (**Fig. 1.21**). Analizzando molti organismi si constatò che il cariotipo varia con la specie ma risulta costante in una specie: tale caratteristica è

mantenuta dal modo con cui i cromosomi si replicano e si dividono durante la mitosi (per la moltiplicazione delle cellule somatiche) e la meiosi (per la formazione delle cellule germinali). L'analisi della struttura dei cromosomi, unitamente alla misura della loro dimensione, è eseguita in momenti particolari della divisione nucleare, allo stadio di pro-metafase, quando i cromosomi sono molto compatti e rendono visibile la loro morfologia. L'insieme delle coppie di cromosomi omologhi disposte in ordine decrescente di lunghezza costituisce il *cariogramma* di una specie.

Tra le scoperte più significative della storia della citogenetica bisogna senza dubbio ricordare quella di Curt Stern, Harriet Creighton e Barbara McClintock concernente la dimostrazione che il *crossing-over* interessa filamenti di DNA di cromosomi omologhi replicati e quelle di Roy Britten e collaboratori riguardante l'esistenza di DNA moderatamente ed altamente ripetitivo nei cromosomi degli organismi superiori.

Negli anni 1960-70 vennero messe a punto le prime tecniche di *bandeggio* per la visualizzazione sul cromosoma di una caratteristica colorazione a bande secondo un modello risultante dalla metodologia adottata e dal ruolo funzionale delle diverse regioni. Il *bandeggio cromosomico* ha caratterizzato una fase cruciale della storia della citogenetica, portando ad un sostanziale avanzamento delle conoscenze sulla struttura

cristallografica. Egli comprese che la cromatina delle cellule eucariotiche presenta un motivo strutturale ricorrente che si identifica con il nucleosoma. Così come fu ipotizzato da **Roger David Kornberg** (1947-) nel 1974, il nucleosoma è un elemento strutturale risultante da una aggregazione globulare di DNA avvolto attorno ad un nucleo di proteine (istoni). La **Fig. 1.23** riporta una rappresentazione schematica dei diversi livelli di organizzazione e impacchettamento del DNA di un cromosoma metafaseico. La parte centrale del nucleosoma risultò composta da un nucleo proteico che contiene otto subunità ovvero due copie di ciascuno di quattro istoni differenti: H2A, H2B, H3 e H4, mentre un segmento di DNA è avvolto attorno al nucleo proteico. Nella maggior parte delle cellule eucariotiche, esternamente al nucleosoma, si identificò l'istone H1 che serve come proteina di collegamento tra il DNA del nucleo centrale e il DNA di connessione (**Fig. 1.24**). Un ulteriore impacchettamento del DNA si otterrà grazie all'azione esercitata da questo istone che promuove la compattazione dei singoli nucleosomi, originando così una struttura a spirale a cui venne dato il nome di fibra fondamentale. In seguito si scoprirà che un terzo livello di organizzazione è basato su un meccanismo che compatta ulteriormente il DNA cromosomico attraverso la formazione di una serie di domini ad anse radiali indipendenti. Mediante questo meccanismo, la cromatina è organizzata in anse che sono ancorate ad una impalcatura cromosomica, lo *scaffold*. Subito si ipotizzò che l'organizzazione del DNA in anse poteva essere importante non solo per il compattamento della fibra di cromatina, ma anche per la regolazione dell'espressione genica.

Negli ultimi anni, con l'avvento della biologia molecolare, è stato possibile non solo studiare dettagliatamente la struttura della cromatina, ma anche valutare le relazioni citogenetiche tra genomi e localizzare singoli cromosomi nei genomi e perfino singoli geni nei cromosomi.

Quadro 1.2 – Organismi sperimentali (procarioti ed eucarioti) per la ricerca genetica

Tutti gli organismi sono composti da una o più cellule, che hanno in comune molte caratteristiche strutturali e funzionali. Tuttavia, esistono organismi formati da cellule a struttura relativamente semplice ed altri formati da cellule a struttura più complessa. I due tipi di cellula sono chiaramente identificabili e portano alla distinzione tra organismi procariotici (letteralmente "con nucleo primitivo"), tutti unicellulari, con cellule a struttura più semplice e organismi eucariotici (letteralmente "con nucleo ben definito"), che possono essere sia unicellulari che pluricellulari, e sono formati di cellule a struttura più complessa.

I procarioti, non hanno una membrana nucleare che circonda il materiale ereditario, caratteristica che li distingue dagli eucarioti. A questo gruppo appartengono tutti i batteri, organismi di forma diversa, per lo più unicellulari, molto piccoli con diametro compreso tra 0,1 e 10 μm . I batteri presentano una parete cellulare rigida, esterna alla membrana cellulare, e contengono DNA organizzato in un unico cromosoma. I batteri più studiati dai genetisti appartengono al gruppo degli eubatteri, che sono i batteri presenti comunemente negli organismi viventi. Quello più studiato è *Escherichia coli*, un batterio a forma di bastoncino che si trova comunemente nell'intestino umano. L'uso di tale batterio nella ricerca ha permesso la comprensione della biologia molecolare della cellula e lo sviluppo della tecnologia del DNA ricombinante. L'altro gruppo è rappresentato dagli archeobatteri

che generalmente vivono nel terreno e nelle acque in condizioni molto più inospitali.

Gli eucarioti, oltre ad avere un nucleo ben definito dove si trova localizzato il DNA, sono composti di una o più cellule di maggiori dimensioni, caratterizzate da una maggiore complessità. In particolare, tale complessità è evidenziata dalla compartimentalizzazione di molti processi in appositi organelli subcellulari, separati dal resto del citoplasma da una propria membrana. A differenza dei procarioti, negli eucarioti il DNA è complessato a proteine e organizzato in più cromosomi. All'interno del nucleo c'è il nucleolo, un corpo specifico composto di RNA e proteine che rappresenta il sito della sintesi dei ribosomi. La cellula vegetale si distingue da quella animale per la presenza della parete cellulare, che costituisce un involucro di protezione e sostegno. Il citoplasma, delimitato dalla membrana plasmatica, contiene un gran numero di organelli, alcuni di particolare interesse per i genetisti: i ribosomi, i mitocondri e i cloroplasti. Tutti e tre sono avvolti da una doppia membrana e contengono acidi nucleici. I ribosomi, sono organelli subcellulari composti di proteine e di RNA (rRNA) che possono trovarsi liberi nel citoplasma o associati al reticolo endoplasmatico. Nei ribosomi legati al reticolo endoplasmatico avviene la sintesi delle proteine che sono secrete dalla cellula o delle proteine che vengono localizzate nella membrana cellulare o in particolari vacuoli. I ribosomi liberi svolgono, invece, un ruolo fondamentale nella sintesi delle altre proteine. I mitocondri svolgono un ruolo fondamentale nei flussi energetici cellulari: demoliscono i grassi e i carboidrati per otte-

nere molecole più piccole e liberare energia. Il materiale genetico presente nei mitocondri è costituito da una molecola circolare di DNA a doppia elica (mDNA). I cloroplasti, tipici delle cellule vegetali, rappresentano la sede dove avviene il processo di fotosintesi e contengono oltre alla clorofilla, materiale genetico nella forma di DNA circolare a doppia elica (cpDNA). Una rappresentazione schematica di una cellula vegetale con le caratteristiche organizzative ed i principali organelli è riportata in **Fig 1.25**.

I principi dell'eredità vennero stabiliti in seguito agli esperimenti condotti da Mendel su *Pisum*

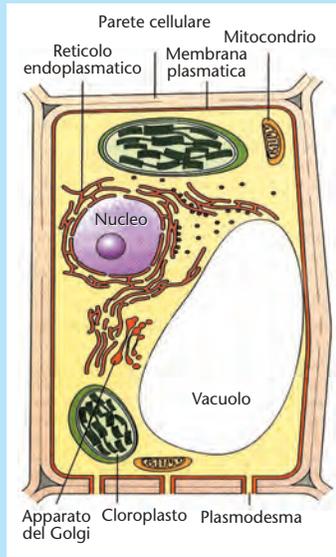


Fig 1.25 – Rappresentazione schematica di una cellula vegetale (da: M.J. Chrispeels 2003, modificata).

sativum (pisello). Attualmente i genetisti nelle loro ricerche impiegano prevalentemente i seguenti organismi pluricellulari: *Drosophila melanogaster* (moscerino della frutta), *Caenorhabditis elegans* (nematode), *Neurospora crassa* (muffa del pane), *Arabidopsis thaliana* (specie erbacea appartenente alla famiglia delle Brassicaceae), *Zea mays* (mais) e *Mus musculus* (topo). Tra quelli unicellulari, altri organismi quali *Saccharomyces cerevisiae* (lievito di birra), *Chlamydomonas reinhardtii* (alga azzurra), *Tetrahymena* (protozoo) e *Paramecium* (paramecio) hanno contribuito a importanti scoperte genetiche.

Tra gli organismi che hanno contribuito alla definizione dell'organizzazione cromosomica, ponendo le basi genetiche dell'eredità un posto di rilievo è occupato dalla *Drosophila*. T.H. Morgan scelse il moscerino della frutta perché è facilmente allevabile in bottiglie ed è provvisto di sole quattro paia di cromosomi, tra l'altro di dimensioni considerevoli e quindi perfettamente visibili anche con microscopi di scarsa potenza. Questo insetto rappresentava un organismo sperimentale modello per analisi genetiche poiché è in grado di raggiungere la maturità sessuale in una settimana e di produrre una discendenza molto numerosa (diverse centinaia di unità). Nel mondo vegetale, *Arabidopsis* rappresenta certamente la specie più impiegata per studi di genetica molecolare e di genomica. Tale pianta è infatti caratterizzata da dimensioni molto ridotte (pochi centimetri), da un ciclo vitale di circa 2 mesi e da un genoma di appena 7×10^7 pb.

1.5 Concatenazione e trasposizione dei geni

La scoperta dell'associazione genica si deve agli studi condotti dai biologi inglesi, nonché coniugi, W. Bateson ed Edith S. Saunders e da R.C. Punnett impiegando il pisello odoroso (*Lathyrus odoratus*). Nel 1905, Bateson e collaboratori individuano ciò che inizialmente fu considerata come un'eccezione al principio mendeliano dell'assortimento indipendente: incrociando due linee pure di pisello, una con fiori viola e polline allungato e l'altra con fiori rossi e polline rotondo, produssero una F_1 perfettamente uniforme composta di piante con fiori viola e polline allungato (caratteri dominanti). Passando alla generazione F_2 si accorsero che i caratteri dominanti si ritrovavano insieme più frequentemente di quanto predetto da Mendel e che le due classi parentali erano chiaramente sovrarappresentate, ma non seppero spiegarne il motivo. Bateson e Punnett formularono una complessa spiegazione dei loro risultati, in termini di percentuali mendeliane modificate, che comunque si rivelò sbagliata. La spiegazione corretta, che verrà fornita qualche tempo dopo, è che i geni per il colore del fiore e la forma del polline sono localizzati sullo stesso cromosoma e di conseguenza non c'è segregazione indipendente durante la meiosi poiché tendono ad essere ereditati insieme.

La dimostrazione sperimentale della localizzazione dei geni sui cromosomi fu data da T.H. Morgan nel decennio 1910-1920. Lavorando in *Drosophila melanogaster*, Morgan e collaboratori intuirono anche che i geni dovevano essere localizzati sui cromosomi secondo un ordine lineare privo di discontinuità. Secondo la metafora di Morgan, come "perline su una cordicella".

Nel 1910 Morgan scoprì il primo gene legato al sesso, *white*, un gene per il colore bianco dell'occhio di *Drosophila*. In seguito identificò molti altri mutanti spontanei legati al sesso e ciò gli permise di sviluppare la precorritrice di tutte le mappe genetiche: la mappa del cromosoma X di *Drosophila*. In realtà, il primo carattere

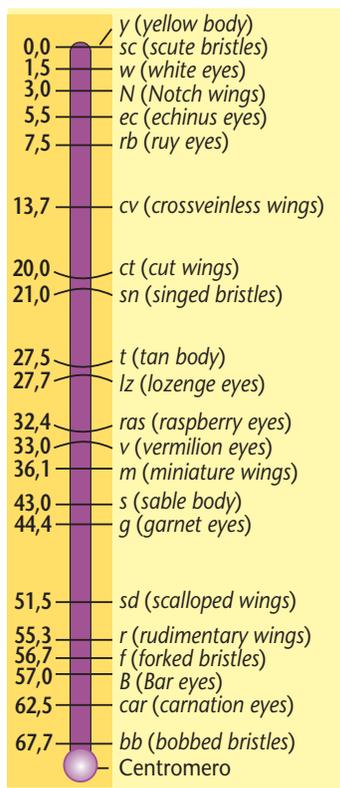


Fig. 1.26 – Gruppo *linkage* del cromosoma X di *Drosophila* (da: P.J. Russell 1998, modificata).

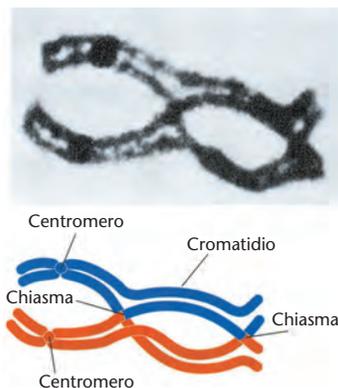


Fig. 1.27 – Evento di ricombinazione tra cromosomi omologhi: formazione di chiasmi e scambio (*crossing-over*) di parti corrispondenti tra cromatidi.

legato al cromosoma X era stato scoperto prima, in *Abraxas*, una farfalla notturna, ma fu difficile combinare i dati genetici con le osservazioni citologiche. I biologi del tempo sapevano già che le femmine erano omogametiche per il cromosoma del sesso, cioè avevano due copie del cromosoma X, mentre i maschi rappresentavano il sesso eterogametico, portando un lungo cromosoma X con uno più corto noto come Y. Non avevano però capito che in *Abraxas* la situazione è diversa e questo creò confusione: la femmina è infatti XY ed il maschio XX. Nella definizione del concetto di “associazione”, o *linkage*, Morgan fu aiutato dalla constatazione che quando una mutazione si mostrava in misura pressoché assoluta nei maschi, era con ogni probabilità determinata da un gene trasportato dal cromosoma X. Questo nel 1913 permise ad Alfred H. Sturtevant (1891-1970), uno studente che lavorava nel laboratorio di Morgan, di mettere a punto la procedura per la costruzione di una mappa genetica di concatenazione basandosi esclusivamente sull’analisi dei dati di segregazione degli esperimenti di incrocio tra moscerini di *Drosophila*. In sostanza, Sturtevant elaborò i dati numerici che aveva raccolto in laboratorio calcolando quanto spesso si manifestavano le mutazioni e soprattutto con quale frequenze potevano essere associate con altre mutazioni, al fine di determinare la posizione dei relativi geni nello specifico cromosoma. Chiamando la prima mutazione scoperta *white*, Morgan introdusse inoltre la convenzione per cui a una mutazione si dà il nome dell’anomalia creata piuttosto che quello più generale del carattere rappresentato, in questo caso il colore degli occhi (**Fig. 1.26**).

Numerosi dati sperimentali permisero di dimostrare che l’associazione non era una proprietà assoluta poiché i geni localizzati sullo stesso cromosoma potevano separarsi nel corso della meiosi e dare nuove combinazioni. Le più importanti acquisizioni raggiunte da Morgan sono le seguenti: i) l’unità della trasmissione ereditaria nella segregazione indipendente è il cromosoma il quale porta necessariamente molti geni; ii) i geni situati nello stesso cromosoma tendono ad essere ereditati in blocco poiché il cromosoma è un’unità relativamente stabile durante il processo meiotico; iii) ciascun cromosoma può essere considerato come un insieme di geni che tendono a rimanere associati nel gruppo *linkage*; iv) l’associazione non è una proprietà assoluta poiché i geni localizzati sullo stesso cromosoma possono separarsi nel corso della meiosi e dare nuove combinazioni. Quest’ultimo fenomeno, chiamato ricombinazione, fu difficile da spiegare a livello genetico. Una delle ipotesi sosteneva che durante la meiosi, con l’appaiamento dei cromosomi omologhi, si poteva verificare uno scambio fisico tra questi che permetteva ai vari geni di ricombinare. Tale ipotesi fu ispirata dalle osservazioni citologiche che suggerivano la possibilità che i cromosomi potessero sovrapporsi e nei punti di contatto scambiarsi pezzi di materiale ereditario: il punto di incrocio fu chiamato *chiasma*, dalla parola greca che significa “croce”. I genetisti cominciarono ad usare il termine “*crossing-over*” per indicare l’evento fisico alla base della separazione e ricombinazione dei geni (**Fig. 1.27**). La moderna rappresentazione grafica dell’organizzazione del cromosoma – linea retta in cui ogni gene è situato in un particolare punto, o *locus*, identificato con un trattino – risale agli esperimenti di Morgan che dimostrarono che il gene *white* responsabile del carattere “occhi bianchi” in *Drosophila* era localizzato sul cromosoma X. In seguito, Sturtevant insieme con altri studenti, che lavoravano nel laboratorio di Morgan, individuarono parecchi geni associati su questo cromosoma riuscendo così a costruire la prima mappa genetica. Solo nel 1931, Curt Stern (1907-1981) riuscì a dimostrare in *Drosophila* che la ricombinazione, alla base del calcolo delle distanze tra i geni, è dovuta alla formazione di chiasmi e a scambi fisici tra cromosomi omologhi. Nello stesso anno, Harriet Creighton (1925-) e Barbara McClintock (1902-1992) dimostrarono che anche nelle piante, usando il mais come specie sperimentale, la ricombinazione genetica è dovuta a scambi di porzioni corrispondenti tra cromosomi omologhi.

Rilevante è l'attribuzione del premio Nobel per la medicina a Morgan nel 1933. Tra le sue opere più significative, si ricordano *The physical basis of heredity* (1919), *The theory of the gene* (1926) e *Embryology and genetics* (1933).

Dopo la scoperta della concatenazione dei geni, la comunità scientifica riteneva che l'ordine dei geni lungo i cromosomi risultasse statica così come l'organizzazione dei genomi. Quando Barbara McClintock, studiando insieme a Marcus Rhoades i meccanismi ereditari in mais, mise in evidenza che alcuni elementi genetici, ciò che a quel tempo lei stessa chiamava “*controlling elements*”, potevano spostarsi da un sito all'altro del genoma fu un duro colpo per la teoria genetica classica. In effetti certi elementi genetici potevano cambiare posizione e produrre mutazioni localizzate agendo sulle sequenze adiacenti causando l'attivazione e la disattivazione dei geni. In particolare, i risultati ottenuti dalla McClintock dimostrarono che la trasposizione tra cromosomi di elementi mobili, in seguito definiti per questo motivo anche “*jumping genes*”, era in grado di spiegare certi modelli di pigmentazione osservati nelle cariossidi di mais (Fig. 1.28). Gli elementi genetici mobili sono adesso chiamati **trasposoni**, intendendosi con questo termine una qualsiasi porzione di DNA capace di liberarsi e reinserirsi cambiando posizione nell'ambito di un genoma. Negli anni successivi a questa scoperta, i trasposoni vennero individuati nei batteri, nei lieviti, nei moscerini e in molte altre piante. Per la scoperta dei trasposoni, nel 1983 Barbara McClintock ricevette il premio Nobel per la medicina.



Fig. 1.28 – Cariossidi di mais violacee (*wild-type*), non colorate (*colorless*) e colorate a settori (*spotted*) risultanti dalla trasposizione di elementi genetici mobili.

Genetica mendeliana

1866	Gregor Johann Mendel pubblica <i>Versuche über Pflanzenhybriden</i> : in base ai risultati ottenuti in otto anni di esperimenti condotti impiegando migliaia di piante di pisello descrive i principi basilari dell'eredità che porteranno alla teoria della segregazione dei geni
1876	Oscar Hertwig osserva il processo di fecondazione negli animali descrivendo che il nucleo dello spermatozoo entra nella cellula uovo
1877	Eduard Strasburger osserva che nelle piante durante la fecondazione è solo il nucleo spermatico che penetra nella cellula uovo
1878	Walter Flemming descrive la mitosi ed in modo particolare la divisione del nucleo (cariocinesi) nelle cellule animali
1883	Wilhelm Roux individua nella ripartizione in parti uguali delle “qualità nucleari” alle cellule figlie l'evento più importante della mitosi
1883	Edouard van Beneden dimostra che il numero cromosomico dimezzato (aploide) dei gameti è ripristinato dalla fecondazione a numero normale e caratteristico (diploide) della specie
1896	Edmund B. Wilson pubblica <i>The cell in development and heredity</i> : per la prima volta vengono messe in relazione le cellule con l'eredità
1900	Hugo de Vries, Karl Erich Correns e Erich von Tschermak ottengono in modo indipendente e impiegando diverse specie vegetali gli stessi risultati riportati da Mendel: ha inizio la riscoperta del lavoro del padre della genetica
1901	Thomas Montgomery osserva che i cromosomi materni e quelli paterni si appaiano tra loro durante la meiosi
1902	William Bateson traduce in Inglese il lavoro di Mendel e dimostra che il “mendelismo” può essere applicato anche agli animali
1902	Archibald Garrod scopre l'alcaptonuria, una malattia genetica dell'uomo: mette in relazione per la prima volta il materiale ereditario con una particolare reazione chimica
1904	Walter Sutton e Theodor Boveri formulano la “teoria cromosomica dell'eredità”: l'associazione di cromosomi materni e paterni in un numero di coppie prefissato per ciascun organismo vivente e la loro successiva separazione durante la meiosi costituisce la base fisica della legge mendeliana dell'eredità
1906	William Bateson conia il nome della nascente disciplina scientifica: la “Genetica”
1909	Wilhelm Johannsen introduce il termine “gene” per indicare le unità materiali di trasmissione dei caratteri
1911	Thomas Hunt Morgan dimostra la validità del mendelismo studiando la trasmissione del carattere colore degli occhi in <i>Drosophila melanogaster</i> , introduce il termine “mutazione” e fornisce la prova sperimentale della localizzazione dei geni sui cromosomi
1913	Alfred H. Sturtevant costruisce la prima mappa genetica basandosi esclusivamente sull'analisi dei dati di segregazione degli esperimenti di incrocio tra moscerini di <i>Drosophila</i>
1913	Eleanor E. Carothers descrive l'assortimento indipendente delle coppie di cromosomi omologhi durante la formazione dei gameti
1931	Curt Stern dimostra in <i>Drosophila</i> che la ricombinazione genetica è dovuta alla formazioni di chiasmi e a scambi fisici tra cromosomi omologhi (“crossing-over”)
1931	Harriet Creighton e Barbara McClintock dimostrano che anche nelle piante (<i>Zea mays</i>) la ricombinazione genetica è dovuta a scambi di porzioni corrispondenti tra cromosomi omologhi

Tab. 1.1 – Tappe fondamentali della genetica mendeliana.



Fig. 1.29 – Herman J. Müller (1890-1967).

Con la riscoperta delle leggi di Mendel, la teoria di Sutton e Boveri nonché con le ricerche di Morgan e della McClintock erano state acquisite molte informazioni riguardo al comportamento delle unità ereditarie (**Tab. 1.1**). Tuttavia, l'aspetto più curioso è che tra gli anni 1930-1950 i genetisti non sapevano rispondere alla domanda: cos'è un gene? **Hermann Joseph Müller** (1890-1967), colui che nel 1926 aveva scoperto che i raggi X potevano indurre mutazioni in *Drosophila*, pensò a lungo alla questione, delineando chiaramente i compiti del gene: i) doveva contenere un'enorme quantità di informazione; ii) doveva replicare se stesso ogni volta che la cellula si divideva; iii) doveva mutare, cioè andare incontro a cambiamenti; iv) doveva controllare i processi fisiologici e dello sviluppo. Citando un estratto del Congresso Internazionale di Genetica, del 1932: "Un oceano di parole è stato riversato durante incontri formali e informali per discutere la questione centrale, che cos'è un gene? Ma questa importante entità è piuttosto elusiva". Solo dopo le scoperte di George Beadle (1903-1989) e Edward Tatum (1909-1975) riguardo alle mutazioni biochimiche, di Oswald Avery e collaboratori sul principio trasformante nei batteri, e di C. Auerbach e H.J. Müller a proposito delle mutazioni genetiche, lo stesso Müller scrisse, nel 1945, che ci sarebbe stato un "imminente attacco chimico al gene" (**Fig. 1.29**).

Nota chiave – Concetti di eredità e variabilità

La riproduzione, con la formazione di nuovi individui, assicura la continuità della vita. Nel passaggio da una generazione alla successiva si osservano due fenomeni: eredità e variabilità. L'eredità è la caratteristica per la quale una entità vivente genera discendenze a lei simili, sia nelle forme che nelle funzioni. La trasmissione dei caratteri genetici assicura che gli individui della discendenza siano in una certa misura somiglianti ai genitori e tra di loro. Tuttavia, un individuo può mostrare, rispetto ai genitori e agli altri individui della discendenza, alcune differenze più o meno marcate. La variabilità è quindi il fenomeno per il quale gli individui si presentano diversi per la manifestazione fenotipica dei loro caratteri. Alla base di questi due fenomeni vi sono la meiosi e la fecondazione che assicurano, nell'ambito di una specie, che il materiale genetico venga trasmesso "ricombinato" e "riassortito". La meiosi è il processo fondamentale della riproduzione sessuale attraverso il quale un organismo produce i gameti, con numero cromosomico dimezzato rispetto a quello delle cellule somatiche, determinando così un riarrangiamento della composizione dei geni. La fusione della cellula uovo femminile con il nucleo spermatico maschile, e quindi la riunione dei cromosomi materni e paterni, costituisce la fecondazione grazie alla quale si origina lo zigote e viene ripristinato il numero cromosomico tipico della specie (**Fig. 1.30**). In seguito, attraverso successive divisioni cellulari che mantengono e trasmettono inalterato il materiale genetico, basate sulla mitosi, si sviluppa un nuovo organismo multicellulare.

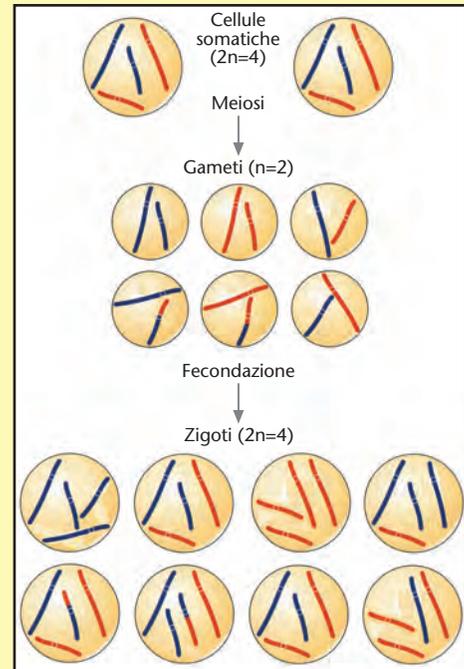


Fig. 1.30 – Effetti di meiosi e fecondazione: cellule somatiche con $2n=4$, di alcuni possibili gameti ($n=2$) parentali e ricombinanti, e di una serie di possibili zigoti derivanti dalla loro unione.

1.6 Ricerca del materiale ereditario e nascita della genetica molecolare

Tra le acquisizioni più importanti che seguirono la scoperta delle leggi di Mendel e che anticiparono la loro riscoperta, vi sono quelle di Johann Fredrich Miescher (1871), che isolò una sostanza dal nucleo, chiamata allora nucleina, e che oggi è nota essere

il DNA, e di E. Strasburger (1882), O. Hertwig (1884) e W. Flemming (1885), i quali dimostrarono che i nuclei contengono i cromosomi.

Nel 1868, J.F. Miescher (1844-1895), un giovane svizzero, studente di medicina, venne affascinato da una sostanza acida che egli stesso aveva isolato da cellule del pus ottenuto dalle bende usate per ricoprire le ferite. Per studiare questa sostanza Miescher separò dapprima le cellule del pus ed i loro residui dalle bende, quindi le trattò con pepsina, un enzima proteolitico che aveva isolato dallo stomaco dei maiali. Questa procedura gli consentì di separare il nucleo dal citoplasma e di recuperare così una sostanza acida, contenente una elevata quantità di azoto e fosforo, che denominò “nucleina”. Un anno più tardi Miescher scrisse un lavoro sui risultati ottenuti descrivendo la scoperta della nucleina, ma poiché l’editore della rivista alla quale fu sottoposto il lavoro non era convinto di ciò che veniva affermato, decise di ripetere l’esperimento. Ed è per tale motivo che il lavoro di Miescher che descriveva la scoperta della nucleina fu pubblicato solo nel 1871, due anni dopo essere stato inviato all’editore. A quel tempo, l’importanza della sostanza identificata da Miescher con il nome di nucleina non poté essere compresa appieno. La presenza di catene polinucleotidiche alla base della composizione del materiale acido della nucleina (acidi nucleici) verrà accertata solo molti anni più tardi. Gli acidi nucleici furono studiati dettagliatamente per la prima volta da un biochimico tedesco, Albrecht Kossel (1853-1927), il quale dopo il 1880 operò la scissione degli acidi nucleici nei suoi gruppi costitutivi, tra cui l’acido fosforico e uno zucchero che non riuscì tuttavia ad identificare. Kossel individuò comunque due composti appartenenti alla classe delle cosiddette purine, che chiamò “adenina” (A) e “guanina” (G), e tre composti appartenenti alla classe delle cosiddette pirimidine, che battezzò “citosina” (C), “timina” (T) e “uracile” (U). Grazie soprattutto ai lavori di un chimico russo-americano, **Phoebus Theodor Aaron Levene** (1869-1940), tra il 1925 e il 1929 venne dimostrato che nella molecola dell’acido nucleico esisteva una struttura tripartita, che chiamò “nucleotide”, composta da una molecola di acido fosforico, una molecola di zucchero e una molecola di base azotata (purina o pirimidina). Negli anni successivi, Levene (**Fig. 1.31**) si spinse ancora più avanti, verificando che le molecole di zucchero presenti negli acidi nucleici erano a cinque atomi di carbonio, anziché sei come gli zuccheri allora più conosciuti, e soprattutto di due tipi (ribosio e deossiribosio), identificando così le due classi di acidi nucleici: DNA e RNA. Il ruolo degli acidi nucleici nella conservazione e nella trasmissione dell’informazione ereditaria fu stabilito nel 1944 e solo nel 1953 fu scoperta la struttura a doppia elica del DNA. Fino a quel tempo, molti genetisti erano ancora riluttanti ad accettare l’idea che fossero gli acidi nucleici, piuttosto che le proteine, a rappresentare il materiale ereditario.

Nel 1885 Wilson scriveva: “La cromatina è certamente simile, se non identica, alla sostanza nota come nucleina... Si può quindi trarre la conclusione che l’eredità possa essere causata dalla trasmissione fisica di un composto chimico particolare dai genitori ai figli”. L’anno dopo, Wilson ipotizzò che gli acidi nucleici fossero i responsabili dell’eredità. Era in anticipo di circa mezzo secolo.

La ricerca della sostanza o delle sostanze che, all’interno del nucleo, potessero svolgere il ruolo di materiale ereditario ha costituito una delle fasi più importanti, ma anche più controverse della storia della genetica. Fino agli anni ’40 del secolo scorso l’opinione più diffusa tra i biologi era che, tra i costituenti del nucleo (proteine, lipidi, polisaccaridi, acidi nucleici, ecc.), soltanto le proteine potessero possedere, grazie alla loro complessità e variabilità strutturale, tutti i requisiti ipotizzabili. Si riteneva infatti che una sostanza chimica per poter assolvere al compito di materiale ereditario dovesse avere una serie di caratteristiche essenziali: i) potersi replicare accuratamente durante la crescita e la divisione cellulare; ii) possedere una struttura sufficientemente stabile; iii) portare tutta l’informazione biologica; iv) essere capace di trasferire tale informazione a tutte le cellule; v) essere in grado di subire cambiamenti ereditabili (mutazioni).

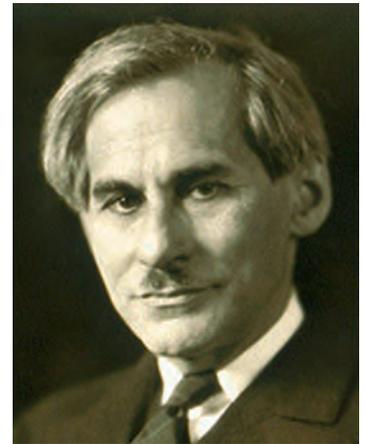


Fig. 1.31 – P.T. Aaron Levene (Rockefeller Archives).

Intorno alla metà del secolo scorso una serie di brillanti esperimenti spostò l'attenzione degli scienziati che si occupavano del materiale ereditario dalle proteine agli acidi nucleici; tali esperimenti rappresentarono una tappa fondamentale per lo sviluppo della genetica e il punto di partenza di tutta la biologia molecolare.

Un contributo, tanto importante quanto involontario, alle indagini sul materiale ereditario venne fornito nel 1928 da **Frederick Griffith** (1878-1939). Esperimenti condotti su due distinti ceppi di *Diplococcus pneumoniae*, che è l'agente patogeno della polmonite dei topi, gli permisero di intuire che un determinante ereditario potesse passare dai batteri di tipo *smooth* (a superficie liscia, virulenti) a quelli *rough* (a superficie rugosa, non virulenti), scoprendo in questo modo la "trasformazione batterica" (Fig. 1.32). In questo periodo non si era ancora scoperto che le varianti delle cellule batteriche si generassero per mutazione genetica, ed era opinione diffusa fra i batteriologi che i batteri non avevano né cromosomi né un'eredità simile a quella degli organismi superiori. Fu Salvador Edward Luria (1912-1991) a fornire l'idea giusta per distinguere fra spiegazioni mendeliane e lamarckiane. Appena Luria ottenne i primi risultati sperimentali a favore delle mutazioni genetiche nei batteri si avvalse del fisico tedesco Max Delbrück (1906-1981) per elaborare adeguate equazioni matematiche. Il loro lavoro, pubblicato nel 1943, cambiò la faccia della genetica, rendendo il batterio l'organismo più comune nella ricerca sulla natura del gene. Luria portò alla ribalta i batteri e i loro virus, i batteriofagi, nella ricerca sulla natura del gene. L'anno successivo Luria proseguì nel dimostrare che durante la moltiplicazione i fagi mutano anche spontaneamente, generando ogni volta varianti stabili quanto quelle trovate nei batteri. Nel 1946 Delbrück e, indipendentemente, Alfred Day Hershey (1908-1997) misero in evidenza la ricombinazione genetica nei fagi, mentre Joshua Lederberg (1925-) e Edward Tatum dimostrarono lo stesso fenomeno in *E. coli* come conseguenza della coniugazione batterica. Così nel breve arco di tre anni, fu accertata la presenza di cromosomi sia nei batteri che nei fagi. Per questi esperimenti e per la successiva dimostrazione, data da Hershey circa la natura del materiale genetico dei fagi, nel 1969, Luria, Delbrück e Hershey ricevettero il premio Nobel in medicina e fisiologia.

