

## Maschiosterilità ed eterosi nelle varietà ibride: dall'ipotesi genetica di Jones all'era genomica

### INTRODUZIONE

L'eterosi, a distanza di un secolo dalla sua scoperta, rappresenta ancora oggi il fenomeno biologico più straordinario esistente in natura che può essere sfruttato nel miglioramento genetico delle varietà coltivate attraverso la costituzione di ibridi. Il termine eterosi [*heterosis*] indica l'esplosione di vigore che si osserva nelle progenie di particolari incroci tra linee pure o inbred, e che si manifesta come superiorità del valore fenotipico dei genotipi ibridi rispetto a quello dei loro genotipi omozigoti parentali (fig. 1).

Il fenomeno, descritto anche come vigore ibrido ed evidente soprattutto nelle specie prevalentemente allogame, può essere considerato l'opposto del deterioramento di vigore che accompagna l'autofecondazione o la fecondazione incrociata tra individui imparentati (depressione da *inbreeding*). In generale, l'eterosi si manifesta non solo come maggiore vigore vegetativo e riproduttivo – lussureggiamento – dell'ibrido rispetto alle linee parentali ma anche come maggiore velocità di sviluppo, quantità di biomassa, qualità del prodotto, resistenza ad agenti biotici e a stress abiotici, robustezza della pianta o qualsiasi altra caratteristica agronomicamente utile. Il grado di eterosi è funzione della diversità genotipica delle linee impiegate nell'incrocio. Per i caratteri quantitativi, l'eterosi (H) è misurata come differenza tra la media della progenie  $F_1$  e la media delle due linee parentali (P):

$$H = \bar{F}_1 - \bar{P}$$

\* Laboratorio di Genetica e Genomica delle Piante, DAFNAE – Università di Padova

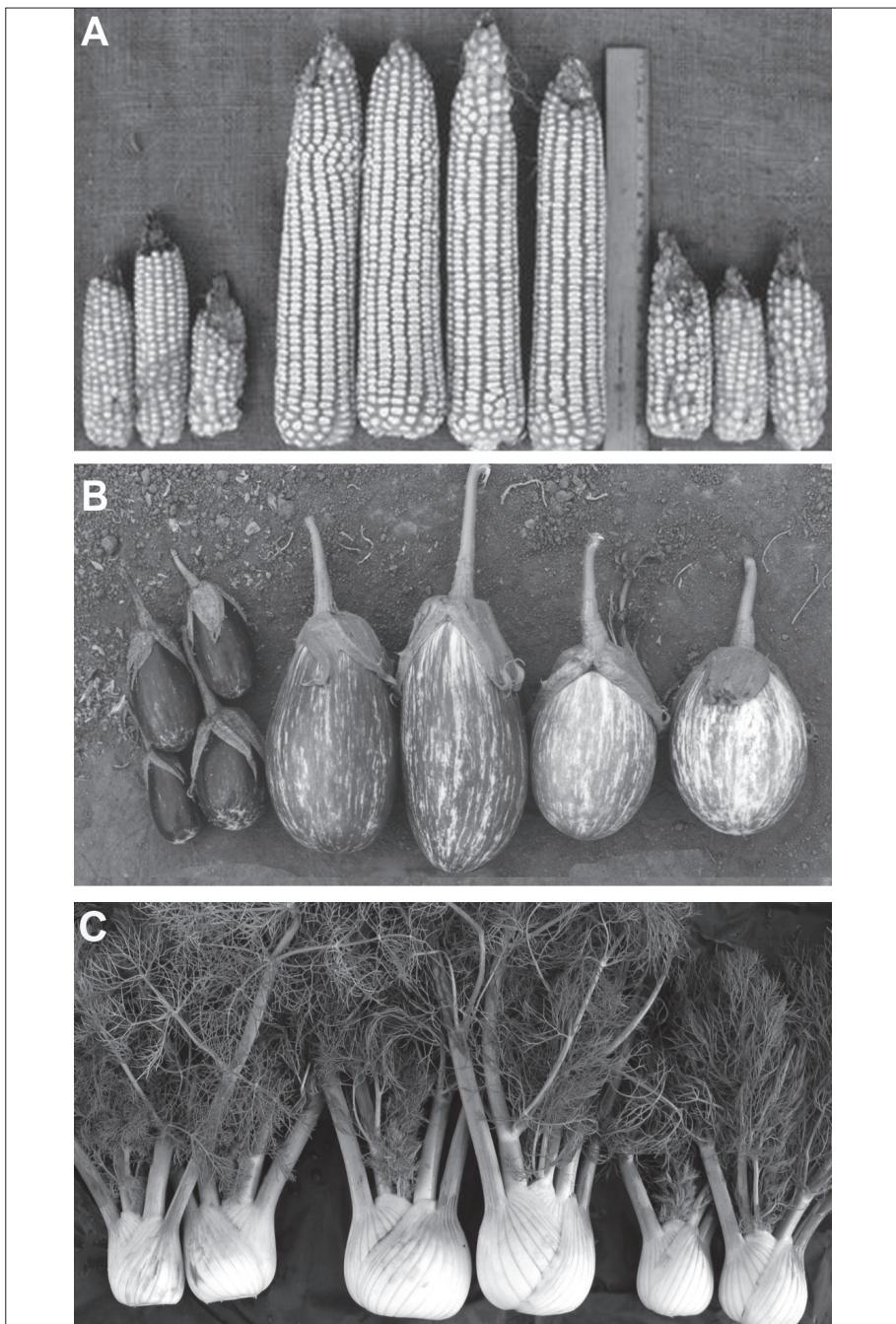


Fig. 1 *Manifestazione fenotipica del vigore eterotico di ibridi  $F_1$  di mais (A), melanzana (B) e finocchio (C) rispetto alle linee omozigoti parentali*

Il grado di eterosi varia in relazione alla specie e al suo sistema riproduttivo. Ad esempio, l'eterosi per la produzione di seme è mediamente pari al 120-130% in mais, 30-50% in colza, 36-55% in riso e circa 9% in frumento.

L'eterosi viene sfruttata in molte specie con la costituzione e la coltivazione di varietà ibride. Le ragioni che spingono a intraprendere programmi di costituzione di varietà ibride e che fanno della costituzione di varietà ibride la scelta strategica più appropriata sono molteplici: i) la produttività delle varietà ibride è maggiore rispetto a quella degli altri tipi possibili di varietà (ad esempio, sintetiche); ii) la produzione di seme ibrido  $F_1$  dà la possibilità di accumulare a livello genomico diverse caratteristiche agronomicamente vantaggiose utilizzando un unico genotipo; iii) l'uniformità genetica degli ibridi  $F_1$  e la segretezza che può essere riservata alle linee parentali facilita la tutela dei diritti del costitutore, stimolando così il coinvolgimento del settore privato in programmi di miglioramento genetico che sono spesso lunghi e molto costosi; iv) la costituzione di varietà ibride non è in contrapposizione con la necessità di preservare le risorse genetiche di specie di interesse agro-alimentare poiché la ricerca di linee inbred con alta attitudine alla combinazione specifica richiede l'esplorazione di ampie collezioni di germoplasma, forzandone il mantenimento.

Lo sfruttamento dell'eterosi in agricoltura è stato uno dei più grandi successi del miglioramento genetico vegetale: specie importanti come mais, pomodoro, girasole, sorgo e barbabietola sono attualmente coltivate nei Paesi occidentali quasi esclusivamente come varietà ibride. Le varietà ibride di riso stanno diffondendosi rapidamente in molti Paesi asiatici, soprattutto Cina. Anche molte altre specie di notevole importanza economica per l'Europa (ad esempio, segale, peperone, spinacio, carota, ecc.) sono coltivate come varietà ibride. Benché le varietà ibride siano ampiamente diffuse in agricoltura, l'eterosi che esse manifestano e che i miglioratori sfruttano da oltre mezzo secolo è un fenomeno non ancora chiaro sia in termini genetici che molecolari.

