Atti del seminario

Gregor Mendel il mendelismo e la genetica agraria

dedicato a
Angelo Bianchi, Carlo Lorenzoni, Ercole Ottaviano e Michele Stanca

14 ottobre 2022
Castello Morando Bolognini
Sant'Angelo Lodigiano, Lodi

a cura di
Osvaldo Failla, Tommaso Maggiore e Anna Sandrucci

MUSEO DI STORIA DELL'AGRICOLTURA

FONDAZIONE MORANDO BOLOGNINI

Società agraria di Lombardia

MUSEO DI STORIA
DELL'AGRICOLTURA

FONDAZIONE MORANDO
BOLOGNINI

Società agraria
di Lombardia

Atti del seminario

14 ottobre 2022
Castello Morando Bolognini - Sant'Angelo Lodigiano

Gregor Mendel il mendelismo e la genetica agraria

nel bicentenario della nascita di Gregor Mendel

dedicato a

Angelo Bianchi, Carlo Lorenzoni, Ercole Ottaviano e Michele Stanca

a cura di
Osvaldo Failla, Tommaso Maggiore e Anna Sandrucci

CON IL PATROCINIO DI

ASSOCIAZIONE MILANESE LAUREATI IN
SCIENZE AGRARIE E IN SCIENZE FORESTALI

ORDINE
DEI DOTTORI AGRONOMI
E DEI DOTTORI FORESTALI
DI MILANO
Province di Milano, Lodi, Monza e Brianza, Pavia
Ministero della Giustizia

CON IL CONTRIBUTO DI

I CURATORI

Osvaldo Failla
Presidente del Museo di Storia dell'Agricoltura
Professore ordinario di Arboricoltura generale e Coltivazioni arboree

Tommaso Maggiore
Presidente onorario del Museo di Storia dell'Agricoltura
Professore ordinario di Agronomia generale e Coltivazioni erbacee, in pensione

Anna Sandrucci
Consigliera del Museo di Storia dell'Agricoltura
Professoressa ordinaria di Zootecnia speciale

Gennaio 2023
© Museo di Storia dell'Agricoltura
www.mulsa.it
ISBN 978-88-909735-8-1

INDICE

SALUTO DEL PRESIDENTE DEL MUSEO DI STORIA DELL'AGRICOLTURA
Osvaldo Failla _____ 5

SALUTO DEL PRESIDENTE DELLA SOCIETÀ AGRARIA DI LOMBARDIA
Flavio Barozzi _____ 7

INTRODUZIONE AL SEMINARIO
Adriano Marocco _____ 9

MENDEL, LA SUA EPOCA E LA SUA VITA
Luigi Mariani _____ 11

GLI ESPERIMENTI DI MENDEL E LA LORO ATTUALITÀ
Francesco Salamini _____ 27

IL MENDELISMO IN ITALIA: ANGELO BIANCHI E LO STUDIO DELLE MUTAZIONI
Basilio Borghi _____ 41

IL RUOLO DEI MUTANTI NELLA SCOPERTA DEGLI ELEMENTI TRASPONIBILI
Giuseppe Gavazzi _____ 51

DA STRAMPELLI A BORLAUG: MUTAGENESI ALLA CASACCIA
Luigi Rossi _____ 59

MUTANTI E MIGLIORAMENTO GENETICO
Carlo Pozzi e Tommaso Maggiore _____ 71

MUTANTI ARTIFICIALMENTE INDOTTI E SPONTANEI IN POMODORO: L'INSEGNAMENTO DI ANGELO BIANCHI
Gian Piero Soressi _____ 85

I MUTANTI DELLO SVILUPPO NELL'ORZO
Laura Rossini _____ 97

MUTANTI PER LA QUALITÀ: RISVOLTI OPPOSTI DELLA SELEZIONE UMANA APPLICATA ALLE LANDRACES DI FRUMENTO DURO
Luigi Cattivelli _____ 105

MUTAGENESI E CARATTERI MONOMENDELIANI NEL RISO
Eugenio Gentinetta _____ 111

GENETICA DI CARATTERI MONOFATTORIALI E SELEZIONE GUIDATA NEI BOVINI
Paolo Ajmone Marsan _____ 115

GENOME EDITING, TRADIZIONE E INNOVAZIONE IN AGRICOLTURA
Giulio Vicentini, Vittoria Brambilla e Fabio Fornara _____ 125

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE
Silvio Salvi _____ 135

RICORDI E TESTIMONIANZE _____ 139

ANGELO BIANCHI (1926 – 2020)
Francesco Salamini _____ 141

CARLO LORENZONI (1936 – 2020)
Adriano Marocco _____ 145

ERCOLE OTTAVIANO (1937-1991)
Mirella Sari-Gorla _____ 149

MICHELE STANCA (1942 – 2020)
Luigi Cattivelli _____ 153

SALUTO DEL PRESIDENTE DEL MUSEO DI STORIA DELL'AGRICOLTURA

Osvaldo Failla

È con vero piacere che apro il seminario che, come ormai di consueto, il nostro Museo, con la Società Agraria di Lombardia e la Fondazione Morando Bolognini, organizza in occasione della Giornata mondiale dell'alimentazione e che quest'anno celebra anche il bicentenario della nascita di Gregor Mendel (1822 – 1884).

La Giornata mondiale dell'alimentazione 2022 affronta un tema particolarmente significativo: "Non lasciare nessuno indietro". Come viene sottolineato negli obiettivi della manifestazione: "è necessario costruire un mondo sostenibile in cui tutti, in tutti i paesi del mondo, abbiano accesso regolare a quantità sufficienti di alimenti nutrienti".

La Genetica come disciplina scientifica è nata dal genio e dalla caparbietà di Gregor Mendel e le attività di miglioramento genetico delle piante agrarie e degli animali domestici, che da essa sono scaturite, hanno rivestito e rivestono tuttora un ruolo decisivo nell'imprescindibile percorso verso la sicurezza alimentare globale.

Come i relatori che si succederanno nel corso della giornata sanno, il merito dell'organizzazione del seminario va soprattutto al nostro Presidente onorario, Tommaso Maggiore, che desidero ringraziare ancora pubblicamente.

In questa occasione mi piace anche ricordare il convegno organizzato, per volontà del nostro fondatore Gaetano Forni, nel giugno del 1999 per celebrare, con un anno di anticipo per la verità, la riscoperta delle leggi di Mendel; convegno che diede origine al volume: Le piante coltivate e la loro storia (Fig. 1).

Abbiamo voluto dedicare il seminario a quattro scienziati fondatori della Genetica agraria italiana: Angelo Bianchi, Carlo Lorenzoni, Ercole Ottaviano e Michele Stanca, pubblicando anche un piccolo fascicolo che raccoglie le loro biografie scientifiche che saranno anche riprese negli atti.

Devo infine ricordare e ringraziare le aziende che ci hanno dato un fondamentale sostegno finanziario per la realizzazione della giornata. Si tratta di aziende fortemente impegnate

nel miglioramento genetico delle piante agrarie, la cui attività rende concrete le scoperte della Genetica, innescate dalle ricerche e dalle intuizioni di Gregor Mendel, dando così un contributo essenziale la sicurezza alimentare globale con l'obbiettivo di "non lasciare nessuno indietro.

Figura 1 – Copertina del volume degli atti del convegno organizzato dal Museo nel giugno 1999 per celebrare il centenario della riscoperta delle Leggi di Mendel: Failla O., Forni G. (a cura di) 2001 Le piante coltivate e la loro storia. Franco Angeli Milano, pp. 382

SALUTO DEL PRESIDENTE DELLA SOCIETÀ AGRARIA DI LOMBARDIA

Flavio Barozzi

Sono onorato nel portare il saluto della Società Agraria di Lombardia al Seminario odierno, che ad un tempo celebra la Giornata mondiale dell'Alimentazione voluta dalla FAO ed il bicentenario dalla nascita di Gregor Mendel. Il cui contributo al miglioramento della produzione agroalimentare attraverso le scoperte della genetica costituisce un elemento non solo essenziale, ma sempre attuale, moderno ed in perenne evoluzione nel processo di crescita della conoscenza al servizio della necessità di nutrire una popolazione caratterizzata da crescenti esigenze alimentari, tanto sul piano quantitativo che su quello qualitativo.

La ricorrenza del bicentenario dalla nascita dello scopritore delle leggi dell'ereditarietà (pure abbastanza misconosciuto "ab origine", come emergerà dall'attenta analisi storica tracciata dall'amico Luigi Mariani), come quella dei 70 anni dalla scoperta di Watson e Crick che ricorrerà l'anno venturo, dimostrano che la genetica e la genetica applicata all'agricoltura sono scienze relativamente "giovani", quindi con potenzialità di sviluppo enormi e per tanti versi ancora inesplorate.

Nondimeno le scoperte della genetica hanno rivoluzionato il nostro modo di operare, contribuendo in maniera decisiva al miglioramento quanti-qualitativo delle produzioni agro-zootecniche e quindi alla nostra sicurezza alimentare.

Qualche giorno fa la Società Agraria di Lombardia ha completato la ristampa anastatica di un agile manuale sulla coltivazione del prato, opera di Gaetano Cantoni risalente al 1884. Nelle sue prime pagine c'è una interessantissima tabella che riporta le superfici coltivate nei vari Paesi del mondo a fine Ottocento. In particolare in Italia la superficie coltivata nel 1881 era di 21 milioni di ettari, circa il doppio di quella coltivata attualmente. All'epoca la popolazione nazionale era di circa 40 milioni di abitanti, di cui 17 milioni analfabeti, con il 70% della forza lavoro impiegata nel primario, e con una quota annua non irrilevante di emigranti che andavano all'estero alla ricerca di fortuna ed alimentazione.

Credo che su questo dato dovremmo riflettere per comprendere quale enorme contributo la “rivoluzione verde” con la meccanica, la chimica e la genetica ha dato alla nostra crescita, al nostro benessere e per certi versi alla nostra stessa libertà. Tale richiamo alla riflessione appare particolarmente significativo oggi, in tempi difficili, caratterizzati da derive antiscientifiche e tecnofobiche, da ridicoli “complottismi”, e da quel “business della paura” denunciato recentemente da Paolo Crepet che spesso blocca il progresso nella ricerca e nell’innovazione, specie in ambito agrario. La risposta passa attraverso il coraggio nel percorrere nuove strade. In esse le potenzialità offerte dalla genetica -ed in particolare dalle tecnologie di evoluzione assistita- costituiscono per molti versi una “nuova frontiera” per aumentare la resilienza alle avversità delle piante coltivate, per ridurre l’uso dei prodotti fitosanitari, per migliorare le qualità nutrizionali degli alimenti, per ottenere quella “intensificazione sostenibile” che rappresenta l’unica strada percorribile per vincere la sfida rappresentata da una popolazione in crescita a fronte di fattori produttivi quali terra, aria ed acqua non riproducibili né incrementabili.

Il Seminario di oggi offre una panoramica ad ampio raggio su queste potenzialità. Lo fa attraverso relatori di altissimo livello, che altamente onorano la qualità della ricerca italiana, purtroppo spesso misconosciuta e bistrattata, tanto a livello comunicativo che decisionale e “politico”. A tutti loro va il ringraziamento, la riconoscenza ed il sostegno della Società Agraria di Lombardia.

Tra i relatori che oggi avrebbero potuto dare un fondamentale contributo alla discussione vorrei ricordarne uno che non è più tra noi ma che resta sempre presente “*in spiritu*” ed a cui sono personalmente profondamente legato: Antonio Michele Stanca. Nel suo commosso ricordo, unito a quelli di Angelo Bianchi, Carlo Lorenzoni ed Ercole Ottaviano, vi auguro buon lavoro e buona giornata.

INTRODUZIONE AL SEMINARIO

Adriano Marocco[1]
Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza

Sono estremamente lieto di partecipare e di dare il benvenuto a questo seminario in quanto segna il bicentenario della nascita di Gregor Mendel, la Giornata mondiale dell'alimentazione 2022 ed è dedicato al ricordo di Angelo Bianchi, Carlo Lorenzoni, Ercole Ottaviano e Michele Stanca. Si tratta di quattro personalità che hanno condiviso la passione per la genetica e che sono stati protagonisti della scienza italiana negli ultimi 50 anni. Angelo Bianchi è stato uno dei fondatori della scuola italiana di genetica agraria e attorno a lui, a partire dagli anni 60, si sono raccolte le migliori menti della genetica italiana. Le strade di Mendel e del "gruppo Bianchi" si intrecciarono nello studio dei mutanti, in particolare di mais, pomodoro e orzo. La prima parte del seminario di oggi si svolge come un percorso storico: si riconsiderano le fondamenta della genetica costruite da Mendel, si analizza lo sviluppo in Italia del metodo mendeliano, e si presenta il ruolo dei mutanti sia per la comprensione dei processi di sviluppo delle piante che nel miglioramento genetico vegetale, in particolare del mais, del frumento, dell'orzo e del pomodoro. Gli interventi dei relatori sottolineano ancora una volta che la genetica è una scienza dinamica, al centro della moderna biologia, alla base dell'agricoltura, il motore per il progresso e la sostenibilità della stessa, capace di coniugare la difesa dell'ambiente con la sicurezza alimentare.

[1] Professore ordinario di Genetica agraria

MENDEL, LA SUA EPOCA E LA SUA VITA

Luigi Mariani
Museo di Storia dell'Agricoltura e Società Agraria di Lombardia

Riassunto

Sacerdote e monaco agostiniano, Gregor Johann Mendel trascorse gran parte della sua vita nel monastero di San Tommaso a Brünn (l'odierna Brno) di cui fu Abate per 16 anni. Naturalista con una forte vocazione all'interdisciplinarietà che si traduceva nell'interesse per la botanica, l'agronomia, la matematica, la fisica, la pedagogia, la meteorologia e l'apicoltura, è universalmente noto per la scoperta delle leggi dell'ereditarietà, considerate il punto di partenza della moderna scienza della genetica. Per comprendere Mendel è certamente necessario immergersi nella realtà del mondo rurale da cui proveniva, afflitto dalla mancanza di elementari mezzi di sopravvivenza e per il quale la fede era un elemento imprescindibile per dare senso a una vita di fatica e sofferenza. Da Mendel siamo lontani non solo per la scarsità delle fonti ma anche per il nostro essere parte di società postmoderne nate dalle rovine di ideologie - nazionalismi e comunismo – che si erano fondate sul palese rifiuto dei valori che hanno ispirato il pensiero e l'azione di Mendel (fiducia nella scienza, dialogo interculturale, mitezza e benevolenza). In questo contributo cerco di offrire alcuni elementi utili per una riflessione basata sulla biografia di Mendel e sugli eventi del suo tempo.

Summary
Mendel, its period and its life

Priest and Augustinian monk, Gregor Johann Mendel spent most of his life in the monastery of St. Thomas in Brünn (today's Brno) of which he was Abbot for 16 years. Naturalist with interests in agronomy, mathematics, physics, meteorology, beekeeping and pedagogy, he is universally known for the discovery of the laws of inheritance, considered the starting point of the modern science of genetics. To understand Mendel, it is certainly needed to evaluate the reality of the rural world from which he came and for which faith was an essential element to give meaning to a life of toil and suffering. From Mendel keeps us away not only the shortage of the sources but also our being part of a post-modern societies born from the ruins of the ideologies - nationalisms and communism - which were founded on the rejection of the values (trust in science, intercultural dialogue, mildness and kindness) that inspired the Mendel's thinking and action. In this paper I try to offer some elements useful for a reflection based on Mendel's biography and the events of his time.

INTRODUZIONE

Gregor Johann Mendel (20 luglio 1822 – 6 gennaio 1884), sacerdote e monaco agostiniano, trascorse la maggior parte della sua vita nel monastero di San Tommaso in Brünn, l'odierna Brno, in Moravia, oggi regione della Repubblica Ceca. Attento naturalista con notevoli interessi per la matematica, la meteorologia e l'agronomia, è oggi universalmente noto per le attività sperimentali di ibridazione in pisello e altre specie che lo portarono a scoprire le leggi dell'ereditarietà, considerate il punto di partenza della moderna scienza della genetica, termine quest'ultimo che ai tempi di Mendel non esisteva, essendo stato coniato nel 1906 da William Bateson (1907).

La vicenda scientifica di Mendel prima e dopo la sua morte si articola in quattro passaggi chiave e cioè:

- la scoperta da parte di un ricercatore estraneo al mondo accademico, delle leggi che governano l'ereditarietà dei caratteri

- l'incapacità del mondo scientifico di comprendere il significato e la portata di tale scoperta

- la riscoperta delle leggi di Mendel da parte di Hugo De Vries, Varl Correns, William Jasper Spillman e dei fratelli Tschermak-Seysenegg, che intorno al 1900 porta finalmente alla pubblica attenzione il messaggio scientifico di Mendel (Giannini, 2002; Minelli, 2014).

- la *damnatio memoriae* a cui la figura di Mendel fu soggetta nei regimi comunisti dell'Est per il diffondersi delle teorie di origine lamarckiana di Trofim Lisenko. Ciò comportò anche la persecuzione dei genetisti mendeliani, con la vicenda esemplare di Nikolai Ivanovich Vavilov, amico personale di Bateson, incarcerato per le sue idee e morto in carcere a Saratov nel 1943 (Janick, 2015).

Una riflessione preliminare necessaria è quella che concerne le fonti su cui poter riflettere per delineare sul piano storico la figura di Mendel. A differenza infatti con quando accade con Charles Darwin, per il quale sussiste una sovrabbondanza di fonti (la sua corrispondenza consta infatti di oltre 15.000 lettere[1] nel caso di Mendel la disponibilità di fonti primarie, prodotte cioè quando Mendel era in vita o a partire da testimonianze di chi l'aveva conosciuto, è scarsa e secondo quanto riportato da van Dijk et al., 2018 (Allegato 1) si limita ad alcuni suoi articoli scientifici, diciotto lettere scritte a parenti e amici, le testimonianze di suoi allievi e di altre persone che ebbero occasione di interagire con lui e quanto riportato su quotidiani e periodici dell'epoca. La povertà delle fonti limita la capacità di ricostruzione ed espone al rischio costante di interpretazioni forzate e non realistiche.

NOTE BIOGRAFICHE

L'infanzia (1822-1833)

Mendel nacque il 20 (o forse il 22) luglio del 1822 da Anton Mendel e la moglie Rosine (nata Schwirtlich). Con il giovane Johann si giunse alla sesta generazione di Mendel nati a Heinzendorf bei Odrau (Hyncice), piccolo villaggio vicino al confine moravo-slesiano che all'epoca contava una popolazione di circa 500 abitanti e che oggi ospita la casa natale di Mendel. Johann era il secondo di tre figli sopravvissuti, con la sorella maggiore Veronika e la minore Theresia, a cui Mendel resterà sempre molto legato. Anton e Rosine ebbero altri due figli: una, nata tra Johann e Theresia, morta all'età di due anni e l'altro, nato dopo Theresia, che visse solo poche settimane.

[1] https://www.darwinproject.ac.uk/letters/darwins-life-letters

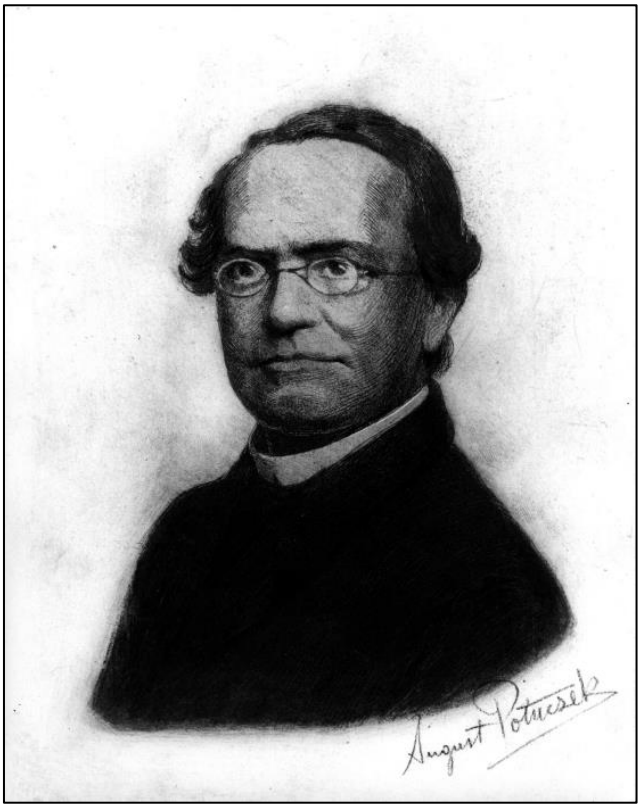


Figura 1 – Ritratto di Johann Gregor Mendel di August Potuczek (Richter, 2015).

Figura 2 - La casa natale di Mendel a Heinzendorf bei Odrau (oggi Hyncice)
(foto dello scrittore Simon Mawer - http://www.simonmawer.com/photoessay.htm)

Anton era un agricoltore di lingua tedesca che, dopo aver servito per 8 anni nell'esercito austro-ungarico, era riuscito a farsi assegnare un podere con un contratto che gli imponeva però di sottostare a una corvée di 3 giorni la settimana a vantaggio del proprietario terriero. Ci si aspettava quindi dai bambini il lavoro nella fattoria, compresa l'apicoltura

e la gestione del frutteto, attività nelle quali Johann eccelleva e che proseguirà per tutta la vita (Giannini, 2003).

Sebbene molti residenti di Heinzendorf fossero analfabeti, il villaggio aveva una scuola elementare e il maestro Thomas Makitta riconobbe il precoce talento di Johann, raccomandando ai genitori di inviarlo in collegio a Leipnik (Lipnìk nad Becvou), una cittadina a circa 20 km di distanza. Come per molte famiglie in ristrettezze finanziarie, il problema legato a una tale scelta erano i soldi della retta e i genitori di Johann fecero molti sacrifici per mantenerlo agli studi. A 11 anni Johann affrontò così un anno di studi a Leipnik, ove una nota a margine di una delle sue pagelle lo indica come "primo della classe" (Hartl, 2022).

Gli studi successivi (1834-1843)

Il passo successivo nell'educazione di Johann fu la scuola di preparazione presso il ginnasio di Troppau (Opava), a circa 30 chilometri da casa, ove fu ammesso alla fine del 1834 (Hartl, 2022). Preside a Troppau era padre Ferdinand Schaumann, monaco agostiniano formatosi al monastero a Brünn. A Troppau Mendel ottenne costantemente i voti più alti ma ciò non lo liberò dai suoi problemi finanziari, i quali peggiorarono nel 1838, allorché il padre ebbe un incidente debilitante che minò la capacità della famiglia di sostentarsi: durante il lavoro invernale di corvée infatti un grosso tronco gli rotolò addosso schiacciandogli parte del petto. E fu proprio a seguito di tale incidente che Johann Mendel si iscrisse a un corso di formazione per precettori privati, nella speranza di poter guadagnare abbastanza per sopravvivere. Vi erano però anche altri problemi: già a Troppau nel 1838, all'età di 16 anni, Mendel aveva vissuto il primo episodio di una malattia grave e non specificata che lo costrinse a ritirarsi dalla scuola e a rientrare a casa per settimane o mesi prima di poter riprendere gli studi. Peraltro episodi simili si ripeteranno più volte durante la tarda adolescenza e i primi anni in monastero.

Nonostante le difficoltà finanziarie e di salute, Mendel continuò con profitto gli studi a Troppau, tanto che venne giudicato eccellente (prima classis cum eminentia)[1] in quasi tutte le materie. Sopravvivono a questo periodo due poesie scritte con la calligrafia di Mendel e che sono state trovate tra i ricordi di Theresia. Le correzioni, le cancellazioni e le riformulazioni nel manoscritto lasciano pochi dubbi sul fatto che le poesie siano originali e autentiche. Particolarmente significativi per quanto di profetico vi si ritrova, sono i versi dedicati a Gutenberg, inventore della stampa a caratteri mobili: "...*possa il destino garantirmi l'estasi suprema della gloria terrena […] quella di veder, uscendo dalla tomba, la mia arte prospetare nella pace tra coloro che saranno dopo di me"* (Giannini, 2003).

Nella primavera del 1839, nuovamente malato per lo stress, Mendel si ritirò dalla scuola e trascorse il resto della primavera e dell'estate a casa con i genitori. Ritrovata la salute poté tornare a Troppau nell'autunno del 1839 e nel 1840, completando gli studi e ricevendo un attestato che ne riconosceva il talento.

L'anno 1841 si rivelò un punto di svolta per la famiglia Mendel (Hartl, 2022): la salute di Anton continuò infatti a peggiorare, costringendolo a vendere la fattoria, che fu acquistata dal genero, il marito di Veronika, con un contratto che prevedeva anche un piccolo stipendio a Johann per tutto il tempo in cui sarebbe stato studente e una dote per Theresia. Nello stesso anno Johann fu ammesso al 2° anno del corso di studi presso l'Istituto Filosofico di Olmutz, che era affiliato alla università Palacky, la più antica università della Moravia, fondata nel 1573 dal Gesuiti. Durante il suo primo anno di studi

1 Scrive Carlo Giuseppe Londonio nel suo testo del 1819 "*Per l'esecuzione del Piano degli studj ginnasiali giusta le recenti modificazioni superiormente prescritte*" e relativo alle scuole del Lombardo Veneto: nella classificazione del merito dovranno in avvenire ritenersi i seguenti gradi cioè Prima classis cum eminentia, Prima classis accedens ad eminentiam, Prima classis, Sec classis, Tert classis.

Mendel soffrì di un altro esaurimento nervoso debilitante che lo costrinse a ritirarsi. A quei tempi la materia che più lo interessava era la fisica e al suo rientro, l'anno successivo, trovò un nuovo insegnante, il professor Friedrich Franz, che aveva insegnato fisica per quasi 20 anni all'Istituto Filosofico a Brünn mentre viveva con i frati al monastero di San Tommaso. Lo stipendio di Mendel era insufficiente per mantenersi e pagare le sue tasse, ed è in questo fondamentale frangente che sua sorella Theresia, che all'epoca aveva solo 11 anni, rinunciò volontariamente alla sua quota del patrimonio di famiglia destinandogliela affinché potesse continuare gli studi.

Il monastero: sacerdozio, studio e insegnamento (1843-1868)

Anche quando il corso di studi di Mendel fu completato con successo, rimasero ad assillarlo i problemi economici (Hartl, 2022), come scrive in terza persona nella sua autobiografia: egli "si rese conto che era impossibile per lui sopportare ulteriori sforzi. Pertanto, dopo aver terminato gli studi filosofici, si sentì in dovere di cercare una condizione di vita che lo liberasse dall'aspra lotta per l'esistenza. Le circostanze decisero la sua scelta di vocazione". Si rivolse dunque per un consiglio al professor Franz, il quale aveva da poco ricevuto la richiesta di segnalare uno studente meritevole per il monastero di Brünn. E fu così che Franz il 14 luglio 1843 rispose indicando Johann Mendel, che durante il suo corso di 2 anni in filosofia "ha avuto, quasi invariabilmente, i rapporti più ineccepibili, ed è un giovane dal carattere molto solido. Nel mio ramo è quasi sempre il migliore. Ha una insufficiente conoscenza del ceco ma è disposto a dedicarsi al studio della lingua durante gli anni di studio teologico".

Mendel fu pertanto invitato a unirsi agli Agostiniani di Brünn e prima dell'accettazione gli fu chiesto di superare un esame fisico, cosa che fece guardandosi dall'indicare le malattie ricorrenti che lo avevano colpito, e di presentare un documento di assenso firmato da ambedue i genitori. Il 9 ottobre 1843 Johann, insieme ad altri tre novizi, fu formalmente ammesso al convento con il nome di "Gregor" (Hartl, 2022).

Posta alla confluenza dei fiumi Svitava e Svratka e capoluogo della Moravia, Brünn (Brno) era soggetta nel XIX secolo a una forte espansione demografica trainata in primis dall'industria tessile della lana. Da notare che nell'area collinare a sudest di Brünn si combatté la battaglia di Austerlitz, in cui Napoleone sconfisse l'esercito austro – russo. Inoltre la collina attorno a cui sorge Brünn ospita una fortezza, lo Spielberg, antica residenza dei Margravi di Moravia e che dal 1820 ospitò un carcere duro per delinquenti comuni e "politici", fra cui figurarono vari nostri patrioti. Fra questi ricordiamo Silvio Pellico (1789-1854) che di Brünn parla a più riprese nel suo libro "Le mie prigioni" e Giorgio Pallavicino Trivulzio (1796-1878), imparentato con i conti Bolognini[1].

Gli studi formali di Mendel al monastero di San Tommaso non ebbero inizio che un anno dopo il suo arrivo; prima di tale inizio Mendel investì probabilmente le proprie energie nel conoscere le persone e nel capire i rapporti fra monastero e città, oltre che nello studiare il ceco parlato e scritto. Il curriculum per i novizi includeva lezioni su argomenti ecclesiastici come storia della chiesa, diritto canonico, dogmatica e teologia morale. Mendel studiò anche ebraico, greco, metodi di insegnamento nella scuola elementare, rudimenti di caldeo, siriaco e arabo e partecipò inoltre alle lezioni di economia, agricoltura, pomologia e viticoltura presso l'Istituto Filosofico di Brünn (Hartl, 2022).

A quel tempo vi era carenza di parroci, per cui l'abate Napp ritenne utile imporre un'accelerazione alla carriera ecclesiastica di Mendel, che fu ordinato sacerdote il 25 dicembre 1846 (Richter, 2015) e di lì a un anno prese servizio come parroco aggiunto nella collegiata del monastero. La fase di prova non ebbe tuttavia esito positivo per cui nel 1849

1 Alcuni oggetti a lui appartenuti sono conservati nella sala dell'800 della casa Bolognini, uno dei tre musei ospitati nel Castello di Sant'Angelo Lodigiano.

l’abate Napp, che nel frattempo era divenuto direttore educativo per la Moravia e la Slesia, designò Mendel come insegnante al liceo a Znaim (Znojmo), una piccola città della Moravia a circa 65 km a sud-ovest di Brünn. Al riguardo Napp ebbe a scrivere al vescovo: “[Mendel] vive una vita molto ritirata … ed è molto diligente nello studio delle scienze mentre è assai poco adatto al lavoro di parroco, a motivo della timidezza che lo coglie quando deve visitare persone malate e sofferenti. Invero, questa sua infermità lo ha reso pericolosamente malato ed è per questo che ho ritenuto necessario sollevarlo dal servizio di parroco” (Hartl, 2022).

Mendel giunse dunque a Znaim ove insegnò matematica elementare e greco. E qui, all’età di 28 anni, lo colse il decreto del 1850 che richiedeva che tutti gli insegnanti precedentemente non certificati fossero sottoposti a un esame di abilitazione, il che interessava Mendel e altri due insegnanti presenti a Znaim. Mendel fece domanda per gli esami di storia naturale e fisica e a supporto di tale domanda redasse la propria autobiografia che a più riprese è stata citata in questo testo. L’abilitazione comportò la predisposizione di un ampio lavoro di ricerca sui due argomenti prescelti, cui seguì un viaggio a Vienna per un esame scritto su ogni argomento, seguito da un orale. Gli esiti dell’esame furono contrastanti: a un successo nella fisica si contrapposero un risultato negativo nella storia naturale e una performance mediocre nell’orale. Gli esaminatori, pur non potendo far altro che negargli l’abilitazione, rimasero colpiti dal suo zelo e gli raccomandarono di ripresentare domanda entro un anno. Il primo biografo di Mendel, Hugo Iltis, dedica un lungo capitolo a questo episodio, concludendo che un simile risultato era da dare quasi per scontato, in quanto Mendel non aveva una formazione universitaria in fisica e mancava di un preparazione sufficiente in storia naturale, materia per la quale si presentava come autodidatta, conscio del fatto che nella storia naturale, “il metodo autodidattico, come forse in nessun’altra scienza, è arduo e porta a raggiungere l’obiettivo solo lentamente”. Tornato a Brünn Mendel trascorse l’anno successivo insegnando in una scuola locale (Hartl, 2022).

Non solo le autorità scolastiche di Znaim volevano che Mendel fosse abilitato: lo stesso segretario della commissione esaminatrice, nel frattempo divenuto ministro del commercio, nel 1851 scrisse in tal senso all’abate Napp, il quale contattò il vescovo di Brünn chiedendogli il permesso di inviare Mendel all’Università di Vienna per un periodo formativo e ottenendo parere favorevole, a condizione però che Mendel «non si allontanasse dalle sue attività». E fu così che padre Gregor trascorse gli anni accademici dal 1851 al 1853 a Vienna, tornando a Brünn solo per le vacanze e recandosi inoltre a Heinzendorf nel 1852 per il matrimonio di Theresia. A Vienna, Gregor frequentò le lezioni di fisica sperimentale di Christian Andreas Doppler, e le lezioni di matematica, fisica matematica, chimica, zoologia, paleontologia, botanica sistematica, fisiologia vegetale e microscopia. Il suo professore di paleontologia lo giudicò "estremamente diligente e molto attento" e nel suo secondo anno di studi fu nominato socio della Società Zoologica e Botanica di Vienna (Hartl, 2022).

Dal suo ritorno a Brünn (estate del 1853) alla primavera del 1854 non è del tutto chiaro cosa abbia fatto Mendel ma pare abbia insegnato alla scuola elementare. Inoltre alla fine di maggio 1854 Mendel fu nominato insegnante supplente di fisica e storia naturale alla Brünn Modern School, che aveva 300 iscritti, in seguito saliti a più di 1000. Lì Mendel insegnò fino al 1867 e, un anno dopo la sua nomina, fece nuovamente domanda per essere esaminato per l’abilitazione all’insegnamento, questa volta indicando fisica come materia principale e storia naturale come seconda. Nell’occasione Mendel ricevette ottime valutazioni sui suoi scritti di ricerca e a inizio maggio 1856 si recò a Vienna, ottenendo risultati deludenti e che sono così descritti in una lettera dal confratello padre Klacel al frate Bratànek: “benché le domande fossero facili, Mendel si ammalò durante la prova scritta e di conseguenza non fu in grado di partecipare. Pare che Mendel abbia problemi

con i suoi nervi in generale, avendo già subito molti attacchi insidiosi... Siamo dispiaciuti per lui, dal momento che i suoi scritti sono stati valutati in modo molto positivo. Ma le formalità sono formalità; non è stato possibile continuare. Per paura che gli attacchi potessero proseguire, Mendel tornò a casa senza portare a termine la prova". L'esame fu poi riprogrammato per agosto dello stesso anno ma Mendel non si recò Vienna per sostenerlo (Hartl, 2022).

Mendel amava viaggiare per diletto e per le sue vacanze nel 1862 si concretizzò un'opportunità speciale (Hartl, 2022): gli imprenditori Neumeyer e Mihailovics avevano di recente fondato un'agenzia specializzata in viaggi di piacere per gruppi. Uno, in treno, riguardava il percorso da Vienna a Londra via Parigi e costava 250 fiorini austriaci, circa la metà dello stipendio annuo di Mendel, il quale acquistò un biglietto e il 30 luglio a Vienna si unì agli oltre 300 turisti, per lo più benestanti. Il gruppo trascorse sei giorni godendosi le attrazioni turistiche di Parigi e dei suoi dintorni, dove Mendel soggiornò nel Grand Deluxe Hotel, di recente aperto vicino al Louvre-Tuileries. Da lì i turisti si recarono a Londra, alloggiando nella nuova London Pavilion Music Hall vicino a Piccadilly Circus e seguendo sei giorni di visite turistiche di cui due all'International Industrial Exhibition.

Il gruppo ritornò a Vienna il 16 agosto e Mendel fu molto soddisfatto dell'esperienza, tant'è vero che l'anno successivo si iscrisse al tour in Italia organizzato dalla medesima agenzia di viaggi. A tale tour parteciparono un centinaio di viaggiatori che partirono da Vienna il 1° settembre e in treno raggiunsero Verona e Genova per poi percorrere in battello la costa fino a Pisa e raggiungere da lì Roma, dove i turisti trascorsero sei giorni, comprensivi di un'udienza di gruppo con Papa Pio IX tenutasi il 9 settembre. Da Roma i turisti proseguirono per Napoli e Pompei per poi raggiungere Firenze in treno e da lì, fra il 21 e il 24 settembre 1863, rientrare a Vienna attraverso Genova, Milano e Venezia (Hartl, 2022). Si noti peraltro che questo viaggio turistico ebbe luogo nel breve periodo di pace compreso fra la seconda (1859) e la terza guerra di indipendenza (1866).

Le esperienze di Mendel sui piselli

Dal 1856 al 1863 Mendel condusse i suoi pionieristici esperimenti sull'ereditarietà nei piselli (*Pisum sativum* L.). Tre anni e mezzo dopo l'inizio di tali esperimenti il mondo della biologia fu profondamente scosso dalla pubblicazione del libro di Darwin sull'origine delle specie, avvenuta il 24 novembre 1859. Mendel acquistò copie personali di tutti i libri di Darwin non appena si resero disponibili in edizione tedesca e li lesse assiduamente, apportando note a margine e commenti. La sua copia personale era una traduzione tedesca della seconda edizione pubblicata nel 1863, e contiene annotazioni dei passaggi ritenuti più interessanti. L'entusiasmo per il testo di Darwin mise in ombra ogni altro aspetto della biologia di quei tempi, tant'è vero che l'11 gennaio del 1865 Alexander Makowsky, relatore principale della sessione mensile della Società per lo studio delle scienze naturali[1], offrì un appassionato riassunto del testo di Darwin (Hartl, 2022). Relatore principale delle sessioni di febbraio e marzo era invece Mendel, il quale nella serata dell'8 febbraio 1865 presentò la prima parte delle sue ricerche sull'ereditarietà, in cui descrisse come i caratteri si trasmettono negli ibridi (Giannini, 2003). Alla conferenza era presente una quarantina di persone, per lo più frequentatori abituali delle conferenze della Società. Fra di essi spiccavano alcuni amici di Mendel fra cui Johann Nave, botanico esperto di alghe d'acqua dolce, Gustav von Niessl, astronomo e botanico, Alexander Makovsky, botanico, Joseph Auspitz, direttore della Realschule, Jacob Kalmus, medico, Franz Czermak, chimico e Karl Theimer, floricoltore e farmacista. La seconda parte dela

1 La Naturforscender Verein (Società per lo studio delle scienze naturali) era emanazione della Mährischen Gesellschaft zur Beförderung der Landwirtschaft, der Natur- und Landeskunde (Società morava per lo sviluppo dell'agricoltura, delle scienze naturali e della storia locale) che comprendeva anche sezioni dedicate alla viticoltura, alla pomologia e all'allevamento ovino (Wood e Orel, 2005).

presentazione di Mendel si svolse esattamente un mese dopo, l'8 marzo, e fu dedicata sia alle modalità con cui le cellule riproduttive (polline e cellule uovo), delle piante ibride trasmettono i caratteri alle generazioni successive sia al tema della speciazione, allora al centro dell'attenzione grazie anche agli scritti di Darwin. I resoconti delle due conferenze di Mendel apparvero sul giornale locale *Tagesbote* e furono poi sviluppati da Mendel stesso nel famoso articolo *Versuche über Pflanzen-Hybriden* (1866), nel quale si riassume gran parte dell'eredità scientifica di Mendel (Giannini, 2003).

Mendel Abate (1868-1884)

Cyrill Napp, che aveva protetto e guidato Mendel per tanti anni, morì il 22 luglio 1867. Il 26 marzo 1868, Mendel scrisse a Leopold Schindler, marito di Theresia, che: "*Lunedì prossimo a mezzogiorno dovremo eleggere il prelato ... l'esito è ancora incerto e non si sa chi di noi sarà il fortunato. Se la scelta ricadrà su di me, cosa che non oso sperare, lunedì pomeriggio ti manderò un telegramma*" (Hartl, 2022).

Una volta eletto, Mendel sottovalutò il lavoro che lo attendeva tant'è che subito dopo l'elezione scrisse al botanico di Monaco Carl von Nageli che la sua nuova posizione sarebbe costata molto tempo e fatica "f*inché non mi sentirò a mio agio nei miei nuovi doveri"* e che tuttavia, "*questo non mi impedirà di andare avanti con gli esperimenti di ibridazione cui sono tanto affezionato; spero infatti di poter dedicare ancora più tempo e attenzione ad essi*." Per i primi anni Mendel ebbe ragione, i suoi esperimenti proseguirono e nel 1871 ebbe anche modo di recarsi a Kiel, a nord di Amburgo, per un Convegno Internazionale di Apicoltura. Tuttavia man mano che gli oneri amministrativi crescevano, Mendel si vide costretto ad abbandonare l'attività scientifica, cosa di cui si lamentò nel 1873 scrivendo che "*sono davvero scontento di dover trascurare le mie piante e le mie api*». Solo le sue registrazioni meteorologiche poterono proseguire (Hartl, 2022).

Ciò che Mendel sottovalutò fu il tempo e lo sforzo necessari per gestire i vasti possedimenti del monastero con la conseguente necessità di frequenti visite ispettive. A ciò si aggiunga che le sue funzioni pubbliche di prelato richiedevano un'enorme quantità di tempo e lo avevano portato a far parte di praticamente tutte le società colte della Moravia. Divenne ad esempio membro di un comitato che esaminava la frutta e i prodotti orticoli, di uno che stanziava sovvenzioni agricole a comuni rurali e scuole agrarie, uno per la tassazione fondiaria in Moravia, uno che promuoveva la costruzione di strade secondarie e uno che si occupava della disponibilità di libri della biblioteca di agricoltura nelle scuole elementari. Gli fu chiesto di recensire libri, di valutare un nuovo tipo di filato e di identificare un lepidottero che devastava i raccolti di lino. Fu inoltre nominato vicepresidente della Banca Mutua Morava, il che gli offriva un buon stipendio ma lo costringeva quasi ogni giorno a 1-2 ore di lavoro in banca (Hartl, 2022).

A quei tempi il più grande assillo di Mendel fu lo scontro decennale con il Ministero della Pubblica Istruzione per problemi di fiscalità. Nel 1874 il Reichsrat aveva infatti approvato una legge che aggiungeva una tassa speciale sul reddito dei monasteri per pagare gli stipendi di parroci e altri funzionari religiosi, spesso impegnati in attività di insegnamento nelle scuole. Sebbene tutti i monasteri si fossero opposti a tale tassa, la maggior parte alla fine rispettò la legge denunciando il proprio reddito ma detraendo il denaro versato a religiosi e personale, così come le altre spese e azzerando di fatto le proprie pendenze. L'abate Mendel rifiutò invece di ricorrere a un simile sotterfugio, insistendo sul fatto che la legge era incostituzionale e rifiutandosi pertanto di pagare. Le sue proteste proseguirono mese dopo mese finché, nel 1876, le autorità esasperate sequestrarono i possedimenti monastici trattenendo al contempo la tassa. Mendel continuò ostinatamente le sue proteste, anno dopo anno, finché non si ammalò troppo per continuare. In tal modo si amareggiò, credette che i suoi amici lo avessero tradito e si alienò le simpatie di molti confratelli. Iltis dedica venti pagine della sua biografia a questo infelice capitolo finale

della prelatura di Mendel. Peraltro dopo la morte di Mendel il procuratore del monastero effettuò una valutazione dei redditi degli anni precedenti, azzerandoli con le detrazioni e ottenendo così il risultato che molto del denaro che era stato prelevato per la tassazione fu restituito direttamente o attraverso l'abbattimento di altre imposte (Hartl, 2022).

Gli anni del declino (1882 - 1884)

Persa l'amicizia di molti colleghi a seguito della lunga disputa fiscale con le autorità e preoccupato dal declino della sua salute, Mendel si avvicinò ai suoi nipoti, figli di Theresia che era morta nel 1857 a soli 28 anni: Alois, Ferdinand e Johann Schindler. Man mano che questi nipoti diventarono abbastanza grandi, Mendel li fece infatti trasferire a Brünn dove, in segno di gratitudine per il dono altruistico di Theresia che molti anni prima gli aveva permesso di continuare la propria istruzione, li sostenne pagando la loro iscrizione al liceo e poi alla scuola di medicina dell'Università di Vienna, ove Alois e Ferdinand si laurearono divenendo ambedue medici. Il primogenito di Theresia, Johann, divenne invece vicedirettore della scuola tecnica di Brünn e fu membro della Società per lo studio delle scienze naturali insieme allo zio Gregor, morendo poi di tubercolosi a metà degli anni '20 (Hartl, 2022).

Mendel era di media altezza con spalle larghe e complessione robusta (Richter, 2015). La conformazione corporea era in parte di origine genetica ma i ricchi pasti serviti dai cuochi del monastero giocarono indubbiamente un ruolo nel determinare il sovrappeso che sempre più lo afflisse con il procedere dell'età. Anni prima un medico gli aveva peraltro suggerito che il fumo poteva aiutalo a controllare il peso, il che spinse Mendel a fumare fino a 20 piccoli sigari al giorno. Alla fine del 1883 Mendel soffriva di insufficienza renale e cardiopatia, tanto che non poté più svolgere le sue osservazioni meteorologiche e si spense il 6 gennaio 1884, a 61 anni.

I funerali di Mendel furono elaborati come competeva a un abate e a un'importante personalità civile: vi parteciparono centinaia di persone di tutte le religioni ed i rappresentanti delle numerose organizzazioni e Società scientifiche a cui apparteneva, oltre a membri del governo.

Probabilmente molte carte e altri cimeli di Mendel furono bruciati dopo la sua morte e si salvarono solo i suoi libri rilegati. Sebbene tale perdita sia molto grave, occorre anche dire che con l'occupazione tedesca di Brno nel 1939 e poi con la presa del potere da parte dei comunisti dopo la guerra, gran parte dei cimeli del monastero sarebbe andata comunque perduta (Hartl, 2022).

MENDEL, LE SCIENZE AGRARIE E I CAMBI DI PARADIGMA OTTOCENTESCHI

Scriveva Luigi Luca Cavalli Sforza che "L'uso che Mendel fece della matematica per interpretate i suoi esperimenti biologici e gli sviluppi teorici che stimolarono la pianificazione di nuovi sperimenti progettati per confermare, estendere e mettere di nuovo alla prova la sua teoria, sono il primo esempio di metodo sperimentale avanzato in biologia e si configurano come l'equivalente biologico del rivoluzionario lavoro che due secoli e mezzo prima aveva portato Galileo al metodo sperimentale". Questa affermazione conferma l'idea del XIX secolo come secolo del cambio di paradigma nelle scienze agrarie. In tali scienze infatti fino al XVIII secolo aveva dominato la teoria del vitalismo, che in agricoltura era declinata come umismo. Wöhler (1828 - sintesi dell'urea, molecola organica, a partire da una molecola inorganica con la nascita della chimica organica).

Con ogni probabilità Mendel, nella sua vicinanza alle scienze agrarie, conosceva a fondo il primo cambio di paradigma e si rendeva perfettamente conto che il suo contributo si collocava al grande filone che mirava alla rifondazione dell'agronomia su base scientifica. In tal senso occorre ricordare che dal nuovo quadro di conoscenze scientifiche, cui Mendel

In base a tale teoria la materia vivente avrebbe posseduto una vis vitalis che la rendeva del tutto separata rispetto al mondo inorganico. A sconvolgere questo quadro di conoscenze furono le scoperte di Nicolas Theodore De Saussure (1804 - nutrizione carbonica dei vegetali per mezzo della CO_2 atmosferica[1]) e di contribuirà in misura determinante sul fronte della genetica, deriverà un pacchetto tecnologico innovativo su cui si fonderà la rivoluzione verde del XX secolo

Un omaggio importante ai filoni di indagine inaugurati dai grandi scienziati ottocenteschi come Gregor Mendel ci viene da questa attualissima frase che l'agronomo Alberto Oliva inserisce in un suo testo del 1930: "La tecnica moderna, in confronto a quella antica, assieme a molti mezzi tecnici nuovi e perfezionati, ne dispone di due poderosi per risolvere in pieno il problema granario mondiale: razze a prodigiosa capacità produttiva ed azoto a buon mercato ricavato industrialmente dalla miniera inesauribile dell'aria".

Circa i rapporti fra Mendel e la ricerca agronomica, Van Dijk et al. (2017) analizzano la questione facendo riferimento a due articoli apparsi su quotidiani moravi il 26 e il 30 luglio 1861. Nel primo, pubblicato sul Mährischer Korrespondent (Il corrispondente moravo) si loda l'attività di Mendel a favore dell'orticoltura e dell'agricoltura, scrivendo fra l'altro che Mendel grazie anche all'acquisto di sementi all'estero e all'uso dell'ibridazione stava selezionando nuove varietà di spinacio, anguria, pisello, fagiolo, piccoli frutti e specie da fiore, fra cui si citano le fuchsie. Il secondo articolo, apparso sul Brünner Zeitung, contesta le considerazioni espresse nel primo articolo affermando che, "benché non si voglia in alcun modo offendere il Professor Mendel poiché noi onoriamo ogni sforzo per avvicinarsi alla verità in modo pratico", le attività di Mendel per la selezione di nuove varietà non devono essere sopravalutate, trattandosi di attività già da tempo condotte da vari altri studiosi. Partendo da tali fonti, Van Dijk et al. (2017) avanzano l'ipotesi che Mendel, grazie anche al costante scambio di esperienze con l'Abate Napp, fosse molto più vicino di quanto si pensi alle tematiche agronomiche del breeding ed in tal senso citano:

- la preoccupazione che emerge da una lettera inviata ai familiari il 28 dicembre (1851?) per la peronospora della patata che in quegli anni stava infliggendo importanti danni in quell'area d'Europa.

