

Apomissia: storia di un carattere rivoluzionario

Nel lontano 1829 i Kew Gardens di Londra ricevettero 3 piante femminili di una specie dioica Australiana della famiglia delle *Euforbiaceae* che fino a quel momento era rimasta sconosciuta. Il 18 Giugno 1839, presso la “Linnean Society of London”, John Smith, primo curatore dei Kew, annunciò che, nonostante le avesse tenute sotto stretto controllo per 10 anni, queste piante producevano seme anche in apparente assenza di polline. Egli affermò: «la mia ricerca di strutture riconducibili a un apparato riproduttivo maschile non ha avuto successo». A quei tempi nessuna pianta, che potesse essere minimamente imparentata con la specie in questione, veniva coltivata presso i Kew Gardens ma, nonostante questo, ogni anno i 3 individui femminili producevano frutti contenenti semi vitali e Smith poté allevare, di anno in anno, progenie “identiche alla pianta madre”. Questa caratteristica peculiare fece sì che a tale specie venisse dato il nome di *Caelebogyne ilicifolia* — da “caelebs, celibe” e “γυνή, donna” — per indicare una «pianta in cui il polline non è essenziale per la formazione del seme». Da quel momento venne avviata una lunga diatriba sulle cause del fenomeno che, solo dopo quasi mezzo secolo, venne identificato con il termine di *apomissia*. In realtà tale termine fu inizialmente utilizzato per indicare, in modo generico, qualunque forma di riproduzione asessuata, compresa la propagazione vegetativa. Solo nel 1984 Nogler fornì quella che ancora oggi è la definizione esatta del termine apomissia: *riproduzione asessuale per seme*. Anche Mendel, nel 1869, si era imbattuto inconsapevolmente nell’apomissia quando, durante i suoi studi sull’ereditarietà dei caratteri, decise di passare dal pisello alla specie *Hieracium pilosella*. Non si hanno informazioni sul numero di incroci che Mendel condusse in quanto la maggior

* Dipartimento di Biologia Applicata, Università di Perugia

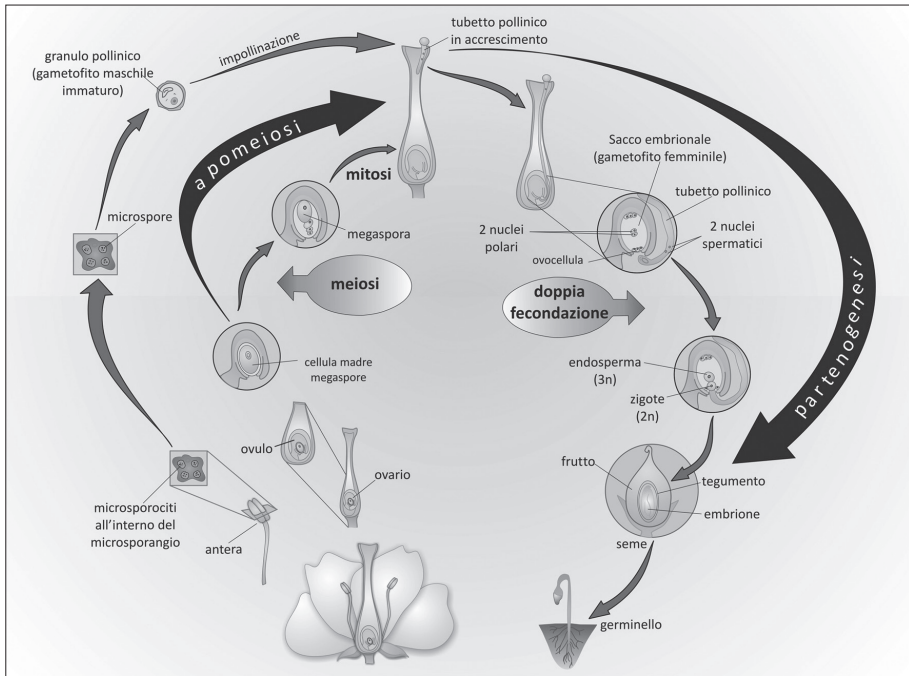


Fig. 1 Ciclo vitale caratteristico delle angiosperme con le principali modificazioni (indicate dalle due frecce nere) che si hanno nella riproduzione apomittica

parte dei suoi dati è andata persa, ma studi condotti sulle informazioni ancora disponibili indicano che egli ne effettuò alcune migliaia in un periodo di oltre 10 anni. In diretto contrasto con quanto osservava in pisello, gli ibridi F_1 di *H. pilosella* mostravano un'ampia segregazione mentre le discendenze delle singole piante F_1 erano uniformi. Agli inizi del '900, quando l'apomissia era ormai un fenomeno conosciuto, uno scienziato (Ostenfeld) riprese lo studio dell'ereditarietà dei caratteri in *Hieracium* effettuando diversi incroci che includevano quelli effettuati da Mendel. Insieme al suo collega Rosemberg, egli confermò la presenza dell'apomissia in questo genere spiegando, a circa 40 anni di distanza, i risultati ottenuti da Mendel. Per molti anni l'apomissia fu considerata dai ricercatori una sorta di curiosità botanica, caratteristica di pochi generi e quasi priva d'interesse. L'attenzione inizialmente rivolta all'aspetto botanico e tassonomico e, in seguito, alle ripercussioni evoluzionistiche ed ecologiche, si è recentemente focalizzata sull'aspetto applicativo a causa delle grandi potenzialità economiche in esso racchiuse. Oggi l'apomissia è presente in più di 300 specie che appartengono a 40 famiglie sia mono che dicotiledoni. Circa il 75% delle specie apomittiche appartiene a 3 grandi famiglie:

Asteraceae, Rosaceae e Poaceae. L'apomissia sembra, invece, essere del tutto assente nella famiglia delle Solanaceae.