#### MASCHIOSTERILITÀ: SCOPERTA DI MUTANTI MASCHIOSTERILI E IL LORO IMPIEGO PER LA COSTITUZIONE DI VARIETÀ IBRIDE FI

La scoperta di barriere riproduttive sotto controllo genetico ha aperto la via alla costituzione di varietà ibride nelle specie di interesse agro-alimentare. Inoltre, le strutture fiorali hanno effetti fortemente influenzati da sistemi genetici che possono favorire o limitare un particolare tipo di fecondazione. Oltre al dioicismo, tra i meccanismi genetici più efficaci nel favorire o richiedere

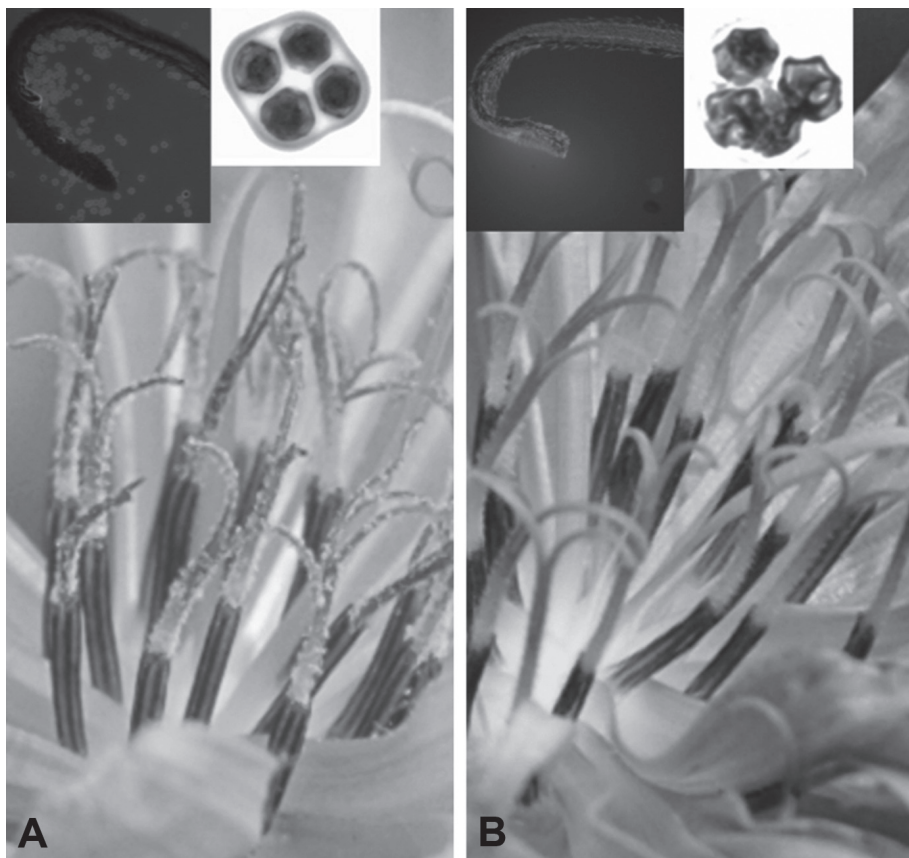


Fig. 2 Fiore di una pianta «wild-type» (A) e di un mutante «ms» (B) di radichio, con dettagli che evidenziano la presenza oppure assenza di granuli pollinici e la morfologia di una tetrade di microspore normali e non vitali

l'incrocio sono quelli che determinano la maschiosterilità e l'incompatibilità. Questi meccanismi si sono rivelati molto importanti per la costituzione di varietà ibride in molte specie ai fini dello sfruttamento dell'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 impollinazione è legata a ostacoli fisiologici e morfologici che si oppongono alla fecondazione – unione dei gameti. Tuttavia, ciò che più di ogni altra cosa ha richiamato l'interesse degli operatori attivi nel miglioramento genetico delle specie vegetali è stata la maschiosterilità. La maschiosterilità consiste nella produzione di gameti maschili non funzionali e nella mancata produzione di gameti maschili e può essere controllata da geni nucleari, mitocondriali o da entrambi

i tipi. Nelle popolazioni naturali la maschiosterilità, a differenza dell'incompatibilità, non è un meccanismo comune tra le specie vegetali. La maschiosterilità, scoperta da F.V. Owen in barbabietola (*Beta vulgaris*) nel 1942, ha reso possibile la produzione commerciale del seme ibrido in molte specie (ad esempio, sorgo, girasole, pomodoro e barbabietola). Il radicchio rappresenta una delle ultime specie tra quelle di interesse agro-alimentare in cui sono stati identificati mutanti maschiosterili (fig. 2).

La maschiosterilità genetica è determinata da un singolo gene nucleare allo stato recessivo (*ms*): le piante maschiosterili hanno un genotipo *msms* e possono essere mantenute soltanto attraverso l'incrocio con piante maschioferti eterozigoti (*Msms*). Geni mitocondriali determinano la maschiosterilità citoplasmatica contraddistinta dalla trasmissione per via materna. In questo caso, le piante maschiosterili possiedono un particolare citoplasma sterile (*S*) e possono produrre seme solo se impollinate da piante con citoplasma normale (*N*). L'interazione dei fattori citoplasmatici e nucleari determina infine la maschiosterilità genetico-citoplasmatica: le piante con citoplasma *S* non sono necessariamente maschiosterili poiché la presenza di geni ristoratori (*Rf*) con sede cromosomica può ripristinare del tutto o in parte la fertilità maschile. Indipendentemente dalla natura del citoplasma (*S* o *N*), le piante che presentano geni ristoratori in singola o doppia dose risultano maschioferti.

Nella costituzione degli ibridi è fondamentale il controllo dell'impollinazione che si può realizzare con l'emasculazione manuale, meccanica, chimica oppure genetica. Nelle diverse specie compaiono saltuariamente dei mutanti maschiosterili che possono produrre seme solo se impollinate da individui maschioferti in grado di promuovere la fecondazione. La comprensione delle basi genetiche di questo fenomeno ha permesso di evitare l'emasculazione manuale delle piante portaseme nella produzione del seme ibrido con conseguente notevole riduzione dei costi. La maschiosterilità è da ritenersi quindi utile, anche se non necessaria, ai fini della produzione di seme ibrido di specie aventi strutture fiorali tali da rendere relativamente facile l'emasculazione manuale o meccanica (ad esempio, pomodoro e peperone). Le specie che presentano fiori con antere e stigmi più o meno intimamente associati o tali da rendere impossibile l'emasculazione meccanica e laboriosa quella manuale (ad esempio, girasole e sorgo) debbono, invece, assolutamente beneficiare della maschiosterilità affinché la produzione del seme ibrido sia economicamente possibile.

La maschiosterilità genetico-citoplasmatica è quella che meglio si presta alla costituzione delle varietà ibride in quelle specie dove il seme è il prodotto principale, come sorgo e girasole. Le linee inbred vengono rese maschiosterili



con un apposito programma di reincrocio nel quale il genitore donatore ha citoplasma che determina maschiosterilità ( $S$ ) ed è omozigote recessivo per il gene nucleare ristoratore ( $rfrf$ ), mentre il genitore ricorrente è rappresentato dalla buona linea inbred maschiofertile ( $N-rfrf$ ). Dopo alcune generazioni di reincrocio gran parte del genotipo della linea inbred sarà stato recuperato e il prodotto maschiosterile del reincrocio ( $S-rfrf$ ) rappresenterà il portaseme dell'ibrido a due vie: questa linea verrà mantenuta e moltiplicata incrociandola con la linea sorella maschiofertile ( $N-rfrf$ ) usata come impollinante. Per l'ottenimento dell'ibrido semplice si effettua un incrocio in cui il genitore maschile può avere citoplasma sia di tipo  $N$  che  $S$  in quanto nell'ibrido il citoplasma è fornito esclusivamente dalla linea femminile. Nel campo di produzione del seme è sufficiente che metà delle piante produca polline per assicurare la completa fecondazione delle piante portaseme. Nella catena di produzione del seme di un mais ibrido a due vie mediante la maschiosterilità genetico-citoplasmatica si dovranno quindi allestire tre campi geneticamente isolati: uno per mantenere e moltiplicare la linea inbred portaseme ( $S-rfrf \times N-rfrf$ ), uno per mantenere e moltiplicare la linea impollinante ( $S-Rf$  o  $N-Rf$ ) e uno per la produzione dell'ibrido semplice ( $S-rfrf \times S-RfRf$ ).