- il legame di Mendel tramite l'Abate Napp con la Sheep breeders society, che tanto interesse aveva al miglioramento genetico animale in relazione all'industria della lana, che in quegli anni vedeva Brünn fra i maggiori poli produttivi europei.

MENDEL E LA METEOROLOGIA

Mendel fu membro fondatore della società meteorologica austriaca e il suo contributo alla meteorologia fu l'aspetto scientifico più noto ai suoi contemporanei, che si scordarono ben presto delle sue attività di ibridatore. Mendel tenne registri giornalieri con 3 osservazioni al giorno che poi analizzava personalmente e fece ad esempio un'attenta analisi della tromba d'aria che colpì Brünn nel 1870. Mendel tenne inoltre traccia dell'attività delle macchie solari in relazione alle aurore boreali e ai disturbi nelle comunicazioni telegrafiche (Roznovsky, 2014). Per essendo ovvio che il contributo di Mendel alla meteorologia sia ben lontano da quello dato alla nascita della scienza della genetica, non possiamo tuttavia scordare che la metodicità accomuna le osservazioni

1 Scrive De Saussure (1804) a pagina 47 del suo trattato: "piante alimentate con acqua pura in aria libera estraggono carbonio dalla piccola quantità di CO_2 naturalmente presente nella nostra atmosfera". Occorre inoltre evidenziare il seguente brano tratto dall'introduzione: "Il percorso che mi sono imposto è senza dubbio arduo e faticoso, ma se si considera che il miglioramento dell'agricoltura è l'obiettivo verso cui è diretto, se ne sopporteranno le difficoltà e se ne scuseranno le mancanze. Questo lavoro mi ha portato a raccogliere molte nuove osservazioni che provano che tutti i problemi che ho enunciato possono essere risolti senza attribuire ai vegetali particolari forze creatici o trasmutazioni in contrasto con le osservazioni note".

meteorologiche (stato del cielo, fenomeni in atto, misure strumentali) e la raccolta sistematica di dati biologici sugli ibridi di pisello che porteranno Mendel a formulare le sue leggi.

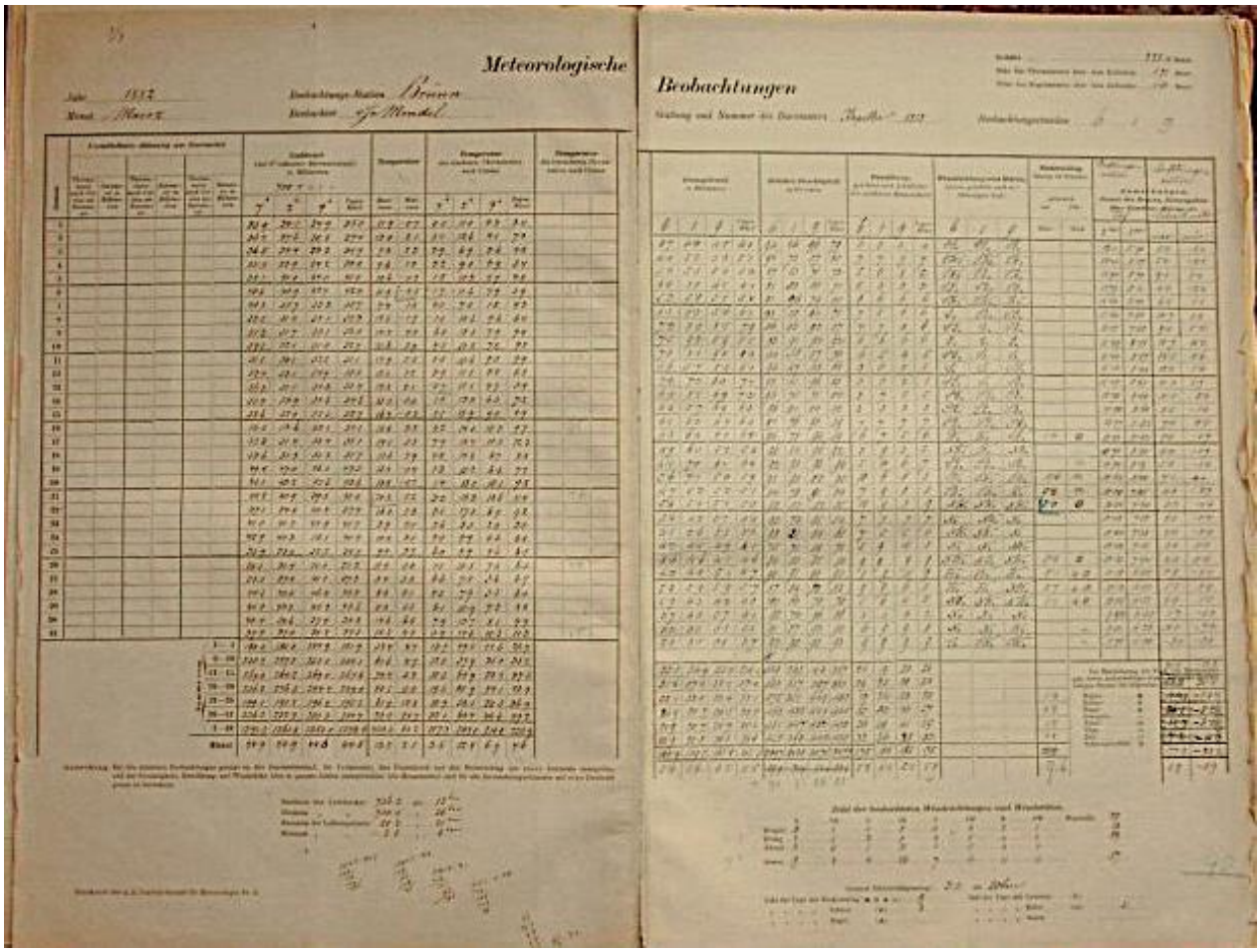


Figura 3 - Registro meteorologico compilato da Gregor Mendel (Roznovsky, 2014)

Occorre anche ricordare che l'apporto di Gregor Mendel in quanto religioso alla meteorologia fu tutt'altro che un caso isolato. Ad esempio in Italia fra XVII e XIX secolo si ebbero importanti contributi di religiosi come l'Abate benedettino Benedetto Castelli (1578-1643), collaboratore di Galileo Galilei ed inventore del pluviometro e dell'evaporimetro, il barnabita Francesco Denza (1834-1894) e il gesuita Angelo Secchi (1818-1878). E' questa una tradizione di attenzione alla scienza che si è a lungo conservata nel mondo religioso cattolico e che ad esempio in Lombardia ha visto fino ad anni recenti l'attività di don Elia Orsenigo, mancato nel 2016 dopo esser stato per lunghi anni docente di matematica presso il Seminario arcivescovile di Venegono Inferiore, ove dal 1935 fino allo smantellamento, avvenuto nel 1985 per decisioni superiori, diresse la stazione meteorologica e geofisica, che riteneva un importate sussidio alle attività sperimentali degli studenti maturandi del Liceo Classico del Seminario (Arcani, 2022).

MENDEL UOMO DI SCIENZA E DI FEDE

Mendel oltre che scienziato fu un cattolico dalla fede profonda, come del resto uomini di fede erano stati Galileo Galilei e Nicolò Copernico (anch'egli monaco agostiniano). Dobbiamo anche dire che le gerarchie ecclesiastiche e in primis l'Abate Napp non ostacolarono la vocazione di Mendel per la ricerca e l'insegnamento.

Sulla fede che animò l'azione di Mendel è utile citare la testimonianza di un parente, padre Clemens Richter, anche lui monaco agostiniano, che ricorda il trisavolo dalle pagine della rivista scientifica Molecular Genetics & Genomic Medicine affermando anzitutto che "N*ella casa dei miei nonni a Heinzendorf (oggi Vranze), c'era una stanza che veniva aperta solo in occasioni speciali e in cui si entrava con il massimo rispetto. In quella stanza c'era un quadro incorniciato che ritraeva un dignitario ecclesiastico vestito con un abito rosso-violaceo e un rocchetto bianco magnificamente ricamato e che portava sul petto un prezioso crocifisso. Solo più tardi venni a sapere che si trattava del mio trisavolo, il prelato Johann Gregor Mendel. Essendo io stesso un monaco agostiniano, mi sento molto vicino al mio famoso parente e permettetemi dunque di ricordarlo sia come essere umano che come sacerdote cattolico. Johann Mendel nacque da una famiglia di agricoltori di etnia tedesca profondamente religiosa e il cui spirito cristiano è ben documentato da una piccola piastrella bruciata trovata nel salotto dei Mendel. Su di essa vi era la Santissima Trinità simboleggiata da tre cerchi intrecciati che contenevano le parole: "Dein Wille geschehe". ("Sia fatta la tua volontà"). Queste tre parole potrebbero aver dato impulso alla scelta religiosa del giovane Mendel ponendo le basi per il suo desiderio di diventare sacerdote. Per tutta la vita Mendel si attenne con tutto il cuore ai suoi voti; accettando* sinceramente tutti gli obblighi impostigli dal suo ordine. *Altrimenti come avrebbero fatto i suoi confratelli a eleggerlo abate all'unanimità nel 1866, dopo la morte di Cyrill Napp? Mendel era profondamente radicato nella sua fede cristiana e cercava appassionatamente di trasmettere la sua convinzione e la sua esperienza agli altri in ogni occasione. Questo atteggiamento è testimoniato da diversi schemi di sermoni ancora conservati.*

Mendel era di statura media, con spalle larghe e una figura un po' robusta. Era benvoluto dagli altri e sempre pronto a intervenire. Aveva un buon senso dell'umorismo e della "comicità delle situazioni". I suoi contemporanei sottolineavano il suo carattere accattivante e uno dei suoi compagni di monastero parlò di Mendel come "affabilis unicuique" (gentile e amichevole con tutti). "Con la sua generosità, gentilezza e mitezza, Mendel si guadagnò il rispetto e la simpatia di tutti. Nessuna richiesta di aiuto rimaneva senza risposta e, in modo amichevole, sapeva come dispensare aiuto senza far sentire il peso di ciò al richiedente" (Citazione da uno dei suoi necrologi).

Il carattere di Mendel è confermato dalla lettera alla madre scritta il 25 giugno 1859, in occasione della battaglia di Solferino (Brem, 2015): *"C'è poco di nuovo nel nostro monastero, eccezion fatta per l'arrivo di due novizi, uno da Brünn e uno straniero dalla Baviera…. Ma nel mondo non c'è pace e quiete. In Italia c'è la guerra, sanguinosa più che mai. In migliaia hanno perso la vita e attendiamo di conoscere gli esiti di una battaglia avvenuta negli ultimi giorni. Possa Dio dare un esito fortunato per la nostra parte: il dolore elevato al cielo da migliaia di madri i cui figli si sono sacrificati possa essere udito da Dio".*

L'attuale collocazione del paese natale e della città di Brno la dicono lunga su quanto i nazionalismi abbiano modificato le carte geografiche della Mitteleuropa. Di tale temperie, che nel 1918 si tradurrà nell'esplosione della compagine multinazionale dell'impero asburgico, fenomeno che poi porterà alla seconda guerra mondiale e alla successiva "cortina di ferro", è intrisa anche la vicenda umana di Mendel, il cui monastero vide ai suoi tempi la compresenza di una componente tedesca e di una componente slava. Scrive ancora Clemens Richter (2015) che "c*ome abate, Mendel accettò più novizi cechi che tedeschi - supervisionando la transizione di un monastero prevalentemente di lingua tedesca a uno di lingua ceca. L'idea di Mendel di una coesistenza di nazioni diverse nel microcosmo dell'Abbazia di San Tommaso era fondata sul rispetto per i suoi simili e per la loro diversità e sulla responsabilità reciproca dei membri di entrambe le etnie per lo sviluppo culturale ed economico della loro patria comune."*

Figura 4 - Foto del 1862 raffigurante i confratelli della Comunità Agostiniana del Monastero di San Tommaso a Brno. L'abate Cyrill Napp (N), seduto con croce pettorale e Bibbia, è affiancato da Gregor Mendel (M) e da Joseph Lindenthal (L), il quale aiutò Mendel nei suoi esperimenti di incrocio. Mendel e Lindenthal tengono in mano un fiore e sono entrambi appoggiati alla sedia di Napp, il che stabilisce forse un legame ideale fra l'Abate Napp, i cui interessi per gli studi sull'ereditarietà erano ben noti, e i due sperimentatori attivi nel suo convento (Van Dijk et al., 2017)

Su Mendel uomo di fede concludiamo con l'acuto ritratto che ne traccia Santa Francesca Saverio Cabrini in una lettera alle consorelle scritta dalla California nel febbraio 1906 (Centro Cabriniano, 2012): *"I frutti hanno una fragranza e un sapore tutto speciale e qui presso Los Angeles abita il celebre naturalista Burbank che va aggiungendo nuove meraviglie alle meraviglie naturali, e con ingegnosi esperimenti e innesti ha ottenuto nuove specie di fiori e frutti, albicocche e prugne senza nocciolo, uva senza semi. A gloria della Chiesa debbo dirvi che chi mostrò la via al signor Burbank fu l'Abate Gregorio Mendel il quale, mezzo secolo fa, nel suo convento di Austria, cominciò esperimenti che hanno reso celebre il nome del naturalista di California. Ciò che egli compie al presente è dovuto al lavoro di un intelligente monaco Agostiniano. Di qui vedete quanto rispetto si debba alla Chiesa anche come nutrice di scienze e arti."*.

La testimonianza della Cabrini ci aiuta peraltro a capire come l'attività divulgativa abbia fatto rapidamente seguito alla "riscoperta" del lavoro scientifico di Mendel, che come abbiamo accennato avvenne ai primi del '900.

UN'EREDITÀ DIFFICILE DA RACCOGLIERE

Mendel considerava fondamentali i risultati dei suoi esperimenti sugli ibridi vegetali, che tuttavia durante la sua vita non furono compresi e riconosciuti. Pochi mesi prima di morire Mendel disse a un novizio del monastero, Franz Barina, in seguito divenuto suo successore

come Abate: *"Anche se ho vissuto alcune ore buie durante la mia vita, sono grato che le ore belle abbiano superato di gran lunga quelle oscure. Il mio lavoro scientifico mi ha portato grande gioia e soddisfazione e sono convinto che non ci vorrà molto perché il mondo intero apprezzi i risultati e il significato del mio lavoro".* A un amico espresse inoltre la sua ferma opinione*: "Meine Zeit wird kommen"* (il mio tempo arriverà).

Scrive Hugo Iltis, primo biografo di Mendel, che "*Il pensiero di Mendel era orientato al concreto e non ne facevano parte sentimentalismi e sterili riflessioni*". Da ciò deriva che Mendel non tenne mai un diario e che le lettere scritte a familiari e amici non fanno piena luce sulla sua vita interiore. Verso la fine della sua vita, si sentì sempre più solo. "*Quando morì*", scrive ancora Hugo Iltis, "*nessuno era consapevole dell'importanza del lavoro di Mendel e i pochi appunti manoscritti furono messi da parte o bruciati con noncuranza*".

CONCLUSIONI

In questo scritto si è cercato di offrire un sintetico quadro biografico di Johann Gregor Mendel, mirando altresì ad offrire alcune riflessioni utili a porre la vicenda scientifica e umana di Mendel in relazione con la temperie culturale del proprio tempo.

Ne emerge con chiarezza che Mendel fu un personaggio poliedrico (uomo di fede e prelato, scienziato e insegnante, botanico e agronomo, meteorologo, matematico e fisico) e proprio questa poliedricità rischia di renderlo sfuggente a quanti si avvicinano alla sua biografia.

Da quadro biografico emerge inoltre che Mendel fu il prodotto di:

- una famiglia di agricoltori molto religiosa, unita nelle difficoltà e con grande desiderio di istruire i figli

- un sistema di formazione che l'aveva posto in contatto con la scienza allo stato dell'arte (si pensi al calcolo combinatorio che Mendel aveva appreso a Vienna dalle lezioni del professor Ettingshauser e che tanto peso avrà nella sua ricerca)

- un ambiente socio-culturale aperto all'innovazione e molto impegnato nel perseguirla e una società che nutriva grande rispetto nei confronti della scienza.

Tal cultura, che forse potremmo oggi identificare con il concetto di civiltà Mitteleuropea, mise radici in un ambito sovrannazionale e dette frutti abbondanti in svariati contesti, andando a costituire un esempio a cui ispirarsi per coloro che progettano il futuro dell'Europa e non solo.

Su Mendel si sono certamente sparsi fiumi di parole nel tentativo di sopperire alla povertà delle fonti e spero che questo modesto contributo possa in qualche modo giovare al lettore.

BIBLIOGRAFIA

Arcani M., 2022. Geofisica al Seminario di Venegono Inferiore, https://www.astroparticelle.it/geofisica-al-seminario-di-venegono.asp

Bateson, W., 1907 The progress of genetic research, pp. 90 – 97 in The Report of the Third International Conference of Genetics, edited by W. Wilks. Royal Horticultural Society, London.

Brem G., 2017. 150 years Gregor Mendel, from cunting peas to genome editing, Lohmann information, vol 51(1), June 2017.

Centro Cabriniano, 2012. Tra un'onda e l'altra, viaggi di Santa Francesca Saverio Cabrini, edizioni Centro Cabriniano di Roma, 553 pp.

De Saussure N.T., 1804. Recherches chimiques sur la végétation. Paris. https://books.google.it/books/about/Recherches_chimiques_sur_la_v%C3%A9g%C3%A9tation.html?id=xXFwyAgAQn8C

Gest H., 2002. Definition of photosynthesis History of the word photosynthesis and evolution of its definition, Photosynthesis Research 73: 7–10, 2002.

Giannini A., 2003. Mendel, il padre postumo della genetica, Le scienze, i grandi della scienza, n. 34, giugno 2003. 95 pp.

Hartl D.L., 2022. Gregor Johann Mendel: From peasant to priest, pedagogue, and prelate. PNAS, Vol. 119, No.30, e2121953119

Lafrate L., 2021. Angelo Secchi: il Gesuita Italiano che inventò le previsioni del tempo, http://www.meteoam.it/news/angelo-secchi-il-gesuita-italiano-che-invento-le-previsioni-del-tempo

Janick J., 2015. Nikolai Ivanovich Vavilov Plant Geographer, Geneticist, Martyr of Science, Hort.Science, vol 50(6), 772-776.

Mendel, Gregor: Versuche über Pflanzen-Hybriden. In: Verhandlungen des Naturforschenden Vereines in Brünn 4 (1866), S. 3-47

Minelli A., 2014. Introduzione a "Gregor Mendel, Le leggi dell'ereditarietà", Mimesis, Milano-Udine

Oliva A., 1930. La politica granaria di Roma antica, Federazione italiana dei consorzi agrari, Piacenza, 296 pp. (introduzione - pag X).

Richter C., 2015. Remembering Johann Gregor Mendel: a human, a Catholic priest, an Augustinian monk, and abbot, Molecular Genetics & Genomic Medicine», vol. 3/6 (2015), pp. 483-485

Roznovsky J., 2014. G.J. Mendel´s meteorological observations. in Rožnovský, J., Litschmann, T., (eds): Mendel a bioklimatologie.

van Dijk P.J., Weissing F.J., Noel Ellis T.H., 2017. How Mendel's Interest in Inheritance Grew out of Plant Improvement, Genetics, Vol. 210, 347–355 October 2018

Wood R.J., Orel V., 2005. Scientific Breeding in Central Europe during the Early Nineteenth Century: Background to Mendel's Later Work, Journal of the History of Biology, Summer, 2005, Vol. 38, No. 2, pp. 239-272

APPENDICE

Fonti primarie riguardanti il lavoro di Mendel (van Dijk et al., 2018)

1. I suoi articoli scientifici di cui il più noto, Versuche über Pflanzenhybriden, è lungo 44 pagine e contiene una breve introduzione e una lunga discussione che tocca vari argomenti. Inoltre, Mendel nel 1870 pubblica un breve articolo sull'ibridazione artificiale in Hieracium e nel 1853 e 1854 pubblica due brevi articoli sui parassiti nelle colture. Questi articoli testimoniano due decenni di lavoro ma non sono in ogni caso diari, ma piuttosto ricostruzioni al passato che spesso non offrono alcuna descrizione su come l'autore abbia raggiunto le sue conclusioni. Ciò è ad esempio illustrato dal fatto che Versuche über Pflanzenhybriden fu fortemente influenzato dall'origine delle specie di Darwin in traduzione tedesca ma il libro di Darwin si rese disponibile solo alla fine degli esperimenti di Mendel su Pisum e quindi non può aver influenzato il pensiero di Mendel durante la progettazione e la conduzione dei suoi esperimenti.
2. Le lettere di Mendel che sono più simili a diari e spesso descrivono pensieri e motivazioni. Si conosce parte della corrispondenza di Mendel con Carl Nageli, professore di botanica a Monaco, comprese dieci lettere pubblicate da Correns nel 1905. Queste lettere riguardano principalmente gli esperimenti su Hieracium, a cui Mendel si dedicò su consiglio di Nageli e che ebbero luogo 8 anni dopo il lavoro dedicato al pisello.
3. Diciotto lettere che Mendel scrisse a parenti e amici e nelle quali non si addentra mai nel proprio lavoro sperimentale.
4. I resoconti di prima mano di persone che incontrarono Mendel durante la sua vita. Infatti nel periodo successivo alla riscoperta dell'opera di Mendel vari amici e molti dei suoi allievi del liceo erano ancora vivi e il suo primo biografo Iltis intervista molti di loro - fra cui l'amico Gustav Niessl von Mayendorf (1839-1919), segretario della Società di scienze naturali - ottenendo contributi per lo più aneddotici. Più pregnante appare il contributo offerto da Eichling, che visitò Mendel nel 1878 come giovane venditore di una ditta di sementi e con il quale Mendel si mostrò tuttavia riluttante a parlare dei suoi esperimenti sul pisello.

5. I giornali dell'epoca di Mendel. Due brevi reportage su un quotidiano locale relativi alle conferenze su Pisum tenute da Mendel nel febbraio e marzo 1865 sono stati scoperti da Sajner nel 1966 e sulla loro base Zhang et al. hanno reinterpretato nel 2017 gli esperimenti di Mendel su pisello.

GLI ESPERIMENTI DI MENDEL E LA LORO ATTUALITÀ

Francesco Salamini
Accademia Nazionale dei Lincei

Riassunto

Viene presentato il ruolo di Mendel come padre fondatore della Genetica. Si dà rilievo all'importanza della sua educazione, ai contenuti del suo principale scritto del 1866 (metodi; cura delle piante; terminologia; materiali; analisi dei dati; risultati), ai tentativi di rendere nota la sua visione dell'eredità, alla riscoperta di quelle che oggi sono note come leggi di Mendel. Viene anche riassunta la rilevanza di Mendel nel proporre una teoria divenuta, poi, termine di confronto nell'analisi di argomenti biologici che potevano rappresentare eccezioni alla stessa, anche se solo apparenti, come allopoliploidia, fattori genetici multipli, apomissia, semi dominanza, rapporto numerico tra i sessi, fattori gametofitici.

Summary

Mendel's experiments and their current relevance

The contribution summarizes the unique role of Gregor Mendel as the founder of Genetics. The note includes discussions on the importance of his education, on the content of his main contribution published in 1866 (methods; plant handlings; terminology; materials; data analysis; results), on the action taken by Mendel to communicate his discoveries, and on the re-discovery of Mendel work. The Mendel laws are considered as focal points in the analysis of biological arguments appearing as putative exceptions to mendelism, exceptions frequently only apparent, such as allopolyploids, duplicated genetic factors, apomixis, semi-dominance, sex ratio, gametophytic factors.

INTRODUZIONE

Gregor Mendel[1] ha offerto alla scienza un contributo epocale, ma il suo messaggio presupponeva l'accettazione di aspetti metodologici dove, per la prima volta, il calcolo combinatoriale, allora sconosciuto ai biologi, veniva applicato allo studio dell'eredità. È, infatti, a partire da rapporti matematici che Mendel propose l'esistenza di determinanti ereditari di natura discreta, oggi chiamati geni. "*Senza le conoscenze di citologia e cromosomiche, senza l'analisi di Weismann sul ruolo del nucleo, e senza tutte le scoperte biologiche sopravvenute tra il 1865 e il 1900, Mendel propose un nuovo modo di considerare l'eredità*" (Mayr, 1982). Negli ultimi 120 anni si è discusso alla noia del perché

Mendel sia stato dimenticato per 34 anni prima che le sue conclusioni, pubblicate nel 1866, venissero accettate. Una possibile ragione è che, in quegli anni, la scienza biologica si presentava alle società umane sulla base delle proposte di Charles Darwin con argomenti evolutivi affascinanti per le loro implicazioni scientifico-filosofiche (Lewontin, 2004; Abbondandolo, 2015). Al contrario, la scoperta di Mendel, dal punto di vista filosofico, era meno interessante: proponeva solo un meccanismo che, però, sarebbe - e come - servito a Darwin per dare anche più sostanza scientifica alla sua teoria dell'evoluzione: è evidente che Darwin non ha spiegato l'origine della variabilità biologica. La chiave della ereditarietà dei caratteri, ma anche dell'origine della variabilità, si nascondeva, al tempo, nel lavoro di Mendel. Edward M. East (1923) era convinto che se c'era qualcuno in grado di capire quel lavoro, questo era Darwin (oltre che Galton[2]). La storia di Mendel, contrapposta a quella di Darwin, è, invece, quella di un gentile rivoluzionario nato troppo presto, e che non ha goduto, per emergere, delle spalle di giganti e maestri (Henig, 2000).

In sintesi, il suo contributo alla biologia moderna, concentrato in un paio di pubblicazioni, va dalla descrizione di elementi assimilabili ai geni di oggi e dalle sue tre famose leggi (uniformità della F1, segregazione, indipendenza dei caratteri), alla dimostrazione dell'utilità della matematica in biologia, fino ad offrire un paradigma predittivo del DNA. Curiosamente, nel suo sviluppo la genetica ha poi assunto un ruolo culturale che, secondo Bianchi (1997), la rende una disciplina biologica generale soffusa di atmosfera caratteristicamente filosofica. Nel nostro secolo, specialmente nei suoi aspetti biotecnologici, sta addirittura ipotecando il nostro futuro.

EDUCAZIONE

Per comprendere lo sviluppo del percorso scientifico di Mendel, è necessario accennare a come, nel periodo educativo, sia stato introdotto alla scienza. Friedrich Franz, Il professore della scuola che Mendel aveva frequentato prima di entrare in Convento, nel raccomandarlo all'abate Cyril Napp lo presentava come uno dei migliori studenti di fisica. Questa sua attitudine si manifestò anche a Vienna dove, appena arrivato all'Università[3], divenne assistente all'Istituto di Fisica, una posizione riservata agli studenti più bravi e seri. Dal 1851 al 1853 Mendel studiò in quella Università, frequentando il corso di fisiologia vegetale e botanica tenuto da Franz Unger. Questo professore era convinto che nelle popolazioni naturali esistessero individui varianti che caratterizzavano le varietà o le sottospecie. Già allora Mendel fu un accanito lettore dei testi di Josef Kölreuter (1761-1766) e di Carl Friedrich Gärtner (1849) che trattano degli ibridi tra specie e varietà di piante (Rocchi, 2022). Inoltre, Mendel conosceva anche il lavoro di Franz Unger dove si dimostrava che le cellule della pianta si originano per divisione più che per spontanea neoformazione. Questo indirizzò Mendel verso la conclusione sul ruolo delle cellule riproduttive nella formazione degli ibridi e nelle loro segregazioni[4] (Wallace, 2002-2003).

A Vienna, Mendel seguì non solo i corsi di scienze naturali, ma anche di matematica e fisica. All'Accademia Imperiale delle Scienze, in quegli anni il fisico Andreas von Baumgartner proponeva la necessità di creare legami tra botanica, zoologia e fisica; erano tempi in cui si sollecitava anche l'uso della matematica per valutare dati sperimentali relativi anche alle scienze biologiche. Insieme, i fisici Andreas von Baumgartner, Andreas von Hettingshausen e Christian Doppler ebbero un ruolo positivo nell'educazione di Mendel (Accademia Nazionale dei Lincei, 1984). Mendel seguì il corso di fisica sperimentale di Doppler; dopo il suo ritiro l'insegnamento fu tenuto da Hettingshausen, autore dell'importante libro di testo Combinatorial analysis (Darwin, che pubblica L'Origine delle specie nel 1859, non considerò nel formulare la sua proposta i contributi di matematica, fisica e statistica applicati all'eredità dei caratteri). Dopo il suo ritorno a Brno, Mendel ebbe la possibilità di completare la sua formazione scientifica avendo accesso alla

biblioteca del Convento che era dotata di più di 20.000 volumi. Inoltre, a Brno per diversi anni insegnò la fisica.

IL CONTRIBUTO DEL 1866: LE VERSUCHE

Si è già ricordato che Mendel ha pubblicato poco. Il suo lavoro principale del 1866 fu preceduto da due presentazioni pubbliche dei dati[5]. Una traduzione in italiano a cura di Angelo Bianchi è stata pubblicata in Annali della Facoltà di Agraria dell'Università Cattolica del Sacro Cuore, Anno VIII, Fasc. I, 1968 (Montalenti, 1984). È sorprendente, nel rileggere (o leggere) il testo del 1866, constatare quanto sia moderno nella terminologia e, soprattutto, nell'esporre le conclusioni; tuttavia, le Versuche sono state spesso (ma impropriamente) ritenute difficili da consultare, forse per la poca pazienza dei lettori a seguire gli esperimenti riportati in forma molto analitica. L'articolo è invece un miracolo di chiarezza (Cavalli-Sforza, 2002-2003).

Metodi

Mendel introduce la sua metodologia con parole molto precise: "*Al compito ... di seguire lo sviluppo degli ibridi nelle loro discendenze hanno sacrificato parte della loro vita.... attenti osservatori come Kölreuter, Gärtner, Herbert, Lecocq, Wichura ed altri... Se ancora non si è riusciti a stabilire una legge universalmente valida per la formazione e lo sviluppo degli ibridi, ciò non recherà meraviglia ad alcuno che conosca la portata dell'assunto e che sappia valutare le difficoltà con le quali si trovano a dover lottare per realizzare adatti esperimenti. Un responso definitivo si potrà raggiungere soltanto quando si disporrà di esperimenti di dettaglio condotti in piante appartenenti ai più diversi ordini ... Fra i numerosi esperimenti non ve n'è alcuno eseguito in dimensioni e maniera tali da rendere possibile di determinare il numero delle diverse forme in cui si presentano i discendenti degli ibridi, talché si possano con sicurezza ordinare queste forme nelle singole generazioni, fissandone i reciproci rapporti numerici*". "*La presente trattazione descrive la prova di un siffatto esperimento di dettaglio*".

L'uso di Mendel della matematica per interpretare esperimenti biologici e gli sviluppi teorici della sua teoria - che hanno stimolato dopo il 1900 nuovi esperimenti di verifica - sono il primo esempio di metodi avanzati applicati in biologia. Il fidarsi del calcolo combinatoriale e la sicurezza nel praticarlo, furono, infatti, parte importante del suo genio. Questa fiducia nella matematica gli ha permesso, nell'impostazione degli esperimenti e nelle conclusioni-interpretazioni dei dati, di adottare senza patemi il metodo ipotetico-deduttivo. Si deve anche accennare al dettaglio, non insignificante, che nessuno prima di Mendel aveva fatto in biologia un piano sperimentale così accurato al solo scopo di curiosità scientifica (Rocchi, 2022). Relativamente alla critica di Fischer circa i numeri riportati per le segregazioni e utilizzati per stabilire i rapporti tra versioni alternative dei caratteri – numeri troppo precisi secondo Fischer – è stato considerato che Mendel possa aver continuato a ripetere lo stesso incrocio fino a che i numeri si avvicinavano ai rapporti attesi (Mayr, 1982).

Cura delle piante

Le piante con caratteri differenziati, utilizzate per produrre ibridi, dovevano, negli anni, mantenere fisso il carattere che manifestavano. I fiori degli ibridi dovevano essere protetti per evitare l'incrocio accidentale. Gli ibridi e le loro progenie non dovevano manifestare sterilità, situazione da accertare con cura, anche per rivelare solo una eventuale semi-sterilità. La scelta di una leguminosa era giustificata perché le specie della famiglia hanno fiori che tendono ad evitare l'alloincrocio.

Terminologia

Definisce gli stati di dominanza e recessività, termini poi usati sempre in genetica. Introduce il simbolo dei caratteri come lettera maiuscola per la versione dominante (dominirende) e minuscola per quella recessiva (recessive) (A vs a; B vs b etc.). Questo uso delle lettere in binomio è stata un'importante iniziativa di Mendel (Henig, 2000). Correns, invece dei termini di Mendel Merkmal o Elemente, usa Anlage che fa riferimento alla cosa che genera una caratteristica, più che alla stessa caratteristica (suggerisce, inoltre, che il set completo delle Anlage potrebbe localizzarsi nel nucleo cellulare; Rocchi, 2022). Il termine Regel introdotto da Correns indica una regola, non una legge. Mendel, in verità, non ha riassunto le sue conclusioni in forma di leggi; queste sono state introdotte dopo la sua riscoperta[6] (Fantini, 2001). Anche Il quadrato di Reginald Crundall Punnet, poi universalmente adottato per illustrare le combinazioni tra gameti, apparve per la prima volta nel 1911 nel libro di Punnet "Mendelism" (Henig, 2000). Nella Versuche, Mendel usa almeno dieci volte la parola "Elemente" che ragionevolmente ora corrisponde al nostro concetto di gene.

Materiali

Rende da subito chiaro che gli ibridi da considerare non devono essere sterili o parzialmente sterili (comportamento da accertare con molta cura). Inizia con il considerare 34 varietà di pisello che vengono valutate per due anni per stabilirne l'omogeneità rispetto al carattere allo studio. Scarta quelle che fanno eccezione e ne conserva 22 che si dimostreranno stabili nel fenotipo per tutti gli anni di durata degli esperimenti. Seleziona sette coppie di varietà, ciascuna coppia con due versioni dei caratteri seme liscio o seme rugoso, colore dell'endosperma giallo o verde, pericarpo del seme bianco o grigio, baccello liscio o con costrizioni, colore del baccello immaturo verde o giallo, fiori assiali o terminali, pianta alta o nana. Gli ibridi venivano prodotti nelle due direzioni (AA madre - aa donatore di polline; aa madre - AA donatore di polline), e dovevano risultare fenotipicamente indistinguibili. Al fine di ottenere, specialmente nelle generazioni segreganti, credibili rapporti di segregazione, riteneva metodologicamente importante pianificare esperimenti basati su un elevato numero di piante: si è calcolato che il lavoro sul pisello abbia imposto a Mendel di controllare circa 10.000 piante, 40.000 fiori e 300.000 semi.

Analisi dei dati

Il commento di Mendel ai suoi dati ha una chiarezza propria delle leggi fisiche, una chiarezza non più raggiunta da coloro che poi riscoprirono le sue leggi (Czihac, 1984). Conosceva e utilizzava con disinvoltura il calcolo combinatoriale. Questa sua famigliarità si può anche desumere, oltre che da come presenta i risultati, da una osservazione che fa nella discussione delle Versuche. Scrive che se due parentali differissero per 7 caratteri, e se venissero allevate 100-200 piante F2 al fine di stabilire le relazioni tra le diverse combinazioni di fenotipi, le conclusioni sarebbero quanto mai aleatorie, perché la serie delle combinazioni indicherebbe la necessità di osservare e caratterizzare 16.384 individui, distribuiti in 2187 forme (e le piante simili ai parentali ricomparirebbero una sola volta per ciascun parentale). Dal testo risulta evidente che gli esperimenti di rincrocio sono stati condotti per ultimi come verifica dei risultati delle F1 e delle F2 (Rocchi, 2022).

Risultati

A seconda dei testi che si consultano, le leggi di Mendel sono riportate come due o come tre. In generale possono definirsi della dominanza, della segregazione e dell'assortimento indipendente dei caratteri. È inutile, considerati i destinatari di questo manoscritto,

citare i dati prodotti per i rapporti F2 3:1, suddiviso poi in 1:2:1 per i genotipi AA: Aa: aa. Le Versuche sviluppano anche, dimostrando la famigliarità con il calcolo combinatoriale, le probabilità dei fenotipi delle progenie degli ibridi fino alla generazione n, secondo la serie 2n-1: 2: 2n-1 (per n = 5, per esempio, si ottiene 31: 2: 31, rispettivamente per AA: Aa: aa; da qui l'insistenza su esperimenti con numeri elevati di individui: una corretta approssimazione sperimentale della frequenza di Aa (teoricamente pari a 2 su 64) richiede molto più di 64 individui. Usa ancora l'approccio combinatoriale per stabilire l'indipendenza tra caratteri sviluppando i rapporti 9: 3: 3: 1 (due caratteri segreganti: fenotipi AB, Ab, aB, ab) e 27: 9: 9: 9: 3: 3: 3: 1 (tre caratteri segreganti: fenotipi ABC: ABc: AbC: aBC: Abc: aBc: abC: abc). Kölreuter è largamente citato nelle Versuche: aveva intuito e scritto che caratteri diversi potevano essere ereditati indipendentemente; anche i lavori di Gärtner erano ben noti a Mendel[7].

In sintesi, Mendel credeva che i caratteri passassero, da genitori a figli, come unità individuali discrete, in modo prevedibile, consistente e matematicamente preciso (Henig, 2000).

I TENTATIVI DI MENDEL DI RENDERE NOTI I SUOI RISULTATI

Mendel sentiva la necessità di diffondere i suoi risultati, almeno se si considera il contenuto delle sue lettere. Voleva, in particolare, verificare se le regole stabilite per il pisello valevano anche per altre piante, compreso lo Hieracium. Per parte sua, confermò i dati di Pisum con incroci di Mattiola annua e glabra, Zea e Mirabilis, ma, stranamente, non rese noto che i nuovi dati confermavano la pubblicazione del 1866. Sull'argomento ebbe una lunga corrispondenza (1866-1873) con Carl Nägeli, professore di Botanica a Monaco[8]. Nägeli non recepì la novità del lavoro di Mendel perché non credeva che la manifestazione di un carattere passasse inalterata attraverso le generazioni. Perché Mendel scriveva a Nägeli nel periodo in cui erano ancora in corso i lavori su *Hieracium*[9]? Forse cercava incoraggiamenti, ma anche che qualcuno ripetesse i suoi esperimenti (Wallace, 2002-2003).

Mendel ordinò 40 estratti del suo lavoro del 1866 e almeno una dozzina fu spedita a importanti botanici del tempo. Una copia a Kerner von Marilaun, compagno di corso di Mendel a Vienna. Le pagine dell'estratto sono rimaste non separate e quindi non lette. Un secondo estratto, non letto perché a pagine unite, arrivò a Darwin[2]. Un terzo raggiunse Martinus Beijerinck. olandese, che, avendo saputo che De Vries stava pubblicando sugli ibridi delle piante, tra il 1898 e il 1900 glielo spedì. Un quarto arrivò al Max Planck Institute di Tubingen sul tavolo di Boveri, uno degli scopritori della teoria cromosomica della cellula. Un quinto esiste nella biblioteca dell'Istituto di Botanica di Graz dove Unger aveva insegnato prima di spostarsi a Vienna; l'estratto era intonso. Un sesto raggiunse il botanico Matthias Jacob Schleiden. Sono stati ritrovati altri cinque estratti ma non si conosce chi li abbia ricevuti. L'ultimo estratto spedito a persona nota è quello di Nägeli (Henig, 2000).

Bisogna anche considerare che Mendel aveva veramente anticipato i tempi[10]: per esempio, la meiosi, che è alla base delle segregazioni fenotipiche e genetiche, fu scoperta solo 25 anni dopo la pubblicazione delle Versuche. Ha giocato un ruolo anche la scarsissima diffusione della rivista su cui Mendel ha pubblicato (Wallace, 2002-2003).

LA RISCOPERTA DI MENDEL

Nel 1900, la ricerca di spiegazioni alternative alla teoria che l'ereditarietà dei caratteri avvenisse per il mescolamento dei contributi di due genitori, stimolò la produzione di risultati che la volevano dimostrare di natura discontinua. Nel preparare le relative pubblicazioni, Hugo de Vries e Karl Correns riscoprirono il contributo di Mendel. De Vries (1900a), nella nota sui Comtes Rendus, non aveva citato Mendel; Correns si insospettì, presumendo che De Vries volesse avere il merito di essere arrivato indipendentemente

alle stesse conclusioni di Mendel. Nelle due note dello stesso anno (1900b, c), tuttavia, De Vries citò Mendel (Fantini, 2001). Anche Erich von Tschermak è stato incluso tra i riscopritori, anche se era chiaro che non aveva compreso i contenuti delle Versuche (Henig, 2000). È vero che Wilheim Olbers Focke già nel 1881 cita Mendel quindici volte, ma non in modo lusinghiero ("*Mendel ha creduto di aver trovato* ..."). Le scoperte fatte tra la pubblicazione di Mendel e la sua riscoperta, come l'attenzione ai cromosomi e il meccanismo di divisione cellulare, avrebbero dovuto aiutare a comprendere il lavoro di Mendel, ma non giocarono alcun ruolo nella sua riscoperta (Cavalli-Sforza, 2002-2003). Le stesse scoperte avrebbero potuto essere di Mendel se questi, a suo tempo, fosse stato incoraggiato a continuare le sue analisi genetiche. La teoria dell'eredità trasmessa dai cromosomi è stata da subito considerata la base fisica delle leggi di Mendel, anche se, in senso evolutivo, dal 1900 al 1960 la ricombinazione tra cromosomi omologhi venne relativamente poco considerata. I chiasmi cromosomici erano noti fino dal 1880 dal lavoro di August Weismann, ma solo con l'equazione "chiasmata = crossing over" di Cyril Dean Darlington il fenomeno divenne universalmente accettato (Mayr, 1988).

Frank Raphael Weldon tentò di opporsi, con altri, all'accettazione del contributo di Mendel. In particolare, riconsiderò i dati sui rapporti mendeliani per il colore dei cavalli da corsa che Charles Chamberlain Hurst, nel 1905, aveva sottoposto alla Royal Society. I dati di Hurst erano stati desunti dai pedigree ufficiali dei cavalli da corsa inglesi e Weldon vi scoprì significativi errori. Hurst, tuttavia, dimostrò che le eccezioni di Weldon erano dovute ad errori di trascrizione, lasciando così via libera alle regole di Mendel anche per il regno animale (Rocchi, 2022).

RILEVANZA DELLE LEGGI DI MENDEL: LE ECCEZIONI APPARENTI

Subito dopo la riscoperta di Mendel, iniziò la ricerca di spiegazioni dei casi di non allineamento alle sue leggi, questo sia per negare la validità generale del mendelismo, sia, quando spiegate, per contraddire gli oppositori definendole eccezioni apparenti. Formalmente, vere eccezioni alle leggi di Mendel esistono: i libri di testo citano, per esempio, l'epistasi, l'eredità poligenica e gli alleli multipli allo stesso locus genetico. Relativamente alle eccezioni solo apparenti, già Bateson (1909) faceva una osservazione di singolare importanza "*Fate tesoro delle eccezioni in cui vi imbattete*". Queste eccezioni, per essere considerate tali, necessitano, però, che esista una teoria dalla quale si discostano. Nel caso della sua spiegazione dell'ereditarie, l'aver proposto una teoria è stato il più grande merito: ha offerto una regola per mettere in discussione fatti, o dati, o altre ipotesi le cui conclusioni erano prima accettate come tali. Mendel ha considerato alcune di queste eccezioni che lo hanno, per esempio, forzato a ipotizzare l'esistenza di fattori genetici ripetuti o di ibridi con progenie non segreganti che producevano gameti tutti uguali. Queste ed altre eccezioni, più o meno apparenti, sono brevemente presentate di seguito.

Allopoliploidia

Secondo Mayr (1982), Joseph Gottlieb Kölreuterer è stato il primo a proporre la nascita di una nuova specie dall'incrocio interspecifico. Aveva incrociato Nicotiana rustica con N. paniculata e osservato la costanza delle piante F1 ottenute. Gli ibridi, pur vigorosi, erano, però, sterili. Si specializzò nelle ibridazioni interspecifiche: ne produsse moltissime a partire da almeno 138 specie. Anche Carl Friedrich Gärtner adottò questo approccio effettuando circa 10.000 incroci e ottenendo 250 ibridi diversi. Una delle eccezioni apparenti alle leggi di Mendel riguardava il comportamento di diversi ibridi interspecifici che generavano progenie F2 composte da piante tutte uguali, i cosiddetti "constant species-hybrids" (Correns, 1901; Winge, 1917, 1932). Nella discussione delle Versuche, anche Mendel fa acutamente osservare che esistono ibridi fertili che danno progenie

sempre uguali ai genitori, comportamento che li può far considerare specie pure nate dall'incrocio. Questi casi sono riportati da Gärtner per A*quilegia atropurpurea canadensis*, *Lavatera pseudoalba thuringiana*, *Geum urbanorivale* e alcuni ibridi di *Dianthus* (nonchè di *Salix*, secondo Wichura, specifica Mendel). Oggi sappiamo che questi casi erano relativi a situazioni allopoliploidi derivanti dalla fusione di gameti non ridotti. Mendel, correttamente, interpreta questi ibridi proponendo che le loro cellule riproduttive siano tutte uguali per il contenuto ereditario: gli allopoliploidi, come più tardi si è verificato, hanno cromosomi che si appaiano in bivalenti (e non in tetravalenti), condizione che sostiene nell'ibrido la trasmissione inalterata dei genomi dei due parentali; da qui la stabilità fenotipica e genetica. È anche stato accertato che l'allopoliploidia è un importante modalità di speciazione, particolarmente nelle piante (Soltis e Soltis, 2009; Ramsey 2014). Parole di Mendel: "*gli esperimenti di J. G. Kölreuter, Gärtner e di altri che riportano la trasformazione di una specie in un'altra via fecondazione artificiale, meritano una particolare attenzione*"; è importante sottolineare con Gärtner che questi casi sono tra i più difficili tra quelli da analizzare dopo ibridazione.

Fattori genetici ripetuti

Nelle Versuche, Mendel annota che alcune delle varietà di pisello considerate inizialmente potevano essere sottospecie di *Pisum sativum*. Altre potevano appartenere alle specie *P. quadratum*. *P. saccharatum*, *P. umbellatum*. Osserva che è spesso difficile differenziare gli ibridi tra varietà da quelli tra specie. Tuttavia, fa notare che per realizzare esperimenti come i suoi, bisogna assolutamente evitare gli ibridi sterili o parzialmente sterili, situazione che elimina dall'analisi gli ibridi interspecifici. Quando tratta degli esperimenti con altre specie di piante, introduce e commenta le segregazioni da incrocio tra linee di fagiolo. Qui considera prima *Phaseolus vulgaris* x *P. nanus*, concludendo che i risultati si allineano a quelli del pisello (oggi sappiamo che si trattava di due varietà della stessa specie). In un secondo caso, descrive gli ibridi tra *P. nanus* (*P. vulgaris*) e *P. multiflorus* (*P. coccineus*). I fiori F1 avevano un colore intermedio tra quello dei genitori e le piante erano altamente sterili. Alcuni dei caratteri considerati presentavano rapporti di segregazione veramente anomali, con la comparsa del fenotipo recessivo molto in difetto. E qui Mendel ne approfitta per proporre un'interpretazione che, suo merito spesso dimenticato, introduce una spiegazione basata su fattori ereditari ripetuti, basati sui rapporti di segregazione 15:1 e 63: 1 (Diese färbung ist in der rehie nur einmal enthalten, und könnte daher auch nur in durchshnitte unter je 16, bei drei farbenmerkmalen sogar nur unter 64 pflanzen einmal entwickelt werden; il colore (bianco) è stato osservato una sola volta; potrebbe comparire, in media, in un caso su 16; se fossero coinvolti tre fattori (ereditari), una volta su 64). Negli anni Settanta del secolo scorso, A. M. Ibrahim e D.P. Coyne (1975) hanno ripetuto questo incrocio, riportando che la comparsa di fiori rosa in F1 si osserva solo nell'incrocio interspecifico *Ph. vulgaris*, fiore bianco, utilizzato come portaseme e *Ph. coccineus* scarlatto come donatore di polline (e non nell'incrocio con maschio e femmina invertiti). Ipotizzano che il controllo del colore ha anche una componente citoplasmatica.