TIPI DI APOMISSIA

Nelle piante superiori il seme vitale si forma solo se viene rispettata una definita sequenza di eventi che si realizzano all'interno dell'ovulo: la Cellula Madre delle Megaspore, originatasi entro la nucella, produce, a seguito di meiosi, la megaspore funzionale che, mediante tre mitosi successive dà origine al sacco embrionale all'interno del quale si organizzano l'ovocellula e il nucleo polare. La doppia fecondazione di queste due entità, da parte dei 2 nuclei spermatici portati dal tubetto pollinico, determina lo sviluppo dell'embrione e dell'endosperma. Nella riproduzione apomittica, nonostante alcuni dei passaggi sopra elencati vengano omessi (fig. 1), si ha comunque la formazione di seme vitale grazie al susseguirsi di *apomeiosi* (assenza di meiosi che porta alla formazione di un sacco embrionale non ridotto) e *partenogenesi* (sviluppo autonomo dell'ovocellula non ridotta in embrione). Gli embrioni così formati, in assenza di mutazioni, possiedono un patrimonio genetico identico a quello della pianta madre (Bicknell e Koltunow, 2004). Questa forma di apomissia in cui l'embrione si forma da una cellula uovo differenziatasi in un sacco embrionale non ridotto è definita *apomissia gametofitica*. Si parla, invece, di *apomissia sporofitica* (embrionia avventizia) nel caso in cui l'embrione si forma direttamente da una cellula somatica senza produzione del sacco embrionale. Le specie apomittiche gametofitiche possono, a loro volta, distinguersi in base all'origine del sacco embrionale. Si ha *diplosporia* quando il sacco embrionale si origina da una ovocellula non ridotta formatasi a seguito di soppressione (*diplosporia mitotica*) o modificazione (*diplosporia meiotica*) della meiosi e di *aposporia*, quando esso si sviluppa da una cellula della nucella, detta *iniziale aposporica*. La diplosporia di tipo mitotico, con assenza totale di meiosi, assicura l'identità genetica mentre nella diplosporia meiotica (o restituzionale) tale identità non è garantita poiché la soppressione della meiosi avviene dopo la prima divisione, quando si è già avuto il riarrangiamento cromosomico (Albertini et al., 2010).

IMPORTANZA DELL'APOMISSIA

Il principale vantaggio dell'apomissia è permettere di ottenere semi geneticamente identici al genitore materno fissando stabilmente le combinazioni ge-

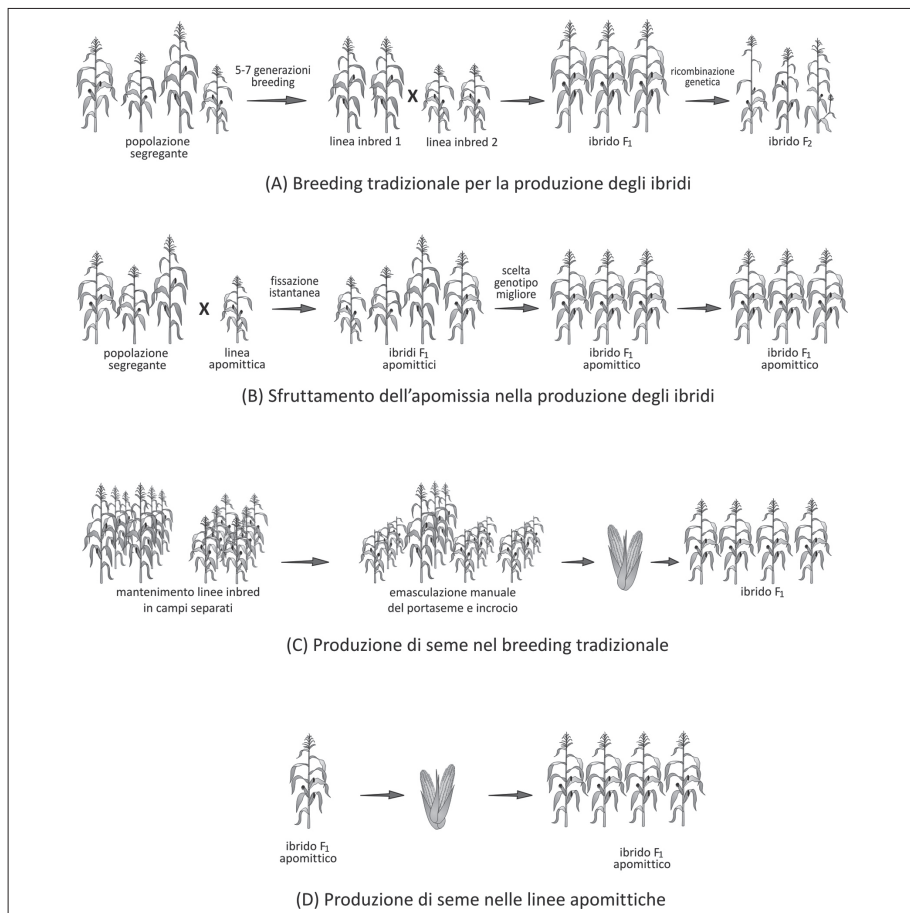


Fig. 2 Schema comparativo tra breeding tradizionale (A e C) e quello supportato dall'impiego dell'apomissia (B e D). Nel breeding tradizionale (A), all'interno di una popolazione segregante (naturale o appositamente sviluppata) vengono selezionati alcuni genotipi che, dopo 5-7 generazioni di autofecondazione e selezione, vengono testati per la loro attitudine a produrre gli ibridi. Le due linee inbred migliori vengono selezionate, moltiplicate in purezza e incrociate per ottenere seme ibrido F₁ da cui nasceranno piante uniformi, molto vigorose e produttive. Tale schema, però, richiede una serie di interventi (C): le due linee inbred devono essere mantenute in purezza e moltiplicate in campi separati. Per l'ottenimento del seme ibrido è necessario costituire un apposito campo dove 1/4 delle piante viene utilizzato come impollinante (linea inbred 1) mentre dalle restanti piante (linea inbred 2) verrà raccolto il seme ibrido. L'agricoltore non utilizza il seme raccolto dagli ibridi F₁, in quanto questo origina popolazioni fortemente variabili (A) a causa della ricombinazione genetica. Utilizzando linee apomittiche, invece, la situazione sarebbe molto più semplice. Una volta selezionati dei genotipi superiori (B), li si incrocia con linee portanti il gene per l'apomissia fissando, così, il genotipo. Da questo momento in poi, l'ibrido F₁ viene mantenuto per numerose generazioni senza necessità di creare campi isolati per il mantenimento delle linee inbred (B e D).