La maggior parte del progresso genetico, come lo studio delle mutazioni e della struttura fine del gene, dipese dagli stratagemmi ideati per studiare eventi molto rari. I microrganismi ampliarono questa possibilità. La risoluzione genetica fu portata al suo massimo estremo da Seymour Benzer (1921-), quando nel 1961, realizzò la mappatura per ricombinazione a livello nucleotidico nel fago T4. Da lì a poco gli esperimenti di Avery e collaboratori con batteri dimostrarono in maniera convincente che il materiale ereditario era il DNA, ma stranamente gli esperimenti meno incisivi realizzati qualche anno dopo da Alfred Hershey e Martha Chase con i fagi ebbero un maggiore impatto sulla comunità scientifica.

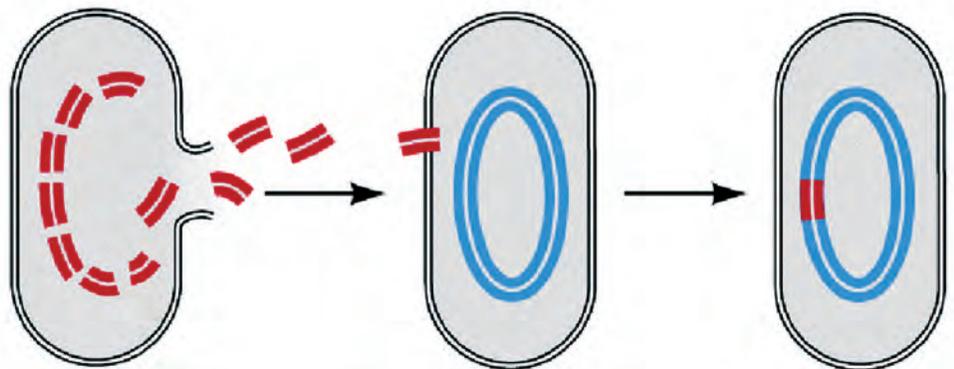


Fig. 1.32 – Trasformazione batterica.

Nel 1944 **Oswald Avery** (1877-1955), **Colin MacLeod** (1909-1972) e **Maclyn McCarty** (1911-) ripresero il materiale usato da Griffith e attraverso una serie di esperimenti dimostrarono che la capacità di indurre trasformazione nei batteri non era connessa alle proteine, ma piuttosto agli acidi nucleici. Per l'identificazione della natura chimica del principio trasformante, Avery, MacLeod e McCarty somministrarono nel mezzo di coltura dei batteri del ceppo non virulento degli estratti acellulari del ceppo virulento dai quali con metodi appropriati erano state rimosse o denaturate particolari categorie di sostanze chimiche (proteine, grassi, polisaccaridi e acidi nucleici). Ciò permise di isolare e purificare una singola classe di molecole – acido deossiribonucleico (DNA) – con alta attività trasformante, capaci di indurre una trasformazione ereditaria delle cellule da non virulente a virulente. Che il principio trasformante in *Pneumococcus* era il DNA fu una grande sorpresa per molti genetisti, che ritenevano ancora le proteine responsabili di questo fenomeno, ma alla fine riconobbero che Wilson nel 1885 aveva visto giusto. Benché Avery, MacLeod e McCarty avessero presentato prove convincenti che il DNA è in grado di modificare geneticamente le proprietà della superficie batterica, la sua funzione di validità universale venne definitivamente confermata nel 1952 dagli statunitensi Alfred Day Hershey e Martha Chase (1930-), i quali dimostrarono che anche nei virus il materiale ereditario era rappresentato dagli acidi nucleici e non dalle proteine. Qualche tempo dopo, nel 1957, Heinz Fraenkel-Conrat (1910-1999) e collaboratori dimostrarono che l'ereditarietà dei virus dipende dal loro acido nucleico e, nel caso specifico del virus del mosaico del tabacco, dall'acido ribonucleico (RNA).

In definitiva, questi esperimenti dimostrarono in modo inequivocabile che gli acidi nucleici sono il materiale ereditario. È interessante soffermarsi sul fatto che tale acquisizione risale a poco più di mezzo secolo fa. Sebbene fossero state raccolte prove inconfutabili che il DNA fosse il materiale genetico contenente il “progetto” di un organismo, come tutta l'informazione immagazzinata in un polimero potesse replicarsi e trasmettersi alla progenie durante la divisione della cellula rappresentava una domanda apparentemente senza risposta. In quel periodo, alcuni scienziati, ed in modo particolare **James Watson** (1928-), **Francis Crick** (1916-), **Maurice Wilkins** (1916-2004), **Rosalind Franklin** (1921-1958) e **Linus Pauling** (1901-1994) realizzarono che se fossero riusciti a stabilire la struttura del DNA, le risposte a quelle domande potevano saltare fuori (**Fig. 1.33**). Il biochimico **Erwin Chargaff** (1929-1992) aveva dedicato anni di minuziosa ricerca all'analisi della composizione delle basi, cioè le proporzioni dei quattro nucleotidi, in campioni di DNA di organismi di origine diversa, riuscendo ad ottenere l'importante risultato di dimostrare che la composizione era molto diversa fra un organismo e l'altro, ma che la proporzione di adenina (A) era sempre uguale a quella di timina (T), così come quella di citosina (C) era sempre uguale a quella di guanina (G). Chargaff e i suoi collaboratori, dimostrando la corrispondenza tra i quantitativi di purine e pirimidine, condussero ad ipotizzare che i due tipi di basi del DNA dovevano trovarsi appaiati. La soluzione all'enigma noto come “regola di Chargaff” venne trovata da Watson e Crick quando, nel 1953, dedussero la struttura corretta del DNA, certamente l'acquisizione più importante della storia della genetica, premiata con l'attribuzione del Nobel per la medicina e la fisiologia nel 1962 (**Fig. 1.34**). Watson e Crick per arrivare al loro modello utilizzarono anche i dati della cristallografia ai raggi X sulla struttura del DNA forniti da Wilkins, Franklin e i loro

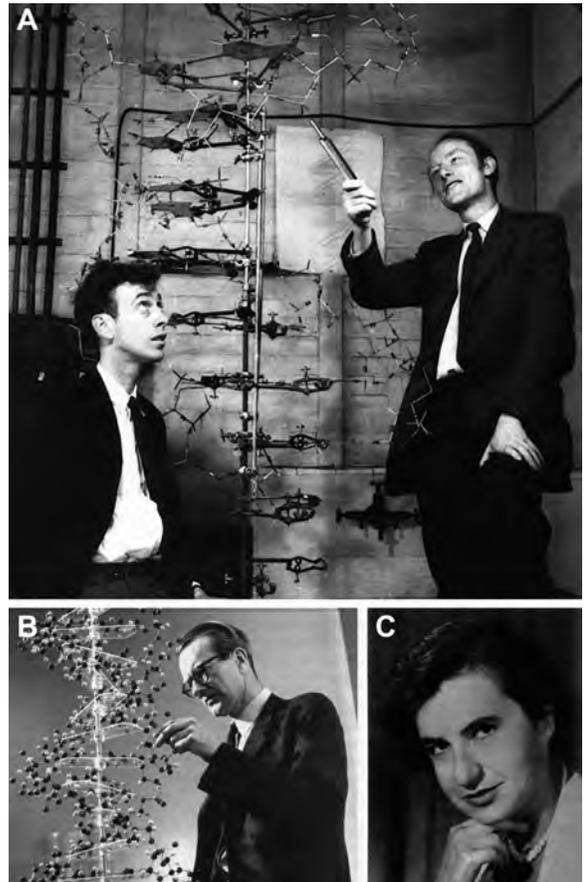


Fig. 1.33 – James Watson e Francis Crick (A), Maurice Wilkins (B) e Rosalind Franklin (C).

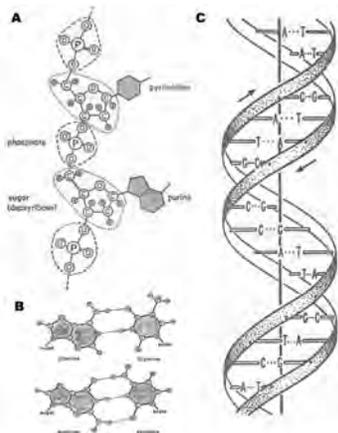


Fig. 1.34 – Struttura a doppia elica della molecola del DNA come dedotta da J. Watson e F. Crick nel 1953 (da: J. Watson 1968, *The double helix*).

collaboratori. Questi dati suggerivano che il DNA ha una struttura altamente organizzata formata da due filamenti con substrutture che si ripetono regolarmente lungo l'asse della molecola. Sulla base dei dati chimici di Chargaff, dei risultati della diffrazione ai raggi X di Wilkins e Franklin, e dalle possibili inferenze, Watson e Crick proposero che il DNA avesse una struttura a forma di doppia elica destrorsa, con le due catene polinucleotidiche antiparallele avvolte l'una sull'altra in una spirale. L'articolo pubblicato su *Nature*, si chiude con una frase tra le più celebri della letteratura scientifica: "Non è sfuggito alla nostra attenzione che l'appaiamento specifico postulato suggerisce direttamente un possibile meccanismo di replicazione del materiale genetico" (Fig. 1.35). In effetti, sarà la complementarità dei due filamenti a dirigere il corso della ricerca genetica nei dieci anni e più che seguirono.

No. 4356 April 25, 1953
NATURE
737

MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS

A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid

WE wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.). This structure has novel features which are of considerable biological interest.

A structure for nucleic acid has already been proposed by Pauling and Corey¹. They kindly made their manuscript available to us in advance of publication. Their model consists of three intertwined chains, with the phosphates near the fibre axis, and the bases on the outside. In our opinion, this structure is unsatisfactory for two reasons: (1) We believe that the material which gives the X-ray diagrams is the salt, not the free acid. Without the acidic hydrogen atoms it is not clear what forces would hold the structure together, especially as the negatively charged phosphates near the axis will repel each other. (2) Some of the van der Waals distances appear to be too small.

Another three-chain structure has also been suggested by Fraser (in the press). In his model the phosphates are on the outside and the bases on the inside, linked together by hydrogen bonds. This structure as described is rather ill-defined, and for this reason we shall not comment on it.

We wish to put forward a radically different structure for the salt of deoxyribose nucleic acid. This structure has two helical chains each coiled round the same axis (see diagram). We have made the usual chemical assumptions, namely, that each chain consists of phosphate di-ester groups joining β -D-deoxy-ribofuranose residues with 3',5' linkages. The two chains (but not their bases) are related by a dyad perpendicular to the fibre axis. Both chains follow right-handed helices, but owing to the dyad the sequences of the atoms in the two chains run in opposite directions. Each chain loosely resembles Furberg's² model No. 1; that is, the bases are on the inside of the helix and the phosphates on the outside. The configuration of the sugar and the atoms near it is close to Furberg's 'standard configuration', the sugar being roughly perpendicular to the attached base. There is a residue on each chain every 3.4 Å. in the z-direction. We have assumed an angle of 36° between adjacent residues in the same chain, so that the structure repeats after 10 residues on each chain, that is, after 34 Å. The distance of a phosphorus atom from the fibre axis is 10 Å. As the phosphates are on the outside, cations have easy access to them.

The structure is an open one, and its water content is rather high. At lower water contents we would expect the bases to tilt so that the structure could become more compact.

The novel feature of the structure is the manner in which the two chains are held together by the purine and pyrimidine bases. The planes of the bases are perpendicular to the fibre axis. They are joined together in pairs, a single base from one chain being hydrogen-bonded to a single base from the other chain, so that the two lie side by side with identical z-co-ordinates. One of the pair must be a purine and the other a pyrimidine for bonding to occur. The hydrogen bonds are made as follows: purine position 1 to pyrimidine position 1; purine position 6 to pyrimidine position 6.

If it is assumed that the bases only occur in the structure in the most plausible tautomeric forms (that is, with the keto rather than the enol configurations) it is found that only specific pairs of bases can bond together. These pairs are: adenine (purine) with thymine (pyrimidine), and guanine (purine) with cytosine (pyrimidine).

In other words, if an adenine forms one member of a pair, on either chain, then on these assumptions the other member must be thymine; similarly for guanine and cytosine. The sequence of bases on a single chain does not appear to be restricted in any way. However, if only specific pairs of bases can be formed, it follows that if the sequence of bases on one chain is given, then the sequence on the other chain is automatically determined.

It has been found experimentally^{3,4} that the ratio of the amounts of adenine to thymine, and the ratio of guanine to cytosine, are always very close to unity for deoxyribose nucleic acid.

It is probably impossible to build this structure with a ribose sugar in place of the deoxyribose, as the extra oxygen atom would make too close a van der Waals contact.

The previously published X-ray data^{5,6} on deoxyribose nucleic acid are insufficient for a rigorous test of our structure. So far as we can tell, it is roughly compatible with the experimental data, but it must be regarded as unproved until it has been checked against more exact results. Some of these are given in the following communications. We were not aware of the details of the results presented there when we devised our structure, which rests mainly though not entirely on published experimental data and stereochemical arguments.

It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.

Full details of the structure, including the conditions assumed in building it, together with a set of co-ordinates for the atoms, will be published elsewhere.

We are much indebted to Dr. Jerry Donohue for constant advice and criticism, especially on inter-atomic distances. We have also been stimulated by a knowledge of the general nature of the unpublished experimental results and ideas of Dr. M. H. F. Wilkins, Dr. R. E. Franklin and their co-workers at King's College, London. One of us (J. D. W.) has been aided by a fellowship from the National Foundation for Infantile Paralysis.

J. D. WATSON
F. H. C. CRICK

Medical Research Council Unit for the Study of the Molecular Structure of Biological Systems, Cavendish Laboratory, Cambridge. April 2.

¹ Pauling, L., and Corey, R. B., *Nature*, **171**, 346 (1953); *Proc. U.S. Nat. Acad. Sci.*, **36**, 84 (1953).

² Furberg, S., *Acta Chem. Scand.*, **6**, 634 (1952).

³ Chargaff, E., for references see Zaminhof, S., Braverman, G., and Chargaff, E., *Biochim. et Biophys. Acta*, **9**, 402 (1952).

⁴ Wyatt, G. R., *J. Gen. Physiol.*, **38**, 201 (1952).

⁵ Ashbury, W. T., *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **1**, Nucleic Acid, 66 (Camb. Univ. Press, 1947).

⁶ Wilkins, M. H. F., and Randall, J. T., *Biochim. et Biophys. Acta*, **10**, 102 (1953).

Fig. 1.35 - Articolo di J. Watson e F. Crick, *Molecular structure of nucleic acids*, *Nature* April 25, 1953, reimpresso in una sola facciata.

Negli anni successivi al 1953, la scoperta di Watson e Crick riguardante la struttura a doppia elica del DNA in realtà non polarizzò l'attenzione dei genetisti come era lecito aspettarsi, anzi le citazioni del loro articolo da parte di altri ricercatori non fecero registrare alcun aumento, evidenziando pertanto uno scarso interesse della comunità scientifica internazionale verso questa sensazionale scoperta. Benché il numero di pubblicazioni scientifiche relative ad aspetti diversi del materiale genetico avesse subito un incremento consistente negli anni 1954-60, il numero di articoli editi ad esempio da *Nature* e *Science*, due riviste scientifiche molto prestigiose, che citavano quello di Watson e Crick subì un vistoso calo. Ancora una volta sembra quindi che la comunità scientifica impiegò parecchio tempo per comprendere e recepire il significato rivoluzionario di una scoperta che avrebbe cambiato la storia della genetica ed aperto nuovi orizzonti di ricerca. Il fascino della doppia elica non sfuggì comunque all'attenzione di un grande artista come Salvador Dalì che si appropriò del simbolo del DNA per uno dei suoi quadri (Fig. 1.36).



Fig. 1.36 – Butterfly landscape, Salvador Dalì, 1957-58.

A distanza di mezzo secolo dalla scoperta della struttura del DNA sono emerse novità per certi versi sconcertanti sugli eventi e gli episodi che portarono a svelare il segreto della molecola della vita. Quando nel 1962 J. Watson, F. Crick e M. Wilkins ricevettero il premio Nobel per la scoperta della struttura del DNA non furono molti quelli che notarono l'assenza di R. Franklin, colei che con le sue fotografie del DNA ai raggi X (Fig. 1.37) aveva direttamente contribuito a svelare la struttura a doppia elica del DNA. La morte prematura della Franklin, avvenuta nel 1958 all'età di 37 anni, insieme alla predominante rappresentanza maschile nella comunità scientifica del tempo, hanno contribuito ad eleggere la Franklin come un'icona del movimento femminista. Nel febbraio del 1953, due mesi prima della pubblicazione di Watson e Crick, *Molecular structure of nucleic acids*, avvenuta il 25 aprile, la Franklin scrisse nel suo diario di laboratorio che la molecola del DNA era composta di due catene polinucleotidiche simmetriche con scheletro di gruppi fosfati e zuccheri pentosi in successione (Fig. 1.38). La Franklin ignorava che Maurice Wilkins avesse mostrato a Watson e Crick la sua celebre fotografia 51 relativa ai modelli di diffrazione del DNA ai raggi X – che forniva la prova inequivocabile della struttura ad elica – e che Max Perutz avesse fornito loro una copia della relazione concernente l'attività di ricerca condotta presso il *King's College* – comprendente anche le sue precise misurazioni relative agli elementi ripetuti costituenti il DNA. Nel suo celebre libro, *The double helix*, pubblicato nel 1968, Watson ammetterà candidamente che non fu la Franklin a fornire loro i dati e le informazioni emerse dai suoi studi e soltanto alcuni anni più tardi

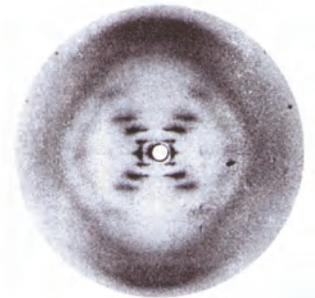


Fig. 1.37 – Fotografia 51 di Rosalind Franklin così come venne pubblicata sulla rivista *Nature* il 25 aprile 1953.

Peaks at height 0 lies on axis
 ∴ 2 P atoms attached to similar nucleotides
 - apart from this, symmetry does not control nucleotide sequence
 suggests that = a "back-to-back" pair of chains top half of
 one is mirror to bottom half of other
 Each chain of peaks = unit cell
 can't reconcile nucleotide sequence with Chargoff's analysis

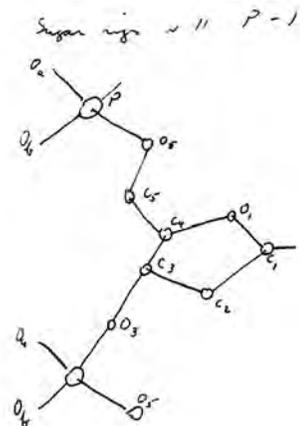


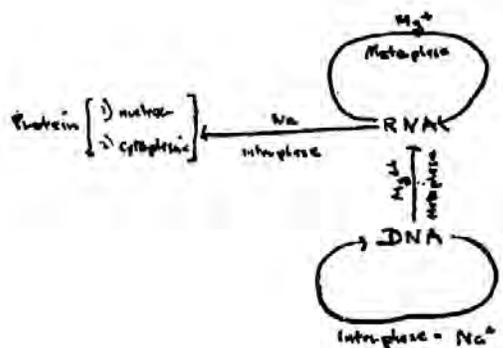
Fig. 1.38 – Note di laboratorio di R. Franklin riguardanti la struttura ipotetica del DNA (da: J. Clayton e C. Dennis 2003, Churchill College Archives, Cambridge).

dichiarerà, insieme a Crick, che nel febbraio del 1953 non avrebbero mai scoperto la struttura del DNA senza i risultati ottenuti dalla Franklin e che la Franklin meritasse quanto loro e Wilkins il premio Nobel per la scoperta della struttura del DNA.

Alla ricerca sulla struttura del DNA si affiancò ben presto il lavoro sulle proteine svolto da **Fred Sanger** (1918-) a Cambridge. Anche queste sostanze sono composte di lunghe catene, le cui unità chimiche fondamentali sono gli amminoacidi, in numero di venti. Comunemente si dava per scontato che in una proteina in fase di sintesi gli amminoacidi venissero incorporati casualmente, senza disporsi secondo un ordine preciso. Sanger, invece, dimostrò come in realtà la sequenza amminoacidica sia esclusiva di ogni proteina. Nel 1955 Sanger decifrò la prima sequenza amminoacidica di una proteina – l'ormone insulina. Crick e collaboratori si resero immediatamente conto che doveva esserci una qualche relazione tra la sequenza delle basi nel DNA e la sequenza degli amminoacidi nella proteina da esso codificato. Da questa intuizione prese avvio la ricerca volta alla decifrazione del “codice genetico”, la vicenda forse più appassionante nella storia della biologia molecolare.

Nel frattempo, era il 1941, G. Beadle e E. Tatum avevano scoperto le mutazioni biochimiche in *Neurospora* e proposto l'ipotesi “un gene – un enzima”, secondo la quale l'informazione genetica per specificare la sequenza di amminoacidi di una proteina doveva avere la sua primitiva origine nei geni presenti nel nucleo. Con le loro scoperte, Beadle e Tatum non solo hanno rappresentato l'inizio della genetica biochimica moderna, ma hanno consentito anche il primo passo verso l'applicazione delle tecniche genetiche ai microrganismi. Circa dieci anni dopo a Bruxelles, Jean Brachet, Hubert Chantrenne e i loro collaboratori, misero in risalto la correlazione tra il contenuto di RNA dei vari tipi di cellula e la capacità di sintesi proteica, ed inoltre fornirono la prova che il nucleo, e quindi il DNA, non partecipa direttamente alla sintesi delle proteine. Nel 1952, sulla scorta di queste evidenze sperimentali, Watson ipotizzò l'esistenza di un processo a due fasi di sintesi proteica, immaginando che dapprima il DNA servisse da stampo per la sintesi dell'RNA nel nucleo (trascrizione), e poi l'RNA potesse spostarsi nel citoplasma e fungere da stampo per la sintesi della proteina (traduzione), ciò che nel 1957 Crick definì il “dogma centrale della genetica”: DNA → RNA → Proteina (Fig. 1.39). In questo modo, l'accoppiamento delle basi

A Hypothetical Scheme of the Interrelationship between the Nucleic Acids and Proteins



Consequences of Scheme

1. RNA synthesis and \neq DNA synthesis should not occur at the same time. Nucleic synthesis and DNA synthesis will occur simultaneously.
2. Nuclear RNA synthesis will occur only at dividing cells.
3. The total Mg^{2+} concentration will increase toward metaphase and decrease during interphase.
4. The content of nuclear RNA may possibly remain constant during interphase. - Synthesis of nuclear RNA occurs only at chromosomes during prophase-metaphase.

Fig. 1.39 – Ipotesi di J. Watson riguardante il processo a due fasi di sintesi delle proteine a partire dal DNA via un RNA intermediario (da: J. Watson 1968, *The double helix*).

poteva non solo fornire un sistema per eseguire la copia esatta di ciascun gene durante la duplicazione del materiale ereditario, ma anche essere con ogni probabilità alla base del meccanismo di trasferimento dell'informazione genetica da una molecola di DNA ad una di RNA (**Fig. 1.40**). Restava tuttavia da stabilire quale RNA e come tale RNA potesse servire da stampo per disporre nella giusta sequenza gli amminoacidi nei relativi prodotti polipeptidici.

Un contributo di grande prestigio intellettuale venne fornito all'inizio del 1955 da Crick con la nota intitolata *Sugli stampi degenerati e sull'ipotesi degli adattatori*. Senza conoscere l'esistenza dei vari tipi di RNA, Crick lanciò un'idea rivoluzionaria a proposito del meccanismo di sintesi proteica: prima di formare il legame peptidico, gli amminoacidi si legano secondo una reazione enzimatica a piccole molecole adattatrici, dotate di superfici modellate per legarsi alle triplette degli acidi nucleici. In proposito Crick suggerì che potesse trattarsi di oligonucleotidi capaci di unirsi per accoppiamenti di basi agli stampi di RNA.

Negli anni immediatamente successivi, tra il 1956 e il 1961, una serie di brillanti esperimenti permisero di acquisire alcune informazioni determinanti. Mahlon Hoagland (1921-), colui che aveva scoperto qualche tempo prima gli enzimi attivanti della sintesi proteica (aminoacil-sintetasi), lavorando insieme con Marjorie Stephenson e Paul Zamecnik, nel 1957 trovò che la molecola adattatrice capace di legarsi sia all'amminoacido che all'RNA stampo esisteva veramente: essa risultò costituita da una piccola frazione di RNA solubile sulla quale si trasferiscono gli amminoacidi attivati prima di intervenire nella sintesi delle proteine. Data la sua funzione, a tale molecola venne dato il nome di RNA di trasferimento (tRNA). Nel 1958, Hoagland e collaboratori dimostrarono l'esistenza di almeno un RNA di trasferimento per ogni amminoacido. Un paio di anni più tardi, nel 1960, un allievo di Watson, Robert Riseborough dimostrò che i ribosomi, le particelle composte di RNA (RNA ribosomiale o rRNA) e proteine, fino a poco tempo prima chiamate "granuli ribosomiali", non hanno alcuna funzione di stampo, ma piuttosto rappresentano la sede della sintesi proteica. L'anno dopo il vero stampo si sarebbe rivelato un altro tipo di RNA rimasto fino ad allora sconosciuto, sia perché costituisce una frazione minima dell'RNA totale sia perché di lunghezza variabile. Questi stampi, metabolicamente instabili, presenti nelle cellule in quantità corrispondenti alle loro necessità, vennero scoperti nel 1961 da Sidney Brenner (1913-), François Jacob (1920-) e Matthew Meselson (1930-) e sarebbero poi stati chiamati RNA messaggeri (mRNA).

Nel 1958 **Matthew Meselson** e **Franklin Stahl** (1929-) dimostrarono che nei procarioti (batterio *E. coli*) la replicazione del DNA avviene secondo un modello semiconservativo. Qualche mese prima, **J. Herbert Taylor** (1916-1998) aveva provato la validità del modello a livello cromosomico anche negli eucarioti (*Vicia faba*). In quegli stessi anni **Arthur Kornberg** (1918-2007) e collaboratori isolarono la prima DNA polimerasi da *E. coli*, riuscendo ad effettuare la sintesi *in vitro* di DNA operando con sistemi acellulari di questo batterio. Per questi studi Kornberg ricevette il premio Nobel nel 1959. Nello stesso anno, Severo Ochoa (1905-1993) e Marianne Grunberg-Manago (1921-) scoprirono l'enzima polinucleotide fosforilasi, una RNA polimerasi presente in tutti i batteri, utilizzabile per sintetizzare RNA artificiali. Tale enzima costituì la chiave per la decifrazione del codice con cui l'informazione genetica è scritta nel DNA poiché permise di produrre RNA messaggeri artificiali con composizione di basi nota direttamente utilizzabili per la sintesi proteica *in vitro* con sistemi acellulari.

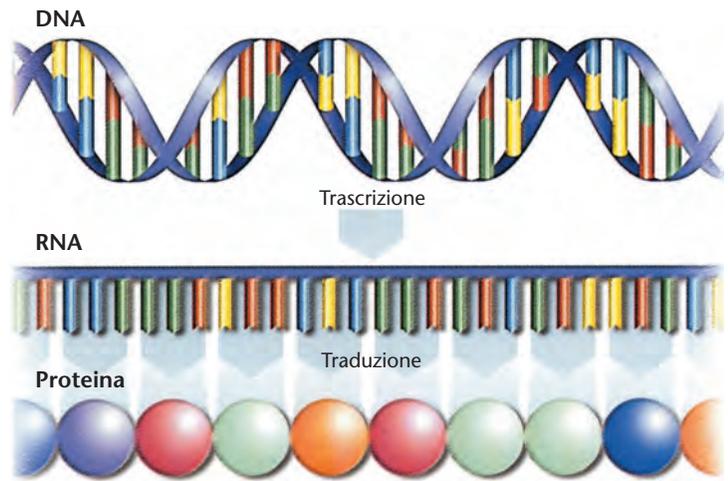


Fig. 1.40 – Dogma centrale della genetica: flusso di informazione a senso unico dal DNA contenuto nel nucleo alle proteine sintetizzate nel citoplasma attraverso l'RNA come intermediario.

Genetica molecolare

1871	Johann Fredrich Miescher	isola dal nucleo una sostanza acida contenente una elevata quantità di azoto e fosforo e la chiama "nucleina"
1928	Frederick Griffith	scopre la "trasformazione batterica": in <i>Diplococcus pneumoniae</i> un determinante ereditario può passare da un ceppo virulento ad uno non virulento
1941	George Beadle e Edward Tatum	scoprono le mutazioni biochimiche in <i>Neurospora</i> e propongono l'ipotesi "un gene – un enzima"
1943	Salvador Edward Luria e Max Delbrück	dimostrano che le varianti delle cellule batteriche si generano per mutazione genetica
1944	Oswald Avery, Colin McLeod e Maclyn McCarty	dimostrano che nei batteri la capacità di indurre trasformazione non è connessa alle proteine ma agli acidi nucleici
1945	Max Delbrück e Alfred Day Hershey	scoprono la ricombinazione genetica nei virus
1946	Joshua Lederberg e Edward Tatum	dimostrano l'esistenza della "coniugazione batterica" in <i>Escherichia coli</i>
1952	Alfred Day Hershey e Martha Chase	dimostrano che anche nei virus il materiale ereditario è rappresentato dagli acidi nucleici e non dalle proteine
1953	James Watson e Francis Crick	deducono la struttura corretta del DNA: una doppia elica destrorsa con le due catene polinucleotidiche antiparallele avvolte l'una sull'altra in una spirale
1957	Francis Crick e George Gamow	ipotizzano la relazione esistente tra acidi nucleici e proteine proponendo il "dogma centrale della genetica molecolare": DNA → RNA → Proteina
1957	Mahlon Hoagland, Marjorie Stephenson e Paul Zamecnik	individuano l'RNA di trasferimento, la molecola adattatrice capace di legarsi sia all'amminoacido che all'RNA stampo e dimostrano l'esistenza di un "tRNA" per ogni amminoacido
1958	Matthew Meselson, Franklin Stahl e Herbert Taylor	dimostrano che nei procarioti (<i>Escherichia coli</i>) e negli eucarioti (<i>Vicia faba</i>) la replicazione del DNA avviene secondo un modello semiconservativo
1958	Arthur Kornberg e Severo Ochoa	isolano la DNA polimerasi I, uno degli enzimi del complesso implicato nella replicazione del DNA
1961	Sidney Brenner, François Jacob e Matthew Meselson	scoprono che i veri stampi della sintesi proteica sono una minima frazione dell'RNA totale di lunghezza variabile, in seguito chiamati RNA messaggeri ("mRNA")
1961	Marshall Nirenberg e J. Heinrich Matthaei	dimostrano in modo inequivocabile l'esistenza di un "codice genetico"
1961	Francis Crick e Sydney Brenner	dimostrano che il codice funziona a triplette ("codogeni" nel DNA e "codoni" nell'mRNA) e che l'informazione ereditaria viene letta in modo continuo a partire da un certo punto della molecola
1966	Marshall Nirenberg e H. Gobind Khorana	decifrano completamente il codice genetico stabilendo la corrispondenza fra triplette nucleotidiche e singoli amminoacidi
1971	Stanley Cohen, Annie Chang e Herbert Boyer	impiegano gli enzimi di restrizione per produrre le prime molecole di "DNA ricombinante"
1975	Allan Maxam, Walter Gilbert e Fred Sanger	mettono a punto tecniche diverse per il sequenziamento di molecole di DNA
1977	Phil Sharp, Richard Roberts, Louise Chow e Pierre Chambon	scoprono che i geni degli organismi superiori e dei virus sono discontinui, cioè frammentati in regioni trascritte ("esoni") ed in altre non codificanti ("introni")
1980	Aaron Klug e Roger Kornberg	scoprono la struttura della cromatina, evidenziandone l'unità strutturale ripetitiva, il "nucleosoma", costituito da DNA a doppio filamento avvolto attorno ad un nucleo di proteine istoniche
1985	Kary Mullis	inventa la reazione a catena della polimerasi (PCR)
2006	Roger Kornberg	svela le basi molecolari della trascrizione dei geni negli eucarioti

Tab. 1.2 – Tappe fondamentali della genetica molecolare.

nella rimozione degli introni e nella congiunzione degli esoni, dando così un mRNA maturo che può essere tradotto in una proteina (**Tab. 1.2**).

Durante il periodo di sperimentazione condotta per svelare il codice genetico, alcuni ricercatori cominciarono ad acquisire informazioni sul funzionamento dei geni. Nel 1961 François Jacob e Jacques Monod dimostrarono per la prima volta che alcuni geni sono in grado di controllare l'espressione di altri geni. Questi geni "regolatori" presiedono alla sintesi di particolari proteine capaci di attivare o reprimere altri geni legandosi al DNA in prossimità di questi. Qualche anno dopo, nel 1967, Walter Gilbert e Mark Ptashne isolarono, indipendentemente l'uno dall'altro, proteine "regolative" così come predetto da Jacob e Monod. Tali acquisizioni diedero avvio alla scoperta di una serie di proteine conosciute adesso come promotori e fattori di trascrizione nonché di elementi regolativi nel DNA come silenziatori (*silencer*) ed intensificatori (*enhancer*) che controllano l'azione dei geni, determinando la funzione specializzata di determinate cellule sia nello spazio che nel tempo.

1.7 Eredità poligenica

Sebbene le intuizioni di Darwin sul processo della selezione naturale e le scoperte di Mendel sul fenomeno della trasmissione ereditaria siano state contemporanee, i biologi



Fig. 1.43 – Wilhelm L. Johannsen (1857-1927).

faticarono non poco a riconciliare la complessità dei caratteri quantitativi – importanti per l'evoluzione – con la semplicità del principio della segregazione – alla base della trasmissione dei caratteri quantitativi.