In alcune specie per le quali non si dispone di maschiosterilità genetico-citoplasmatica si può far ricorso alla maschiosterilità genetica. L'impiego della maschiosterilità genetica per la produzione di seme ibrido prevede l'adozione dello schema classico. Il seme che verrà raccolto sul portaseme sarà eterozigote ( $Msms$ ) e darà origine a piante tutte maschiofertili se l'impollinante è omozigote dominante ( $MsMs$ ). Qualora l'impollinante sia, invece, eterozigote, il seme che verrà raccolto sul portaseme darà origine a una progenie composta per metà da piante maschiosterili ( $msms$ ) e per l'altra metà da piante maschiofertili ( $Msms$ ). La maschiosterilità genetica si può conservare soltanto se la specie si propaga vegetativamente oppure attraverso la condizione eterozigote. In pratica una linea inbred maschiosterile ( $msms$ ) si può conservare incrociandola con la linea sorella maschiofertile eterozigote ( $Msms$ ), ottenendo così metà progenie maschiosterile ( $msms$ ) e metà maschiofertile eterozigote ( $Msms$ ). Nella costituzione degli ibridi le piante maschiosterili fungono, ovviamente, da portaseme e vengono alternate in file con quelle della linea maschiofertile impollinante. Nelle file portaseme la metà delle piante della linea inbred saranno maschiosterili e l'altra metà maschiofertili. Queste ultime debbono essere eliminate prima della fioritura, operazione praticamente possibile soltanto se il gene della maschiosterilità è pleiotropico o è strettamente associato a un gene che si manifesta fenotipicamente sempre prima della fioritura. Attualmente, in molte altre specie di interesse agro-alimentare,

si ricorre all'uso di uno o più marcatori molecolari strettamente associati al gene responsabile della maschiosterilità.

In alcune specie si ricorre, invece, alla maschiosterilità citoplasmatica. Anche in questo caso le piante maschiosterili usate come genitore femminile producono seme solo in presenza di un impollinante maschiofertile. Il seme ibrido prodotto darà però origine soltanto a piante maschiosterili in quanto il citoplasma dello zigote è fornito esclusivamente dalla pianta madre maschiosterile. Questo tipo di maschiosterilità è largamente utilizzato nella costituzione di varietà ibride in specie nelle quali il seme non rappresenta il prodotto principale, come ad esempio la cipolla.

#### BLOCCHI CROMOSOMICI O UNITÀ GENOMICHE DELLA TRASMISSIONE EREDITARIA

L'ipotesi formulata da Alfred H. Sturtevant e Thomas H. Morgan agli inizi del secolo scorso, secondo cui i crossing-over avvengono in siti casuali lungo i cromosomi, attualmente viene considerata valida solo parzialmente. Infatti, sono stati acquisiti moltissimi dati, per lo più in organismi modello di funghi, piante, insetti e mammiferi, che dimostrano l'esistenza nei cromosomi di *hot spots*, cioè di siti caldi di ricombinazione corrispondenti a regioni caratterizzate da frequenze di crossing-over nettamente più alte rispetto a quelle di altre regioni.

In linea generale, la dimensione dei cromosomi riflette comunque la frequenza dei crossing-over che possono verificarsi. La relazione tra la frequenza media di ricombinazione e la distanza genetica tra loci lungo il cromosoma, così come la relazione tra la frequenza media dei chiasmi e la dimensione genetica dei cromosomi, consentono di derivare la lunghezza complessiva delle mappe genetiche. Benché queste relazioni risultino piuttosto affidabili, in un genoma esistono in realtà regioni cromosomiche più frequentemente soggette di altre all'insorgenza di crossing-over che condizionano negativamente la corrispondenza tra mappa genetica e mappa fisica. Conseguentemente, le distanze genetiche, misurate in cM (unità di ricombinazione), non sempre corrispondono con precisione alle distanze fisiche, misurate invece in Mb (milioni di paia di basi).

In molte specie, il confronto tra la mappa fisica e quella genetica ha consentito di svelare discrepanze considerevoli relativamente alle distanze reciproche tra loci nonché differenze riconducibili a geni posizionati in maniera errata. In effetti, in tutte le specie le estremità dei cromosomi – telomeri – così

come le regioni adiacenti al centromero sono di regola meno interessate da eventi di scambio rispetto ad altre regioni sparse lungo i bracci cromosomici. In una mappa genetica le regioni fisiche meno interessate dalla ricombinazione risultano compresse, mentre quelle maggiormente coinvolte da eventi di ricombinazione appaiono espanse. Comunque, anche se la relazione tra mappa fisica e mappa genetica dei cromosomi non può ritenersi uniforme, le mappe genetiche e quelle fisiche di un cromosoma sono generalmente colineari, nel senso che i loci conservano lo stesso ordine. Il recente sequenziamento di interi genomi vegetali, oltre ad *Arabidopsis* quelli di specie agro-alimentari come riso, pomodoro, vite e pesco, consentirà di acquisire informazioni di rilievo anche sulla sintenia tra mappe di specie diverse. Ciò significa che, oltre all'ordine dei geni, potrà essere analizzata anche la composizione dei geni lungo i cromosomi e nell'ambito dei genomi.

L'analisi del genoma dei lieviti e dei mammiferi, ma anche di alcune piante, come ad esempio il mais, ha evidenziato l'esistenza di particolari elementi genetici, detti *cis-* e *trans-genetic modifiers*, in grado di regolare gli eventi di ricombinazione meiotica. In aggiunta a specifiche sequenze riscontrate in fase di associazione *cis* all'interno o nelle vicinanze dei punti caldi di ricombinazione, corrispondenti a elementi di regolazione del crossing-over, sono state individuate anche sequenze polimorfiche dislocate in fase di associazione *trans* e dovute a riarrangiamenti consistenti come delezioni, inserzioni e traslocazioni oppure a cambiamenti riguardanti la struttura della cromatina. Entrambi i tipi di fattori modificatori condizionano sia il grado di ricombinazione per unità di lunghezza fisica dei cromosomi che la distribuzione dei siti di ricombinazione nei singoli cromosomi.

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

Nelle specie a riproduzione sessuale i blocchi cromosomici rappresenterebbero le unità genomiche della trasmissione ereditaria. L'attività di miglioramento genetico agirebbe pertanto non sui singoli geni quanto invece sui blocchi cromosomici, intesi come complessi di geni associati nei segmenti risultanti dal crossing-over. Secondo tale interpretazione ogni cromosoma *crossover* sarebbe costituito dalla successione di blocchi di origine materna e paterna, il cui numero dipende dagli eventi di scambio verificatisi tra omologhi durante la meiosi. Nei blocchi cromosomici si possono trovare associati



geni che controllano caratteri qualitativi e complessi di poligeni per caratteri quantitativi (QTL, *quantitative trait loci*). Il miglioramento dei caratteri complessi, controllati da molti geni, implica che con la selezione è necessario agire contemporaneamente su più blocchi cromosomici. Anche quando si è interessati all'introggressione di caratteri controllati da un singolo gene ciò che viene trasmesso è in realtà un blocco cromosomico più o meno esteso. Normalmente, di tale tratto cromosomico non si conosce la quantità di materiale genetico indesiderato che risulta associato col gene di interesse e che il miglioratore si porta necessariamente dietro (situazione nota come *linkage drag*).