niche superiori e il vigore ibrido in quelle specie dove le varietà si basano sullo sfruttamento dell'eterosi. Oggi, infatti, molte varietà vengono commercializzate sotto forma di ibridi F_1 e, come noto, i semi ibridi non possono essere impiegati per la generazione successiva (F_2) dal momento che questa risulterebbe altamente variabile a causa della ricombinazione genetica. In queste specie l'apomissia potrebbe rivoluzionare la produzione del seme determinandone un notevole abbassamento dei costi di produzione. Questo vantaggio, seppur importante in quelle che già vengono commercializzate sotto forma di ibrido (ad esempio mais, pomodoro, peperone, barbabietola da zucchero) sarebbe ancor più rivoluzionario per le specie (come i cereali tipo frumento) nelle quali, oggi, la produzione di seme ibrido non è vantaggiosa (fig. 2). Sfortunatamente, l'apomissia è poco presente tra le specie coltivate ed è completamente assente in quelle utilizzate per l'alimentazione. Uniche eccezioni sembrano essere alcune specie tropicali e subtropicali da frutto come mango, mangostano, *Citrus* e diverse piante foraggere non presenti, o di importanza limitata, nella nostra agricoltura quali *Poa pratensis*, *Pennisetum squamulatum*, *Panicum maximum*, *Brachiaria* spp, *Dichantium* spp. e *Paspalum* spp. È plausibile che la limitata presenza dell'apomissia tra le specie coltivate derivi dalla lunga storia di selezione che avrebbe giocato a sfavore della trasmissione del carattere. La selezione per ottenere genotipi superiori rispetto ai parentali avrebbe sfavorito un meccanismo, come l'apomissia, che in natura tende a mantenere l'uniformità. L'elevata presenza del fenomeno apomittico in specie da frutto tropicali e in specie foraggere coltivate potrebbe esserne una conferma visto lo scarso lavoro di miglioramento genetico cui tali specie sono state sottoposte. Fortunatamente esistono specie apomittiche che, imparentate con specie di notevole interesse agrario, potrebbero essere utilizzate in programmi di miglioramento genetico volti a introdurre il carattere nelle specie di importanza agraria. A oggi, però, nessuno è riuscito a trasferire l'apomissia alle specie di interesse agrario.

È stato stimato che nel riso l'introduzione dell'apomissia porterebbe un beneficio economico di 1,8 miliardi di euro annui mentre il Boston Consulting Group ha quantificato in 2,3 miliardi di euro/anno i benefici legati all'apomissia per cassava e patata. È realistico, quindi, pensare che l'utilizzo dell'apomissia potrebbe rappresentare la rivoluzione agricola di questo millennio. Lo sviluppo della "tecnologia apomittica" renderebbe possibile anche il superamento di barriere legate alla riproduzione sessuale come l'autoincompatibilità e problemi relativi alla propagazione vegetativa (trasmissione di virus). È evidente che, considerato il valore economico dell'apomissia, è auspicabile uno sviluppo della tecnologia apomittica a opera di strutture pubbliche, no profit; ciò garantirebbe

la possibilità di renderla disponibile anche a quelle popolazioni che non potrebbero permettersi di pagare le *royalties* dovute nel caso in cui il carattere venisse brevettato da industrie private. Nonostante l'introduzione dell'apomissia garantirebbe enormi guadagni, la sua manipolazione e impiego in specie come riso sembra oggi più complicata di quanto si sia ritenuto in passato. Geni chiave espressi negli organi riproduttivi di specie a riproduzione sessuale potrebbero essere espressi in modo deregolato nei sistemi apomittici naturali; quali siano tali geni, tuttavia, è ancora quasi del tutto ignoto.

DISTRIBUZIONE, FILOGENESI ED EVOLUZIONE

Per molte specie apomittiche è stata teorizzata un'origine ibrida dovuta a una combinazione di poliploidia e ibridizzazione che avrebbe generato allopoliploidi apomittici (Ellerstrom e Zagorcheva, 1977; Carman, 1997; Carman, 2001) a causa della asincronia di eventi regolatori chiave della megasporogenesi, megagametogenesi e fecondazione. Evidentemente l'apomissia si può manifestare in specie diverse a causa del "malfunzionamento" di geni diversi così come diverse sono le tipologie di apomissia sporofitica e gametofitica; tale visione basata su *multiple routes* (Spillane et al., 2004) aumenterebbe le *chances* di una sintesi *de novo* dell'apomissia, ingegnerizzando indipendentemente ciascun elemento, per poi combinarli in un unico genotipo. Oggi, infatti, è largamente accettata la teoria secondo la quale l'apomissia si sarebbe evoluta molteplici volte a partire da ancestrali sessuali. A questo riguardo molto illuminante è un lavoro condotto da Sharbel e collaboratori (2005) in *Boechera holboellii*: analizzando la configurazione allelica di una serie di loci microsatelliti, in individui apomittici e sessuali appartenenti a diverse popolazioni nordamericane, è risultato che la somiglianza tra genotipi con opposto modo di riproduzione, all'interno della stessa popolazione, è superiore a quella tra individui di popolazioni diverse aventi medesimo modo di riproduzione. In ciascuna popolazione, in definitiva, l'apomissia si sarebbe evoluta in modo indipendente e i genotipi apomittici, delle diverse popolazioni, non sarebbero il risultato della dispersione di un ancestrale comune. Questa visione del fenomeno ben si lega alle caratteristiche di plasticità e variabilità delle sue diverse forme. Se la presenza di variabilità, all'interno di sistemi di natura fortemente agamica, sia da attribuire prevalentemente a fenomeni di mutazione o alla ricombinazione dovuta a una residua sessualità, è stato per numerosi anni motivo di discussione tra gli studiosi. Dati recentemente pubblicati su *Hieracium pilosella* indicherebbero nei "residui di sessualità" la causa prima di variabilità genomica nella specie (Houliston e Chapman,

2004). In popolazioni naturali apomittiche australiane di *Hiperycum perforatum*, lo sviluppo del solo 2% di sacchi embrionali sessuali garantisce la realizzazione di numerosi eventi di ricombinazione attraverso le generazioni successive. Proprio perché apomissia e anfimissia non si escludono vicendevolmente, la variabilità genetica esistente in un sistema prevalentemente agamico è di norma maggiore di quella prevedibile; questo aspetto potrebbe giustificare la fissazione e il successo evolutivo di un meccanismo riproduttivo che mina fortemente lo sfruttamento della variabilità da parte delle specie. Di conseguenza, analizzando i sistemi apomittici facoltativi nel loro complesso, rileviamo che gli assetti genomici di embrione ed endosperma risultano molteplici e complessi. Un esempio importante di tale variabilità è stato documentato da Matzk e collaboratori (2001) che, studiando la riproduzione in *H. perforatum*, hanno osservato 11 possibili combinazioni di embrione/endosperma. Ricerche recenti svolte in specie che hanno programmi di sviluppo apomittico differenziati (es. *Hieracium*, *Poa pratensis*, *Tripsacum*) suggeriscono che l'apomissia si basa sulla diversa espressione spaziale e/o temporale di geni che normalmente agiscono durante la riproduzione sessuale (Grimanelli et al., 2003; Tucker et al., 2003; Albertini et al., 2004; Curtis e Grossniklaus, 2007). Tuttavia, per gran parte dei geni candidati finora identificati, il coinvolgimento nel controllo dell'apomissia è in gran parte speculativo (Ozias Akins, 2006) e questo potrebbe essere dovuto alle tecniche utilizzate e al numero di genotipi impiegato. Il dibattito sul controllo genetico dell'apomissia è stato ulteriormente alimentato a seguito delle ipotesi circa il ruolo funzionale della poliploidia e dell'espressione asincrona dei genomi in specie allopoliploidi (Carman, 1997). Di conseguenza, il controllo genetico dell'apomissia è un campo largamente sconosciuto. Recentemente è stato ipotizzato anche un coinvolgimento dei fenomeni di metilazione del DNA nel controllo genetico dell'apomissia a seguito dell'evidenza di un riprogrammazione del pattern di metilazione del DNA nei gameti femminili (Hsieh et al., 2008; Gehring et al., 2009). Sulla base di queste osservazioni è stato proposto il "modello epigenetico" secondo il quale i geni che controllano l'apomissia potrebbero essere i target di cambiamenti epigenetici.