Apomissia

Nogler (2006), in una pubblicazione ospitata dalla rivista Genetics dal titolo "The lesser-known Mendel: his experiments on *Hieracium*", descrive nei dettagli la più cocente delusione scientifica di Mendel. La sperimentazione su *Hieracium* indicava che gli ibridi F1 non erano uniformi come quelli del pisello, ma molto variabili da pianta a pianta. Al contrario, la generazione F2 era uniforme, cioè non segregava come invece accadeva nelle F2 di pisello. In una lettera a Nägeli, Mendel considera fino a che punto *Pisum* e *Hieracium* possono rappresentare due diversi tipi di eredità. Nei primi anni dopo la riscoperta delle

leggi di Mendel, questa visione era condivisa anche da De Vries, Correns e Bateson. Solo dopo anni dalla pubblicazione di dati embriologici sulla partenogenesi (Juel, 1898, 1900), divenne chiaro che le specie di *Hieracium* sono tra le poche angiosperme che hanno embrioni derivanti da cellule materne 2n, cioè che il genere ospita in larga parte specie apomittiche dove le progenie derivate da seme sono cloni del genotipo materno. È evidente che, invece, il paziente lavoro di impollinazione manuale, che Mendel praticava in *Hieracium*, produceva semi (rari) da cellule uovo con ploidia ridotta e da gameti maschili trasferiti dall'operatore, rivelando così in F1 tutta l'eterozigosi dei parentali (che invece Mendel considerava linee pure perché composte da piante tutte uguali perché derivanti da apomissia, ma certamente geneticamente eterozigoti).

Mendel aveva studiato almeno 20 specie appartenenti a generi molto diversi come possibili soggetti di indagine (tra altre, *Antirrhinum*, *Lychnis*, *Mirabilis*, *Zea*). Decise per *Pisum* e poi per *Hieracium*, in questo caso rivolgendosi a Nägeli, rinomato professore e specialista del genere *Hieracium*. La corrispondenza con Nägeli è stata pubblicata da Correns (1905) e consiste di 10 lettere. Nella prima lettera a Nägeli, Mendel comunica che ha iniziato esperimenti con *Geum*, *Hieracium* e *Cirsium*: Nägeli risponde incoraggiandolo (Iltis, 1924). Il primo incrocio di successo (*H. praealtum* X *H. stoloniferum*) produsse 4 semi, solo uno ibrido. Mendel si dedicò, negli anni successivi, a migliorare il metodo di impollinazione artificiale, molto laborioso: secondo Correns (1924) fu in grado di ottenere centinaia di piante F1 da 21 combinazioni di incrocio (derivanti da migliaia di emasculazioni!). Quando dispose di più ibridi F1 per lo stesso incrocio, notò con disappunto che entro incrocio erano estremamente variabili. In un incrocio di *H. pilosella* raggiunse il numero di 29 piante F1 ibride, tutte diverse le une dalle altre. Anche in un incrocio di *H. auricola* (una specie oggi nota per riprodursi solo sessualmente) X *H. aurantiacum*, le 84 piante F1 erano variabili. Questo esperimento fu ripetuto da Ostenfeld nel 1910 e diede gli stessi risultati. Nella generazione F2 le piante ottenute da Mendel risultarono uguali tra di loro. Nella pubblicazione relativa ai dati di *Hieracium* (1869), Mendel scrive: "*Bei Pisum haben die Bastarde (…) in allen Fällen den gleichen Typus, ihre Nachkommen dagegen sind veränderlich und variiren nach einem bestimmten Gesetze. Bei Hieracium scheint sich nach den bisherigen Versuchen das gerade Gegentheil davon herausstellen zu wollen; in Pisum le piante degli ibridi F1 sono simili, mentre la progenie derivante da loro varia secondo una regola precisa. In Hieracium gli esperimenti finora effettuati indicano il contrario*". L'ultimo esperimento di Mendel considerava l'incrocio *H. praealtum* X *H. aurantiacum*, dove con il reicrocio a *H. aurantiacum* aumentava la formazione di seme sulle piante F1; ma ancora i rapporti di segregazione non si allineavano con le regole stabilite per *Pisum* (dall'ultima lettera a Nägeli con i risultati e il commento su *Hieracium*). I dati ottenuti, e la mancata risposta di Mendel alle due ultime lettere del 1874 e 1875 di Nägeli, possono avere influenzato quest'ultimo ad assumere un atteggiamento scettico verso il contributo di Mendel. È certo che, al tempo della riscoperta di Mendel, coloro che discussero e proposero le conclusioni di Mendel ritenevano ancora che i comportamenti ereditari si allineassero alle regole valide per *Pisum* e, alternativamente, alle situazioni osservate in *Hieracium*. È vero che già nel 1881 Focke aveva riportato il caso di molti ibridi fenotipicamente stabili, così come Millardet (1894; citato da Bateson 1906) pubblicava i risultati relativi a "falsi ibridi", ma di fatto anche un accanito propugnatore delle regole di Mendel come Bateson, nel 1902 sosteneva la differenza tra *Pisum* e *Hieracium*, per poi ricredersi nel 1909. È stato C.H. Ostenfeld (1904) che per primo ha interpretato il caso *Hieracium* come dovuto alla partenocarpia risultante in uova 2n. Correns, nel 1905, si salvò in corner scrivendo che la partenogenesi nelle piante è rara al punto da comprendere che sia Mendel che De Vries non l'abbiano considerata. Conclusione: le leggi di Mendel per un certo periodo di anni, pur riscoperte, non furono immediatamente riconosciute di validità generale.

I risultati di Mendel relativi a *Hieracium* vengono interpretati, di solito, negativamente (Van Dijk e Ellis 2016). In realtà, in una pagina andata persa della prima lettera di Mendel a Nägeli, egli dimostrava una accentuata attenzione ai cosiddetti "ibridi costanti", ritenuti essenzialmente diversi dagli "ibridi variabili" come quelli di pisello. Mendel considerava i due diversi tipi di ibridi come la manifestazione di una legge dell'eredità ancora più fondamentale.

Semidominanza

Già Mendel aveva notato che negli incroci tra specie di *Phaseolus* il colore di fiori era intermedio. Anche il periodo di fioritura dei piselli si comportava nello stesso modo. Correns (1900) notò che certi fattori genetici sono semidominanti con F1 intermedia tra il fenotipo dei genitori. Bateson confermò la semidominanza negli incroci tra polli bianchi e neri, così come Cuènot per il colore del pelo nei topi. Tuttavia, le generazioni degli ibridi segregavano come atteso, confermando, seppur in casi complessi, le leggi di Mendel.

Il rapporto numerico tra i sessi

Il rapporto viola la regola del 3:1 e nella larghissima maggioranza delle specie è allineato a 1:1. Già prima di Mendel, riflettendo sul rapporto tra sessi, veniva ipotizzato un controllo relativamente semplice. Nel decennio 1840-1850 erano stati scoperti i cromosomi. W. S. Sutton (1902) nella tesi di dottorato aveva descritto la segregazione dei cromosomi di Brachystola magna, ciascuno di essi identificato singolarmente. Insieme a Theodor Boveri propose che l'associazione tra cromosomi materni e paterni e la loro successiva separazione durante la gametogenesi poteva rappresentare la base fisica delle leggi mendeliane. Nettie Stevens ed Edmund Wilson, indipendentemente, descrissero il comportamento dei cromosomi X e Y, ritenuti da Erwin McClug come i determinanti del sesso (Geraci, 2001). Nel 1910-1911, Thomas Hunt Morgan provò il loro ruolo nell'ereditarietà. In particolare, confermò la loro partecipazione al determinismo del rapporto 1:1 tra i sessi. Negli incroci tra femmine (cromosomi X X) a occhi rossi, omozigoti per l'allele R, e maschi X Y a occhi bianchi (allele r), nelle F1 sia le femmine (XR XR o XR Xr) che i maschi (XR Y) avevano occhi rossi. Nelle loro F2 nessuna femmina aveva occhi bianchi (perché riceveva sempre un allele R dai maschi XR Y), con l'assenza di colore presente invece nel 50% dei maschi (erano XR Y o Xr Y). L'interpretazione fu che il gene responsabile del controllo del colore degli occhi era localizzato sul cromosoma X, cioè, in generale, che i determinanti ereditari erano ospitati dai cromosomi. Negli anni successivi il gruppo di Morgan scoprì il linkage genetico tra geni ospitati in modo lineare sui cromosomi. Si evidenziava, così, che la legge di Mendel della segregazione indipendente dei caratteri, poteva avere delle importantissime eccezioni che però non la negavano.

Fattori gametofitici

In studi citogenetici postmendeliani si era notato che i granuli di polline possono avere un successo differenziale nella fecondazione, determinando così rapporti di segregazione non allineati alle regole di Mendel (Pfahler, 1965, 1967). Questo comportamento dei grani pollinici è dovuto a quelli che i genetisti del mais indicano come fattori gametofitici (loci Ga-ga). In senso lato, la stessa terminologia si può anche usare per fattori gametofitici che influenzano lo sviluppo dell'ovulo (come lethal ovule 1 e 2, sempre del mais). In questa pianta, i fattori gametofitici che si esprimono nei granuli di polline hanno alleli Ga che determinano un vantaggio competitivo su quelli ga nella fecondazione di piante Ga Ga o Ga ga, ma non ga ga. Fa eccezione a questa regola il locus genetico ga7 localizzato sul cromosoma 3 (Nelson, 1994). La fecondazione differenziale altera la trasmissione dei fattori genetici concatenati ai loci ga, generando segregazioni che, apparentemente, sono diverse da quelle attese in base alle regole mendeliane e ai dati di linkage.

CONCLUSIONI

L'applicazione di metodi quantitativi matematici e statistici alla botanica non aveva antecedenti prima della pubblicazione delle Versuche (Henig, 2000). Mendel, inascoltato per 34 anni, offrì una teoria semplice, verificabile da qualsiasi ricercatore. Centrale era la persistenza della separazione negli ibridi delle "*Anlagen*" tracciate da stati alternativi dei caratteri (Mayr, 1982). Dopo la sua riscoperta, il mendelismo fu accettato anche dagli studiosi dei caratteri a variabilità continua. La matematica della genetica di popolazione, basata sull'equilibrio di Hardy-Weinberg del 1908, assume che la frequenza di due alleli dello stesso locus rimane costante nelle generazioni, a meno che venga modificata da migrazione, mutazione, selezione, accoppiamenti non casuali. I proponenti accettarono il mendelismo, nel senso di considerare nelle loro analisi alleli alternativi e trasmissibili (Mayr, 1982). Sarà poi Ronald Aylmer Fischer a precisare che la variabilità continua di un carattere non dipende dall'ambiente ma da fattori mendeliani multipli con piccoli effetti fenotipici. Cadeva così un importante bastione che divise, per anni, la genetica dei mutanti da quella di caratteri complessi. È stato commentato che è impossibile che Mendel non abbia compreso l'interazione tra mutazione e selezione naturale, una introduzione che inevitabilmente conduce a interpretare l'evoluzione organica (Cavalli-Sforza, 2002-2003); anche questa è una conquista nata da banali incroci tra varietà di una pianta coltivata.

La genetica nasce con Mendel, fondatore celebrato dai testi delle scuole di tutti i livelli. Non è sempre stato così: morì senza essere riconosciuto dai contemporanei e anche il suo Convento, nell'annunciarne la morte, dimenticò di celebrarlo per i risultati dei suoi esperimenti (Accademia Nazionale dei Lincei, 1984). Certamente trovò ascolto presso gli specialisti di miglioramento delle piante. In Boemia, un plant breeder locale diede il nome "Prelate Mendel" a una vigorosa varietà di *Fuchsia monstrosa*. In Italia, Nazareno Strampelli, che fin dal 1904-1907 utilizzò l'incrocio per migliorare i frumenti, diede il nome "Gregorio Mendel" a una sua costituzione commentando: "*Questo frumento cui volli dedicare il nome venerato di quel sapiente naturalista che dettò le leggi che tanto utile guida mi furono nei miei lavori di ibridazione, è quello che porta il no. 133 fra i 256 ottenuti per l'incrocio Rieti x Principe Alberto*" (Montalenti, 1984).

NOTE

1. Battezzato con il nome di Johann, a Mendel fu dato il nome di Gregor alla sua entrata in Convento. Fu ordinato sacerdote nel 1847.
2. Darwin non considerò quanto gli suggeriva il cugino Francis Galton, scienziato molto noto, che gli raccomandava di leggere il testo di W.O. Focke del 1881, incluse i richiami all'eredità dove Focke citava Mendel almeno 15 volte. Come evidente dalle sue note sulla trasmissione dei caratteri, Galton si avvicinava al mendelismo e, tra il 1875 e il 1876, in diverse lettere suggeriva a Darwin di famigliarizzarsi con il pisello per accertare se un "certo" Mendel aveva ragione (Wallace, 2002-2003).
3. Nel Dipartimento di Storia naturale e Agricoltura della Facoltà di Filosofia, la direzione era tenuta da Johann Karl Nestler che si interessava di trasmissione dei caratteri, specie negli animali.
4. Dalla figura, ripresa dalle Versuche, si desume visivamente la posizione di Mendel relativa alla trasmissione dei caratteri via gameti maschili e femminili.
5. La pubblicazione del 1866 fu preceduta da due presentazioni alla Società per le Scienze Naturali di Brno. Alle due riunioni, dell'8 febbraio e dell'8 marzo 1865, parteciparono 40 tra accademici e cultori di biologia vegetale.
6. Più corretto sarebbe indicarle, con Bateson (1902, 1909), come i principi dell'eredità.

7. Gärtner, però, non riteneva che dagli incroci interspecificsi si potessero generare nuove specie (Wallace, 2002-2003). Che questo fosse possibile era comunque accettato da molti, Mendel incluso (si legga la sezione Allopoliploidia).

8. Correns pubblicò la corrispondenza di Mendel con Nägeli; di questo suo insegnante, Correns aveva sposato la nipote (Rocchi, 2022).

9. Nelle prime discussioni seguite alla riscoperta di Mendel, ha poi ammesso Bateson nel 1909, si era inclini a credere che il caso Hieracium fosse molto diverso da quello di Pisum.

10. Dopo la morte di Mendel, Gustav von Niessel ricordò ufficialmente Mendel in una seduta della Società di Scienze naturali di Brno della quale era stato membro, senza però accennare ai suoi esperimenti con le piante. A Mendel riscoperto, von Niessel, ancora vivo, raccontò a Hugo Iltis, il primo biografo di Mendel, che questi era uso dire ai suoi amici che "il mio tempo verrà" (Rocchi, 2022), intuendo, cioè, un futuro che si sarebbe realizzato.

BIBLIOGRAFIA

Abbondandolo A., 2015. Mendel e Darwin: la nascita della biologia moderna. https://www.uaar.it/uaar/ateo/archivio/2015_1_art1.html/

Accademia Nazionale dei Lincei, 1984. Johan Gregor Mendel. 1822-1884. Catalogo della mostra a cura di Geherard Czihac. Trad. A.M. Fidora. Argos, Roma.

Accademia Nazionale dei Lincei, 2001. Centenario della riscoperta delle leggi di Mendel. Atti Convegni Lincei no. 169. Roma.

Bateson W., 1902. Mendel's principles of heredity: A defense. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Bateson W., 1906. The progress of genetics since the rediscovery of Mendel's papers. Progr. Res. Bot. 1: 368–418.

Bateson W., 1909. Mendel's principles of heredity. pp. xiv e 396. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Bateson, 1902, pp. 96–103, and in W. Bateson, 1909, pp. 362–368).

Bianchi A., 1968. Esperimenti su ibridi di piante di Gregor Mendel. Ann. Facoltà Agraria Università Cattolica Anno VIII: 5-44.

Bianchi A., 1997. Genetica Agraria, missione di vita. Edizioni Informatore Agrario, Verona.

Cavalli-Sforza L.L., 2002-2003. Mendel's Greatness. In: Albano C., Wallace M., Kemt M., 2002-2003. Gregor Mendel, the genius of genetics. A celebration of Gregor Mendel through Science and Art. An exhibition at the Abbey of St. Thomas, Brno. Verainigung zur Forderung der Genomforschung, VFG, Vienna.

Correns C., 1900. Mendel's regel uber das verhalten der nachkommenschafter rassebastarde. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 18: 158-168.

Correns C., 1901. Ueber bastarde zwischen rassen von Zea Mays, nebst einer bemerkung uber die "faux hybrides" Millardet's und die "unechten bastarde" de Vries. Ber. Dt. Bot. Ges. 19: 211–220.

Correns C., 1905. Gregor Mendel's briefe an Carl Nägeli 1866–1873. Ein nachtrag zu den veröffentlichten bastardierungsversuchen Mendels. Abh. Math. Phys. Classe Kgl. Sächs. Ges. Wiss. 29: 189–265.

Correns C., 1924. Reprint in Gesammelte Abhandlungen, pp. 1233–1297. Springer, Berlin.

Czihac G., 1984. Premessa. In: Accademia Nazionale dei Lincei, 1984. Johan Gregor Mendel. 1822-1884. Catalogo della mostra a cura di Geherard Czihac. Trad. A.M. Fidora. Argos, Roma.

Darwin C., 1859. On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favored races in the struggle for life. John Murray, London.

De Vries H., 1900a. Sur la loi de disjunction des hybrides. Comtes Rendus de l'Académie des Sciences 130: 845-847.

De Vries H., 1900b. Sur les unités des charactères spécifiques et leur application à l'étude des hybrids. Rev. Gén. Bot. 12: 257-271.

De Vries H., 1900c. Das spaltungsgesetz der bastarde. Ber. Deutsc. Bot. Gesell. 18: 83-90.

East E. M., 1923. Mendel and his contemporaries. The Scientific Monthly 16: 225-237.

Fantini B., 2001. 100 anni di genetica: le leggi di Mendel e la filosofia della vita. In: Accademia Nazionale dei dei Lincei, 2001. Centenario della riscoperta delle leggi di Mendel. Atti Convegni Lincei 169. Roma.

Focke W. O., 1881. Die Pflanzen-Mischlinge. Ein beitrag zur biologie der gewächse. Borntaeger, Berlin.

Gärtner C. F., 1849. Versuche und beobachtungen uber die bastarderzeugung im pflanzenreiche. Hering und Comp., Stuttgard.

Geraci G., 2001. Genetica biochimica. Una visione storica ed epistemologica delle linee di pensiero e dei principali contributi scientifici che hanno portato alla moderna genetica. In: Accademia Nazionale dei Lincei, 2001. Centenario della riscoperta delle leggi di Mendel. Atti Convegni Lincei 169. Roma.

Henderson M., 2008. 50 grandi idee di genetica. Edizioni Dedalo, Bari.

Henig R. M., 2000. A monk and two peas. The story of Gregor Mendel and the discovery of genetics. Weidenfeld & Nicolson, London.

Ibrahim, A.M.; Coyne, D.P., 1975. Genetics of stigma shape, cotyledon position, and flower colour in reciprocal crosses between Phaseolus vulgaris L. and Phaseolus coccineus Lam. and implication in breeding. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 100: 622–626.

Iltis H., 1924. Gregor Johann Mendel: Leben, Werk und Wirkung. Springer, Berlin.

Juel H. O., 1898. Parthenogenesis bei Antennaria alpina (L.). R. Br. Bot. Centralblatt 74: 369–372.

Juel H. O., 1900. Vergleichende untersuchungen uber typische und parthenogenetische fortpflanzung bei der Gattung Antennaria. Kgl. Svenska Vetenskapsakad 33: 1–59.

Kölreuter D. J. G., 1761-1766. Vorläfige nachricht von einigen das geshlecht der pflanzen bettrefenden versuchen und beobachtungen, nebst fortsetzungen. W. Pfeffer, Leipzig.

Lewontin R., 2004. Il sogno del genoma umano ed altre illusioni della scienza. Laterza, Roma-Bari.

Mayr E., 1982. The growth of biological thought. Diversity, evolution, and Inheritance. Belknap Press, Cambridge, London.

Mayr E., 1988. Toward a new philosophy of biology. Belknap Press, Cambridge, London.

Mendel G., 1866. Versuche uber Pflanzen-Hybriden. Verkandhungen Naturforschenden Veraines, Bande IV. Brünn, Georg Gastl's Buchdrucherei.

Mendel G., 1869. Ueber einige aus künstlicher Befruchtung gewonnenen Hieracium-Bastarde. Verh. Naturf. Ver. Brünn 8: 26–31. (English translation: On Hieracium hybrids obtained by artificial fertilisation. In W.

Millardet A., 1894. Note sur l'hybridation sans croisement ou fausse hybridization. Mém. Soc. Sci. Phys. Nat. Bordeaux 4: 347–372.

Montalenti G., 1984. Presentazione. In: Accademia Nazionale dei Lincei, 1984. Johan Gregor Mendel. 1822-1884. Catalogo della mostra a cura di Geherard Czihac. Trad. A.M. Fidora. Argos, Roma.

Morgan T. H., 1910. Sex limited inheritance in Drosophila. Science 32: 120-122.

Morgan T. H., 1911. Random segregation versus coupling in Mendelian inheritance. Science 36: 384.

Nelson O. E., 1994. The gametophyte factors of maize. The Maize Handbook, M. Freeling, V. Walbot, eds. Springer-Verlag, New York.

Nogler G.A., 2006. The lesser-known Mendel: his experiments on Hieracium. Genetics 172: 1-6.

Ostenfeld C. H., 1903. English abstract on Raunkiær (1903). Bot. Centralblatt 93: 81–83.

Ostenfeld C. H., 1910. Further studies on the apogamy and hybridization of the Hieracia. Zeitschrift für induktive Abstammungs und Vererbungslehre 3: 241–285.

Ostenfeld C. H.,1904. Weitere beiträge zur kenntnis der fruchtentwicklung bei der Gattung Hieracium. Ber. Dt. Bot. Ges. 22: 537–541.

Pfahler, P. L., 1965. Fertilization ability of maize pollen grains. I. Pollen sources. Genetics 52: 513–520.

Pfahler, P. L., 1967. Fertilization ability of maize pollen grains. I. Pollen genotype, female sporophyte, and pollen storage interactions. Genetics 57: 513–521.

Ramsey J., 2014. Ecological studies of polyploidy in the 100 years following its discovery. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0352.

Rocchi M., 2022. A 200 anni dalla nascita di Gregor Mendel. (L'autore esplicitamente fa notare di avere largamente attinto al libro di Robin Marantz Henig).

Soltis D. E., Soltis P.S., 2009. The role of hybridization in plant speciation. Annu. Rev. Plant Biol. 60: 561–588.

Sutton W. S., 1902. On the morphology of the chromosome group in Brachystola magna. Zoological Bullettin 4: 24-29.

van Dijk P. J., Ellis T. H. N., 2016. The full breadth of Mendel's genetics. Genetics 204: 1327–1336.

Wallace M., 2002-2003. The genius of genetics. In: Albano C., Wallace M., Kemt M., 2002-2003. Gregor Mendel, the genius of genetics. A celebration of Gregor Mendel through science and art. An exhibition at the Abbey of St. Thomas, Brno. Verainigung zur Forderung der Genomforschung, VFG, Vienna.

Winge Ø., 1917. The chromosomes: their number and general importance. Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg 13: 131–275.

Winge Ø., 1932. On the origin of constant species-hybrids. Sven. Bot. Tidskr. 26: 107–122.

IL MENDELISMO IN ITALIA: ANGELO BIANCHI E LO STUDIO DELLE MUTAZIONI

Basilio Borghi[1]

Riassunto

Viene ricordato il ruolo di Angelo Bianchi nel promuovere in Italia gli studi di genetica agraria. Al rientro in Italia dopo un importante stage ad Harvard nel laboratorio di Paul C. Mangelsdorf dove ebbe l'opportunità di frequentare i più famosi genetisti del mais statunitensi tra cui il premio Nobel Barbara Mc Clintock, individuò e descrisse, a partire da un'ampia collezione di varietà italiane di mais, fenotipi mutanti della cariosside, delle plantule e della pianta prevalentemente a base genetica mono-mendeliana. Vengono ricordati alcuni esempi di ricerche condotte dal gruppo Bianchi quali l'analisi della variabilità somatica nell'incrocio tra due diversi alleli o2 recessivi, e dalla "cattura" e sequenziamento del trasposone responsabile delle variegazioni osservate. Un secondo caso di rilevante importanza scientifica è stato l'induzione, via trasposizione dell'elemento Ds (Dissociator) di Mc Clintock, della mutazione 2F11 al locus Adh.

Disponendo di risorse finanziarie e strumentali limitate Bianchi operò adottando una metodologia sperimentale semplice e poco costosa coniugata con un approccio scientifico molto sofisticato che gli consentì di venir annoverato tra i migliori genetisti del mais a livello mondiale. Nonostante il perdurante ostracismo del mondo accademico agronomico, in pochi anni riuscì ad allevare un gruppo di una quindicina di ricercatori, suoi allievi diretti o che facevano riferimento al suo gruppo, che sono diventati titolari di cattedre universitarie o hanno occupato posizioni equivalenti in centri di ricerca italiani e stranieri.

Quanti hanno avuto il privilegio di condividere con Angelo Bianchi un tratto di strada ricordano con profonda stima la sua forte determinazione nel perseguire gli obiettivi che si era prefissato sin da giovane, la straordinaria generosità nel condividere con i collaboratori i frutti della ricerca, la capacità di gestire gli ostacoli anche di tipo economico incontrati nella prima fase della carriera adottando uno stile di vita sobrio che è rimasto un tratto distintivo dell'intera sua vita.

Abstract

Mendelism in Italy: Angelo Bianchi and the study of mutations

The role of Angelo Bianchi in promoting agricultural genetics studies in Italy is recalled. Upon returning to Italy after an important stage at Harvard in the laboratory of Paul C. Mangelsdorf

[1] Direttore di Centri di Ricerca (MiPAF e FEM) in pensione

where he had the opportunity to meet the most famous American maize geneticists including the Nobel prize Barbara Mc Clintock, he identified and described, starting from a wide collection of Italian varieties of maize, mutant phenotypes of kernels, seedlings and plants mainly based on mono-Mendelian genetics. Some examples of research conducted by the Bianchi group are mentioned, such as the analysis of somatic variability in the crossing between two different recessive o2 alleles, and the "capture" and sequencing of the transposon responsible for the observed variegations. A second case of significant scientific importance was the induction, via transposition of the Mc Clintock element Ds (Dissociator), of the 2F11 mutation at the locus Adh.

Having limited financial and instrumental resources, Bianchi operated by adopting a simple and inexpensive experimental methodology combined with a very sophisticated scientific approach that allowed him to be counted among the best maize geneticist in the world. Despite the persistent ostracism of the agronomic academic world, in a few years he created a group of about fifteen researchers who have become university professors or have occupied equivalent positions in national or international research centers

Those who have had the privilege to collaborate with Angelo Bianchi remind his strong determination in pursuing the objective to “genetize” agricultural research, the extraordinary generosity in sharing the fruits of research with collaborators, the ability to manage obstacles, also of an economic nature, encountered in the first phase of his career by adopting a sober lifestyle that has remained a distinctive feature of his entire life.

PREMESSA

Buongiorno, ringrazio gli amici Maggiore e Salamini che mi hanno affidato il gradito ma certamente non facile compito di ricordare il ruolo di Angelo Bianchi nel promuovere in Italia gli studi di genetica agraria. Il mio coinvolgimento diretto come collaboratore di Bianchi negli studi sulla genetica del mais, da lui avviati al rientro dagli Stati Uniti, è durato un paio di anni; successivamente ho continuato ad operare sotto la sua supervisione sino a quando nel 1998 lasciai l’istituto da lui diretto. Ho quindi avuto modo di conoscere profondamente l’uomo Bianchi, di operare nell’ambito della rete di collaboratori di cui si era circondato (il gruppo Bianchi) e di condividerne le peripezie, le amarezze, ma anche i successi che hanno contraddistinto la vita del caposcuola.

Suddividerò la presentazione in due parti: la prima per inquadrare il contesto in cui Bianchi si è trovato ad operare e la seconda per cercare di raccontare chi era l’uomo Bianchi e quali profondi insegnamenti ha trasmesso ad allievi e collaboratori.

LA RICERCA GENETICA IN ITALIA NELLA METÀ DEL SECOLO SCORSO

Angelo Bianchi maturò l’interesse per la genetica agraria a cavallo tra il quarto e il quinto decennio del secolo scorso, un periodo caratterizzato da forti tensioni tra gli studiosi di genetica. Può essere utile riassumere gli eventi sulla base di quanto raccontato in dettaglio da Lorenzetti (2014).

In Italia i cultori della genetica facevano riferimento alla Società Italiana di Genetica ed Eugenica (SIGE), fondata nel 1919. Nel ventennio fascista molti dei simpatizzanti del regime avevano operato nel settore dell’Eugenetica e contribuito allo sviluppo di idee razziste. Al termine del secondo conflitto mondiale, le personalità maggiormente coinvolte nella politica razziale vennero epurate e la SIGE, a partire dal 1949, si articolò in due sezioni, una di Eugenetica e una di Genetica. Nel settore del miglioramento genetico – specialmente di quello vegetale - operavano diversi costitutori privati; in quello pubblico, erano attivi a Roma l’Istituto Nazionale di Genetica per la Cerealicoltura e a Bologna l’istituto per l’Allevamento Vegetale per la Cerealicoltura. Nel 1949 viene istituito a Pavia il centro di ricerca Spallanzani che disponeva di una struttura localizzata a Rieti denominata Centro Appenninico di Genetica del Terminillo diretta dal Professor Carlo Jucci, ordinario di zoologia. Jucci svolgerà un ruolo importante a sostegno di coloro che si

occupavano delle applicazioni pratiche della genetica e introdusse Angelo Bianchi nel settore della genetica vegetale.

Sempre in questo periodo vennero istituite le prime cattedre di genetica. A partire dal 1951, la nuova generazione di genetisti teorici lasciò la vecchia SIGE dove, nonostante le epurazioni, erano ancora presenti vecchi cultori dell'eugenetica; nel 1953 Barigozzi, Buzzati-Traverso, Chiarugi e Montalenti fondarono l'Associazione di Genetica Italiana, AGI. Jucci, che sentiva la responsabilità di rappresentare a livello nazionale le aspettative dei miglioratori genetici, preferì rimanere nella SIGE quale presidente di una sezione per la Genetica Applicata. Questa scelta fu aspramente criticata da altri genetisti che lo attaccarono pubblicamente e violentemente in diverse occasioni (Lorenzetti 2014). Tra mille difficoltà, Jucci (allora Commissario dell'Istituto di Genetica per la Cerealicoltura di Roma) riuscì ad organizzare nel 1950 la prima Conferenza Internazionale di Genetica Vegetale che fu un grande successo: furono presentati 19 contributi di breeder italiani, 18 di stranieri e i partecipanti furono oltre 300. Jucci e i cultori della genetica applicata si convinsero che erano maturi i tempi per fondare una nuova società scientifica denomina Società Italiana di Genetica Agraria (SIGA); la dichiarazione ufficiale avvenne durante un convegno sui mais ibridi, a Vicenza ne 1954, e fu seguita dalla prima riunione della SIGA a Rieti (Terminillo) il 22 e 23 agosto 1954. Jucci svolse il ruolo di Presidente, carica che mantenne sino al suo decesso avvenuto nel 1962, avendo Bianchi come segretario.

Due forze contrapposte rendevano difficile la "genetizzazione" del settore agrario. Da un lato i genetisti puri criticavano le metodologie adottate dai miglioratori genetici del tempo che non avevano recepito il messaggio di Mendel, o ancor peggio si basavano su approcci antiscientifici rivolti alle teorie lysenkoiste. Buzzati-Traverso nel 1949, ad una conferenza tenuta presso la Società Agraria di Lombardia disse testualmente: "*…dal 1910 circa una rivoluzione è avvenuta nella biologia grazie allo sviluppo della genetica moderna… Ora ho l'impressione che coloro che si occupano del miglioramento delle sementi in Italia non si siano ancora accorti di questa rivoluzione e procedano quindi con quei criteri empirici che andavano bene un tempo ma non oggi*" (Lorenzetti 2014).

Dall'altro lato c'erano gli agronomi che temevano di venir colonizzati dalla nuova generazione di genetisti biologi, con Jucci e Bianchi in testa che rivendicavano lo strumento genetico come potente mezzo per introdurre significative innovazioni nel comparto agronomico.

Il compromesso raggiunto fu di bandire dalle facoltà di agraria la denominazione" genetica" per le nuove cattedre che per molti anni, verranno indicate col termine "allevamento vegetale" o "miglioramento genetico", assegnandole in prevalenza a studiosi provenienti dal settore agronomico.

BIANCHI E LA GENETICA AGRARIA

La formazione giovanile

Sin da giovane Bianchi è attratto dall'ambiente agreste: colleziona insetti, classifica le piante spontanee, è incuriosito dal fatto che su alcune spighe di mais coesistono granelli di tipo differente senza ottenere spiegazioni convincenti dai contadini che le avevano coltivate. Arriva in prima elementare conoscendo solo il dialetto pavese, in poco tempo si appropria della lingua italiana, ne approfondisce la grammatica, già alle medie è tra i migliori studenti e si procura le risorse per continuare gli studi senza gravare sulla famiglia. Frequenta le magistrali pensando di poter diventare maestro di scuola ma alla fine del quarto anno decide di presentarsi alla maturità classica a settembre. Ha successo e nell'ottobre del 1944 si iscrive alla Facoltà di scienze naturali che potrà frequentare grazie alla vincita di borse di studio. Un anno prima di conseguire la laurea pubblica il suo primo lavoro scientifico: uno studio sulle spighe fossili dell'Oligocene in Brianza; la specie

da lui indagata venne poi denominata *Triticoides bianchii*. Nel preparare la tesi di laurea si familiarizza con i metodi statistici e, ancora studente del terzo anno, viene incaricato di svolgere un corso di metodologia statistica per gli studenti del famoso collegio Ghisleri di Pavia.

L'incontro con la genetica

Fa la conoscenza della genetica frequentando il corso di zoologia generale tenuto dal professor Jucci, corso che trattava essenzialmente la genetica generale. Come argomento della tesi di laurea sceglie il mais e in particolare il comportamento di ibridi fra le cultivar di mais Marano Vicentino e Nostrano dell'Isola. Il lavoro di campo lo svolge presso l'Istituto nazionale di genetica per la cerealicoltura a Sant'Angelo Lodigiano dove operava Roberto Forlani. È durante questo periodo che Bianchi si familiarizza con altre specie quali frumento e pomodoro e matura il convincimento di dedicare la sua vita professionale allo studio della genetica vegetale, prestando particolare attenzione alle sue ricadute applicative.

Tuttavia, i tempi non erano ancora maturi per sviluppare le sue ambizioni; ~~e~~ per cinque anni Bianchi rimarrà nell'Istituto di Jucci occupandosi di aspetti genetici relativi ai topi in collaborazione con biologi e medici.

La genetica del mais

Finalmente, nel 1954 Bianchi vince una prestigiosa borsa di studio della National Accademy of Science di Washington che gli consentì di frequentare ad Harvard il laboratorio di Paul C. Mangelsdorf e di incontrare i più famosi genetisti del mais statunitensi. Bianchi racconterà che nei due anni trascorsi all'estero imparò più genetica agraria che negli otto anni precedenti in Italia. Al rientro nel nostro paese si rende conto di non poter aspirare ad una posizione stabile a Pavia per cui lascia il maestro Jucci che però sarà determinante nel fargli ottenere un sostegno finanziario dalla Rokfeller Foundation per proseguire in Italia gli studi sulla genetica del mais.

Riprende l'insegnamento della genetica vegetale a Piacenza e nell'ottobre del 1958 si trasferisce a Milano nella Facoltà di scienze nell'Istituto diretto dal Professor Barigozzi che gli affida tre borsisti che stavano svolgendo la tesi di laurea in agraria sull'impiego delle radiazioni ionizzanti nella mutagenesi sperimentale del mais.

Dall'America Bianchi era ritornato con alcune preziose bustine di seme di mais che contenevano linee omozigoti per i marcatori di diversi cromosomi, linee con marcatori multipli tra cui il *Mangelsdorf Multiple Tester* largamente utilizzato anche dai suoi allievi perché portava un marcatore genetico per ciascun cromosoma. C'erano infine le linee possedenti traslocazioni tra cromosomi A e cromosomi B (indicati come o soprannumerari), linee che, a causa delle frequenti non disgiunzioni dei cromosomi B, permettevano di rivelare, dopo mutagenesi, la presenza nella generazione F1 di mutanti localizzati sul braccio del cromosoma A traslocato.

Gli strumenti di lavoro di cui necessitava Bianchi per i suoi studi non differivano molto da quelli utilizzati in precedenza da Mendel e gli vennero messi a disposizione dalla Facoltà di agraria di Piacenza: un appezzamento di terreno su cui allevare i materiali genetici, un locale dove conservare il seme e analizzare le segregazioni nelle cariossidi, una piccola serra per individuare i mutanti allo stadio di plantula, un buon microscopio ottico. Si potrebbe dire una metodologia sperimentale semplice e poco costosa coniugata con un approccio scientifico molto sofisticato.

Il reclutamento e la formazione dei collaboratori

In termini di risorse umane, a Piacenza Bianchi trovò un assistente e un tecnico di laboratorio che seguivano principalmente le attività sul pomodoro, una specie di interesse per l'agricoltura locale. Jucci gli affidò una sua laureata, Marisa Pozzi, che per molti anni affianco Bianchi nella gestione del laboratorio In concreto, le sole forze su cui poteva far affidamento per svolgere le sue ricerche di genetica agraria erano gli studenti in tesi che, attratti da quanto raccontava a lezione e dalla lettura del suo volume "L'abc della genetica" arrivavano numerosi nel suo studio. Bianchi non aveva bisogno di manodopera a buon mercato ma di persone fortemente motivate e applicò ferrei criteri nel selezionare i tesisti: una frequenza assidua alle sue lezioni che teneva nell'orario meno favorevole per i giovani studenti, ossia le prime due ore del lunedì mattina, una prova d'esame approfondita e severa con il rischio di vedersi segnato sul libretto un giudizio negativo in caso di insuccesso, un impegno a frequentare assiduamente il suo istituto durante il tirocinio, la disponibilità a lavorare nel periodo primaverile estivo in campo per semina, impollinazione e raccolta del mais.

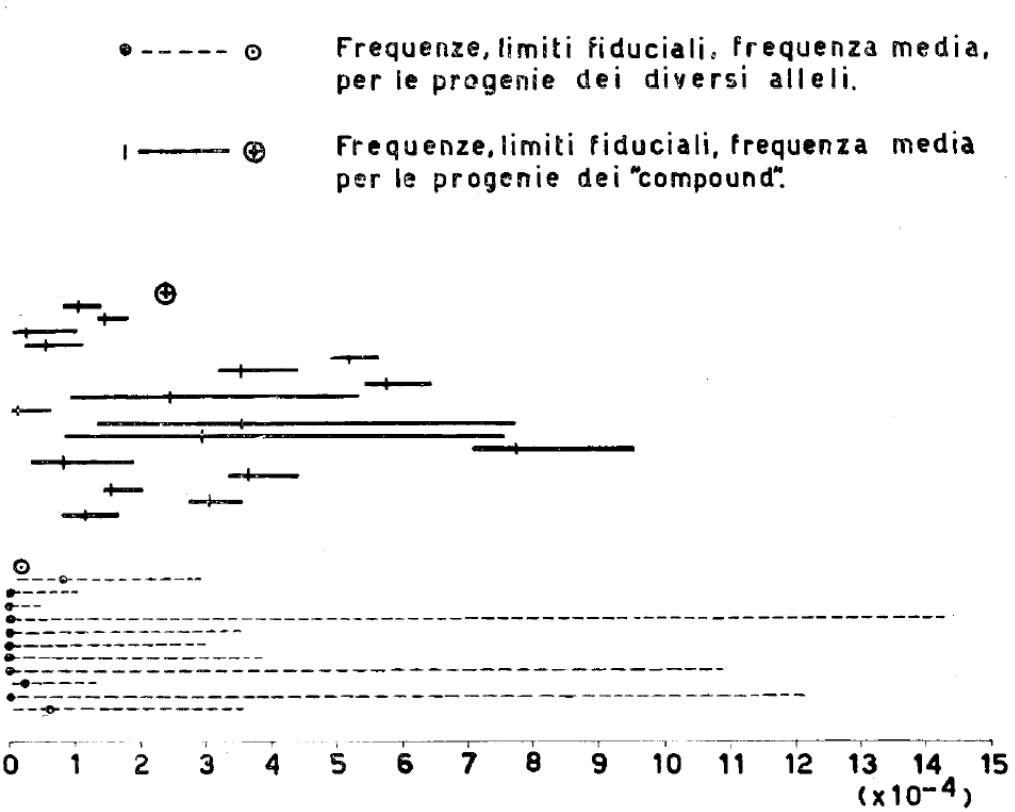


Figura 1 – Frequenze medie di reversione gl e relativi limiti di confidenza (scala arbitraria).

Nei primi quattro anni di docenza circa una dozzina di studenti si laureano con tesi da lui coordinate e molti diventarono poi suoi collaboratori. I rigidi criteri fissati per accettare studenti in tesi gli assicurava di poter contare su giovani dotati di capacità intellettuali, motivazioni personali e spirito di sacrificio. Dall'altro lato gli studenti ricevevano una formazione in grado di assicurare loro sbocchi professionali di successo anche se poi decidevano di percorreranno strade diverse. Bianchi assegnava a ciascun studente una specifica linea di ricerca e ne curava lo sviluppo e la divulgazione dei risultati attraverso note scientifiche nelle quali compariva, assieme al suo, il nome dei collaboratori. Non appena percepiva che lo studente si era impossessato della tematica gli concedeva ampia autonomia operativa se non addirittura la titolarità della ricerca non appena conseguita

la laurea. Citerò brevemente il mio caso personale. Fui particolarmente fortunato perché Bianchi mi indirizzò allo studio dei mutanti *glossy* riguardanti la presenza/assenza di cere delle superfici fogliari allo stadio di plantula, affidandomi a Francesco Salamini che l'anno prima aveva completato la tesi di laurea sull'argomento. Partecipai quindi allo studio delle frequenze dei diversi loci *gl* nelle popolazioni italiane e all'ottenimento dei primi dati sulle frequenze di reversione del tipo recessivo *gl* al fenotipo normale nei diversi isoalleli al locus *Gl1*, reversioni dovute a probabili eventi di ricombinazione intracistronica (fig. 1). Ancor prima della laurea ritrovai il mio nome in un paio di note sul Maize Genetics Newsletter. Lo studio sui mutanti *glossy* di mais comparve in due lavori, l'uno a nome Borghi e Salamini e l'altro Salamini e Borghi. Una nota del testo specificava "Lavoro eseguito ... sotto la direzione e con materiale fornito dal prof. A. Bianchi che qui si ringrazia". Questi erano i talenti che Angelo Bianchi consegnava ai suoi allievi per avviarli alla carriera scientifica!

Il gruppo Bianchi e i mutanti

L'interesse decisamente mendelista di Bianchi si è, almeno in parte, ripetuto nei suoi allievi che, chi più chi meno, hanno praticato studi di variabilità genetica discontinua. La specie modello era, all'inizio, il mais. Gli esperimenti genetici su questa pianta si sono avvalsi di mutazioni ben note, quasi sempre già mappate sui gruppi di *linkage*, ceppi genetici spesso richiesti alla Maize Genetics Cooperative. Tuttavia, avendo il Prof. Fenaroli (direttore dell'Istituto di Maiscoltura di Bergamo) messo a disposizione di Bianchi la collezione di germoplasma conservata a Bergamo (circa 600 varietà) Bianchi decise di procedere all'autofecondazione di 10-20 piante di ogni varietà; questo per controllare la presenza di segregazione per fenotipi mutati della cariosside, della plantula e, in parte, della pianta. I dati furono pubblicati a firma Salamini, Pozzi Lorenzoni. I mutanti a cariosside opaca furono richiesti da Oliver Nelson (che aveva pubblicato su *Science* l'effetto positivo della mutazione *opaco-2*) che riportò a Bianchi l'allelismo di uno dei mutanti ricevuti con il locus *O2*.

Il mutante fu poi caratterizzato e utilizzato in numerosi esperimenti condotti in Italia. Tra questi si può accennare al caso di variabilità somatica derivante dall'incrocio di due diversi alleli *o2* recessivi, e dalla "cattura" e sequenziamento del trasposone responsabile delle variegazioni osservate.

Un secondo caso di rilevante importanza scientifica è stato l'induzione, via trasposizione dell'elemento *Ds* (*Dissociator*) di Mc Clintock, della mutazione *2F11* al locus *Adh* (*Ds* era localizzato vicino al locus per l'alcool deidrogenasi). Il progetto fu condotto a Bergamo stimolato da Peter Starlinger (Università di Colonia). Il mutante indotto permise di isolare il trasposone *Ds*, questo esistendo al tempo una sonda molecolare per *Adh*. Il lavoro di isolamento di *2F11* fu pubblicato e tre degli autori della pubblicazione ricordata la utilizzarono con profitto: i) Starlinger via *Ds* isolò e sequenziò *Ac* (*Activator* di Mc Clintock), esperimento pubblicato in Nature; ii) Freeling, altro coautore, notò che la trasposizione di *Ds* ad *Adh,* presente in *2F11,* era accompagnata da una seconda trasposizione al gene *Knotted* (*K*); isolò quindi il gene via *Ds* e pubblicò in Embo J. il primo caso di gene homeobox descritto per le piante; iii) Salamini utilizzò la conoscenza relativa alla stretta associazione tra *Adh* e *K* di mais per verificare se esistesse anche in orzo tra *Adh* e il gene *Hooded*, mutante dominante come *K*. Lo studio fu pubblicato in Nature: *Hodded* era l'allele dominante di un gene homeobox. Nel mutante il lemma ospita un secondo fiore che può anche essere fertile.

I mutanti di orzo furono particolarmente considerati da Michele Stanca a Fiorenzuola. Per questa specie Stanca allevava ogni anno una collezione di mutanti dello sviluppo. Fu a Fiorenzuola che venne isolato l'importante mutazione *leafy lemma* che trasformava

l'arista in una struttura fogliare, sia pur ridotta. Sempre a Fiorenzuola furono indotti e mappati casi genetici di soppressione del fenotipo *Hooded*.

A Piacenza e poi a Montanaso Lombardo Soressi si dedicò con passione all'isolamento in pomodoro di mutanti potenzialmente utili per il miglioramento genetico. Riportò il caso del mutante recessivo *Brown seed* che permetteva di semplificare la produzione per la specie, di seme ibrido. Introdusse e caratterizzò anche mutanti per l'accumulo di antocianine e composti derivati, strategia poi condivisa da molti costitutori varietali. Attivo a Montanaso lombardo, Soressi si interessò anche di mutanti dell'anguria da eventualmente utilizzare per creare varietà ibride e di mutazioni del pomodoro che inducevano una elevata attività perossidasica. A Montanaso lombardo era anche stato iniziato un programma di miglioramento genetico del fagiolo per resistenza al Virus 1. Nell'ambito del programma venne attuato un esperimento di mutagenesi chimica che indusse stati chimerici per la struttura della pianta; si descrisse anche un mutante *Reduced leaf* nei suoi effetti sulla produzione.

Carlo Lorenzoni (Università di Piacenza; successore di Bianchi nell'insegnamento della Genetica vegetale) considerò per un lungo periodo la genetica formale del mais relativa a diversi geni come *cp1* (*collapsed endosperm 1*), *cp2*, *rt* (*rootless*), *spb* (spighette biflore), *opaco2*, *fl2* (*floury 2*). Adriano Marocco, subentrato a Lorenzoni nell'insegnamento di Genetica Agraria nel Dipartimento di Scienze delle produzioni vegetali sostenibili dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza ha continuato ed ampliato gli studi sul mais e si è fatto carico di mantenere l'ampia collezione di mutanti ottenuti da Bianchi e collaboratori come sintetizzato in Tabella 1.

Tabella 1 - Collezione di mutanti all'Università Cattolica - Piacenza

Tipologia	Numero di accessioni	Principali mutanti
Chlorophyll	72	pale green, yellow, albescent, luteus, fine stripe, high chlorophyll fluorescence, albino, virescent
Glossy	43	gl1, gl2, gl3, gl4, gl5, gl6, gl8, gl11, gl14, several alleles and gl-mutables
Kernel	60	defective endosperm, miniature, collapsed endosperm, reduced grain filling, opaque, waxy, orange pericarp
Plants	12	dwarf, knotted, tassel seed, lineate leaves, decussed, phytochrome-1, liguleless, vestigial glumes, teopod
Tester	12	MuDR (several copies), bz2:MuDR, tester Spm, C^{I} wx Ds

Una nota per concludere questo breve accenno agli interessi del gruppo Bianchi verso sistemi genetici analizzati con le collezioni e uso di mutanti. Queste attività non erano lontane da interessi applicativi. Per il caposcuola era sufficiente far notare che tutto quanto di genetica formale veniva sviluppato in piante agrarie era da considerarsi genetica applicata. L'elenco delle specie di piante coltivate considerate da Bianchi e dai suoi allievi e dagli Istituti da Lui diretti è veramente lungo: mais, frumenti, pomodoro, melanzana, peperone, fagiolo, zucchino, anguria, asparago, orzo, sorgo, canapa, riso, segale, avena.

Le angurie apireni

Vorrei infine ricordare le ricerche che Bianchi fece sull'anguria a partire dal 1958. Lo spunto ad occuparsene gli venne certamente dalla lettura dell'articolo del citogenetista giapponese Kihara che nel 1951 aveva dimostrato la possibilità di ottenere angurie apireni triploidi.