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

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

In mais ( $2n=2x=20$ ), assumendo due crossing-over e quindi tre scambi tra cromosomi di una coppia di omologhi si avrebbero 30 unità di trasmissione genetica per gamete, cioè 3 blocchi per ciascuno dei 10 cromosomi del complemento aploide. In erba medica ( $2n=4x=32$ ), assumendo un crossing-over, vale a dire due scambi, per coppia di cromosomi omologhi si avrebbero 2 blocchi per ciascuno dei 16 cromosomi del complemento diploide pari a 32 unità di trasmissione genetica per gamete. La frequenza degli eventi di ricombinazione, in termini di numero di chiasmi, è stata stimata per alcune delle più importanti specie di interesse agrario (tab. 1). Bisogna comunque considerare che il numero totale dei blocchi cromosomici (variabile tra 20 e 40) è molto piccolo rispetto al numero di geni presenti nel genoma di una specie (mediamente 25-30 mila).

SPECIE	NO. DI CHIASMI (INTERVALLO)	BLOCCHI CROMOSOMICI	
		TOTALE	MEDIO
<i>Brassica oleracea</i>	10,0-18,5	29,6	3,3
<i>Hordeum vulgare</i>	13,5-15,6	22,7	3,2
<i>Lactuca sativa</i>	14,6-20,7	28,1	3,1
<i>Lycopersicon esculentum</i>	16,2-17,0	25,5	2,1
<i>Oryza sativa</i>	18,9-27,6	36,7	5,2
<i>Pisum sativum</i>	10,3-18,1	29,3	4,2
<i>Solanum tuberosum</i>	13,2-14,1	20,7	1,7
<i>Zea mays</i>	17,4-25,0	35,8	3,6

Tab. 1 Numero di chiasmi osservati a livello citologico e di scambi determinati a livello molecolare, e numero totale e medio di blocchi per ciascuno dei cromosomi del complemento aploide

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

Una importante considerazione da fare affrontando il tema delle azioni geniche è quella che un allele avente dominanza completa a volte possiede anche un effetto additivo rispetto a quello recessivo (cioè il valore fenotipico dell'allele recessivo non sempre è nullo). Inoltre, gli effetti di più alleli di loci diversi ma responsabili del controllo di uno stesso carattere quantitativo sono cumulativi a livello fenotipico. Sulla base di queste considerazioni, nel 1988 Hallauer e Miranda affermarono che l'eterosi è dovuta agli effetti cumulativi di alleli favorevoli aventi dominanza parziale o completa.

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

L'equilibrio genetico, secondo la legge di Hardy-Weinberg, si ha quando in una popolazione numerosa le frequenze relative degli alleli a un dato locus rimangono costanti nel corso delle generazioni e questo si realizza in assenza di fattori di disturbo (selezione, mutazione, migrazione) e in presenza di unioni casuali. Nelle specie diploidi, così come in quelle allopoliploidi (organismi a eredità disomica),

l'equilibrio genotipico viene raggiunto con una sola generazione di unioni casuali, vale a dire nella discendenza  $F_2$  di un ibrido oppure nella generazione  $Syn1$  di una sintetica. L'equilibrio gametico, spesso indicato anche come equilibrio delle fasi gametiche, corrisponde invece a una situazione di combinazione casuale nei gameti tra alleli di geni a loci diversi. Considerando due coppie alleliche e assumendo che le singole forme alleliche siano selettivamente neutrali, cioè non esercitano alcuna influenza sulla *fitness* degli individui che compongono la popolazione, all'equilibrio si formeranno quattro tipi di gameti con uguale frequenza (25%) e le sedici possibili combinazioni genotipiche saranno presenti ciascuna con frequenza pari a 6,25%. L'equilibrio viene pertanto raggiunto quando i gameti si formano dalla combinazione casuale degli alleli e i genotipi derivano dall'unione casuale dei gameti. In presenza di segregazione indipendente, in un diibrido  $AaBb$  i quattro tipi possibili di gameti  $AB$ ,  $Ab$ ,  $aB$  e  $ab$  si formeranno in proporzioni uguali fin dalla prima generazione, ma con i geni associati in fase *cis* ( $AB/ab$ ) nelle prime generazioni dopo l'incrocio prevarranno i gameti  $AB$  e  $ab$ , così come nel caso di geni associati in fase *trans* ( $Ab/aB$ ) prevarranno i gameti  $Ab$  e  $aB$ . Per alcune generazioni dopo l'incrocio, per effetto dell'associazione i quattro tipi di gameti possibili non si formeranno in proporzioni uguali ma prevarranno quelli parentali determinando quella situazione nota come disequilibrio di associazione. Pertanto se le due coppie alleliche sono associate, l'avvicinamento alla condizione di equilibrio è graduale. In alcuni casi può richiedere anche parecchie generazioni e, comunque, la velocità con cui viene raggiunto è funzione della frequenza di ricombinazione tra i due geni: maggiore è la distanza tra due geni lungo il cromosoma e minore è il numero di generazioni richieste per raggiungere l'equilibrio. I geni localizzati nei blocchi cromosomici sono in una situazione di disequilibrio di associazione nelle prime generazioni segreganti: l'equilibrio di associazione è raggiunto all'incirca in  $F_8$ , allo stato pratico, e in  $F_{16}$ , a quello teorico. Nelle specie autoploiploidi (organismi a eredità polisomica), come erba medica e patata, l'equilibrio genotipico viene raggiunto in maniera asintotica approssimativamente alla generazione  $F_{12}$ . L'equilibrio gametico è, invece, una situazione teorica poiché richiederebbe parecchie generazioni, molte più di quelle praticamente possibili nella maggior parte dei programmi di miglioramento genetico.

#### BASI GENETICHE DELL'ETEROSI: TEORIE DELLA DOMINANZA E DELLA SOVRADOMINANZA

Il termine “eterosi” è stato usato per la prima volta da George H. Shull nel 1916 come sinonimo di vigore ibrido, senza però fare riferimento ad alcun

meccanismo in particolare. Ancora oggi l'eterosi è considerato il fenomeno biologico più straordinario esistente in natura sfruttato da oltre mezzo secolo senza conoscerne le basi genetico-molecolari.

Le basi genetiche dell'eterosi sono state oggetto di ampia discussione fin dai tempi delle prime osservazioni sul mais. Le evidenze sperimentali disponibili a quel tempo per formulare ipotesi genetiche erano sostanzialmente due: i) l'eterosi si manifesta come vigore ibrido in conseguenza dell'unione tra individui geneticamente diversi; ii) l'ibrido  $F_1$  risultante dall'incrocio tra individui omozigoti per alleli diversi evidenzia a livello fenotipico una media superiore a quella calcolata tra le due linee parentali o uguale alla media della migliore linea parentale (dominanza parziale o completa), e in qualche caso addirittura superiore alla media della migliore linea parentale (sovradominanza).

Già allora per spiegare l'eterosi furono avanzate due teorie basate su ipotesi contrapposte. Dapprima East nel 1908 e Shull nel 1912 ritennero che germoplasma geneticamente differenziato potesse determinare uno «stimolo fisiologico allo sviluppo tanto maggiore quanto più diversi sono i gameti coinvolti nella fecondazione». Secondo questa interpretazione, nota come ipotesi o teoria della sovradominanza, l'eterosi è connessa con la quota di eterozigosi dell'individuo ibrido che determina un vantaggio rispetto a entrambi gli omozigoti. Alternativamente, l'eterosi venne considerata la conseguenza del mascheramento di alleli recessivi deleteri trasmessi da uno dei parentali da parte delle forme dominanti, sia a livello parziale che totale, trasmesse dall'altro parentale dell'incrocio. Questa interpretazione, nota come ipotesi o teoria della dominanza, è stata formulata da Bruce nel 1910, con l'affermazione che «gli effetti di geni recessivi deleteri tendono a essere annullati dalla dominanza negli eterozigoti», anche se Keeble e Pellew, sempre nel 1910, sono stati in realtà i primi a parlare esplicitamente di ipotesi della dominanza.