GENETICA DELL'APOMISSIA

È stato osservato che apomissia sporofotica e gametofitica sono spesso presenti in specie diverse di una stessa famiglia e questo suggerirebbe un "intreccio evolutivo" e la sovrapposizione dell'espressione di vie riproduttive modificate dovuta sia a caratteristiche dei genomi non ancora note che a fattori ambien-

tali. Un genotipo apomittico, data l'assenza di riproduzione sessuale, può essere visto come un gigantesco gruppo linkage nel quale i geni vantaggiosi non possono sfuggire all'accumulo di mutazioni sfavorevoli (fenomeno noto come *Muller's ratchet*). Seguendo una linea verticale (madre-figlia-nipote) le specie apomittiche vedono limitate le proprie opportunità di evoluzione e la fitness. In molte specie agamosperiche, come ad es. *Taraxacum*, questo è compensato da un elevatissimo livello di variabilità fenotipica (Richards, 1972). Sempre in genotipi apomittici di *Taraxacum* Mogie (1982) ha osservato un'elevata frequenza di ponti anafasici indice di un certo grado di ricombinazione somatica cosa assai poco frequente nei genotipi sessuali.

Le prime teorie sul controllo genetico dell'apomissia, sviluppate dallo studio di *P. pratensis* (Müntzing, 1940), indicavano questo come un carattere controllato da un "delicato equilibrio di geni". Con il passare del tempo, tuttavia, le teorie sono confluite verso l'ipotesi che l'apomissia fosse controllata da uno o pochi geni dominanti o codominanti strettamente associati (Asker e Jerling, 1992; Koultnow et al., 1995). Infatti, nonostante si è quasi certamente di fronte a un carattere complesso, questo viene spesso trasmesso come mendeliano, cioè a controllo monogenico. Nel caso di specie aposporiche come la *P. pratensis* tale/i gene/i permetterebbero a una cellula della nucella di formare il sacco embrionale in assenza di meiosi e di sviluppare l'embrione senza fecondazione. Una volta che lo sviluppo dell'embrione è stato indotto, la sua maturazione potrebbero essere sotto il controllo degli stessi geni che regolano la crescita degli embrioni di origine sessuale. La programmazione ex-novo dell'espressione genica, attraverso la quale cellule somatiche riacquistano la capacità embriogenetica, deve necessariamente essere guidata da geni regolatori, che sempre più attraggono le attenzioni di diversi gruppi di ricerca. Esiste disaccordo tra gli studiosi anche intorno al/i prodotto/i del gene/i regolatore/i del fenomeno: secondo alcuni, infatti, tali proteine sarebbero assenti nelle piante a riproduzione sessuale (teoria del "gain of function" o acquisizione di funzione) ma presenti nelle apomittiche (Savidan et al., 1989); secondo altri, invece, (Mogie, 1988) le proteine coinvolte nella regolazione dei due tipi di riproduzione sarebbero le medesime ma con un'alterata attività spaziale e/o temporale durante lo sviluppo (teoria del "loss of function" o perdita di funzione). Nonostante non manchino i sostenitori della prima, la seconda teoria è quella maggiormente condivisa. Mancano, inoltre, dati definitivi circa le caratteristiche peculiari delle cellule che danno inizio all'apomissia e sul rapporto che esiste tra il *pathway* sessuale e quello apomittico. Secondo alcuni studiosi (Roche et al., 1999) si tratterebbe di vie metaboliche distinte; altri, invece, sostengono che quella apomittica rappresenti un'aberra-

zione della normale riproduzione sessuale dovuta a ibridizzazione, mutazione o effetti epigenetici (Peacock, 1992; Grossniklaus et al., 2001; Albertini et al., 2010).

In particolare, Nogler (1984) sosteneva che le componenti apomittiche si fossero originate per mutazione e dimostrò che, almeno in *Panicum maximum*, l'apomeiosi viene ereditata come un carattere dominante in condizione simplex (*Aaaa*). Alle stesse conclusioni era giunto anche Savidan (1982) in *Ranunculus auricomus*. Queste teorie cozzano, però, con l'evidenza che in molte specie (*apomittiche facoltative*) sacchi embrionali aposporici e meiotici possono coesistere in uno stesso ovulo a indicare una indipendenza dell'apomissia dalla sessualità. In *Cenchrus ciliaris* sono state ipotizzate anche interazioni epistatiche: il gene A controllerebbe l'aposporia mentre il gene B, epistatico di A, sarebbe necessario per ripristinare la sessualità. In *P. pratensis* non solo è stato ipotizzato un controllo genetico distinto per apomissia e sessualità ma è stato addirittura riscontrato un certo grado di ricombinazione tra le due componenti dell'apomissia (aposporia e partenogenesi) dimostrando un loro controllo genetico distinto (Albertini et al., 2001; Matzk et al., 2005).

APOMISSIA E POLIPLOIDIA

Altro punto che è stato affrontato nel corso degli anni è la stretta relazione che intercorre tra poliploidia e apomissia. Anche se la ragione di tale associazione è tuttora ignota, sono state elaborate 3 teorie per spiegarla: i) la poliploidia sarebbe richiesta per aumentare l'espressione del carattere piuttosto che per garantirne la presenza poiché, anche se rari, sono stati riscontrati genotipi diploidi apomittici. In *Paspalum notatum*, invece, l'espressione dell'apomissia è risultata direttamente dipendente dal livello di ploidia poiché i geni che potenzialmente la controllano non sono espressi a livello diploide e, un aumento del livello di ploidia, indurrebbe l'espressione del *locus* per l'apomissia; ii) la trasmissione del carattere attraverso le generazioni potrebbe essere mediata da gameti non ridotti che velocemente porterebbero alla formazione di complessi agamici poliploidi. Già nel 1984, Nogler notò come in *Ranunculus auricomus*, l'allele dominante, che conferiva l'apomissia, poteva essere trasmesso solo attraverso gameti diploidi; gameti aploidi venivano prodotti ma originavano sempre individui sessuali. Simili osservazioni sono state fatte per *Tripsacum* e *Pennisetum* (Grimanelli et al., 1998; Jessup et al., 2003); iii) in specie dove l'espressione dell'apomissia richiede la presenza contemporanea di diversi alleli essenziali, posizionati in loci differenti non associati, i gameti

non ridotti agirebbero come un ampio gruppo di associazione (*whole-genome linkage group*) garantendo la trasmissione del carattere.