All'inizio del XIX secolo si assistette ad una accesa discussione riguardo all'eredità dei caratteri quantitativi, cioè di quei caratteri che variano in modo continuo nella popolazione e che per tale motivo possono essere misurati ed analizzati con vari strumenti statistici. La scuola biometrica fondata da Galton e Pearson sosteneva che questo tipo di caratteri non è determinato da singoli geni che influenzano il fenotipo in modo prevedibile. Tale corrente di pensiero era piuttosto favorevole alla teoria dell'eredità per mescolamento, proposta in precedenza ed allora prevalente. Altra scuola, alternativa a questa, rappresentata dai seguaci di Mendel e capeggiata da William Bateson, in Inghilterra, e da William E. Castle, negli Stati Uniti, sosteneva a ragione che i caratteri a variabilità continua sono determinati da più geni ereditati come unità discrete. Le difficoltà maggiori che gli scienziati del tempo incontravano nella determinazione dell'eredità dei caratteri quantitativi erano dovute al fatto che essi dipendono in larga misura anche da fattori ambientali. Il primo studioso a mettere in evidenza l'influenza dell'ambiente sull'espressione dei caratteri quantitativi fu **Wilhelm L. Johannsen** (1857-1927) (**Fig. 1.43**). Tra il 1903 e il 1909 egli realizzò una serie di esperimenti utilizzando semi di fagiolo. La consapevolezza di avere a che fare con una specie strettamente autogama e che ciascun seme era da ritenersi omozigote a tutti i loci, portò Johannsen ad introdurre il concetto di linea pura, definita come un insieme di individui derivanti per autofecondazione da un capostipite omozigote. Egli dimostrò che la variabilità morfologica di un carattere quantitativo può avere due componenti, una genetica e l'altra ambientale e che è la loro azione congiunta a determinare il fenotipo. Johannsen affermò, inoltre, che la selezione è efficace solo in presenza di variabilità genetica ed è pertanto del tutto inefficace entro la linea pura, e che la variabilità fenotipica che si osserva entro linee pure è dovuta unicamente all'ambiente. Nel 1906, in seguito a tali brillanti deduzioni, George U. Yule (1871-1951) intuì che la componente genetica della variazione fenotipica comprende il contributo di numerosi geni differenti. Egli ipotizzò che la variabilità continua dei caratteri quantitativi fosse legata a più coppie alleliche segreganti contemporaneamente, senza però fornire alcuna indicazione concreta. Fu **Herman Nilsson-Ehle** (1873-1949) che due anni più tardi trovò un modello naturale in grado di spiegare l'eredità dei caratteri quantitativi studiando il colore della cariossida in frumento. Nel 1908, sulla base dei risultati ottenuti, egli formulò l'ipotesi secondo la quale più coppie alleliche segreganti in maniera indipendente, ereditate in assenza di dominanza ed aventi azione uguale e cumulativa (additiva) potessero spiegare i risultati relativi al grado di espressione del carattere considerato nella generazione F_2 . Nilsson-Ehle introdusse i termini *plus* e *minus* per indicare i geni che, rispettivamente, contribuiscono alla manifestazione del carattere agendo nello stesso senso in maniera cumulativa e con uguale effetto sul fenotipo oppure che sono ininfluenti sul fenotipo. Tuttavia, la prova sperimentale circa l'ipotesi multifattoriale dell'eredità quantitativa spetta a **Edward M. East** (1879-1938), della Connecticut Agricultural Experimental Station, negli USA. Studiando la lunghezza della corolla dei fiori di tabacco, nel 1916 egli dimostrò che l'eredità dei caratteri quantitativi è dovuta ad una pluralità di geni, aventi azione additiva, segreganti in maniera indipendente ed in assenza di dominanza (**Fig. 1.44**). Dal momento che East scelse di valutare un carattere particolarmente favorevole, poiché relativamente stabile sotto un'ampia gamma di condizioni ambientali, egli riuscì a determinare il numero di loci coinvolti e ad attribuire un valore numerico all'effetto dei singoli geni *plus* e all'effetto ambientale.

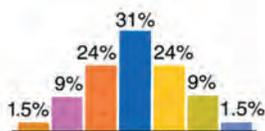
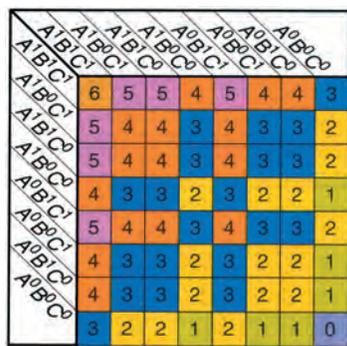


Fig. 1.44 – Mendelismo applicato ai caratteri quantitativi: quadrato di Punnett e istogrammi di distribuzione relativi alla F_2 del tribrido $A^1A^0B^1B^0C^1C^0$ (adattata da L.H. Hartwell *et al.*, 2004).

Nel 1918 **Ronald A. Fisher** affermò “L'ipotesi basata sull'esistenza di fattori mendeliani cumulativi ... e sull'influenza di fattori non genetici come quelli am-

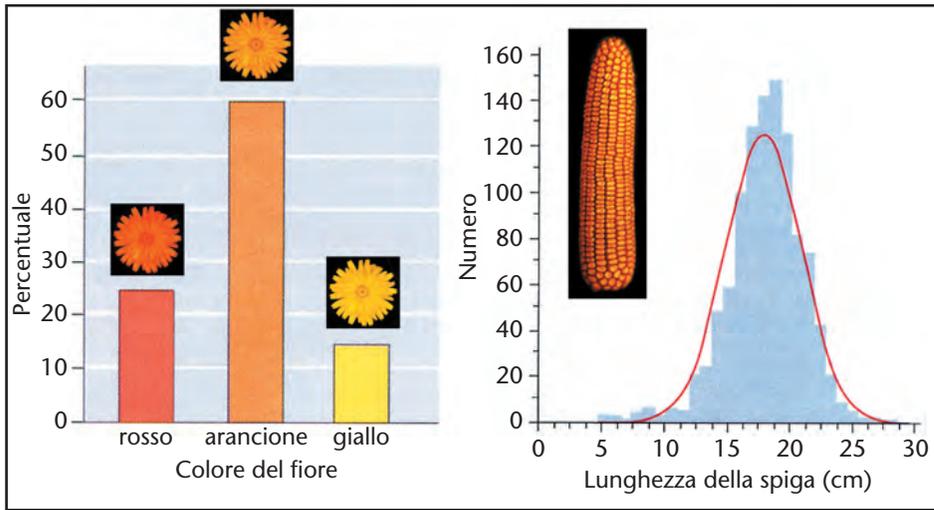


Fig. 1.45 – Distinzione tra carattere qualitativo e carattere quantitativo: istogrammi e distribuzione di frequenza relativi al colore del fiore in *Mirabilis jalapa* e alla lunghezza della spiga in *Zea mays*, rispettivamente.

bientali, ... sembra essere perfettamente in accordo con le osservazioni condotte sui caratteri quantitativi”. Di fatto, i caratteri più importanti rinvenibili in un individuo non possono essere descritti come alternativi, antagonisti o nettamente contrastanti poiché le differenze risultano essere gradualmente lungo una scala continua di valori. Tale variazione è di natura quantitativa e i caratteri che mostrano questo tipo di variazione vengono perciò detti quantitativi o metrici (**Fig. 1.45**). A differenza di quelli qualitativi, questi caratteri variano dunque in modo continuo nella popolazione, non possono essere classificati secondo classi discrete ma possono essere misurati e quindi descritti mediante parametri numerici. I caratteri quantitativi non possono essere identificati con uno o due geni ma dipendono dall’azione di molti geni e sono soggetti ad una notevole influenza operata dall’ambiente. Tenendo conto della maggiore complessità del sistema genetico alla base dei caratteri quantitativi, nel 1941 K. Mather denominò “poligeni” i fattori ereditari coinvolti nel loro controllo genetico e “sistema poligenico” l’insieme dei fattori che controllano la variabilità continua di questi caratteri [*Polygenic inheritance and natural selection*, 1942]. Le posizioni occupate da questi geni sui cromosomi corrispondono ai loci per i caratteri quantitativi, comunemente indicati con l’acronimo QTL (*Quantitative Trait Loci*). Molti dei caratteri agronomicamente utili sono di tipo quantitativo e l’identificazione dei loci corrispondenti è attualmente ritenuta di fondamentale importanza per il miglioramento genetico delle difese e delle produzioni nelle principali specie coltivate.

1.8 Genetica di popolazione

L’evoluzione fu concepita come conseguenza della mutazione – il meccanismo di origine della variazione ereditaria – e della selezione naturale a partire dagli anni venti del Novecento. Due importanti campi di ricerca che cominciarono in quegli anni sono la creazione di una teoria matematica dell’evoluzione e lo sviluppo di una analisi sperimentale dell’evoluzione in popolazioni naturali (genetica di popolazioni).

La genetica di popolazione, intesa come quella branca della genetica che studia l’eredità, in gruppi di individui, di caratteri controllati da uno o pochi geni, si basa sull’applicazione dei principi mendeliani a livello di popolazioni.

La genetica di popolazioni studia i modelli di distribuzione della variabilità all’interno di gruppi di individui, cioè la struttura genetica delle sottopopolazioni, e di ripartizione della variabilità tra sottopopolazioni, ma anche come questi modelli

cambiano, cioè si evolvono nel tempo e nello spazio. Come per la genetica dei caratteri quantitativi, lo sviluppo di questo campo di ricerca fu conseguente alla riscoperta dei principi di Mendel, soprattutto a causa delle sue implicazioni sulle teorie darwiniane. La combinazione delle teorie mendeliane con quelle più generali di Darwin, è detta la sintesi neo-darwiniana. Tale sintesi permise, in passato, di cogliere l'importanza della teoria della selezione naturale e costituisce, adesso, la base della moderna biologia.

Il primo passo per la formazione di nuove specie, è rappresentato dal differenziamento di razze (o sottospecie) nell'ambito di una specie. Le razze e le sottospecie risultanti da tale processo differiscono tra loro per le frequenze di un certo numero di alleli, ma sono interfeconde cioè attraverso l'incrocio danno origine a prole ibride fertili. Per studiare la formazione di razze e sottospecie fu necessario trasferire l'indagine dal livello individuale o familiare a quello di popolazioni. Il matematico inglese **Godfrey H. Hardy** (1877-1947) ed il medico tedesco **Wilhelm Weinberg** (1862-1937) osservarono in maniera del tutto indipendente che ad un particolare locus, date due frequenze geniche iniziali qualsiasi, $p(A)$ e $q(a)$, in una popolazione queste si mantengono costanti attraverso le generazioni se vengono rispettate un insieme di condizioni: i) la popolazione sia numerosa, infinitamente grande, almeno dal punto di vista teorico; ii) non vi sia selezione naturale, cioè che nessuno dei tre possibili genotipi AA , Aa e aa sia avvantaggiato rispetto agli altri; iii) non vi sia frequenza differenziale di mutazione nel senso $A \rightarrow a$ rispetto a quello $a \rightarrow A$; iv) non si verifichi migrazione dell'allele A o a da o verso popolazioni contigue; e v) le unioni fra individui siano del tutto casuali. Nel 1908 Hardy pubblicò un breve lavoro, *Mendelian proportions in a mixed population*, che descriveva la relazione tra i genotipi ed i fenotipi di una popolazione e poche settimane più tardi Weinberg stabilì in modo analogo la stessa relazione (*Über den nachweis der vererbung beim menschen* [Sulla dimostrazione dell'eredità nell'uomo], è il titolo del suo lavoro ben più consistente). La legge che unisce matematicamente le frequenze geniche con le frequenze genotipiche in una popolazione caratterizzata da incroci casuali porta il nome di entrambi: "legge dell'equilibrio di Hardy-Weinberg" (**Fig. 1.46**). È necessario, comunque, ricordare che nel 1903 il primo ad evidenziare la relazione tra frequenze geniche e genotipiche fu lo statunitense W.E. Castle, dell'Università di Harvard, che tuttavia non riuscì a formularla in termini matematici.

Le acquisizioni teoriche conseguenti alla formulazione della legge dell'equilibrio da parte di Hardy-Weinberg risultarono determinanti.

Sir **Ronald A. Fisher** (1890-1962), **J.B.S. Haldane** (1882-1964) e **Sewall Wright** (1889-1988) debbono essere considerati i maggiori artefici della teoria neo-darwinista, allorché nel decennio 1920-30 ripresero in esame il problema dell'evoluzione dal

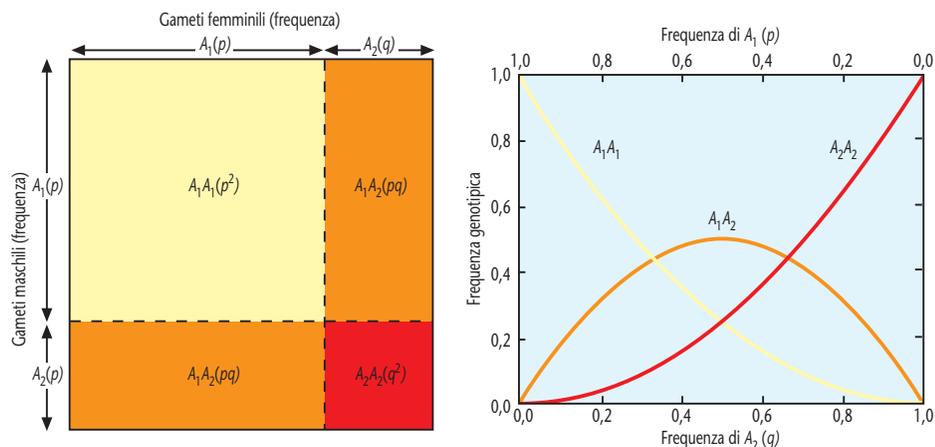


Fig. 1.46 – Proporzioni genotipiche attese ad un singolo locus secondo la legge di Hardy-Weinberg in funzione dei valori delle frequenze geniche (A) e relazione esistente tra frequenze geniche e genotipiche in una popolazione in equilibrio Hardy-Weinberg (B).

punto di vista genetico (**Fig. 1.47**). Fisher, Haldane e Wright elaborarono relazioni matematiche in grado di esprimere la teoria della selezione naturale, individuando varie modalità alla base dei processi selettivi. Essi si resero conto che la violazione di una o più delle assunzioni dell'equilibrio Hardy-Weinberg può costituire la causa di variazione delle frequenze geniche, cioè del primo gradino dell'evoluzione. La mutazione ha frequenze talmente basse che non è ritenuta determinante nello spostare le frequenze geniche, come pure la migrazione da o verso popolazioni contigue è un fenomeno generalmente piuttosto limitato. Il vantaggio di un genotipo rispetto agli altri così come la dimensione della popolazione e le unioni che si verificano al suo interno sono invece molto importanti. Il primo aspetto, quello relativo alla *fitness* individuale, si identifica con la selezione in senso darwiniano: se in un determinato ambiente gli individui aventi uno dei tre possibili genotipi ad un locus sono favoriti rispetto agli altri contribuiranno con un maggior numero di discendenti alla generazione successiva. Ciò significa che la selezione naturale agisce in loro favore. Nel tempo, perdurando il vantaggio, le frequenze geniche iniziali finiranno con lo spostarsi ed attestarsi su un nuovo equilibrio.

R.A. Fisher, mentre era insegnante di scuola superiore, nel 1915, scrisse un articolo che gettava le basi dell'analisi statistica dei caratteri quantitativi. L'articolo fu rifiutato dai revisori e venne pubblicato solo nel 1918, grazie ad un sussidio di Leonard Darwin, figlio di Charles. Nel 1922 Fisher pubblicò un lavoro molto importante sull'analisi quantitativa delle conseguenze evolutive dell'eredità mendeliana e qualche anno più tardi (nel 1930) pubblicò, con il titolo *The genetical theory of natural selection* [Teoria genetica della selezione naturale], la sua teoria unificante dell'evoluzione che combina i modelli mendeliani di eredità con la teoria darwiniana della selezione. Nello stesso anno, 1930, Sewall Wright sviluppò la sua teoria della selezione naturale, gettando le basi per la nascita della genetica delle popolazioni. Wright studiò in modo particolare l'effetto delle unioni tra individui imparentati (*inbreeding*) sulle popolazioni in equilibrio Hardy-Weinberg, arrivando a definire una fondamentale espressione matematica nota come "formula generale dell'equilibrio di Sewall Wright". In definitiva, Fisher e Wright, con le loro acquisizioni teoriche, permisero lo sviluppo della genetica quantitativa e della genetica di popolazioni, e consentirono l'emergere di concetti fondamentali come additività e ereditabilità.

Altri scienziati che portarono avanti osservazioni ed esperimenti particolarmente importanti per lo sviluppo della genetica di popolazioni furono **Theodosius Dobzhansky** (1900-1975), della Columbia University, negli USA, e **Motoo Kimura** (1924-1994), dell'Istituto Nazionale di Genetica di Mishima, in Giappone. Dobzhansky era un naturalista e un tassonomista, interessato soprattutto all'entomologia, che nel 1927 cominciò a lavorare con Morgan studiando popolazioni del genere *Drosophila*. Dobzhansky affermò che la spiegazione dell'evoluzione dovesse risiedere nella natura discreta e discontinua delle differenze interspecifiche. Un suo contributo essenziale fu l'ipotesi che le specie si formassero e si mantenessero distinte grazie a meccanismi di isolamento. Le popolazioni naturali di animali e piante a fecondazione incrociata vennero definite come comunità riproduttive di organismi sessuati che si dividono un pool genico comune. Dobzhansky ipotizzò che ciascuna specie fosse isolata dalle altre specie dal punto di vista riproduttivo. Nel 1937 pubblicò un libro, *Genetics and the origin of species* [Genetica e origine della specie], dove affermò che sono le mutazioni casuali a fornire la base della variazione genetica, sostenendo che le variazioni adattative si accumulano nelle specie per selezione naturale. Nel 1968 Kimura, genetista giapponese, propose la "teoria neutralista dell'evoluzione". Secondo questa teoria, la maggior parte della variazione genetica osservata nelle popolazioni naturali è dovuta all'accumulazione di mutazioni neutre che non influenzano il fenotipo dell'organismo. Di conseguenza, gli alleli neutrali non vanno incontro a selezione naturale. Kimura affermò che sebbene

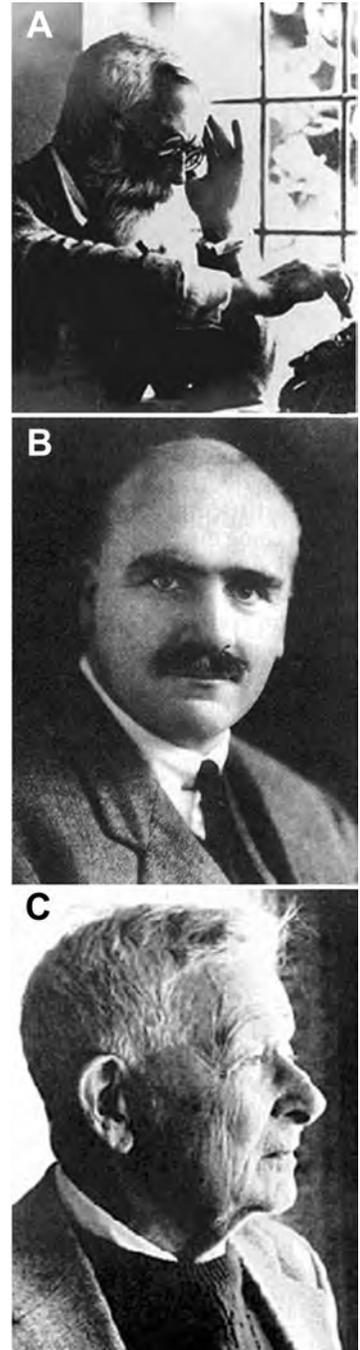


Fig. 1.47 – R.A. Fisher (A), J.B.S. Haldane (B) e S. Wright (C).

la selezione naturale sia responsabile delle variazioni adattative che avvengono in una specie durante l'evoluzione, bisogna prendere atto che la maggior parte della variazione presente attualmente nelle sequenze geniche consiste in una variazione neutra anziché adattativa. Di fatto, al momento esistono alcuni genetisti, detti selezionisti, che si oppongono alla teoria di Kimura, sostenuta dai neutralisti. Entrambe le scuole di pensiero considerano, comunque, sia la deriva genetica che la selezione naturale come elementi in grado di svolgere un ruolo essenziale nell'evoluzione.

La biologia molecolare ha indubbiamente aperto il campo completamente nuovo dell'indagine dell'evoluzione da un punto di vista molecolare. Ciò ha consentito un'analisi dettagliata dei cambiamenti evolutivi a livello di DNA. Sebbene gli studi molecolari non abbiano scalfito la centralità della teoria dell'evoluzione di Darwin per selezione naturale, a Kimura va riconosciuto il merito di avere evidenziato il grande ruolo che i cambiamenti casuali hanno nell'evoluzione molecolare.

1.9 Selezione e miglioramento genetico

Il miglioramento genetico prevede la manipolazione della variabilità genetica con lo scopo di indirizzare l'eredità dei caratteri e la composizione delle popolazioni verso uno specifico obiettivo. Si basa sulla scelta oculata ed intenzionale, nell'ambito di una popolazione variabile, dei migliori rappresentanti come i soli riproduttori in grado di contribuire alla generazione successiva.

Il miglioramento delle piante è vecchio quanto l'agricoltura ed è stato praticato empiricamente nel corso di molti secoli basandosi sulla scelta e sulla moltiplicazione dei tipi ritenuti superiori o aventi le caratteristiche desiderate (**Fig. 1.48**). La storia del miglioramento genetico può essere tracciata solo rifacendosi a documenti scritti ed evidenze archeologiche o paleontologiche. L'acquisizione delle conoscenze necessarie per arrivare ad un miglioramento genetico consapevole è proseguito per lunghissimo tempo in modo del tutto casuale. Così grazie al ritrovamento di testi cuneiformi si ha notizia che già gli Assiro-Babilonesi, intorno al 700-800 a. C. adottavano l'impollinazione artificiale nella palma da datteri (*Phoenix dactylifera*) senza avere alcuna nozione sul sesso delle piante. Attraverso l'incrocio veniva favorita l'allegagione e quindi la produzione. Reperti archeologici indicano che il miglioramento genetico potrebbe risalire a 13.000 anni fa con l'inizio dell'agricoltura. Tuttavia, molto prima di questo periodo, l'uomo era già dedito alla selezione dei frutti più grossi e delle piante più produttive e ciò si protrasse per migliaia di anni in molte specie, come, ad esempio, mais, frumento, orzo, riso, cotone, lino, arachide, ananas e banano. Queste sono con ogni probabilità le specie per le quali si è assistito alla più eccezionale trasformazione con il miglioramento genetico rispetto ai tempi della loro domesticazione.

Il problema del sesso nelle piante, al centro dell'attività di miglioramento genetico, fu affrontato in modo razionale solo con la pubblicazione del celebre *De sexu plantarum epistola* di Camerarius nel 1694. Linneo, nel 1760, forse vide i tubetti pollinici accrescersi nei pistilli, ma pensava all'esistenza di una "aura fecondante". Solo oltre un secolo più tardi, nel 1877, E. Strasburger individuerà il processo di fecondazione e formazione dello zigote così come lo intendiamo oggi.

Sebbene avesse conseguito successi significativi nel corso del XIX secolo con i lavori di Patrick Shireff, Frederic Hallett e soprattutto di John Le Couteur [*On the varieties, properties and classification of wheat*, London 1836] sul frumento e di Pierre Louis François Levêque de Vilmorin (1816-1860) sulla barbabietola, il lavoro di miglioramento delle piante coltivate diverrà una scienza applicata all'agricoltura e potrà qualificarsi come genetico a pieno titolo solo con la nascita della genetica. Tuttavia, già prima della nascita della genetica, l'ampia variabilità presente nelle po-

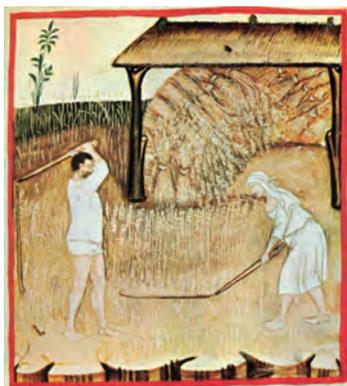


Fig. 1.48 – Piantagione di frumento (Taccuino Sanitatis Casanatense).

popolazioni coltivate rese necessaria l'introduzione di criteri più precisi di valutazione dei caratteri da migliorare e di metodologie più efficaci da utilizzare per la selezione. D'altro canto la produzione di ibridi interspecifici venne molto utilizzata per tutto il XVIII secolo. Il primo ibrido vegetale interspecifico venne ottenuto nel 1717 da Thomas Fairchild (1667-1729) incrociando il garofano comune (*Dianthus superbus*) con un'altra specie del genere *Dianthus*. Sulla scia di questo successo furono ottenute molte varietà di piante da fiore e da orto. Questo tipo di attività, condotta con specie di tabacco (genere *Nicotiana*), nel 1761 consentì a J.G. Kölreuter, di mettere in evidenza il particolare vigore degli ibridi o "eterosi" (Fig. 1.49). La conoscenza dell'effetto positivo dell'ibridazione artificiale promosse così l'uso di tale metodo, soprattutto in Inghilterra e in Germania, per sviluppare nuove varietà. Inoltre, Vilmorin, fu il primo ad utilizzare le prove di progenie per valutare le piante di barbabietola (*Beta vulgaris*) da impiegare per produrre nuove varietà.

Agli inizi del XX secolo, la riscoperta delle leggi di Mendel introdusse un cambiamento radicale nei metodi di selezione. Il miglioramento genetico prese comune avvio e divenne una scienza a sé non appena la genetica ebbe acquisito nozioni sufficienti non solo sui principi dell'eredità biologica (trasmissione dei caratteri, localizzazione dei geni nei cromosomi), ma anche sulle fonti di variabilità (ibridazione, ricombinazione, mutazione del genotipo). In questo contesto l'attività di ricerca di W. Bateson prima e di T.H. Morgan poi sugli aspetti riguardanti l'associazione e la ricombinazione genetica risultò determinante. È altresì vero che la possibilità di selezionare ai fini della costituzione di popolazioni migliorate e soprattutto la capacità di prevedere le caratteristiche ereditarie nelle discendenze e dirigere così l'evoluzione delle popolazioni dipese dalle acquisizioni teoriche di tre biologi che nel decennio 1920-30 lavorarono indipendentemente l'uno dall'altro: J.B.S. Haldane e R.A. Fisher in Gran Bretagna e S. Wright negli Stati Uniti. I tre ricercatori intrapresero l'analisi dei fenomeni ereditari e delle variazioni, non soltanto a livello di singoli individui, ma anche delle popolazioni. Nacque così un nuovo ramo della genetica, cui fu dato il nome di genetica di popolazione, che permise di sviluppare l'analisi matematica del problema dell'evoluzione.

Per studiare in quale modo possono insorgere variazioni delle frequenze geniche occorre riferirsi a popolazioni, anziché a piccoli gruppi di individui, ed analizzare il movimento dei geni nelle generazioni successive. Già Mendel aveva iniziato questo tipo di indagine, allorché aveva dimostrato che, attraverso successive autofecondazioni, il genotipo eterozigote diveniva sempre più raro col trascorrere delle generazioni, mentre i due omozigoti divenivano sempre più frequenti. Nel caso, invece, di fecondazione incrociata venivano mantenute le frequenze dei tre genotipi. Dopo la riscoperta delle leggi di Mendel, quando si fecero i primi tentativi per interpretare l'evoluzione sulla base del mendelismo, W.E. Castle (1903) e K. Pearson (1904) ripresero la sua idea, senza però riuscire a svilupparla compiutamente. Lo sviluppo ebbe luogo allorché lo statistico inglese G.U. Yule (1902) criticò la possibile interpretazione mendeliana dell'evoluzione. Le sue affermazioni spinsero, infatti, il genetista R.C. Punnett a sottoporre il problema al matematico G.H. Hardy, il quale studiò la questione delle frequenze geniche nelle popolazioni durante successive generazioni. Nello stesso anno W. Weinberg, si dedicò allo stesso problema giungendo in modo indipendente alle medesime conclusioni. Il lavoro di Hardy e quello di Weinberg destarono in principio scarso interesse e soltanto pochi genetisti, fra cui Herbert Spencer Jennings (1868-1947), ripresero questo tipo di ricerca. Solo dopo il 1930, quando Haldane, Fisher e Wright intrapresero lo studio matematico della selezione naturale, i lavori di Hardy e Weinberg vennero tratti dall'oblio e fu così che la genetica di popolazioni entrò in un periodo di rapido sviluppo soprattutto come supporto al lavoro di selezione sperimentale e di miglioramento genetico.

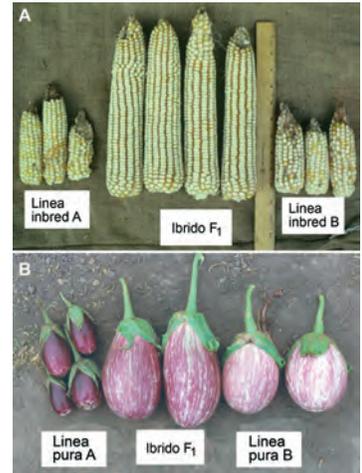


Fig. 1.49 – Vigore ibrido o eterosi in mais (A) e in melanzana (B).



Fig. 1.50 – Fiori di tabacco (A) e particolare di antere normalmente sviluppate e di antere abortite (B) a causa di maschio-sterilità citoplasmatica (foto: L. Russi). Fiore di radicchio (C), specie caratterizzata da meccanismi di incompatibilità, e particolare di reazioni compatibili e incompatibili con auto- e allo-polline (D) (foto: S. Varotto).

I primi progressi significativi nell'attività di miglioramento genetico vegetale si ebbero in seguito all'acquisizione di nuove conoscenze teoriche sull'eredità dei caratteri qualitativi e quantitativi a livello di gruppi di individui e soprattutto con la comprensione della struttura genetica delle popolazioni in relazione al sistema riproduttivo prevalente della specie (allogamo vs. autogamo). In questo contesto di notevole valore si rivelarono le scoperte di Edward M. East circa il ruolo della riproduzione sessuale nell'evoluzione e la natura multigenica dell'eredità dei caratteri a variabilità continua. East fu anche uno dei primi ricercatori a fornire informazioni sulla frequenza delle mutazioni in tabacco. Successivamente, fu Lewis John Stadler (1896-1954) che studiò la frequenza di particolari mutazioni in mais.

Nelle specie allogame la scoperta di barriere riproduttive sotto controllo genetico aprì la via alla costituzione di varietà ibride. Le strutture fiorali hanno effetti fortemente influenzati da sistemi genetici che possono favorire o limitare un particolare tipo di fecondazione. Tra i meccanismi genetici più efficaci nel favorire o richiedere l'incrocio sono quelli che determinano dioicismo, cioè piante con sessi separati, maschiosterilità e incompatibilità (**Fig. 1.50**). Questi meccanismi si rivelarono molto importanti per la costituzione di varietà ibride in molte specie ai fini dello sfruttamento del vigore eterotico (eterosi). Con l'incompatibilità, fenomeno molto diffuso in natura, il polline e gli ovuli sono funzionali e la mancata formazione di seme in presenza di gameti e di impollinazione è legata ad ostacoli fisiologici e morfologici che si oppongono alla fecondazione. Ciò che più di ogni altra cosa attirò gli operatori attivi nel miglioramento genetico delle specie vegetali fu l'autoincompatibilità, cioè il sistema che determina incompatibilità tra polline e pistillo della stessa pianta rendendo obbligatoria la fecondazione incrociata. Il controllo genetico del sistema gametofitico di incompatibilità fu studiato per la prima volta nel 1925 da E.M. East e P.C. Mangelsdorf in *Nicotiana sanderae*. Venne chiamato "sistema dei fattori di opposizione" e osservato che era sotto controllo di geni (*S*) in serie alleliche numerose non manifestanti tra loro rapporti di dominanza e recessività.

La maschiosterilità citoplasmatica, scoperta da F.V. Owen in barbabietola (*Beta vulgaris*) nel 1942, è caratterizzata dalla mancata produzione di gameti maschili o dalla produzione di gameti maschili non funzionali. Nelle popolazioni naturali la maschiosterilità, a differenza dell'incompatibilità, non è un meccanismo comune tra le specie vegetali. L'uso di questo tipo di sterilità, controllata da meccanismi di tipo genetico, citoplasmatico o genetico-citoplasmatico, rese possibile la produzione commerciale del seme ibrido in molte specie (ad esempio, sorgo, girasole, pomodoro e barbabietola).

Molti sono i ricercatori che nella metà del XX secolo hanno svolto un ruolo chiave nell'acquisizione di informazioni teoriche circa la struttura genetica delle popolazioni naturali e sperimentali, e nello sviluppo di metodi di selezione e di costituzione varietale.

Le popolazioni di base per il miglioramento genetico delle piante allogame sono create per lo più attraverso schemi di selezione ricorrente. Tali schemi, che prevedono ripetuti cicli di selezione, furono sviluppati da H.K. Hayes e R.J. Garber, da E.M. East e D.F. Jones, tra il 1919 e il 1920, con la finalità di aumentare le frequenze dei geni favorevoli presenti in una data popolazione di partenza ed avere così maggiori possibilità di estrarre dai materiali selezionati genotipi superiori. In seguito, i ricercatori americani che lavoravano sul mais, nel corso degli anni 1930-1940, condussero diverse sperimentazioni con l'obiettivo di selezionare linee *inbred* superiori da impiegare nella costituzione di varietà ibride. **Gorge Harrison Shull** (1874-1954), a Cold Spring Harbor, New York, fu il primo, nel 1906, a suggerire un metodo basato sull'ottenimento di linee *inbred* mediante autofecondazione continuata e sulla successiva combinazione delle linee ottenute attraverso l'incrocio per l'ottenimento di ibridi F_1 . Il termine varietà ibride è usato nel miglioramento genetico per indicare popolazioni geneticamente uniformi che manifestano un notevole vigore eterotico ottenute dall'incrocio tra due linee *inbred*, entrambe omozigoti a tutti i loci ma per alleli diversi (**Fig. 1.51**).

L'ibrido divenne economicamente conveniente solo dopo il 1918, quando Jones suggerì di costituire ibridi doppi attraverso l'incrocio tra due ibridi semplici. Fino ad oggi il più grande successo delle varietà ibride è stato realizzato con il mais. Le strutture morfologiche e la separazione fisica delle infiorescenze maschili e femminili di questa specie la rendono particolarmente adatta sia per l'autofecondazione (produzione delle linee *inbred*) che per la fecondazione incrociata (produzione del seme ibrido) (**Fig. 1.52**).

Nel 1922 Wright inventò il coefficiente di *inbreeding*. Grazie a questo indice fu possibile cominciare a misurare quantitativamente l'effetto delle unioni tra individui imparentati come probabilità che due alleli aventi la stessa origine (alleli identici) si trovino insieme nello stesso zigote.