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

Secondo l'ipotesi originale della dominanza, l'eterosi si manifesta quando nell'ibrido, a una serie di loci, l'allele dominante favorevole trasmesso da

una linea parentale maschera quello recessivo sfavorevole trasmesso dall'altra linea parentale. Ciò significa che alcune linee potranno integrarsi molto bene producendo ibridi migliori rispetto alla media delle possibili combinazioni di incrocio, mentre altre non saranno in grado di complementarsi a causa della sovrapposizione delle loro situazioni alleliche. A sostegno di questa idea c'è l'osservazione che l'eterosi è molto evidente quando si incrociano linee provenienti da popolazioni differenziate e meno evidente quando si incrociano linee imparentate. Secondo l'ipotesi della sovradominanza, l'eterosi è invece attribuibile a particolari interazioni alleliche a singoli loci presenti nell'ibrido e non possibili nelle linee parentali.

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

La teoria della dominanza implica che i geni recessivi siano meno favorevoli di quelli dominanti determinando così effetti negativi nelle linee inbred e il loro mascheramento comporterebbe l'espressione del vigore eterotico negli ibridi. A sostegno di questo modo di vedere c'è il diverso effetto della selezione naturale e il diverso livello di eterosi che si osserva nelle specie autogame e in quelle allogame. In tutte le popolazioni sia di specie autogame che allogame, gli alleli deleteri vengono rapidamente eliminati se dominanti. Gli alleli deleteri recessivi, invece, nelle specie autogame vengono eliminati dalle popolazioni perché raggiungono la condizione omozigote, mentre nelle specie allogame vengono conservati nelle popolazioni in condizione eterozigote. Ciò spiegherebbe perché l'eterosi, nelle specie autogame, non è un fenomeno così frequente e rilevante come nelle specie allogame.

Una delle prime critiche formulate alla teoria della dominanza sosteneva che in presenza di effetti di dominanza doveva essere possibile ottenere linee omozigoti con alleli dominanti a tutti i loci responsabili dell'eterosi e pertanto tanto vigorose quanto gli ibridi. Oltre al fatto che linee inbred di questo tipo

Linea inbred 1						Linea inbred 2					
Cromosoma						Cromosoma					
I		II		III		I		II		III	
A	A	m	m	W	W	a	a	M	M	w	w
b	b	N	N	x	x	B	B	n	n	X	X
C	C	o	o	Y	Y	c	c	O	O	y	y
d	d	P	P	z	z	D	D	p	p	Z	Z

Ibrido F <sub>1</sub>					
Cromosoma					
I		II		III	
A	a	m	M	W	w
b	B	N	n	x	X
C	c	o	O	Y	y
d	D	P	p	z	Z

Fig. 3 *Modello dei fattori genetici dominanti associati in blocchi cromosomici, secondo D.F. Jones (1917). Una linea inbred avente sei loci omozigoti per alleli dominanti e altrettanti loci omozigoti per alleli recessivi associati tra loro in fase «trans» quando incrociata con un'altra linea inbred avente agli stessi loci alleli complementari produce un ibrido F<sub>1</sub> con tutti e 12 i loci considerati che presentano alleli dominanti*

non sono mai state ottenute sperimentalmente, ai sostenitori di tale critica venne anche fatto notare che nel caso di molti geni coinvolti sarebbe risultato teoricamente impossibile accumulare tutte le forme alleliche migliori in una singola linea inbred a causa dell'associazione nei cromosomi di alleli deleteri di alcuni geni con alleli superiori di altri geni. La ricombinazione necessaria per concentrare nei singoli cromosomi tutti gli alleli favorevoli avrebbe infatti richiesto una serie numerosa di crossing-over, peraltro non facili da controllare o anche semplicemente da verificare.

Un'altra critica all'ipotesi della dominanza muoveva dalla considerazione che nelle popolazioni F<sub>2</sub> la distribuzione dei genotipi in base al vigore non era distorta come invece atteso per effetto della presenza di 3 fenotipi dominanti contro 1 di recessivi.



In risposta alle obiezioni sollevate dalla comunità scientifica, nel 1917 Jones asserì che in presenza di associazione stretta tra geni le due ipotesi non sarebbero tra loro distinguibili, così come nel caso di molti geni coinvolti, anche in assenza di associazione. In altri termini, ciò che è riconducibile alla sovradominanza può in realtà essere un effetto spiegabile anche con la dominanza di geni strettamente associati. La frase «la dominanza di fattori genetici associati può spiegare l'eterosi» scritta da Jones quasi un secolo fa si può considerare ancora valida nei contenuti. Il modello di geni associati in blocchi cromosomici postulato da Jones è schematizzato in figura 3 assumendo due distinte linee inbred omozigoti per alleli diversi a dodici distinti loci di tre ipotetici cromosomi.

In questo modello, ogni cromosoma delle tre coppie di omologhi possiede due loci con alleli dominanti e altrettanti con alleli recessivi, associati in fase *trans*. Gli alleli ai loci considerati risultano tra loro complementari, nel senso che se in una linea a un dato locus si ha omozigosi per l'allele dominante, nell'altra linea allo stesso locus si ha omozigosi per l'allele recessivo. L'ibrido  $F_1$  ottenuto dall'incrocio di queste linee inbred mostra così un allele dominante in ciascuno dei loci – blocchi cromosomici – considerati per un totale di dodici loci aventi alleli dominanti. L'effetto complessivo è che nell'ibrido si hanno alleli dominanti a un numero di loci che è doppio rispetto a quello si osserva in ciascuna delle linee parentali. Pertanto, anche in presenza di dominanza semplice ai singoli loci, il risultato è che l'ibrido appare superiore a entrambi i genotipi omozigoti di partenza. Il fenomeno per il quale il valore fenotipico dell'eterozigote supera quello di entrambi gli omozigoti a causa della complementazione di alleli recessivi deleteri associati ad alleli dominanti in fase *trans* è stato indicato con il termine di pseudo-sovradominanza.

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

La semplice complementazione di alleli recessivi e dominanti non dà comunque ragione dei risultati pratici ottenuti fino a ora. Negli ultimi decenni le linee inbred sono state considerevolmente migliorate e nonostante ciò il grado di manifestazione dell'eterosi non è diminuito ma è lentamente e progressivamente aumentato. Se l'eterosi fosse effettivamente dovuta al mascheramento di alleli deleteri da parte di alleli dominanti, assumendo che nell'ar-

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

Nel complesso, le osservazioni condotte in mais sul miglioramento del vigore ibrido ottenuto nel corso degli anni suggeriscono due possibili interpretazioni genetiche: i) accumulazione nelle linee inbred di alleli favorevoli a un certo numero di loci dove risiedono geni fondamentali, non direttamente coinvolti nell'espressione dell'eterosi; ii) sostituzione nelle linee inbred degli alleli deleteri con quelli superiori ai loci che controllano direttamente processi fisiologici alla base dell'eterosi.

La contrapposizione tra la teoria della dominanza e quella della sovradominanza non è ancora risolta. Molto spesso si parla ancora oggi di sovradominanza ma molti ricercatori hanno messo in evidenza nel mais che le stime della varianza genetica attribuibile alla dominanza che superano quelle teoriche potrebbero essere dovute sia alla sovradominanza che al disequilibrio di associazione di alleli favorevoli in fase *trans* a loci localizzati in blocchi cromosomici (pseudo-sovradominanza). Il confronto tra i livelli di dominanza stimati in popolazioni  $F_2$ , in disequilibrio, con quelli stimati in popolazioni comprese tra la  $F_8$  e la  $F_{16}$ , in equilibrio, ha evidenziato che l'effetto della dominanza si riduce rapidamente nelle prime generazioni segreganti e in modo più lento, ma progressivo, avvicinandosi alla situazione di equilibrio gametico. Tali risultati avvalorano l'ipotesi della dominanza, dimostrando che l'eterosi nelle prime generazioni segreganti è verosimilmente dovuta a fattori genetici dominanti in condizione di disequilibrio di associazione.

STUDIO DELL'ETEROSI NELL'ERA GENOMICA:  
STATO DELL'ARTE A LIVELLO MOLECOLARE

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

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

Un primo contributo che la genetica moderna ha potuto fornire per la comprensione dell'eterosi riguarda lo studio dei loci che controllano i caratteri quantitativi (QTL, *quantitative trait loci*). Nuove informazioni, probabilmente determinanti per la comprensione dell'eterosi, vengono acquisite attraverso lo studio dei modelli di espressione genica, in relazione al dosaggio allelico e all'azione o all'interazione di fattori regolatori.