Carman (1997) ha dimostrato, in una teoria convincente, che esiste relazione tra apomissia e altri eventi inusuali legati alla riproduzione quali polisporia e poliembrionia e che l'ibridazione tra specie affini ha rappresentato un fattore chiave nell'evoluzione di diversi sistemi apomittici. Secondo l'ipotesi di Carman (Carman, 1997), l'apomissia si è originata a causa dell'espressione asincrona di set duplicati di geni coinvolti nella riproduzione sessuale in genomi ibridi poliploidi. Carman vede nell'alloploidia l'origine dell'apomissia. Questa ipotesi è stata ulteriormente perfezionata imputando il processo alla cromatina soprannumeraria (Roche et al., 2001). È possibile che la cromatina in eccesso leghi le DNA-binding protein e impedisca a esse di svolgere il loro ruolo regolativo nei confronti dei geni coinvolti nella megasporogenesi. Il livello ridotto di questi regolatori potrebbe causare l'errata espressione che porta all'apomeiosi. In tal caso, l'apomeiosi potrebbe co-segregare con la cromatina soprannumeraria anche se il gene che causa l'effetto e che è identico nei genotipi apomittici e sessuali è situato altrove nel genoma. Contrariamente all'ipotesi di Carman, le analisi molecolari condotte da Leblanc et al. (1995) dimostrerebbero un'origine autotetraploide/autotetraploide segmentale in *Tripsacum dactyloides*. Autopoliploidia (basata sull'ereditarietà tetrasomica) è stata osservata anche in *Pennisetum squamulatum* (Ozias Akins et al., 1998) e *Paspalum simplex* (Pupilli et al., 1997).

APPROCCI SPERIMENTALI PER L'INDIVIDUAZIONE DI GENI COINVOLTI NELLA REGOLAZIONE DEL FENOMENO APOMITTICO

Come visto, se da un lato molti anni di studi descrittivi sull'apomissia hanno fornito una solida documentazione sui diversi modi in cui il fenomeno si può presentare, dall'altro le conoscenze a riguardo delle sue basi genetiche e molecolari sono piuttosto scarse e, a volte, contraddittorie. Le cause di questo profondo disequilibrio possono essere collegate a 2 aspetti fondamentali: i) la maggior parte delle specie apomittiche non riveste interesse agrario e non presenta specie affini d'importanza agronomica salvo poche eccezioni (es. *Tripsacum* e mais); ii) la natura poliploide della maggior parte delle specie caratterizzate da questa forma di riproduzione ha complicato notevolmente l'avanzamento degli studi e, in particolar modo, la costruzione di mappe genetiche. Le nostre conoscenze molecolari del fenomeno apomittico aumenterebbero notevolmente nel caso in cui i geni espressi in modo specifico/

differenziale negli ovuli dei genotipi apomittici e sessuali fossero identificati. Questo obiettivo può essere raggiunto attraverso due strategie fondamentali: i) analisi del processo apomittico in specie apomittiche naturali e ii) analisi funzionale di mutanti e del profilo di espressione in specie modello che, normalmente, produce seme attraverso riproduzione sessuale. L'obiettivo della prima strategia è individuare e mappare i geni che controllano l'apomissia, con la prospettiva di trasferirli alle specie coltivate, attraverso l'ingegneria genetica (Albertini et al., 2010). Con la seconda strategia, invece, si applica la mutagenesi a specie modello come *Arabidopsis* e riso al fine di identificare quei geni che, quando mutati, risultano in fenotipi che mimano in parte il processo apomittico.

1. Identificazione di geni coinvolti nella regolazione del fenomeno apomittico in specie apomittiche

Negli ultimi anni sono stati intrapresi numerosi studi volti a identificare geni differenzialmente espressi negli stadi iniziali di sviluppo del sacco embrionale di genotipi apomittici e sessuali di *Panicum maximum* (Chen et al., 1999), *Brachiaria* spp. (Leblanc et al., 1997; Dusi, 2001; Rodrigues et al., 2003), *Pennisetum squamulatum* (Vielle-Calzada et al., 1996; Jessup et al., 2003) e *Paspalum* spp. (Pessino et al., 2001). Tutti questi studi erano basati sull'ibridazione sottrattiva e hanno permesso di isolare alcuni geni ai quali, però, non si è riusciti ad attribuire nessuna funzione. Nonostante siano risultati estremamente negativi questi studi hanno permesso di capire che l'apomissia e la riproduzione sessuale potrebbero condividere un pathway comune e che, quindi, le tecniche basate sull'esclusione dei trascritti comuni non possono che risultare fallimentari.

Tra le specie apomittiche, un risultato molto importante è stato ottenuto da Albertini e coll. (2004 e 2005) che hanno dimostrato come il programma di sviluppo dell'embriogenesi zigotica risulterebbe altamente conservato nella partenogenesi apomeiotica. Utilizzando la tecnica dei cDNA-AFLP Albertini e coll. (2004) hanno identificato 179 mRNA differenzialmente espressi tra genotipi apomittici e sessuali di *Poa pratensis*. Per cinque cloni è stata evidenziata alta similarità con un gruppo di geni che in *Arabidopsis*, *M. truncatula* e riso risultano strettamente associati e che in *P. pratensis* potrebbero essere coinvolti nell'apomissia e nell'acquisizione di competenze embriogenetiche da parte di cellule somatiche. Due geni, *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase*) e *APOSTART* sono caratterizzati e gli autori ne ipotizzano

un coinvolgimento nell'interazione cellula-cellula dal punto di vista sia del trasporto del segnale sia della stimolazione ormonale. Gli autori, inoltre, propongono che l'attivazione del gene *PpSERK* nelle cellule della nucella di genotipi apomittici rappresenterebbe l'interruttore che dà l'avvio allo sviluppo del sacco embrionale e potrebbe reindirizzare i prodotti genici a compartimenti cellulare diversi da quelli tipici. Il profilo di trasporto del segnale mediato da *SERK* può interagire con il profilo ormonale e auxinico controllato da *APO-START*. Gli autori suggeriscono anche un coinvolgimento di *APOSTART* nella meiosi e nella morte cellulare programmata.