Riguardo alla natura genetica del fenomeno dell'eterosi nei vegetali (**Quadro 1.3**), le ipotesi formulate e i dati sperimentali raccolti sono contrastanti. Nel 1908 Charles Davenport formulò l'ipotesi della dominanza per spiegare l'eterosi. Secondo questa ipotesi la depressione da *inbreeding* è causata dalla fissazione allo stato omozigote di alleli recessivi sfavorevoli (ma non letali) che nelle popolazioni in equilibrio altamente eterozigoti si esprimono raramente. L'eterosi sarebbe dovuta semplicemente al fenomeno opposto, vale a dire al mascheramento degli alleli recessivi sfavorevoli presenti in una linea *inbred* da parte degli alleli dominanti dell'altra linea *inbred* utilizzata nell'incrocio. Nello stesso periodo, Shull e East proposero indipendentemente una seconda ipotesi nota come ipotesi della sovradominanza. Dal momento che si ha sovradominanza quando l'eterozigote è più vigoroso di ciascuno dei corrispondenti omozigoti, secondo questa ipotesi l'eterosi sarebbe dovuta al fatto che gli ibridi risultanti dall'incrocio sono eterozigoti per uno o più geni che presentano sovradominanza. In anni più recenti Charles Stuber e collaboratori, lavorando con il mais, hanno raccolto prove a favore dell'ipotesi della sovradominanza, mentre Steven Tanksley e collaboratori hanno scoperto che in riso l'eterosi è dovuta alla dominanza. Nei prossimi anni sarà certamente sciolto il dilemma di come l'eterosi nelle specie di interesse agrario sia spiegabile, con la dominanza, la sovradominanza o una combinazione dei due fenomeni.



Fig. 1.51 – Esperimenti di G.H. Shull a Cold Spring Harbor inerenti alla produzione di ibridi di mais.



Fig. 1.52 – Infiorescenza femminile (spiga) e maschile (pannacchio) di mais.

Quadro 1.3 – Linee pure, linee *inbred* e ibridi – *inbreeding* e eterosi

Le "linee *inbred*" sono popolazioni di piante di specie allogame ottenute attraverso autofecondazione praticata per più generazioni successive. Le linee finali che si ottengono sono pertanto

omozigoti a tutti i loci. Da un punto di vista genetico, le linee *inbred* equivalgono alle linee pure. Tuttavia, il termine "linea pura", introdotto da Johannsen, dovrebbe essere utilizzato unicamente per le specie autogame. Per definizione, una linea pura è un insieme di individui derivati per autofecondazione da un capostipite omozigote. Qualsiasi sistema che preveda l'unio-

ne sessuale tra individui imparentati (*inbreeding*) determina un aumento del livello di omozigosi che, nelle specie allogame, è accompagnato da un declino di vigore ed una riduzione di produttività generalizzati. Tale fenomeno, noto come “depressione da *inbreeding*” ovviamente non si osserva nelle specie autogame, dal momento che in queste specie l’autofecondazione costituisce il sistema riproduttivo prevalente se non quello obbligato. È necessario sottolineare, comunque, che la risposta all’*inbreeding* varia in funzione della specie. Ci sono infatti specie, come il mais, che tollerano bene l’*inbreeding* e permettono di ottenere e mantenere agevolmente linee *inbred*, altre invece, come ad esempio l’erba medica, che non tollerano o tollerano male l’*inbreeding*, rendendo molto difficoltoso produrre linee *inbred*. La ristorazione

del vigore e della fertilità a livelli pari o superiori a quelli originari, attraverso l’incrocio tra linee *inbred*, è ciò che va sotto il nome di vigore ibrido o “eterosi”. L’eterosi è quindi l’esatto opposto della depressione da *inbreeding*. Il termine eterosi venne coniato da George Shull che, insieme a Edward M. East, fu tra i primi scienziati a studiare il fenomeno. L’eterosi non è comunque un fenomeno limitato all’incrocio tra *inbred*, ma può manifestarsi anche nei prodotti dell’incrocio tra popolazioni in equilibrio o tra altri materiali eterozigoti di specie allogame e negli ibridi ottenuti dall’incrocio tra linee omozigoti di specie autogame. Perciò, un ibrido, per definizione, è un individuo risultante dall’unione di gameti differenti per uno o più alleli, cioè un individuo eterozigote a uno, più o tutti i loci (**Fig. 1.53**).



Fig. 1.53 – Esempi di linee *inbred* e varietà ibride di mais e linee pure di orzo.

Varietà composte di piante fenotipicamente simili, che in termini di composizione genotipica a singoli loci possono praticamente considerarsi vicine ad una condizione di equilibrio e che sicuramente hanno avuto un ruolo di grande rilievo nella storia del miglioramento genetico delle specie allogame sono le sintetiche. Le prime varietà sintetiche vennero ottenute mediante l’interincrocio di un certo numero di cloni, linee o altri materiali valutati in precedenza sulla base di prove di progenie. A partire dagli anni attorno al 1930, con le ricerche condotte in Inghilterra da Sir George R. Stapledon (1885-1965) e Thomas Jenkin ed in Canada da John T.O. Kirk, le varietà sintetiche ebbero una diffusione sempre maggiore soprattutto nelle specie foraggere, sia graminacee che leguminose. Tali varietà destarono subito grande interesse anche per altre colture, come ad esempio il mais, soprattutto in considerazione del loro ruolo potenziale in aree geografiche dove le produzioni di pieno campo non erano sufficientemente alte da compensare il costo elevato del seme delle varietà ibride. In questo settore, Sewall Wright, nel 1922, sviluppò una formula che consentiva di calcolare le produzioni attese nelle diverse generazioni di una sintetica formata a partire da un numero qualsiasi di linee *inbred*. La conferma sperimentale di tale formula fu data nel 1935 da N. Neal con una classica esperienza condotta sul mais.

Riguardo invece alle risposte che si possono avere dalla selezione in funzione del tipo di controllo genetico dei caratteri, un ruolo determinante lo ebbero K. Mather, del John Innes Institution di Londra e S. Wright, del Cold Spring Harbor Laboratory di New York. Questi due ricercatori elaborarono una serie di modelli genetici che consentissero di interpretare le risposte alla selezione di volta in volta osservate nelle loro sperimentazioni in *Drosophila*.

Mather, ad esempio, elaborò un modello teorico dell’eredità quantitativa che permise la suddivisione della variazione genetica di una popolazione nelle sue principali componenti. Tale modello, noto come “modello di Mather”, consentì di elaborare statistiche interpretative appropriate per la stima di un parametro chiave nella pianificazione dei programmi di miglioramento genetico: l’ereditabilità. L’ereditabilità, misurando il peso relativo delle cause genetiche ed ambientali nella manifestazione fenotipica di un carattere quantitativo, consentì di iniziare a misurare e prevedere il progresso conseguibile con la selezione.

Anche Sewall Wright si interessò di risposte alla selezione: egli affermò che la forma di una specie meglio adattata ad un dato ambiente è di norma quella che ha tutti i caratteri quantitativi prossimi alla media. Tale concetto fu basato sul fatto che la selezione naturale, agendo globalmente, favorisce gli individui con i valori prossimi alla media per tutti i caratteri. A ciò corrisponde una pressione selettiva contro i fenotipi estremi ed il mantenimento, da parte della popolazione, della variabilità genetica sufficiente per adattarsi ai cambiamenti ambientali che si possono verificare nel lungo periodo. Fu inoltre osservato che quando più individui competono liberamente tra di

loro in una popolazione abbastanza numerosa, la sopravvivenza dipende dalla loro *fitness* (o capacità riproduttiva), cioè dal numero di semi che ogni individuo produce e quindi dal contributo relativo fornito da ogni individuo alla generazione successiva. Per spiegare come la selezione naturale può modificare la manifestazione fenotipica di certi alleli, Sewall Wright formulò il concetto di “picchi adattativi” in grado di descrivere le combinazioni di molti alleli che conferiscono una *fitness* ottimale in un ambiente stabile. Negli anni attorno al 1930 Wright svolse un ruolo di primo piano anche nella formulazione del concetto di “deriva genetica casuale”, termine con cui si indicano le alterazioni delle frequenze geniche e genotipiche dovute al campionamento casuale: Wright dimostrò che nelle popolazioni poco numerose le frequenze alleliche possono subire fluttuazioni da una generazione all’altra per effetto puramente del caso, fenomeno che favorisce o la perdita o la fissazione degli alleli. Spesso in suo onore la deriva genetica viene chiamata “effetto Sewall Wright” (Fig. 1.54).

Nelle specie allogame, sia per la costituzione di varietà sintetiche che di varietà ibride, uno dei problemi più difficili del miglioratore fu quello di correlare il fenotipo al genotipo. Questo problema venne risolto con l’introduzione delle prove di progenie (*progeny test*). Diversi ricercatori misero a punto schemi sperimentali aventi la finalità di valutare ciascuna pianta madre in esame in base alle prestazioni della sua progenie. Fare questo permise di raccogliere informazioni sull’attitudine alla combinazione generale e specifica, parametri genetici fondamentali per la costituzione, rispettivamente, di sintetiche e di ibridi. Anche in questo settore Wright fornì un contributo molto importante con il suo lavoro del 1921 *Systems of mating: the biometric relation between parent and offspring* [Sistemi di unione: la relazione biometrica tra genitore e progenie].

Nelle specie autogame un ruolo chiave lo ebbe W. Johannsen. Tra il 1903 e il 1909 Johannsen realizzò una serie di esperimenti in fagiolo che gli permisero di distinguere per la prima volta la variabilità dovuta a cause genetiche da quella attribuibile ad effetti ambientali, e soprattutto di dimostrare che la selezione può operare solo in presenza di variabilità genetica. Il fatto che la selezione entro linea pura risultasse inefficace aprì una nuova era del miglioramento genetico delle specie autogame rivolto alla costituzione di varietà geneticamente uniformi basate sulla linea pura. Tuttavia, alcuni esperimenti simili a quelli di Johannsen, condotti intorno al 1950 da **Robert K. Allard** (1919-2003) e collaboratori, sempre con specie di fagiolo (*Phaseolus vulgaris* e *Phaseolus lunatus*), indicarono che la selezione entro linee può dare risultati positivi, suggerendo che gli individui di una popolazione di specie autogama non sempre sono pienamente omozigoti, come si riteneva in passato, ma forniscono sempre nuova variabilità ad ogni generazione, attraverso la segregazione e la ricombinazione. Tale risultato portò Allard a concludere che nelle popolazioni di specie autogame è presente un equilibrio conseguente al fatto che la perdita di variabilità dovuta alla selezione naturale è bilanciata dal rilascio di nuova variabilità derivante da mutazioni spontanee e da incroci naturali.

In queste specie le fonti di nuova variabilità genetica sono rappresentate dalle mutazioni spontanee a singoli loci e dall’incrocio occasionale seguito dalla segregazione e dalla ricombinazione. Tale variabilità, e soprattutto quella creata artificialmente attraverso l’incrocio controllato tra linee pure, è stata a lungo sfruttata per la costituzione di nuove varietà di specie autogame.

Dopo il 1926, anno in cui Herman J. Müller (1890-1967) dimostrò che i raggi X possono indurre mutazioni genetiche, molti ricercatori iniziarono ad utilizzare la mutagenesi per indurre variazioni nelle specie vegetali. Nel 1937, il botanico americano Albert Francis Blakeslee (1874-1954) arrivò a dimostrare che era possibile elevare il tasso di mutazione anche mediante l’esposizione a sostanze chimiche specifiche, per questo motivo chiamate “mutagene”, come ad esempio la colchicina. A distanza di un ventennio, la mutagenesi sperimentale si estese notevolmente e venne basata

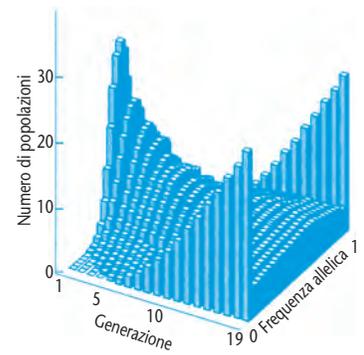


Fig. 1.54 – Modello teorico di Sewall Wright circa il destino di alleli neutrali in un campione di popolazioni.

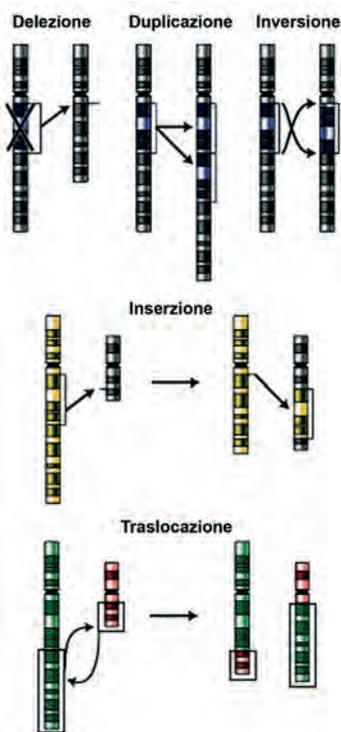


Fig. 1.55 – Mutagenesi: conseguenze a livello della struttura dei cromosomi.

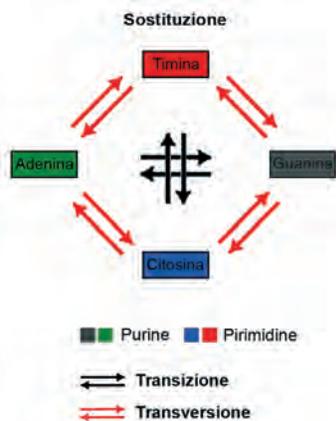


Fig. 1.56 – Mutazioni geniche per sostituzione.

sull'impiego sia di mutageni chimici che fisici. Tra questi ultimi, le radiazioni ionizzanti (raggi X, neutroni, particelle α e β , raggi γ) rappresentarono i mutageni più largamente usati. C. Auerbach, di Edinburgo, con esperimenti condotti dolorosamente sulla sua pelle tra il 1930 e il 1940, dimostrò che anche certi composti chimici (gas mostarda) potevano indurre mutazioni determinando fenomeni e danni simili a quelli provocati dai raggi X. Queste scoperte portarono, con la fine della Seconda Guerra Mondiale, a studi molto più sofisticati di mutagenesi. Soprattutto negli anni 1960-70, l'induzione di mutazioni fu un sistema largamente impiegato negli Stati Uniti come in Europa per sviluppare nuove varietà di piante agrarie.

Le mutazioni sono modificazioni improvvise del materiale ereditario e possono interessare la sua organizzazione sia a livello genomico che cromosomico e genico (**Fig. 1.55** e **Fig. 1.56**). Tra queste, furono le mutazioni genomiche e soprattutto quelle geniche a risultare più utili per il miglioramento genetico. Le mutazioni cromosomiche dimostrarono infatti ben presto di essere troppo dannose per rivestire un interesse pratico. Le piante coltivate rivelarono di prestarsi in modo diverso all'induzione della poliploidia e sebbene i risultati ottenuti in diverse specie (ad esempio, tetraploidi di lino, soia, segale, barbabietola e pomodoro) furono soddisfacenti dal punto di vista tecnico-scientifico, la loro diffusione in coltivazione si rivelò molto limitata e di scarsa utilità pratica. Le piante allopoliploidi (contenenti genomi completi di specie differenti) vennero comunque utilizzate per produrre ibridi interspecifici fertili, mentre la scoperta della colchicina permise di produrre autoploidi (aventi genomi in soprannumero della stessa specie). Con l'avvento della poliploidia, si scoprì anche che la frutta generalmente senza semi, come le banane, aveva un numero di corredi cromosomici dispari e che tali piante erano sterili poiché non potevano avere una meiosi normale. Negli anni 1955-60, il giapponese Hitoshi Kihara utilizzò un triploide con 33 cromosomi, ottenuto dall'incrocio di un diploide con un tetraploide, per produrre angurie senza semi. Diverso è invece il discorso riguardante le mutazioni geniche indotte attraverso l'applicazione di agenti mutageni. Dal momento che le mutazioni causano una perdita di funzione, nella maggior parte dei casi dimostrarono di essere recessive e deleterie, spesso perfino letali, per l'individuo che le subisce. Tuttavia, fu possibile individuare alcune mutazioni con effetti vantaggiosi che si rivelarono interessanti da un punto di vista applicativo. Soprattutto nei cereali, i materiali con caratteristiche favorevoli ottenuti a seguito di trattamento mutageno vennero utilizzati direttamente per costituire nuove varietà oppure incrociati con linee già esistenti allo scopo di introdurre in queste le caratteristiche favorevoli insorte con il trattamento mutageno. Il secondo metodo, si rivelò quello migliore e nel 1974 portò, ad esempio, alla selezione del "Creso", varietà italiana di frumento duro capace di fornire produzioni ottime dal punto di vista qualitativo e quantitativo, competitive per oltre un ventennio con le varietà commerciali più diffuse. Questa varietà ha rappresentato in Italia un punto di svolta per il miglioramento genetico del frumento duro tanto che a distanza di oltre tre decenni dalla sua costituzione entra ancora nelle genealogie di alcune delle moderne varietà. Attualmente la mutagenesi è comunque ormai in disuso.

L'uniformità genetica e la produttività delle popolazioni rappresentano elementi essenziali dei programmi di costituzione varietale che hanno tuttavia subito uno sviluppo consistente in un numero di anni relativamente ridotto. Soltanto in seguito alle conoscenze genetiche acquisite e al lavoro di miglioramento genetico portato avanti sistematicamente a partire dagli inizi del secolo scorso, per le singole specie coltivate si è assistito all'affermazione di varietà migliorate, agronomicamente superiori e geneticamente uniformi. Questo fenomeno è risultato particolarmente evidente con la "Rivoluzione Verde" che negli anni 1950-60 portò alla costituzione e alla rapida diffusione di linee pure e di ibridi, varietà molto produttive e adatte ad una agricoltura intensiva di tipo monocolturale. In questo processo l'agronomo

Paese	Specie	1963	1983
India	Frumento	0,9	1,7
India	Riso	0,9	2,2
Cina	Frumento	1,0	2,5
Cina	Riso	2,0	4,7

Dati FAO

Tab. 1.3 – Risultati della Rivoluzione Verde in frumento e riso in termini di produzione unitaria di granella (t/ha).

americano **Norman Ernest Borlaug** (1914-) svolse un ruolo rilevante tanto che nel 1970 ricevette il Premio Nobel per la pace – poiché non esiste un premio simile per l'agricoltura – soprattutto a riconoscimento degli sforzi profusi in Messico presso l'*International Maize and Wheat Improvement Center* (CIMMYT) a partire dal 1944 per lo sviluppo di varietà di frumento altamente produttive. In seguito lavori analoghi vennero condotti nelle Filippine e portarono allo sviluppo di varietà di riso altrettanto produttive in meno di un decennio. Per entrambe le specie, i programmi di incrocio e selezione permisero di introdurre e combinare insieme geni responsabili di caratteri importanti alla base della produttività, come la taglia bassa, la maturazione rapida, la resistenza alle malattie (ruggine in frumento e brusone in riso) e l'adattamento alle condizioni locali. Gli incrementi produttivi osservati per questi cereali in India e Cina (**Tab. 1.3**) possono considerarsi alla base del forte incremento demografico verificatosi in queste regioni. Con la costituzione delle varietà migliorate cambiarono in realtà anche i sistemi agrari: nel caso delle varietà di frumento e riso i coltivatori dovettero infatti adottare non soltanto i semi, ma anche il pacchetto tecnologico a questi associato, comprendente fertilizzanti, insetticidi, erbicidi nonché le macchine per la lavorazione dei terreni. Tutto ciò permise consistenti aumenti delle produzioni unitarie e di quelle annuali complessive, determinando al contempo aumenti notevoli delle richieste lavorative (**Fig. 1.57**).

Con il termine “varietà” si indica un insieme di piante coltivate chiaramente distinte per caratteri morfologici, fisiologici, citologici, chimici e molecolari che,

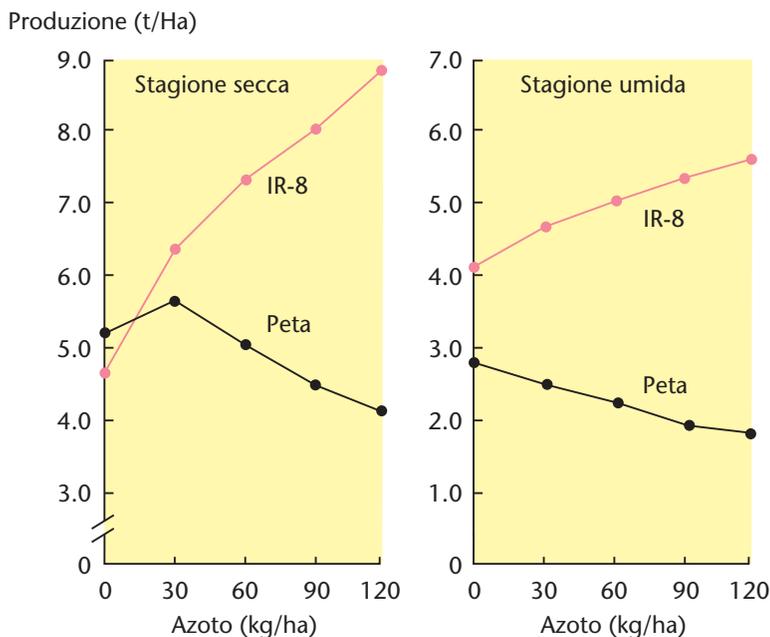


Fig. 1.57 – Produzioni di granella (t/ha) in relazione alle concimazioni azotate (kg/ha) osservate nella varietà ibrida di riso IR-8 ottenuta incrociando la linea pura Peta con la landrace *Dee-gee-woo-gen*.

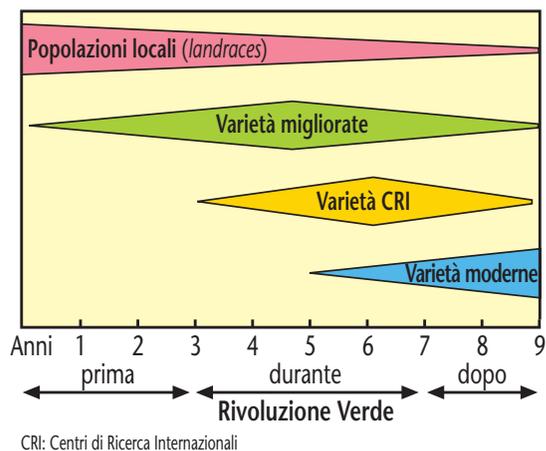


Fig. 1.58 – Sequenza dello sviluppo e dell'uso di varietà prima, durante e dopo la Rivoluzione Verde (da: M. J. Chrispeels e D. E. Sadava 2003, modificato).

altamente produttive ed uniformi rappresenta il risultato di un processo sostanzialmente simile avvenuto in molti Paesi di continenti diversi (**Fig. 1.58**). Prima della Rivoluzione Verde, gli agricoltori hanno impiegato varietà tradizionali (stadio I) selezionate a partire da popolazioni locali (*landraces*). Queste varietà erano molto bene adattate allo specifico ambiente di coltivazione ma presentavano problemi di altra natura, come la suscettibilità alle malattie e la bassa produttività. Allo scopo di migliorare tali varietà, i miglioratori di specifiche aree nazionali di coltivazione ricorsero allora all'incrocio tra diverse varietà diffuse localmente e alla selezione di varietà migliorate (stadio II). Benché superiori a quelle di partenza, anche queste varietà risultarono non sufficienti a soddisfare le richieste crescenti di una popolazione in continuo aumento. A questo punto, i centri di ricerca internazionali cominciarono a selezionare varietà a bassa taglia, più resistenti, precoci e produttive, che in poco tempo si diffusero a livello mondiale innescando una vera e propria Rivoluzione Verde (stadio III). Dopo questa fase, i miglioratori hanno avviato programmi di incrocio tra le varietà moderne e i materiali locali allo scopo di migliorarne l'adattamento a specifiche condizioni pedo-climatiche (stadio IV).

Il progresso dell'agricoltura nei Paesi in via di sviluppo, che spesso coincidono con i centri di origine e diversificazione delle più importanti specie coltivate, spinse i coltivatori locali ad adottare le varietà migliorate più resistenti e produttive innescando però un processo impressionante di erosione genetica. In anni recenti, il riconoscimento di questa situazione ha spinto il CGIAR (*Consultive Group on International Agricultural Research*) a fondare l'*International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI) che attualmente coordina l'attività di una serie di centri di ricerca internazionali. Ognuno di questi è responsabile per una determinata coltura ed ha come principale mandato la

Tab. 1.4 – Tipi di varietà selezionate dai miglioratori in funzione del sistema riproduttivo.

Specie	Sistema riproduttivo prevalente	Tipi di varietà
Riso	Autofecondazione	Linee pure e ibridi
Frumento	Autofecondazione	Linee pure
Mais	Fecondazione incrociata	Ibridi
Soia	Autofecondazione	Linee pure
Patata	Fecondazione incrociata	Cloni
Sorgo	Autofecondazione	Ibridi e linee pure
Orzo	Autofecondazione	Linee pure
Arachide	Autofecondazione	Linee pure
Fagiolo	Autofecondazione	Linee pure
Girasole	Fecondazione incrociata	Ibridi e sintetiche
Erba medica	Fecondazione incrociata	Sintetiche

quando riprodotte per via sessuale o propagate per via vegetativa, nei modi indicati dal costitutore, conservano i loro caratteri distintivi. La varietà per poter essere legalmente riconosciuta deve essere distinguibile, uniforme, stabile (D.U.S.) e possedere valore agronomico e di utilizzazione (V.A.U.).

La massima uniformità fenotipica si realizza costituendo popolazioni prive di variabilità genetica. Per tale motivo, in genere le varietà di specie a propagazione vegetativa si identificano con i cloni, quelle di specie autogame con le linee pure e quelle di specie allogame con gli ibridi F_1 .

Nel lunghissimo periodo intercorso tra la domesticazione e il rilascio di varietà commerciali sono state coltivate le varietà locali o *landraces*, che si sono costituite ed affermate plasmandosi sulle disponibilità offerte dall'ambiente naturale di coltivazione e dalle tecniche agronomiche imposte dall'uomo. L'adozione delle moderne varietà

salvaguardia delle risorse genetiche vegetali basata sulla gestione di banche del germoplasma per la conservazione *in situ* o *ex situ* delle razze locali delle più importanti specie coltivate nonché delle specie ancestrali e selvatiche affini.

Il fine ultimo del miglioratore genetico delle piante è in definitiva quello di costituire nuove varietà e di studiare i principi, i metodi e le tecniche per ottenerle, soddisfacendo le esigenze reali degli agricoltori. In questo contesto le conoscenze genetiche rappresentano unicamente uno strumento di lavoro. Robert V. Allard, con il suo libro *Principles of plant breeding* [Principi di allevamento vegetale], del 1960, può essere considerato colui che per primo fece ordine nella materia riassumendo i concetti basilari del miglioramento genetico delle piante agrarie (Tab. 1.4).

Negli ultimi tempi si è assistito ad un radicale cambiamento riguardo all'approccio seguito nella costituzione di nuove varietà. Ai metodi di selezione convenzionale si sono affiancati metodi biotecnologici, basati sulle colture *in vitro* di espanti cellulari e sulle manipolazioni *in vitro* di acidi nucleici – ingegneria genetica – che consentono modificazioni mirate tendenti a dotare una varietà già eccellente di una o poche caratteristiche agronomiche e produttive di pregio.

1.10 Biotecnologie genetiche: colture *in vitro* e ingegneria genetica nelle piante

La biotecnologia è conoscenza e studio (*logos*) di una serie di norme della vita organica (*bios*) per il concreto svolgimento di un'attività manuale o intellettuale (*technè*) rivolta a trasformare una data materia prima per produrre e ricavarne beni oppure per innovare servizi.

In anni recenti sono state messe a punto tecniche innovative di manipolazione genetica degli organismi note come biotecnologie genetiche avanzate. Nel corso del tempo le biotecnologie genetiche si sono diversificate in funzione del sistema biologico studiato e in rapporto all'ambito applicativo, dando così luogo alle biotecnologie genetiche applicate ai microbi, ai vegetali, agli animali, alla salute dell'uomo. Le biotecnologie applicate alle piante agrarie operano prevalentemente a due livelli: cellulare e molecolare.

Il primo settore di attività, quello cellulare, è fondato sulla totipotenza delle cellule vegetali e quindi si è sviluppato sulla base della conoscenza che porzioni

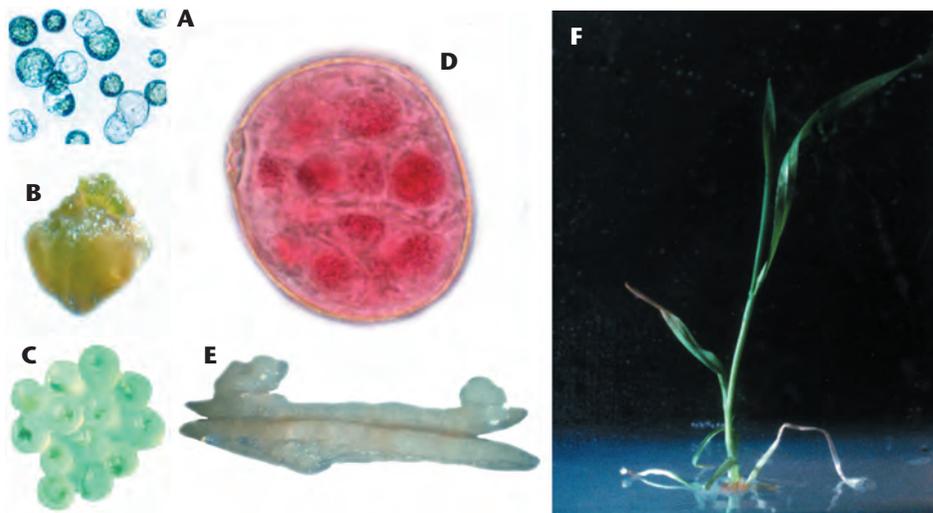


Fig. 1.59 – Esempi di colture *in vitro* di protoplasti per l'ottenimento di ibridi somatici (fusione di protoplasti) (A), di calli embriogenetici (B) per l'ottenimento di semi sintetici (embrioni somatici) (C) e di antere (D) e di antere (E) per l'ottenimento di plantule aploidi (androgenesi) (F).

multicellulari di una pianta (espianti) e perfino singole cellule (protoplasti, microspore) possono *in vitro*, con adeguati substrati e condizioni colturali, rigenerare nuove piante complete di tutti gli organi (**Fig. 1.59**). La possibilità di rigenerare piante da cellule, tessuti e organi è anche un requisito essenziale per poter operare manipolazioni a livello molecolare. Il settore di attività a livello molecolare si è sviluppato dopo alcune scoperte molto importanti come quelle che consentono di individuare, isolare e modificare i geni e di poterli trasferire dalle cellule di una specie a quelle di un'altra specie. Tale metodo, noto come trasformazione genetica, consente di ottenere cellule trasformate in grado di evolversi poi in piante dette transgeniche nel cui genoma sono stati incorporati geni esogeni (transgeni) senza la mediazione del processo sessuale. Così come le "colture *in vitro*" di espanti cellulari e la rigenerazione di piante sono basate sulla totipotenza, la "transgenesi" per l'ottenimento di piante geneticamente modificate (PGM) è basata sull'ingegneria genetica e su vettori di trasferimento di DNA esogeno.

Intorno al 1950 si manifestò la necessità di sviluppare metodi di miglioramento genetico delle piante più riproducibili e più affidabili da un punto di vista teorico-pratico. La possibilità di controllare *in vitro*, attraverso la micropropagazione, grandi quantità di espanti per poter selezionare genotipi dotati di caratteristiche particolari apparve di grande utilità per il miglioramento genetico delle specie di interesse agrario. Le tappe principali che condussero all'uso pratico di nuove tecnologie genetiche basate sulle colture *in vitro* sono state: i) l'ottenimento di calli (strutture indifferenziate) da espanti o singole cellule; ii) la messa a punto di procedure e soluzioni enzimatiche per l'isolamento di protoplasti (cellule private della parete); iii) la scoperta della totipotenza delle cellule vegetali; iv) la messa a punto di protocolli per la rigenerazione di piante da protoplasti e sospensioni cellulari; v) l'ottenimento di piante aploidali da microspore. Contributo determinante all'acquisizione di tali informazioni fu dato da **T. Murashige** e **Folke K. Skoog** (1908-2001).

La scoperta fondamentale che ha segnato lo sviluppo delle colture *in vitro* si ebbe nel 1939 quando P.R. White, R. Gautheret e P. Nobécourt dimostrarono indipendentemente che l'accrescimento illimitato di espanti non meristematici poteva essere ottenuto in presenza di auxina. Nel 1957 F. Skoog e C.O. Miller dimostrarono, invece, l'importanza delle citochinine per la rigenerazione *in vitro* delle piante. Altre acquisizioni determinanti furono quelle di J. Reinert e di F.C. Steward e collaboratori i quali nel 1958 osservarono che singole cellule di carota potevano differenziare *in vitro* embrioni somatici in grado di rigenerare piante complete. Altrettanto importanti sono stati infine i protocolli sperimentali messi a punto nel 1960 da E.C. Cocking per isolare protoplasti mediante digestione enzimatica della parete cellulare di espanti vegetali, da essere impiegati nella coltura *in vitro* di sospensioni e nel 1964 da S. Guha e S.C. Maheshwari per rigenerare piante complete da granuli pollinici mediante coltura *in vitro* di antere.

La selezione *in vitro* per sé non riuscì a fornire un gran contributo al miglioramento genetico vegetale, tuttavia contribuì alla definizione del concetto che le attività non convenzionali di miglioramento genetico e quelle di manipolazione genetica potessero includere un passaggio *in vitro* come loro parte integrante (ad esempio, micropropagazione, embriogenesi somatica e trasformazione genetica).

Le tecniche proprie delle colture *in vitro* possono trovare applicazione nel miglioramento genetico per raggiungere fini particolari come: i) l'ottenimento di ibridi somatici; ii) il recupero di embrioni di ibridi interspecifici; iii) l'ottenimento di linee aploidali via androgenesi (coltura di polline) o ginogenesi (coltura di ovuli); iv) la selezione di linee cellulari resistenti a stress biotici ed abiotici, e di mutanti utili dello sviluppo basata sullo sfruttamento della variazione somaclonale; v) la produzione di semi sintetici (**Fig. 1.60**).

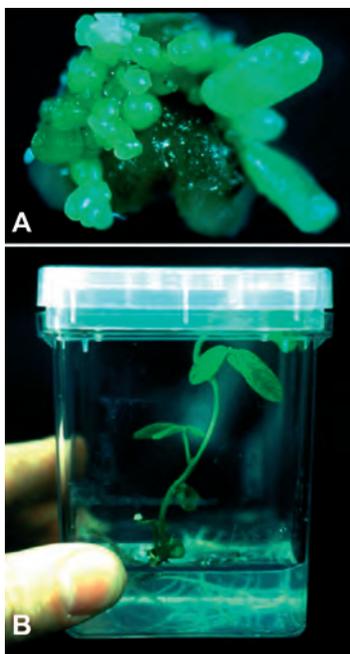


Fig. 1.60 – Embriogenesi *in vitro*: calli con embrioni avventizi (A) e piantuola rigenerata (B) di erba medica.