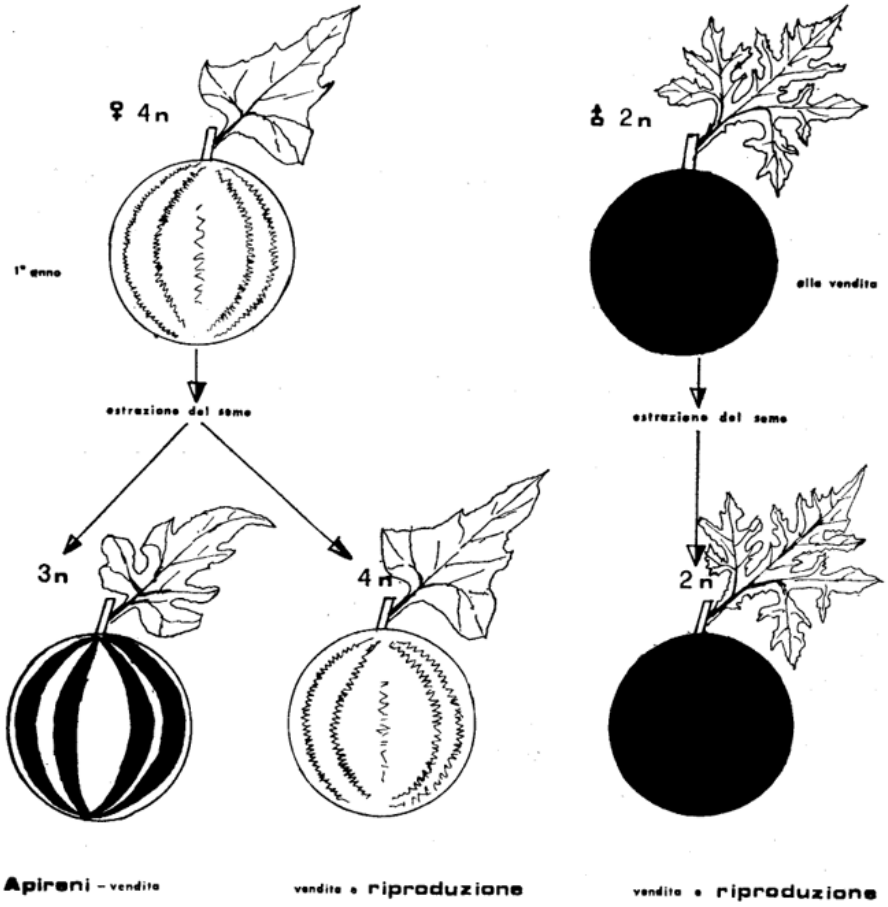


Figura 2 – Schema proposto per produzione commerciale di ibridi triploidi

I principi teorici erano semplici: si sviluppano linee tetraploidi trattando con colchicina varietà diploidi (figura 2). I tetraploidi così ottenuti vengono impollinati con varietà diploidi ottenendo individui triploidi. Allevando queste piante triploidi in presenza di impollinatori diploidi si ottengono frutti senza semi o solo con rudimenti seminali. Bianchi, avvalendosi della collaborazione di Ghidoni e Marchesi, ripercorse le tappe indicate da Kihara arrivando ad ottenere angurie triploidi apireni (Bianchi e Marchesi 1964,1968), figure 3 e 4. L'approccio era corretto ed anche gli aspetti pratici della produzione di seme triploide sembravano superabili grazie all'impiego di marcatori genetici monomendeliani delle foglie e della scorza dei frutti. I collaboratori di Bianchi a Piacenza ebbero modo di assaggiare le angurie ottenute da Bianchi ma è stato necessario attendere mezzo secolo per trovare gli stessi frutti sui bancali dei supermercati. Bianchi interruppe il lavoro perché si era reso conto che il passaggio dal modello teorico all'applicazione pratica richiedeva un lungo processo di miglioramento genetico, irrealizzabile nelle nostre strutture di ricerca. Fortunatamente negli Stati uniti operava un ricercatore Orie Jacob Eigsti che, in quanto a volontà nel conseguire gli obiettivi, non era certamente meno determinato di Bianchi. Inizialmente collaborò con Kihara in Giappone, poi nel 1954 fondò negli USA la "American Seedless Watermelon Corporation" che non ebbe grande successo: sino agli anni 70 del secolo scorso, infatti, angurie apireni venivano coltivate solamente da una azienda nell'Illinois e ancora nel 1985 le angurie senza semi occupavano solamente l'1% del mercato. Occorreva un ulteriore forte impegno finanziario e di ricerca ed Eigsti contattò le cinque maggiori società sementiere statunitensi che si defilarono perché lo

ritenevano un progetto senza futuro. Non si arrese; due anni più tardi costituì una partnership con Sun World International denominata “American Sunmelon” successivamente acquistata dalla multinazionale del seme Novartis (Woodbum 1999). Grazie al forte impulso impresso alle ricerche le angurie senza semi cominciarono ad invadere il mercato: nel 2003 raggiungevano il 51%, l’83% nel 2012 e attualmente il 90% delle angurie vendute in USA sono apireni (figura5). Eigsti, che era nato nel 1908, si ritirò in pensione nel 1999 a 91 anni con la certezza di aver portato a termine la propria missione.

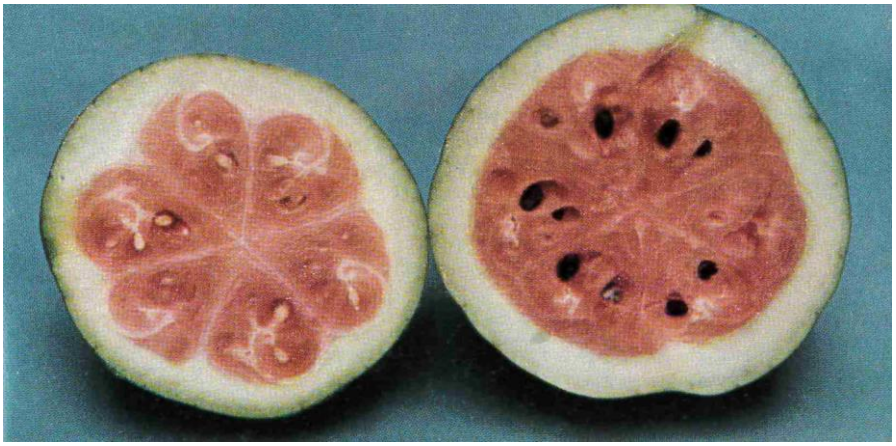


Figura 3 - Frutto maturo di pianta triploide (a sinistra) e di pianta tetraploide (a destra) da Bianchi e Marchesi, 1965.

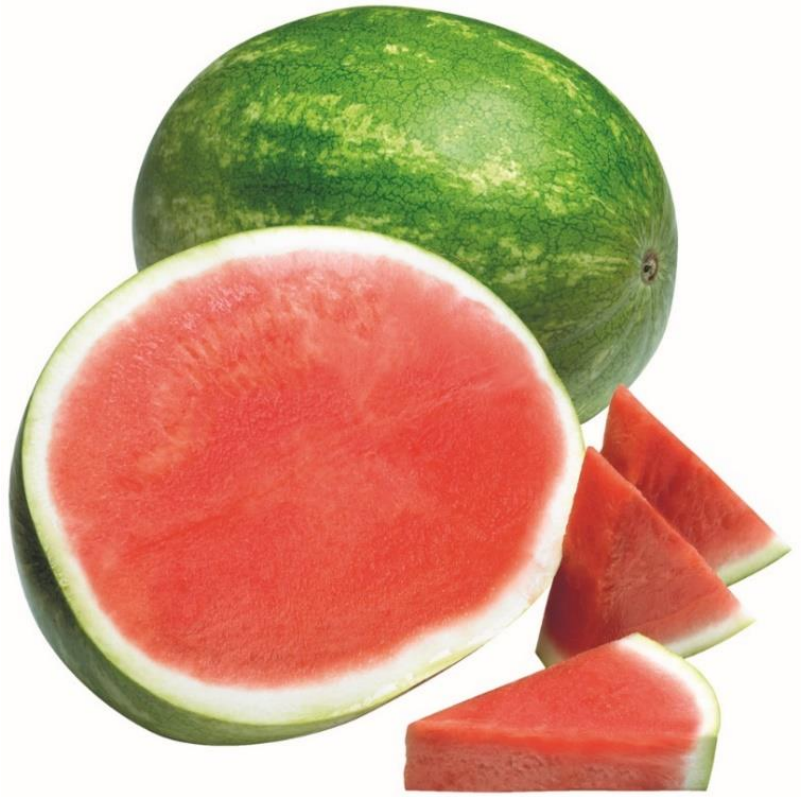


Figura 4 – Moderna cultivar ibrida apirena

CONCLUSIONI

Volendo sintetizzare l'intera parabola della vita di Bianchi si può certamente affermare che è stato un uomo di grande successo: una quindicina di ricercatori suoi allievi diretti o che facevano riferimento al suo gruppo sono diventati titolari di cattedre universitarie o hanno occupato posizioni equivalenti in centri di ricerca italiani e stranieri. Un vero "barone", si potrebbe dire, sempre in termini accademici. Non male per una persona che non ha mai occupato una cattedra universitaria! In realtà Bianchi era tutto fuorché un "barone". Come ricordato da Salamini, Bianchi non praticava l'*honorary authorshi*p e aveva fiducia, delegando molto ai collaboratori dei quali accettava suggerimenti tematici e operativi.

Personalmente sono rimasto profondamente colpito dalla sua forte determinazione nel perseguire gli obiettivi che si era prefissato sin da giovane, dalla straordinaria generosità nel condividere con i collaboratori i frutti della ricerca comune, condividendo anche le modeste risorse finanziarie che era stato capace di procurarsi, la capacità di gestire gli ostacoli anche di tipo economico incontrati nella prima fase della carriera adottando uno stile di vita sobrio che è rimasto un tratto distintivo dell'intera sua vita. In una delle ultime visite a Roma ricordo Angelo Bianchi in paziente attesa di una visita medica in un ambulatorio pubblico.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio Francesco Salamini per la revisione del testo e per la stesura del paragrafo 3.5 *Il gruppo Bianchi e i mutanti*, Adriano Marocco per la tabella 1 riguardante i mutanti presenti nella collezione del Dipartimento di Scienze delle produzioni vegetali sostenibili dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza, i numerosi colleghi del gruppo Bianchi con i quali ci siamo risentiti per aggiornare i ricordi sul nostro caposcuola, la mia "antica" segretaria Carmen Cominotti per aver curato l'editing del manoscritto.

BIBLIOGRAFIA

Bianchi A, Marchesi G. 1968 Primi risultati nel programma di produzione di angurie poliploidi. Pubb. Univ. Catt. S. Cuore, 69 Ann. Fac. Agraria s. VI, P. 3: 73-77

Bianchi A. 1997 Genetica Agraria, missione di vita; Edizioni l'Informatore Agrario pp182

Bianchi A., Marchesi G. 1964 Frutti apireni di angurie triploidi prodotte in Italia. Genetica Agraria. 18:439-444

Borghi B. 1979. Il miglioramento genetico delle cucurbitacee. Istituto Sperimentale per l'orticoltura pp131

Döring, H.P., M. Freeling, M.A. Johns, P. Kunze, A. Merckelbach, F. Salamini, and P. Starlinger, 1984. A Ds-mutation of the Adh1 gene in Zea mays L. Mol. Gen. Genet. 193:199-204.

Kihara H. 1951 "Triploid Watermelons" Proceedings of the American Society for Horticultural Science volume 58, pages 217-230.

Lorenzetti F. 2014 Le origini della genetica agraria in Italia Perugia settembre 2014 http://www.geneticagraria.it/attachment/societa/Storia/Storia_SIGA.pdf

Lorenzoni, C., M. Pozzi, and F. Salamini. 1964. Frequenze di mutanti in popolazioni di mais italiane. Genetica Agraria 19:146-158.

Salamini, F., 1968. Variabilità mendeliana nelle varietà italiane di mais. Maydica 13:1-45.

Woodbum J.H. 1999 20th century bioscience: professor O.J. Eigsti and the seedless watemelon Pentland Press

IL RUOLO DEI MUTANTI NELLA SCOPERTA DEGLI ELEMENTI TRASPONIBILI

Giuseppe Gavazzi[1]
Università degli Studi di Milano

Riassunto

La scoperta dei trasposoni e della loro capacità di spostarsi nel genoma è stata preceduta da osservazioni che in qualche modo ne hanno favorito l'individuazione

In questa breve presentazione cechiamo di riprodurre le tappe che hanno preparato la strada alla scoperta dei trasposoni mediante l'uso di mutanti e di illustrare come l'uso dei trasposoni abbia portato alla mutagenesi inserzionale come metodo per clonare i geni

Summary

The role of mutant in the discovery of trasposons

In this report we briefly describe the intellectual framework where the discovery of transposons, a milestone in the history of genetics, was achieved. We go through the analysis of crosses in maize that led McClintock to the discovery of the transposons. We then describe how the advent of recombinant DNA technology allowed the use of gene tagging as a tool to achieve gene cloning. In addition, the genetic and molecular characteristics of the transposons are presented along with their capacity to modulate the expression of genes including those agronomically interesting.

PRODROMI DELLA SCOPERTA DEI TRASPOSONI

La scoperta dei trasposoni rappresenta una pietra miliare nella storia della Genetica. Ciò nonostante, quando McClintock (Fig.1) presentò il suo lavoro a Cold Spring Harbor, sede di uno dei più prestigiosi laboratori del mondo scientifico di allora, venne accolto con poco entusiasmo e una certa incredulità e fu solo quando elementi simili vennero identificati nei microorganismi che gli scienziati cominciarono a considerare con più attenzione e a rivalutare il lavoro della McClintock.

La scoperta dei trasposoni, come tutte le scoperte a forte impatto, non appare sulla scena improvvisamente come i funghi dopo una pioggia ma va inserita in una cornice

[1] Professore ordinario di Genetica agraria in pensione

intellettuale ampia, comprendente molteplici osservazioni precedenti. Alcune di queste, seppure non mostrino un nesso evidente con la scoperta dei trasposoni, se viste retrospettivamente appaiono come facenti parte di un continuum nel progredire dell'acquisizione di conoscenza dei fenomeni sotto studio. In questa cornice va senz'alto inserito il lavoro di Rhoades che dieci anni prima della identificazione dell'elemento trasponibile *Dissociation* (*Ds*) descrisse le proprietà di un gene instabile. Geni instabili erano stati studiati molto prima dell'analisi di Barbara McClintock sia in fiori di piante ornamentali che in Drosofila senza però capire la base genetica dell'instabilità. Piante con fiori che mostrano variegazione nella pigmentazione sono frequenti in specie come *Mirabilis jalapa* e *Antirrhinum* e già nel 1905 De Vries studiando questa caratteristica in *Antirrhinum* aveva accertato l'ereditabilità della variegazione stabilendo che la caratteristica era riconducibile a un solo gene. Più tardi Emerson studiò la variegazione del pigmento rosso nel pericarpo del seme di mais osservabile in alcune varietà e riconducibile all'attività di un singolo gene simbolizzato *p*, notando che oltre a una certa variabilità nel pattern di variegazione, comparivano anche, in bassa frequenza, semi incolori o con colorazione rossa uniforme. Notò inoltre che selezionando semi con più tessuto rosso, aumentava nella progenie il numero di spighe con semi rossi. Sulla base di queste osservazioni Emerson propose che un cambiamento somatico poteva verificarsi in un fattore mendeliano divenendo un cambiamento ereditabile che obbediva a semplici principi mendeliani. Sulla base di queste osservazioni Emerson propose che la variegazione rappresentasse un cambiamento reversibile di un gene che si differenziava rispetto ad altre mutazioni per la sua alta frequenza. Il lavoro che probabilmente ispirò maggiormente la McClintock nella sua ricerca fu quello di Rhoades con l'analisi di un allele instabile di *a1* che si manifesta nel seme come macchie di pigmento su sfondo incolore. Rhoades riuscì a dimostrare che la frequente mutabilità somatica di *a1* nel seme è riconducibile a un secondo fattore che egli denominò *Dotted* (*Dt*) localizzabile su un cromosoma diverso rispetto ad *a1*. Quando *Dt* va perso per segregazione il gene *a1* perde la sua instabilità e si comporta come l'allele recessivo nullo che determina seme incolore. Quindi Rhoades identificò un gene in grado di destabilizzare una mutazione apparentemente stabile e nello specifico suggerì che *Dt* producesse qualcosa capace di accelerare la mutazione da *a1* ad *A1*.

IDENTIFICAZIONE DEI TRASPOSONI IN MAIS

Anche McClintock osservò instabilità somatica di geni del colore in genotipi che portavano rotture cromosomiche ed eterozigoti per più geni marcatori dell'endosperma del seme di mais. Il parametro usato dalla McClintock per individuare la inserzione di un trasposone in uno specifico gene marcatore dell'endosperma è l'insorgenza di variegazione mentre l'evento traspositivo viene inferito dal cambiamento nella sequenza di scomparsa dei marcatori dell'endosperma. L'evidenza sperimentale di questi eventi si basa sull'analisi genetica della progenie dell'incrocio di maschi omozigoti per i marcatori *C-I sh Bz Wx* con femmine *C sh bz wx* (Fig. 2). Nella F1 si osservano semi variegati (incolori con macchie bronzee dove si manifestano l'allele *C* e gli alleli recessivi *sh bz wx*). Questa osservazione portò la McClintock a postulare l'esistenza di un elemento prossimale rispetto al centromero a cui attribuire la rottura cromosomica e che venne designato *Ds* (*Dissociation*). *Ds* può rompere il cromosoma o trasporre solo in presenza di un secondo elemento genetico chiamato *Activator* (*Ac),* l'elemento autonomo che può anche promuovere la propria trasposizione. La comparsa, nella progenie dell'incrocio su menzionato, di rare cariossidi che non presentavano perdita simultanea di tutti i marcatori distali rispetto a *Ds* ma solo dell'ultimo nella sequenza (C-I) venne interpretato come evidenza che *Ds* si sposta nel genoma occupando diverse posizioni. Sia *Ac* che *Ds* possono indurre mutazioni inserendosi in altri geni. Le mutazioni dovute a inserzione di *Ac* sono

instabili e determinano un fenotipo mosaico mentre quelle dovute a inserzione di *Ds* sono stabili, divenendo instabili in presenza di *Ac*. Assieme *Ac* e *Ds* costituiscono una famiglia che include elementi autonomi (*Ac*) e non autonomi (*Ds*) derivati dai primi per delezioni.

Figura 1 - Barbara McClintock

Contributo dell'analisi molecolare alla conoscenza dei trasposoni

Successivi studi molecolari hanno mostrato che *Ac* è un elemento lungo 4.6 kb con terminazioni terminali invertite di 11 paia di basi. *Ac* e *Ds* generano duplicazioni d 8 paia di basi del sito bersaglio in seguito a inserzione che rimangono, in parte o integre, in seguito a escissione (footptrint). Altre famiglie di elementi trasponibili vennero successivamente identificate oltre che in mais anche in altre piante e animali. In tutti i casi esse rappresentano elementi a DNA o di classe 2. Questo gruppo è caratterizzato da ripetizioni terminali invertite (TIR) e trasposizione non replicativa attraverso intermediario a DNA. Esiste inoltre un gruppo di elementi, i retroposoni o elementi di classe 1 in cui l'intermediario per la trasposizione è l'RNA (Feschotte et al. 2002). Comprendono diversi elementi quali i LTR (long terminal repeat retrotransposons). Questi ultimi, presenti nel genoma delle piante in un alto numero di copie, sono presumibilmente alla base del cosiddetto C value-paradox che si riferisce alla mancanza di correlazione tra l'aumento nel contenuto di DNA e la complessità di un organismo. La percentuale del genoma attribuibile a trasposoni è del 50-80% in mais e frumento e più del 70% in orzo.

SIGNIFICATO E FUNZIONI DEI TRASPOSONI

Inizialmente i trasposoni sono stati visti come DNA spazzatura o DNA egoista mentre ora sono considerati come componenti funzionali dei genomi con il ruolo nel determinare dimensioni e riarrangiamenti del genoma, nel generare mutazioni, nell'alterare l'architettura dei cromosomi e nel regolare l'espressione genica. La maggior parte di questi elementi è inattiva, non è cioè in grado di trasporre. Si ipotizza che la loro

inattivazione rappresenti una modalità di regolazione genica evolutasi come meccanismo di difesa contro DNA invasivo quali i virus e i trasposoni.

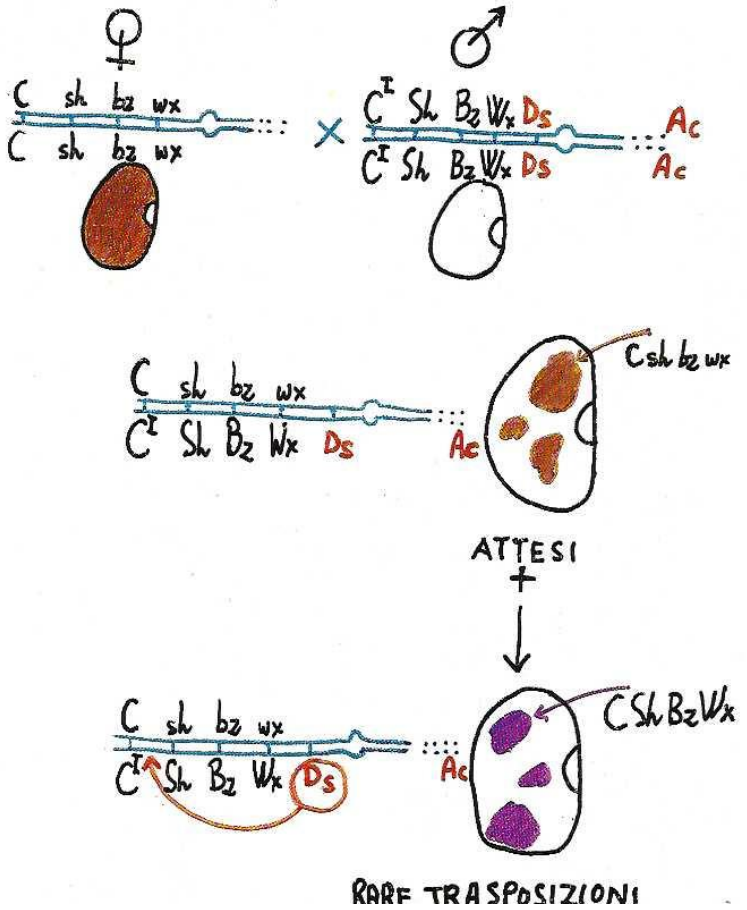


Figura 2 - Incroci per dimostrare l'interazione Ac-Ds e la trasposizione dell'elemento Ds. Vedi testo per spiegazione. Da: Salamini (1984)

COME SFRUTTARE LA TRASPOSIZIONE PER INDURRE MUTAZIONI SPECIFICHE AD UN SITO BERSAGLIO

Durante l'evento traspositivo *Ac* tende a spostarsi e reinserirsi in regioni cromosomiche vicine al sito di partenza. Lo stesso vale per *Ds*. Kermicle e Coll. per primi sfruttarono questa caratteristica per sviluppare una strategia appropriata per indurre mutagenesi in uno specifico gene. A questo fine si avvalsero del fatto che l'inserzione di *Ds* nel gene *R-sc* ha un fenotipo. *R-sc* determina infatti un'intensa colorazione del seme mentre in seguito a inserzione di *Ds* al suo interno si ottiene seme incolore. In presenza di *Ac* si osserva il passaggio da seme incolore a seme variegato dovuto a molteplici eventi traspositivi di *Ds* durante lo sviluppo del seme. Nella progenie di r-*sc:m* isolarono diversi revertenti self-colored. Sulla base di precedenti osservazioni ci si aspetta che un terzo dei revertenti mantenga *Ds* nella posizione occupata dopo la trasposizione. In questi casi introducendo *Ac* nella progenie dei revertenti dovrebbe essere possibile osservare la ricomparsa del fenotipo instabile come effetto del reinserimento di *Ds* in un sito del gene *R* e isolare così nuove varianti di *r-sc:m* (Fig. 3).

Gli Autori riuscirono in questo modo a isolare 40 nuovi casi di variegazione. Che questo fenotipo sia il risultato di reinserzione di Ds nel gene R è confermato dall'osservazione

che rimuovendo Ac dal genoma al posto della variegazione si osserva pigmentazione debole o assente.

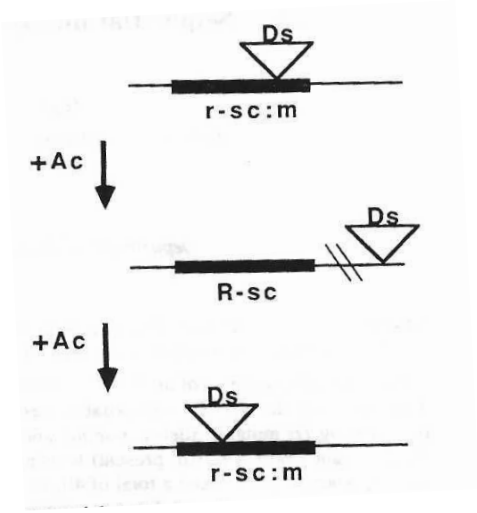


Figura 3 - Mutagenesi sequenziale di r-sc:m mediata da Dissociation.
Da: Kermicle et al. 1989

I TRASPOSONI COME STRUMENTO PER CLONARE I GENI

Quando un trasposone si sposta nel genoma e si inserisce in un gene ne altera l'attività determinando una mutazione. Lo studio molecolare dei trasposoni ha permesso di sfruttare la loro mobilità non solo per determinare nuove mutazioni ma anche per "pescare" il gene visitato e clonarlo. Un esempio paradigmatico di come ciò sia fattibile è il brillante lavoro di Steve Dellaporta e coll. (1988) che portò all'isolamento del locus *r* in mais. Gli studi genetici di *r*, che è un regolatore della sintesi degli antociani, avevano dimostrato che *R* è un locus complesso(Fig.4) che consiste di due duplicazioni, una che porta *S* responsabile della pigmentazione del seme e una seconda con *P* che conferisce pigmentazione a specifici tessuti della pianta (Stadler, 1951).Per clonare *r* Della Porta e Coll. si sono avvalsi del trasposone *Ac* e della disponibilità di una traslocazione T1-10 che avvicinava *R* ad *Ac* in modo da sfruttare la tendenza di *Ac* a muoversi nelle vicinanze, rendendo così più facile ottenere una sua inserzione in *r*. Partendo da *R-nj*, un allele di *r* con una caratteristica colorazione nel seme della porzione apicale e dell'asse embrionale, isolarono, attraverso opportuni incroci, semi con fenotipo variegato e dimostrarono con l'analisi genetica che il fenotipo osservato era riconducibile a inserzione di *Ac* nel locus *r.* L'allele mutabile fu definito *r-nj:m.* La dimostrazione molecolare si ottenne attraverso un'analisi Southern che mostrava cosegregazione del fenotipo r-nj:m e uno specifico frammento di DNA. Il loro lavoro ha permesso di ottenere una sonda molecolare specifica per il gene *r e* successivamente di evidenziare le componenti *P* ed *S* del locus e, inattesa, una terza che venne denominata Q, probabilmente uno pseudogene nella regione *r* e silente a livello fenotipico.

FUNZIONE REGOLATIVA DEI TRASPOSONI

I trasposoni oltre alla caratteristica di permettere l'isolamento dei geni sono anche molto utili per studiare la regolazione genica. Questo viene bene illustrato dallo studio del comportamento di un altro trasposone scoperto da McClintock e analizzato a livello molecolare dalla Federoff, denominato Spm (Suppressor Mutator). Oltre all'elemento autonomo Spm capace da solo di trasporre vi è l'elemento non autonomo, il recettore,

simbolizzato dSpm, che indica un Spm difettoso, cioè mancante di una porzione di quello autonomo e quindi incapace di muoversi in assenza di un Spm attivo. Originariamente l'inserzione dSpm fu identificata analizzando l'inserzione in un gene (a1) responsabile della pigmentazione del seme, che determina riduzione ma non soppressione del colore in assenza di un elemento autonomo. In presenza di quest'ultimo, si osserva invece un fenotipo a mosaico dovuto alla completa soppressione della pigmentazione (suppressor-) e presenza di macchie colorate che rappresentano cloni cellulari originati da escissioni di dSpm indotte dall'elemento autonomo (mutator). La completa soppressione dell'attività genica per effetto della presenza di un elemento autonomo trans-attivante è presumibilmente mediata dal legame della transposasi codificata dall'elemento autonomo con le ripetizioni terminali. In questo caso si parla di allele sopprimibile. In seguito furono identificati alleli in cui il gene non è espresso in seguito a inserzione di dSpm, mentre l'introduzione mediante incrocio dell'elemento autonomo determina la sua espressione. Nel primo caso il gene è sopprimibile, nel secondo è inducibile e si parla di allele Spm-dipendente Quindi un elemento Spm trans-attivante determina un prodotto genico che può attivare o inibire l'espressione di un gene che contiene l'inserzione di un dSpm. Presumibilmente, nel caso di un allele sopprimibile, l'elemento dSpm, inserito in un esone all'interno della regione trascritta del gene visitato, ne impedisce parzialmente l'attività. Lo splicing dell'elemento dal trascitto del gene mutante spiega il perché dell'espressione genica degli alleli sopprimibili, mentre una proteina codificata dall'elemento autonomo impedisce lo splicing, il che spiegherebbe come mai l'espressione dell'allele dSpm sopprimibile si arresta in presenza dell'elemento autonomo. Nel caso di un allele Spm-dipendente, l'inserzione del dSpm avviene in un sito a monte della regione trascritta del gene: in questo caso il dSpm si comporta come una sequenza enhancer Spm-dipendente. La localizzazione dell'inserzione di dSpm determina quindi le modalità con cui Spm controlla il gene in cui dSpm si è inserito (Fedoroff, 1989). Un elemento Spm autonomo può subire mutazioni che alterano il pattern di mutabilità somatica (Fig.4) o la capacità di trasporre (dSpm). Inoltre, può subire delle epimutazioni che lo rendono inattivo. Operativamente un Spm inattivo si differenzia da un dSpm per la sua capacità di riacquistare uno stato attivo. L'inattivazione reversibile di Spm è associata alla sua metilazione nella regione 5' dell'elemento.

Figura 4 - Semi con il fenotipo osservabile in seguito a inserzione di Spm al locus a1. La variegazione più (seme a s.) o meno (seme a d.) intensa è riconducibile a "stati" diversi di Spm. Foto dono di B.M.

ESPRESSIONE DI AC IN UN SISTEMA ETEROLOGO

Ac è stato introdotto in specie che ne sono prive quali tabacco, pomodoro, carota, riso e *Arabidopsis thaliana*. Usando una sonda del trasposone e enzimi di restrizione che non digeriscono l'elemento stesso è stato possibile visualizzare nuovi eventi inserzionali. Il saggio per la visualizzazione si basa sulla escissione di *Ac* da un gene chimerico *SPT::Ac*. In presenza di streptomicina, plantule transgeniche che hanno il gene *SPT* che conferisce resistenza alla streptomicina, sono verdi mentre quelle con il costrutto *SPT::Ac* mostrano foglie con macchie verdi su sfondo albino. In presenza di streptomicina nel substrato di crescita gli eventi somatici di escissione sono riconoscibili come settori verdi in cotiledoni albini mentre escissione germinali danno luogo a plantule verdi.

LA VARIABILITÀ INDOTTA DAI TRASPOSONI E FENOTIPI DI INTERESSE AGRONOMICO

Tramite trasposizione i trasposoni creano nuove mutazioni e contribuiscono significativamente alla variabilità genetica. In alcuni casi questa variabilità interessa caratteristiche importanti da un punto di vista agronomico come nel caso della mutazione tb1 in mais (Fig. 5). Il mais è il risultato della domesticazione del teosinte, la sua forma ancestrale caratterizzata da una crescita cespugliosa. Il gene tb1 codifica per un regolatore con azione di repressione della crescita. In mais, l'espressione di tb1 è elevata rispetto a teosinte, il che è in linea con la soppressione della crescita dei polloni. Questo cambiamento nell'espressione di tb1 è collegabile alla presenza di una regione del DNA, 60 kb a monte del gene. In questa regione è stato identificato un retroposone responsabile dell'intensificazione dell'espressione di tb1. Quindi l'inserzione del retroposone contribuisce a un cambiamento nella morfologia della pianta cruciale per la domesticazione. Questa capacità dei trasposoni di spostarsi nel genoma influenzando l'espressione genica delle regioni dove si inseriscono ha importanti implicazioni evolutive oltre che in alcuni casi effetti sulla fitness.

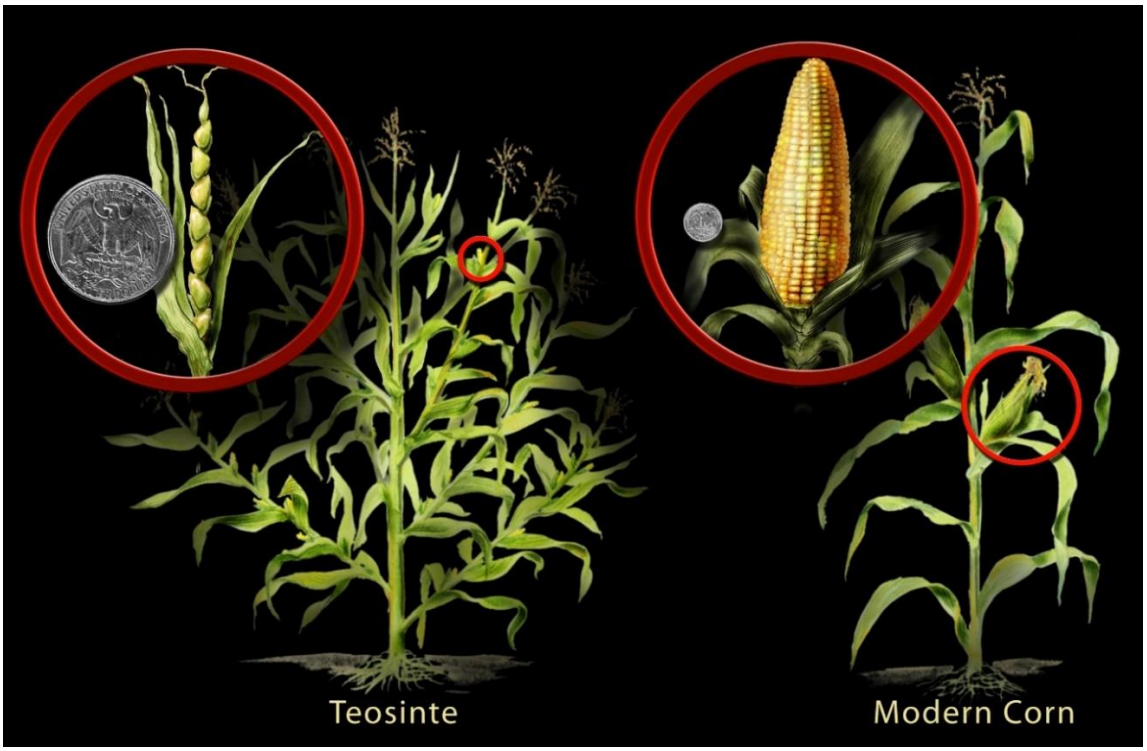


Figura 5 - Domesticazione del mais. Il teosinte, progenitore del mais, ha un aspetto cespuglioso e ogni seme è racchiuso dentro un involucro rigido. La selezione operata dall'uomo durante la domesticazione ha eliminato questi caratteri creando una pianta monoculmo e a semi nudi (credito: Nicolle Rager Fuller, National Science Foundation).

BIBLIOGRAFIA

Dellaporta S., I. Greenblatt e Coll. (1988) Molecular cloning of the maize R-nj allele by transposon tagging with Ac. From: Chromosome structure and function Ed. by P Gustafson ad R. Appels. Plenum Publishing Corp.

Federoff Nina V. Maize transposable elements. (1989) in Mobile DNA. Berg D. and M.M. Howe Eds. pp 375-411

Feshotte C., N. Jiang and S. Wessler (2002) Plant transposable elements: where genetics meet genomics. Nature Reviews Genetics 3:329-341

Kermicle J., M. Alleman, S. Dellaporta (1989) Sequential mutagenesis of a maize gene, using the transposable element Dissociation. Genome 31:712-716

Klein S.P. and S.N. Anderson (2022) The evolution and function of transposons in epigenetic regulation in response to the environment. Curr. Op. in Plant Biol.69:102277

Rhoades M.M. (1938) Effect of the Dt gene on the mutability of the a1 allele in maize. Genetics23:377-397

Salamini F. (1984) Il concetto di trasposizione genica e la sua rilevanza negli studi applicativi. In: Genetica degli elementi trasponibili e sue applicazioni. Monografie di Genetica Agraria

Stadler L.J. (1951) Spontaneous mutation in maize. Cold Spring Harbor Symp. Qant. Biol. 16:49-63

DA STRAMPELLI A BORLAUG: MUTAGENESI ALLA CASACCIA

Luigi Rossi[1]

Riassunto

La varietà di grano duro Creso ha determinato una vera e propria rivoluzione cerealicola in Italia. Nata presso il Centro Ricerche del CNEN (ora ENEA) della Casaccia, grazie alle conoscenze sugli effetti delle radiazioni sulle piante, fu ottenuta irradiando con raggi X la varietà Cappelli, incrociata con una varietà fornita dal CIMMYT. Iscritta nel 1974 nel Registro Nazionale delle varietà di grano duro, in pochi anni diventò la varietà più coltivata in Italia, facendo raddoppiare la produzione italiana di grano duro a parità di superficie. La varietà incontrò subito il favore degli agricoltori, che, impiegando moderne tecniche agronomiche di coltivazione, raggiunsero in Italia Centrale produzioni uguali o superiori a quelle del frumento tenero. L'agricoltore fu favorevolmente impressionato dall'aspetto della granella di Creso, dalla adattabilità di tale varietà e dalla positiva risposta ad ogni miglioramento della tecnica colturale. Le industrie di trasformazione (mugnai e pastai) accettarono e apprezzarono la qualità tecnologica del prodotto che risultò assai elevata sia per le caratteristiche genetiche sia per le migliorate tecniche colturali. Il Creso si diffuse rapidamente in tutta l'Italia Centrale (Lazio, Toscana e Marche in particolare), nelle zone Adriatiche del Nord a clima non rigidamente continentale e nel Mezzogiorno.

Summary

From Strampelli to Borlaug: mutagenesis at Casaccia

The Creso variety of durum wheat led to a real cereal revolution in Italy. Created at the Casaccia Research Center of CNEN (now ENEA), thanks to the knowledge on the effects of radiation on plants, it was obtained by irradiating the Cappelli variety with X-rays, crossing it with a variety supplied by CIMMYT. Registered in 1974 in the National Register of durum wheat varieties, in a few years it became the most cultivated variety in Italy, doubling the Italian production of durum wheat for the same surface area. The variety immediately met the favor of the farmers who, using modern agronomic cultivation techniques, achieved production equal to or greater than that of common wheat in central Italy. The farmer was favorably impressed by the appearance of the Creso grain, by the adaptability of this variety and by the positive response to any improvement in the cultivation technique. The processing industries (millers and pasta makers) accepted and appreciated the technological quality of the product which turned out to be very high both for the genetic characteristics and for the improved cultivation techniques. Creso spread rapidly throughout Central Italy (Lazio, Tuscany and Marche in particular), in the Northern Adriatic areas with a non-rigidly continental climate and in the South.

[1] Direttore del Dipartimento BIOTEC dell'ENEA in pensione

PREMESSA

Nuovi approcci della genetica, basati sull'impiego di mutageni (chimici e radiazioni), erano stati sviluppati in USA, Germania, Svezia, Norvegia, Francia ed India. In seguito alla disponibilità di una sorgente di Cobalto-60 (200 Curie) offerta dalla Commissione americana USAEC, fu progettato il «campo gamma» e si avviò (1956) un programma di radio-genetica sui frumenti (grano duro Cappelli e tenero Brescia) presso l'Università di Pisa, guidato dal Prof. Francesco D'Amato. Nel 1957 il Prof. Vincenzo Caglioti fu incaricato dal CNRN - organismo attivato nel 1952 dal quale nel 1960 nacque il CNEN - di presiedere una Commissione consultiva (segretario scientifico Gian Tommaso Scarascia Mugnozza) per sviluppare in Italia programmi di Applicazioni delle Scienze Nucleari in Agricoltura. Il Laboratorio fu localizzato nel Centro di Ricerche Nucleari Casaccia del CNEN, ora ENEA. Gian Tommaso Scarascia-Mugnozza fu la mente e il motore di quella straordinaria fase storica, così ricca e variegata nell'avvio e nello sviluppo, nonché nella fase evolutiva che seguì, ampiamente documentata.

Avendo partecipato alla Conferenza «Peaceful Uses of Atomic Energy» del 1955, in qualità di Consigliere tecnico della delegazione italiana, Scarascia indicò chiaramente (Scarascia, 1956) quattro linee di ricerca di interesse per l'agricoltura italiana e si impegnò per il loro sviluppo nel Laboratorio Applicazioni delle Radiazioni in Casaccia:

– l'induzione di mutazioni per migliorare le colture agrarie;

– un nuovo mezzo di lotta biologica: la tecnica degli insetti sterilizzati con radiazione gamma;

– l'applicazione del metodo dei radioisotopi per tracciare il fertilizzante marcato dato al terreno ed assorbito dalla pianta;

– l'irradiazione di alcuni prodotti agricoli (patate, agli e cipolle) per prevenire la germogliazione e di altri prodotti (frutta fresca e secca).

Scarascia-Mugnozza integrò fra loro attività con indirizzi specifici di ricerca di base e applicata, mirati anche alla soluzione di problemi dell'agricoltura italiana, spesso in collaborazione con Istituzioni di ricerca italiane ed estere e con il settore privato.

Figura 1 - Casaccia, 1960. Dal granaio al laboratorio (Foto B. Donini)

L'integrazione tra la ricerca di base e lo sviluppo delle applicazioni, la collaborazione con le altre attività di ricerca del Centro Casaccia, con il mondo produttivo, particolarmente interessato alle novità provenienti dalla scienza e dalla tecnologia, apparvero subito vincenti.

Alcuni punti di forza del Laboratorio. Scarascia-Mugnozza inserì le attività di ricerca in agricoltura all'interno di un Centro di ricerca multidisciplinare, quale era quello della Casaccia, in cui erano presenti ricercatori con competenze in fisica, elettronica, ingegneria, chimica, biologia, geologia, dosimetria e medicina. Integrò fra loro attività con indirizzi specifici di ricerca di base e applicata, mirati anche alla soluzione di problemi dell'agricoltura italiana, spesso in collaborazione con Istituzioni di ricerca italiane ed estere e con il settore privato. L'integrazione tra la ricerca di base e lo sviluppo delle applicazioni e la collaborazione con le altre attività di ricerca del Centro Casaccia e con il mondo produttivo.

Queste due caratteristiche anticipatrici per l'epoca, la scelta di settori di ricerca innovativi e l'assunzione di laureati provenienti da varie Istituzioni italiane (ben 13 in Scienze agrarie) e di tecnici diplomati qualificati, diedero vita a un «gruppo di ricerca» altamente motivato ed a un laboratorio di eccellenza. Il «gruppo di ricerca» veniva regolarmente incentivato e stimolato grazie al continuo aggiornamento scientifico (partecipazione a corsi, congressi scientifici e visite presso Istituti di ricerca all'estero) nelle diverse aree di interesse: mutagenesi applicata al miglioramento delle piante agrarie; tecnica dell'insetto sterile per la lotta contro la mosca della frutta; tecnica dei radioisotopi (N, P, K) usati come traccianti per lo studio della fisiologia e la nutrizione delle piante; tecnica della radio-conservazione delle derrate alimentari per il prolungamento della vita di mercato, particolarmente di frutta e ortaggi e della radio-conservazione di granaglie e altri prodotti agricoli.

Il «gruppo di ricerca» aveva anche il continuo supporto scientifico da parte di consulenti italiani ed internazionali e disponeva della strumentazione e dei necessari materiali tecnici di avanguardia. L'approccio multidisciplinare della ricerca e la integrazione delle competenze – di agronomo, cito-genetista, genetista, statistico, biochimico ecc. – necessarie alla soluzione dei problemi affrontati, vennero collegati alla valorizzazione dei risultati della ricerca in tutti i suoi momenti: nella fase di sviluppo delle conoscenze di base utili al progresso della scienza (confronto e partecipazione a convegni, seminari) nella messa a punto di tecniche e metodologie innovative e infine nella diffusione dei risultati e valutazione dell'impatto economico.

IMPIANTI E STRUMENTAZIONI

Il Laboratorio fu dotato fin dall'inizio di impianti e strumentazioni di avanguardia.

– Il «campo gamma» della Casaccia, realizzato nel 1960, comprendeva un appezzamento di terreno a pianta circolare, della superficie di circa 6.000 m^2, circondato da un terrapieno e con al centro una unità di irraggiamento, sorgente di Co-60 (al 1960, 180 Curie). Fu l'unico impianto del genere in Europa, dopo quello di Brookhaven negli Stati Uniti e di Omihia in Giappone. Il campo gamma è stato indispensabile strumento per ricerche di base ed applicate, per studiare gli effetti delle radiazioni a livello citologico, genetico, fisiologico, evoluzionistico ed ambientale e per valutare la radiosensibilità di molte specie botaniche (circa 600) e di oltre 30 piante agrarie (cereali, orticole, piante da fiore, conifere, piante da frutto ed ornamentali).

– La «cella gamma», sorgente di Co-60 di 120 Curie, posta al centro di una camera «schermata» e munita di un sistema di controllo automatico di temperatura ed illuminazione, veniva utilizzata per gli irraggiamenti di semi e piante.

- L’impianto industriale “Agrigamma” con sorgente di Cobalto-60 (150 Curie) per l’irraggiamento di derrate alimentari, pupe di insetti, confezioni di fiori, cavi elettrici, opere d’arte ecc.

- Una serie di serre e camere di crescita moderne.

- I campi sperimentali interni al Centro, indispensabili per l’allevamento, la selezione e la valutazione agronomica delle linee in selezione di grani, orzi, pomodori, piselli, peperoni e piante da frutto.

- Un impianto per l’allevamento massale di mosca della frutta (*Ceratitis capitata*) che aveva la capacità di allevare settimanalmente 15 milioni di insetti che, dopo la radio-sterilizzazione, venivano rilasciati su aree infestate (esperimenti pilota di Capri, Procida e Pantelleria).

- Il citofotometro, un eccezionale mezzo di avanguardia ed unico (allora) in Italia per la ricerca e la sperimentazione, che consentì di acquisire informazioni preziose sulla biologia delle cellule (singole o popolazioni), sul contenuto in DNA dei nuclei di singole cellule ed in stadi diversi del ciclo mitotico, sulla possibilità di separare cellule singole «marcate» in una popolazione cellulare.

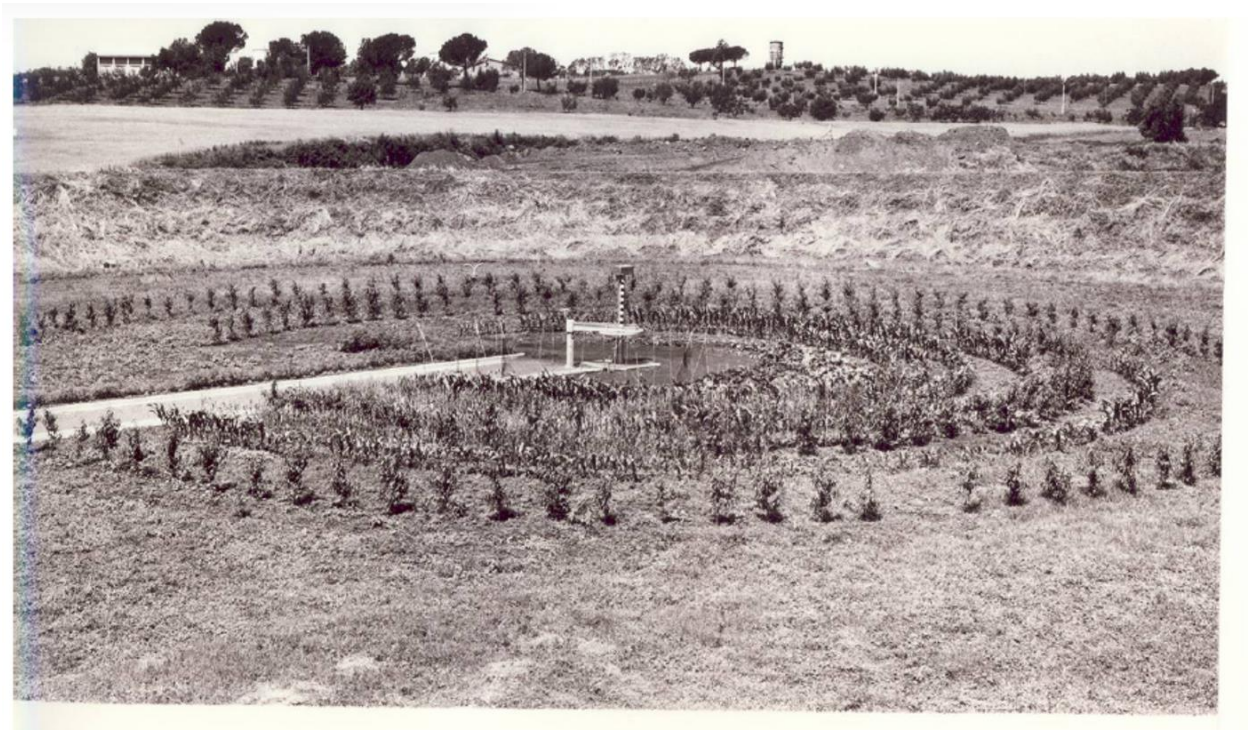


Figura 2 - Campo gamma, panorama di piante esposte all’irraggiamento cronico, 1967.