2. Identificazione di geni coinvolti nella regolazione del fenomeno apomittico in specie sessuali

Già nel 1993 Chandhury e Peacock ipotizzarono che lo studio di geni coinvolti nella riproduzione isolati in *Arabidopsis* avrebbe potuto portare un contributo fondamentale alla comprensione della regolazione dei fenomeni apomittici. Per alcuni anni questo aspetto fu testato con un'intensa attività di ricerca ma la difficoltà di individuazione di altri geni coinvolti e lo scarso ritorno in termini di finanziamenti e pubblicazioni scientifiche portò molti dei gruppi interessati a desistere. Alcuni geni furono comunque identificati, ma a nessuno di essi i ricercatori furono in grado di assegnare un chiaro ruolo nella riproduzione apomittica. Ad esempio, tramite lo studio di mutanti di *Arabidopsis* per il modo di riproduzione, con disfunzioni meiotiche che mimavano il processo apomittico, sono stati isolati diversi geni interessanti. Tra questi si ricordano i) *SPL*, la cui attività, in *Arabidopsis*, è richiesta per la sporogenesi sia maschile che femminile (Yang et al., 1999); ii) *SERK* (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase), considerato uno dei più probabili mediatori del passaggio di una cellula somatica allo stadio embriogenetico (Hect et al., 2001), iii) *LEC1* e *LEC2* che, se sovraespressi, portano allo sviluppo di embrioni direttamente da tessuti vegetativi in assenza di stimoli esogeni di alcun tipo (Lotan et al., 1998); iv). famiglia dei geni *FIS* (Fertilization-Independent Seed, *FIS1/MEA*, *FIS2*, *FIS3/FIE*) che, mutati, permettono lo sviluppo dell'endosperma in assenza dello stimolo della fertilizzazione. Negli ultimi anni c'è stato un fervente rifiorire di questo settore grazie anche all'evoluzione delle tecniche molecolari. Due recenti lavori pubblicati su importanti riviste internazionali sembrano infatti riaprire uno spiraglio sulla possibilità di indurre l'apomissia in specie che oggi si riproducono esclusivamente per via sessuale. Alcuni anni fa un gruppo di studiosi francesi individuò un gene (*osd1*) che controlla l'ingresso nella seconda divisione meiotica in *Arr-*

bidopsis e la combinarono con una mutazione che impedisce la ricombinazione tra i cromosomi omologhi al momento dell'appaiamento (*spo11*) e con una mutazione che modifica la segregazione dei cromatidi (*rec8*). Ottennero così un genotipo in cui la meiosi è assente e completamente sostituita dalla mitosi ma che richiedeva comunque la fecondazione per formare semi vitali, cui dettero il nome di **MiMe** (*mitosis instead of meiosis*, d'Erfurth et al., 2009). Naturalmente questi semi derivanti dalla fecondazione di una cellula uovo non ridotta ($2n$) da parte di un polline ridotto (formatosi a seguito di normale meiosi e, quindi, aploide, n) mostravano un numero cromosomico anormale (triploide). C'era dunque la necessità di individuare una nuova mutazione che permettesse lo sviluppo dell'embrione in assenza di fecondazione, ma la ricerca in tale senso non aveva prodotto nessun risultato di rilievo. I ricercatori francesi acquisirono una linea dall'Università di Davis (*cenh3*, induttrice di aploidia uniparentale, Ravi e Chan, 2010) e la utilizzarono per creare la loro linea **GEM** (Genome Elimination caused by a Mix of CENH3 variants). Quando MiMe (genitore femminile) venne incrociata con GEM (genitore maschile) produsse una media di 14 semi vitali per siliqua e, di questi, ben il 34% (53 su 155 semi prodotti) era diploide (Marimuthu et al., 2011). Gli individui sviluppati da questi semi avevano un corredo cromosomico esclusivamente di origine materna e completa assenza di cromosomi paterni. Questa è stata la prima prova circa la possibilità di indurre la riproduzione asessuata per seme in piante che normalmente si riproducono per via sessuata, anche se MiMe richiede ancora la fecondazione per sviluppare il seme. Uno sfruttamento massimo del sistema di riproduzione asessuale richiederebbe, invece, che le piante siano capaci di autofecondarsi.

Recentemente, al fine di migliorare questi risultati e ottenere piante apomittiche altamente produttive, tutti i ricercatori europei che studiano il sistema riproduttivo delle piante e quelli che studiano l'apomissia si sono uniti nella COST ACTION "Harnessing plant reproduction for Crop Improvement" finanziata dalla Comunità Europea (www.hapreci.org). Alla Action si sono uniti anche gruppi di ricerca Australiani, Nord Americani, Argentini e Neozelandesi.

RIASSUNTO

I semi rappresentano un fattore chiave per la produttività delle piante coltivate. Il successo commerciale di una nuova varietà selezionata dipende dalle caratteristiche delle parti produttive, ma ancora di più dalla loro capacità di produrre semi. In agricoltura, il miglioramento per la qualità e la resa richiedono la messa a punto di nuove metodologie che possano superare i limiti delle procedure del breeding convenzionale. Fra le modificazioni

del sistema riproduttivo notevole importanza riveste l'apomissia, cioè la capacità delle piante di riprodursi in assenza di meiosi e di fecondazione. L'introduzione dell'apomissia in una specie coltivata consentirebbe la fissazione immediata dell'intero genoma delle piante migliori, ridurrebbe i tempi e i costi della selezione e farebbe aumentare enormemente i benefici economici delle colture. Consentirebbe ad esempio di fissare l'eterosi negli ibridi F1 e porterebbe a una produzione costante ed efficiente di fiori, frutti, semi. Sfortunatamente l'apomissia non esiste nella maggior parte delle specie coltivate (alcune eccezioni si trovano nel genere *Citrus*, e nel mango, dove si formano embrioni avventizi). Lo sviluppo della "tecnologia apomittica" (TA) renderebbe possibile il superamento di barriere legate alla riproduzione sessuale (ad es. autoincompatibilità) e i problemi relativi alla propagazione vegetativa (ad es. trasmissione di virus). È stato stimato, ad esempio, che l'impiego dell'apomissia renderebbe possibile la produzione di ibridi di riso fornendo un beneficio economico pari a 1,8 miliardi di euro annui. Lo sviluppo delle TA in agricoltura richiede tuttavia una migliore conoscenza dei processi riproduttivi.