Agli inizi del 1980 crebbe l'interesse specialmente verso l'embriogenesi somatica come premessa allo sviluppo del seme sintetico (o artificiale). Molto più interessanti per il miglioramento genetico vegetale si dimostrarono comunque l'androgenesi e l'ibridazione somatica. L'androgenesi è la tecnica basata sulla coltura *in vitro* di antere per l'ottenimento di piante aploidi da polline, aventi cioè un numero cromosomico gametico. Il maggiore vantaggio di questo procedimento, particolarmente seguito nelle *Graminaceae*, risiede nella possibilità di produrre rapidamente linee omozigoti a tutti i loci (diaploidi) per raddoppiamento cromosomico, aumentando così l'efficacia della selezione di linee pure e della costituzione di ibridi. In effetti l'ottenimento di diaploidi ha permesso di creare varietà di successo in diverse specie coltivate, fra le quali orzo, riso, mais e tabacco. L'ibridazione somatica è un'altra tecnica fondata sulle colture *in vitro* che ha fornito un contributo di rilievo al miglioramento genetico delle piante coltivate. Questo metodo, basato sulla fusione di protoplasti isolati da specie diverse e sulla rigenerazione di piante a partire dai prodotti di fusione ibridi, consente di scavalcare le barriere sessuali interspecifiche. Ibridi somatici sono stati ottenuti per le *Brassicaceae* e le *Solanaceae* e, sebbene utilizzabili direttamente come tali, più frequentemente rappresentano un ponte per trasferire caratteri tra specie filogeneticamente lontane. Infatti, con le tecniche attuali possono essere fusi non solo i genomi di specie dello stesso genere, ma anche di specie appartenenti a generi diversi.

La scoperta della struttura del DNA avviò intorno al 1960 una rivoluzione intellettuale prodiga di risposte a quesiti con i quali la mente umana si sta confrontando fin dall'alba della ragione. In medicina come in agricoltura comportò innumerevoli progressi, portando allo sviluppo dell'ingegneria genetica e delle biotecnologie molecolari.

L'ingegneria genetica può essere definita come un insieme di metodi e di tecniche che permettono di isolare geni e di analizzarne la struttura e la funzione.

Tra il 1965 e il 1970, alcuni ricercatori sparsi per il mondo, osservando la peculiarità posseduta da alcuni batteri di speciali sistemi di difesa contro l'invasione di virus, si misero a studiare ciò che a quel tempo sembrava semplicemente una curiosità naturale priva di qualsiasi importanza applicativa. Qualche anno dopo, nel 1971, i meccanismi molecolari alla base di questo fenomeno furono chiariti da Stanley Cohen, Annie Chang e Herbert Boyer: la degradazione del DNA virale riconosciuto come estraneo da un certo ceppo batterico era causata da un enzima prodotto da quest'ultimo, che fu chiamato "enzima di restrizione". Tali enzimi purificati dimostrarono di essere a tutti gli effetti delle forbici molecolari che eseguivano tagli in corrispondenza di sequenze nucleotidiche specifiche. Il nome fu suggerito dal fatto che per mezzo di questi enzimi alcuni batteri restringevano il numero di fagi in grado di infettarli. Parimenti venne dimostrato che questi enzimi non erano in grado di agire sul DNA batterico per la presenza di un altro enzima capace di modificare i siti di taglio aggiungendo un gruppo metile (CH_3). Dopo tale scoperta, vennero isolati in breve tempo e da diverse specie batteriche, moltissimi enzimi di restrizione aventi specificità di taglio differenti. Per lo sviluppo dell'ingegneria genetica, oltre all'individuazione degli enzimi di restrizione, ed in modo particolare delle endonucleasi, determinante fu l'identificazione anche di un'altra classe di enzimi che agisce sul DNA: le ligasi, capaci di saldare fra loro due sequenze nucleotidiche con estremità complementari. Questo settore di studio, grazie alle endonucleasi e alle ligasi, diede avvio alla costruzione *in vitro* di nuove molecole di DNA chimeriche ottenute unendo insieme sequenze isolate da organismi diversi. La "tecnologia del DNA ricombinante", così chiamata perché le molecole provenienti da fonti diverse venivano ricombinate insieme, permise di originare nuove sequenze che potevano essere poi inserite mediante opportuni vettori all'interno di cellule batteriche ospiti al fine di essere riprodotte in un numero elevato di copie. Fu inoltre possibile isolare ed analizzare la sequenza di un dato segmento genico e talora trascriverla in

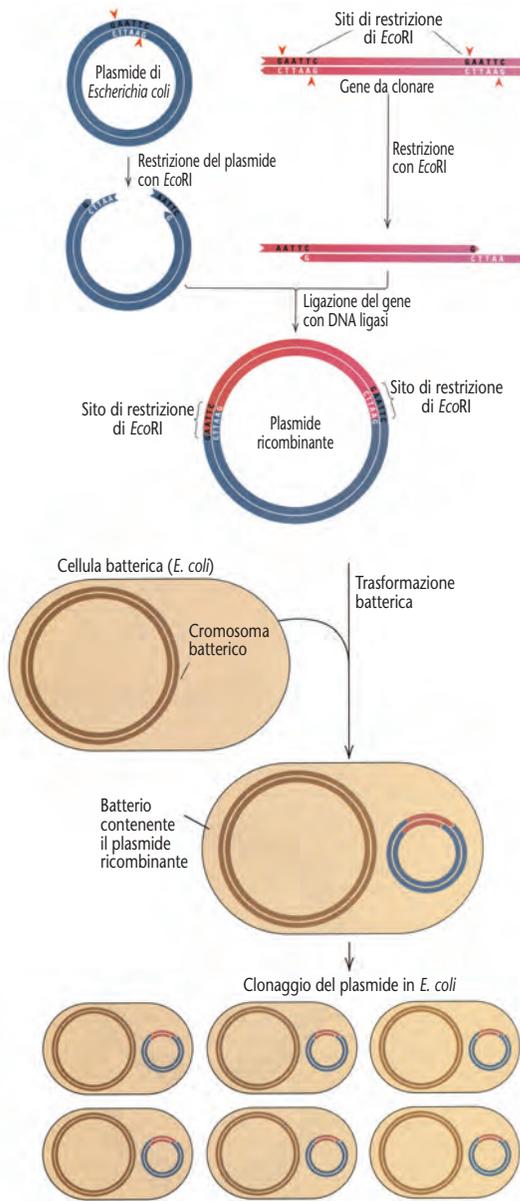


Fig. 1.61 – Rappresentazione schematica di costruzione di una molecola di DNA ricombinante e di clonaggio di un gene in *E. coli* (da: D. H. Hartl e E.W. Jones 1998, modificato).

un mRNA e tradurla nella proteina corrispondente, oppure inserirla stabilmente nel genoma degli individui di un'altra specie che diventano così transgenici.

Era il 1972 quando Paul Berg (1926-) costituì *in vitro* la prima molecola di DNA ricombinante, mentre l'anno seguente Herb Boyer e Stanley Cohen usarono per la prima volta un plasmide per clonare un gene esogeno in *E. coli*. Potendo impiegare i plasmidi come vettori di clonaggio, già nel 1973 si poteva preparare qualsiasi porzione di DNA eucariotico in quantità sufficienti per una dettagliata caratterizzazione molecolare (Fig. 1.61). Attualmente sono noti più di 3.000 enzimi di restrizione di origine batterica che vengono comunemente usati in biologia molecolare.

La messa a punto di tale tecnologia in principio venne accolta con grande scetticismo a causa del dubbio che le procedure di ricombinazione del DNA potessero dare origine ad agenti patogeni nuovi in laboratorio. Per questo motivo, nella primavera del 1974, durante la "Conferenza di Asilomar" un gruppo di ricerca di undici biologi molecolari di fama (tra gli altri P. Berg e J. Watson) chiese una moratoria temporanea sugli esperimenti riguardanti il trasferimento genico nei batteri. La consapevolezza che la tecnologia del DNA ricombinante fosse il più potente fra i nuovi strumenti a disposizione della ricerca biologica, che i ceppi virali e cellulari usati in laboratorio generalmente non fossero patogeni per l'uomo, che un qualche rischio biologico imponderabile potesse avere comunque da sempre accompagnato la ricerca genetica e che in natura il trasferimento di DNA da una specie all'altra mediato dai virus avesse già sperimentato le conseguenze ecologiche di manipolazioni simili, portò pochi anni più tardi ad una ripresa della sperimentazione.

A quel tempo Watson dichiarava la "impossibilità logica di disciplinare rischi puramente teorici", affermando: "è frequente che il DNA venga trasportato da una specie all'altra ad opera dei virus e le ripercussioni evolutive globali degli esperimenti condotti in laboratorio sono sicuramente trascurabili di fronte ai trasferimenti di DNA che avvengono per via naturale".

Dieci anni dopo Asilomar si ebbero consensi massicci che portarono ad una completa inversione. Nel 1982, negli Stati Uniti, la Food and Drug Administration approvò l'uso di insulina prodotta da batteri ricombinanti a scopi terapeutici nell'uomo. Cominciò così una

nuova era che portò all'uso di molti farmaci importanti prodotti da microrganismi ricombinanti e che porterà in un futuro prossimo all'uso di piante transgeniche come vaccini. A proposito della tecnologia del DNA ricombinante, Watson, nel 1978, scriveva: "Le nuove tecnologie di manipolazione del DNA possono rivoluzionare la nostra conoscenza dei cromosomi, permetterci di scoprire come sono fatti i geni, fornirci un sistema pratico per costruire vaccini contro virus... e produrre quantità illimitate di farmaci".

Da questo momento e per i venti anni successivi, la produzione di grossi quantitativi di specifici geni (amplificazione del DNA) sarà basata quasi esclusivamente sull'impiego di vettori di clonaggio derivanti da batteri (plasmidi) o dal batteriofago λ (lambda). Il concetto di partenza era molto semplice: quando in una cellula batterica viene introdotto DNA ricombinante in un appropriato vettore, sarà possibile moltiplicare questo DNA in un numero praticamente infinito di copie semplicemente moltiplicando la cellula batterica.

Per molti anni il clonaggio di un gene implicò il suo isolamento e l'inserzione in un piccolo elemento genetico auto-replicante quale un plasmide o un cromosoma virale. Nel 1985, **Kary B. Mullis** (1944-) e collaboratori svilupparono la reazione a catena della polimerasi (PCR, *Polymerase Chain Reaction*), una tecnica che, consentendo l'amplificazione *in vitro* di specifici frammenti di DNA, senza clonaggio, ma per via enzimatica, rivoluzionò l'analisi genetica. Attraverso questa tecnica l'amplificazione del DNA risulterà altrettanto efficace, ma molto più rapida, semplice ed economica. In seguito all'invenzione di questa tecnica, nel 1993 Mullis ricevette il premio Nobel per la chimica (**Fig. 1.62**).

Le sequenze di DNA così amplificate costituirono il materiale di partenza di molti esperimenti designati a rispondere a molti tipi di questioni biologiche. L'analisi dei geni e dei prodotti genici fu resa possibile dalla messa a punto di una serie di metodiche innovative.

Edward M. Southern nel 1975 sviluppando un sistema per trasferire su un filtro frammenti di DNA separati su gel mediante elettroforesi rese possibile l'analisi strutturale di geni e genomi. Questo procedimento fu chiamato *Southern blotting* e per l'analisi di geni venne combinato con l'ibridazione mediante sonde. Lo stesso procedimento fu subito applicato anche agli RNA (analisi *Northern*) e permise di cominciare a studiare l'attività genica e quindi la presenza di specifici trascritti in un determinato tipo di cellule o in un particolare stadio di sviluppo. A completamento di questi avanzamenti metodologici, due anni più tardi, nel 1977 Walter Gilbert, Frederick Sanger e Maxam Gilbert misero a punto due distinte procedure tecniche per il sequenziamento degli acidi nucleici.

Nel 1980, **Frederick Sanger** e **Walter Gilbert**, insieme con Paul Berg, vinsero il premio Nobel per la chimica per il contributo fornito riguardo alla determinazione della sequenza nucleotidica degli acidi nucleici. In particolare, Sanger è uno delle poche persone ad avere ricevuto due premi Nobel: il primo gli era stato conferito nel 1958 per i suoi studi sulle proteine. Attualmente il metodo di Sanger è quello più impiegato in quanto maggiormente adatto all'automazione rispetto a quello di Gilbert (**Fig. 1.63**).

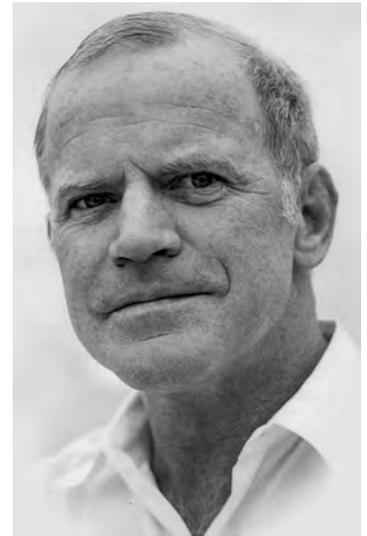


Fig. 1.62 – Kary B. Mullis, inventore della reazione a catena della polimerasi (PCR).

5' - TTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCC - 3'
 3' - AACCGCATTAGTACCAGTATCGACAAAGGACACACTTTAACAAATAGG - 5'

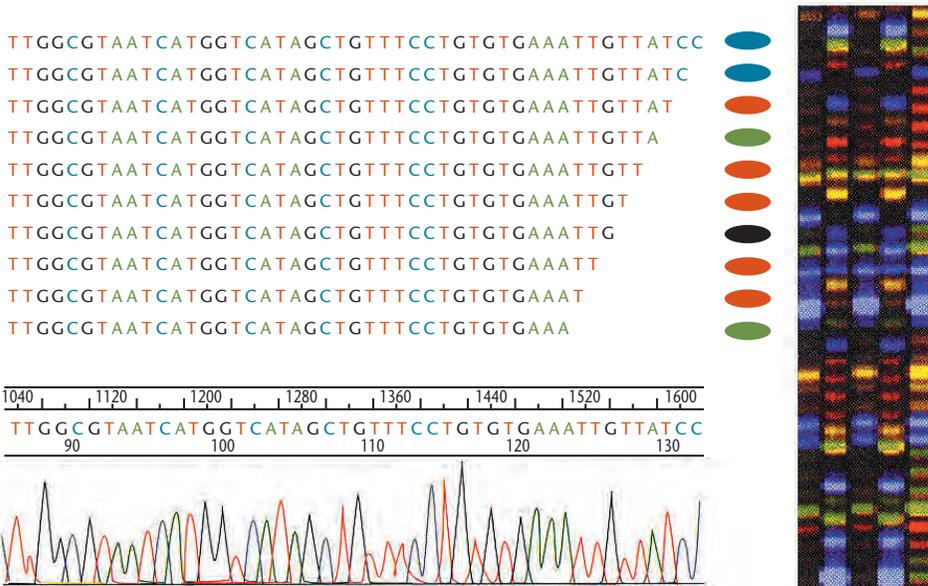


Fig. 1.63 – Diagramma di una reazione automatizzata di sequenziamento di DNA basata sulla PCR (da: L. Hood e D. Galas 2003, modificato).

L'avvento dell'analisi *Southern* (marcatori RFLP) e della reazione a catena della polimerasi (marcatori PCR-derivati) avviò un nuovo settore di indagine genetica basato sul *fingerprinting* del DNA e cioè sulla possibilità di creare una "impronta digitale biologica" di qualsiasi genoma e di rintracciare specifici geni in qualsiasi organismo. Alec Jeffries è considerato colui che nel 1984 inventò la tecnica per visualizzare fingerprint genomici ai fini della identificazione univoca di singoli individui, subito divenuta uno strumento fondamentale della genetica forense.

Lo sviluppo dei marcatori molecolari per l'analisi genetica basata sul *genotyping* del DNA individuale a uno o più loci ha portato alla nascita di un nuovo settore di ricerca rappresentato dalla selezione assistita da marcatori, più semplicemente nota come MAS (*Marker-Assisted Selection*). Il termine è stato coniato nel 1990 da parte di Russell Lande e Robin Thompson, anche se la pietra miliare in questo settore è rappresentata dal lavoro di Andrew H. Paterson e Steven D. Tanksley del 1988 riguardante la risoluzione di caratteri quantitativi in fattori Mendeliani usando marcatori molecolari in pomodoro.

I marcatori molecolari, potendo co-segregare con i geni e venendo ereditati secondo i modelli Mendeliani, analogamente ai marcatori morfologici e biochimici, permettono di mappare geni quali-quantitativi che controllano la manifestazione di caratteri agronomicamente utili in molte specie coltivate. I marcatori del DNA offrono la possibilità di attuare la selezione genetica ad uno stadio molto precoce, come quello di plantula, rendendo così la procedura di valutazione rapida, aspetto molto importante soprattutto per i caratteri che sono espressi ad uno stadio di sviluppo molto tardivo, come ad esempio quelli inerenti al fiore, al frutto o al seme. In definitiva, la selezione assistita da marcatori molecolari è affidabile, consente di risparmiare tempo e spazi, ed è anche più economica. Ogni pianta ritenuta non idonea a livello genotipico può quindi essere scartata molto precocemente, consentendo così di portare avanti un programma di miglioramento genetico soltanto con le piante risultate genotipicamente più interessanti.

Le principali applicazioni dei marcatori molecolari ai fini della selezione assistita riguardano la rimozione dei *linkage drag*, ovvero l'effetto negativo esercitato da un carattere sulla manifestazione di un altro carattere, considerato invece favorevole, quando i geni corrispondenti risultano strettamente associati, e la combinazione di più geni di resistenza in un unico genotipo, operazione nota come *pyramiding* (Fig. 1.64). La comprensione delle basi molecolari dell'ereditarietà dei caratteri quantitativi, che molto spesso coincidono con caratteri di interesse agronomico, come la resa o la risposta a stress biotici e abiotici, rappresenta comunque una delle principali sfide della genetica e della genomica attuali. La peculiarità del mappaggio di QTL, cioè dei loci per i

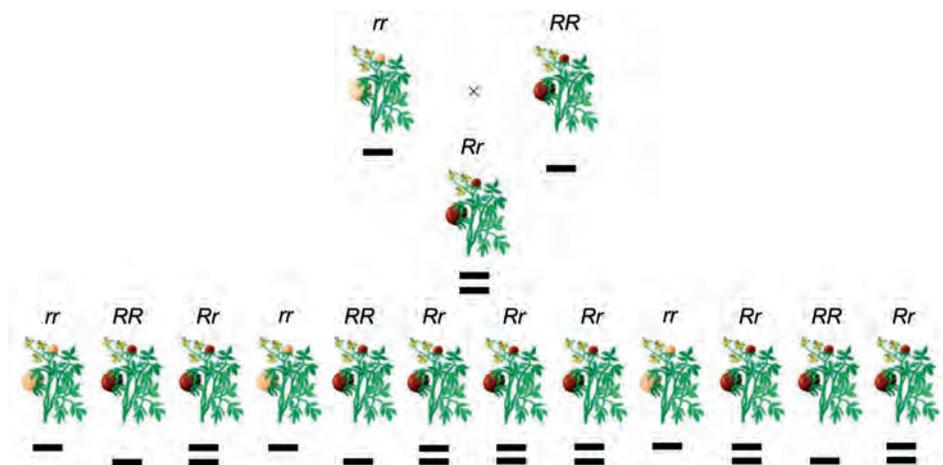


Fig. 1.64 – Esempio di MAS per la resistenza a patogeni.

caratteri quantitativi (*Quantitative Trait Loci*), così come il clonaggio dei geni alla base degli stessi, consiste nella possibilità di svelare come la selezione naturale, nel corso dell'adattamento ad una particolare situazione agronomica o ambientale, abbia privilegiato la variazione allelica ad un particolare locus rispetto ad un altro. L'acquisizione di tali informazioni sarà certamente di importanza fondamentale nel miglioramento genetico delle piante per la costituzione di varietà superiori. Rimane comunque il fatto che gli approcci genetico-molecolari, soprattutto quelli basati sulla selezione assistita da marcatori, non potranno mai dare i loro frutti senza la perizia del *breeder*.

Con l'avvento della tecnologia del DNA ricombinante e di metodiche di analisi del DNA genomico fu così possibile manipolare (cioè "ingegnerizzare") i microrganismi ed analizzarne le conseguenze genetiche. La possibilità di introdurre DNA anche in piante e animali faceva intravedere l'opportunità di applicare tale tecnologia per la produzione di organismi ricombinanti e di piante ed animali transgenici.

Poco dopo il 1980 si trovò il modo di manipolare gli organismi pluricellulari e ciò produsse un cambiamento molto importante. Fino a quel momento, infatti, si era riusciti soltanto a trasferire geni in cellule isolate provenienti da organismi diversi (principalmente batteri), ma non in organismi formati da milioni o miliardi di cellule, come piante o animali. Questa acquisizione aprì molti altri campi di applicazione nel settore agro-alimentare.

Dopo che nel 1981 vennero prodotti topi giganti mediante l'introduzione di un gene codificante per un ormone della crescita, molti gruppi di ricerca cominciarono a pensare agli animali da allevamento transgenici per migliorare le produzioni zootecniche (carne, latte, formaggio, uova, ecc.). Per le piante, i cereali in particolare, gli obiettivi pratici ed economici sembrarono subito altrettanto importanti e promettenti.

La produzione di piante transgeniche prese avvio quando i biologi molecolari scoprirono che l'*Agrobacterium tumefaciens* poteva essere impiegato per il trasferimento e l'integrazione di geni esogeni nelle cellule vegetali. Fu provato che tale batterio, che in natura infetta le cellule vegetali provocando la malattia nota come "galla del colletto", presenta un plasmide Ti (*tumor inducing*) con un segmento particolare detto T-DNA che è trasmesso dal batterio alle cellule vegetali, inducendo la formazione del tumore. Dimostrato che tale segmento plasmidico, il T-DNA batterico, era in grado di integrarsi per ricombinazione nel DNA cromosomico della cellula vegetale, si riuscì a modificare il plasmide Ti in modo da rendere efficiente questo processo senza l'inconveniente della proliferazione cellulare incontrollata dovuta ai geni per la tumorigenesi. Quasi contemporaneamente furono messi a punto altri sistemi per la produzione di piante transgeniche basati sull'assunzione diretta di DNA mediante elettroporazione (cioè mediante l'impiego di impulsi di corrente elettrica che creano nella membrana plasmatica pori transitori attraverso i quali il DNA penetra nella cellula), microiniezione (cioè per mezzo di aghi di dimensioni microscopiche) o sull'impiego di uno strumento (*particle gun*) per l'inserzione di microparticelle rivestite di DNA (trasferimento genico biolistico). I metodi di trasformazione genetica delle piante sono schematizzati in Fig. 1.65.

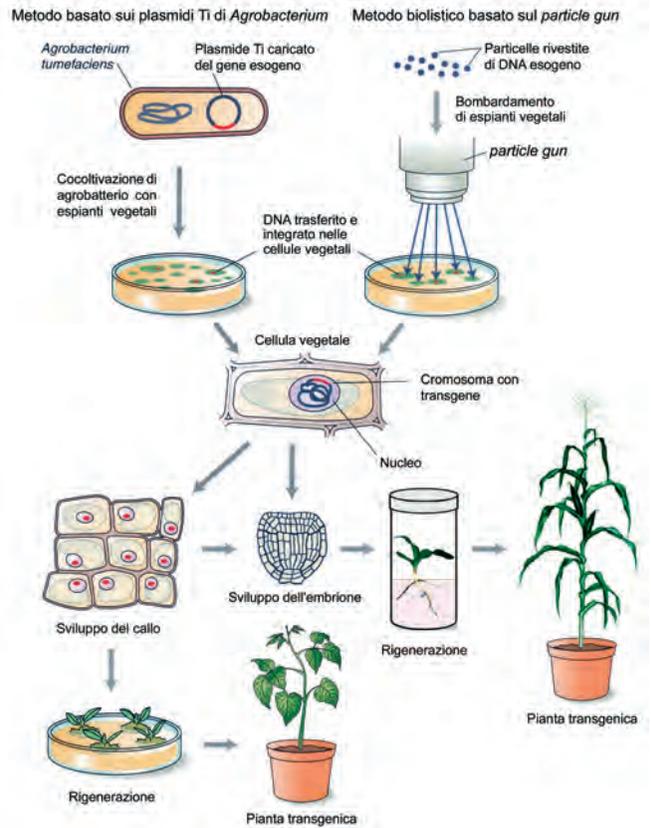
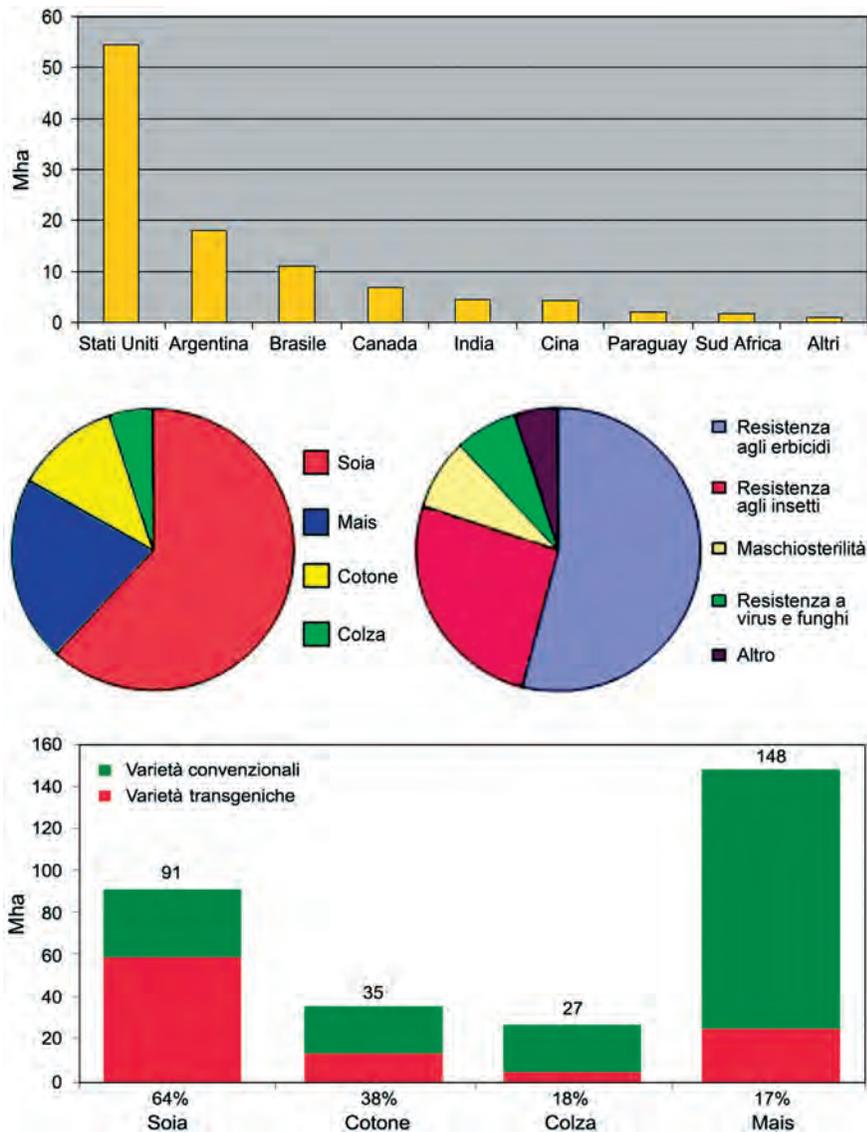


Fig. 1.65 – Metodi di trasformazione genetica delle piante.

Le prime piante transgeniche furono prodotte nel periodo 1980-82 da quattro gruppi di ricerca lavorando in progetti tra loro indipendenti: Washington University

Fig. 1.66 – Principali Piante Geneticamente Modificate (PGM), caratteri introdotti nelle varietà transgeniche e loro diffusione a livello mondiale (dati 2007). Fonte: Clive James.



(St. Louis, Missouri, USA), Rijksuniversiteit di Gent (Belgio), Monsanto Co. (St. Louis, Missouri, USA) e University of Wisconsin (Madison, USA). I primi tre gruppi annunciarono contemporaneamente (gennaio 1983), in una conferenza tenutasi a Miami, Florida, che avevano inserito con successo geni batterici in organismi vegetali; il quarto gruppo annunciò qualche mese dopo (aprile 1983), in una conferenza tenutasi a Los Angeles, California, che erano stati in grado di trasferire un gene vegetale da una specie ad un'altra.

Il gruppo dell'Università di St. Louis, guidato da Mary-Dell Chilton, produsse una pianta transgenica di una specie selvatica di tabacco, *Nicotiana plumbaginifolia*, resistente all'antibiotico kanamicina; Jeff Schell e Marc Van Montagu, dell'Università di Gent, avevano invece prodotto piante di tabacco resistenti alla kanamicina (antibiotico) e al metotrexato (agente chemioterapico antitumorale), un composto usato per trattare il cancro e l'artrite reumatoide; Robert Fraley, Stephen Rogers e Robert Horsh della Monsanto, produssero piante di pisello resistenti alla kanamicina. Il gruppo dell'Università del Wisconsin, guidato da John Kemp e Timothy Hall, aveva trasferito con successo un gene di fagiolo in una pianta di girasole. Queste ricerche furono condotte prevalentemente

su piante modello, ma la transgenesi subito dopo cominciò ad essere applicata alle specie di interesse agrario per il miglioramento di caratteri agronomici e commerciali.

La produzione di piante transgeniche è diventata ormai una pratica consolidata per molte specie vegetali di interesse agrario come il mais, la soia, il cotone, il tabacco e il pomodoro (Fig. 1.66). I caratteri che in anni recenti e in laboratori diversi sono stati trasferiti riguardano la resistenza a erbicidi, a stress abiotici e biotici (insetti, virus, batteri e funghi), le caratteristiche qualitative delle produzioni, il controllo dello sviluppo e del sistema riproduttivo della pianta, la produzione di proteine ricombinanti di interesse medicinale e farmaceutico. Al momento la maggior parte delle produzioni transgeniche è concentrata negli Stati Uniti (53%), seguiti da Argentina, Brasile, Canada, India, Cina e Sud Africa mentre in Europa non è consentito il rilascio nell'ambiente di piante geneticamente modificate a fini produttivi ma solo sperimentali. Nel 2007 le culture geneticamente modificate nel mondo sono state stimate intorno a 110 milioni di ettari! (Fig. 1.67)

Una delle domande più ricorrenti formulate dai non addetti ai lavori è la seguente: Perché vengono prodotte varietà geneticamente modificate? La risposta è semplice ma coinvolge molteplici aspetti, dal momento che in questo settore si è avuta una progressiva evoluzione in relazione all'avanzamento delle conoscenze teoriche ed all'affinamento delle esigenze applicative. Inizialmente sono state costituite varietà transgeniche per aumentare le rese unitarie, attraverso la resistenza a malattie, erbicidi e stress ambientali come siccità e salinità, anche al fine di perseguire un'agricoltura sostenibile, cioè a minore impatto ambientale (varietà GM di I generazione, come ad esempio il mais *Bt* e la soia *RoundUp Ready*). Successivamente si è rivolta l'attenzione al miglioramento della qualità globale e delle caratteristiche nutrizionali e di salubrità dei derivati alimentari, attraverso la costituzione di varietà transgeniche con più vitamine e amminoacidi essenziali, e meno acidi grassi saturi e carica allergenica (varietà GM di II generazione, come ad esempio il pomodoro *FlavrSavr* e il riso *Golden*). Più recentemente, le varietà transgeniche sono costituite per la produzione di biofarmaci, cioè con l'obiettivo di utilizzare le piante come biofabbriche di molecole e proteine ricombinanti di interesse farmaceutico, cosmetico e industriale come ad esempio vaccini, anticorpi, vitamine, ormoni e bioplastiche (varietà GM di III generazione). L'uso di piante per la produzione commerciale di prodotti terapeutici, principalmente ormoni ed enzimi di origine umana o animale, e componenti del sangue, è un settore emergente dell'industria biotecnologia noto come *plant molecular farming* che promette di avere notevole ricadute applicative in un futuro prossimo.

L'introduzione e l'adozione in coltivazione delle varietà geneticamente modificate può portare benefici sia per gli agricoltori che per l'ambiente, ma solleva tre preoccupazioni principali: i) il flusso genico dalle piante transgeniche alle piante delle varietà convenzionali coltivate in campi limitrofi attraverso l'impollinazione; ii) il flusso genico dalle piante transgeniche alle piante spontanee di specie tassonomicamente affini e sessualmente compatibili mediante ibridazione; iii) la diffusione di piante transgeniche *volunteer*, cioè piante di varietà geneticamente modificate che emergono nelle colture di varietà convenzionali ma che derivano da semi o propaguli lasciati sul terreno in precedenza.

La coesistenza tra colture biotecnologiche e convenzionali, oltre che biologiche, può determinare una contaminazione tra filiere produttive ed avere ripercussioni a livello ecologico, sanitario, legale ed economico. L'articolo 26 bis della Direttiva 2001/18/CE invita gli Stati membri ad adottare opportune misure nazionali sulla coesistenza al fine di evitare la presenza involontaria di OGM in altri prodotti, senza

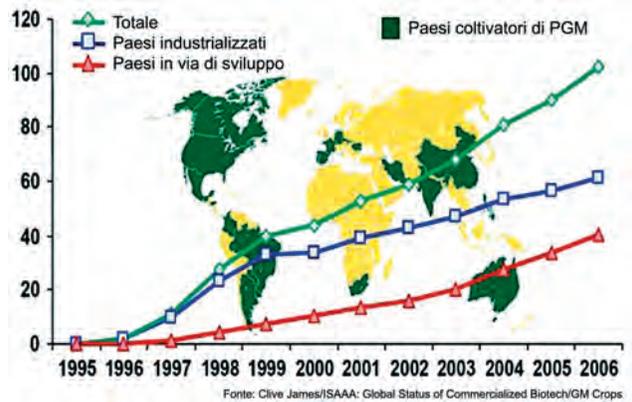


Fig. 1.67 – Andamento della superficie (espressa in Mha) coltivata con varietà transgeniche a livello mondiale.

Tab. 1.5 – Fattori che influenzano il flusso genico tra varietà transgeniche e varietà tradizionali.

Coltura	Sp. affini	Gamia	Perdite (%)	Dormienza	Longevità (a)	Rischio*	Dist. isol. (m)
Colza	Sì	Allo	1-10	Sì	3-5	A	100-1500
Barbabietola	Sì	Allo	-	Sì	5-10	M-A	50-2000
Frumento	No	Auto	1-15	Sì	1-5	M-B	0-50
Riso	Sì	Auto	5-15	Sì	-	M	0-50
Patata	Sì	Allo	-	Sì	1-10	B	15-20
Mais	No	Allo	Trasc.	No	1-2	M	200-600
Erba medica	Sì	Allo	30-40	Sì	10-20	M-A	50-200
Soia	No	Auto	4-15	No	1-2	M-B	1-50
Pomodoro	No	Auto	Trasc.	No	-	B	-

* A, alto; M, medio; B, basso.