Fino a pochi anni fa, a causa del limitato numero di marcatori genetici disponibili, era estremamente difficile determinare i meccanismi ereditari alla base della trasmissione e della manifestazione dei caratteri quantitativi. Attualmente, la disponibilità di mappe genetiche sature di marcatori molecolari consente di identificare e localizzare con precisione le regioni cromosomiche dove risiedono i geni che determinano un carattere quantitativo. Quasi tutti i QTL descritti nelle specie vegetali in realtà non riflettono un singolo locus mendeliano ma un tratto cromosomico che verosimilmente si identifica, in tutto o in parte, con quelli che abbiamo chiamato blocchi cromosomici. Inoltre, secondo recenti acquisizioni riguardanti una serie di marcatori molecolari strettamente associati a QTL in specie diverse, una stessa regione cromosomica è in grado di controllare più caratteri quantitativi. I risultati in favore di una proprietà pleiotropica di alcuni QTL, capaci di influenzare due o più caratteri diversi e apparentemente non correlati tra loro, suggeriscono che la selezione naturale abbia portato alla creazione di regioni cromosomiche con geni strettamente associati che raramente ricombinano e che verosimilmente determinano la capacità adattativa e riproduttiva. Il dato più sorprendente è che per la maggioranza dei caratteri quantitativi studiati il numero di QTL è piuttosto basso, con un numero medio attorno a una decina di loci. Poiché

è improbabile che caratteri complessi come sono molti caratteri quantitativi possano dipendere da così pochi poligeni, si può ipotizzare che nei materiali geneticamente migliorati attualmente disponibili molti alleli favorevoli risultino fissati in tutte le linee esaminate. In questo modo l'azione degli alleli ai QTL di maggiore rilevanza agronomica sarebbe sottostimata e il vigore ibrido chiamerebbe in causa la dominanza di alleli ad altri loci, magari più direttamente coinvolti nell'espressione dell'eterosi.

I modelli genetici evocati per spiegare l'azione e l'interazione dei geni compresi nei QTL vanno dall'additività, alla dominanza e all'epistasia. Non è da escludere che tutte contribuiscano alle manifestazioni eterotiche, ma resta alla biologia molecolare chiarire quali sono i processi biochimici che stanno dietro questi termini. Molti dei loci per i caratteri quantitativi mostrano assenza di dominanza o effetti di semi-dominanza. Ciò significa che il genotipo eterozigote per uno specifico QTL manifesta un fenotipo diverso da quello dei due omozigoti e spostato verso l'uno o l'altro degli omozigoti, benché sia stato dimostrato che il più delle volte l'eterozigote possiede un valore intermedio tra i due omozigoti.

In mais, la specie allogama maggiormente studiata per la comprensione dell'eterosi, l'individuazione di una pluralità di QTL che controllano un singolo carattere resa possibile dal mappaggio effettuato con l'uso di marcatori molecolari strettamente associati a questi loci, ha evidenziato l'esistenza di azioni geniche diverse, prevalentemente intralocus dovute a dominanza sia completa che parziale, ma anche a sovradominanza e pseudo-sovradominanza. Tuttavia, l'esistenza di sovradominanza è stata molto spesso ricondotta a fenomeni di pseudo-sovradominanza, derivanti da alleli dominanti associati in fase *trans*. Infine, in un limitato numero di casi sono stati riscontrati anche effetti di epistasia attribuibili soprattutto a interazioni tra alleli di loci associati.

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

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

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

In che misura differiscono, dal punto di vista nucleotidico, le forme alleliche alternative di un gene e, soprattutto, quali sono i livelli di efficienza trascrizionale? Qual è il livello funzionale delle proteine codificate dalle possibili varianti alleliche a un dato locus? Tutti gli alleli possono essere considerati trascrizionalmente attivi e in grado di presiedere alla sintesi di proteine metabolicamente funzionali? Oppure è verosimile che alcuni alleli di specifici geni possano non venire trascritti e/o tradotti oppure che il prodotto di questi alleli non sia funzionale?

Recentemente sono state messe a punto tecniche molto precise per l'analisi quantitativa dell'espressione genica a singoli loci mediante Real-Time PCR amplificando cDNA con primer allele-specifici disegnati in corrispondenza delle regioni conservate fiancheggianti polimorfismi di tipo SNP e In/Del. I dati acquisiti per molti geni indicano che negli ibridi il livello dei loro trascritti è significativamente diverso dalla media dei livelli dei trascritti osservati nelle corrispondenti linee omozigoti parentali. Dati simili di espressione genica sono stati riscontrati anche per il livello delle proteine, dimostrando pertanto che nell'ibrido insorgono realmente cambiamenti sostanziali rispetto alle linee inbred. In mais, l'analisi dell'espressione di geni codificanti per zeina dell'endosperma ha evidenziato nella maggior parte degli ibridi un livello di espressione genica due volte superiore oppure inferiore rispetto al livello medio delle linee omozigoti parentali. Risultati analoghi sono stati ottenuti,

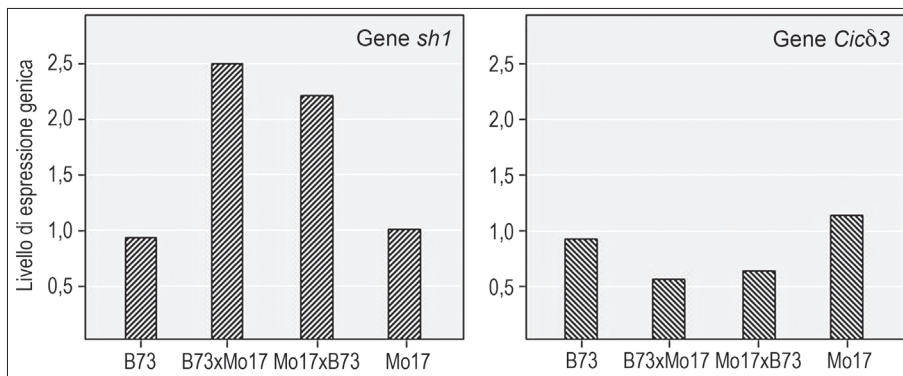


Fig. 4 Livelli di espressione dei geni saccarosio-sintasi «sh1» («Shrunken1») e ciclina  $\delta 3$  («Cyclin delta-3») di mais nelle linee inbred parentali e nei loro ibridi

sempre nell'endosperma di mais, studiando i profili di espressione di migliaia di geni. Ancora più recentemente, l'analisi condotta sull'espressione di decine di geni in ibridi di mais ha confermato che una quota consistente di questi geni non mostra livelli di trascrizione riconducibili a un modello additivo e che negli ibridi l'espressione dei geni è frequentemente repressa oppure potenziata (fig. 4).

Modelli di espressione genica non additivi sono stati confermati in mais analizzando ibridi triploidi ed effettuando confronti con quelli diploidi. In particolare, lo studio dei livelli di espressione in diversi genotipi ibridi ottenuti incrociando linee inbred di diversa origine ha evidenziato risposte quantitative per lo più indipendenti dal dosaggio genico e genomico. Anche in cotone sono stati messi in evidenza contributi ineguali dei genomi parentali negli allopoliploidi di nuova sintesi, suggerendo che quando due diversi genomi sono riuniti insieme in un ibrido i livelli di espressione dei geni non sono prevedibili sulla base dei livelli di espressione degli stessi geni nei parentali.