Il Laboratorio per le Applicazioni in Agricoltura del CNEN partecipò dal 1961 alle attività del Gruppo di lavoro del CNR per il miglioramento genetico delle piante coltivate, nonché, in particolare, al “Progetto collegiale di prove agronomiche sul “frumento duro”, inserendo anche i primi mutanti di Senatore Cappelli, Russello, Garigliano, Azizia, Grifoni. Nel 1963 iniziò un Programma di collaborazione scientifica “Mutation Breeding Concact Group” finanziato dall’Euratom. Al Programma partecipavano diversi Istituti europei dei paesi Francia, Belgio, Germania e Olanda (Istituto per le Applicazioni dell’Energia Nucleare in Agricoltura di Wageningen). Altri Paesi (Francia, Belgio, Germania) si aggiunsero successivamente sulle tematiche oggetto di collaborazione e vertevano su: (i) messa a punto delle metodologie di irraggiamento, (ii) radiosensibilità delle piante superiori, (iii) radiogenetica e studi sistematici su cariotipi di frumento duro, compresi i mutanti. Il modus operandi di questi Gruppi di ricerca, che annualmente si riunivano per

confrontare i risultati, ha anticipato i «network» dei programmi della UE, a partire dagli anni 1990. Il Laboratorio partecipò nel 1965 ad un programma sul frumento duro guidato dalla Divisione congiunta FAO/IAEA che comprendeva dodici paesi del Bacino del Mediterraneo. Nelle prove agronomiche furono messe a confronto due varietà standard (Cappelli e Capeiti 8), due varietà locali (per ciascun paese) ed alcuni mutanti di Cappelli e Garigliano ottenuti alla Casaccia.

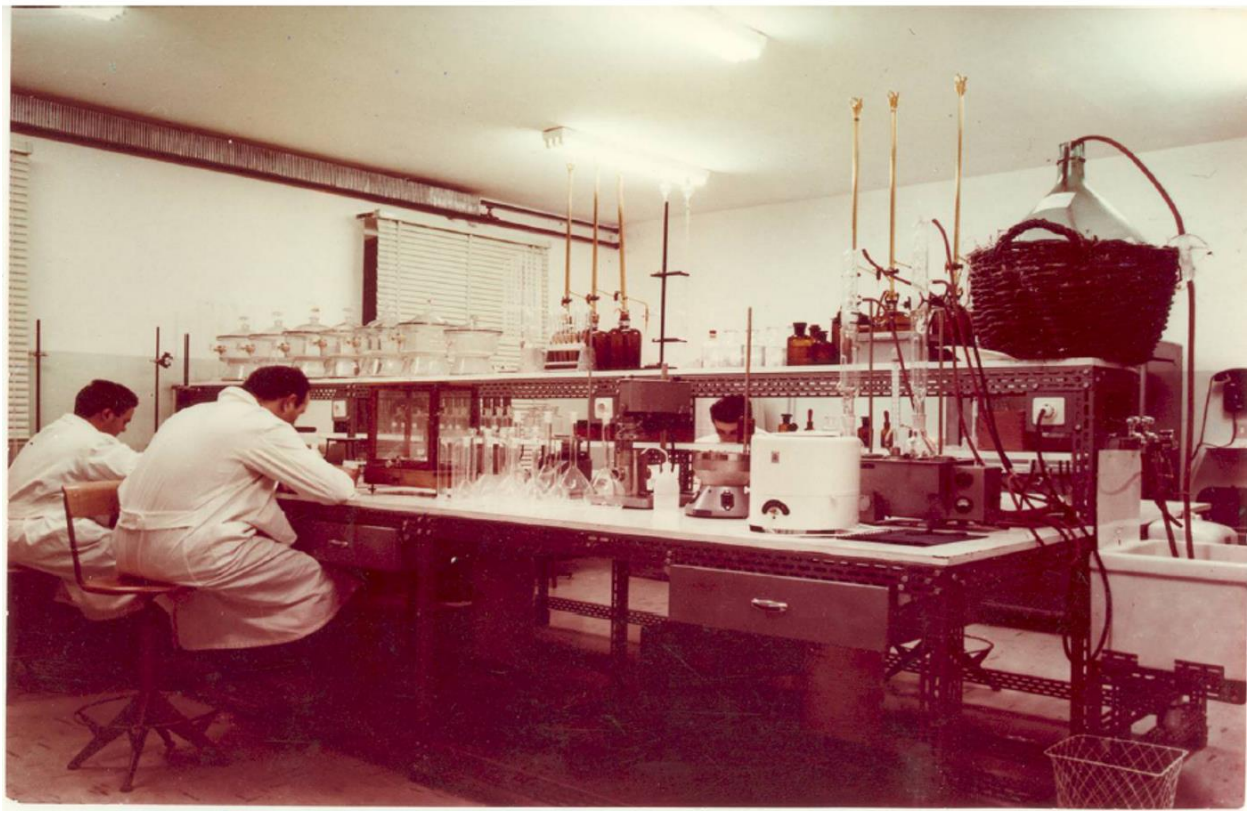


Figura 3 - Il primo laboratorio di Genetica Vegetale, 1960.

CONSULENTI E OSPITI

Il Professor Francesco D'Amato (Ordinario di Genetica dell'Università di Pisa) ha dato un decisivo apporto sia all'impostazione delle attività svolte nel Laboratorio Applicazioni in Agricoltura del CNEN, sia alla supervisione scientifica dei progetti ed alla qualità della ricerca. Il Prof. A. Gustafsson (Svalov, Svezia) è stato il punto di riferimento sulle ricerche di mutagenesi applicate al «breeding». Altri consulenti di diverse discipline sono stati: dr. H. Gaul, Università di Monaco Baviera esperto di Genetica vegetale; dr. Gunnar Armstrong, Università di Stoccolma, esperto in dosimetria e fisica delle particelle. Dr. L. Ehrenberg, Università di Stoccolma, esperto in chimica delle radiazioni, dr. M.S. Swaminathan, India (esperto di genetica e mutagenesi); dr. C. Borojevic, Jugoslavia, dr S. Bogyo della FAO. Gli esperimenti, inizialmente volti a conoscere la radiosensibilità delle piante, furono ben presto indirizzati allo studio degli effetti genetici delle radiazioni (Radiogenetica), e a determinare, successivamente, mutazioni utili nelle piante agrarie (mutagenesi)). Altri esperti e collaboratori: Dr.ssa S. Avanzi (Università di Pisa), dr. D. de Zeeuw (Wageningen, Olanda), dr. B. Decourtye, Francia, dr. A. Nybon e S. Blixt, Svezia, dr. E.A. Favret, Argentina, dr. A. Micke e dr. G. Lundquist della Divisione congiunta FAO/IAEA di Vienna.

LE QUATTRO LINEE DI RICERCA SOPRA DESCRITTE

Si svilupparono molto rapidamente sotto la direzione di Gian Tommaso Scarascia Mugnozza, nel Laboratorio Applicazione delle Radiazioni in Agricoltura del Centro Ricerche Nucleari della Casaccia, e, dalla fine degli anni '50, hanno rappresentato un filo conduttore per le sue attività nel corso degli anni. In particolare, quella di ricerca scientifica relativa all'induzione di mutazioni per il miglioramento di specie di interesse agrario (mutagenesi e miglioramento genetico) si è ampliata e trasformata nel tempo, includendo nuove tecnologie (colture in vitro e ingegneria genetica).

L'azione mutagenica dei raggi X e di alcuni agenti chimici su diversi organismi, tra cui molte piante superiori, era stata scoperta a partire dagli anni '20. La possibilità di indurre nelle piante modificazioni del patrimonio genetico e di ottenere in tal modo un ampliamento della relativa variabilità rappresentava per i genetisti uno strumento importantissimo nel miglioramento genetico di specie di interesse agrario.

Obiettivo concreto del Laboratorio fu quello di avvalersi della mutagenesi per indurre variabilità genetica utile al miglioramento di piante autogame (cereali, orticole) ed aumentare la frequenza di mutazioni somatiche in piante a propagazione vegetativa (fruttiferi e piante da fiore). A tal fine furono acquisite molte conoscenze:

i) confronto tra agenti mutageni chimici (metansolfonato, dietil-solfato, etilenimmina, ecc.) e fisici (raggi X, raggi gamma Co-60, neutroni termici, neutroni veloci);

ii) efficacia dei trattamenti combinati (chimico e fisico) rispetto al singolo trattamento nella induzione di mutazioni, nelle frequenze e spettro;

iii) definizione delle dosi/concentrazioni più appropriate per le varie specie trattate (grano duro, pisello, ciliegio, pesco, vite, olivo ecc.);

iv) confronto sull'efficacia dei mutageni chimici di indurre mutazioni geniche rispetto ai neutroni termici e veloci che inducono mutazioni cromosomiche;

v) confronto fra irraggiamento acuto ed irraggiamento cronico nell'indurre mutazioni. Quest'ultimo (effettuato nel campo gamma) è stato prezioso per gli studi di radiosensibilità delle piante a livello fisiologico e genetico e per aumentare la frequenza di mutazioni somatiche in piante a propagazione vegetativa.

Altri aspetti metodologici furono messi a punto e riguardavano il materiale da trattare: seme, gemma, calli (organi pluricellulari) e zigote, gameti, cellula uovo, polline, microspore, e singole cellule in vitro. In particolare, fu stabilito che il trattamento di un organismo pluricellulare conduceva alla formazione di un tessuto chimerico (costituito da cellule mutate e normali).

Si osservò, inoltre, che nel tessuto chimerico a seguito delle divisioni cellulari, si creava una competizione tra cellule mutate e normali "selezione diplontica". L'ampiezza del settore mutato nelle piante M1 (prima generazione) dipendeva, infatti, dal numero delle cellule iniziali che davano origine alla pianta/spiga e l'analisi «topografica» sulle spighe principali e secondarie delle piante M2 (seconda generazione) consentì di stabilire il numero di «cellule iniziali» presenti nel seme irradiato. Queste scoperte hanno consentito al Laboratorio Applicazioni, in stretta connessione con il CNEN/ENEA Casaccia, di adottare corretti metodi di selezione nelle generazioni M2 e M3 (selezione spiga, selezione pianta, selezione massale), permettendo di ottenere una maggiore efficacia di risultati. In quegli anni fu anche dimostrato che il trattamento mutageno applicato ad una singola cellula (es. polline, microspora) non conduce alla formazione della chimera; e questo metodo ha consentito di poter selezionare con maggiore efficienza le mutazioni indotte nella seconda generazione.

IL MIGLIORAMENTO GENETICO DEL GRANO DURO

Fu solo nella prima metà del secolo scorso che l'utilizzazione di base del frumento delle due specie (duro e tenero) si differenziò nettamente: il primo per la pastificazione e il secondo per la panificazione (Bozzini et al., 1998).

Negli anni '60 del secolo il fabbisogno annuo di grano duro nei paesi della CEE si aggirava sui 40 milioni di quintali. Il 50% circa di tale fabbisogno era soddisfatto con la produzione italiana, il 30% importato dal Canada, USA e Argentina e il 20 % sostituito dal granito di frumento tenero. La produzione italiana su circa 1,3 milioni ettari era intorno a 17 milioni di quintali e la resa media era di 12 q/ha. Le previsioni per le necessità del 1975, sempre per la CEE, erano di 50 milioni di quintali. Il prezzo era di circa 10.000 £/q, comprensiva di una integrazione di 2172 £/q, mentre quello del grano tenero era di circa 7.000 £/q. Questa differenza di prezzo stimolò anche la ricerca di nuovi areali di coltura. Infatti allora il grano duro era coltivato nelle aree meridionali e principalmente in Puglia e Sicilia. Le sementi per più del 90% non erano certificate. Tutte le varietà allora coltivate erano caratterizzate da taglia molto alta (140-180 cm), che le rendeva suscettibili all' allettamento e ai conseguenti danni produttivi.

I breeder che operavano sul frumento duro in quegli anni erano: Maliani a Roma, Barbieri e Deidda in Sardegna; De Cillis, Casale e Ballatore in Sicilia; Iannelli, Grifoni e Dionigi in Puglia; Rusmini in Lombardia. Le varietà maggiormente coltivate erano Capeiti 8 e Patrizio 6 (di Casale), Trinacria (di Ballatore), Maristella e Nuragus (di Barbieri e Deidda), ISA 1 e Appulo (di Dionigi) con anche il Senatore Cappelli (rilasciato nel 1915 da Strampelli).

Per la Casaccia la scelta di lavorare sul grano duro non fu casuale fu, infatti, dettata dalle condizioni sopra esposte e da almeno altri due fatti: uno di carattere scientifico in quanto pianta poliploide e quindi di interesse per gli studi di mutagenesi; l'altra di carattere pratico in quanto specie fino a quel momento non molto attenzionata dai miglioratori vegetali.

Per superare tale grave problema dell'allettamento, che non consentiva di adottare alcuna innovazione (l'uso dei fertilizzanti azotati aumentava notevolmente il rischio!), si erano ricercate possibili fonti genetiche di bassa taglia nelle varie collezioni mondiali, oppure tentato di abbassare la taglia delle singole varietà incrociandole con quelle di grano tenero, con una riduzione della qualità pastificatoria.

Alla Casaccia per i trattamenti mutageni furono scelte le cultivar Cappelli, Garigliano, Capeiti 8, Grifoni, Russello e si puntò subito all'ottenimento di piante a taglia bassa resistenti all'allettamento. Si considerarono le varie mutazioni indotte:

- morfologiche (riduzione di taglia, culmo rigido, foglie senza cera, spiga sferococcoide, tipo elimoide, vavilovoide ecc.;
- per pigmentazione (foglie giallo-verdi, antocianiche, glume antocianiche, ecc.;
- cromosomiche (traslocazioni, delezioni, duplicazioni, trisomia, ecc.);
- gametiche (asinapsis, disinapsis, sterilità maschile, ecc.).

Si ottennero migliaia di nuove linee, alcune di interesse scientifico, botanico, e evoluzionistico, altre di potenziale impiego per il miglioramento genetico. Diverse varietà di frumento duro furono ottenute nel programma di mutagenesi: due linee mutate di Cappelli (Castelporziano (CpB132), Castelfusano (CpC48)), una linea di Grifoni (Castedelmonte Gra145), una di Garigliano (Castelnuovo).

Alcuni resistenti all'allettamento furono iscritti nel Registro Nazionale delle Varietà nel 1969: Castelfusano e Castelporziano. Esse furono le prime varietà di grano duro, a taglia significativamente ridotta, ad essere coltivati.

Per migliorare le caratteristiche dei mutanti e per trasferire i «caratteri mutati» in nuove varietà, fu realizzato un ampio programma di incroci, con successive selezioni genetiche

per caratteristiche di interesse agronomico (resistenza all'allettamento, precocità, resistenza alle malattie, produttività) e per caratteristiche qualitative della granella (peso ettolitrico, proteine, capacità pastificatoria).

Figura 4 - Primi mutanti di grano duro. Scarascia Mugnozza con Gianfranco Franco allora direttore del Centro, 1966

IL CRESO: ESEMPIO DI INNOVAZIONE NEL SISTEMA AGROALIMENTARE

Dal programma di incroci si derivarono numerose varietà e tra queste tre furono scelte per l'iscrizione al Registro delle Varietà: Tito, Mida e Creso. In un secondo tempo si preferì lasciare iscritto solo Creso.

Creso è il nome che fu dato alla linea FB55, che apparve subito emergere con piante basse e vigorose, spighe molto fertili, resistente alle malattie e in particolare alle ruggini. Creso ha determinato una vera e propria rivoluzione cerealicola in Italia. Deriva dall'incrocio di ((Yt54N10-B) Cp2-63)Tc2)* x CpB144**) e cioè di una varietà*del Centro Internacional de mejoramiento de maiz y trigo – Messico (CIMMIT) e di una linea ottenuta irradiando con raggi X la varietà Senatore Cappelli . Creso fu iscritta nel 1974 da Alessandro Bozzini e Carlo Mosconi nel Registro Nazionale delle varietà e in pochi anni diventò la varietà di grano duro più coltivata in Italia anche per le sue caratteristiche qualitative

La varietà incontrò subito il favore degli agricoltori più preparati che, impiegando moderne tecniche agronomiche di coltivazione, raggiunsero in Italia centrale produzioni uguali o superiori a quelle del frumento tenero. L'agricoltore fu favorevolmente impressionato dall'aspetto della granella di Creso, dalla adattabilità di tale varietà e dalla positiva risposta ad ogni miglioramento della tecnica colturale. Le industrie di trasformazione (mugnai e pastai) accettarono e apprezzarono la qualità tecnologica del prodotto che risultò assai elevata sia per le caratteristiche genetiche sia per le migliorate tecniche colturali. Il Creso si diffuse rapidamente in tutta l'Italia Centrale (Lazio, Toscana

e Marche in particolare), nelle zone Adriatiche del Nord a clima non rigidamente continentale e nel Mezzogiorno (Rossi, 2010).

Nel 1983 il Creso era coltivato su 26.971 ha in Emilia Romagna, 31.573 ha in Toscana, 81.782 ha nelle Marche, 46.538 ha nel Lazio, 38.754 nelle Puglie, 22.900 ha in Basilicata, 22.118 in Calabria, 60.000 ha in Sicilia, 9.739 ha in Sardegna, 9.299 ha in Campania, 16.300 ha in Molise, 11.949 ha in Abruzzi, 3.810 in Umbria, 755 ha in Veneto, 788 ha in Lombardia, e anche 8 ha in Friuli Venezia Giulia.

Figura 5 e 6 - La varietà Creso e uno dei suoi costitutori: Alessandro Bozzini.

Per meglio comprendere la rapida ed eccezionale diffusione del Creso si può evidenziare che tale varietà aveva raggiunto nel 1984 il 58,3% di tutto il seme certificato di grano duro in Italia. È importante sottolineare che mentre all'inizio degli anni 70 la percentuale di seme certificato, sul totale di quello impiegato per la semina, non superava il 12%, nel 1983 tale percentuale raggiungeva il 29%. Una eccezionale azione di promozione sul settore sementiero era stata pertanto esercitata dal Creso che nel 1983 registrava un quantitativo di ben 578.613 quintali di semente certificata dall'ENSE (Ente Nazionale Sementi Elette). È qui da ricordare che la promozione del settore sementiero è la chiave di volta per il passaggio da una coltura povera e primitiva a una coltura ricca e moderna ed è espressione di un sistema produttivo efficiente e capace di gestire anche altre innovazioni genetiche. L'utilizzo della varietà Creso, accompagnato da una sempre più appropriata tecnica colturale, ha significato per l'agricoltore evidenti benefici economici in qualche modo calcolabili. Non è certo facile valutare l'impatto di una innovazione, specialmente se agronomica, in termini economici. Tuttavia il contributo dovuto all'introduzione di una nuova varietà risulta forse più chiaramente definibile di quello di altri fattori (fertilizzanti, erbicidi, fitofarmaci, lavorazione del terreno). Ciò anche perché, una volta noti le superfici coperte, le produzioni ottenute e il prezzo del prodotto finito, le conclusioni sono rapportabili a semplici operazioni aritmetiche.

Si può pertanto affermare che il Creso rappresenta il frutto di una intima connessione tra ricerca scientifica e apparato produttivo. Stimolata da quest'ultimo, infatti, l'innovazione si è realizzata per merito delle ricerche in un Centro di alto livello scientifico. Grazie al

fenomeno Creso si è potuto provare come l'innovazione genetica costituisca un fattore estremamente importante di sviluppo e promozione del sistema agro-industriale, il quale ha dimostrato in tale occasione buone capacità di gestire l'innovazione quando essa è valida e richiesta dal mercato, pur in presenza di carenze strutturali e organizzative. Di queste, anzi, l'innovazione può funzionare da "sistema di rilevamento", ma può anche, come sperabile, suggerire le vie e le azioni più idonee al loro superamento. (L. Rossi, 1984)

Ancora oggi, dopo oltre 46 anni dalla sua registrazione, il Creso è coltivato in Italia su un'area superiore al 10% della superficie totale a grano duro. Il Creso è stato utilizzato nei programmi di miglioramento genetico del grano duro anche in molti paesi, dalla Cina all'Australia, all'Argentina, agli USA, al Canada e presso i grandi Centri di Ricerca Internazionali (CIMMYT, ICARDA, CSIRO ecc.). È impossibile enumerare tutte le varietà di grano duro che sono derivate dal Creso; è certo che buona parte della relativa produzione mondiale è ottenuta con varietà da esso derivate.

CONCLUSIONI

La tradizionale mutagenesi, in cui vengono indotte mutazioni in modo casuale, ha consentito di ampliare la biodiversità naturale, di accumulare una serie di dati utili per conoscere la genetica delle piante e la loro naturale evoluzione. Essa ha portato alla costituzione di almeno 2.000 varietà coltivate nel mondo. Tale mutagenesi è tuttora riconosciuta come strumento prezioso per aumentare la variabilità genetica di una specie e per conseguire specifici obiettivi di miglioramento genetico. Senza la ricerca e l'innovazione, la competitività del grano duro nei confronti di quello tenero sarebbe venuta meno.

La varietà Creso è stata determinante per una vera e propria rivoluzione cerealicola in Italia, che ha fatto crescere tutta la coltura del grano duro. Da sinonimo di povertà economica, agronomica, varietale, quella del grano duro è diventata una coltura ad alta tecnologia: seme certificato, tecniche agronomiche accurate; l'industria molitoria e quella pastaria sono diventate le prime del mondo.

La stima dell'incremento di produzione dovuta alle intrinseche caratteristiche di maggior produttività del Creso rispetto alle varietà preesistenti, è passata dai 600 mila quintali del 1976 ai 3,7 milioni di quintali del 1984. Poiché il Creso ha sostituito il grano tenero in molte aree del Centro-Nord, l'incremento globale in produzione nazionale di frumento duro è stato ben maggiore e tale da annullare, a quel tempo, il grosso deficit dell'Italia per tale prodotto. Complessivamente gli agricoltori italiani hanno prodotto nei primi dieci anni di diffusione circa 100 milioni di quintali di granella di Creso. L'incremento in produzione lorda vendibile supera nel 1982 e 1983 i 100 miliardi di lire annui.

L'ENEA quale Ente costitutore della suddetta varietà, incassa le royalties dalle industrie sementiere concessionarie; nel 1983 tale introito è stato di 130 milioni di lire. Fino al 1982 l'ENEA ha incassato complessivamente 180 milioni di lire di royalties. Si tratta di una cifra significativa, pure irrisoria rispetto sia al quantitativo certificato e commercializzato (578.613 quintali nel solo 1983), sia ai benefici economici diretti e indiretti determinati in Italia. Se il Creso è avvantaggiato dall'adozione di moderne tecniche agronomiche, si può altresì aggiungere che esso ha agito come veicolo di promozione tecnologica (e non solo tecnologica) presso le aziende agricole, le Società sementiere e le industrie di trasformazione.

A fronte dei vantaggi ottenuti dalla varietà Creso occorre considerare che essa, come tutte quelle a taglia bassa ed alta produttività, richiede diserbanti, concimi chimici, tecniche colturali moderne, e rappresenta un esempio di forte intensificazione colturale. Il caso del grano, il cui miglioramento è stato avviato sulla base di una concezione *technology intensive*, ci fa rendere conto come, anche in relazione alle problematiche ambientali, si

sia resa necessaria una evoluzione verso una concezione di tipo knowledge intensive, comprensiva di molti altri aspetti, oltre a quello agronomico.

RINGRAZIAMENTI

Sono stato fortunato a venire alla Casaccia, grazie all'esame con Angelo Bianchi.

Devo questo lavoro al Prof. Basilio Donini, che ha saputo gestire il grande interesse per il grano duro, la rapida diffusione del Creso e, ancor prima, l'induzione di mutazioni su aspetti evolutivi, botanici e fisiologici.

BIBLIOGRAFIA CITATA E DI APPROFONDIMENTO

Belli M.L., Cervigni T., 1964. Treatment of Seeds with Ethylmethansulphonate and Diethylsulphate. Nature, vol. 204, no 4964, pp. 1199-1200.

Bogyo T.P., Scarascia Mugnozza G.T., Sigurbjornsson B., Bagnara D., Bozzini A. 1973, Bilateral Wheat and Barley programmes in the Near Eastern, North Africa and East Africa Countries-Durum Wheat Yield Performance Nursery. Proc. IVth FAO /Rochefeller Wheat Seminar, Teheran, 26-35.

Bozzini A., 1975. Creso: un frumento duro di elevata produttività e larga adattabilità. L'informatore Agrario, n° 35, 20247-20354.

Bozzini A., Bagnara D., 1974. CRESO, MIDA e TITO, nuovi grani duri del Laboratorio Agricoltura del C.N.E.N. L'informatorio Agrario n° 20: 15869-15871.

Bozzini A., D'Amato F., Monti L., Scarascia Mugnozza G.T., 1962. Mutation in durum wheat induced by radiations and chemicals. Proceedings 2nd Intl. Congress Radiation Research, England, 107.

Bozzini A., Mosconi C., 1976. Creso: una nuova varietà di frumento duro caratterizzata da interessanti prestazioni agronomiche. Genetica Agraria, Vol. XXX, Fasc. 2, pp. 153-162.

Brunetti N., Picciurro G., Boniforti R., (1967). Uptake of 15 N-labelled NR4 + in excised root of a durum wheat mutant line compared with durum bread wheat: Isot. In Plant Nutrition and Physiol Intern: Atom. Eergy Agency, Vienna.

D'Amato F., Scarascia Mugnozza G.T., Bozzini A., Mutanti vitali di frumento duro ottenuti dal Laboratorio per le Applicazioni in Agricoltura del CNEN con impiego di radiazioni ionizzanti e mutageni chimici. Genetica Agraria, Vol. XVIII, Fasc. 1-2: 132-141, Atti IX° Convegno annuale S.I.G.A., Palermo, 1963.

Devreux M., Donini B., Scarascia Mugnozza G.T., Chimeric situation avoided by gametophyte irradiation in barley and durum wheat. XII Intern. Congr. of Genetics, Tokyo 1968, Vol. I, pp. 252, 1968.

Donini B., Ancora G., In vitro culture as a rapid tool of isolation and propagation for somatic mutations. IAEA Mutation Breeding Newletter, No. 16, pp. 9-10, 1980.

Donini B., Bozzini A., Brunori A., Avanzi S., Scarascia Mugnozza G.T., Cytological and genetic effects of neutron irradiation in Durum wheat. Techn. Reports Series n° 141. From: Neutron Irradiation of Seeds III, IAEA, Vienna, pp. 91-94, 1972.

Donini B., Scarascia G.T., D'Amato F., Effects of chronic gamma irradiation in durum and bread wheats. Radiation Botany, 4, pp. 387-393, 1964.

Donini B., Scarascia Mugnozza G.T., D'Amato F., Genetic effects of chronic gamma irradiation in Durum wheat. Radiation Bot., 8, pp. 49-58, 1968.

Donini B., Studi di radiosensibilità nei vegetali superiori. Giornale Bot. It., 102, (6), pp. 556- 557, 1968.

Giorgi B., Mannino P., Donini B. 1975 Radiobiological studies in Triticum. I. Response to chronic and acute gamma irradiation of diploid, tetraploid and exaploid species of Triticum and Aegilops. Comptes Rendus de l'Academie Agricole Georgi Dimitrov, Vol. 8, No. 4, pp. 85- 90.

Martini G., A. Brunori. (1973) Cytophotometric measurements of DNA, total proteins and histone in the nuclei of Triticum dicoccum, Aegilops longissima and their amphidiploi. Caryologia 96, 101-105.

Monti L.M., Donini B., Response to chronic gamma irradiation of twenty-four pea genotypes. Radiation Bot., 8, pp. 473-487, 1968.

Paoloni G. (1992). Dal CNRN al CNEN. Laterza,1992.

Paoloni G. 1992 A colloquio con Gian Tommaso Scarascia Mugnozza, in «Energia, ambiente, innovazione dal CNRN all'ENEA» Laterza.

Pistella F. (1992). Il modo di operare dell'ENEA in «Energia, ambiente, innovazione dal CNRN all'ENEA» a cura di Giovanni Paoloni, Laterza, 1992.

Rossi L. (2006). Dalle tecniche nucleari alle biotecnologie: dal CNEN all'ENEA per la ricerca e l'innovazione tecnologica. L'uso pacifico dell'Energia Nucleare da Ginevra 1955 ad oggi: il caso italiano. Atti del Convegno, 8-9 marzo 2006, Biblioteca Nazionale Centrale, Roma.

Rossi L. (2008). Ricerca e Innovazione del Dipartimento ENEA BAS (Biotecnologie Agroindustria Protezione della Salute) Edizioni ENEA, 206 pagine.

Rossi L. (2010). Il miglioramento genetico del grano duro. Il caso Creso. ENERGIA AMBIENTE E INNOVAZIONE. 6/2010.

Rossi L. 1984. Un esempio di innovazione in agricoltura: il grano Creso. Riv. Energia e Innovazione. ENEA, 1984.

Scarascia Mugnozza G.T., 1956. La ricerca Scientifica. Anno 26, n. 1.

Scarascia G.T., Avanzi S., Bozzini A., Cervigni T., D'Amato F., Donini B., Giacomelli M. 1961. Effects of radiations and chemical mutagens in durum and bread wheats. Reprinted from «EFFECTS OF IONIZING RADIATION ON SEEDS» International Atomic Energy Agency, Vienna.

Scarascia G.T., Cervigni T., Dassiou C., Donini B., Giacomelli M., Ricerche sugli effetti delle radiazioni in Nicotiana. IV Modificazioni morfogenetiche, citologiche e biochimiche rilevate su 23 specie sottoposte ad irraggiamento cronico gamma. Energia Nucleare in Agricoltura, pp. 221-233, 1963.

Scarascia Mugnozza G.T., Bagnara D., Bozzini A., (1968). Mutations induced in durum wheat and their significante in genetics and breeding. Procedings of the 3rd Intl. Wheat Syposium, Canberra, pp. 357-370.

Scarascia Mugnozza G.T., D'Amato F., Avanzi S., Belli M.L., Bozzini A., Cervigni T., Martini G., Monti L.M., Mosconi C., (1963). Use of radiation and chimica mutagens in the production of mutation in crops of considerable interest to mediterranean agricolture: durum wheat. Science et technique pour les regions peu developpees, pp.353-361, CNR, Roma.

MUTANTI E MIGLIORAMENTO GENETICO

Carlo Pozzi[1] *e Tommaso Maggiore*[2]
Università degli Studi di Milano e Museo di Storia dell'Agricoltura

Riassunto

La mutazione genetica spontanea è alla base del miglioramento genetico fin da quando questa era un'attività non strutturata e praticamente casuale. La sindrome da domesticazione delle piante è stata causata da mutanti spontanei, e poi sono state mutazioni selezionate dai breeder a determinare il miglioramento della resa, delle resistenze e della qualità delle colture. Il processo è sempre stato più o meno causale, anche quando si sono usati metodi chimico-fisici per indurre mutazioni. Negli ultimi 10 anni sono stati messi a punto metodi per l'induzione mirata e controllata di mutazioni, che stanno già rivoluzionando il miglioramento genetico agrario.

Summary

Mutants and breeding

Spontaneous genetic mutation is the basis of genetic improvement since this was an unstructured and practically random activity. The plant domestication syndrome was caused by spontaneous mutants, and then it was mutations selected by the breeders that led to the improvement in yield, resistance, and crop quality. The process has always been causal, even when chemical-physical methods have been used to induce mutations. In the last 10 years, methods have been developed for the targeted and controlled induction of mutations, which are already revolutionizing agricultural genetic improvement.

INTRODUZIONE

Le mutazioni genetiche spontanee delle piante sono, da millenni, il materiale di base per l'attività umana di miglioramento genetico, così come per la selezione naturale. Le mutazioni de novo (incluse le mutazioni gemmarie e somatiche), selezionate dai primi agricoltori, hanno consentito la nascita e lo sviluppo delle attività agricole. Valutare quanto le mutazioni naturali siano benefiche e aumentino la fitness di una popolazione è complesso, soprattutto in specie con cicli vitali lunghi, com'è il caso per molte piante. In un recente esperimento si sono usati campioni da erbario per calcolare il tasso di

[1] Professore associato di Genetica Agraria
[2] Professore ordinario di Agronomia generale e Coltivazioni erbacee in pensione

mutazione e valutare quanto alcune mutazioni siano importanti per la capacità di una specie di invadere l'ambiente. Risulta che alcuni caratteri importanti per la capacità di colonizzazione - per esempio il tasso di crescita radicale, il gravitropismo ed il tasso di crescita apicale - sono significativamente ereditabili (Exposito-Alonso et al., 2018).

Il tasso di mutazione spontanea è basso, e i miglioratori delle piante hanno sviluppato procedure per indurre le mutazioni in modo artificiale. La creazione di mutanti si è spesso accompagnata con l'insorgenza di mutazioni nascoste e deleterie o peggiorative. Solo a partire dagli anni '80 del secolo scorso i ricercatori sono stati in grado di introdurre modificazioni genetiche più precise e mirate, ricorrendo all'uso di piante geneticamente modificate. Questo processo ha trovato un ulteriore e sofisticato strumento nell'ultimo decennio, grazie all'impiego della tecnologia CRISPR. Ora è possibile indurre mutazioni in posizioni precise del genoma, riducendo al minimo le variazioni indesiderabili (Ma et al., 2021, Reichert, 2021).

È oggi evidente che molte delle mutazioni che hanno contribuito a sviluppare nuove varietà di piante coltivate sono recessive, sia quelle naturali che quelle indotte. I mutanti dominanti, molto più rari, hanno affascinato i genetisti per la loro capacità di svelare il ruolo di mutazioni letali recessive, così contribuendo allo studio della ridondanza genica, e a rompere i vincoli posti dalla pleiotropia, condizioni che complicano il breeding per "forme" delle piante più compatibili con l'agricoltura.

Le moderne pratiche agronomiche per meglio adattare le piante all'ambiente di coltura richiedono significative alterazioni dell'architettura delle stesse e della loro morfologia, un insieme di fenotipi che ha cominciato ad essere selezionato agli albori dell'agricoltura e che è noto come "sindrome da domesticazione". Nel caso del mais, per esempio, i cambiamenti morfologici sono stati così drammatici che la forma domesticata è così poco simile a quella selvatica da rendere difficile credere che il mais si sia evoluto dal teosinte.

MUTANTI DELLA SINDROME DA DOMESTICAZIONE

La perdita di alcune caratteristiche selvatiche a causa di mutazioni spontanee è stato il principale driver per la creazione dell'agricoltura. L'identificazione e l'analisi dei loci della sindrome da domesticazione in specie diverse (soprattutto graminacee) hanno prodotto risultati sorprendenti. Per esempio, si è osservato che esistono divergenze funzionali significative tra geni ortologhi (il caso del mais e di altre graminacee) e, nonostante questo, gli stessi geni sono stati oggetto di selezione in specie diverse, in virtù dei loro effetti positivi sulla resa. In alcuni casi, la diversità funzionale può essere stata dovuta a rare mutazioni dominanti, che riprogrammano drammaticamente l'espressione ed il funzionamento dei geni coinvolti (Reichert, 2021).

I determinanti genetici che controllano la domesticazione potrebbero essere relativamente pochi. In mais, per esempio, i geni che controllano la transizione tra teosinte e mais sono quattro. Il locus *teosinte branched 1* (*tb1*) è fondamentale, agendo in modo epistatico sull'accestimento, la determinazione del sesso dell'infiorescenza e la durezza delle glume. Il clonaggio di *tb1* ha dimostrato che codifica per un fattore di trascrizione di tipo TCP, sovraespresso nel mais domesticato, e indotto dalla luce nel rosso-lontano. Ad una mutazione di questo gene si devono l'elevata ramificazione e accestimento del teosinte, così come la sostituzione delle spighe femminili da parte di pennacchi maschili (Doebley et al., 1995). *Tb1* è un regolatore di altri geni coinvolti nella domesticazione. Un altro locus coinvolto è *Grassy tiller 1* (*gt1*), che incrementa il numero di accestimenti. La variazione allelica nel promotore di questo gene è responsabile del carattere che controlla la produzione di spighe sullo stesso nodo (Whipple et al., 2011). Il mutante *tassels replace upper ears1* (*tru1*) produce delle ramificazioni ascellari allungate, terminanti in pennacchi maschili invece che spighe femminili (Dong et al., 2017). Infine, *teosinte glume architecture1* (*tga1*) è responsabile per l'ammorbidimento e riduzione

delle glume nel mais domesticato (Dorweiler et al., 1993) ed è direttamente regolato da *tb1* (Fig. 1) (Studer et al., 2017).

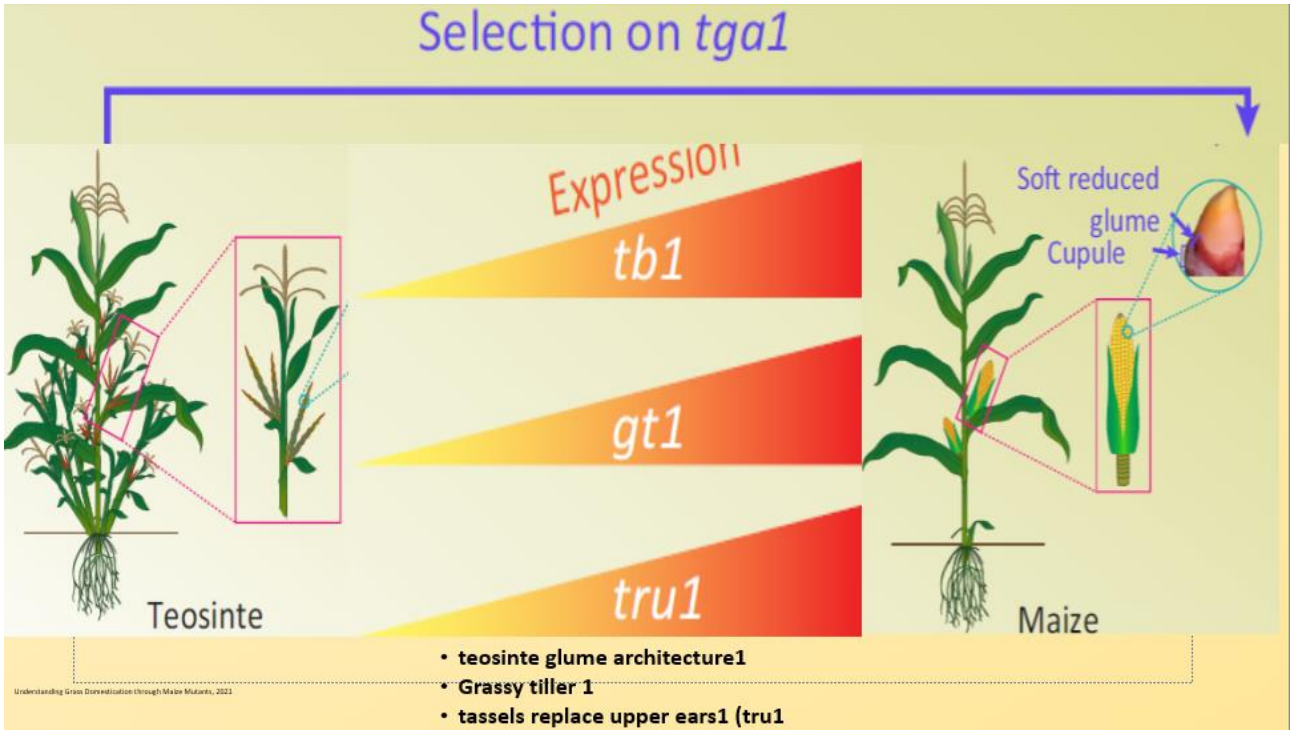


Figura 1. Geni e fenotipi della domesticazione in mais. I mutanti che hanno facilitato il clonaggio dei geni della domesticazione sono indicati (tb1, gt1, tru1, tga1), insieme con il loro livello di espressione nella transizione tra teosinte e mais. Tratto da (Dong et al., 2019).

I geni citati hanno ortologhi in altre graminacee, con funzioni correlate e spesso diverse. *Tb1* è un repressore la cui funzione è conservata tra specie e i cui effetti dipendono dalla specie e dal tessuto dove è espresso: in mais reprime la ramificazione ascellare durante la crescita vegetativa, in frumento reprime l'identità fiorale e in orzo reprime la fertilità della spighetta (Rendon-Anaya and Herrera-Estrella, 2018). Non è noto perché, in specie diverse, la selezione sia stata condotta sia su varianti gain-of-function che su varianti *loss-of-function* del gene. Il mutante di orzo *loss-of-function* dell'ortologo di *tru1*, *uniculme4* (*cul4*) mostra un fenotipo completamente diverso da quello di mais (Tavakol et al., 2015): *cul4* rende le foglie distali fenotipicamente prossimali, un fenotipo non osservato in mais. Inoltre, ha una riduzione del numero delle ramificazioni laterali e degli accesti, l'opposto di quanto osservato in mais (Terzi et al., 2017). Questa differenza potrebbe essere dovuta al fatto che *tru1* in mais è dominante mentre in orzo è recessivo. I mutanti *gain-of-function* sembrano essere un fenomeno piuttosto diffuso tra i geni della domesticazione. Gli strumenti attuali (per esempio quelli basati su CRISPR) per l'ottenimento di fenotipi *loss-of-funcion* in specie correlate promettono di fornire una migliore comprensione del funzionamento dei relativi pathways metabolici, anche in contesti evolutivamente diversi. La ramificazione (del fusto e dell'infiorescenza) è un carattere che deve essere accuratamente modulato: la mancanza di ramificazione riduce la resa, ma anche la ramificazione indeterminata causa fiori non fertili. In specie poliploidi le mutazioni *loss-of-function* sono compensate, e si creano fenotipi intermedi che possono effettivamente aumentare la resa. Nei diploidi, come il riso, i mutanti parzialmente *loss-of-function* potrebbero raggiungere lo stesso effetto.

Un carattere importante selezionato durante la domesticazione dei cereali controlla la deiscenza della spiga. I mutanti che influenzano la dispersione dei semi sono un elemento

essenziale per la selezione di varietà adattate alle pratiche agricole. Le spighe di specie selvatiche, a maturità, disarticolano ogni nodo del rachide, con conseguente dispersione dei semi (Maity et al., 2021). Nelle Poaceae l'architettura dell'infiorescenza si riduce da una forma ancestrale a pannicolo, alla spiga ed alle spighette tipiche delle varietà domesticate. Nelle specie di orzo selvatico, le tre spighette sono una unità facilmente staccabile, funzionali alla dispersione del seme. Sempre in orzo selvatico (*Hordeum spontaneum*) è stato identificato un locus dove risiede il carattere della deiscenza, e i geni candidati identificati (*Brt1* e *Brt2*) controllano la composizione della parete cellulare (Pourkheirandish et al., 2015).

Anche in frumento le mutazioni che controllano la deiscenza sono state importanti nel processo di domesticazione. Nei frumenti selvatici, le glume delle spighette sono tenaci e racchiudono il seme, il rachide è fragile e disperde le singole spighette. Nel frumento domesticato, il rachide non è fragile e le glume sono morbide, cosicché i semi si staccano facilmente dalla spighetta durante le operazioni di trebbiatura. Sono stati identificati molti loci che controllano la facilità di trebbiatura. Uno di questi è il carattere dominante *Q*, co-localizzato con un gene di tipo AP2, un fattore di trascrizione ortologo al gene di mais indeterminate spikelet1 (Zhang et al., 2021). Q controlla anche altri caratteri agronomici, quali l'anticipo di fioritura, la riduzione della taglia e la maggiore densità del seme e compattezza della spiga. La mutazione nel gene che contribuisce alla sindrome di domesticazione è stata identificata e l'allele recessivo è responsabile dell'allungamento della spiga e della copertura della cariosside, mentre l'allele dominante (tipico dei frumenti domesticati) conferisce compattezza alla spiga e rende le cariossidi prive di tegumenti. Recenti studi hanno dimostrato che l'allele dominante è dovuto ad una mutazione al sito di legame di un microRNA (miR172), che funziona come soppressore (Debernardi et al., 2017, Liu et al., 2018).

Altri mutanti dei cereali sono importanti per regolare la quantità di semi che la pianta produce, mediante il controllo del numero di spighette fertili. Nell'orzo distico, è il gene *Vrs1* che controlla la riduzione della fertilità delle spighette laterali (che alla fine risultano fiancheggiate da due spighette sterili). Nell'orzo moderno polistico (a sei file) le spighette laterali sono fertili. Il gene *Vrs1* è un fattore di trascrizione di tipo HD-zip, omologo a *gt1*, e funziona come repressore; infatti, nel mutante *loss-of-function* le spighette laterali sono fertili (Komatsuda et al., 2007). Il carattere "due file" è dominante, ed è evolutivamente vantaggioso. L'attività di Vrs1 è modificata da altri geni, inclusa una istone-demetilasi e un fattore di trascrizione di tipo LOB, ortologo di ramosa2 di mais (dove promuove la crescita determinata delle ramificazioni). La funzione dei geni LOB sembra essere conservata in orzo e mais, perché i mutanti *loss-of-function* in entrambe le specie hanno un'attività indeterminata del meristema dell'infiorescenza. Un altro modificatore di Vrs1 in orzo è int-c, ortologo di tb1, che produce un fenotipo intermedio tra il due- ed il sei-file. Il mutante loss-of-function di int-c riduce l'accestimento in orzo, diversamente da quanto fa tb1 in mais (Ramsay et al., 2011): i mutanti continuano a produrre accesti, anche dopo essere stati esposti ad ombreggiamento (Wang et al., 2022a).

Recentemente è stato isolato un mutante di frumento che mostra spighette extra-numerarie, aumentando sia il numero di cariossidi per spiga che la resa in condizioni di campo. Mentre il tipico frumento tenero esaploide ha una spighetta per rachide, il mutante *DUO-B1* mostra molteplici spighette con un numero anomalo di file (Wang et al., 2022b). Anche il gene di frumento ortologo di *Tb1* (*TaTB1*) contribuisce a determinare la resa, soprattutto attraverso le modificazioni dell'infiorescenza, sebbene in modo opposto a quanto avviene in mais. Infatti, copie extra del gene conducono alla formazione di spighette appaiate ad ogni nodo. In frumento, inoltre, il gene regola negativamente la proteina FLOWERING LOCUS 1 (FT1), prolungando l'attività di ramificazione della spighetta. Questa serie di studi dimostra che, a seconda della specie e dello stadio di

sviluppo considerati, sia l'aumento che la diminuzione della attività di Tb1 e ortologhi possono aumentare la ramificazione della spiga.

Anche in pomodoro, la domesticazione ed il successivo miglioramento genetico hanno condotto alla selezione di genotipi più adatti alle pratiche agricole. In particolare, le varietà attuali hanno perso il carattere selvatico che comporta la rottura del pedicello, facilitando la dispersione dei semi. Nelle varietà *jointless* – derivanti da un mutante selezionato negli anni Cinquanta - il calice si stacca solo alla raccolta, perché viene eliminata la zona di abscissione sul picciolo, riducendo la cascola dei frutti e i danni post-raccolta meccanica. Il carattere è controllato dal locus *j2*, che però è epistatico al locus *ej2*, che controlla la dimensione del frutto e che è stato anch'esso attivamente selezionato. Quando i due geni sono presenti nella stessa varietà, la loro interazione causa una ramificazione eccessiva dell'infiorescenza e sterilità. I breeder hanno sopperito a questo difetto selezionando per varietà con soppressori degli effetti epistatici, diminuendo però i potenziali incrementi di resa. È stato dimostrato che è possibile modulare l'espressione dei due geni coinvolti mediante la selezione di mutanti naturali o indotti, per produrre una gamma di tipi di infiorescenze, con potenziali benefici (Lee and Hutton, 2021, Soyk et al., 2017). La tecnologia CRISPR ha facilitato l'ottenimento di serie alleliche (discusso più avanti), mimando l'effetto dose anche di mutazioni con effetti non facilmente individuabili (Soyk et al., 2019).

La perdita o riduzione della deiscenza è un esempio di evoluzione fenotipica convergente durante la domesticazione. Tuttavia, i mutanti per questo carattere hanno diversi gradi di penetranza: per esempio, tutti i fagioli coltivati sono deiscenti (per facilitare la sgranatura), mentre alcune varietà locali e semi-selvatiche sono indeiscenti (Di Vittori et al., 2019). Gli studi indicano che il carattere è controllato da geni ortologhi in specie diverse, con funzioni conservate. Tuttavia, la perdita della deiscenza può essere dovuta a geni diversi in specie diverse (Rau et al., 2019). È quindi possibile che il modello di evoluzione convergente si possa applicare ai cereali, per esempio, ma non a tutti i legumi.