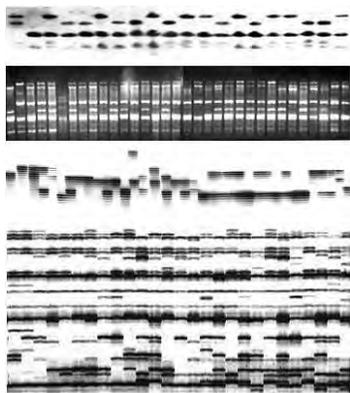


Fig. 1.68 – Esempi di *fingerprint* del DNA prodotti da marcatori RFLP e PCR-derivati.

rendere obbligatorio tale intervento. Ed è in questo contesto che in Italia le singole Regioni sono state chiamate a legiferare in materia di coesistenza. La coesistenza si ricollega soprattutto alla possibilità di scelta da parte degli agricoltori tra colture convenzionali, biologiche e geneticamente modificate. Infatti, ai sensi dell'articolo 22 della stessa Direttiva, gli Stati membri non possono vietare, limitare o impedire l'immissione in commercio di OGM autorizzati dalla CE. Si tratta dunque di mantenere diversi sistemi di produzione agraria come prerequisito per garantire la libertà di scelta dei consumatori. La coesistenza è un tema complesso perché la maggior parte delle colture non è realizzata in condizioni confinate e le filiere produttive non sono di norma separate. Di conseguenza la commistione di materiale OGM e non OGM può verificarsi in molti momenti della produzione e distribuzione.

I rischi di flusso genico tra piante geneticamente modificate e non è strettamente connesso alle loro caratteristiche biologiche, eco-fisiologiche ed agronomiche (Tab. 1.5). Tra queste di primaria considerazione sono il sistema riproduttivo della specie (autogamo o allogamo), la produzione e la dispersione del polline, le perdite di seme alla raccolta, la longevità e le capacità di dormienza dei semi, la presenza di specie selvatiche affini ed interfertili con quella coltivata (in relazione al centro di origine della specie).

L'analisi dell'organizzazione dei genomi ha da sempre affascinato e attirato l'attenzione di molti ricercatori. In tempi recenti, si è assistito ad una rapida evoluzione delle tecniche molecolari per l'analisi degli acidi nucleici e ad una crescente utilizzazione di tali tecniche per l'acquisizione di conoscenze di base e per la soluzione di problemi di rilevanza applicativa. Quel formidabile strumento di indagine genomica rappresentato dai marcatori molecolari, dai più datati RFLP a quelli PCR-derivati di più recente acquisizione (Fig. 1.68), è ormai usato in moltissimi campi della genetica vegetale: i) costruzione di mappe genetiche; ii) mappaggio genico e selezione assistita; iii) caratterizzazione e dissezione della variabilità genetica; iv) tipizzazione e identificazione varietale; v) identificazione di Organismi Geneticamente Modificati (OGM).

Negli ultimi anni, i marcatori molecolari applicati al genoma o al trascrittoma hanno permesso di acquisire una enorme quantità di informazioni sulla struttura dei genomi nonché sulla natura dei geni e dei prodotti genici. Un supporto fondamentale alla interpretazione e alla gestione dei dati molecolari acquisiti è stato fornito dalla bioinformatica. L'analisi dei geni (genoma), dei trascritti (trascrittoma) e delle proteine (proteoma) di una cellula, di un tessuto o di un organismo è adesso un obiettivo realizzabile non soltanto per la disponibilità di sistemi molecolari supertecnologici applicabili *in vitro*, ma anche per la disponibilità di banche dati, reti informatiche e software che consentono di acquisire, elaborare e confrontare *in silico* moltissime sequenze nucleotidiche ed amminoacidiche (Fig. 1.69). La messa a punto di microchip e di microarray ha semplificato e velocizzato la ricerca di polimorfismi genomici

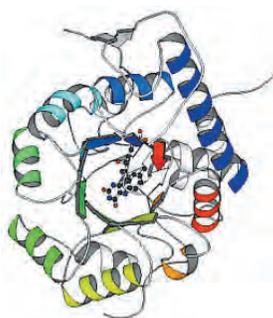


Fig. 1.69 – Predizione della struttura quaternaria di una proteina in base alla sequenza amminoacidica.

(genomica strutturale) e lo studio dell'espressione genica (genomica funzionale): migliaia di molecole di mRNA/cDNA possono essere predisposte su un supporto solido secondo una disposizione ordinata righe-colonne ad alta densità che consente di effettuare molti esperimenti di ibridazione in parallelo (Fig. 1.70).

Dalla metà degli anni '90 diventò chiaro che l'obiettivo di sequenziare interi genomi poteva rientrare nei limiti delle possibilità tecniche. A meno di cinquant'anni dalla pubblicazione del modello a doppia elica di Watson e Crick, molti organismi di eucarioti modello come *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Arabidopsis thaliana* erano già stati interamente sequenziati. Anche il genoma umano è stato sequenziato, arrivando al suo completamento più rapidamente del previsto: nel febbraio del 2001, le riviste *Nature* (n. 409, pp. 860-921) e *Science* (n. 291, pp. 1304-1351) pubblicarono la prima bozza della sequenza quasi completa del genoma umano identificata, rispettivamente, dal consorzio pubblico *The Genome International Sequencing Consortium* costituito da una ventina di laboratori e dalla compagnia privata *Celera Genomics* (Fig. 1.71). Prima di allora si riteneva che il numero di geni necessari per dirigere la crescita e lo sviluppo di un essere umano oscillasse tra 70.000 e 100.000, mentre alcuni ricercatori stimavano un numero addirittura superiore. Del resto i precedenti progetti genoma avevano dimostrato l'esistenza di circa 19.000 geni per il verme *C. elegans*, 13.000 geni per il moscerino *D. melanogaster*, 6.000 geni per il lievito *S. cerevisiae* e 26.000 geni per la pianta *A. thaliana*. E gli esseri umani non potevano che essere ritenuti molto più complessi di questi organismi, facendo pertanto supporre un numero più elevato di geni per fornire tutta l'informazione genetica! Invece i risultati dei due gruppi di sequenziamento furono strabilianti: nella stesura iniziale del genoma umano il numero di geni corrispondenti a sequenze codificanti proteine oscillava tra 25.000 e 30.000. Nel 2004, con il sequenziamento ultimato e con il miglioramento della sua accuratezza, il numero predetto di geni è sorprendentemente diminuito: il consorzio ha infatti stimato che il genoma umano contenga al massimo 25.000 geni codificanti proteine. Tuttavia, Eric Lander e Francis Collins, autori principali della pubblicazione sul genoma umano, mettono in guardia su un paio di aspetti: i) i geni espressi a livelli molto bassi potrebbero essere sfuggiti all'analisi dei trascritti e delle proteine dedotte; ii) i trascritti di molti geni potrebbero essere interessati da splicing alternativi originando così proteine differenti. Al di là dei risultati scientifici, il sequenziamento del genoma umano – per dirla con le parole del responsabile di tale progetto, **Craig Venter** – rappresenta il primo capitolo e non l'ultimo di una rivoluzione. Se è vero che una espressione breve e potente come “gene” è stata in grado di orientare la ricerca genetica del secolo scorso, è altrettanto vero che un'altra espressione breve ed affascinante come “genoma” potrà promuovere la ricerca genetica nel nuovo secolo di questo millennio.

Dopo il Progetto Genoma Umano e il sequenziamento del genoma del topo, di una pianta modello (*Arabidopsis thaliana*) e di una importante pianta coltivata, come il riso (*Oryza sativa*), molti gruppi di ricerca sono attualmente impegnati per ottenere la sequenza completa di altri genomi (Quadro 1.4). Dai geni che compongono un organismo è facile prevedere che presto verrà intrapreso il percorso che dovrà svelare le proteine che questi codificano: il futuro della ricerca genetica a livello molecolare sarà infatti verosimilmente rappresentato dallo studio dei proteomi.

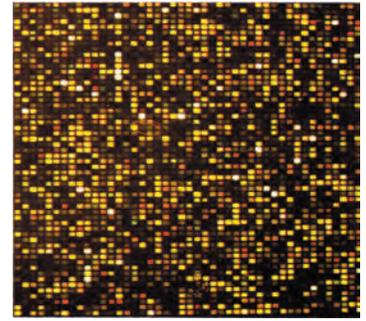


Fig. 1.70 – Esempio di microarray di acidi nucleici.

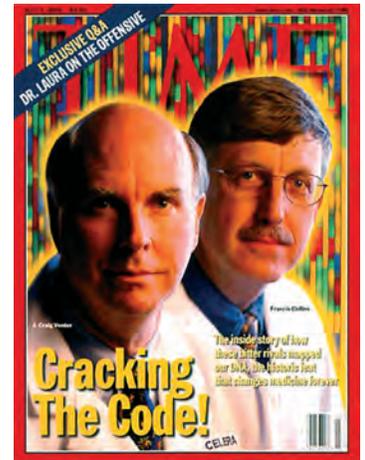


Fig. 1.71 – Copertina della rivista *Time* dedicata ai principali artefici del sequenziamento del genoma umano: Craig Venter e Francis Collins.

Quadro 1.4 – Svelato il genoma di vite

La vite a livello mondiale occupa una parte considerevole del mercato degli alimenti e delle bevande: essa rappresenta la pianta da frutto maggiormente coltivata nonché quella economicamente più rilevante. I dati FAO più recenti indicano circa 7,5

milioni di ettari di terreno coltivati a vigneto per la produzione di vini, liquori, succhi, uve da tavola e passite. Le viti coltivate sono ascrivibili al genere *Vitis* Tourn (ordine *Rhamnales*, famiglia *Vitaceae*) che a sua volta è suddiviso in due sottogeneri, *Muscadinia* ($2n=40$) ed *Euvitis* ($2n=38$), scarsamente interfertili e largamente distinguibili a livello morfologico, anatomico e



Fig. 1.72 – Cultivar “Pinot nero”: particolare del grappolo.

seconda delle varietà. Quest’ultima entità tassonomica ha le potenzialità di diventare la pianta modello per la genetica e la genomica delle piante da frutto.

Nel 2007, due iniziative separate ed autonome, che hanno coinvolto numerosi ricercatori italiani, hanno permesso di svelare il genoma della vite, attraverso il sequenziamento di due genotipi, uno altamente eterozigote ed uno altamente omozigote appartenenti alla o derivanti dalla varietà “Pinot nero” (**Fig. 1.72**).

Nel numero *on line* del 28 agosto 2007 della rivista *Nature* sono stati pubblicati i risultati della ricerca riguardante il sequenziamento del genoma della vite a cura di un consorzio di ricerca pubblico italo-francese. Da parte italiana, questa ricerca ha visto coinvolti, in particolare, Enrico Pe’, Massimo Delledonne, Michele Morgante, Mario Pezzotti e Giorgio Valle. Per la parte italiana, la ricerca è stata supportata da Enti pubblici (MiPAAF - Progetto VIGNA-CRA e la Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia) e da un consorzio

citogenetico. La specie coltivata *Vitis vinifera*, unica specie indigena dell’Eurasia le cui origini risalgono a circa 8.000 anni fa, risulta ulteriormente suddivisa in due sottospecie: *V. vinifera* subsp. *silvestris* e *V. vinifera* subsp. *sativa*. La prima comprendente forme selvatiche, dioiche, con grappoli e acini piccoli, e con basso tenore zuccherino; la seconda comprendente invece tutti i vitigni coltivati, con fiori generalmente ermafroditi e morfologia variabile a

di Ditte private e di banche (IGA). Da parte francese, il progetto è stato coordinato da Anne-Francoise Adam-Blondon e Francis Quetier. I risultati del sequenziamento sono stati resi pubblici dal consorzio di ricerca e sono rintracciabili ai siti www.vitisgenome.it; www.appliedgenomics.org; www.genoscope.cns.fr/vitis. PN40024 rappresenta il clone scelto per effettuare il sequenziamento: si tratta di un genotipo altamente omozigote derivato dalla cultivar Pinot nero attraverso nove successive generazioni di autofecondazione. La scelta del clone è stata molto dibattuta in quanto l’alto grado di omozigosi, da un lato, avrebbe impedito la comprensione della variabilità genotipica/allelica presente nei cloni di vite coltivati, altamente eterozigoti, dall’altro, avrebbe invece assicurato notevoli vantaggi tecnici nella fase di ottenimento e soprattutto assemblaggio della sequenza. La sequenza finale dell’intero genoma di vite con copertura 8X, cioè derivante dalla lettura di otto volte il numero di basi dell’intero genoma, è stata depositata nella banca dati dell’NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) all’indirizzo <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/leuks.cgi>. Le sequenze di vite sono state ancorate a 19 gruppi di associazione e sono state confrontate con le sequenze paraloghe di pioppo e *Arabidopsis* (**Fig. 1.73**). La dimensione del genoma di vite è risultata pari a 487 Mb, costituito da oltre il 40% di sequenze ripetute ed elementi trasponibili, e con un numero predetto di geni codificanti per proteine pari a circa 30.434 (mediamente ogni gene ha evidenziato 372 codoni e cinque esoni). Questo numero è considerevolmente inferiore al numero di geni precedentemente stimato per il pioppo (*Populus trichocarpa*), pari a 45.555, che ha un genoma di dimensioni simili, 485 Mb, ed inferiore perfino al numero di geni riscontrato nel riso (*Oryza sativa*), pari a 37.544, che invece ha un genoma di minori dimensioni, 389 Mb. Rilevante è il dato emerso da questo studio relativamente alla filogenesi della vite: l’analisi della sequenza del suo genoma ha evidenziato il contributo

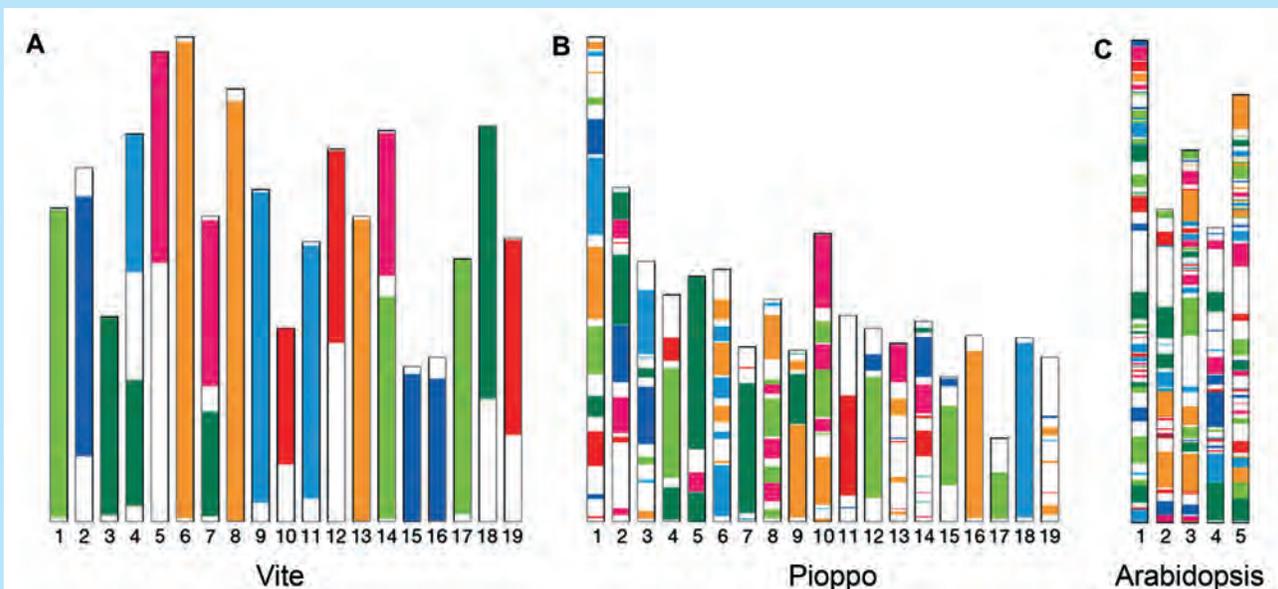


Fig. 1.73 – Rappresentazione schematica delle regioni paraloghe derivate dai tre genomi ancestrali nei cariotipi di: **A**) vite (*Vitis vinifera*); **B**) pioppo (*Populus trichocarpa*); **C**) *Arabidopsis thaliana* (ogni colore identifica una regione sintenica tra i tre genomi, mentre i sette colori in vite corrispondono verosimilmente ai gruppi di associazione del progenitore ancestrale paleo-esaploide (Fonte: Jaillon O., Aury J.M., et al. *The French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization*, 2007).

di tre genomi ancestrali, suggerendo così una antica origine esaploide - paleoesaploide - per la vite. Di grande interesse è stato, inoltre, scoprire che alcune famiglie geniche specificatamente coinvolte nell'aroma del vino, ad esempio quelle della fenilalanina ammonio-liasi, della stilbene sintasi e della terpene sintasi hanno un numero di membri di gran lunga superiore a quanto riscontrato nei genomi delle altre piante sino ad oggi sequenziati: *Arabidopsis*, riso e pioppo. Ad esempio, rispetto ai 30-40 geni appartenenti alle terpene sintasi evidenziati in queste specie, nella vite questa famiglia è risultata composta di 89 geni funzionali e 27 pseudogeni. Attualmente la sequenza del genoma è in fase di caratterizzazione bioinformatica per la predizione dei geni e l'annotazione della loro funzione.

L'altra iniziativa intrapresa da ricercatori italiani, tra i quali Riccardo Velasco, Francesco Salamini e Roberto Viola, in un progetto collaborativo con ricercatori inglesi ed americani, ha portato al sequenziamento del genoma della vite impiegando una cultivar di Pinot nero altamente eterozigote. I risultati di questa ricerca, finanziata dalla Provincia di Trento, sono stati pubblicati nel numero *on line* del 19 dicembre 2007 della rivista *PLoSOne*.

La dimensione del genoma di vite è risultata pari a 504,6 Mb. Nel complesso sono state assemblate le sequenze corrispondenti a 477 Mb e quelle equivalenti a 435 Mb sono state ancorate a 19 gruppi di associazione. Il numero predetto di geni è risultato pari a 29.585: oltre il 96% di questi sono stati assegnati ai singoli gruppi di associazione. I cromosomi omologhi hanno evidenziato differenze in misura superiore all'11% a livello della sequenza del loro DNA riconducibili soprattutto a condizioni di emizigosi, vale a dire presenza di geni in singola copia in un cromosoma per la mancanza del tratto corrispondente nel cromosoma omologo. Infine, è stata determinata anche la natura e stimata l'epoca dei geni duplicati: i dati acquisiti suggeriscono eventi di duplicazione relativamente recenti e riguardanti almeno dieci dei cromosomi del corredo di base. Le sequenze di vite sono state confrontate con quelle di *Arabidopsis*, riso e pioppo al fine di evidenziare i geni unici, specie-specifici, e quelli omologhi, comuni a due o tutti e quattro i genomi, caratterizzati in base ai termini dei vocabolari della ontologia genica: i risultati sono riportati in **Fig. 1.74**. L'assemblaggio finale della sequenza ha evidenziato molti geni candidati al controllo di caratteri importanti sia in termini agronomici, per la coltivazione della vite, che in termini qualitativi, per la produzione del vino come ad esempio quelli associati alla resistenza a patogeni e alla biosintesi di metaboliti secondari. È interessante, infine, rilevare l'individuazione di oltre due milioni di polimorfismi dovuti a singoli nucleotidi (SNP) la maggior parte dei quali posizionati nei cromosomi ed associati ai geni a questi ancorati. Tali polimorfismi, unitamente a quelli

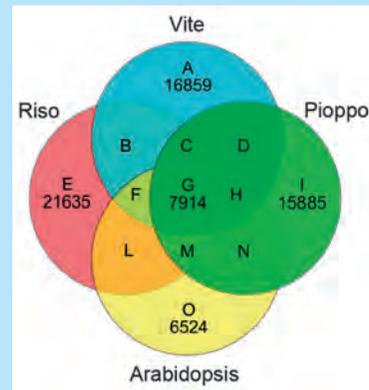


Fig. 1.74 – Diagramma di Venn che riporta graficamente i risultati emersi dal confronto tra i genomi di vite (*Vitis vinifera*), pioppo (*Populus trichocarpa*), riso (*Oryza sativa*) e *Arabidopsis thaliana*. I geni totali sono i seguenti: 29.585 in vite, 41.046 in riso, 45.555 in pioppo e 26.819 in *Arabidopsis*. I geni unici, specie-specifici, sono risultati pari a 16.859 in vite, 21.635 in riso, 15.885 in pioppo e 6.524 in *Arabidopsis*, mentre quelli omologhi, comuni a tutti e quattro i genomi sono risultati 7.914 (G), quelli comuni a due sono risultati pari a 9.106 con riso (B+F+C+G), 11.948 con pioppo (C+G+D+H) e 9.555 con *Arabidopsis* (F+G+H). (Fonte: Velasco R., Zharkikh A., Troggio M., Cartwright D.A., Cestaro A., *et al.*, 2007).

microsatelliti (SSR) rinvenuti in diverse regioni di tutti i cromosomi, potranno fornire marcatori molecolari di grande utilità per il miglioramento genetico della vite.

L'aver svelato il genoma della vite rappresenta senza dubbio una importante conquista della biologia che apre nuovi orizzonti per la ricerca di base in questa specie, fornendo al contempo grandi potenzialità applicative nel settore vitivinicolo.

Bibliografia di riferimento e approfondimento

- Jaillon O., Aury J.M., *et al.* The French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, vol. 449: pp. 463-467. doi:10.1038/nature06148.
- Velasco R., Zharkikh A., Troggio M., Cartwright D.A., Cestaro A., *et al.* (2007). A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS ONE* 2 (12): e1326. doi:10.1371/journal.pone.0001326.

Si è ormai negli stadi iniziali di una rivoluzione metodologica del miglioramento delle piante. L'uomo ha raggiunto una raffinata capacità di costituire varietà superiori di specie agrarie, dotate di caratteristiche ereditarie miglioratrici delle funzioni e delle produzioni, procedendo per millenni in via empirica e, dal XX secolo, incrociando e selezionando secondo metodi sperimentali basati su conoscenze scientifiche dei processi naturali. Durante questo percorso, i metodi di miglioramento genetico si sono sviluppati fino ad integrare tecniche di ingegneria genetica molecolare. Benché si differenzino nel metodo di lavoro, i metodi molecolari di ingegneria genetica e quelli convenzionali di miglioramento genetico hanno tuttavia gli stessi obiettivi: produrre nuove vantaggiose associazioni di fattori genetici.

1.11 Marcatori molecolari e analisi genomica negli animali

La capacità di decifrare il codice genetico degli organismi viventi, attraverso la determinazione della sequenza del DNA, è una rivoluzione in biologia. La maggior parte delle procedure e delle tecnologie impiegate qualche anno fa nel Progetto Genoma Umano e più recentemente nel Progetto Vigna sono adottate anche in altri settori, come ad esempio quelli che riguardano le scienze animali e la catena alimentare. In particolare, le potenzialità applicative della genomica in zootecnia sono enormi: le moderne tecniche di analisi del genoma, del trascrittoma e del proteoma condizioneranno gli schemi di selezione per il miglioramento genetico degli animali domestici, nonché i metodi di valutazione dei prodotti di origine animale per garantire la sicurezza alimentare.

Fra gli organismi animali più usati come sistemi modello per lo studio di geni e genomi si possono considerare nematodi (*Caenorhabditis elegans*), moscerini (*Drosophila* spp.) e topi (*Mus musculus*). Recentemente anche il pollo (*Gallus gallus*) è stato ritenuto un sistema modello: esso rappresenta la principale fonte di proteine per la maggior parte della popolazione a livello mondiale e la sua importanza economica ha determinato un aumento delle ricerche genetiche condotte in questa specie, concretizzatesi di recente con il sequenziamento del suo intero genoma. Molte delle informazioni acquisite studiando il genoma dei mammiferi (topo e uomo), unitamente a quelle acquisite sequenziando il genoma di pollo, consentiranno di analizzare e caratterizzare geni omologhi in molti animali di interesse zootecnico e veterinario, come ruminanti (bovini, ovini e caprini) e monogastrici (suini e cani).

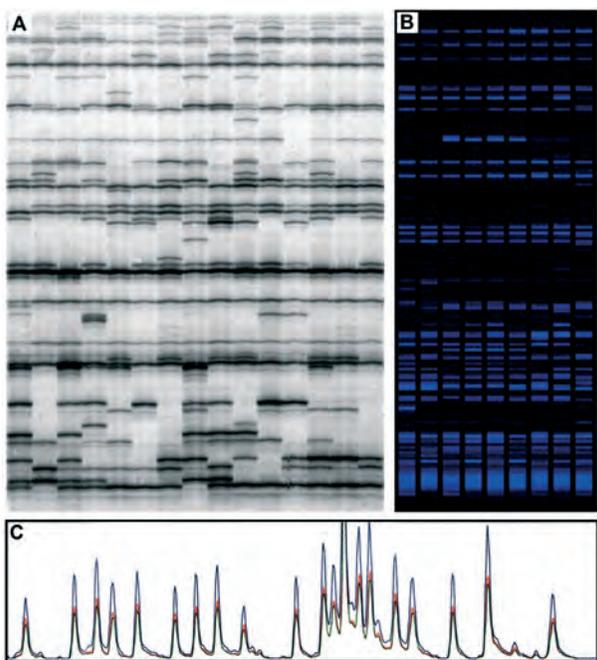


Fig. 1.75 – Marcatori AFLP: profili visualizzati attraverso elettroforesi tradizionale in gel verticali di acrilamide (PAGE) e generati mediante PCR usando primer marcati con molecole radioattive (A) oppure fluorescenti (B); ogni banda corrisponde ad un prodotto di amplificazione. Elettroferogrammi ottenuti in seguito ad elettroforesi capillare: ogni picco corrisponde ad un prodotto di amplificazione (C).

Per le specie animali di maggiore rilevanza economica, come ad esempio bovini, suini, equini ed avicoli sono inoltre disponibili mappe genetiche sature basate su marcatori molecolari. Come per le specie vegetali, i marcatori molecolari sono ormai conosciuti come strumenti particolarmente efficaci ed affidabili per l'analisi dei polimorfismi del DNA anche di specie e razze animali. Attraverso l'uso dei marcatori molecolari è infatti possibile misurare la variazione genetica presente entro singole popolazioni e le relazioni filogenetiche esistenti tra popolazioni così da agevolare l'impostazione di programmi di conservazione e di selezione assistita. In questo settore, il mappaggio di caratteri Mendeliani e QTL nonché il clonaggio di geni che sottintendono alla manifestazione di caratteri quali-quantitativi promettono di avere ricadute di estrema rilevanza pratica nel miglioramento genetico animale.

Lo sviluppo di marcatori molecolari RFLP e PCR-derivati per l'analisi del polimorfismo genomico (marcatori SSR o microsatelliti e AFLP) e genico (marcatori SNP) ha reso i sistemi diagnostici per l'identificazione genetica degli animali di semplice applicazione, sostenibili economicamente, tecnicamente affidabili e adatti all'automazione (**Fig. 1.75**). Con l'avvento delle tecniche di sequenziamento automatico del DNA e con l'aumento

delle informazioni disponibili nelle banche dati nucleotidiche è stato possibile iniziare a valutare con maggiore efficienza il polimorfismo genico dovuto a sostituzioni oppure a inserzioni o delezioni. Grazie a questo progresso è stato possibile mettere a punto i marcatori SNP che consentono di evidenziare il polimorfismo riconducibile a differenze di singoli nucleotidi (**Fig. 1.76**). La tracciabilità genetica rappresenta uno strumento potente ed affidabile per controllare e validare i sistemi di identificazione tradizionali: essa si basa direttamente sul prodotto alimentare e non sull'etichetta del prodotto alimentare, consentendo così di tracciare i tagli di carne fino al singolo animale

di origine e di verificare la corrispondenza con i dati dichiarati nella sua etichettatura. Si prospetta quindi la possibilità di un'etichettatura basata sulla tracciabilità genetica a supporto di quella convenzionale che può certamente contribuire a salvaguardare il consumatore e a tutelare il produttore e il trasformatore da possibili errori, frodi o alterazioni di varia natura.

La sensibilità dei consumatori nei confronti della sicurezza alimentare è notevolmente aumentata negli ultimi tempi, soprattutto in seguito alle nuove tendenze agrarie (impiego di OGM) e alle nuove emergenze sanitarie (come, ad esempio, la BSE). Nel settore zootecnico, in particolare, si sono verificati spiacevoli eventi quali le epidemie di influenza aviaria e di afta epizootica, che hanno destato forti preoccupazioni nell'opinione pubblica. Questi eventi hanno minato la fiducia di molti consumatori, inducendoli a ridurre il consumo o addirittura ad interrompere l'acquisto dei consueti prodotti alimentari di origine animale. A questo si aggiunge il disorientamento creato da troppi e spesso contrastanti messaggi che in tema di prodotti alimentari giungono ai consumatori dalle varie fonti di informazione. D'altronde anche gli agricoltori e gli allevatori si trovano ormai inseriti in un sistema commerciale sempre più globale dove risulta difficile, senza particolari accorgimenti o adeguamenti tecnici, valorizzare le produzioni locali, legate al territorio, o dotate di specificità e tipicità.

Negli ultimi tempi i consumatori hanno acquisito una maggiore consapevolezza riguardo alla qualità dei prodotti alimentari, richiedendo garanzie sull'autenticità dei componenti e sulla loro origine. In passato, l'autenticazione dei cibi comprendeva il rilevamento delle proteine specie-specifiche, con saggi che impiegavano una varietà di metodi immunologici ed elettroforetici, ma che nascondevano delle insidie. Essendo i prodotti il risultato di un processo che prevedeva anche trattamenti col calore, la composizione proteica complessiva poteva risultare alterata a causa di eventi di denaturazione. Inoltre, la maggior parte dei metodi commerciali era orientata verso l'uso e l'analisi di proteine del plasma, che è una frazione facilmente contaminabile e che può portare a risultati scarsamente interpretabili. Ora l'attenzione si è concentrata verso saggi basati sul DNA come fonte di informazione. In effetti, il DNA ha numerosi vantaggi rispetto alle proteine: i) è più termostabile di molte proteine; ii) è presente nella maggioranza delle cellule degli organismi; iii) può potenzialmente fornire più informazioni delle proteine. Inoltre, la tecnologia di analisi del DNA è più rapida e adatta ad essere automatizzata, semplificando così notevolmente le procedure di autenticazione (Fig. 1.77).

La valutazione del polimorfismo genetico a livello di DNA è usata non solo per identificare singoli organismi ma anche per determinare la tassonomia di gruppi di organismi. Nel corso dell'ultimo decennio, si è passati dall'analisi di DNA ribosomale e della sequenza di singoli geni ribosomali per ricostruire le relazioni evolutive tra specie ad approcci di analisi di DNA mitocondriale e di singoli geni mitocondriali per studi di sistematica molecolare. Nell'era genomica, la filogenesi molecolare ha acquisito un ruolo di grande rilievo, soprattutto per lo sviluppo di metodi statistici sempre più rigorosi per la ricostruzione delle relazioni tra genomi, in combinazione con l'accumulo di sempre più dati molecolari e sequenze di geni e proteine. Ad esempio, la comparazione del genoma nucleare e di quello mitocondriale dell'uomo con quelli del gorilla e dello scimpanzé ha portato a concludere che lo scimpanzé debba essere considerato più strettamente correlato all'uomo di quanto non lo sia il gorilla. Bisogna altresì considerare che le tre specie presentano a livello di DNA differenze inferiori al 3%, persino nelle regioni più divergenti dei loro genomi. Analoga indagine filogenetica, basata su particelle proteiche infettive chiamate prioni, è stata condotta per mettere in evidenza le relazioni tra genomi dell'uomo, dei primati e quelli di animali domestici

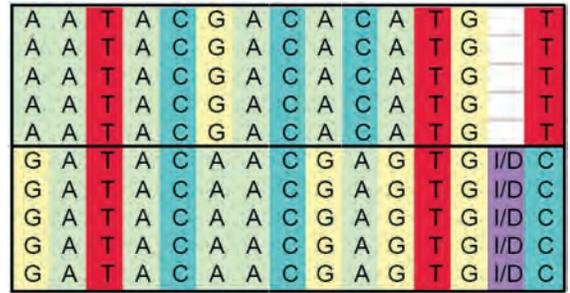


Fig. 1.76 – Allineamento multiple di sequenze nucleotidiche che evidenzia due distinti aplotipi basati su molteplici SNP derivanti da sostituzione o inserzione/delezione.

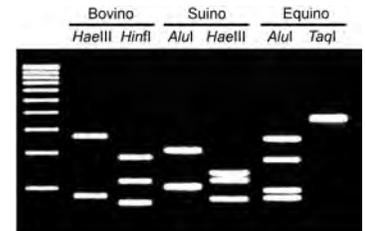


Fig. 1.77 – Marcatori PCR-RFLP utili per l'identificazione di carne bovina, suina ed equina.

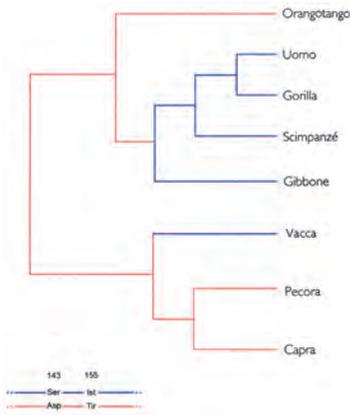


Fig. 1.78 – Dendrogramma relativo alle correlazioni evolutive tra proteine prioniche.

come bovini, caprini, suini, ecc. I geni che codificano i prioni sono stati clonati in molte specie animali e ciò ha permesso di ricostruire la filogenesi dei genomi usando le sequenze omologhe disponibili. In **Fig. 1.78** è riportato il dendrogramma relativo alle correlazioni evolutive tra proteine prioniche. Sulla base di tale indagine alcune specie sono risultate più strettamente imparentate di quanto si ritenesse. Ad esempio, il gorilla è posizionato più vicino all'uomo che non lo scimpanzé. Inoltre, è emersa una inaspettata evoluzione convergente tra le proteine prioniche dell'uomo e quelle dei bovini! Le identità di alcuni residui amminoacidici (serina in posizione 143 e istidina in posizione 155) sono state messe in relazione con la suscettibilità degli essere umani alla forma infettiva del prione bovino.

Il genoma degli animali di interesse zootecnico è costituito tipicamente da un diverso numero di paia di autosomi e da un paio di cromosomi sessuali con una dimensione che si aggira intorno ai 3 miliardi di nucleotidi nel caso dei mammiferi (2,9 Gb nell'uomo, 2,8 Gb nel ratto e 2,6 Gb nel topo) e a circa 1 miliardo di nucleotidi per le specie avicole (1,1 Gb nel pollo). La dimensione stimata per il genoma di suino e di bovino è pari a circa 3,0 Gb per entrambe le specie. La maggior parte degli eucarioti animali è caratterizzata da un genoma aploide di dimensione variabile tra 10^8 e 10^{10} pb (**Fig. 1.79**). Sulla base delle stime disponibili per il genoma umano e per quelli di topo e pollo, il DNA delle specie animali comprende circa 40-50.000 geni, le cui sequenze nel complesso rappresentano solo una piccola parte dell'intera sequenza del genoma. I cromosomi sono quindi costituiti da sequenze geniche disperse e da estese regioni intergeniche che non hanno alcuna funzione codificante ma che probabilmente svolgono una funzione regolativa, influenzando l'espressione genica.