ABSTRACT

Seed is the key factor of crop productivity. The commercial success of a newly selected cultivar depends not only on its vegetative attributes but also on its ability to produce seeds. Breeding for seed yield and quality requires new sophisticated technologies, such as apomixis, that will allow overcoming the conventional breeding limits. Apomixis is a naturally occurring mode of asexual reproduction in flowering plants, resulting in embryo formation without meiosis or fertilization of the egg. Seed derived progenies are genetically identical to the maternal parent. In crop species, apomixis would enable the instantaneous fixation of the complete genome of the best plants. The introduction of apomixis in crop species is one of the key desirable traits since it would allow the fixation of heterosis in F1 hybrids leading to efficient and consistent production of high-quality seeds, fruits, and vegetables. Unfortunately, apomixis does not naturally occur in major crop species (some exceptions are *Citrus*, mango and mangosteen, which have adventitious embryony). The development of Apomixis Technology (AT) is expected to have a revolutionary impact on food and agriculture production by reducing cost and breeding time, avoiding some complications of sexual reproduction (incompatibility barriers) and of vegetative propagation (viral transfer). It is estimated that AT in the production of hybrid rice alone could provide benefits exceeding €1800 million per annum. The development of AT in agriculture require a deeper knowledge of reproductive development in plants.

BIBLIOGRAFIA

- ALBERTINI E., PORCEDDU A., FERRANTI F., REALE L., BARCACCIA G., FALCINELLI M. (2001): *Apospory and parthenogenesis may be uncoupled in Poa pratensis L.: cytological and genetic evidences*, «Sexual Plant Reproduction», 14, pp. 213-217.
- ALBERTINI E., MARCONI G., BARCACCIA G., RAGGI L., FALCINELLI M. (2004): *Isolation*

- of candidate genes for apomixis in Poa pratensis L.*, «Plant Molecular Biology», 56, pp. 879-894.
- ALBERTINI E., MARCONI G., REALE L., BARCACCIA G., PORCEDDU A., FERRANTI F., FALCINELLI M. (2005): *SERK and APOSTART: candidate genes for apomixis in Poa pratensis L.*, «Plant Physiology», 138, pp. 2185-2199.
- ALBERTINI E., MARCONI G., RAGGI L., VERONESI F., FALCINELLI M. (2009): *Niente sesso siamo apomittiche*, «Darwin», 29, pp. 36-43.
- ALBERTINI E., BARCACCIA G., MAZZUCATO A., SHARBEL T., FALCINELLI M. (2010): *Apomixis in the biotechnology era*, in *Plant Developmental Biology – Biotechnological Perspectives*, a cura di E.C. Pua e M. Davey, Springer, New York, pp. 405-436.
- ASKER S.E., JERLING L. (1992): *Apomixis in Plants*, CRC Press, London.
- BICKNELL R.A., KOLTUNOW A.M. (2004): *Understanding apomixis: Recent advances and remaining conundrums*, «Plant Cell», 16, pp. S228-S245.
- CARMAN J.G. (1997): *Asynchronous expression of duplicated genes in angiosperms may cause apomixis, bispority, tetraspority, and polyembryony*, «Biological Journal of the Linnean Society», 61, pp. 51-94.
- CARMAN J.G. (2001): *The gene effect: genome collisions and apomixis*, in Savidan Y., Carman J.G. & Dresselhaus T. (eds.), *Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering*, CIMMYT, IRD, European Commission DG VI, Mexico, pp. 95-110.
- CHEN L.Z., MIYAZAKI C., KOJIMA A., SAITO A., ADACHI T. (1999): *Isolation and characterization of a gene expressed during early embryo sac development in apomictic guinea grass (Panicum maximum)*, «Journal of Plant Physiology», 154, pp. 55-62.
- CURTIS M.D., GROSSNIKLAUS U. (2007): *Amphimixis and apomixis: two sides of the same coin!*, in *Apomixis: Evolution, Mechanisms and Perspectives*, a cura di E. Hörandl, U. Grossniklaus, P. Van Dijk, T.F. Sharbel, Intl Association of Plant Taxonomy Koeltz Scientific Books, Vienna (Austria), pp. 37-62.
- D'ERFURTH I., JOLIVET S., FROGER N., CATRICE O., NOVATCHKOVA M., MERCIER R. (2009): *Turning Meiosis into Mitosis*, «PLoS Biology», 7: e1000124.
- DUSI D.M.A. (2001): *Apomixis in Brachiaria decumbens*, in PhD Thesis, University of Wageningen, Wageningen, The Netherlands.
- ELLERSTRÖM S., ZAGORCHEVA L. (1977): *Sterility and apomictic embryo-sac formation in Raphanobrassica*, «Hereditas», 87, pp. 107-120.
- GEHRING M., HUH J.H., HSIEH T.F., PENTERMAN J., CHOI Y., HARADA J.J., GOLDBERG R.B., FISCHER R.L. (2006): *DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA Polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation*, «Cell», 124, pp. 495-506.
- GRIMANELLI D., LEBLANC O., ESPINOSA E., PEROTTI E., GONZALEZDE-LEAN D. AND SAVIDAN Y. (1998): *Non-Mendelian transmission of apomixis in maize-Tripsacum hybrids caused by a transmission ratio distortion*, «Heredity», 80, pp. 40-47.
- GRIMANELLI D., GARCIA M., KASZAS E., PEROTTI E., LEBLANC O. (2003): *Heterochronic expression of sexual reproductive programs during apomictic development in Tripsacum*, «Genetics», 165, pp. 1521-1531.
- GROSSNIKLAUS U., NOGLER G.A., VAN DIJK P. (2001): *How to avoid sex: the genetic control of gametophytic apomixis*, «The Plant Cell», 13, pp. 1491-1497.
- HOULISTON G.J., CHAPMAN H.M. (2004): *Reproductive strategy and population variability in the facultative apomict Hieracium pilosella (Asteraceae)*, «American Journal of Botany», 91, pp. 37-44.