Anche in riso, i mutanti che favoriscono la raccolta sono stati oggetto di selezione. La specie selvatica *Oryza nivara* ha uno strato di abscissione continuo tra il seme ed il pedicello, mentre nel domesticato *O. sativa* lo strato è incompleto. Esistono anche diversità nella intensità di deiscenza: la selezione umana in riso ha favorito i mutanti che riducono la deiscenza, sebbene lo strato di abscissione sia presente – in minore quantità – anche nelle varietà scarsamente deiscenti. Questo processo riduce la perdita della granella, ma la parziale conservazione dello strato di abscissione facilita la trebbiatura. Nei cereali, i mutanti per la deiscenza sono dovuti a varianti di molti geni (Maity et al., 2021); pochi di questi sono parte di programmi di breeding, per esempio in riso. In particolare, mutazioni nelle regioni regolatrici di un gene omeotico (qSH1) conferiscono facilità di trebbiatura (Konishi et al., 2006) e, recentemente, la tecnica CRISPR è stata utilizzata su questo gene per creare varietà di riso ad elevata trebbiabilità (Sheng et al., 2020).

In mais, sono stati individuati mutanti che potrebbero essere importanti per le applicazioni agronomiche. L'angolo di inserzione delle foglie è diverso in mais e in teosinte e questo ha permesso di mappare e clonare i loci responsabili. Due dei geni responsabili del carattere quantitativo – *Upright Plant Architecture 1 e 2* – sono stati clonati. Questo ha permesso di fare luce sulla relazione tra questi geni ed i brassinosteroidi, responsabili dell'aumento dell'angolo di inserzione delle foglie durante la domesticazione. La manipolazione dei geni identificati e dei loro partner può portare a modificare l'architettura della pianta, rendendola più adeguata all'aumento della densità di semina richiesta dalla moderna maiscoltura (Tian et al., 2019).

MUTANTI PER LE RESISTENZE

La mutazione del gene *Mildew resistance locus O* (*MLO*) è stata originariamente identificata, a cavallo degli anni ’30 del secolo scorso, come variante naturale in una *landrace* di orzo etiope. Questa mutazione *loss-of-funcion* conferisce, in orzo, la resistenza all’ascomicete fitopatogeno *Blumeria graminis*, ed è impiegata da 40 anni in orzo e più recentemente in molte altre specie dove il gene ortologo sia presente. Diversamente dalla resistenza tipica mediata dai geni *R*, che conferisce resistenza razza-specifica ed è dominante o semidominante, la resistenza conferita da *mlo* non è razza-specifica. Esistono molti alleli mutanti per *mlo* in orzo e di questi la mutazione naturale *mlo-11* e quella indotta da *mlo-9* sono quelle maggiormente usate a partire dagli anni ’70 del secolo scorso (Acevedo-Garcia et al., 2014). Oggi, più della metà degli orzi primaverili in commercio nell’Europa centrale sono immuni all’oidio, grazie all’introgressione della resistenza *mlo*. Sono ancora poche invece le varietà di orzo invernale introgredite.

I geni *Mlo* sono presenti in piccole famiglie nei genomi delle piante superiori. Il ruolo regolativo negativo di particolari membri nella definizione dell’immunità è conservato evolutivamente e questo è dimostrato dal fatto che sono descritti mutanti resistenti *mlo* in Arabidopsis, pomodoro e pisello, solo per citare alcune specie (Fig. 2) (Kusch and Panstruga, 2017).

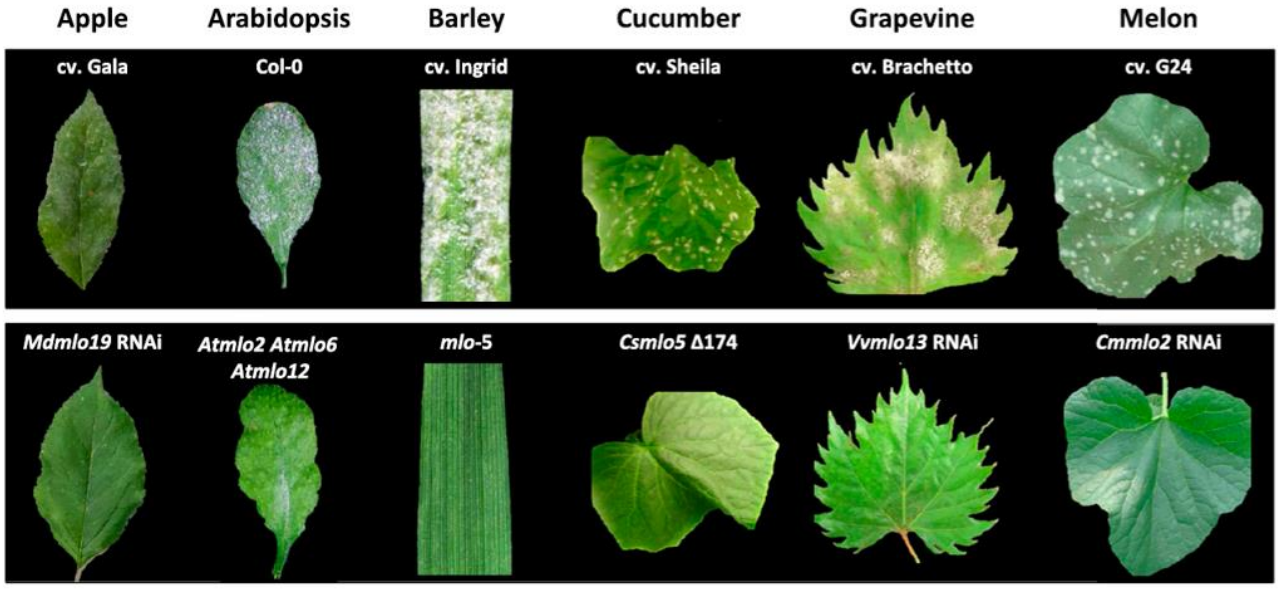


Figura 2. Il fenotipo mlo in diverse specie, ottenuto con una varietà di metodi, incluse le mutazioni naturali e quelle dovute a interferenza con RNA. Da (Kusch and Panstruga, 2017).

L’uso di piante resistenti *mlo* è associato ad alcune limitazioni. I parassiti biotrofici, come l’oidio, sono adattati alla fisiologia dell’ospite e questo fa sì che una mutazione che implichi la perdita della suscettibilità al patogeno molto probabilmente comporti effetti pleiotropici per la pianta. Prima di tutto, in assenza del patogeno, le piante resistenti formano delle papille (cellule ricche di callosio), soprattutto sulla epidermide della foglia. Inoltre, le cellule del mesofillo vanno incontro a morte spontanea, un indicatore di senescenza precoce. È anche possibile che insorga suscettibilità a malattie prima non rilevate come conseguenza dell’uso di geni di resistenza singoli in programmi di breeding. Per esempio, l’orzo *mlo* è suscettibile al fungo emibiotrofico *Magnaporthe oryzae* e mostra una maggiore sensibilità alla tossina di *Bipolaris sorokiniana*. Esiste una correlazione negativa tra la suscettibilità all’oidio e l’estensione dei fenotipi pleiotropici, correlazione che dipende dal genotipo della pianta. Inoltre, lo stadio di sviluppo e le condizioni di

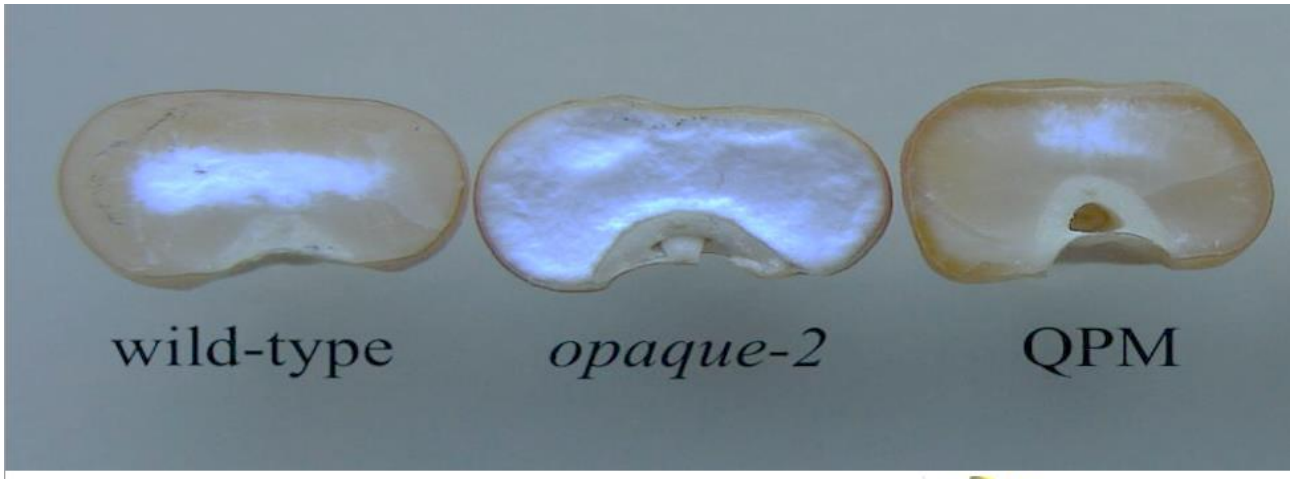
idratazione della pianta sono importanti nella definizione dell'entità degli effetti pleiotropici. Per esempio, le varietà *mlo* hanno una suscettibilità (dipendente dall'ambiente) all'ascomicete *Ramularia spp*. (Hoheneder et al., 2021). Inoltre, sono state registrate aumentate suscettibilità ad altri patogeni, in orzo primaverile. Per questi motivi, è stato un obiettivo primario del breeding l'identificazione di genotipi con il minor numero di effetti pleiotropici. La *landrace* di orzo Eth295 ha una variante di *mlo-11* e mostra resistenza senza i fenotipi pleiotropici comunemente osservati (Ge et al., 2020). Inoltre, gli orzi resistenti *mlo* sono meno colonizzati dalle benefiche micorrize arbuscolari, anche se non è ancora del tutto chiarita la relazione causa-effetto. I breeder cominciano a capire che è necessario selezionare piante resistenti ai patogeni e contemporaneamente in grado di ospitare una microflora benefica, a tutto vantaggio della sostenibilità delle colture (Hilbert et al., 2019).

In frumento si è scoperto che gli zuccheri apoplastici facilitano la relazione tra ospite e patogeno, promuovendo lo sviluppo della malattia. Quando il patogeno è riconosciuto dai recettori cellulari, si attivano i trasportatori di esosi che prelevano gli zuccheri dall'apoplasto, sottraendoli al patogeno. In risposta, il patogeno secerne degli effettori che bloccano la risposta immunitaria. In mutanti *mlo* di frumento, gli zuccheri sono presi dall'apoplasto ed accumulati nel citoplasma, dove vengono percepiti da una esochinasi-1, che attiva la glicolisi. La esochinasi, in presenza di quantità crescenti di glucosio, viene traslocata nel nucleo, dove interagisce con alcuni fattori di trascrizione per innescare la senescenza precoce e reprimere l'espressione di geni fotosintetici, portando ad una diminuzione di resa nei mutanti. Esistono altri mutanti di frumento (*Tamlo-R32*) dove gli esosi vengono invece accumulati nel vacuolo, creando un gradiente che facilita l'assunzione di esosi citoplasmatici in eccesso, bypassando gli effetti tossici dell'accumulo di zucchero. Il risultato è che le piante resistenti sono meno soggette ad una riduzione della crescita (Najafi and Palmgren, 2022).

MUTANTI PER LA QUALITÀ

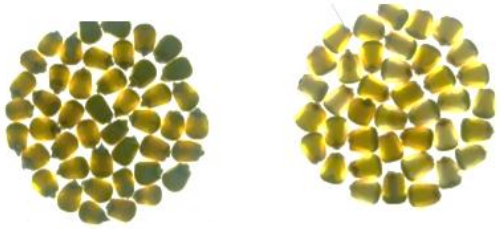
Durante gli ultimi '50 anni sono state condotte molte ricerche per aumentare il livello di micronutrienti in specie agrarie fondamentali, quali mais e frumento, soprattutto per migliorare la qualità nutrizionale a vantaggio delle popolazioni più povere che non hanno accesso a fonti alternative di proteine. Più di due miliardi di persone in Asia, Africa ed America Latina soffrono per la carenza di uno o più micronutrienti. Il CIMMYT si è distinto in quest'opera, come prova il successo di Villegas e Vasal, ai quali è stato conferito il World Food Prize nel 2000 per il loro lavoro sulla qualità proteica del mais (Vasal, 2016). Sono state realizzate molte varietà *quality protein maize* (QPM), che portano fino ad un raddoppiamento della quantità di triptofano (fino a 0.08% nella farina), di lisina (fino a 0.4% nella farina), rispetto alle varietà convenzionali di mais (Prasanna et al., 2019). Questi miglioramenti sono dovuti ad una mutazione spontanea di mais, scoperta negli anni '20 del secolo scorso, che porta ad avere granelli teneri ed opachi (Fig. 3). Nel 1961, i ricercatori della Purdue University hanno scoperto che questi mais sono mutanti omozigoti recessivi per il gene *opaque2* che porta ad aumenti di lisina e triptofano nell'endosperma (Wang et al., 2019). Tuttavia, non è sufficiente avere la mutazione per ottenere livelli amminoacidici più alti. Occorrono anche dei loci modificatori e questo rende necessario effettuare un breeding molto accurato nella misurazione dei livelli amminoacidici. La selezione del mutante implica anche effetti negativi che includono la riduzione fino al 25% della resa (a causa della minore densità della granella) e un aumento della suscettibilità ai marciumi della spiga e dello stocco ed agli insetti durante lo stoccaggio. Gli effetti pleiotropici, soprattutto la minore resa e la maggior tenerezza della granella, restringono l'utilizzabilità di questa mutazione nel breeding. Nonostante questo,

i programmi di miglioramento hanno avuto successo nell'identificazione di varietà *opaque2* a granella dura (Pukalenthy et al., 2020). Gli attuali programmi di miglioramento sono indirizzati all'ottenimento di popolazioni di mais *opaque* adattate ad ambienti subtropicali e tropicali e all'ottenimento di varietà a cariosside dura, che mantengano i livelli di elevata qualità proteica, aumentata resa e resistenza ai marciumi. In Asia, sono state sviluppate più di 40 QPM. Recentemente, è stato scoperto un mutante recessivo – *opaque16* – che combina performance agronomiche con qualità alimentare (Sarika et al., 2018b). Il miglioramento genetico utilizza ora marcatori molecolari in associazione con *opaque2* e *opaque16* per piramidare entrambi gli alleli in un solo background genetico (Sarika et al., 2018a).



Traits	CM	QPM
Protein (%)	≥ 8	≥ 8
Lysine in endosperm protein (%)	1.6-2.6 (mean 2.0)	2.7-4.5 (mean 4.0)
Tryptophan in endosperm protein (%)	0.2-0.6 (mean 0.4)	0.5-1.1 (mean 0.8)

Source: Vivek et al. (2008)



https://www.frontiersin.org/files/Articles/539857/fpls-11-00698-HTML-r1/image_m/fpls-11-00698-g001.jpg

Figura 3. Fenotipo mutante, opaque-2 e QPM in mais. Sono indicati in tabella alcuni valori nutrizionali del mais comune e QPM. Inoltre, sono illustrate le diverse colorazioni dell'amido in mais opaque-2 e normali. Da (Parsons et al., 2020).

Altri esempi di mutanti per la qualità sono stati descritti in specie arboree, dove viene praticata la selezione di mutazioni gemmarie. Queste mutazioni sono correlate con la variabilità presente nelle cellule somatiche, ma i meccanismi che le originano non sono noti. Un recente esempio è fornito dalla forma del frutto della pesca. La pesca viene classificata come "a frutto piatto" o "rotondo", dove la forma piatta è dominante. La forma del frutto è controllata da un *S-locus*, che è stato geneticamente e molecolarmente mappato. È stato identificato un polimorfismo di un singolo nucleotide che permette di discriminare la forma del frutto (Cao et al., 2016). Il risequenziamento del genoma di un clone vegetativo mutante ha fornito evidenze che la forma del frutto è associata alla perdita di eterozigosi. Nel caso, l'aplotipo che porta il gene o i geni che controllano il frutto piatto viene perso nel mutante, portando alla transizione a frutto rotondo (Tan et al., 2019).

MUTANTI E SERIE ALLELICHE

I miglioratori delle specie agrarie hanno sempre cercato di ottenere variabilità genetica inducendo mutanti mediante mutagenesi di vario tipo (Reichert, 2021). La tecnologia CRISPR (una versione di successo del *genome editing*) ha migliorato la situazione con il

permettere di ottenere mutanti in modo rapido e preciso (Gaillochet et al., 2021). La integrazione di genetica diretta ed inversa attraverso la creazione di librerie di mutanti con mutagenesi mirata è uno strumento rapido e preciso per la validazione di geni importanti, soprattutto in specie con genomi complessi. Nelle librerie di mutanti tradizionali, la relazione tra genotipo e fenotipo è di solito molto debole ed è difficile identificare e clonare i geni che sottendono i fenotipi individuati. Le librerie di mutanti CRISPR permettono invece uno screening molto efficiente. Sono state create librerie di mutanti originati mediante CRISPR in riso (Lu et al., 2017), mais (Liu et al., 2020) e pomodoro (Jacobs et al., 2017). Inoltre, la tecnologia si adatta anche a screening in specie poliploidi quali *Brassica napus* (Li et al., 2018) e soia (Bai et al., 2020). La creazione di librerie CRISPR permette di identificare la funzione genica determinando il fenotipo dei mutanti *loss-of-function*. Il processo di *genome editing* ad alta efficienza può essere applicato a migliaia di geni candidati, ed è ottimo per la validazione di fenotipi legati a caratteri genetici, ma anche per l'identificazione di nuovi geni; la comparazione di fenotipi ottenuti con l'editing di alleli con quelli di alleli naturali e per la scoperta di geni che risultino in cambiamenti fenotipici inattesi. Si tratta di una piattaforma tecnologica efficace e precisa, che richiede però molto lavoro per la individuazione di modificazioni *off-target* ed *on-target*, e per la rimozione dei transgeni nella progenie di piante editate. Per superare le limitazioni connesse con lo screening di mutanti sono state messe a punto varie tecniche, che includono la PCR "*annealing at critical temperature*", l'analisi di *melting* ad alta risoluzione e l'uso di elettroforesi in poliacrilamide (Huang et al., 2022). Certamente i mutanti con fenotipo evidente possono essere individuati più facilmente: per esempio, in riso e tabacco un fenotipo albino si origina quando viene editato il gene per la fitoene desaturasi. Inoltre, lo screening fenotipico può essere facilitato usando marcatori quali erbicidi o antibiotici.

Il protocollo per lo screening delle collezioni di mutanti è basato sul sequenziamento ad alta efficienza di campioni raggruppati (*pooled*), abbattendo così i costi di screening. L'RNA guida del CRISPR deve essere disegnato in modo da avere un unico target nel genoma, diminuendo quindi la possibilità di *off-target*. Esempi in riso sono basati sulla targhettizzazione di esoni vicini all'inizio dell'ORF, in prossimità del codone di inizio. La piattaforma CRISPR in riso è basata su più di dodicimila geni altamente espressi nel germoglio. L'inserimento di una libreria di molecole di RNA-guida in Agrobatterio e la successiva trasformazione ha permesso di ottenere più di quattordicimila linee trasformate indipendenti. Queste linee sono state fenotipizzate e sono state isolate una cinquantina di linee "mutanti". Il sequenziamento di queste linee ha permesso di identificare quelle correttamente editate. Questo esperimento indica che genotipo e fenotipo sono più efficientemente correlabili in questo tipo di screening che in altre piattaforme, quando l'obiettivo è di identificare i mutanti indotti. Inoltre, l'identificazione del gene candidato per un fenotipo è semplificata dal fatto che esiste una relazione uno-a-uno tra sequenza guida e gene target nelle linee mutanti. Infine, questo approccio permette di identificare molteplici alleli mutanti per lo stesso gene, e questo evita i test di complementazione. Recentemente, lo screening di librerie CRISPR è stato applicato anche a famiglie di elementi genetici quali i miRNA, come testimoniato dallo studio condotto in cotone sulle isoforme di miR482, implicato nella resistenza a *Verticillium dahliae* (Zhu et al., 2022). Lo screening ad alta efficienza con CRISPR è facilitato dalla progressiva maggiore disponibilità di pangenomi: in riso, ad esempio, sono state risequenziate le cultivar che hanno originato il pedigree della varietà semi-nana IR8, e sono stati così identificati dei tratti genomici conservati dalla selezione. Queste regioni contengono geni candidati per esperimenti di knockout e knockdown, alla ricerca di mutanti in fenotipi di interesse agronomico (Huang et al., 2018).

La specificità di CRISPR apre nuove possibilità allo studio, in un background genetico noto, degli effetti di piccole varianti alleliche e rende possibile accertare l'effetto del dosaggio genico generando serie alleliche di mutanti. È, tuttavia, ancora difficile validare piccole varianti ottenute mediante lo screening di librerie di mutanti. Questo è stato realizzato in medicina umana, mediante una tecnologia chiamata "*saturation editing*", che ha permesso di analizzare la funzione di SNPs individuati negli esoni del gene *BRCA1* (Erwood et al., 2022).

L'editing genomico mediante CRISPR consente di creare serie alleliche e viene applicato a complessi caratteri agronomici quali la resa (Herbert et al., 2020). Per esempio, sono state create serie alleliche in riso per studiare la funzione del gene *OsIAA23*, quando una semplice inattivazione del gene non aveva prodotto alcun fenotipo. La maggior parte delle applicazioni è basata sui regolatori negativi, avendo come target regioni codificanti e promotrici per creare mutanti *null* o dei deboli *loss-of-function*. Tuttavia, caratteri di interesse agronomico possono essere anche dominanti o conferiti da alleli *gain-of-function*. Per esempio, uno studio recente si è concentrato sui membri della famiglia genica *CYP78A*, regolatori positivi del peso e della dimensione degli organi delle piante. L'editing, in questo caso, è avvenuto sul promotore di un gene di pomodoro, il gene *KLUH*, attorno ad un SNP associato con il carattere "peso del frutto". Lo SNP mappa in una regione contigua a un elemento di cis regolazione. Sono stati ottenuti vari mutanti, alcuni dei quali hanno mostrato un aumento del peso del frutto ed una diminuzione nella quantità di frutti piccoli (Li et al., 2022). Questo metodo permette di creare mutanti con fenotipi utili, anche nel caso in cui i mutanti inattivati costitutivi abbiano fenotipi sterili o difettosi. Le mutazioni in regioni cis-regolatorie sono quindi utili per il breeding, perché creano una continuità locus specifica nella variabilità genetica, con pochi o nessun effetto negativo (Rodriguez-Leal et al., 2017). Questo esperimento dimostra il potenziale per il breeding dell'editing genomico di precisione: la presenza di geni come *KLUH*, in specie quali patata, peperone, soia, riso, frumento e mais, fa presagire che anche in queste specie sarà possibile ingegnerizzare la dimensione degli organi attraverso l'accesso a serie alleliche. La tecnologia CRISPR si presta anche al breeding basato sull'accumulo di più QTL, come dimostrato da Zhou e colleghi (Zhou et al., 2019). In questo caso sono stati scelti geni che controllano negativamente QTL per la resa e sono state ottenute combinazioni di mutanti singoli, doppi e tripli in background di élite.

Quanto riportato descrive un avanzamento della ricerca basata su CRISPR in alcune colture di grande rilevanza economica. Recentemente, la National Science Foundation americana ha supportato il progetto Plant Genome Editing Database, descritto da Zheng e collaboratori (Zheng et al., 2019), che contiene dati su mutanti originati in otto specie: *Brachypodium distachyon*, *Fragaria* sp., *Manihot* sp., *Medicago truncatula*, *Nicotiana benthamiana*, *Physalis* sp., riso e pomodoro.

L'ottenimento di mutanti *loss-of-function* in specie poliploidi è molto complesso, a causa della ridondanza funzionale dei genomi. In erba medica (*Medicago sativa*), questo si accompagna con la depressione da inbreeding che rende ulteriormente complessa l'attività del miglioratore genetico. Per questo, in specie poliploidi è utile indurre mutazioni dominanti. Una possibilità è offerta dalle microProteine, cioè piccole proteine che si originano da geni che codificano per proteine più grandi. In medica, i geni target per questo approccio potrebbero essere quelli che regolano la fioritura e quindi il rapporto tra foglie e fusto e in ultima analisi la resa e digeribilità della foraggera. La tecnologia CRISPR può essere usata per arrivare alla sintesi di microProteine derivanti da parti troncate di unità di trascrizione. Queste possono eterodimerizzare con la proteina intera, inattivandola producendo mutanti dominanti negativi (Chiurazzi et al., 2022). I candidati ideali per questo approccio sono i geni della famiglia CONSTANS/CO-LIKE e, nel caso della

medica, ci si attende di ottenere un ritardo di fioritura, a vantaggio della biomassa e della qualità del foraggio.

CONCLUSIONI

L'ottenimento di mutazioni senza l'intervento diretto umano ha permesso alle piante di adattarsi ai nuovi ambienti. Questo processo viene ora affiancato dalla possibilità di generare in modo preciso nuove mutazioni, un approccio utile anche al miglioramento di caratteri di interesse per l'uomo.

BIBLIOGRAFIA

Acevedo-Garcia, J., Kusch, S., and Panstruga, R. (2014) Magical mystery tour: MLO proteins in plant immunity and beyond. New Phytol 204, 273-281.

Bai, M., Yuan, J., Kuang, H., Gong, P., Li, S., Zhang, Z., . . . Guan, Y. (2020) Generation of a multiplex mutagenesis population via pooled CRISPR-Cas9 in soya bean. Plant Biotechnol J 18, 721-731.

Cao, K., Zhou, Z., Wang, Q., Guo, J., Zhao, P., Zhu, G., . . . Wang, L. (2016) Genome-wide association study of 12 agronomic traits in peach. Nat Commun 7, 13246.

Chiurazzi, M.J., Norrevang, A.F., Garcia, P., Cerdan, P.D., Palmgren, M., and Wenkel, S. (2022) Controlling flowering of Medicago sativa (alfalfa) by inducing dominant mutations. J Integr Plant Biol 64, 205-214.

Debernardi, J.M., Lin, H., Chuck, G., Faris, J.D., and Dubcovsky, J. (2017) microRNA172 plays a crucial role in wheat spike morphogenesis and grain threshability. Development 144, 1966-1975.

Di Vittori, V., Gioia, T., Rodriguez, M., Bellucci, E., Bitocchi, E., Nanni, L., . . . Papa, R. (2019) Convergent Evolution of the Seed Shattering Trait. Genes (Basel) 10.

Doebley, J., Stec, A., and Gustus, C. (1995) teosinte branched1 and the origin of maize: evidence for epistasis and the evolution of dominance. Genetics 141, 333-346.

Dong, Z., Li, W., Unger-Wallace, E., Yang, J., Vollbrecht, E., and Chuck, G. (2017) Ideal crop plant architecture is mediated by tassels replace upper ears1, a BTB/POZ ankyrin repeat gene directly targeted by TEOSINTE BRANCHED1. Proc Natl Acad Sci U S A 114, E8656-E8664.

Dorweiler, J., Stec, A., Kermicle, J., and Doebley, J. (1993) Teosinte glume architecture 1: A Genetic Locus Controlling a Key Step in Maize Evolution. Science 262, 233-235.

Erwood, S., Bily, T.M.I., Lequyer, J., Yan, J., Gulati, N., Brewer, R.A., . . . Cohn, R.D. (2022) Saturation variant interpretation using CRISPR prime editing. Nat Biotechnol 40, 885-895.

Exposito-Alonso, M., Becker, C., Schuenemann, V.J., Reiter, E., Setzer, C., Slovak, R., . . . Weigel, D. (2018) The rate and potential relevance of new mutations in a colonizing plant lineage. PLoS Genet 14, e1007155.

Gaillochet, C., Develtere, W., and Jacobs, T.B. (2021) CRISPR screens in plants: approaches, guidelines, and future prospects. Plant Cell 33, 794-813.

Ge, C., Moolhuijzen, P., Hickey, L., Wentzel, E., Deng, W., Dinglasan, E.G., and Ellwood, S.R. (2020) Physiological Changes in Barley mlo-11 Powdery Mildew Resistance Conditioned by Tandem Repeat Copy Number. Int J Mol Sci 21.

Herbert, L., Meunier, A.C., Bes, M., Vernet, A., Portefaix, M., Durandet, F., . . . Perin, C. (2020) Beyond Seek and Destroy: how to Generate Allelic Series Using Genome Editing Tools. Rice (N Y) 13, 5.

Hilbert, M., Novero, M., Rovenich, H., Mari, S., Grimm, C., Bonfante, P., and Zuccaro, A. (2019) MLO Differentially Regulates Barley Root Colonization by Beneficial Endophytic and Mycorrhizal Fungi. Front Plant Sci 10, 1678.

Hoheneder, F., Hofer, K., Groth, J., Herz, M., Heß, M., and Hückelhoven, R. (2021) Ramularia leaf spot disease of barley is highly host genotype-dependent and suppressed by continuous drought stress in the field. Journal of Plant Diseases and Protection 128, 749-767.

Huang, J., Li, J., Zhou, J., Wang, L., Yang, S., Hurst, L.D., . . . Tian, D. (2018) Identifying a large number of high-yield genes in rice by pedigree analysis, whole-genome sequencing, and CRISPR-Cas9 gene knockout. Proc Natl Acad Sci U S A 115, E7559-E7567.

Huang, Y., Shang, M., Liu, T., and Wang, K. (2022) High-throughput methods for genome editing: the more the better. Plant Physiol 188, 1731-1745.

Jacobs, T.B., Zhang, N., Patel, D., and Martin, G.B. (2017) Generation of a Collection of Mutant Tomato Lines Using Pooled CRISPR Libraries. Plant Physiol 174, 2023-2037.

Komatsuda, T., Pourkheirandish, M., He, C., Azhaguvel, P., Kanamori, H., Perovic, D., . . . Yano, M. (2007) Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 1424-1429.

Konishi, S., Izawa, T., Lin, S.Y., Ebana, K., Fukuta, Y., Sasaki, T., and Yano, M. (2006) An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication. Science 312, 1392-1396.

Kusch, S. and Panstruga, R. (2017) mlo-Based Resistance: An Apparently Universal "Weapon" to Defeat Powdery Mildew Disease. Mol Plant Microbe Interact 30, 179-189.

Lee, T.G. and Hutton, S.F. (2021) Field Evaluation of CRISPR-Driven Jointless Pedicel Fresh-Market Tomatoes. Agronomy 11, 1957.

Li, C., Hao, M., Wang, W., Wang, H., Chen, F., Chu, W., . . . Hu, Q. (2018) An Efficient CRISPR/Cas9 Platform for Rapidly Generating Simultaneous Mutagenesis of Multiple Gene Homoeologs in Allotetraploid Oilseed Rape. Front Plant Sci 9, 442.

Li, Q., Feng, Q., Snouffer, A., Zhang, B., Rodriguez, G.R., and van der Knaap, E. (2022) Increasing Fruit Weight by Editing a Cis-Regulatory Element in Tomato KLUH Promoter Using CRISPR/Cas9. Front Plant Sci 13, 879642.

Liu, H.J., Jian, L., Xu, J., Zhang, Q., Zhang, M., Jin, M., . . . Yan, J. (2020) High-Throughput CRISPR/Cas9 Mutagenesis Streamlines Trait Gene Identification in Maize. Plant Cell 32, 1397-1413.

Liu, P., Liu, J., Dong, H., and Sun, J. (2018) Functional regulation of Q by microRNA172 and transcriptional co-repressor TOPLESS in controlling bread wheat spikelet density. Plant Biotechnol J 16, 495-506.

Lu, Y., Ye, X., Guo, R., Huang, J., Wang, W., Tang, J., . . . Qian, Y. (2017) Genome-wide Targeted Mutagenesis in Rice Using the CRISPR/Cas9 System. Mol Plant 10, 1242-1245.

Ma, L., Kong, F., Sun, K., Wang, T., and Guo, T. (2021) From Classical Radiation to Modern Radiation: Past, Present, and Future of Radiation Mutation Breeding. Front Public Health 9, 768071.

Maity, A., Lamichaney, A., Joshi, D.C., Bajwa, A., Subramanian, N., Walsh, M., and Bagavathiannan, M. (2021) Seed Shattering: A Trait of Evolutionary Importance in Plants. Front Plant Sci 12, 657773.

Najafi, J. and Palmgren, M. (2022) Hexose transport reverts the growth penalty of mlo resistance. Trends Plant Sci 27, 739-741.

Pourkheirandish, M., Hensel, G., Kilian, B., Senthil, N., Chen, G., Sameri, M., . . . Komatsuda, T. (2015) Evolution of the Grain Dispersal System in Barley. Cell 162, 527-539.

Prasanna, B.M., Palacios-Rojas, N., Hossain, F., Muthusamy, V., Menkir, A., Dhliwayo, T., . . . Fan, X. (2019) Molecular Breeding for Nutritionally Enriched Maize: Status and Prospects. Front Genet 10, 1392.

Pukalenthy, B., Manickam, D., Adhimoolam, K., Mahesh, S.G., Ramanathan, N., Chandran, S., . . . Natesan, S. (2020) Marker aided introgression of opaque 2 (o2) allele improving lysine and tryptophan in maize (Zea mays L.). Physiol Mol Biol Plants 26, 1925-1930.

Ramsay, L., Comadran, J., Druka, A., Marshall, D.F., Thomas, W.T., Macaulay, M., . . . Waugh, R. (2011) INTERMEDIUM-C, a modifier of lateral spikelet fertility in barley, is an ortholog of the maize domestication gene TEOSINTE BRANCHED 1. Nat Genet 43, 169-172.

Rau, D., Murgia, M.L., Rodriguez, M., Bitocchi, E., Bellucci, E., Fois, D., . . . Papa, R. (2019) Genomic dissection of pod shattering in common bean: mutations at non-orthologous loci at

the basis of convergent phenotypic evolution under domestication of leguminous species. Plant J 97, 693-714.

Reichert, N.A. (2021) History of plant genetic mutations ± human influences. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 57, 554-564.

Rendon-Anaya, M. and Herrera-Estrella, A. (2018) The advantage of parallel selection of domestication genes to accelerate crop improvement. Genome Biol 19, 147.

Rodriguez-Leal, D., Lemmon, Z.H., Man, J., Bartlett, M.E., and Lippman, Z.B. (2017) Engineering Quantitative Trait Variation for Crop Improvement by Genome Editing. Cell 171, 470-480 e478.

Sarika, K., Hossain, F., Muthusamy, V., Zunjare, R.U., Baveja, A., Goswami, R., . . . Gupta, H.S. (2018a) Marker-assisted pyramiding of opaque2 and novel opaque16 genes for further enrichment of lysine and tryptophan in sub-tropical maize. Plant Sci 272, 142-152.

Sarika, K., Hossain, F., Muthusamy, V., Zunjare, R.U., Baveja, A., Goswami, R., . . . Gupta, H.S. (2018b) Opaque16, a high lysine and tryptophan mutant, does not influence the key physico-biochemical characteristics in maize kernel. PLoS One 13, e0190945.

Sheng, X., Sun, Z., Wang, X., Tan, Y., Yu, D., Yuan, G., . . . Duan, M. (2020) Improvement of the Rice "Easy-to-Shatter" Trait via CRISPR/Cas9-Mediated Mutagenesis of the qSH1 Gene. Front Plant Sci 11, 619.

Soyk, S., Lemmon, Z.H., Oved, M., Fisher, J., Liberatore, K.L., Park, S.J., . . . Lippman, Z.B. (2017) Bypassing Negative Epistasis on Yield in Tomato Imposed by a Domestication Gene. Cell 169, 1142-1155 e1112.

Soyk, S., Lemmon, Z.H., Sedlazeck, F.J., Jimenez-Gomez, J.M., Alonge, M., Hutton, S.F., . . . Lippman, Z.B. (2019) Duplication of a domestication locus neutralized a cryptic variant that caused a breeding barrier in tomato. Nat Plants 5, 471-479.

Studer, A.J., Wang, H., and Doebley, J.F. (2017) Selection During Maize Domestication Targeted a Gene Network Controlling Plant and Inflorescence Architecture. Genetics 207, 755-765.

Tan, Q., Liu, X., Gao, H., Xiao, W., Chen, X., Fu, X., . . . Gao, D. (2019) Comparison Between Flat and Round Peaches, Genomic Evidences of Heterozygosity Events. Front Plant Sci 10, 592.

Tavakol, E., Okagaki, R., Verderio, G., Shariati, J.V., Hussien, A., Bilgic, H., . . . Rossini, L. (2015) The barley Uniculme4 gene encodes a BLADE-ON-PETIOLE-like protein that controls tillering and leaf patterning. Plant Physiol 168, 164-174.

Terzi, V., Tumino, G., Pagani, D., Rizza, F., Ghizzoni, R., Morcia, C., and Stanca, A. (2017) Barley Developmental Mutants: The High Road to Understand the Cereal Spike Morphology. Diversity 9, 21.

Tian, J., Wang, C., Xia, J., Wu, L., Xu, G., Wu, W., . . . Tian, F. (2019) Teosinte ligule allele narrows plant architecture and enhances high-density maize yields. Science 365, 658-664.

Vasal, S.K. (2016) The Quality Protein Maize Story. Food and Nutrition Bulletin 21, 445-450.

Wang, H., Seiler, C., Sreenivasulu, N., von Wiren, N., and Kuhlmann, M. (2022a) INTERMEDIUM-C mediates the shade-induced bud growth arrest in barley. J Exp Bot 73, 1963-1977.

Wang, W., Niu, S., Dai, Y., Wang, M., Li, Y., Yang, W., and Zhao, D. (2019) The Zea mays mutants opaque2 and opaque16 disclose lysine change in waxy maize as revealed by RNA-Seq. Sci Rep 9, 12265.

Wang, Y., Du, F., Wang, J., Wang, K., Tian, C., Qi, X., . . . Jiao, Y. (2022b) Improving bread wheat yield through modulating an unselected AP2/ERF gene. Nat Plants 8, 930-939.

Whipple, C.J., Kebrom, T.H., Weber, A.L., Yang, F., Hall, D., Meeley, R., . . . Jackson, D.P. (2011) grassy tillers1 promotes apical dominance in maize and responds to shade signals in the grasses. Proc Natl Acad Sci U S A 108, E506-512.

Zhang, J., Xiong, H., Guo, H., Li, Y., Xie, X., Xie, Y., . . . Liu, L. (2021) Identification of the Q Gene Playing a Role in Spike Morphology Variation in Wheat Mutants and Its Regulatory Network. Front Plant Sci 12, 807731.

Zheng, Y., Zhang, N., Martin, G.B., and Fei, Z. (2019) Plant Genome Editing Database (PGED): A Call for Submission of Information about Genome-Edited Plant Mutants. Mol Plant 12, 127-129.

Zhou, J., Xin, X., He, Y., Chen, H., Li, Q., Tang, X., . . . Zhang, Y. (2019) Multiplex QTL editing of grain-related genes improves yield in elite rice varieties. Plant Cell Rep 38, 475-485.

Zhu, Q.H., Jin, S., Yuan, Y., Liu, Q., Zhang, X., and Wilson, I. (2022) CRISPR/Cas9-mediated saturated mutagenesis of the cotton MIR482 family for dissecting the functionality of individual members in disease response. Plant Direct 6, e410.

MUTANTI ARTIFICIALMENTE INDOTTI E SPONTANEI IN POMODORO: L'INSEGNAMENTO DI ANGELO BIANCHI

Gian Piero Soressi[1]
Università degli Studi della Tuscia

Riassunto

L'autore ripercorre la propria carriera e attività di ricerca e sperimentazione, prevalentemente dedicata all'induzione, ricerca e valorizzazione dei mutanti di pomodoro, con l'obiettivo di ottenere marcatori fenotipici per la selezione dei semi ibridi, di sviluppare cultivar apirene, di ottenere frutti di diversa colorazione e tipologia di maturazione, nonché con fattori di resistenza alle malattie anche con il ricorso alla transgenesi. Viene inoltra riportata una descrizione aggiornata dei mutanti e dei relativi geni che influenzano il colore della bacca in pomodoro.

Abstract

Artificially induced and spontaneous mutants in tomato: the teaching of Angelo Bianchi

The author traces his career, research and experimentation activities, mainly dedicated to the induction, research and valorisation of tomato mutants, with the aim of obtaining phenotypic markers for the selection of hybrid seeds, of developing seedless cultivars, of obtaining fruits of different coloring and type of ripening, as well as with factors of resistance to diseases also with the use of transgenesis. An updated description of the mutants and related genes that influence tomato berry color is also reported.

PREMESSA

La prima immagine che mi viene alla mente del prof. Angelo Bianchi risale all'ultimo anno di Liceo. Una persona in camice bianco affiancata da due assistenti donne anch'esse con il loro camice bianco ed un tecnico in camice grigio. Li vidi transitare sulla strada di campagna che passando a 30 metri da casa mia andava ai campi dell'azienda Buzzetti.

[1] Professore ordinario di Miglioramento genetico delle piante coltivate in pensione

Seppi in seguito trattarsi del prof. Angelo Bianchi (Fig. 1) che, insieme alle dott.ssa Marisa Pozzi (futura moglie del nostro compianto prof. Carlo Lorenzoni), alla dott.ssa Morando e al tecnico Giuseppe Ferrari, si recava a vedere le parcelle di mais sperimentale nell'ambito di un programma finanziato dalla Rockfeller Foundation. Il campo era di proprietà del dott. Guido Buzzetti. L'anno stesso mi iscrissi alla Facoltà di Agraria di Piacenza dell'Università Cattolica del Sacro Cuore.

Figura 1 – Alcuni componenti del gruppo del prof. Angelo Bianchi (AB).

Superato l'esame di Genetica vegetale, corso tenuto dal Prof. Bianchi, gli chiesi di accogliermi in tesi. Altri tre studenti del mio anno di corso avevano chiesto allo stesso la loro tesi: Francesco Salamini, Achille Ghidoni e il pugliese Emiliano. Loro ebbero argomenti sul mais, io sul pomodoro, oggetto di miglioramento genetico del suo assistente incaricato, il prof. Giuseppe Marchesi. Il titolo della mia tesi era: Effetti genetici dei raggi X su alcune cultivar di pomodoro.

Il giorno successivo alla discussione della tesi di laurea, il 11 luglio 1964, dovetti partire per il servizio militare come allievo della scuola degli allievi ufficiali di complemento a Lecce, dove rimasi per cinque mesi fino a dicembre dello stesso anno. Da qui fui trasferito come sergente nella Caserma di Novi Ligure quindi, terminai il servizio militare come Sottotenente di complemento nella Caserma Ufficiali di Monza. Congedato dopo 15 mesi di servizio militare, ho accettato la borsa di studio dell'Associazione dei Laureati in Scienze Agrarie di Bologna, da usufruire presso l'Istituto di Allevamento Vegetale di Bologna, di cui il prof. Angelo Bianchi era divenuto nel frattempo Direttore. Lì ho avuto l'opportunità di conoscere il dott. Lollini, un anziano sperimentatore che oltre al miglioramento genetico del frumento tenero si interessava di selezione di pomodoro nell'ambito delle vecchie varietà della Regione Emilia.

Sotto la guida del prof. Bianchi ho potuto continuare l'attività di miglioramento genetico del pomodoro, concentrando l'attenzione sui mutanti da me ottenuti.

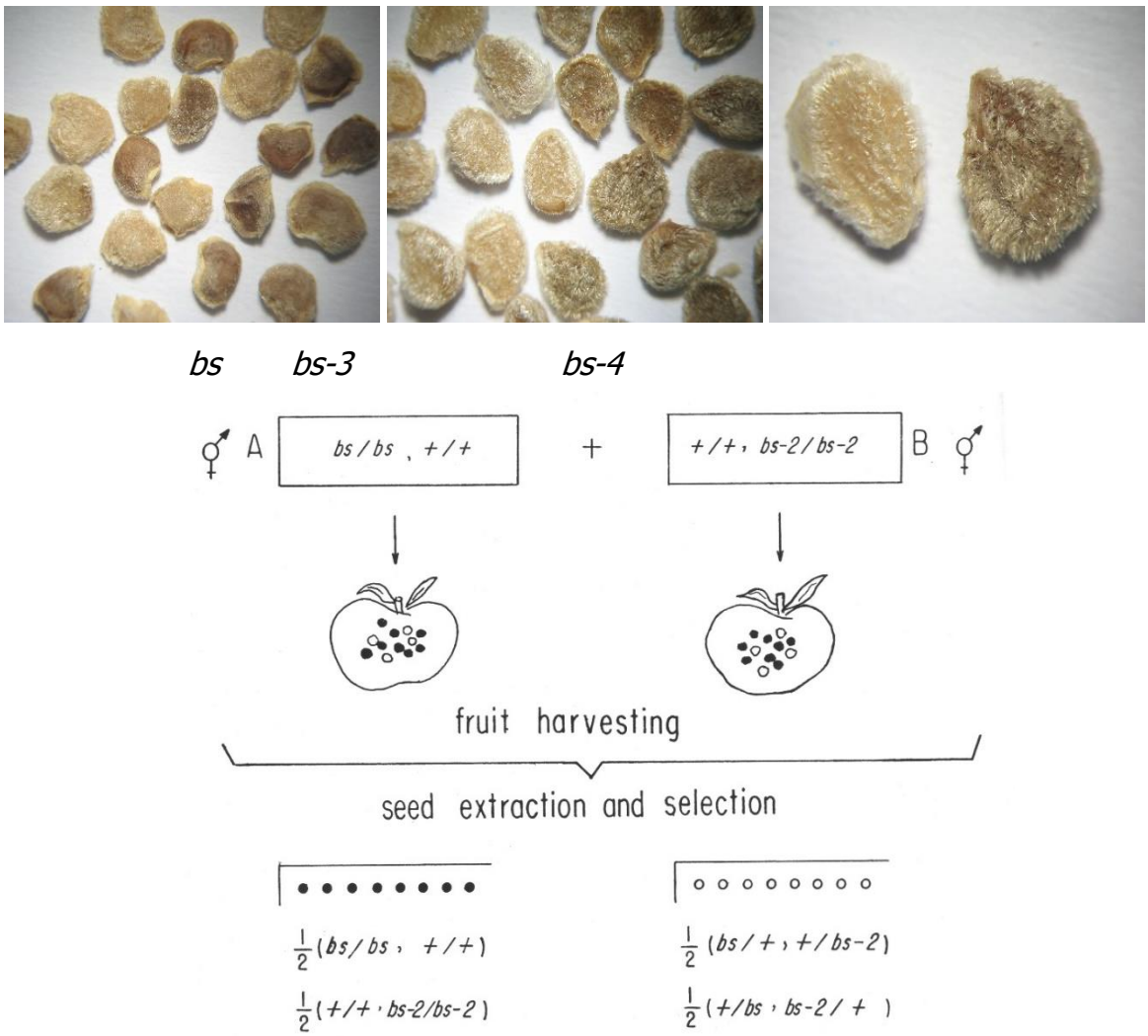


Figura 2 – Semi di mutanti genetici della serie non allelica brown seed (bs, bs-3, bs-4) caratterizzati dalla pigmentazione scura dell'endosperma (in alto). Tale mutazione costituisce un marcatore fenotipico utile per la distinzione o la selezione di semi provenienti da un processo di incrocio tra due linee parentali (ognuna con una mutazione bs non allelica allo stato omozigote) rispetto a quelli derivante da autofecondazione del fiore, secondo lo schema riportato in basso. Il seme ibrido risulterà con fenotipo WT per la colorazione dell'endosperma, mentre in caso di autofecondazione il seme sarà pigmentato.

IL COLORE DEL SEME

Uno dei primi eventi significativi avvenuti nei primi anni di sperimentatore con Bianchi è stato il ritrovamento, tra i mutanti indotti a seguito del trattamento con etilmetansulfonato (EMS) ai semi della cultivar Sioux, del mutante recessivo per il colore del seme brown seed (bs; Soressi, 1967a) a eredità endospermica quindi utile per l'identificazione di semi chiari (colore paglierino) ibridi da impollinazione naturale incrociata in bacche di piante portaseme nate da seme bruno (bs). Questo ritrovamento mi permise di elaborare alcuni schemi teorici per la produzione di seme ibrido F1 di pomodoro sfruttando l'impollinazione naturale incrociata (NCP; fig. 2) o manuale. In relazione a questa possibilità è stata svolta una prova agronomica in collaborazione con l'entomologo dottor F. Bin, allora assistente alla cattedra di Entomologia della Facoltà di Agraria di Piacenza. L'esperimento era consistito nell'allevamento di piante alterne bs (portaseme) e normali (a seme chiaro) impollinanti nelle colline piacentine dove gli insetti impollinatori erano più numerosi. A cura del dott. Bin vennero raccolti esemplari di

impollinatori bottinatori cioè raccoglitori di polline. Di fatto, le api che raccolgono nettare sono inefficaci perché i fiori del pomodoro sono privi di nettari. Gli impollinatori più attivi ed efficaci risultarono alcune specie di imenotteri dei generi *Bombus* e *Halictus*, a seguito del loro riconoscimento tassonomico effettuato presso un Istituto specializzato estero (Bin e Soressi, 1973).