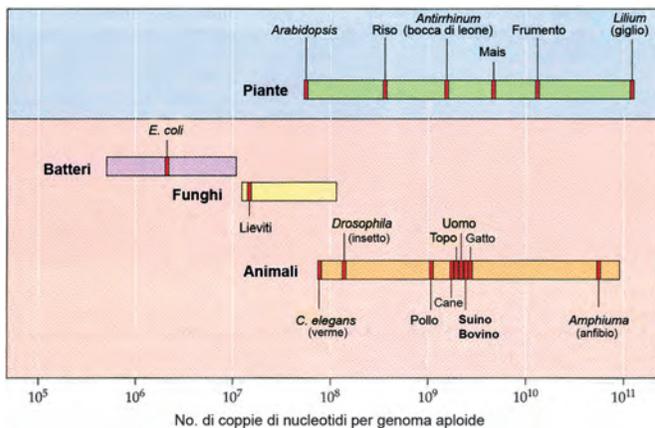


Fig. 1.79 – Dimensione dei genomi aploidi di alcuni organismi animali in relazione a quelli di piante, batteri e funghi (10^9 pb = 1 Gb).

La storia evolutiva dei genomi può anche essere ricavata attraverso una analisi comparativa basata sulla composizione (sintenia) e sull'ordine (colinearità) dei geni nei cromosomi. Studi recenti sull'architettura dei genomi condotti usando le informazioni disponibili per tutti i mammiferi con genoma sequenziato hanno permesso di stabilire che il numero di riarrangiamenti intra ed intercromosomici, dovuti soprattutto ad inversioni e traslocazioni, sono in realtà superiori a quanto precedentemente ipotizzato. Al momento si ritiene, ad esempio, che i riarrangiamenti cromosomici nei primati sia pari ad un terzo di quelli avvenuti nei roditori e che la consistenza di tali riarrangiamenti negli uccelli sia minore. La disponibilità delle sequenze di interi genomi, come quelli di uccelli (pollo) e di pesci (fugu), ha permesso di comparare e di classificare tutti i loro geni in funzione delle relazioni evolutive con quelli omologhi rinvenuti nei genomi di mammiferi (uomo e topo). Ad esempio, il 43% dei geni dell'uomo, del topo e del pollo sono risultati presenti come ortologhi nel rapporto di 1:1:1 nelle tre specie. Inoltre, sono stati osservati molti paraloghi nel genoma di ciascuna delle tre specie, risultanti da eventi di duplicazione, che hanno portato alla formazione di famiglie multigeniche sia nell'uomo e nel topo che nel pollo. Membri ortologhi sono stati riscontrati anche in due dei tre genomi analizzati: tra fugu e pollo tali situazioni sono risultate rare come atteso, suggerendo una perdita di geni durante la linea evolutiva del genoma umano. Sorprendente è il dato che indica una proporzione pari a circa il 60% di geni di pollo codificanti per proteine aventi singoli ortologhi nell'uomo (**Fig. 1.80**). I geni ortologhi osservati nel rapporto di 1:1 tra il genoma dell'uomo e quello del pollo hanno evidenziato un valore medio di identità a livello di sequenze amminoacidiche inferiore a quello calcolato per i geni ortologhi rinvenuti sempre nel rapporto di 1:1 tra il genoma dell'uomo e quello del topo (75% contro 88%). Infine, è

come bovini, caprini, suini, ecc. I geni che codificano i prioni sono stati clonati in molte specie animali e ciò ha permesso di ricostruire la filogenesi dei genomi usando le sequenze omologhe disponibili. In **Fig. 1.78** è riportato il dendrogramma relativo alle correlazioni evolutive tra proteine prioniche. Sulla base di tale indagine alcune specie sono risultate più strettamente imparentate di quanto si ritenesse. Ad esempio, il gorilla è posizionato più vicino all'uomo che non lo scimpanzé. Inoltre, è emersa una inaspettata evoluzione convergente tra le proteine prioniche dell'uomo e quelle dei bovini! Le identità di alcuni residui amminoacidici (serina in posizione 143 e istidina in posizione 155) sono state messe in relazione con la suscettibilità degli essere umani alla forma infettiva del prione bovino.

interessante rilevare che le sequenze nucleotidiche dei geni ortologhi responsabili di funzioni citoplasmatiche e nucleari sono risultate più conservate di quelle di geni implicati nella riproduzione, nella difesa contro patogeni e nell'adattamento ambientale.

Nell'era genomica la bioinformatica ha dato e sta fornendo un contributo fondamentale non solo per la determinazione e la ricostruzione della sequenza di interi genomi, ma anche per l'identificazione e l'annotazione dei loro geni. Il sequenziamento del genoma di pollo ha promosso dettagliate indagini comparative con il genoma umano e di topo, al fine di ricavare informazioni di carattere evolutivo estendibili ad un confronto più ampio nell'ambito dei vertebrati tra la classe degli uccelli e quella dei mammiferi. Tali indagini hanno messo in evidenza meccanismi di espansione e conversione dei geni, sviluppo di famiglie multigeniche così come guadagni e perdite di molti geni nei due lignaggi. I dati molecolari sinora acquisiti portano a concludere che il genoma avicolo, benché mostri proporzioni consistenti di blocchi sintenici con i mammiferi (uomo, ratto e topo) e di geni ortologhi altamente conservati nei mammiferi, sia caratterizzato da una sotto-rappresentazione di molti geni verosimilmente presenti nell'ancestrale comune di mammiferi e uccelli. I modelli di innovazione genica durante l'evoluzione genomica dei vertebrati sono stati ricostruiti in base alle perdite e ai guadagni dei geni in gruppi ortologhi tra genomi di alcuni organismi metazoici: tutte le specie considerate tra i mammiferi (uomo, ratto e topo), i pesci (*Fugu*), gli insetti (*Drosophila* e *Anopheles*) e i vermi (*C. elegans* e *C. briggsae*) hanno mostrato un bilancio genico positivo, con la sola eccezione dell'unica specie considerata tra gli uccelli. Tra i vertebrati con genoma interamente sequenziato il pollo è infatti l'unico organismo ad aver perduto molti più geni di quanti ne abbia guadagnati.

Parallelamente alle attività di sequenziamento del genoma delle principali specie di interesse zootecnico, sull'esempio di quanto è stato fatto per l'uomo e per il topo, si stanno identificando e caratterizzando collezioni di sequenze espresse (EST, *expressed sequence tags*) in molti animali. Tali sequenze, che rappresentano porzioni di trascritti genici, generalmente sono di piccole dimensioni e riconducibili a tessuti specifici. Di particolare interesse è la caratterizzazione del trascrittoma dei tessuti che direttamente influenzano le produzioni zootecniche. Per esempio, le caratteristiche costituzionali del tessuto muscolare dei suini e dei bovini rivestono una notevole importanza per la produzione di carne. In questo settore, al momento sono in atto programmi di ricerca volti a clonare e caratterizzare EST di geni aventi espressione tessuto-specifica.

Con l'avvento dell'era genomica è adesso possibile disporre di strumenti di indagine che consentono di chiarire le basi genetico-molecolari della variazione fenotipica negli animali domestici. La ricerca genomica negli animali di interesse zootecnico differisce in molti aspetti da quella condotta negli esseri umani o negli organismi sperimentali (cavie di laboratorio). Malgrado l'interesse generalizzato verso l'eredità dei caratteri, l'identificazione di geni qualitativi responsabili di specifiche malattie negli animali da reddito non è molto importante poiché gli individui che manifestano disfunzioni fisiche o disordini metabolici tendono ad essere eliminati dai programmi di selezione, come del resto i loro genitori. La maggior parte dei caratteri di interesse commerciale in zootecnia, come ad esempio la velocità di crescita di un animale, la qualità della carne e del latte, sono comunque caratteri quantitativi. I caratteri quantitativi mostrano una variabilità fenotipica continua ed hanno una eredità poligenica dal momento che sono controllati da una pluralità di geni e risentono anche dell'influenza esercitata dai fattori ambientali. Le posizioni occupate da questi geni sui cromosomi sono chiamate loci per i caratteri quantitativi (QTL): ognuno di questi loci è principalmente associato alla produttività e alle caratteristiche di qualità. Il mappaggio ed

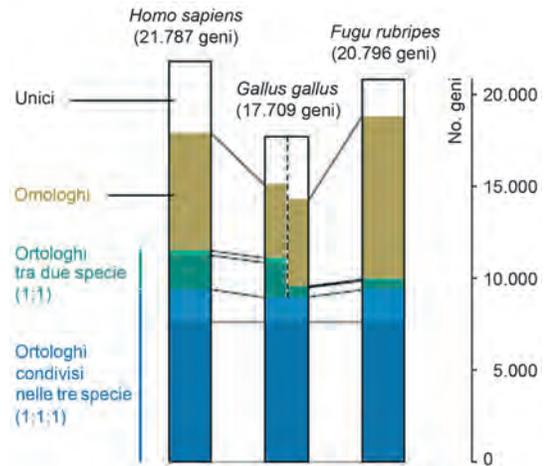


Fig. 1.80 – Statistiche relative alla comparazione tra i genomi di uomo, topo e pollo in termini di composizione di geni ortologhi.

il clonaggio di geni coinvolti nella manifestazione dei caratteri quantitativi promette di avere ricadute di estremo interesse pratico in zootecnia.

L'analisi del DNA mediante marcatori molecolari consente il mappaggio ed il clonaggio di geni coinvolti nell'espressione di caratteri funzionali e quantitativi seguendo due possibili approcci: i) la scansione del genoma (*genome scanning*); ii) la selezione di geni candidati (*candidate genes*).

Con il *genome scanning* si indaga tutto il genoma dell'animale, tipizzando un certo numero di marcatori informativi, in genere SSR. L'efficacia di questo metodo dipende dal numero di marcatori mappati e quindi dalla copertura del genoma, ma anche dal tipo di popolazione sperimentale e dal numero di animali analizzati. Usando un approccio

Tab. 1.6 – Principali geni candidati al controllo della qualità della carne nei bovini (A cura di: M. Soattin).

Gene candidato	Crom.	Funzione putativa	No. accessione
CAPN1 (Proteasi calcio-dipendente)	29	Proteasi cisteinica (μ -calpaina) che degrada le proteine miofibrillari nel periodo post-mortem. Agisce sul processo di intenerimento della carne.	AF248054 AF252504
DGAT1 (Diglicerolo aciltransferasi)	14	Enzima chiave nella biosintesi dei trigliceridi. Deposizione di grasso intramuscolare e accumulo di grasso nel latte.	AJ318490
TG (Tiroglobulina)	14	Interviene nel metabolismo dei lipidi. Deposizione di grasso intramuscolare e accumulo di grasso nel latte.	M35823
LEP (Leptina)	4	Ormone secreto dal tessuto adiposo. Regola l'appetito, la ripartizione dell'energia e il rapporto tra massa grassa e magra del corpo.	AB070368
UCP2 (Proteina non-legante)	15	Limita il numero di radicali liberi nelle cellule inibendo gli stress ossidativi.	BC011737
MT2A (Metallothioneina)	18	Lega metalli come rame e cadmio limitandone la tossicità. Inibisce lo stress ossidativo e le infiammazioni.	M76977
CPE (Carbossipeptidasi)	–	Coinvolta nella sintesi degli ormoni.	AY147818
MC1R e MC4R (Recettori melanocortinici)	18/24	Influenzano l'azione della leptina.	NM174108 NM005913
IGFBP3 (Fattore di crescita insulinico proteina-legante)	4	Trasportatore e modulatore principale dei fattori di crescita insulinici.	NM174556
CRH (Ormone corticotropina-rilasciante)	14	Causa il rilascio di glucocorticoidi con conseguente inibizione dell'appetito.	AF340152
POMC (Pro-opio melanocortina)	11	Interviene nella regolazione dell'appetito.	AN174151
GH (Ormone della crescita)	19	Controlla la crescita e il metabolismo.	AY912488
GHR (Recettore dell'ormone della crescita)	20	Interagisce con l'ormone della crescita.	AF140284
POU1F1 (Fattore di trascrizione)	1	Fattore di trascrizione che determina l'espressione di GH.	NM174579
FABP3 (Proteine acidi grassi-legati)	10	Trasporto e riserva di acidi grassi (nel cuore).	NG001365
CAST (Calpastatina)	7	Inibitore della calpaina.	L14450
LOX (Lisilossidasi)	7	Enzima coinvolto nella formazione dei legami tra le fibre di collagene.	NM173932
SCD (Stearoil-CoA denaturasi)	26	Converte gli acidi grassi saturi in monoinsaturi.	AB075020
AMPK (PRKAG3) (Proteina chinasi AMP-attivata)	2	Influenza il metabolismo del glicogeno.	DQ082732-6
Miostatina e GDF8 (Fattore della crescita e della differenziazione)	2	Controllo negativo sullo sviluppo muscolare.	AF019761

statistico di mappatura ad intervalli si possono identificare le regioni cromosomiche, ciascuna delimitata da due marcatori molecolari, dove risiedono i QTL principali e quelli secondari aventi insieme un effetto rilevante sulla variabilità di un carattere quantitativo. L'approccio del gene candidato si basa, invece, sull'ipotesi che alcuni geni possano influenzare direttamente o indirettamente l'espressione di un carattere produttivo in base alla disponibilità di informazioni sulla loro funzione fisiologica e biochimica. La selezione di geni candidati e la loro validazione in popolazioni sperimentali appropriate può portare velocemente all'identificazione dei QTL principali in quanto è possibile valutare direttamente l'associazione tra polimorfismi di questi geni e la manifestazione dei caratteri produttivi, senza analizzare il genoma nel suo complesso. I polimorfismi a carico dei *candidate genes* a singoli loci sono saggiati ricorrendo a marcatori SNP. L'efficacia di questo metodo dipende sostanzialmente dal tipo di carattere valutato e dal numero di animali analizzati. Molteplici sono i casi di studio di geni candidati per caratteri legati alla produzione della carne nei suini e alla qualità del latte nei bovini. In **Tab. 1.6** sono elencati i principali geni candidati al controllo della qualità della carne.

L'approccio di scansione del genoma e quello basato sulla selezione di geni candidati dovrebbero essere usati in modo complementare. L'informazione riguardante la posizione del gene candidato nella mappa genetica della specie oggetto di studio rispetto alla posizione del QTL può risultare determinante per discriminare i migliori candidati tra tutti i possibili geni. Benché il numero di geni candidati potenzialmente coinvolti o responsabili di caratteri produttivi di interesse zootecnico possa essere anche molto alto, combinando le informazioni acquisite attraverso il mappaggio dei QTL nei bovini e nei suini, con le informazioni relative al mappaggio dei geni candidati nelle regioni cromosomiche che contengono i QTL, è possibile validare solo alcuni dei geni candidati e ridurre così drasticamente il loro numero. In definitiva, ciò consente di concentrare l'attenzione unicamente in quelle regioni del genoma dove sono stati mappati sia QTL che geni candidati. A titolo di esempio, la variazione allelica del gene *CAPN1* (*micromolar calcium-activated protease neutral*) è stata recentemente messa in stretta relazione con la tenerezza della carne nei bovini. Questo gene codifica una proteasi Ca-dipendente e muscolo-specifica, nota come μ -calpaina, ritenuta l'enzima chiave del processo di "maturazione post-mortem" poiché capace di degradare le proteine miofibrillari durante il periodo cosiddetto di frollatura. Più in particolare, il grado di tenerezza della carne sembrerebbe dipendere dalla regolazione dell'attività della μ -calpaina. Grazie ad un'analisi genomica comparativa con il cromosoma 11 umano, il gene *CAPN1* è stato mappato nella regione telomerica del cromosoma 29 bovino: è interessante rilevare che un QTL associato al grado di tenerezza della carne è risultato localizzato nella stessa regione cromosomica, avvalorando così la tesi che esso possa realmente essere un gene coinvolto nel controllo di questo carattere. Al momento sono disponibili informazioni relative alla organizzazione del gene *CAPN1* in *Bos taurus* L. ed alla localizzazione di polimorfismi dovuti a singoli nucleotidi (noti anche come QTN, *Quantitative Trait Nucleotide*) potenzialmente correlati con la variazione quantitativa del carattere (**Fig. 1.81**). Analogamente, numerosi QTL per la produzione e la composizione del latte sono stati identificati in alcuni degli autosomi del genoma bovino. In particolare, le analisi statistiche condotte sui caratteri quantitativi, basate sulla stima dell'effetto delle sostituzioni alleliche ai singoli loci, hanno permesso di ricavare una mappa consenso delle regioni cromosomiche più significative. Tali analisi hanno messo in evidenza due regioni cromosomiche, particolarmente influenti sulla produttività in latte, nel cromosoma 6 intorno a 49 cM e a 87 cM in grado di spiegare, rispettivamente, il 4,2% e il 3,6% della varianza fenotipica totale per questo carattere (**Fig. 1.82**). Inoltre, la prima di queste due regioni cromosomiche, è risultata coinvolta anche nel controllo di altre caratteristiche del latte, come la quantità totale e la percen-

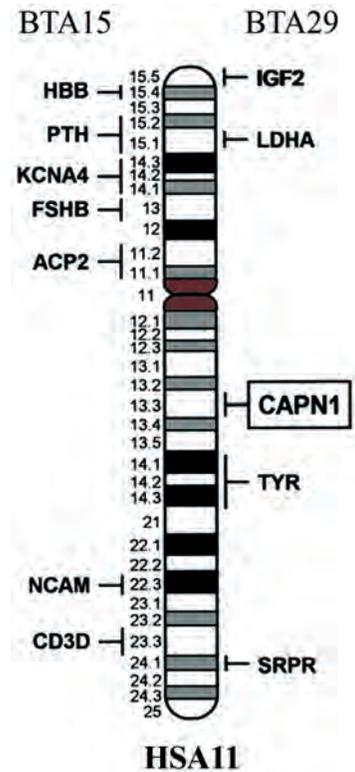


Fig. 1.81 – Mappaggio del QTL per la qualità della carne e del corrispondente gene candidato CAPN1 nel cromosoma 29 bovino (BTA29).

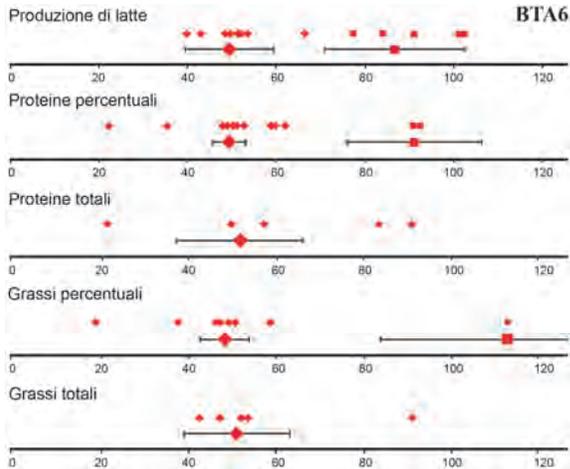


Fig. 1.82 – QTL principali per la qualità del latte mappati sul cromosoma 6 bovino (BTA6).

posizione nella mappa dei loci per i caratteri quali-quantitativi e la variazione allelica ai loci marcatori associati sono due informazioni indispensabili per costituire razze superiori in termini produttivi ed identificabili a livello molecolare. Da ciò la selezione può trarre un enorme vantaggio, sia in termini di tempo che di costi, integrando gli attuali metodi matematico-statistici di valutazione genetica dei riproduttori con le informazioni relative ai geni candidati o ai marcatori associati ai caratteri Mendeliani o

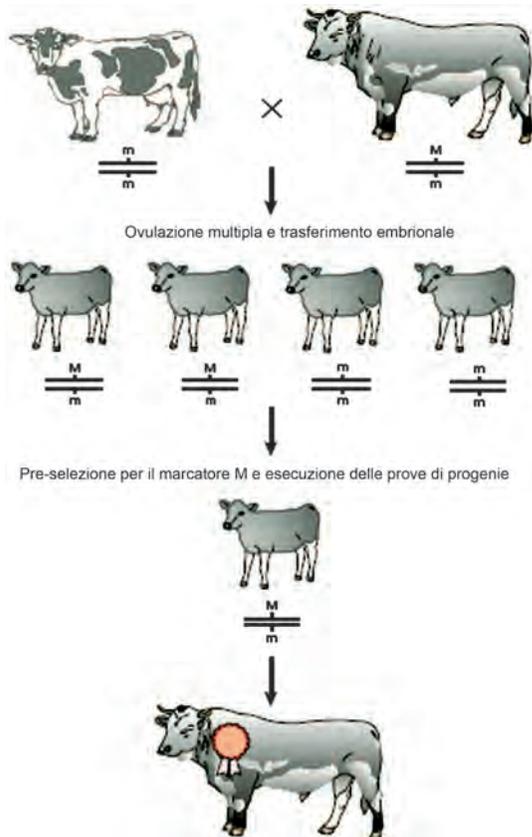


Fig. 1.83 – Esempio di pre-selezione assistita da marcatori molecolari.

tuale di grassi e proteine, mentre la seconda è localizzata attorno al complesso delle caseine.

L'attuale disponibilità di marcatori molecolari, facilmente rilevabili tecnicamente e numericamente abbondanti nei genomi animali consente di accelerare i tempi richiesti per la caratterizzazione e la selezione genetica, e di aumentare le possibilità di successo dei programmi di miglioramento genetico, ricorrendo alla cosiddetta selezione assistita da marcatori (MAS, *Marker-Assisted Selection*). Quest'ultima consiste nell'impiego di mezzi biotecnologici per seguire la trasmissione di geni favorevoli ed eliminare quelli indesiderati. La disponibilità di marcatori molecolari associati a caratteri zootecnicamente utili può teoricamente apportare cambiamenti di rilievo sui metodi seguiti per selezionare e salvaguardare razze superiori che combinano il maggior numero di alleli favorevoli ai loci che controllano i caratteri oggetto di miglioramento genetico. La

La selezione assistita da marcatori molecolari può influire favorevolmente su tutti i fattori che determinano il progresso genetico: l'accuratezza della selezione, l'intensità della selezione e l'intervallo di generazione. Inoltre, tale approccio può aumentare l'efficacia della selezione attuata esclusivamente sulla base delle prestazioni produttive, soprattutto per quelle caratteristiche che si esprimono in un solo sesso, come ad esempio la produzione del latte e il numero di nati per parto, oppure per tutte quelle difficilmente misurabili sugli animali vivi, come le caratteristiche della carcassa e della carne.

L'evoluzione dei metodi di valutazione genetica nel campo animale, e non solo, sarà sempre più influenzata dallo sviluppo e dalla ricerca di nuove tecniche statistiche o dal recupero ed adattamento di tecniche biometriche già conosciute in altri ambiti scientifici, associate a nuove conoscenze di bioinformatica e genomica, e ad informazioni sempre più approfondite riguardanti i meccanismi molecolari legati al controllo dell'espressione genica (trascrittomica e proteomica).

Gli strumenti biotecnologici disponibili per l'analisi del DNA genomico potranno rendere più agevoli ed efficaci gli interventi atti a selezionare gli animali con i geni deputati al controllo delle caratteristiche desiderate. Quando i geni utili ai fini di migliorare la produzione di carne e di latte, sia come quantità che qualità, ma altresì la resistenza a malattie ed a condizioni ambientali sfavorevoli, saranno direttamente individuabili nel genoma si potranno selezionare gli animali in base agli esiti delle analisi del DNA, senza l'interferenza di fattori esterni (**Fig. 1.83**). È altrettanto chiara l'utilità che può derivare da strumenti biotecnologici in grado di agevolare l'accertamento dello stato di salute di un animale (diagnosi), ma anche di fornire informazioni sulle misure

preventive da adottare per impedire l'insorgenza di una malattia (profilassi) o eventualmente per ricercare i rimedi e i farmaci più adatti a curare una malattia (terapia).

In conclusione, l'adozione dei marcatori molecolari in zootecnia ha già permesso molte utili applicazioni nel miglioramento genetico degli animali di interesse zootec-

nico: i) clonare e caratterizzare geni che controllano caratteri produttivi; ii) mappare loci che controllano caratteri quantitativi; iii) diagnosticare malattie ereditarie; iv) selezionare genotipi con varianti alleliche o combinazioni geniche favorevoli; v) identificare animali e prodotti di origine animale; vi) determinare le relazioni di parentela tra individui.

Nel breve e medio termine non è pensabile una sostituzione totale dei metodi tradizionali di selezione con quelli moderni basati sulle conoscenze del genoma, ma è verosimile una loro sempre maggiore integrazione. Le potenziali applicazioni dei marcatori molecolari lasciano intravedere un uso sempre più consistente di questi strumenti diagnostici sia per il miglioramento che per la salvaguardia delle produzioni zootecniche.

Bisogna infine considerare che il sequenziamento dei genomi e lo studio dei geni animali sono una moderna estensione dell'uso di vecchia data di specie modello per comprendere gli aspetti di medicina e biologia umana. È da questa considerazione che nasce l'esigenza di sviluppare metodologie di ingegneria genetica e biotecnologie genetiche specifiche per gli organismi animali. Le principali motivazioni che hanno portato alla clonazione di animali ed alla produzione di animali transgenici sono connesse non solo all'ottenimento di razze più resistenti e produttive, ma anche all'ottenimento di cavie di laboratorio idonee per studiare patologie dell'uomo, di emoglobina ed organi umanizzati di suini per realizzare trasfusioni e xenotraspianti, e di farmaci. Si pensi, a titolo di esempio, alla opportunità di utilizzare topi transgenici in cui sono stati modificati dei geni che provocano l'insorgenza del cancro al fine di studiare questa patologia oppure alla possibilità di clonare pecore o vacche transgeniche che producono e secernono nel proprio latte molecole di interesse farmaceutico come vaccini.

1.12 Biotecnologie genetiche in medicina veterinaria: clonazione e produzione di animali transgenici

Le biotecnologie possono essere considerate come l'applicazione della conoscenza biologica a qualsiasi livello e rivestono notevole importanza nei programmi di selezione genetica di varie specie animali. Alcune tecnologie, come quelle di ovulazione multipla e trasferimento embrionale, ed altre tecnologie connesse quali la suddivisione e il sessaggio degli embrioni, la clonazione, l'individuazione di marcatori genetici mediante analisi del DNA, l'isolamento ed il trasferimento di geni per la produzione di animali transgenici, la manipolazione ed il congelamento di gameti ed embrioni possono favorire il miglioramento genetico degli animali di interesse zootecnico.

L'ingegneria genetica e le biotecnologie sono state applicate agli animali soprattutto allo scopo di trasferire artificialmente geni eterologhi nelle cellule uovo fecondate o nelle cellule embrionali per ottenere così individui transgenici. Pertanto transgenesi indica il processo che porta all'ottenimento di un organismo nel cui genoma è stato inserito un gene esogeno che non avrebbe mai potuto acquisire per via sessuale.

Negli anni settanta del secolo scorso R.L. Brinster produsse il primo topo di laboratorio modificato geneticamente, combinando insieme due embrioni di ceppi diversi e riuscendo ad ottenere un singolo embrione che sviluppandosi in un adulto chimerico esibiva le caratteristiche di entrambi i ceppi. Una chimera è pertanto un organismo formato da cellule derivate da due differenti individui. Il primo organismo chimerico interspecifico venne prodotto qualche anno più tardi tra pecora e capra, portando ad ottenere un individuo detto *geep* (*goat-sheep*) che esprimeva a livello del mantello chiazze caratteristiche dell'una o dell'altra specie (**Fig. 1.84**). Un organismo di questo tipo riunisce insieme il patrimonio genetico delle due specie di origine. Sostanzialmente



Fig. 1.84 – *Geep*, chimera interspecifica ottenuta combinando embrioni di capra (*goat*) e pecora (*sheep*). Foto: G.B. Anderson.

diverso è, invece, il concetto di organismo transgenico: in questo caso il patrimonio genetico di una specie viene arricchito di uno o pochi geni provenienti dalla stessa specie oppure da una specie diversa, anche molto distante in termini evolutivi.

La definizione di animale transgenico si è evoluta seguendo il cambiamento delle tecniche di trasferimento genico. In linea generale, il termine fa riferimento ad un animale in cui è stata indotta una specifica modificazione del suo genoma. Nel 1997 John A. Beardmore con “transgenici” ha definito le cellule o gli organismi contenenti sequenze di DNA esogeno nel loro patrimonio genetico, inserite utilizzando tecniche di ingegneria genetica ivi incluse quelle di trasferimento e di silenziamento di geni.

Un qualsiasi gene clonato in un vettore adatto può integrarsi in uno o più dei cromosomi e aggiungersi (addizione genica) o sostituirsi (sostituzione genica) ad un gene esistente così da trasmettersi stabilmente di generazione in generazione. Quando il gene clonato è acquisito in un sito casuale di un cromosoma si parla di ricombinazione eterologa ed il processo implica una addizione genica. È questo il caso degli animali transgenici per geni esogeni isolati da una specie diversa da quella trasformata in grado pertanto di esprimere una nuova caratteristica (*gain of function*). Quando, invece, il gene clonato è integrato in un sito specifico di un cromosoma al posto del gene normale si parla di ricombinazione omologa ed il processo comporta una sostituzione genica. In questo caso gli animali sono transgenici per geni mutanti provenienti dalla stessa specie e risultano quindi incapaci di esprimere una caratteristica tipica (*loss of function*). I guadagni di funzione sono perseguiti soprattutto negli animali da allevamento al fine di migliorare le produzioni zootecniche, mentre le perdite di funzione sono utili negli animali da laboratorio per studiare particolari patologie mediche. Negli eucarioti più complessi, con genomi molto grandi, il trasferimento di geni clonati nelle cellule tende a produrre una addizione genica anziché una sostituzione genica.

Riguardo alle tecniche di trasformazione, la microiniezione di DNA esogeno nel nucleo di cellule uovo fecondate di topo fu il primo successo nei mammiferi, ottenuto nel 1980 ad opera di J.W. Gurdon e F.H. Ruddle. Due anni più tardi vennero prodotti topi giganti attraverso il trasferimento del gene di ratto codificante l'ormone della crescita combinato con il promotore del gene di topo per la metallothioneina (**Fig. 1.85**). Da allora la tecnica è stata applicata con successo in altri animali, come ad esempio ratti, suini, ovini, conigli, uccelli e pesci. In seguito vennero messe a punto altre due tecniche di transgenesi, quella descritta nel 1986 da A. Gossler e collaboratori, che fa ricorso alla transfezione di cellule staminali, ed un'altra ancora proposta nel 1996 da R. Jaenisch basata sull'utilizzazione di vettori retrovirali.

I metodi attualmente utilizzabili per il trasferimento genico negli animali prevedono: i) l'integrazione di geni in embrioni ad uno stadio molto precoce per mezzo di retrovirus; ii) la microiniezione di DNA esogeno nel nucleo spermatico di una cellula uovo appena fecondata; iii) il trasferimento di nuclei geneticamente modificati in cellule uovo private del materiale nucleare; iv) l'incorporazione nell'embrione, ad uno stadio di sviluppo molto precoce, di cellule staminali geneticamente modificate; v) il trasferimento di geni mediato da spermatozoi.

La tecnica di microiniezione di DNA in cellule della linea germinale è quella maggiormente impiegata per gli animali, sia da laboratorio che da allevamento (**Fig. 1.86**). Essa consente di inserire il gene esogeno direttamente nel nucleo spermatico ingrandito (pronucleo) di una cellula uovo appena fecondata. In questo caso sono necessarie femmine donatrici superovulate che dopo essersi accoppiate debbono essere sacrificate al fine di prelevarne le cellule uovo fecondate. Il gene può quindi essere integrato nel genoma dello zigote che, opportunamente trapiantato in una femmina ricevente, potrà svilupparsi fino alla nascita di uno o più animali transgenici. Una parte della progenie ottenuta dalle cellule uovo impiantate presenterà il gene esogeno in tutte le proprie cellule. Dal momento che l'integrazione del transgene avviene solitamente



Fig. 1.85 – Topo normale insieme col fratello transgenico per l'ormone della crescita (foto: R.L. Brinster).



Fig. 1.86 – Tecnica di microiniezione di DNA esogeno in cellule uovo fecondate dal nucleo spermatico.

in singola copia, determinando una condizione emizigotica, sarà necessario incrociare gli animali transgenici tra loro allo scopo di selezionare nella discendenza quelli che presentano il transgene su entrambi i cromosomi omologhi. Tali animali sono in grado di trasmettere il transgene a tutte le cellule della linea germinale.

Attraverso questa tecnica è possibile migliorare le caratteristiche produttive e qualitative nonché la resistenza a patologie o la tolleranza all'ambiente degli animali, ma anche produrre animali in grado di sintetizzare nel latte proteine ricombinanti di interesse nutraceutico o farmaceutico. L'interesse delle biotecnologie è orientato verso la creazione di animali transgenici quali vacche, pecore e capre, e in misura minore anche conigli e maiali, modificati usando geni umani sotto il controllo di promotori esprimibili nella ghiandola mammaria, capaci di secernere le proteine unicamente nel latte. Negli ultimi anni si è sviluppata così una nuova industria, quella che utilizza gli animali transgenici come "bioreattori" allo scopo di produrre molecole con proprietà farmaceutiche o alimenti con attività terapeutiche. Tra i geni espressi nelle ghiandole mammarie il cui prodotto proteico viene secreto nel latte per effetto di un promotore cosiddetto galatto-specifico, oltre al caso più noto della lattoglobulina, è possibile citare quelli che presiedono alla sintesi della caseina e della proteina acida del siero. Per ottenere l'espressione di un gene umano nel latte di una animale da allevamento, il promotore e le sequenze regolative di questi geni galatto-specifici devono essere associati in un vettore di clonaggio con le regioni codificanti dei geni di interesse. Solo in questo modo la proteina codificata da un gene esogeno verrà espressa all'interno della ghiandola mammaria e secreta nel latte: il latte animale potrà essere agevolmente raccolto al fine di isolare la proteina umana. La purificazione di una proteina dal latte è considerato un processo relativamente semplice poiché il latte contiene un numero ridotto di proteine diverse. Bisogna, infine, considerare che il latte dei mammiferi rappresenta un mezzo molto comodo per recuperare e purificare proteine che altrimenti sarebbero difficili da ottenere senza sacrificare l'animale. Rispetto alla produzione di proteine nei batteri, un vantaggio notevole è connesso al fatto che certe proteine sono prodotte correttamente e tendono a funzionare più efficacemente quando espresse nei mammiferi. Inoltre, alcune proteine di eucarioti possono venire degradate rapidamente o essere ripiegate in modo inappropriato nei procarioti.