Vari gruppi di ricerca hanno studiato i livelli di mRNA trascritti dagli alleli di specifici geni in plantule e spighe immature di ibridi di mais in momenti diversi del loro sviluppo, in condizioni normali e di stress idrico (siccità), e in relazione a diverse densità di coltivazione. La maggior parte dei geni studiati ha mostrato differenze significative dei livelli di mRNA, variabili dall'espressione ineguale di entrambi gli alleli (espressione bialelica) all'espressione di un singolo allele (espressione monoallelica). L'origine materna o paterna non ha influenzato, o ha influenzato in misura molto modesta, il rapporto tra le quantità di trascritti degli alleli. Uno dei risultati più importanti è comunque quello emerso dal confronto tra varietà ibride costituite in epoche diverse: gli



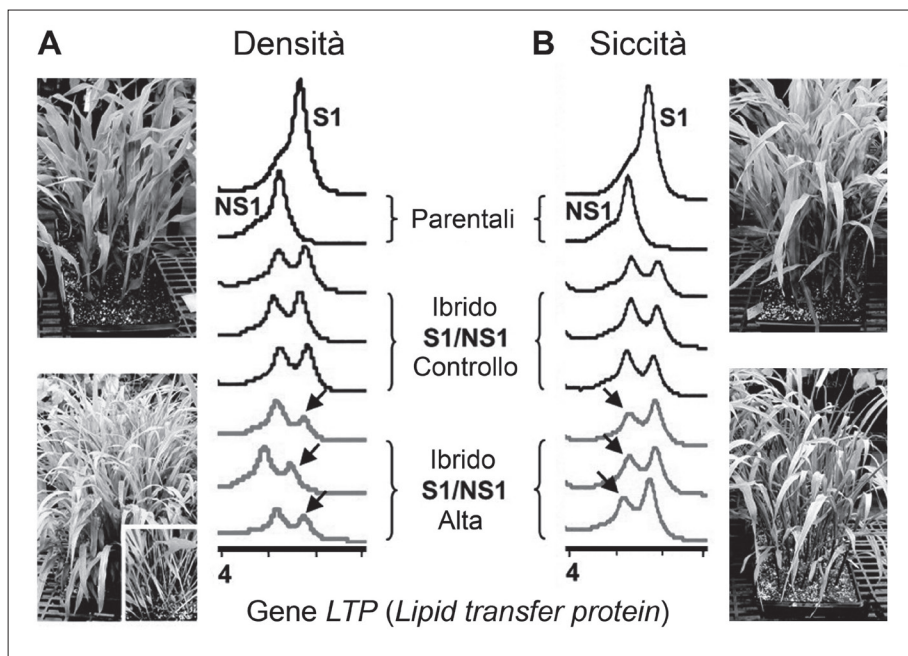


Fig. 5 Risultati ottenuti per il gene *LTP* («Lipid transfer protein») nelle linee inbred *S1* e *NS1* e nei loro ibridi: cambiamenti consistenti dei livelli di espressione negli ibridi rispetto alle linee parentali sono stati osservati sia in condizioni normali sia di stress (esempio, alta densità e siccità)

ibridi più moderni, derivanti da un'intensa attività di miglioramento genetico, hanno mostrato quasi esclusivamente una espressione di tipo biallelico mentre quelli più vecchi hanno evidenziato frequentemente una espressione di tipo monoallelico. Ancora più interessante è la risposta fatta registrare nelle diverse condizioni di stress abiotico (densità e siccità): negli ibridi i due alleli ai diversi loci studiati hanno evidenziato sempre una espressione differenziata e/o modulata (fig. 5).

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

Fino a oggi gli studi di espressione comparativa tra linee inbred e ibridi sono stati limitati a un numero ridotto di geni e a uno o pochi organi. Per la comprensione a livello genetico-molecolare dell'influenza dei livelli di espressione genica sull'eterosi appare determinante la possibilità di valu-

tare un numero di geni rappresentativo dell'intero genoma e più organi/tessuti vegetativi e riproduttivi a diversi livelli/stadi di sviluppo. La sfida sperimentale è quella di definire quali cambiamenti nell'espressione genica sono cruciali per promuovere il vantaggio dell'eterozigote. Poiché i caratteri che manifestano eterosi negli ibridi sono sotto controllo genetico complesso e solo raramente sono aumentati più di due volte in termini di valore fenotipico, cambiamenti relativamente modesti di molti geni possono giocare un ruolo importante in contrapposizione a cambiamenti consistenti di pochi geni.

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

Il confronto della struttura genomica di alcuni loci specifici in diverse linee inbred di mais ha evidenziato che le regioni intergeniche contengono tipi e combinazioni di trasposoni e retrotrasposoni diversi, e in posizioni diverse. Tale confronto ha, inoltre, evidenziato che le linee inbred sono diverse anche in termini di composizione genica: alcuni loci di una linea presentano geni non rinvenibili nelle regioni corrispondenti di un'altra linea, violando così la colinearità intraspecifica. Più recentemente, attraverso il confronto a livello genomico del contenuto genico e del polimorfismo allelico in cloni BAC delle linee inbred B73 e Mo17, è stato documentato il grado e il tipo di diversità intraspecifica esistente in mais, e riportato che le variazioni coinvolgono migliaia di sequenze soprattutto a causa di inserzioni di DNA. Inoltre, è stato dimostrato che il genoma di mais è in continua evoluzione poiché certi elementi trasponibili sono in grado di provocare variazioni a livello sia delle regioni codificanti che di quelle regolative attraverso meccanismi di duplicazione di singoli geni e di integrazione di porzioni di geni diversi. Tenendo conto di queste nuove acquisizioni, oltre a un effetto dovuto al dosaggio genico come possibile ipotesi alla base dell'eterosi, un'altra ipotesi possibile per il mais è quella che si basa sull'esistenza di regioni regolative nei trasposoni e nei retrotrasposoni in grado di fornire ampie e diverse possibilità di espressione genica modulata e/o di determinare silenziamento genico per effetto della presenza o meno di sequenze ripetute.

Un altro aspetto che è stato considerato recentemente in merito alla modulazione dell'espressione genica riguarda l'eventuale presenza negli ibridi di particolari effetti epigenetici. Tra questi la metilazione del DNA, i cambiamenti strutturali delle proteine istoniche e le variazioni del grado di impacchettamento della cromatina sono in grado di ripercuotersi profondamente sull'espressione genica.

## PROSPETTIVE E CONCLUSIONI

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

Con la nascita della genetica molecolare, che ha ormai oltre mezzo secolo di vita, le possibilità offerte alla ricerca sono immensamente cresciute specialmente dopo che questa ha superato la fase iniziale volta a mettere a fuoco il modo nuovo di affrontare i problemi e ad accumulare dati sulle relazioni fondamentali tra fattori genetici e biochimismo cellulare. Durante questo periodo il lavoro pratico per lo sfruttamento dell'eterosi ha proceduto alacramente e pur non potendo essere basato su puntuali conoscenze scientifiche ha dato i risultati prodigiosi che sono sotto gli occhi di tutti. Le prime acquisizioni di dati concernenti risultati pratici importanti e materiali innovativi messi a punto affidandosi più all'intuito dei ricercatori che non alle conoscenze scientifiche, da un lato, e le nuove acquisizioni relative all'organizzazione dei genomi e al loro funzionamento, dall'altro, hanno stimolato in tempi recenti un crescente interesse nei confronti dell'eterosi. Si sta in sostanza verificando quello che tante volte si è verificato nella storia della genetica: questa scienza si è proposta spesso di dar conto di risultati pratici e da questo lavoro ha tratto essa stessa motivi di progresso. In effetti, la pratica pone domande che non sempre trovano risposta nelle conoscenze acquisite, ma richiedono approfondimenti e verifiche di ipotesi nuove. In tema di eterosi, per lungo tempo si è dato credito all'ipotesi che gli ibridi mostrino complementazione dei differenti alleli trasmessi dai due genitori, in modo tale che i geni favorevoli di un genitore abbiano la capacità di compensare quelli sfavorevoli dell'altro genitore e viceversa. In termini di espressione genica sono state considerate due ipotesi alternative: 1) gli alleli possono operare nell'ibrido in modo completamente additivo e quindi mostrare un livello intermedio rispetto a quello dei parentali e 2) le interazioni tra i fattori regolatori dei due genitori alterano l'espressione genica ripercuotendosi sul fenotipo degli ibridi che non risulta intermedia rispetto a quella dei parentali. I risultati acquisiti supportano quest'ultima ipotesi.