Ipotizzando il ritrovamento di un mutante a seme bruno non allelico a bs venne proposto uno schema di incrocio con due linee bs non alleliche (bs, portaseme e bs-2, impollinante) così che i semi scuri delle bacche erano frutto di autofecondazione mentre i semi chiari nelle bacche delle due linee erano sicuramente ibridi F1. Il problema era la separazione dei semi chiari ibridi da quelli scuri. A quel tempo esistevano già macchine per la selezione ottico meccanica in base alla differenza di colore (ad esempio dei semi di cipolla e del colore delle bacche immature e mature del pomodoro). La ditta specializzata in questo settore era la Sortex inglese. Parlandone con il prof. Bianchi, egli decise di mandarmi in missione presso questa ditta per tentare di separare i semi chiari e scuri di pomodoro. Partii quindi con due sacchetti di seme, uno con semi normali chiari ed uno con semi scuri, tutti opportunamente depilati sia per facilitare la rilevazione del colore che lo scorrimento meccanico lungo la canaletta conduttrice alla selezionatrice. I numerosi tentativi con il tecnico della Sortex non furono soddisfacenti essendo impossibile far scendere i semi depilati uno ad uno chiaro o bruno che fosse. Non restava che la scelta manuale dei semi chiari (ibridi) tra quelli scuri, autofecondati, troppo laborioso e costosa anche se possibile. Quindi, questa prospettiva venne abbandonata anche se nel frattempo erano stati realizzati buoni ibridi manuali tra linee bs e linee impollinanti a seme normale.

PARTENOCARPIA E COLORE

Nel periodo che va dal 1966 al 1967, quando il prof. Lorenzoni si trasferì all'Istituto per l'Ortoflorofrutticoltura di Minoprio e dovette lasciare il posto di assistente presso il prof. Bianchi all'Istituto di Genetica Vegetale di Piacenza, io subentrai a lui. In questo periodo seguii alcuni laureandi in tesi con il prof. Bianchi sul pomodoro, come il dott. Cravedi con la tesi sui mutanti artificiali indotti in cultivar di pomodoro a seguito di trattamento mutagenico con EMS. Il trattamento con questo agente mutageno ha permesso di ottenere inoltre il primo caso di partenocarpia genetica descritta in pomodoro, con il mutante *parthenocarpic fruit* (*pat*; fig. 2).

Altro momento significativo delle attività di ricerca con il prof. Bianchi fu la conoscenza diretta del prof. Leonard Butler, coautore con il dott. Charles M. Rick del testo classico sulla genetica del pomodoro, "Cytogenetics of the Tomato" (1956), e dei suoi materiali genetici in occasione del suo anno sabbatico condotto presso l'Istituto di Allevamento Vegetale di Bologna. In questa occasione ho avuto modo di valutare e apprezzare le varianti alleliche che coinvolgono i pigmenti della bacca ("geni del colore") del pomodoro che lui aveva portato con sé, riproducendoli nei terreni dell'Università Cattolica di Piacenza. Fu così che ebbi in dono una piccola quota di semi di questi mutanti. Altra tappa importante per la mia attività è stata la missione stimolata da Bianchi per la ricerca sia di vecchie varietà che di mutanti spontanei nelle coltivazioni di pomodoro dal centro al sud d'Italia. In questo periodo, sono state raccolte sia antiche varietà locali che mutanti quali maschiosterili, poliploidi, mutanti nani e della maturazione della bacca di particolare interesse, come quelli del ritardo della maturazione (non ripening2, nor2), del colore del frutto (yellow flesh, r) e della buccia (colorless fruit skin, y e nor3) e i tipi "Cuor di bue", a polpa rossa con la buccia incolore. I primi ibridi sperimentali sulla serbevolezza della bacca realizzati con il mutante nor2 risalgono a questo periodo. A questi seguiranno gli ibridi commerciali sviluppati dagli Israeliani, che avevano in precedenza ricevuto da noi un campione di questo mutante.

Figura 2 – Sezione di bacca di pomodoro della varietà Chico III (a sinistra) e della rispettiva linea quasi isogenica per il gene parthenocarpic fruit. Si tratta del primo caso di partenocarpia descritta in pomodoro, ottenuta con trattamento mutagenico EMS (Bianchi e Soressi, 1969).

Quando Bianchi venne spostato come Direttore del nuovo Istituto sperimentale per l'Orticoltura di Salerno a seguito della Riforma ministeriale degli Istituti del M.A.F. (1967), io fui inviato presso la Sezione di Montanaso Lombardo del medesimo Istituto. Qui, ebbi l'opportunità di seguire la selezione delle progenie segreganti e dei mutanti indotti artificialmente, sia a livello di plantula in serra che di pianta in campo. Presso questa Sezione prese servizio alche il prof. Francesco Salamini, rientrato dagli Stati Uniti a seguito del suo periodo di specializzazione sul mais presso la Cornell University, invece di proseguire per Salerno, dove avrebbe dovuto recarsi. Iniziò, in questo periodo un'intensa attività di miglioramento genetico in collaborazione reciproca sulla coltura del fagiolo, scelta da Salamini per indurre la resistenza genetica al Bean Common Mosaic Virus (BCMV) in alcune varietà locali e sul pomodoro. Nominato sperimentatore, io venni assegnato a questa Sezione nel 1969. In questa sede, d'accordo con il prof. Salamini, proseguii anche l'attività di Direttore di Sezione facente funzione, riorganizzando l'Istituto. L'attività sul pomodoro proseguì con la realizzazione di incroci per introdurre tutti i geni del colore (Tabb. 1 e 2) in cinque varietà coltivate sia da tavola che da industria (Marmande, Gimar, San Marzano, Roma e New Yorker). Una volta terminata l'attività di introgressione (BC5) di questi geni, l'intento era quello di poter combinare questi geni a due a due o a tre a tre nello stesso background genetico per avere l'espressione di colore e di caratteristiche nutraceutiche della bacca innovative e idonee sia per la trasformazione industriale che per il consumo fresco. Per la realizzazione di questi incroci, mi sono avvalso della collaborazione del neo-sperimentatore dott. Agostino Falavigna, nel frattempo nominato presso la Sezione di Montanaso.

SPONGY SEED

In questo periodo, ebbi l'incarico dell'insegnamento di Miglioramento genetico presso la Facoltà di Agraria della Cattolica di Piacenza, fino ad allora tenuto dal prof. Lorenzoni. Tale situazione mi diede l'opportunità di seguire le tesi di studenti laureandi, tra cui menziono in particolare il dott. Andrea Allavena, a cui venne affidato il compito di poliploidizzare la linea partenocarpica pat-2 e il dott. Pasquale Martiniello, che studiò i geni della serbevolezza della bacca e del marcatore del seme bs (Fig. 3). In questo periodo fu isolato anche il mutante spongy seed (ss, Soressi, 1967b), caratterizzato da una struttura alveolare della superficie del tegumento del seme pertanto sprovvista di "peli",

un carattere a eredità materna. Questo fenotipo si accompagna ad un effetto pleiotropico che si riscontra sulla pianta poiché tutti gli organi assili (fusto, ramificazione, piccioli fogliari e peduncoli fiorali) presentano uno sviluppo con andamento elicoidale e non lineare.

Tabella 1 - Mutanti che influenzano il colore della bacca in pomodoro.

Classe di mutanti	**Nome**	**Simbolo**	**Rif. Bibliografico**
Stay green	*green flesh*	*gf*	Kerr 1957
Chlorophyll reducer	*lutescent*	*l-1, l-2*	Rick e Butler 1956
Chlorophyll enhancer	*high pigment 1*	*hp-1*	Clayberg *et al*. 1960
	high pigment 2	*hp-2*	Soressi 1975
Colour genes	*yellow flesh*	*r*	Rick e Butler 1956
	Beta	*B*	Rick e Butler 1956
	old gold crimson	B^c (og^c)	Thompson *et al*. 1965
High anthocyanin	*atroviolacium*	*atv*	Clayberg 1972
	Anthocyanin fruit	*Aft* (*Af*)	Georgiev 1972
Non ripening	*non-ripening*	*nor*, nor^2	Tigchelaar *et al*. 1973, Soressi 1975
	ripening inhibitor	*rin*	Robinson *et al*. 1968
	Never ripe	*Nr, Nr-2*	Rick e Butler 1956, Kerr 1982

VARIABILITÀ SOMACLONALE E TRANSGENESI

Dopo tre anni di attività come professore associato presso la Cattolica, dal 1983 al 1986, collaborando in particolare con il prof. Lorenzoni, ottenni la cattedra di Miglioramento genetico per la resistenza alle avversità biotiche e abiotiche nelle piante coltivate presso l'Università degli Studi della Tuscia di Viterbo, sotto la guida del prof. Gian Tommaso Scarascia Mugnozza, fondatore e Rettore della medesima Università. Qui ripresi con particolare interesse l'attività di miglioramento genetico del pomodoro. In quest'ambito, sono stati realizzati studi sulla variabilità somaclonale indotta dalla rigenerazione in vitro, esperimenti di trasformazione genetica con geni eterologhi di resistenza (geni GOX, Kunitz, AtCys) e programmi di incrocio svolti con risultati positivi per ottenere piante di pomodoro triploidi a bacca partenocarpica completamente sterili, sia a livello di seme che di polline, ideali per ottenere piante transgeniche senza i temuti problemi di riproduzione per questo tipo di materiale genetico. La mia attività a Viterbo si è avvalsa della valente collaborazione del prof. Andrea Mazzucato, associato e dei ricercatori dott. Enrico Santangelo, Mariagrazia Antonelli e Maurizio Picarella (il primo studente a fare l'esame ad un mio corso alla Tuscia). Con la loro collaborazione è stato realizzato il pomodoro "SunBlack®" (Fig. 5) a bacca con buccia nero-violacea e polpa rossa (Fig. 6) e la linea "Kiwi tomato" a polpa verde a maturità della bacca.

RINGRAZIAMENTO

Come ricercatore devo la mia gratitudine più profonda al prof. Bianchi, senza dimenticare i contributi di collaborazione e di amicizia con i proff. Francesco Salamini, Carlo Lorenzoni, Tommaso Maggiore e il dott. Basilio Borghi.

Figura 3 – Un altro marcatore fenotipico che interessa il seme è rappresentato dall'impiego della mutazione spongy seed (ss), a eredità materna e caratterizzato dalla modificazione della struttura dei "peli" che ricoprono il tegumento del seme. Un effetto pleiotropico di questa mutazione è dato dalla presenza di fusto, ramificazioni secondarie, piccioli fogliari e peduncoli fiorali con sviluppo elicoidale anziché lineare. Questo fenotipo presenta una sorprendente similitudine con quello di una varietà di nocciolo, caratterizzato dallo stesso andamento tortuoso delle ramificazioni della pianta. È ipotizzabile che anche in questa specie vi sia all'origine una lesione a carico dello stesso locus ss.

Tabella 2a – Descrizione dei mutanti e dei relativi geni che influenzano il colore della bacca in pomodoro.

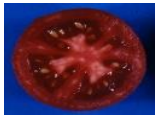
Nome mutante	Colore della bacca	Gene	Processo metabolico	Cromosoma	Foto
green flesh (gf)	Rosso-bruno, ma verde quando in combinazione con *yellow flesh*	*SGR1 (*Barry *et al. 2009)*	Rallentata e parziale degradazione della clorofilla durante il processo di maturazione della bacca	8	
lutescent (l-1, l-2)	Bianco giallo all'invaiatura, rosso chiaro a maturazione	SlRCM1 (Liu et al. 2021), Metalloproteasi (Barry *et al.* 2012)	Anticipata e progressiva degradazione della clorofilla in tutte le parti della pianta	8, 10	
high pigment 1 (hp-1)	Verde intenso quando immatura, rosso intenso a maturazione completa	*DDB1* (*UV damaged binding protein*) (Liu *et al.* 2004*)*	Regolazione del ciclo cellulare e riparazione del DNA	2	
high pigment 2 (hp-2)	Verde intenso quando immatura, rosso intenso a maturazione completa	*DET1* (omologo di *deetiolated 1* di Arabidopsis) *(*Mustilli *et al.* 1999*)*	Controllo luce-dipendente dell'espressione di geni preposti al rimodellamento della cromatina	1	
yellow flesh (r)	Giallo, ma molto pallido se in combinazione con *colorless fruit skin* (y)	*PSY 1 (Fitoene sintasi 1) (Frey e Grierson 1993)*	Arresto della sintesi dei carotenoidi a livello del precursore del fitoene	3	
Beta (B)	Arancio	*Crtl-b* (*Licopene b-ciclasi* localizzata nel cromoplasto) *(*Ronen *et al.* 2000*)*	Incremento della conversione del licopene in b-carotene	6	
Old gold crimson (B^c)	Rosso cremisi intenso	*Crtl-b* (*Licopene b-ciclasi* localizzata nel cromoplasto, allele nullo di *B*) *(*Ronen *et al.* 2000*)*	Ridotta conversione del licopene in b-carotene	6	

Tabella 2b – Descrizione dei mutanti e dei relativi geni che influenzano il colore della bacca in pomodoro.

non-ripening (nor, nor2)	Arancio chiaro a maturità	Fattore di trascrizione non identificato (Giovannoni *et al.* 1995)	Rallentata sintesi dei pigmenti carotenoidi della bacca	10	
ripening inhibitor (rin)	Verde-giallino a maturità avanzata	Fattore di trascrizione *MADS-rin* (Vrebalov *et al.* 2002)	Blocco del picco climaterico della maturazione (parziale nell'eterozigote)	5	
Never ripe (Nr)	Rosso arancio a maturità avanzata	Recettore dell'etilene (Wilkinson *et al.* 1995)	Blocco della percezione dell'etilene con effetti sul picco climaterico	9	
Never ripe 2 (Nr-2)	Rosso arancio a maturità avanzata	Proteina a funzione sconosciuta (Barry *et al.* 2005)	Ridotta risposta all'etilene durante la maturazione	1	
Anthocyanin fruit (Aft)	Variabile pigmentazione antocianica dell'epicarpo in relazione all'ambiente (luce e temperatura)	Fattore di trascrizione MYB (Schreiber *et al.* 2012)	Regolazione positiva della sintesi degli antociani evidente nella bacca	10	
atroviolacium (atv)	Intensa pigmentazione antocianica nelle parti vegetative della pianta, ad eccezione della bacca	Fattore di trascrizione MYB (Cao *et al.* 2017)	Regolazione positiva della sintesi degli antociani con esclusione della bacca	7	

Figura 5 – Schema di incrocio per l'ottenimento della linea SunBlack®, caratterizzata dalla pigmentazione nero-violacea della buccia del frutto: Solanum chilense (Aft) x Solanum cheesmaniae (atv). Aft e atv mostrano un forte effetto sinergico sulla pigmentazione antocianica della bacca.

Figura 6 - Particolare di pianta della linea SunBlak® con bacche (a sinistra) e bacche a due stadi di maturazione e sezioni di bacche mature (a destra).

BIBLIOGRAFIA

Barry CS, McQuinn RP, Thompson AJ, Seymour GB, Grierson D, Giovannoni JJ (2005) Ethylene insensitivity conferred by the Green-ripe and Never-ripe 2 ripening mutants of tomato. Plant Physiol 138(1):267-75. doi: 10.1104/pp.104.057745. Epub 2005 Apr 15. PMID: 15834010; PMCID: PMC1104181.

Barry CS, McQuinn RP, Chung MY, Besuden A, Giovannoni JJ (2008) Amino acid substitutions in homologs of the STAYGREEN protein are responsible for the greenflesh and chlorophyll retainer mutations of tomato and pepper. Plant Physiol 147(1):179187.

Barry CS, Aldridge GM, Herzog G, Ma Q, McQuinn RP, Hirschberg J, Giovannoni JJ (2012) Altered chloroplast development and delayed fruit ripening caused by mutations in a zinc metalloprotease at the lutescent2 locus of tomato. Plant Physiol 159(3):108698. doi: 10.1104/pp.112.197483. Epub 2012 May 22. PMID: 22623517; PMCID: PMC3387696.

Bianchi A, Soressi GP (1969) Mutanti di pomodoro artificialmente indotti suscettibili di utilizzazione nel miglioramento genetico. Sementi Elette XV (3): 26.

Bin F. e Soressi GP (1973) Insetti pronubi e produzione di seme ibrido di pomodoro. Genetica Agraria 27: 3574.

Cao X, Qiu Z, Wang X, Van Giang T, Liu X, Wang J, Wang X, Gao J, Guo Y, Du Y, Wang G, Huang Z (2017) A putative R3 MYB repressor is the candidate gene underlying atroviolacium, a locus for anthocyanin pigmentation in tomato fruit. J Exp Bot 68(2122):57455758. doi: 10.1093/jxb/erx382. PMID: 29186488; PMCID: PMC5854135.

Clayberg CD, Butler L, Rick CM, Young PA (1960) Second list of known genes in the tomato. Journal of Heredity 5:167174.

Clayberg CD (1972) Preliminary mapping of three chromosome 7 genes. Rep. Tomato Genet Coop 22:4.

Fray RG e Grierson D (1993) Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and cosuppression. Plant Mol Biol 22:589–602. https://doi.org/10.1007/BF00047400.

Georgiev C (1972) Anthocyanin fruit (Af). Rep Tomato Genet Coop 22:10.

Giovannoni JJ, Noensie EN, Ruezinsky DM, Lu X, Tracy SL, Ganal MW, Martin GB, Pillen K, Alpert K, Tanksley SD (1995) Molecular genetic analysis of the ripeninginhibitor and nonripening loci of tomato: a first step in genetic mapbased cloning of fruit ripening genes. Mol Gen Genet 248(2):195206. doi: 10.1007/BF02190801. PMID: 7651343.

Kerr EA (1957) Linkage relations of gf. Tomato Genetics. Expression of Cooperative Reports 8:21.

Kerr EA (1982) Never ripe2 (Nr2) a slow ripening mutant resembling Nr and Gr. Rep Tomato Genet Coop 32:33.

Liu Y, Roof S, Ye Z, Barry C, van Tuinen A, Vrebalov J, Bowler C, Giovannoni J (2004) Manipulation of light signal transduction as a means of modifying fruit nutritional quality in tomato. Proc Natl Acad Sci USA 101:9897–9902.

Liu G, Yu H, Yuan L et al. (2021) SlRCM1, which encodes tomato Lutescent1, is required for chlorophyll synthesis and chloroplast development in fruits. Hortic Res 8:128. https://doi.org/10.1038/s41438021005636.

Mustilli AC, Fenzi F, Ciliento R, Alfano F, Bowler C (1999) Phenotype of the tomato high pigment2 mutant is caused by a mutation in the tomato omolog of DEETIOLATED1. Plant Cell 11:145–157.

Rick CM e BUTLER L (1956) Cytogenetics of the tomato. Advan Genet 8:267382.

Robinson RW e Tomes ML (1968) Ripening inhibitor: A gene with multiple effect on ripening. Tomato Genetic Coop 18:3637.

Ronen G, CarmelGoren L, Zamir D, Hirschberg J (2000) An alternative pathway to β carotene formation in plant chromoplasts discovered by mapbased cloning of Beta and oldgold color mutations in tomato. Proc Nat Acad Sci 97(20):1110211107.

Soressi GP (1967a) Brown seed (bs) a tomato seed character which behaves as an endosperm trait. Tomato Genet Coop Rep 17:50.

Soressi GP (1967b) Spongy seed (ss), a new plant character which modifies the seed hair appearance. Tomato Genet Coop Rep 17:4950.

Soressi GP (1975) New spontaneous or chemicallyinduced fruit ripening tomato mutants. Rep Tomato Genet Coop 25:21–22.

Schreiber G, Reuveni M, Evenor D, OrenShamir M, Ovadia R, SapirMir M, BootboolMan A, Nahon S, Shlomo H, Chen L, Levin I (2012) ANTHOCYANIN1 from Solanum chilense is more efficient in accumulating anthocyanin metabolites than its Solanum lycopersicum counterpart in association with the ANTHOCYANIN FRUIT phenotype of tomato. Theor Appl Genet 124(2):295307. doi: 10.1007/s0012201117056. Epub 2011 Sep 23. PMID: 21947299.

Thompson AE, Tomes ML, Wann EV, McCollum JP, Stoner AK (1965) Proc. Am. Soc. Hortic. Sci, 86:610 – 61.

Tigchelaar E, Tomes M, Kerr E, Barman R (1973) A new fruitripening mutant, nonripening (nor). Rep Tomato Genet Coop 23:33.

Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V, White R, Medrano D, Drake R, Schuch W, Giovannoni J (2002) A MADSbox gene necessary for fruit ripening at the tomato ripeninginhibitor (rin) locus. Science 296(5566):3436. doi: 10.1126/science.1068181. PMID: 11951045.

Wilkinson JQ, Lanahan MB, Yen HC, Giovannoni JJ, Klee HJ (1995) An ethyleneinducible component of signal transduction encoded by neverripe. Science 270(5243):18079. doi: 10.1126/science.270.5243.1807. PMID: 8525371

I MUTANTI DELLO SVILUPPO NELL'ORZO

Laura Rossini[1]
Università degli Studi di Milano

Riassunto

L'orzo è una delle prime piante domesticate dall'uomo e un importante sistema modello per studi di genetica dei cereali. Nell'ambito della ricca diversità genetica di questa specie, i mutanti dello sviluppo hanno ricevuto particolare attenzione, permettendo di chiarire alcuni aspetti fondamentali dei processi di domesticazione e della morfogenesi degli organi vegetativi e riproduttivi.

Summary

Barley development: mutants

Barley is one of the first plants domesticated by humans and an important model system for genetic studies in cereals. Within the rich genetic diversity of this species, developmental mutants have received particular attention, allowing to clarify some fundamental aspects of domestication processes as well morphogenesis of vegetative and reproductive organs.

PREMESSA

Insieme a frumento, riso e mais, l'orzo è uno dei principali cereali in termini di produzione e l'Unione Europea nel suo complesso contribuisce con oltre il 40% del raccolto globale. Una peculiarità di questa coltura sono le sue molteplici destinazioni d'uso (Meints et al., 2016): circa il 75% è utilizzato per l'alimentazione zootecnica, mentre una quota importante (circa il 20%) è destinata alla maltazione specialmente per la produzione di birra - una delle bevande alcoliche più antiche, già apprezzata dagli antichi Egizi. Oggi solo una piccola proporzione della granella è utilizzata per l'alimentazione umana, sebbene in passato l'orzo sia stato importante da questo punto di vista. Testimonianze del consumo di orzo nella Roma antica si riscontrano in riferimenti ai gladiatori come *hordearii* (Meints et al., 2016). Negli ultimi anni la paglia ha cominciato ad attrarre una certa attenzione come *feedstock* per la produzione di biocarburanti e di materiali a base di fibre vegetali.

[1] Professoressa ordinaria di Genetica Agraria

L’orzo è una delle colture fondatrici dell’agricoltura neolitica (Ullrich, 2011): in seguito alla domesticazione, dalla Mezzaluna Fertile si è diffuso a Est nel continente asiatico e a Ovest nel bacino del Mediterraneo per poi raggiungere il Nord Europa. Oggi è coltivato in tutti i continenti eccetto l’Antartide, dalle regioni boreali al nord Africa, dagli altopiani dell’Etiopia e del Tibet all’Australia (Langridge, 2018). A questa diffusione geografica è associata una ricchissima diversità genetica (Bustos-Korts et al., 2019), rappresentata in ampie collezioni di linee selvatiche, *landraces*, cultivar e mutanti, custodite nelle banche di germoplasma (Mascher et al., 2019). Alcune mutazioni spontanee hanno rivestito un ruolo fondamentale nella domesticazione dell’orzo: il rachide coriaceo, carattere recessivo rispetto al rachide fragile del progenitore selvatico (Pourkheirandish et al., 2015); la spiga esastica, una mutazione insorta dall’allele ancestrale che conferisce la spiga distica (Komatsuda et al., 2007); la cariosside nuda, fenotipo recessivo rispetto alla forma “vestita” (Taketa et al., 2008). Il repertorio di mutazioni dell’orzo si è in seguito arricchito con l’avvento dei metodi di mutagenesi indotta a partire dai pionieristici esperimenti di Lewis Stadler (Stadler, 1928). Uno dei più ambiziosi programmi di mutagenesi è stato sviluppato a Svalof su iniziativa di Åke Gustafsson e Herman Nilsson-Ehle, inizialmente mediante l’utilizzo di mutageni fisici e successivamente sperimentando anche con mutageni chimici (Lundqvist, 2014). Con l’importante contributo della genetista Udda Lundqvist, i mutanti sono stati classificati in categorie fenotipiche e assegnati a specifici loci mediante test di complementazione. Fra le migliaia di mutanti collezionati, particolare attenzione è stata dedicata ai caratteri fenologici e morfologici quali la maturità precoce, il portamento eretto, la taglia ridotta, l’architettura della spiga e delle brattee fiorali. Alcuni di questi mutanti trovano applicazione anche nel breeding (Lundqvist, 2014).

LA RESISTENZA ALL’ALLETTAMENTO

Con la Rivoluzione Verde diventa prioritaria la resistenza all’allettamento mediante l’introduzione di mutanti seminani in diversi cereali. Esempi importanti in orzo (Fig. 1) sono *sdw1*, una mutazione recessiva in un gene per la biosintesi delle gibberelline (Dockter and Hansson, 2015), e *uzu*, una mutazione del recettore dei brassinosteroidi diffusa soprattutto in Corea e in Giappone (Chono et al., 2003).

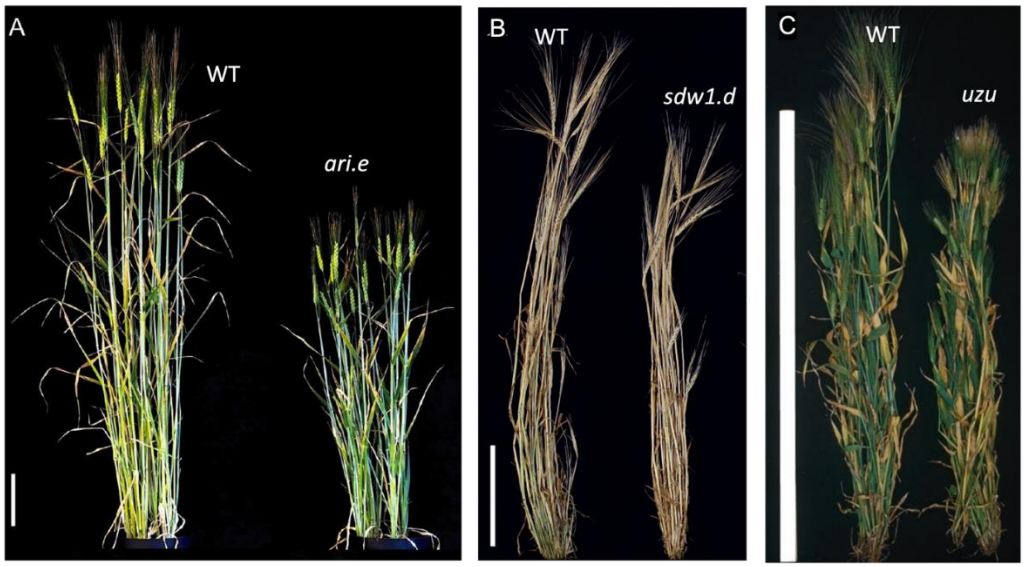


Figura 1 - Fenotipi di mutanti seminani utilizzati nel breeding dell’orzo [Fonti: A (Wendt et al., 2016), B (Dockter and Hansson, 2015), C (Chono et al., 2003)].

Un altro esempio è il mutante *ari.e* che conferisce la bassa statura a Golden Promise, una cultivar che ha avuto una notevole diffusione in Scozia ed è oggi comunemente per la trasformazione (Wendt et al., 2016).

LA GENETICA DELLO SVILUPPO

Con il suo genoma diploide (2n=14), l'orzo rappresenta anche un modello di studio ideale rispetto ad altre Triticeae più complesse dal punto di vista genetico, come i frumenti poliploidi. I mutanti diventano così il fondamento per i primi studi di genetica dello sviluppo: il gruppo diretto da Francesco Salamini presso l'istituto Max Planck di Colonia si concentra sulle conversioni omeotiche presenti nei mutanti per sviluppare un'interpretazione unitaria dell'architettura della pianta e della spiga in relazione al concetto di fitomero (Bossinger et al., 1992). Un esempio interessante è *leafy lemma*, un mutante identificato da Michele Stanca, in cui il complesso lemma-resta è convertito in una struttura di tipo fogliare, suggerendo l'omologia della lemma alla guaina fogliare e della resta alla lamina (Pozzi et al., 2000) (Fig. 2).

In parallelo la comunità scientifica dell'orzo comincia a sviluppare i primi strumenti molecolari per la costruzione di mappe genetiche per arrivare infine al sequenziamento del genoma (Mascher et al., 2017; Monat et al., 2019) allo studio del pangenoma (Jayakodi et al., 2020) e agli strumenti per sequenziare la regione codificante (Mascher et al., 2013).

Il primo mutante dello sviluppo clonato in orzo è *Hooded* (Fig. 2), in cui alla resta si sostituisce una spighetta ectopica a polarità invertita alla sommità della lemma (Müller et al., 1995).

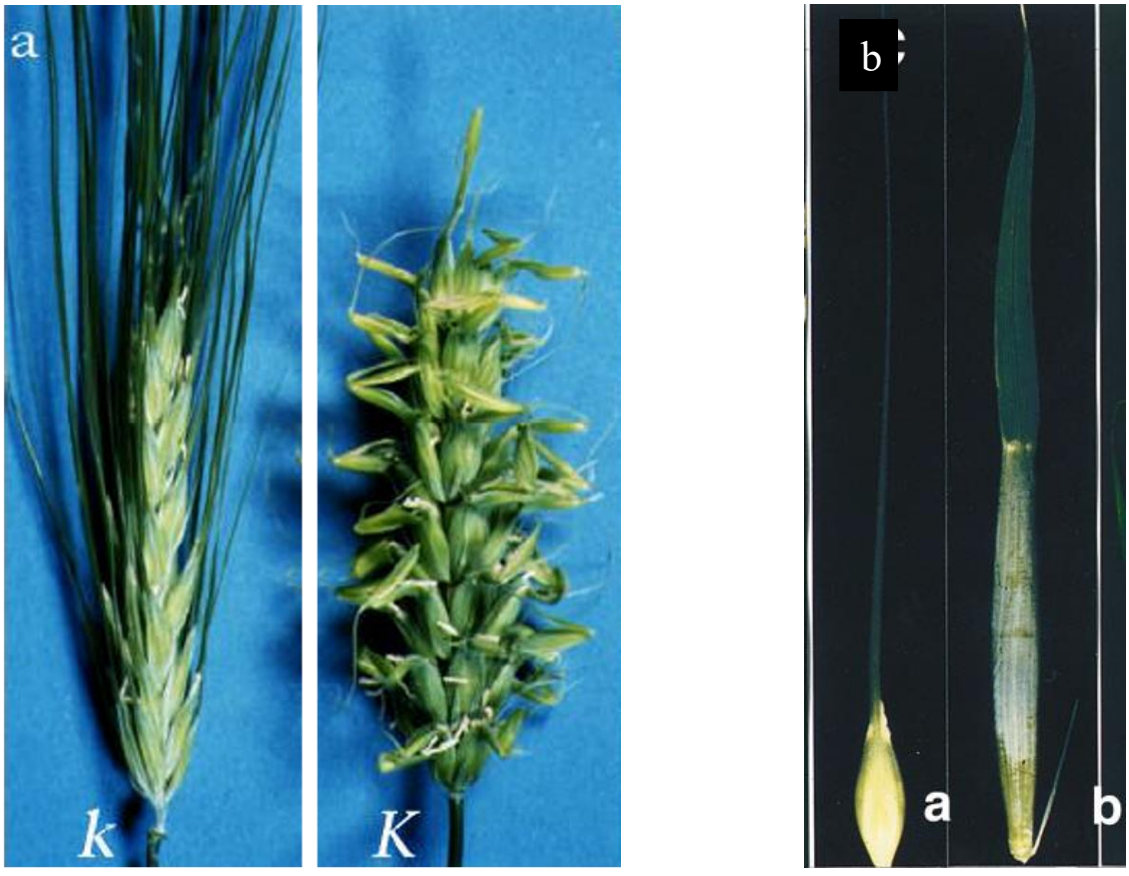


Figura 2 - a) Fenotipo della spiga wild-type (k) e del mutante Hooded (K). b) Fenotipo del complesso lemma-resta nel wild-type (a) e nel mutante leafy-lemma (b). Fonte: Pozzi et al., 2000

Questo particolare fenotipo deriva da una duplicazione in tandem all'interno di un introne del gene homebox *Bkn3*: ulteriori studi hanno permesso di identificare diversi fattori di trascrizione che legano questa sequenza intronica e regolano l'espressione del gene homeobox (Santi et al., 2003; Osnato et al., 2010; Kuijt et al., 2014).

Grazie alla disponibilità di efficienti strumenti di genotipizzazione, centinaia di altri mutanti sono stati mappati (Druka et al., 2011) e in alcuni casi clonati. Ad esempio *SIX-ROWED SPIKE1 (VRS1)* è risultato codificare per un altro fattore di trascrizione homeobox, espresso specificamente nelle spighette laterali di cui sopprime lo sviluppo (Komatsuda et al., 2007): mutanti in cui questo gene è difettivo sviluppano anche le spighette laterali con il risultato di ottenere una spiga esastica. Successivamente, altri geni coinvolti nella regolazione dello sviluppo delle spighette sono stati identificati fornendo una visione abbastanza precisa delle interazioni genetiche e molecolari che determinano il numero di ranghi nel seme (Ramsay et al., 2011; Koppolu et al., 2013; Bull et al., 2017) (de Souza Moraes et al., 2022). In riferimento all'architettura della spiga, lo studio di mutazioni in geni ortologhi che causano la ramificazione della spiga in orzo e frumento, oltre che in riso e mais, ha dimostrato l'esistenza di un comune meccanismo di soppressione della ramificazione della spiga in tutte queste Poacee (Poursarebani et al., 2015).

I mutanti dell'orzo hanno anche offerto la possibilità di studiare i meccanismi genetici e molecolari dell'accestimento (Babb and Muehlbauer, 2003; Dabbert et al., 2010; Okagaki et al., 2013; Hussien et al., 2014b; Shaaf et al., 2019) (Fig. 3). Un esempio è *Uniculme4* che producendo uno o due culmi si avvicina al modello di una pianta "uniculmo" come ideotipo per favorire l'uniformità della maturazione e la raccolta meccanizzata (Donald, 1968). Il gene corrispondente codifica per un fattore trascrizionale di tipo BLADE-ON-PETIOLE che controlla sia l'accestimento sia lo sviluppo prossimo-distale della foglia (Tavakol et al., 2015).

LE COLLEZIONI TILLING

Alle collezioni classiche di mutanti, negli ultimi anni si sono aggiunte diverse nuove collezioni TILLING ottenute per mutagenesi chimica (Talamè et al., 2008; Kurowska et al., 2011; Szurman-Zubrzycka et al., 2018). Queste popolazioni sono idonee a screening sia di genetica diretta alla ricerca di fenotipi mutanti desiderati, sia di genetica inversa per identificare mutazioni in una sequenza di interesse e valutarne gli effetti fenotipici. Un esempio del secondo approccio è stato l'uso della popolazione HorTILLUS per l'identificazione di un mutante nel recettore degli strigolattoni, una classe di ormoni vegetali che gioca un ruolo importante nell'architettura della pianta e nella risposta a diversi fattori ambientali (Marzec et al., 2016). La stessa popolazione è stata anche utilizzata per l'identificazione mediante genetica diretta di mutanti con portamento eretto (Mohammadi Aghdam et al., 2022), attualmente oggetto di studio nel nostro gruppo di ricerca.

Un'altra risorsa interessante è la collezione TILLMore sviluppata dall'Università di Bologna (Talamè et al., 2008): l'identificazione di numerosi mutanti dell'architettura e dello sviluppo delle radici offre un punto di partenza per l'indagine dei meccanismi molecolari che presiedono alla morfogenesi della porzione ipogea della pianta, come esemplificato dalle recenti pubblicazioni riguardanti i geni responsabili di due mutanti caratterizzati da alterazioni della risposta gravitropica (Kirschner et al., 2021; Fusi et al., 2022).

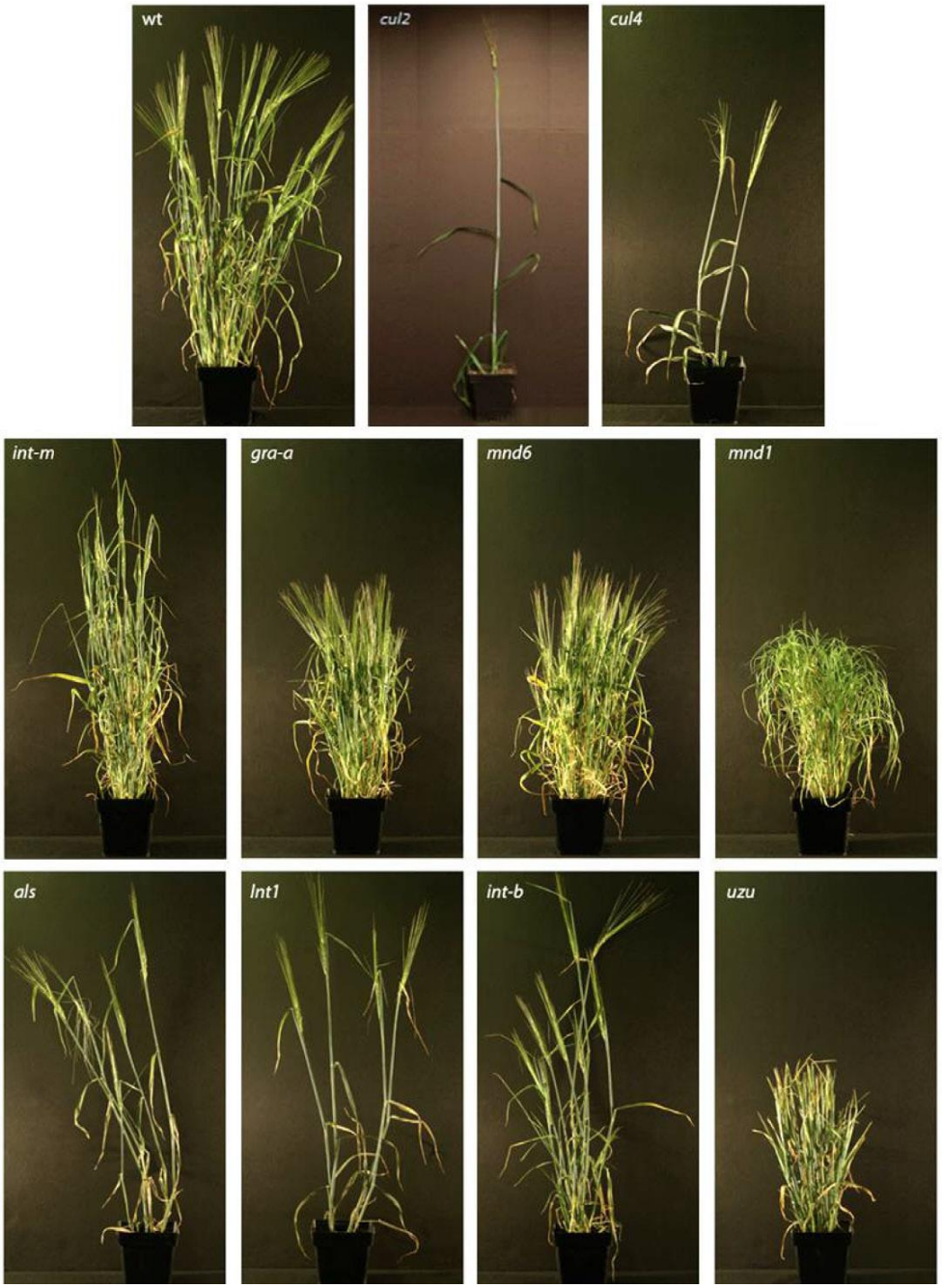


Figura 3. Esempi di mutanti di orzo con aumentato e ridotto accestimento, a confronto con il wild-type (wt). Fonte (Hussien et al., 2014a).

CONCLUSIONI

In conclusione, nell'ultimo secolo i mutanti sono stati fondamentali per studi di genetica nell'orzo e i nuovi strumenti genomici stanno accelerando la valorizzazione di queste risorse.

L'attenzione adesso deve spostarsi dall'analisi del singolo gene alla comprensione dei network genetici e molecolari che plasmano l'architettura e lo sviluppo della pianta e le loro interazioni con i fattori esterni. Le conoscenze risultanti saranno fondamentali per il breeding di nuovi ideotipi per un'agricoltura più sostenibile e adattata alle condizioni future.

In memoria di Michele Stanca e Udda Lundqvist.

BIBLIOGRAFIA

Babb S, Muehlbauer GJ (2003) Genetic and morphological characterization of the barley uniculm2 (cul2) mutant. Theor Appl Genet 106: 846–857

Bossinger G, Rohde W, Lundqvist U, Salamini F (1992) Genetics of barley development: mutant phenotypes and molecular aspects. *In* P Shewry, ed, Barley Genet. Biochem. Mol. Biol. Biotechnol. CAB International, pp 231–264

Bull H, Casao MC, Zwirek M, Flavell AJ, Thomas WTB, Guo W, Zhang R, Rapazote-Flores P, Kyriakidis S, Russell J, et al (2017) Barley SIX-ROWED SPIKE3 encodes a putative Jumonji C-type H3K9me2/me3 demethylase that represses lateral spikelet fertility. Nat Commun 8: 1–9

Bustos-Korts D, Dawson IK, Russell J, Tondelli A, Guerra D, Ferrandi C, Strozzi F, Nicolazzi EL, Molnar-Lang M, Ozkan H, et al (2019) Exome sequences and multi-environment field trials elucidate the genetic basis of adaptation in barley. Plant J 1172–1191

Chono M, Honda I, Zeniya H, Yoneyama K, Saisho D, Takeda K, Takatsuto S, Hoshino T, Watanabe Y (2003) A Semidwarf Phenotype of Barley uzu Results from a Nucleotide Substitution in the Gene Encoding a Putative Brassinosteroid Receptor. Plant Physiol 133: 1209–1219

Dabbert T, Okagaki RJ, Cho S, Heinen S, Boddu J, Muehlbauer GJ (2010) The genetics of barley low-tillering mutants: low number of tillers-1 (lnt1). Theor Appl Genet 121: 705–715

Dockter C, Hansson M (2015) Improving barley culm robustness for secured crop yield in a changing climate. J Exp Bot 66: 3499–3509

Donald CM (1968) The breeding of crop ideotypes. Euphytica 17: 385–403

Druka A, Franckowiak J, Lundqvist U, Bonar N, Alexander J, Houston K, Radovic S, Shahinnia F, Vendramin V, Morgante M, et al (2011) Genetic dissection of barley morphology and development. Plant Physiol 155: 617–627

Fusi R, Rosignoli S, Lou H, Sangiorgi G, Bovina R, Pattem JK, Borkar AN, Lombardi M, Forestan C, Milner SG, et al (2022) Root angle is controlled by EGT1 in cereal crops employing an antigravitropic mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A 119: 1–10

Hussien A, Tavakol E, Horner DS, Muñoz-Amatriaín M, Muehlbauer GJ, Rossini L (2014a) Genetics of tillering in rice and barley. Plant Genome. doi: 10.3835/plantgenome2013.10.0032

Hussien A, Tavakol E, Horner DS, Muñoz-Amatriaín M, Muehlbauer GJ, Rossini L (2014b) Genetics of Tillering in Rice and Barley. Plant Genome. doi: 10.3835/plantgenome2013.10.0032

Jayakodi M, Padmarasu S, Haberer G, Bonthala VS, Gundlach H, Monat C, Lux T, Kamal N, Lang D, Himmelbach A, et al (2020) The barley pan-genome reveals the hidden legacy of mutation breeding. Nature 588: 284–289

Kirschner GK, Rosignoli S, Guo L, Vardanega I, Imani J, Altmüller J, Milner SG, Balzano R, Nagel KA, Pflugfelder D, et al (2021) ENHANCED GRAVITROPISM 2 encodes a STERILE ALPHA MOTIF-containing protein that controls root growth angle in barley and wheat. Proc Natl Acad Sci U S A 118: 1–10

Komatsuda T, Pourkheirandish M, He C, Azhaguvel P, Kanamori K, Perovic D, Stein N, Graner A, Wicker T, Tagiri A, et al (2007) Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 1424–1429

Koppolu R, Anwar N, Sakuma S, Tagiri A, Lundqvist U, Pourkheirandish M, Rutten T, Seiler C, Himmelbach A, Ariyadasa R, et al (2013) Six-rowed spike4 (Vrs4) controls spikelet determinacy and row-type in barley. Proc Natl Acad Sci U S A 110: 13198–203

Kuijt SJH, Greco R, Agalou A, Shao J, 't Hoen CCJ, Övernäs E, Osnato M, Curiale S, Meynard D, van Gulik R, et al (2014) Interaction between the growth-regulating factor and knotted1-like homeobox Families of Transcription Factors. Plant Physiol. doi: 10.1104/pp.113.222836

Kurowska M, Daszkowska-Golec A, Gruszka D, Marzec M, Szurman M, Szarejko I, Maluszynski M (2011) TILLING: a shortcut in functional genomics. J Appl Genet 52: 371–90

Langridge P (2018) Economic and Academic Importance of Barley. The Barley Genome. Springer, pp 1–10

Lundqvist U (2014) Scandinavian mutation research in barley - a historical review. Hereditas 151: 123–131

Marzec M, Gruszka D, Tylec P, Szarejko I (2016) Identification and functional analysis of the HvD14 gene involved in strigolactone signaling in Hordeum vulgare. Physiol Plant 158: 341–355

Mascher M, Gundlach H, Himmelbach A, Beier S, Twardziok SO, Wicker T, Radchuk V, Dockter C, Hedley PE, Russell J, et al (2017) A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. Nature 544: 427–433

Mascher M, Richmond T a, Gerhardt DJ, Himmelbach A, Clissold L, Sampath D, Ayling S, Steuernagel B, Pfeifer M, D'Ascenzo M, et al (2013) Barley whole exome capture: a tool for genomic research in the genus Hordeum and beyond. Plant J. doi: 10.1111/tpj.12294

Mascher M, Schreiber M, Scholz U, Graner A, Reif JC, Stein N (2019) Genebank genomics bridges the gap between the conservation of crop diversity and plant breeding. Nat Genet 51: 1076–1081

Meints B, Cuesta-Marcos A, Fisk S, Ross A, Hayes P (2016) Food Barley Quality Improvement and Germplasm Utilization. *In* Guoping Zhang & Chengdao Li, ed, Explor. Identif. Util. Barley Germplasm. Zhejiang University Press Co., Ltd. Published by Elsevier Inc, pp 41–73

Mohammadi Aghdam S, Abdollahi Mandoulakani B, Rossini L, Janiak A, Shaaf S (2022) Identification of novel plant architecture mutants in barley. Cereal Res Commun 50: 179–189

Monat C, Padmarasu S, Lux T, Wicker T, Gundlach H, Himmelbach A, Ens J, Li C, Muehlbauer G, Schulman A, et al (2019) TRITEX: chromosome-scale sequence assembly of Triticeae genomes with open-source tools. bioRxiv 2: 631648

Müller KJ, Romano N, Gerstner O, Garcia-Marotot F, Pozzi C, Salamini F, Rohde W (1995) The barley Hooded mutation caused by a duplication in a homeobox gene intron. Nature 374: 727–730

Okagaki RJ, Cho S, Kruger WM, Xu WW, Heinen S, Muehlbauer GJ (2013) The barley UNICULM2 gene resides in a centromeric region and may be associated with signaling and stress responses. Funct Integr Genomics 13: 33–41

Osnato M, Stile MR, Wang Y, Meynard D, Curiale S, Guiderdoni E, Liu Y, Horner DS, Ouwerkerk PBF, Pozzi C, et al (2010) Cross talk between the KNOX and ethylene pathways is mediated by intron-binding transcription factors in Barley. Plant Physiol. doi: 10.1104/pp.110.161984

Pourkheirandish M, Hensel G, Kilian B, Senthil N, Chen G, Sameri M, Azhaguvel P, Sakuma S, Dhanagond S, Sharma R, et al (2015) Evolution of the Grain Dispersal System in Barley. Cell 162: 527–539

Poursarebani N, Seidensticker T, Koppolu R, Trautewig C, Gawronski P, Bini F, Govind G, Rutten T, Sakuma S, Tagiri A, et al (2015) The Genetic Basis of Composite Spike Form in Barley and "Miracle-Wheat." Genetics. doi: 10.1534/genetics.115.176628

Pozzi C, Faccioli P, Terzi V, Stanca AM, Cerioli S, Castiglioni P, Fink R, Capone R, Müller KJ, Bossinger G, et al (2000) Genetics of mutations affecting the development of a barley floral bract. Genetics 154: 1335–1346

Ramsay L, Comadran J, Druka A, Marshall DF, Thomas WTB, Macaulay M, MacKenzie K, Simpson C, Fuller J, Bonar N, et al (2011) INTERMEDIUM-C, a modifier of lateral spikelet fertility in barley, is an ortholog of the maize domestication gene TEOSINTE BRANCHED 1. Nat Genet 43: 169–172

Santi L, Wang Y, Stile MR, Berendzen K, Wanke D, Roig C, Pozzi C, Müller K, Müller J, Rohde W, et al (2003) The GA octodinucleotide repeat binding factor BBR participates in the transcriptional regulation of the homeobox gene Bkn3. Plant J 34: 813–826

Shaaf S, Bretani G, Biswas A, Fontana IM, Rossini L (2019) Genetics of barley tiller and leaf development. J Integr Plant Biol 61: 226–256

de Souza Moraes T, van Es SW, Hernández-Pinzón I, Kirschner GK, van der Wal F, da Silveira SR, Busscher-Lange J, Angenent GC, Moscou M, Immink RGH, et al (2022) The TCP transcription factor HvTB2 heterodimerizes with VRS5 and controls spike architecture in barley. Plant Reprod 35: 205–220

Stadler LJ (1928) Mutations in Barley Induced by X-Rays and Radium. Science (80-) 68: 186–187

Szurman-Zubrzycka ME, Zbieszczyk J, Marzec M, Jelonek J, Chmielewska B, Kurowska MM, Krok M, Daszkowska-Golec A, Guzy-Wrobelska J, Gruszka D, et al (2018) HorTILLUS—A Rich and

Renewable Source of Induced Mutations for Forward/Reverse Genetics and Pre-breeding Programs in Barley (Hordeum vulgare L.). Front Plant Sci 9: 216

Taketa S, Amano S, Tsujino Y, Sato T, Saisho D, Kakeda K, Nomura M, Suzuki T, Matsumoto T, Sato K, et al (2008) Barley grain with adhering hulls is controlled by an ERF family transcription factor gene regulating a lipid biosynthesis pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 4062–4067

Talamè V, Bovina R, Sanguineti MC, Tuberosa R, Lundqvist U, Salvi S (2008) TILLMore, a resource for the discovery of chemically induced mutants in barley. Plant Biotechnol J 6: 477–485

Tavakol E, Okagaki R, Verderio G, Vahid SJ, Hussien A, Bilgic H, Scanlon MJ, Todt NR, Close TJ, Druka A, et al (2015) The barley Uniculme4 gene encodes a BLADE-ON-PETIOLE-like protein that controls tillering and leaf patterning. Plant Physiol. doi: 10.1104/pp.114.252882

Ullrich, S. E (2011) Significance, Adaptation, Production, and Trade of Barley. *In* Steven E. Ullrich, ed, Barley Prod. Improv. Uses. Wiley-Blackwell, pp 3–13

Wendt T, Holme I, Dockter C, Preu A, Thomas W, Druka A, Waugh R, Hansson M, Braumann I (2016) HvDep1 Is a Positive regulator of culm elongation and grain size in barley and impacts yield in an environment-dependent manner. PLoS One 11: 1–21

MUTANTI PER LA QUALITÀ: RISVOLTI OPPOSTI DELLA SELEZIONE UMANA APPLICATA ALLE LANDRACES DI FRUMENTO DURO

Luigi Cattivelli[1]
CREA-Centro di ricerca Genomica e Bioinformatica, Fiorenzuola d'Arda (PC)

Riassunto

La qualità degli alimenti è un concetto moderno diverso a seconda delle specie coltivate e dei prodotti ottenuti a seguito della loro trasformazione. In passato l'obbiettivo fondante del miglioramento genetico era costituito dall'aumento delle capacità produttive ed in questo contesto non solo la qualità era scarsamente considerata, ma in diversi casi caratteri che oggi apprezziamo sono stati esclusi attraverso la selezione. Usando il frumento duro ed alcuni caratteri che determinano la qualità della pasta (alto contenuto di proteine, assenza di sostanze tossiche) come caso di studio, si può osservare come la selezione umana abbia volutamente escluso dalle varietà moderne un gene presente nei farri che determina un aumento del contenuto proteico nel seme, mentre abbia selezionato un gene assente nelle forme selvatiche che consente alla pianta di accumulare cadmio, un metallo tossico, nel seme. Questi esempi dimostrano come i criteri seguiti in passato nel miglioramento genetico non necessariamente collimano con i criteri qualitativi attuali.