L'impatto della tecnologia transgenica è aumentato notevolmente negli ultimi 10-15 anni e ciò si evince dai numerosissimi esempi di modelli di animali transgenici creati per sviluppare specifiche ricerche in campo biomedico e farmaceutico, oltre che zootecnico. Gli animali più utilizzati appartengono alle specie da laboratorio (circa il 95%), mentre il restante 5% è rappresentato da animali da allevamento. La maggior parte degli animali transgenici presentano il genoma modificato in seguito al trasferimento o al silenziamento di un determinato gene. Nel loro complesso, questi animali hanno permesso un notevole avanzamento delle conoscenze di base in biologia.

La clonazione animale può servire non solo a moltiplicare genotipi superiori portanti caratteristiche biologiche ottimali, per qualità o quantità, ma anche a perpetuare esemplari transgenici resi capaci di produrre sostanze utili all'uomo (**Fig. 1.87**). Recentemente sono molteplici le applicazioni della clonazione ad animali transgenici, principalmente nei bovini (**Fig. 1.88**). Il termine "clone" fu coniato da Herbert Webber del Ministero dell'Agricoltura degli Stati Uniti, alla fine del secolo XIX, per definire una popolazione di individui derivati da moltiplicazione agamica aventi il medesimo patrimonio genetico. Egli suggerì tale termine, breve ed eufonico, derivato direttamente dal greco *klon*, germoglio, per indicare una popolazione di piante prodotta attraverso propagazione per parti vegetative, in contrapposizione alla riproduzione gamica mediante seme. Il termine aveva tuttavia un grande valore evocativo e nel 1958 il biologo Honor Fell descrisse per primo le "colture clonali" a partire da una singola cellula, mentre l'immunologo Frank MacFarlane Burnett introdusse l'espres-



Fig. 1.87 – Tracy insieme ai suoi due agnellini clonati.



Fig. 1.88 – Bovini transgenici clonati.

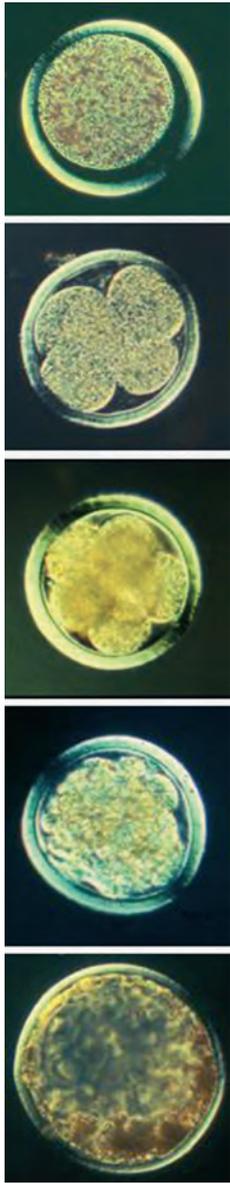


Fig. 1.89 – Processo di sviluppo della cellula uovo fecondata fino allo stadio di morula attraverso fasi embrionali intermedie con 4-8-16-32 blastomeri.

sione “selezione clonale” riferendosi ad elementi cellulari immunocompetenti. In generale per clonazione si intende l’ottenimento di un insieme delle cellule derivate per discendenza diretta da una singola cellula. Si tratta cioè di produrre in coltura un certo numero di cellule identiche in tutto e per tutto fra di loro e identiche a loro volta alla cellula capostipite. In senso stretto si possono dunque clonare solo le cellule. Tuttavia, recenti esperimenti nel campo della biologia della riproduzione animale ed umana hanno portato alla ribalta il concetto di clonazione con una estensione del suo significato all’intero individuo.

Nei mammiferi la clonazione di un intero individuo è tecnicamente possibile partendo da blastomeri (**Fig. 1.89**). In altri termini, si può ottenere un individuo utilizzando una singola cellula se questa appartiene al gruppo delle prime 8-16 cellule costituenti l’embrione ad uno stadio molto precoce derivanti dalla cellula uovo fecondata dal nucleo spermatico (detta anche zigote) a seguito delle prime tre-quattro divisioni mitotiche. Queste cellule, chiamate blastomeri, possiedono la capacità di totipotenza, cioè possono rigenerare un intero individuo. Se vengono separati i vari blastomeri di un embrione precoce di un animale, si possono in teoria ottenere 8-16 individui geneticamente identici e costituenti pertanto un clone.

Il metodo di clonazione di maggiore rilevanza da un punto di vista tecnologico e commerciale è senza dubbio quello perseguito mediante trasferimento nucleare (**Fig. 1.90**). La possibilità di generare un intero individuo partendo da una cellula uovo privata del suo nucleo ed integrata di un nucleo prelevato da un’altra cellula fu ipotizzata dal tedesco Hans Spemann già nel 1938, ma la tecnica per la sua realizzazione venne messa a punto sugli anfibi dai biologi americani Robert Briggs e Thomas J. King nel 1952 e poi confermata dal ricercatore inglese John Gurdon nel 1966. Solo molti anni dopo il danese Steen Willadsen riuscirà ad applicare con successo nei mammiferi la tecnica del trasferimento nucleare: in pecora nel 1984, in maiale nel 1985 e in vacca nel 1986. A distanza di un decennio, nel 1997, un gruppo di ricercatori del *Roslin Institute* di Edimburgo (Scozia) guidati da **Ian Wilmut** ha prodotto una pecora adulta partendo da una cellula uovo privata del suo nucleo nella quale è stato poi inserito il nucleo di una cellula derivante da un’altra pecora. L’esperimento è riuscito sia utilizzando nuclei prelevati da cellule embrionali e fetali sia utilizzando nuclei provenienti da cellule

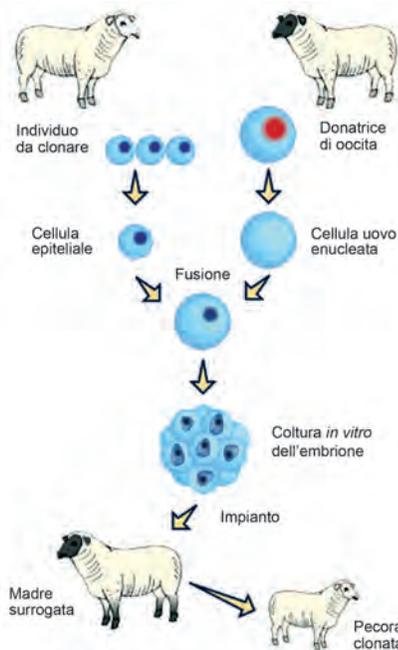


Fig. 1.90 – Fasi essenziali del processo di clonazione mediante trasferimento nucleare.

adulte, come ad esempio quelle della ghiandola mammaria. L’innovazione tecnica introdotta riguardava il trattamento delle cellule adulte dalle quali devono essere prelevati i nuclei: esse vennero coltivate in piastra per un certo periodo e trattate in maniera tale da portarle ad uno stato di quiescenza proliferativa. È molto importante il fatto che le cellule possano essere mantenute indefinitamente in coltura perché, da un lato, favorisce la riprogrammazione genetica dei nuclei e, dall’altro, consente ulteriori manipolazioni genetiche dei nuclei.

Per la clonazione della famosa pecora *Dolly* (**Fig. 1.91**) vennero impiegati nuclei in fase di quiescenza di cellule epiteliali di ghiandola mammaria in coltura per la fusione con cellule uovo provenienti da un’altra pecora di razza diversa e preventivamente private del nucleo. Dopo la fusione, la cellula somatica rinucleata fu allevata *in vitro* fino allo stadio embrionale, quindi venne impiantata nella

madre adottiva. Tale esperimento ha dimostrato, per la prima volta, la possibilità di ottenere individui completi partendo da cellule somatiche in coltura, vale a dire la totipotenza del nucleo di una cellula di individuo adulto differenziata, aprendo pertanto nuove prospettive per la produzione di animali geneticamente modificati e per la loro clonazione. Usando tecniche simili sono stati successivamente prodotti cloni di altri mammiferi, tra cui bovini, suini e topi, sia femmine che maschi.

L'ottenimento di cloni transgenici prevede il trasferimento dei geni esogeni nelle cellule somatiche in coltura anziché nelle cellule uovo fecondate o nelle cellule embrionali. I nuclei prelevati dalle cellule donatrici geneticamente modificate possono essere inseriti nelle cellule riceventi enucleate in modo che il gene esogeno possa trasmettersi alla discendenza ed esprimersi in ogni suo componente. La transgenesi negli animali da allevamento è stata studiata con l'intento principale di utilizzarla per incrementare la produttività e le caratteristiche di qualità: i progetti di ricerca in questi campi sono stati finalizzati ad ottenere un maggiore e più rapido accrescimento corporeo degli animali in allevamento, con una aumentata massa muscolare e un ridotto deposito di grasso. A tale scopo sono stati prodotti maiali e pecore transgeniche, introducendo i geni *GH* (*growth hormone*) codificante l'ormone della crescita e *IGF-1* (*insuline growth factor*) codificante un fattore di crescita insulino-simile. In alcuni modelli si è spesso realizzata una espressione abnorme dei transgeni che ha portato gli animali a sviluppare anomalie anatomiche o fisiologiche, non sopravvivendo oltre l'anno di età (**Fig. 1.92**). Il trasferimento del gene per l'ormone della crescita ha invece consentito notevoli successi in alcune specie di pesci, portando all'ottenimento di salmone transgenici con accresciute dimensioni corporee (**Fig. 1.93**). Il peso dei pesci transgenici risulta, in media, oltre dieci volte superiore a quello dei controlli non transgenici. Questi risultati sono stati raggiunti ponendo il gene codificante per l'ormone della crescita sotto il controllo del promotore della metallotioneina ed introducendo il costrutto plasmidico in uova di salmone per iniezione.

Più recentemente sono stati prodotti maiali transgenici in grado di sintetizzare l'enzima fitasi quasi esclusivamente nelle ghiandole salivari poiché il gene corrispondente è sotto il controllo di un promotore con elevata specificità di espressione. Tale enzima secreto nella saliva agisce a livello dello stomaco allo stesso modo della fitasi addizionata nei mangimi: è stato verificato che i maiali transgenici producono fitasi in quantità sufficiente a digerire la totalità dei fitati contenuti nei cereali dei mangimi. Di conseguenza, il fosforo normalmente presente nelle deiezioni è considerevolmente ridotto, in misura compresa tra il 55% e il 75%, a seconda dell'età dei soggetti. Ciò comporta una drastica riduzione delle potenzialità di inquinamento ambientale provocato dall'allevamento dei suini.

Tra gli animali domestici, oltre che nei suini, soggetti transgenici sono stati ottenuti negli ovini, nei caprini e nei polli per migliorare la qualità del latte, della lana o delle uova. Ad esempio, uno degli obiettivi in ovini e caprini è quello di ottenere latte con meno lattosio, disaccaride che può creare intolleranza, o più ricco di proteine utili alla caseificazione. Negli avicoli, invece, un obiettivo è quello di promuovere o di aumentare la sintesi di particolari proteine nelle uova. Ad esempio, sono stati recentemente prodotti polli transgenici in grado di esprimere una maggiore quantità di lisozima nell'albume delle uova: tale enzima, normalmente sintetizzato nell'albume, è considerato un efficace antimicrobico in quanto degrada i polisaccaridi contenuti nella capsula di rivestimento di molti batteri. Riguardo ai bovini, nel 1990 in Olanda è stato ottenuto il primo toro transgenico (**Fig. 1.94**). L'anno successivo sono



Fig. 1.91 – Pecora Dolly.



Fig. 1.92 – Maiale transgenico per l'ormone della crescita umano, denominato *Beltsville pig*, dal nome della stazione sperimentale del Maryland (USA) dove è stato ottenuto.



Fig. 1.93 – Esempio di salmone transgenico per l'ormone della crescita a confronto con un individuo normale.



Fig. 1.94 – Il toro transgenico *Herman* e la sua progenie (*Gene Farming*, Olanda).

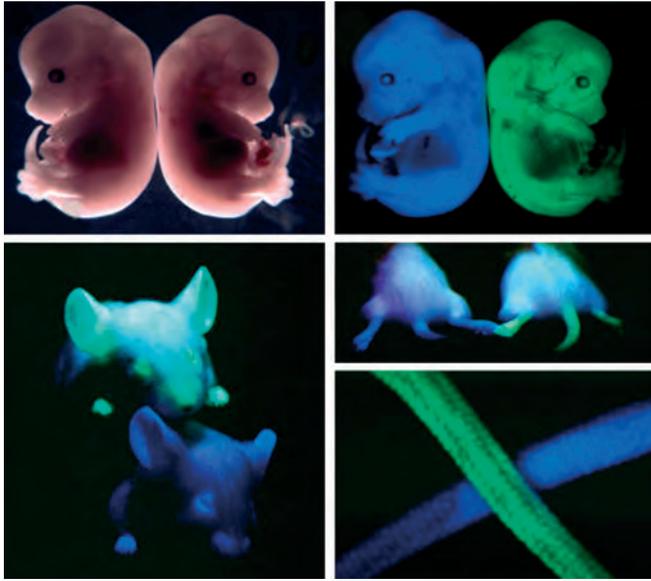


Fig. 1.95 – Topi transgenici esprimen-
ti la GFP, *green fluorescent protein*.

state ottenute vacche transgeniche in grado di secernere la lattoferrina nel loro latte: in questo caso l'obiettivo era quello di usare tale sostanza come integratore di ferro negli alimenti per l'infanzia e per il trattamento della septicemia.

Un settore sul quale le applicazioni biotecnologiche potrebbero fornire un contributo molto importante è quello connesso ad un aumento della resistenza a malattie. Si ritiene che questo settore potrà avere un forte impatto sulla sicurezza alimentare e sulla salute pubblica. La resistenza alla BSE è sicuramente un aspetto di primaria rilevanza: nei topi è stato dimostrato che l'inattivazione del gene codificante la proteina prionica, responsabile delle encefalopatie trasmissibili in diverse specie di animali, determina resistenza alla BSE. Le epidemie più preoccupanti che hanno recentemente colpito il genere umano – AIDS, influenza aviaria (tipo H5N1), SARS, ecc. – sono dovute a virus trasmessi da specie animali. Creare animali resistenti a patologie ed, in particolare, a infezioni virali potrebbe diminuire sensibilmente il rischio per l'uomo di contrarre malattie epidemiche. La

sperimentazione in questo campo è molto attiva ed è mirata ad acquisire informazioni di base in seguito utilizzabili potenzialmente a scopi applicativi (**Fig. 1.95**).

Da millenni l'uomo ha reso possibili scambi massicci di patrimonio genetico tra specie diverse: fra cavalla e asino (mulo), fra asina e cavallo (bardotto), fra cinghiale e maiale, fra cavallo e zebra, fra vacca e bisonte, fra leone e leopardo, creando animali con genoma ibrido. Questi incroci comportano il rimescolamento di migliaia di geni di origine diversa. La trasformazione comporta, invece, una modificazione mirata del patrimonio genetico di un organismo, specificatamente per uno o pochi geni. La creazione di animali con genomi ibridi non ha destato scandali di natura etica e non ha creato rischi per l'ambiente o per l'uomo, così come la produzione di animali con transgeni non può innescare squilibri per gli agro-ecosistemi dal momento che i soggetti vengono allevati in ambienti protetti, sia che si tratti di animali da allevamento che di animali da laboratorio. Rimane il fatto inconfutabile che la **scienza è conoscenza** e pertanto non può essere considerata né "buona" né "cattiva". Le biotecnologie genetiche sono basate sull'applicazione delle conoscenze biologico-molecolari acquisite sugli organismi viventi: possono essere "buone", se obbediscono a canoni etici e se rivolte al bene comune, oppure "cattive", se perseguono fini opposti. Sulla base di ciò, l'uomo non può frenare la scienza, può invece indirizzare l'uso delle biotecnologie!

Allo stato attuale delle conoscenze, le possibili applicazioni degli animali transgenici in campo zootecnico e biomedico sono molteplici. In particolare, la transgenesi consente potenzialmente di: i) introdurre geni di resistenza a patogeni negli animali da allevamento; ii) migliorare le caratteristiche qualitative dei prodotti zootecnici, principalmente carne, latte e lana; iii) produrre proteine di interesse farmaceutico e biotecnologico; iv) ottenere organi per xenotrapianti con minori rischi connessi alle reazioni di rigetto; v) creare animali modello da laboratorio per lo studio di diverse patologie umane o per la ricerca biologica (**Tab. 1.7**).

Le applicazioni mirate al miglioramento delle produzioni zootecniche hanno cercato innanzitutto di migliorare la qualità della carne. Molti studi sono stati condotti, ad esempio, sul gene che controlla la sintesi dell'ormone somatotropo, sapendo che la sovraespressione di questo gene aumenta la velocità dello sviluppo muscolare. Allo stesso modo si è cercato di migliorare la qualità del latte, variando l'espressione delle proteine del latte. Molte di queste applicazioni hanno lo scopo di rendere il latte bovino più simile a quello umano e di eliminare le proteine che causano allergie o di risolvere-

Settore	Finalità	Specie animali
Farmacologia	Produzione e secrezione di biofarmaci nel latte*	Pecore, capre, bovini, suini, topi
Medicina e chirurgia	Modelli sperimentali per lo studio, il trattamento e la prevenzione delle più gravi malattie dell'uomo	Topi, ratti
	Donatori di tessuti e organi per xenotrapianti	Suini
Zootecnia	Selezione e allevamento di animali resistenti alle malattie infettive e neoplastiche	Bovini, suini, polli, pesci
	Miglioramento quali-quantitativo delle produzioni di alimenti di origine animale (carne, latte, uova)	Bovini, suini, polli, pesci

* Biofarmaci per l'uomo già in produzione da parte di animali transgenici:

Antitripsina umana di tipo $\alpha 1$ per la terapia dell'enfisema
 Proteina C umana per la terapia della trombosi
 Fattori VIII e X di coagulazione del sangue umano per la terapia dell'emofilia
 Lattoferrina umana per il trasporto sierico del ferro e l'attività antibatterica
 Attivatore tissutale del plasminogeno umano per la dissoluzione di trombi di fibrina
 Emoglobina umana come sostituto del plasma umano nelle trasfusioni

re il problema dell'intolleranza al lattosio. Infine, si è anche tentato di migliorare la quantità e soprattutto la qualità delle produzioni di lana, aumentando la cheratina, una proteina che entra nella composizione dei peli. Tuttavia, l'applicazione degli animali transgenici che più è stata studiata è sicuramente connessa all'impiego di questi animali come biofabbriche per la produzione di proteine di interesse farmaceutico. Sono già molti gli esempi di proteine prodotte in questo modo, alcune delle quali sono già entrate nelle fasi cliniche che porteranno al loro utilizzo nell'uomo, come ad esempio i fattori della coagulazione del sangue. Le prospettive nel settore biomedico sono molto promettenti: l'interesse è rivolto alla produzione di vacche da latte transgeniche capaci di esprimere anticorpi umani attivi nei confronti di malattie molto gravi come, ad esempio, il carbonchio o il vaiolo, di tossine letali come il botulino o di malattie connesse a deficienze del sistema immunitario.

Strettamente connessa alla transgenesi animale è la clonazione. Nel settore zootecnico la clonazione può essere utilizzata come tecnica di riproduzione per moltiplicare animali geneticamente superiori, molto produttivi (riproduttori di razze da allevamento) o aventi caratteristiche particolari (per esempio, razze in via di estinzione). L'industria zootecnica potrebbe beneficiare moltissimo dalla clonazione di animali geneticamente superiori, così come i programmi di miglioramento genetico poiché la clonazione consentirebbe di moltiplicare i riproduttori maschi miglioratori da utilizzare per la produzione di seme. Nel 1999, Galli e collaboratori hanno ottenuto il toro *Galileo* (Fig. 1.96), che rappresenta il primo clone al mondo di un toro adulto provato, cioè sottoposto ad una prova di valutazione dei riproduttori.

Per quanto riguarda le applicazioni biomediche, l'aspetto più importante della clonazione animale è quello di poter ottenere le cellule embrionali staminali da embrioni sviluppati per clonazione con cellule dei pazienti. Le cellule staminali hanno la capacità di differenziarsi in tutti i tipi di cellule dell'organismo e la ricerca sta facendo rapidi progressi per mettere a punto delle procedure che indirizzino il differenziamento verso il tipo cellulare desiderato. Le potenzialità applicative sono veramente notevoli e i risultati di queste ricerche potranno rivoluzionare la terapia di molte malattie dell'uomo come, ad esempio, il diabete.

In prospettiva, uno degli obiettivi più affascinanti rimane comunque quello di produrre e clonare animali transgenici per il trapianto di organi e tessuti nell'uomo. La ragione principale dell'attenzione che gli xenotrapianti stanno ricevendo dipende dal fatto che essi rappresentino una possibile soluzione alternativa alla carenza di organi umani per i trapianti. L'insufficiente reperibilità di organi e tessuti, unitamente alle

Tab. 1.7 – Principali applicazioni degli animali transgenici e biofarmaci per l'uomo.



Fig. 1.96 – Toro *Galileo*, primo clone al mondo di un toro adulto provato (sottoposto ad una prova di valutazione dei riproduttori) - CIZ Research and Genetics.

prospettive ancora troppo lontane di avere disponibili metodiche alternative hanno indotto a focalizzare l'attenzione negli ultimi anni sugli xenotrapianti. Gli xenotrapianti possono essere definiti come "ogni procedura che comporti l'uso di cellule vive, tessuti e organi provenienti da una specie animale e trapiantati o impiantati in un essere umano, o usati in perfusione attraverso i vasi sanguigni", ora estesi anche a "fluidi, cellule, tessuti e organi umani che abbiano avuto un contatto *ex vivo* con cellule, tessuti o organi non umani vivi". Alcune proteine prodotte nel sangue, dette di complemento, appena individuano una sostanza estranea si attaccano alla sua superficie per segnalarlo al sistema immunitario che si attiva producendo anticorpi specifici. Creare un animale i cui organi interni abbiano in superficie delle proteine il più possibile simili a quelle umane potrebbe consentire di ridurre o superare i problemi connessi alle reazioni di rigetto. Dei quattro tipi di rigetto – iperacuto, vascolare acuto, cellulare acuto, cronico – solo il primo è per il momento avviato alla soluzione. Infatti, per quanto riguarda la forma più grave di rigetto, essa comporta l'attivazione degli antigeni di istocompatibilità, conducendo alla necrosi del tessuto o dell'organo entro breve tempo dall'innesto. La realizzazione di suini modificati geneticamente in modo da indurre una risposta immunitaria più ridotta nell'uomo inteso come organismo ricevente, è stato l'elemento che ha radicalmente cambiato le prospettive sugli xenotrapianti, facendoli intravedere come una biotecnologia concretamente applicabile nel contesto clinico. Nel 1995 sono stati tentati i primi esperimenti con pazienti gravissimi in attesa di trapianto, che sono stati assistiti con fegato di maiali transgenici *ex vivo*, cioè con organi non trapiantati all'interno del corpo ma collegati tramite un macchinario all'esterno. In anni più recenti, la sperimentazione è stata condotta anche per comprendere le reali potenzialità di trapianti di cuore usando maiali transgenici.

Attualmente la sperimentazione sugli essere umani riguarda quasi esclusivamente l'innesto di cellule, soprattutto di tipo neuronali fetali di suini, per la cura del morbo di Parkinson (disordine del sistema nervoso con tremori e rigidità muscolare) e della corea di Huntington (contrazione involontaria dei muscoli), e per la perfusione attraverso il fegato cosiddetto bioartificiale, in cui sono utilizzati epatociti di suini, di pazienti in attesa di trapianto di fegato.

Certamente l'applicazione più utile degli animali transgenici e già ampiamente usata in specie da laboratorio è quella connessa alla produzione di animali modello per lo studio di malattie umane. I topi sono il primo esempio di animale brevettato in cui sono stati modificati alcuni geni specifici per provocare l'insorgenza del cancro al fine di studiare questa patologia (**Fig. 1.97**). L'impiego di questi animali come modelli per lo studio di malattie umane è possibile perché oltre il 90% dei nostri geni sono omologhi a quelli del topo. Le potenzialità della transgenesi nella ricerca in campo biomedico sono immense e non facilmente prevedibili.



Fig. 1.97 – Topo transgenico brevettato impiegato per la ricerca contro il cancro.

Bibliografia di riferimento e approfondimento

- Auerbach, C. (1976). Mutation research, results and perspectives. Chapman & Hall, London.
- Avery, O.T., MacLeod, C.M., McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.* 79:137-158.
- Bateson, W. (1909). Mendel's principles of heredity. Cambridge University Press, UK.
- Bateson, W.E., Saunders, R., Punnett, R.C. (1905). Experimental studies in the physiology of heredity. *Rep. Evol. Comm. R. Soc.*, vol. 2, pp. 80-99.
- Beadle, G.W., Tatum, E.L. (1942). Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 27:499-506.

- Benzer, S. (1961). On the topology of the genetic fine structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 45: 1607-1620.
- Bertoni G., Aimone Marsan P. (2004). La transgenesi nelle produzioni animali. In: *Biotechnologie: i vantaggi per la salute e l'ambiente*. Ed. 21mo Secolo, pp. 75-94.
- Boyer, H.W. (1971). DNA restriction and modification mechanisms in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 25: 153-176.
- Boyle, W.S. (1953). *Principles and practice in plant cytology*. Photographs of mitosis and meiosis in plants. Burgess Publishing Co., Minneapolis.
- Boveri, T. (1902). Über mehrpolige mitosen als mittel zür analyse des zellkerns [Sulla mitosi a più poli come strumento per le analisi del nucleo cellulare]. *Verh. Phys. Med. Ges. Wurzb N.F.* 35: 67-90.
- Brenner, S., Jacob, F., Meselson, M. (1961). An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190: 576-581.
- Chargaff, E. (1951). Structure and function of nucleic acids as cell constituents. *Fed. Proc.* 10: 654-659.
- Clayton, J., C. Dennis (2003). 50 years of DNA. *Nature Publish. Group*.
- Correns, C. (1900). Mendel's regel über das verhalten der nachkommenschaft der rassenbastarde. *Ber. Dt. Bot. Ges.*, vol. 18: 158-168.
- Crick, F.H.C., Bamett, L., Brenner, S., Watts-Tobin, R.J. (1961). General nature of the genetic code for proteins. *Nature* 192: 1227-1232.
- Crick, F.H.C. (1966). Codon-anticodon pairing, the wobble hypothesis. *L. Molec. Biol.* 19: 548-555.
- Crow, J.F. (1986). *Basic concepts in population, quantitative, and evolutionary genetics*. Freeman, New York.
- Darwin, C. (1860). *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. Appleton, New York.
- Darwin, C. (1876). *The effects of cross and self fertilization in the vegetable kingdom*. Amer. Ed., New York.
- De Vries, H. (1900). Das spaltungsgesetz der bastarde. *Ber. Dt. Bot. Ges.*, vol. 18: 83-90.
- Dobzhansky, T. (1951). *Genetics and the origin of species*. Columbia University Press, New York.
- East, E.M. (1910). A Mendelian interpretation of variation that is apparently continuous. *Am. Natur.* 44: 65-82.
- East, E.M. (1916). Studies on size inheritance in *Nicotiana*. *Genetics* 1: 164-176.
- East, E.M., Jones, D.F. (1919). *Inbreeding and outbreeding*. Lippincott, Philadelphia.
- East, E.M. (1936). Heterosis. *Genetics* 21: 375-397.
- Fasolo A. (2004). *Dizionario di biologia*. Edizione UTET Libreria, Torino.
- Fisher, R.A. (1930). *The genetical theory of natural selection*. Clarendon Press, Oxford.
- Fisher, R.A. (1930). Has Mendel's work been rediscovered? *Ann. Sci.*, vol. 1, pp. 115-137.
- Fisher, R.A. (1949). *The theory of inbreeding*. Oliver Boyd, Edinburgh.
- Fraenkel-Conrat, H., Singer, B. (1957). Virus reconstitution: combination of protein and nucleic acid from different strains. *Biochem. Biophys. Acta* 24: 540-548.
- Glick B.R., Pasternak J.J. (1998). Gli animali transgenici. In: *Biotechnologia molecolare. Principi e applicazioni del DNA ricombinante*. Zanichelli Editore, Bologna. pp. 433-457.
- Griffith, F. (1928). The significance of pneumococcal types. *J. Hyg.* 27: 113-159.
- Haldane, J.B.S. (1831). The cytological basis of genetical interference. *Cytologia*, vol. 3, pp. 54-65.
- Haldane, J.B.S. (1932). *The causes of evolution*. Harper, London & New York.
- Hardy, G.H. (1908). Mendelian proportions in a mixed population. *Science* 28: 49-50.
- Hershey, A.D., Chase, M. (1952). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth and bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 36: 39-56.
- Houdebine L.M. (2002). Transgenesis to improve animal production. *Livestock Production Science*, 74: 255-268.
- Jacob, F., Monot, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Molec. Biol.* 3: 318-356.
- Johannsen, W. (1909). *Elemente der exakten erblichkeitslehre* [Elementi della scienza dell'eredità esatta]. Fisher, Jena.

- Khorana, H.G. (1966-1967). Polynucleotide synthesis and the genetic code. Harvey Lectures 62: 79-105.
- Kornberg, A. (1960). Biologic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Science* 131: 1503-1508.
- Krakauer D.C., Pagel M., Southwood T.R.E., Zlotoff M.A. (1996). Phylogenesis of prion protein. *Nature*, 380: 675.
- Lewontin, R.C. (1974). The genetic basis of evolutionary changes. Columbia University Press, New York.
- Luria, S.E., Delbruck, M. (1943). Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28: 491-511.
- Mather, K. (1943). Polygenic inheritance and natural selection. *Biol. Rev.* 18: 32-64.
- Mather, K. (1949). Biometrical genetics. Methuen, London.
- Mather, K. (1954). The genetical units of continuous variation. *Caryologia*, vol. 6 (suppl.), pp. 106-123.
- McClintock, B. (1950). The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 36: 344-355.
- Mendel, G. (1866). Versuche über Pflanzenhybriden. *Verhandlungen des Naturforschenden Vereins in Brünn*, vol. 4, pp. 3-47.
- Meselson, M., Stahl, F.W. (1958). The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44: 671-682.
- Morgan, T.H. (1910). Sex-limited inheritance in *Drosophila*. *Science* 32: 10-122.
- Morgan, T.H. (1911). Random segregation versus coupling in Mendelian inheritance. *Science* 34: 384.
- Morgan, T.H., Sturtevant, A.H., Muller, H.J., Bridges, C.B. (1915). The mechanism of Mendelian heredity. Henry Holt, New York.
- Morgan, T.H. (1919). The physical basis of heredity. Lippincott, Philadelphia.
- Morgan, T.H. (1926). The theory of the gene. Yale University Press, New Haven.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155: 335-350.
- Nilsson-Ehle, H. (1909). Kreuzungsuntersuchungen an hafer und weizen. *Lunds Univ. Aarskr. N.F. Atd. Ser. 2*, vol. 5, n. 2: 1-122.
- Nirenberg, M., Leder, P. (1964). RNA code words and protein synthesis. *Science* 145: 1399-1407.
- Nirenberg, M., Matthaei, J.H. (1961). The dependence of cellfree protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47:1588-1602.
- Nirenberg, M. (2004). Historical review: deciphering the genetic code – a personal account. *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 29, n. 1, pp. 46-54.
- Olins D.E., Olins A.L. (2003). Chromatin history: our view from the bidge. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4: 809-814.
- Paterson A.H., Lander E.S., Hewitt J.D., Peterson S., Lincoln S.E., Tanksley S.D. (1988). Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature*, 335: 721-726.
- Peters, J.A. (1959). Classic papers in genetics. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Pinkert, C.A. (2002). Transgenic animal technology: A laboratory handbook. Academic Press, San Diego (USA).
- Russo V., Fontanesi L. (2001). Il miglioramento genetico animale: potenzialità dei metodi tradizionali e prospettive della genetica molecolare. *Zootecnia e Nutrizione Animale*, 27: 253-284.
- Salvi S., Tuberosa R. (2005). To clone or not to clone plant QTLs: present and future challenges. *Trends in Plant Science*, 10: 297-304.
- Sanger, F., Coulson, A.R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94: 441-448.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Stadler, L.J. (1954). The gene. *Science*, 120: 811-819.
- Stebbins, G.L. (1950). Variation and evolution in plants. Columbia University Press, New York.

- Sturtevant, A.H. (1965). A history of genetics. Harper & Row, New York.
- Sutton, W.S. (1903). The chromosomes in heredity. *Biology Bull.* 4: 231-251.
- Tallacchini, M., Terragni F. (2004). Le biotecnologie: aspetti etici, sociali e ambientali. Bruno Mondadori, pp. 197.
- Taylor, J.H. (1963). The replication and organization of DNA in chromosomes. In: *Molecular genetics*. J.H. Taylor (ed.), pp. 65-111. Academic Press, New York.
- Tschermak, E. (1900). Über künstliche kreuzung bei *Pisum sativum*. *Ber. Dt. Bot. Ges.*, vol. 18: 232-239.
- Vavilov, N.J. (1951). The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. The Chronica Botanica Co., Waltham, Massachusetts.
- Vignal, A., Milan D., San Cristobal M., Eggen A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*, 34: 275-305.
- Voeller, B.R. (1968). The chromosome theory of inheritance. *Classic papers in development and heredity*. Appleton-Century-Crofts, New York.
- Watson, J.D. (1968). The double helix. Atheneum, New York.
- Watson, J.D., Crick, F.H.C. (1953). Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171: 737-738.
- Watson, J.D., Crick, F.H.C. (1953). Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171: 964-969.
- Watson, J.D. (1963). The involvement of RNA in the synthesis of proteins. *Science* 140: 17-26.
- Weinberg, T. (1908). Über den nachweis der vererbung beim menschen [Sulla dimostrazione dell'eredità nell'uomo]. *Jahresh. Ver. F. Vaterl. Naturk. In Württemberg* 64: 369-382.
- Wilkins, M.H.F., Stokes, A.R., Wilson, H.R. (1953). Molecular structure of deoxypentose nucleic acids. *Nature* 171: 738-740.
- Wilson, E.B. (1905). The chromosomes in relation to the determination of sex in insects. *Science* 22: 500-502.
- Wilson, E.B. (1928). The cell in development and heredity. An elaborate review of animal cytology. 3rd ed. The Macmillian Co., New York.
- Winge, Ø. (1917). The chromosomes, their number and general importance. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, vol. 13, pp. 131-275.
- Wright, S. (1921). Systems of mating. I. The biometric relation between parent and offspring. *Genetics* 6: 111-123.
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.
- Wright, S. (1968). Evolution and the genetics of populations. The University of Chicago Press, Chicago.
- Yule, G.V. (1906). On the theory of inheritance of quantitative compound characters on the basis of Mendel's laws. A preliminary note. *Rept. Third Intl. Conf. Genet.*, pp. 140-142.