Sperimentalmente le moderne tecniche di genomica e trascrittomica potrebbero rivelarsi molto utili per misurare l'espressione genica di singoli

alleli a specifici loci e quindi per verificare eventuali differenze in termini quantitativi, sia come espressione nei livelli assoluti dei prodotti genici nelle linee parentali e negli ibridi che come espressione modulata in relazione al tipo di tessuto o organo e al momento dello sviluppo. La tecnologia dei DNA *microarray* e quella di DNA *sequencing* di nuova generazione risultano infatti appropriate per determinare la capacità trascrizionale di complessi di geni o di singoli geni nelle linee inbred e la differenza assoluta esistente tra queste, nonché per prevedere la risposta eterotica negli ibridi in presenza di dominanza oppure per verificare e quantificare eventuali fenomeni di sovra-dominanza. Inoltre, per i membri di famiglie multigeniche, tali tecnologie possono anche risultare utili per analizzare la presenza di effetti di dosaggio genico a livello di espressione nelle linee inbred e nei loro rispettivi ibridi semplici o doppi.

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

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

Il percorso, non certo compiuto, riguardante i fattori regolatori e le reti regolatorie cui danno luogo, spingono a una visione olistica del fenomeno dell'eterosi che non può essere dovuto semplicemente alla somma di un numero, anche molto grande, di effetti genici, ma il prodotto finale di complesse azioni interattive (interattomica) e di specifiche reazioni metaboliche (metabolomica). Questo ragionamento vale non solo per l'eterosi, ma per ogni organismo vivente preso nella sua interezza. Ciò non toglie nulla alla possibilità di integrare il patrimonio genetico di singole specie con uno o pochi geni capaci di presiedere alla sintesi di molecole che direttamente possono migliorare la qualità dei prodotti o promuovere la capacità di resistenza o tolleranza nei confronti di specifici patogeni o stress ambientali.

## RIASSUNTO

L'eterosi, a distanza di un secolo dalla sua scoperta, rappresenta ancora oggi il fenomeno biologico più straordinario esistente in natura che può essere sfruttato nel miglioramento genetico delle varietà coltivate attraverso la costituzione di ibridi. Le azioni e le interazioni dei geni associati nei blocchi cromosomici consentono di spiegare l'eterosi dei diploidi, l'eterosi fissata negli alloploididi di specie autogame, e l'eterosi progressiva negli autopoliploidi di specie allogame. Con l'avvento dell'era genomica, si cominciano ad acquisire informazioni cruciali per la comprensione dei meccanismi genetico-molecolari alla base della manifestazione del vigore eterotico nelle piante. Per la costituzione di varietà fondate sugli ibridi  $F_1$  è fondamentale il controllo dell'impollinazione, che si può realizzare con l'emasculazione genetica della linee portaseme, resa possibile dalla scoperta della maschiosterilità.

## ABSTRACT

Heterosis, after a century from its discovery, is still today the greatest biological phenomenon existing in nature that can be exploited for breeding plant varieties through the constitution of  $F_1$  hybrids. The actions and interactions of genes linked in chromosome blocks allow to explain heterosis in diploids, fixed heterosis in allopolyploids of selfing species and progressive heterosis in autopolyploids of outcrossing species. With the advent of the genomic era, experimental data are now shedding light on the genetic factors and molecular networks that control the expression of heterosis in plants. The discovery of male-sterility was crucial because it enables to control fertilization through the selection of pure lines or inbreds to be used as seed parent in controlled crosses with genetically divergent pollinators.

## BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO E APPROFONDIMENTO

- BARCACCIA G., LORENZETTI S., FALCINELLI M. (2006): *L'eterosi nelle piante: dall'ipotesi genetica di Jones all'era genomica. Parte I: Inbreeding ed eterosi in relazione al sistema di unione. Dal Seme*, vol. 1, pp. 32-38.
- BARCACCIA G., LORENZETTI S., FALCINELLI M. (2006): *L'eterosi nelle piante: dall'ipotesi genetica di Jones all'era genomica. Parte II: Blocchi cromosomici e basi genetiche dell'eterosi. Dal Seme*, vol. 1, pp. 39-48.
- BARCACCIA G., LORENZETTI S., FALCINELLI M. (2006): *L'eterosi nelle piante: dall'ipotesi genetica di Jones all'era genomica. Parte III: Analisi dell'eterosi a livello molecolare. Dal Seme*, vol. 2, pp. 22-31.
- BARCACCIA G., FALCINELLI M. (2011): *Genetica e Genomica*, vol. 2 (seconda ed.), *Miglioramento genetico*, Liguori Editore, Napoli. pp. 314-736.
- BINGHAM E.T. (1998): *Role of chromosome blocks in heterosis and estimates of dominance and overdominance*, in *Concepts and breeding of heterosis in crop plants*, Crop Science Society of America, Madison, WI (USA), «CSSA Special Publ.», n. 25, pp. 71-87.
- BIRCHLER J.A., AUGER D.L., RIDDLE N.C. (2003): *In search of the molecular basis of heterosis*, «Plant Cell», 15 (10), pp. 2236-2239.

- BRUCE A.B. (1910): *The Mendelian theory of heredity and the augmentation of vigor*, «Science», 32, pp. 627-628.
- CROW J.F. (1948): *Alternative hypotheses of hybrid vigour*, «Genetics», 33, pp. 477-487.
- CROW J.F. (1999): *Dominance and overdominance*, in *The genetics and exploitation of heterosis in crops*, (ed. J.G. Coors, S. Pandey), American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Madison, WI (USA), pp. 49-58.
- DUVICK D.N. (1999): *Heterosis: Feeding people and protecting natural resources*, in *Genetics and exploitation of heterosis in crops* (J.G. Coors, S. Pandey ed.), American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Madison, WI, USA, pp. 19-29.
- EAST E.M. (1908): *Inbreeding in corn*, «Rep. Connecticut Agric. Exp. Stn.», 1907, pp. 419-429.
- EAST E.M. (1936): *Heterosis*, «Genetics», 21, pp. 375-397.
- GUO M., RUPE M.A., ZINSELMEIER C., HABBEN J., BOWEN B.A., SMITH O.S. (2005): *Allelic variation of gene expression in maize hybrids*, «The Plant Cell», 16, pp. 1707-1716.
- JONES D.F. (1917): *Dominance of linked factors as a means of accounting for heterosis*, «Genetics», 2, pp. 466-479.
- LAMKEY K.R., EDWARDS J.W. (1999): *Quantitative genetics of heterosis*, in *The genetics and exploitation of heterosis in crops*, (J.G. Coors, S. Pandey, ed.), American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Madison, WI, USA, pp. 31-48.
- LONNQUIST J.H. (1980): *Heterosis: additivity versus dominance*, «An. Acad. Nac. Sci. Ex. Fis. Nat.» (Buenos Aires), 32, pp. 195-202.
- MELCHINGER A.E. (1999): *Genetic diversity and heterosis*, in *The genetics and exploitation of heterosis in crops*, (J.G. Coors, S. Pandey, ed.), American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Madison, WI, USA, pp. 99-118.
- MOLL R.H., LONNQUIST J.H., FORTUNA J.V., JOHNSON E.C. (1965): *The relation of heterosis and genetic divergence in maize*, «Genetics», 52, pp. 139-144.
- SHULL G.H. (1908): *The composition of a field of maize*, «Am. Breeders Assoc. Rep.», 4, pp. 296-301.
- STUBER C.W., LINCOLN S.E., WOLFF D.W., HELENTJARIS T., LANDER E.S. (1992): *Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers*, «Genetics», 132, pp. 823-839.
- TANKSLEY S.D. (1993): *Mapping polygenes*, «Annu. Rev. Genet.», 27, pp. 205-233.
- XIAO J., LI J., YUAN L., TANKSLEY S.D. (1995): *Dominance is the major genetic basis of heterosis in rice as revealed by QTL analysis using molecular markers*, «Genetics», 140, pp. 745-754.