- HSIEH T.F., IBARRA C.A., SILVA P., ZEMACH A., ESHED-WILLIAMS L., FISCHER R.L., ZILBERMAN D. (2009): *Genome-wide demethylation of Arabidopsis endosperm*, «Science», 324, pp. 1451-1454.
- JESSUP R.W., BURSON B.L., BUROW G., WANG Y.W., CHANG C., LI Z., PATERSON A.H., HUSSEY M.A. (2003): *Segmental allotetraploidy and allelic interactions in buffelgrass (Pennisetum ciliare (L.) Link syn. Cenchrus ciliaris L.) as revealed by genome mapping*, «Genome», 46, pp. 304-313.
- KOLTUNOW A.M., BICKNELL R.A., CHAUDHURY A.M. (1995): *Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization*, «Plant Physiology», 108, pp. 1345-1352.
- KOLTUNOW A.M., GROSSNIKLAUS U. (2003): *Apomixis: a developmental perspective*, «Annual Review in Plant Biology», 54, pp. 547-574.
- LEBLANC O., GRIMANELLI D., GONZÁLEZ-DE-LEÓN D., SAVIDAN Y. (1995): *Detection of the apomictic mode of reproduction in maize-Tripsacum hybrids using maize RFLP markers*, «Theoretical and Applied Genetics», 90, pp. 1198-1203.
- LEBLANC O., ARMSTEAD I., PESSINO S., ORTIZ J.P., EVANS C., DOVALLE C. HAYWARD M.D. (1997): *Non-radioactive mRNA fingerprinting to visualise gene expression in mature ovaries of Brachiaria hybrids derived from B-brizantha, an apomictic tropical forage*, «Plant Science», 126, pp. 49-58.
- MARIMUTHU M.P.A., JOLIVET S., RAVI M., PEREIRA L., DAVDA J.N., CROMER L., WANG L., NOGUÉ F., CHAN S.W.L., SIDDIQI I., MERCIER R. (2011): *Synthetic Clonal Reproduction Through Seeds*, «Science», 331, p. 876.
- MATZK F., MEISTER A., BRUTOVSKÁ R., SCHUBERT I. (2001): *Reconstruction of reproductive diversity in Hypericum perforatum L. opens novel strategies to manage apomixis*, «Plant Journal», 26, pp. 275-282.
- MATZK F., PRODANOVIC S., BÄUMLEIN H., SCHUBERT I. (2005): *The inheritance of apomixis in Poa pratensis confirms a five locus model with differences in gene expressivity and penetrance*, «Plant Cell», 17, pp. 13-24.
- MOGIE M. (1982): *The status of Taraxacum agamospecies*, Doctor's Thesis, University of Newcastle.
- MOGIE M. (1988): *A model for the evolution and control of generative apomixis*, «Biological Journal of the Linnean Society», 35, pp. 127-153.
- MULLER H.J. (1964): *The Relation of Recombination to Mutational Advance*, «Mutation Research», 106, pp. 2-9.
- MÜNTZING A. (1940): *Further studies on apomixis and sexuality in Poa*, «Hereditas», 26, pp. 115-190.
- NOGLER G.A. (1984): *Gametophytic apomixis*. in: *Embryology of Angiosperms*, a cura di B.M. Johri, Springer-Verlag, New York, pp. 475-518.
- OZIAS-AKINS P., ROCHE D., HANNA W.W. (1998): *Tight clustering and hemizygosity of apomixis-linked molecular markers in Pennisetum squamulatum implies genetic control of apospory by a divergent locus that may have no allelic form in sexual genotypes*, «Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.», 95, pp. 5127-5132.
- OZIAS-AKINS P. (2006): *Apomixis: Developmental Characteristics and Genetics*, «Critical Review in Plant Science», 25, pp. 199-214.
- PEACOCK J.W. (1992): *Genetic engineering and mutagenesis for apomixis in rice*, in *Proceedings of the International Workshop on Apomixis in Rice*, a cura di K.J. Wilson, The Rockefeller Foundation, New York, pp. 11-21.

- PESSINO S.C., ESPINOZA F., MARTINEZ E.J., ORTIZ J.P.A., VALLE E.M., QUARIN C.L. (2001): *Isolation of cDNA clones differentially expressed in flowers of apomictic and sexual Paspalum notatum*, «Hereditas», 134, pp. 35-42.
- PUPILLI F., CACERES M.E., QUARIN C.L., ARCIONI S. (1997): *Segregation analysis of RFLP markers reveals a tetrasomic inheritance in apomictic Paspalum simplex*, «Genome», 40, pp. 822-828.
- RAVI M., CHAN S.W. (2010): *Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination*, «Nature», 464, pp. 615-619.
- RICHARDS A.J. (1972): *The karyology of some Taraxacum species from alpine regions of Europe*, «Botanical Journal of Linnean Society», 64, pp. 47-59.
- ROCHE D., CONG P., CHEN Z., HANNA W.W., GUSTINE D.L., SHERWOOD R.T., OZIAS-AKINS P. (1999): *An apospory-specific genomic region is conserved between Buffelgrass (Cenchrus ciliaris L.) and Pennisetum squamulatum Fresen.*, «Plant Journal», 19, pp. 203-208.
- ROCHE D., HANNA W.W., OZIAS-AKINS P. (2001): *Is supernumerary chromatin involved in gametophytic apomixis of polyploid plants?*, «Sexual Plant Reproduction», 13, pp. 343-349.
- RODRIGUES J.C.M., CABRAL G.B., DUSI D.M.A., DE MELLO L.V., RIGDEN D.J. CARNEIRO V.T.C. (2003): *Identification of differentially expressed cDNA sequences in ovaries of sexual and apomictic plants of Brachiaria brizantha*, «Plant Molecular Biology», 53, pp. 745-757.
- SAVIDAN Y.H. (1982): *Nature et hérédité de l'apomixie chez Panicum maximum Jacq.*, Tra-vaux et Documents. OSTROM 153, pp. 1-159.
- SAVIDAN Y.H., JANK L., COSTA J.C.G., VALLE C.B. (1989): *Primary Title: Breeding Panicum maximum in Brazil. 1. Genetic resources, modes of reproduction and breeding procedures*, «Euphytica», 41, pp. 107-112.
- SHARBEL T.F., MITCHELL-OLDS T., DOBEŠ C., KANTAMA L., DE JONG J.H. (2005): *Biogeographic distribution of polyploidy and B chromosomes in the apomictic Boechera holboellii complex*, in *Plant Cytogenetics*, a cura di M. Puertas, T. Naranjo, «Cytogenetic and Genome Research», 109, pp. 283-292.
- SPILLANE C., CURTIS M.D., GROSSNIKLAUS U. (2004): *Apomixis technology development: virgin births in farmers' fields?*, «Nature Biotechnology», 22, pp. 687-691.
- TUCKER M.R., ARAUJO A.C.G., PAECH N.A., HECHT V., SCHMIDT E.D.L., ROSSELL J.B., DE VRIES S.C., KOLTUNOW A.M.G. (2003): *Sexual and apomictic reproduction in Hieracium subgenus Pilosella are closely interrelated developmental pathways*, «Plant Cell» 15, pp. 1524-1537.
- VIELLE CALZADA J.P., NUCCIO M.L., BUDIMAN M.A., THOMAS T.L., BURSON B.L., HUSSEY M.A. WING R.A. (1996): *Comparative gene expression in sexual and apomictic ovaries of Pennisetum ciliare (L) Link.*, «Plant Molecular Biology», 32, pp. 1085-1092.