Summary

Mutants for quality: opposite impacts of human selection applied to durum wheat landraces

Food quality is a modern concept depending on the crop and the products obtained because of their processing. In the past, the main target for genetic improvement was to increase yield capacity, and in this context not only was quality poorly considered, but in several cases traits that we value today were excluded through selection. Using durum wheat and some features that depict pasta quality (high protein content, absence of toxic substances) as a case study, one can see how human selection has deliberately excluded from modern varieties a gene present in wild emmer that results in increased seed protein content, while a gene absence in emmer that promote the accumulation of cadmium, a toxic metal, in the seed was instead specifically selected. These examples demonstrate how the criteria followed in genetic improvement in the past do not necessarily match today's quality criteria.

[1] Direttore del Centro

INTRODUZIONE

La qualità è il tipico carattere "quantitativo", perciò, non mendeliano e, a ben vedere, il concetto di qualità ai tempi di Mendel non esisteva neppure. La qualità è un concetto moderno che si sviluppa negli ultimi 50-60 anni, negli anni precedenti il fondamentale obiettivo del miglioramento genetico era la produzione mentre la qualità era un aspetto secondario. Oggi, invece, la qualità è un tratto prioritario e all'interno del concetto di qualità sono compresi aspetti genetici molto diversi tra loro: contenuto in sostanze a valenza nutrizionale (antiossidanti, fibre, proteine ecc.), il basso contenuto di grassi, l'assenza di sostanze indesiderate (es. micotossine, OGM, glutine), la comodità d'uso (es. frutti senza semi), la *shelf life* dei prodotti ecc.

UN ESEMPIO CONCRETO: LA QUALITÀ DEL FRUMENTO DURO E DELLA PASTA

Il concetto di qualità è strettamente legato alle diverse specie coltivate; pertanto, questo contributo sarà focalizzato sulla qualità del frumento duro e del prodotto che da esso deriva, la pasta, un caso di studio che consente bene di spiegare come l'uomo si sia approcciato alla qualità con atteggiamenti molto diversi nel corso dei millenni.

La qualità della pasta dipende sia dalla qualità della materia prima (semola) sia dalla tecnologia adottata nel processo di trasformazione, il primo fattore è di natura genetica La semola di alta qualità è caratterizzata da un elevato indice di glutine, un colore giallo intenso, un elevato contenuto proteico e dall'assenza di sostanze tossiche. Tutte caratteristiche con una rilevante componente genetica.

Vediamo alcuni esempi. Il colore che è quello che potremmo definire un caso geneticamente semplice. L'idea di fare la pasta gialla nasce 50-60 anni fa, quando Barilla ha colto la preferenza dei consumatori per una pasta dal colore giallo intenso, un'intuizione che spiega anche l'uso di confezioni trasparenti per il packaging della pasta. Il colore della pasta dipende da due aspetti: l'accumulo di pigmenti nell'endosperma, principalmente carotenoidi, e il più o meno esteso *bleaching* dei carotenoidi durante la pastificazione a causa dell'azione degli enzimi lipossigenasi (LOX) che degradano i carotenoidi quando la semola viene miscelata con l'acqua in presenza dell'ossigeno. Il principale carotenoide del frumento è la luteina che, diversamente dal betacarotene, non ha un particolare valore nutrizionale. Il colore giallo è quindi soprattutto una questione estetica. Il contenuto di carotenoidi nella semola dipende principalmente dalla diversità allelica ai geni che codificano per gli enzimi coinvolti nella biosintesi dei carotenoidi, primo fra tutti la fitoene sintasi, e diversi QTL sono stati trovati in coincidenza con questi geni (Fig. 1).

L'accumulo di carotenoidi è controbilanciato dalla presenza di enzimi ossigenasici attivi durante la produzione della pasta, in particolare durante l'essicazione del prodotto estruso. Il maggior fattore responsabile per il *bleaching* dei carotenoidi durante la pastificazione è il gene LOX-B1 localizzato sul cromosoma 4B e che codifica per le lipossigenasi presenti nell'endosperma, la selezione di un allele nullo al locus LOX-B1 caratterizzato da una delezione che distrugge l'open reading frame, ha consentito di ridurre l'attività lipossigenasica nei frumenti moderni. La combinazione di questo carattere con i fattori che determinano un elevato accumulo di pigmenti nel seme ha consentito nel volgere alcuni decenni di selezionare varietà di frumento duro che producono semole ad elevato indice di giallo e che non perdono colore durante la pastificazione, indispensabili per fare paste con il "tipico" colore giallo intenso.

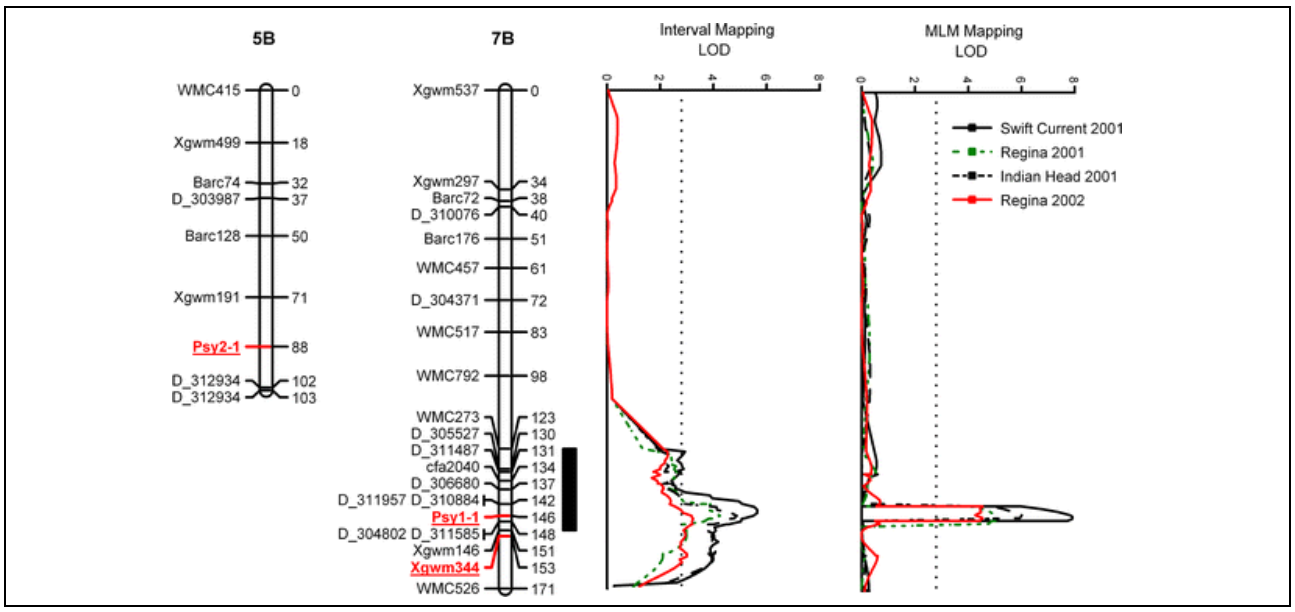


Figura 1 - Mappa di linkage genetico dei cromosomi 5B e 7B del grano duro che illustra la posizione dei geni della fitoene sintasi Psy1-1 e Psy2-1. La distanza genetica dei marcatori è indicata a destra della barra cromosomica in cM. La barra nera rappresenta la posizione di un QTL riportato in precedenza per il colore della farina gialla (da Pozniak et al., 2007)

UN GENE PER L'ELEVATO CONTENUTO DI PROTEINE PERSO NEL CORSO DELLA SELEZIONE

Il principale fattore qualitativo della pasta è rappresentato dal contenuto in proteine o meglio in glutine. il glutine determina la capacità della pasta di rimanere al dente dopo la cottura, più elevato il contenuto di glutine più la pasta rimane al dente e le paste commerciali di elevata qualità hanno un contenuto proteico pari ad almeno il 14% a fronte di un requisito minimo di legge dell'11,5%. La tenuta alla cottura non è tuttavia solo una funzione del contenuto proteico, molto dipende anche dalle caratteristiche del glutine che a loro volta dipendono dalle frazioni proteiche che compongono il glutine. Il miglioramento genetico ha lavorato molto in passato per selezionare le frazioni proteiche migliori per la trasformazione industriale e nel caso della pasta si è operato per migliorare la forza del glutine. Per avere pasta di alta qualità così come la intendiamo oggi, è necessario disporre di semole, quindi di frumenti duri, ad elevato contenuto di proteine e con elevato indice di glutine (glutine tenace). Il contenuto proteico delle cariossidi dipende sia da fattori agronomici, in particolare la concimazione azotata, sia da fattori genetici. Negli ultimi decenni la richiesta dei consumatori di avere una pasta sempre più al dente e l'esigenza di ridurre l'input "chimico" in agricoltura, ha spinto il miglioramento genetico a selezionare varietà in grado di accumulare più proteine a parità di fertilizzazione azotata. Tuttavia, la genetica che determina il contenuto proteico è decisamente complicata e, in linea generale, il contenuto proteico è il tipico fattore poligenico in cui sono coinvolti tanti ed indefiniti geni. Se guardiamo la storia del frumento duro o dei frumenti in generale, più aumenta la capacità produttiva più diminuisce il contenuto proteico. Gli studi che hanno misurato l'effetto del miglioramento genetico dei frumenti negli ultimi 100 anni hanno evidenziato come l'aumento della produzione sia sempre associato alla diminuzione del contenuto proteico (Fig. 2); quindi, i frumenti antichi hanno più proteine e quindi glutine dei frumenti moderni, anche se il loro glutine è in generale poco tenace (basso indice di glutine). C'è però un caso curioso che riguarda un gene scoperto nel farro selvatico. Il farro selvatico è il predecessore del farro coltivato da cui è stato poi selezionato il frumento duro. Si tratta di un gene che sarebbe perfetto

nelle moderne varietà per soddisfare le esigenze qualitative, ma che invece non è mai stato selezionato né dagli agricoltori nei secoli passati né dai programmi di miglioramento genetico degli ultimi decenni, e che solo recentemente, dopo la scoperta della sua funzione, sta per essere introdotto nelle varietà moderne. Il gene in questione si chiama *GPC-B1* (Grain Protein Content 1, Uauy et al., 2006) e si trova sul cromosoma 6B. *GPC-B1* esiste in due forme alleliche, quella *wild-type* ed una forma mutata a seguito dell'inserzione di una base, una T, che determina uno stop codon e rende la proteina codificata da *GPC-B1* inattiva. Il confronto fra linee isogeniche per i due alleli di *GPC-B1* dimostra che l'allele *wild-type* aumenta il contenuto di proteine di almeno il 10% rispetto all'allele portante la mutazione e al contempo aumenta in modo significativo anche il contenuto di zinco e di ferro nel seme.

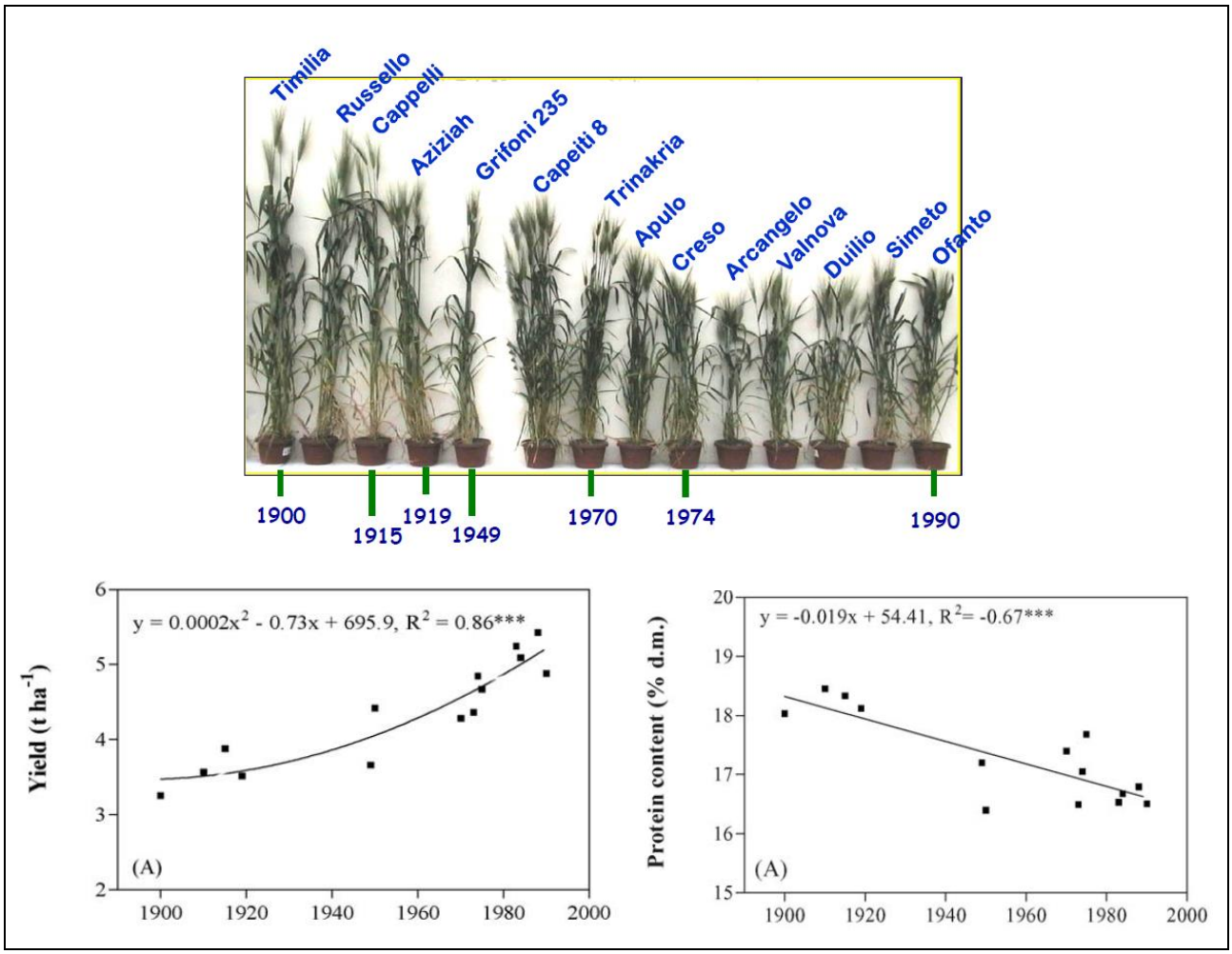


Figura 2 – In alto: evoluzione della taglia delle varietà di grano duro nel corso del '900. In basso: trend nella relativa produttività (a sinistra) e contenuto proteico della granella (Fonte De Vita et al., 2007).

Tutti i farri selvatici portano la versione *wild type* cioè hanno il gene che determina un alto tenore proteico. Le popolazioni di farro domestico hanno prevalentemente l'allele *wild-type*, con alcune eccezioni rappresentate da popolazioni che presentano la forma mutata (basso contenuto di proteine), mutazione che molto probabilmente si è generata all'interno delle popolazioni di farro coltivato. Nelle popolazioni di frumento duro invece la forma mutata è molto frequente e nei frumenti coltivati moderni è l'unico allele presente. A ben vedere questo gene sarebbe perfetto per le esigenze qualitative dell'uomo moderno, ma perché un gene così utile secondo gli standard qualitativi attuali nel corso della selezione è stato di fatto escluso dai genotipi di maggior successo? Considerato che

il frumento duro deriva dai farri, dove l'allele *wild type* è dominate, se oggi le varietà moderne portano tutte l'allele mutato significa che l'allele *wild type* è stato probabilmente contro-selezionato nel corso dei secoli. Perché?

L'allele *wild type* accelera la senescenza delle foglie e facilita la rimobilitazione delle proteine e dei minerali nel seme, di conseguenza il seme risulta più ricco di minerali e di proteine. Tuttavia, anticipare la senescenza implica una riduzione della produttività, circa un 10%, stimato nel confronto tra linee isogeniche. L'allele mutato, al contrario, ritardando la senescenza consente un prolungato *grain filling* che determina semi più grandi e maggiore produzione. Semplicemente nel passato l'uomo ha selezionato per produttività, l'unica vera esigenza fino a pochi decenni fa, quindi un gene, pure utile da un punto di vista qualitativo, ma che riduce la produttività, è stato coerentemente escluso dalle varietà migliori. Dopo la scoperta di *GPC-B1*, è iniziato un lavoro di miglioramento genetico per reinserire l'allele *wild-type* in alcune varietà al fine di elevare il contenuto di proteine, un fattore essenziale per fare pasta di alta qualità.

UN GENE PER L'ACCUMULO DI CADMIO NEL SEME SELEZIONATO NEL CORSO DEI SECOLI

Qualità non è solo la presenza di sostanze favorevoli è anche l'assenza di sostanze tossiche e anche per questo carattere possiamo avere fattori a controllo poligenico così come esempi di genetica mendeliana in grado di incidere pesantemente sul fenotipo.

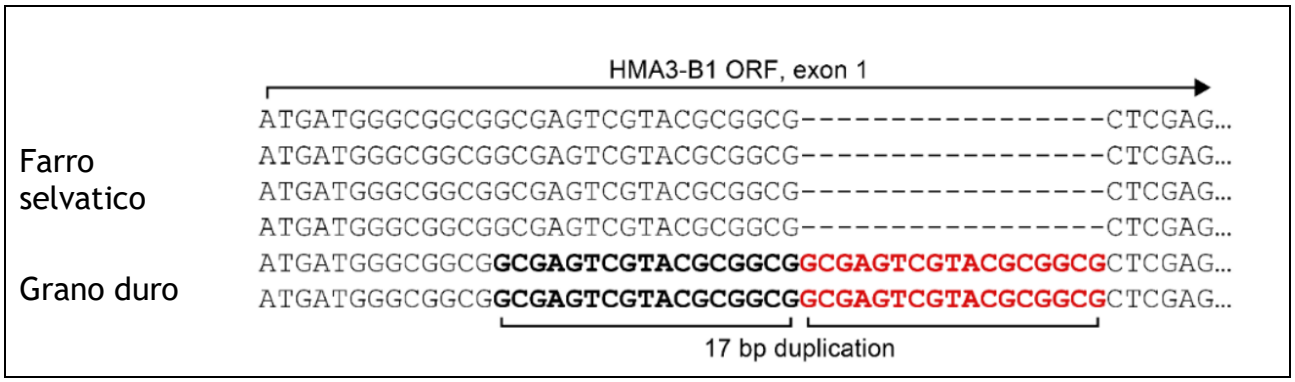


Figura 3 – Inserzione (in rosso) di 17 paia di basi locus Cdu-B1 che determina la comparsa di uno stop codon nell'open reading frame e sostanzialmente inattiva la proteina (da Maccaferri et al., 2019).

L'accumulo di cadmio nella cariosside è un chiaro esempio di un carattere negativo determinato da un singolo fattore genetico. Diversamente dal frumento tenero, il frumento duro quando cresciuto su un terreno che contiene cadmio, ha la tendenza ad accumulare cadmio, un metallo pesante altamente tossico, nel seme. Fortunatamente i terreni italiani, in generale, non contengono cadmio per cui il problema è marginale; tuttavia, nell'Europa settentrionale o nel Canada il problema può diventare rilevante. Non tutte le varietà però sono in grado di accumulare cadmio allo stesso modo, esiste una diversità genetica determinata da un gene denominato *Cdu-B1* presente sul cromosoma 5B (Maccaferri et al., 2019). Sono noti due alleli al locus *Cdu-B1*, una versione *wild-type* che è associata all'assenza di cadmio nel seme ed una versione mutata caratterizzata da una duplicazione di 17 paia di basi che determina la comparsa di uno stop codon nell'open reading frame e sostanzialmente inattiva la proteina. *Cdu-B1* codifica per un trasportatore di metalli attivo a livello radicale e la sua inattivazione impedisce la compartimentalizzazione del cadmio nei vacuoli delle cellule radicali. In presenza dell'allele mutato il cadmio entra passivamente nella radice, non viene accumulato nei vacuoli delle cellule radicali, e viene piano piano traslocato al seguito del flusso traspiratorio nelle foglie e nei semi.

L'allele *wild-type* di *Cdu-B1* è l'unico allele presente nei farri selvatici, la mutazione comparve nelle forme coltivate di farro e successivamente venne selezionata dall'uomo nel corso dei millenni, in particolare nelle zone del Nord Africa. La maggior parte delle popolazioni di frumento duro nordafricane presentano l'allele mutato al locus *Cdu-B1* e conseguentemente hanno la potenziale attitudine di accumulare cadmio nel seme. Come è noto gran parte delle popolazioni di frumento duro coltivati in Italia nell'Ottocento sono di origine nordafricana e da queste popolazioni sono state selezionate le prime varietà di frumento duro a cominciare dalla varietà Senatore Cappelli. A loro volta le prime varietà italiane hanno costituito anche la base di molti programmi di breeding internazionali. Considerato che la gran parte dei materiali nordafricani contengono l'allele mutato al gene *Cdu-B1* è facile comprendere perché questo allele sia così diffuso nelle varietà moderne. Rimane però da capire perché gli agricoltori nei secoli passati hanno preferito, inconsciamente, l'allele mutato al locus *Cdu-B1*. Un'ipotesi è legata al possibile vantaggio per le piante con l'allele mutato quando cresciute in terreni poveri di ferro perché questo minerale viene trasportato insieme al cadmio e la carenza di ferro limita fortemente la produzione, ma mancano ancora prove chiare in merito. Tutto considerato *Cdu-B1* è il tipico esempio di quel gene che l'uomo non avrebbe dovuto selezionare per fare prodotti di alta qualità, ma che invece è stato selezionato perché la necessità di aumentare la produzione si è accompagnata fino a pochi anni fa all'assenza di conoscenze scientifiche.

CONCLUSIONI

Come abbiamo visto la qualità è un concetto nuovo nella storia millenaria del miglioramento genetico e quello che ha fatto l'uomo nel passato non è esattamente seguire i criteri qualitativi che ci siamo dati oggi. Quindi se pensiamo che la pasta buona sia quella di oggi allora probabilmente il frumento del passato non hanno certamente le caratteristiche qualitative dell'iconica pasta italiana.

ALCUNE REFERENZE PER APPROFONDIRE GLI ARGOMENTI TRATTATI

Colasuonno P, Marcotuli I, Blanco A, Maccaferri M, Condorelli GE, Tuberosa R, Parada R, Costa de Camargo A, Schwember AR, Gadaleta A, 2019. Carotenoid pigment content in durum wheat (Triticum turgidum L. var durum): An overview of quantitative trait loci and candidate genes. Frontiers in Plant Science, 10: 1347.

De Vita P, Li Destri Nicosia O, Nigro F, Platani C, Riefolo C, Di Fonzo N, Cattivelli L, 2007. Breeding progress in morpho-physiological, agronomical and qualitative traits of durum wheat cultivars released in Italy during the 20th century. European Journal of Agronomy, 26: 39-53.

Maccaferri M, et al. 2019. Durum wheat genome highlights past domestication signatures and future improvement targets. Nature Genetics, 51: 885–895. doi: 10.1038/s41588-019-0381-3.

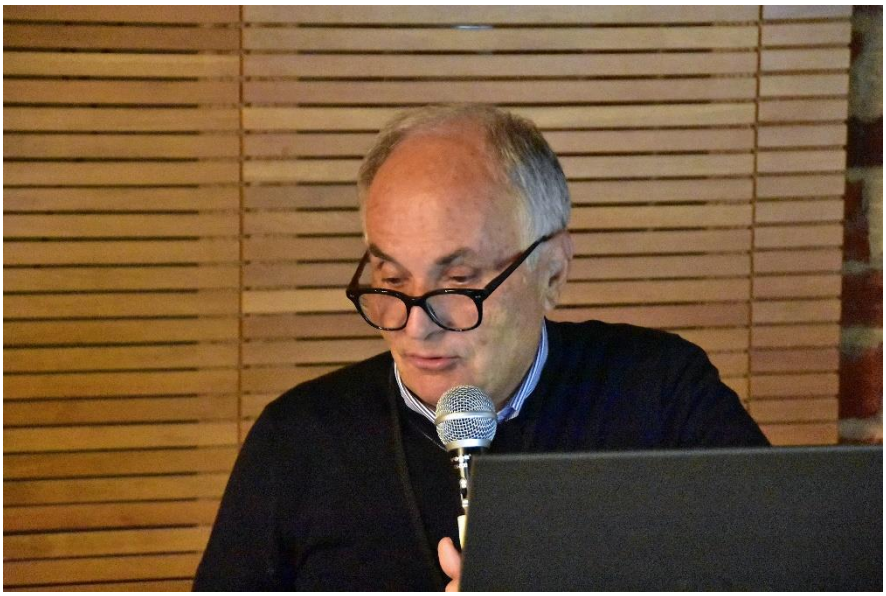
Pozniak, C.J., Knox, R.E., Clarke, F.R. et al. Identification of QTL and association of a phytoene synthase gene with endosperm colour in durum wheat. Theor Appl Genet 114, 525–537 (2007). https://doi.org/10.1007/s00122-006-0453-5

Uauy C, Distelfeld A, Fahima T, Blechl A, Dubcovsky J, 2006. A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. Science 314, 1298–1301. doi: 10.1126/science.1133649

Verlotta A, De Simone V, Mastrangelo A M, Cattivelli L, Papa R Trono D, 2010. Insight durum wheat Lpx-B1: a small gene family coding for Lipoxygenase (LOX) responsible for carotenoid bleaching in mature grains. BMC Plant Biology, 10: 263.

MUTAGENESI E CARATTERI MONOMENDELIANI NEL RISO

Eugenio Gentinetta[1]
Milano Sementi - Soc. Coop. Agricola, Milano



Riassunto

Viene presentata l'attività di costituzione varietale sul riso, realizzata con l'impiego della mutagenesi indotta per migliorare alcuni tratti genetici delle vecchie varietà quali la taglia alta, con l'introduzione dei geni semi-dwarf. Altre varietà storiche, che rappresentano la tradizione culinaria italiana, che necessitavano di piccole modifiche, sono state migliorate per i caratteri di resistenza alle malattie, della taglia, precocità, produttività, impiegando il metodo back cross. Si sono inoltre create popolazioni sintetiche per i diversi gruppi merceologici, tondi, lungo di tipo A da parboiled, lungo di tipo A da risotti e lungo di tipo B, dalle quali sono derivate numerose varietà che hanno una importante rilevanza agronomica nei paesi europei dove si coltiva il riso.

Abstract

Mutagenesis and mono-mendelian traits in rice

The activity of varietal constitution on rice is presented, carried out with the use of induced mutagenesis to improve some genetic traits of the old varieties such as the high size, with the introduction of semidwarf genes. Other historical varieties, which represent the Italian culinary tradition, which needed minor modifications, have been improved for the characteristics of resistance to diseases, size, precocity, productivity using the back cross method. Synthetic populations have also been created for the different product groups, round, long-grain type A for parboiled, long-grain type A for risotto and long-grain type B, from which numerous varieties have been derived that have an important agronomic importance in European countries where rice is grown.

PREMESSA

Il prof. Angelo Bianchi, nel ormai lontano 1992, mi propose per una posizione di breeder del riso in un ente pubblico. Trasferitomi nell'Ente il primo anno analizzai le varietà italiane e mi resi conto che queste presentavano una ridotta variabilità genetica ed erano state costituite a partire dagli anni '20 del secolo scorso.

In Italia, le varietà *japonica* non possedevano geni semi-dwarf, questi geni erano stati introdotti in California negli anni '70 e '80 con mutazione indotta e pertanto sussistevano

[1] Già sperimentatore del MiPAF e dell'Ente Nazionale Risi

i presupposti di replicare quanto realizzato in California. Considerando il quadro varietale italiano che includeva buone varietà dal punto di vista merceologico, ma che necessitavano correzioni agronomiche, furono avviati i progetti di miglioramento sotto riportati.

ESPERIMENTO DI MUTAGENESI INDOTTA CON RAGGI GAMMA.

La creazione di variabilità genetica attraverso le mutazioni è uno degli strumenti importanti per migliorare il riso. Con la collaborazione della Casaccia (prof. Alessandro Bozzini e collaboratori), impostai una ricerca impiegando vecchie varietà di riso che presentavamo serie problematiche agronomiche.

Non riporto i dettagli degli esperimenti fatti, ma tra tutte le varietà trattate quella che rispose in modo significativo fu Carnaroli.

Questa era ed è considerata la migliore varietà di riso per risotti, ma con problemi agronomici quali la suscettibilità alle malattie (in particolare il Brusone), l'allettamento, dato che la pianta è alta 160-170 cm, limitavano la coltivazione a circa 800-1000 ha/annui, inoltre presenta scarsa produttività e le ariste sono molto lunghe. Un tormento per chi lo coltiva.

L'obiettivo di questa ricerca era quello di trovare delle mutazioni che correggessero i più evidenti difetti.

Furono trovate circa 300 mutazioni, principalmente clorofilliane, alcune presentavano assenza di ariste, granelli glabri e solo tre piante avevano taglia ridotta, circa un metro.

In seguito stabilizzando le linee, si sono fatti i test di allelismo confermando che la taglia bassa era dovuta alla presenza del gene recessivo sd1.

Con l'introduzione di questo gene mono mendeliano abbiamo raggiunto il principale obiettivo prefissato, l'abbassamento della taglia, che ha comportato i vantaggi che espongo brevemente.

L'indice di raccolto (IR o HI) in Carnaroli è del 50%, il mutante derivato è del 70%. La differenza è stata acquisita in produzione, si è passati da una resa potenziale di 60 q/ha del Carnaroli a 90 q/ha. E tutto questo modificando un solo gene. L'espressione degli altri caratteri è uguale a Carnaroli. La varietà derivata è stata denominata Karnak. Un grande successo commerciale durato 20 anni.

ESPERIMENTI DI BACK CROSS: CARAVAGGIO, ARBORIO E VIALONE NANO

Il rilascio di Karnak ha rappresentato la fine di un progetto, che se pur importante non risolveva totalmente i problemi della varietà Carnaroli.

Volendo migliorare anche le varietà Arborio e Vialone Nano che presentavano le stesse problematiche del Carnaroli si preferì ricorrere al back cross (BC).

L'obiettivo di questo nuovo progetto fu quello di recuperare questi genotipi d'élite attraverso numerosi BC per ottenere un'identità genetica più vicina a quella del genitore migliorandola per caratteri agronomici e di resistenza alle avversità biotiche. La scelta del genitore con i geni desiderati è stata determinante, si è utilizzata una varietà del Nord America, lungo B, che stando alle descrizioni riportate dalla letteratura scientifica, aveva i caratteri mono mendeliani sd1, Pik, Aw, Hy, gl e alto amilosio. Dopo il primo BC, si è sviluppata la popolazione segregante e su piante scelte in F2/F3 si sono effettuati i reincroci con Carnaroli, Arborio e Vialone Nano. Su un numero significativo di piante scelte, si sono ottenuti almeno 500 semi per ogni set di incroci. Sono state sviluppate le F2 derivate, eliminando le piante alte, i genotipi suscettibili al brusone e le piante con spighette aristate, selezionando verso i fenotipi del Carnaroli, Arborio e del Vialone Nano. Sulle F2 selezionate si è incrociato ancora con Carnaroli, Arborio o Vialone Nano e si è

proceduto con selezione genealogica. Il risultato sono state numerose linee che erano fenotipicamente, per tipologia di granello, simili a Carnaroli, Arborio e a Vialone Nano con tutti i caratteri scelti inseriti nel genotipo.

Le linee derivate da Carnaroli sono diventate Caravaggio, Keope e Leonidas CL (dalle analisi del DNA i genotipi derivati sono simili al 98%), quelle derivate da Arborio sono diventate Grifone, Isabela, mentre quella derivata da Vialone Nano è diventata Alessio (Figg. 1 e 2). Più precisamente la varietà Leonidas CL è stata ottenuta successivamente da una *sister line* di Caravaggio con l'introgressione del gene CL mediante selezione assistita. I tempi per ottenere le diverse varietà sono stati lunghi, dovendo operare in presenza di caratteri sia dominanti sia recessivi, e ad ogni BC si sono analizzate migliaia di linee per resistenza al brusone, per tipo di granello e per fenotipo. Sono stati eseguiti 4 BC e le linee scelte sono diventate varietà importanti che globalmente rappresentano il 70% del mercato del Carnaroli, le varietà derivate da Arborio iscritte recentemente si avviano ad un successo commerciale, mentre la varietà derivata da Vialone Nano è tuttora in corso di iscrizione.

Figura 1 – Cultivar Caravaggio del gruppo merceologico Carnaroli (a sinistra) e cultivar Isabela del gruppo merceologico Arborio (a destra)

Figura 2 – Cultivar Alesio (a sinistra) a confronto con Vialone nano (a destra)

COSTITUZIONE DI POPOLAZIONI SINTETICHE

Il discorso è più complicato, quando ho iniziato ad occuparmi di riso, ho avuto un incontro con Michele Stanca che definisco, alla luce dei fatti, fantastico per gli sviluppi che in seguito ha avuto. Le indicazioni suggerite di come impostare un programma di miglioramento del riso erano molto semplici, incroci solo tra varietà produttive, realizzazione per ogni gruppo merceologico di un incrocio diallelico tra 6/7 varietà a cui seguiva un ulteriore incrocio diallelico tra le F1. In questo programma le varietà sono state scelte per caratteristiche quali resistenza alle malattie, altezza della pianta, tipo di granello, eserzione, aristatura delle glumelle, precocità, produttività. Ogni varietà apportava geni differenti: le varietà californiane i geni sd1 per la taglia bassa; le varietà italiane il tipo di granello, le resistenze e la precocità; altre linee cinesi geni di resistenza, ma tutte dovevano essere molto produttive. Il lavoro è stato molto lungo e dispendioso, ma alla fine sono state estratte diverse varietà che hanno segnato la risicoltura italiana: Augusto varietà che ha conquistato il settore merceologico dei risi da parboilizzazione e soprattutto Cammeo del gruppo merceologico del Baldo, varietà molto produttiva, con granello cristallino, alta resa alla lavorazione, resistente alle malattie, semi-dwarf e precoce. Cammeo è coltivato in tutti i paesi risicoli europei, in medio oriente e ora anche in Uruguay. In Turchia, dati del Ministero, ha rappresentato il 43 % della superficie coltivata a riso.

Figura 3 – Cultivar Cammeo del gruppo merceologico Baldo

Con questi programmi, realizzati anche per le varietà a profilo tondo, si è ottenuta e rilasciata di recente la varietà Filippo, una super varietà per modello di pianta, con resistenza assoluta al brusone e alla siccità, con produzioni simili ai migliori ibridi.

CONCLUSIONI

I 30 anni che ormai ho dedicato al miglioramento del riso per gli ambienti temperati sono stati caratterizzati da una produzione rilevante di nuove varietà per tutti gli ambiti merceologici.

Numerose hanno conquistato una rilevanza agronomica ed economica, sono state certificate negli ultimi 20 anni, circa 50.000 tonnellate di risone, che si stima abbiano dato origine a circa 2 milioni di tonnellate di riso, con un incremento della PLV a livello agricolo e industriale stimato di circa 500 milioni di euro.

GENETICA DI CARATTERI MONOFATTORIALI E SELEZIONE GUIDATA NEI BOVINI

Paolo Ajmone Marsan[1]
Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza

Riassunto

La maggior parte delle mutazioni mendeliane identificate e caratterizzate nelle specie zootecniche sono causa di difetti genetici. Gli animai portatori di tali varianti sono di conseguenza esclusi dai programmi di selezione. Altre mutazioni, purtroppo poche, danno origine ad alleli in grado di migliorare alcuni caratteri di interesse. In questa breve rassegna ne vengono descritte tre, controllate da singoli geni che modificano caratteristiche interessanti per i bovini da latte e da carne: la muscolosità, che influenza l'efficienza della produzione di carne e la resa al macello, la presenza/assenza di corna, carattere associato al benessere animale e alla sicurezza degli operatori e la tolleranza al caldo, carattere sempre più interessante in un periodo di rapidi cambiamenti climatici. L'utilizzo di queste varianti nei programmi di miglioramento genetico è semplice se sono già presenti in alcuni individui all'interno della razza in selezione, più complesso nel caso in cui debbano essere introdotti da una razza diversa. In quest'ultimo caso le nuove tecnologie di gene-editing sarebbero di grande aiuto per inserire rapidamente le varianti favorevoli direttamente in animali di alto valore genetico.

Abstract

Genetics of mono-factorial traits and assisted selection in cattle

Most of the Mendelian mutations identified and characterized in livestock species cause genetic defects. Animals carrying such variants are therefore excluded from breeding programmes. Other mutations, unfortunately few, give rise to alleles capable of improving some characters of interest. In this brief review, three are described, controlled by individual genes that modify interesting characteristics in dairy and beef cattle: double muscling, which influences the efficiency of meat production and slaughter yield, the presence/absence of horns, trait associated with animal welfare and operator safety, and tolerance to heat, an increasingly interesting character in a period of rapid climate change. The use of these variants in breeding programs is simple if they are already present in some individuals within the breed being selected, more complex in case they are to be introduced from a different breed. In the latter case, new gene-editing technologies would greatly speed-up the insertion of favorable variants directly in animals of high genetic value.

[1] Professore ordinario di Miglioramento genetico animale

INTRODUZIONE

Sono trascorsi 200 anni dalla nascita di Mendel. Il fatto che i genetisti chiamino ancora mendeliani i caratteri controllati da singoli geni che segregano indipendentemente è indicativo dell'importanza della ricerca del monaco Agostiniano. Che i suoi risultati non siano stati riconosciuti e che le sue leggi siano state riscoperte da De Vries, Correns, Tschermak e von Seysenegg ben un ventennio più tardi è indicatore di quanto fosse avanzata la sua ricerca, che ha per la prima volta unito biologia e analisi dei dati raccolti, il primo esempio di interdisciplinarietà e importanza dell'analisi matematico-statistica in biologia.

Nel settore zootecnico diversi caratteri sono controllati da singoli geni e segregano in modo mendeliano. Il database OMIA (Online Mendelian Inheritance in Animals) ne elenca 292, due terzi dei quali controllati da varianti geniche note (Tabella 1). Una frazione di quanto noto nell'uomo e riportato nell'omologo database OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), che contiene più di 7000 fenotipi e 4000 varianti causative note. Per entrambe le specie più del 90% dei record si riferisce a varianti deleterie, che se presenti allo stato omozigote, o occasionalmente allo stato eterozigote, sono causa di alterazioni più o meno gravi. Nei bovini i fenotipi alterati riguardano principalmente la fertilità, il metabolismo, la morfologia ed il sistema immunitario.

Tabella 1 - Statistiche del database OMIA consultato il giorno 12/10/2022

	dog	cattle	cat	pig	sheep	horse	chicken	rabbit	goat	Other	TOTAL
TOTAL TRAITS/DISORDERS	847	619	397	344	294	255	235	116	101	908	4216
Mendelian trait/disorder	390	292	133	129	117	61	135	73	23	330	1750
Mendelian trait/disorder; likely causal variant(s) known	329	199	101	61	53	48	56	13	17	178	1072
Likely causal variants	480	263	168	69	86	105	71	15	30	147	1453
Potential models for human traits	546	315	261	194	127	146	82	68	49	522	2357

Sempre in questa specie, il rimanente 10% include varianti dei geni che codificano per le proteine del latte (caseine e sieroproteine), per il colore del mantello, per i gruppi sanguigni, per la muscolosità, la presenza/assenza di corna e per la termotolleranza. Mi soffermerò su questi ultimi tre aspetti perché di interesse per il miglioramento genetico in termini di aumento della sostenibilità delle produzioni e impatto sul benessere animale. Invito il lettore interessato a visitare il sito http://www.lgscr.it/ per esaminare tutti i test genetici offerti e spesso effettuati sulle razze bovine allevate nel nostro paese.

LA DOPPIA COSCIA

Torniamo al primo dei caratteri mendeliani da discutere, la muscolosità. Diverse varianti nel gene *GDF-8*, che codifica per la proteina miostatina hanno come effetto l'aumento della muscolosità degli animali, in particolare nella parte posteriore della groppa. Questo effetto, inizialmente scoperto nel topo (McFerron *et al.*, 1997), si è poi rivelato il responsabile di un fenotipo analogo nei bovini (Marin *et al.*, 1997). Il fenotipo causato dalla mutazione è noto come "doppia coscia", "doppia groppa" o "ipertrofia muscolare". In realtà l'incremento della muscolosità è causato da un'iperplasia dei muscoli, cioè ad un aumentato numero di cellule muscolari. Oggi sappiamo che la mutazione ha influenza anche su metabolismo glucidico e lipidico, sulla produzione di bile (Wu *et al.*, 2022) e, almeno nel topo, sulla funzionalità dei mitocondri (Gu *et al.*, 2022).

L'iperplasia è causata dal malfunzionamento della miostatina, appunto codificata dal gene *GDF-8,* che nel bovino mappa sul cromosoma 2 (BTA2). Questa proteina si lega ad un recettore in forma di dimero, e porta alla formazione di un complesso che interagisce con il DNA e attiva una serie di geni che in ultima analisi reprimono la divisione delle cellule muscolari durante l'ultima fase della gravidanza. Il dominio fondamentale per la dimerizzazione è ricco di cisteine responsabili dell'interazione dei due monomeri di proteina che si legano al recettore (Bongiorni *et al.*, 2016).

Diverse mutazioni che troncano la proteina in questo dominio sono state catturate dall'uomo nel corso della storia evolutiva dei bovini europei e sono oggi presenti in diverse razze da carne. Il fenotipo risultante è tanto più estremo quanto più la mutazione riduce il numero di cisteine, e quindi altera la capacità della proteina di formare dimeri.

Le mutazioni mostrano una dominanza parziale, gli eterozigoti mostrano un fenotipo iperplasico ma non al livello degli omozigoti. È ipotizzabile ciò sia dovuto al fatto che la proteina agisce come dimero. Animali eterozigoti producono sia la forma corretta che quella alterata di miostatina e solo un quarto dei possibili dimeri, quello formato da due forme corrette, funziona normalmente, mentre gli altri hanno efficacia ridotta.

La razza che sicuramente esprime il fenotipo in modo più estremo è la Blu Belga (Fig. 1), spesso usata per fecondare bovine da latte non destinate alla rimonta o in incrocio con altre razze da carne. In questa razza la mutazione è fissata, cioè tutti gli animali sono omozigoti per la mutazione. Il fenotipo estremo mette a rischio le bovine di Blu Belga durante il parto che quasi sempre è cesareo. Per questo motivo in condizioni naturali questa mutazione sarebbe scomparsa velocemente a causa degli effetti negativi sulla fitness dei portatori.

Figura 1 - Tori di razza Blu Belga a sinistra e Piemontese a destra[1]

La mutazione è anche presente in due razze italiane, nella Piemontese, nota appunto come Piemontese della Coscia, e nella Marchigiana. I riproduttori maschi Piemontesi hanno la mutazione allo stato omozigote, mentre le femmine sono omozigoti per l'allele selvatico, cioè non mutato, e sono selezionate per la facilità di parto. Ciò, insieme al fatto che i vitelli sono eterozigoti per la mutazione e che la mutazione posseduta dalla Piemontese non cancella completamente la serie di cisteine, limita l'aumento di muscolosità alla parte posteriore degli animali e riduce moltissimo la necessità di parti cesarei nella razza.

[1] (Fonti: www.chiacchierini.it/tori-da-carne/toro-da-carne-razza-bianca-blu-belga/ www.sigilloitaliano.it/i-prodotti/il-fassone-di-razza-piemontese/la-razza-piemontese/)

Nella Marchigiana la mutazione è stata scoperta grazie a una collaborazione tra l'associazione allevatori delle razze bianche italiane (ANABIC) e l'Università della Tuscia (Marchitelli *et al.*, 2003). La mutazione Marchigiana causa un fenotipo ancor meno estremo di quello della Piemontese ed è ancora poco diffusa nella razza. L'associazione deve infatti contemporaneamente aumentarne la frequenza ed evitare un'eccesiva consanguineità, quest'ultima associata ad anomalie genetiche ed ipofertilità.

Gli animali "ipertrofici" hanno caratteristiche favorevoli, carne più magra, maggior resa al macello e trasformano in modo più efficiente gli alimenti in muscolo. Sono quindi più efficienti, una caratteristica che aumenta la sostenibilità del loro allevamento. D'altra parte, l'efficienza contrasta con la necessità di cure veterinarie e con il loro benessere che nei casi più estremi, come quello della Blu Belga, può dare adito a parti distocici.

L'ASSENZA DI CORNA

Il secondo carattere mendeliano di interesse per la selezione è l'assenza/presenza di corna. L'assenza di corna è un carattere desiderabile, sia per la sicurezza degli operatori, sia degli stessi animali, che durante l'instaurarsi delle relazioni gerarchiche, tipiche delle specie che vivono in gruppo, possono ferirsi. Inoltre, l'assenza "genetica" delle corna eviterebbe la pratica della decornazione dei vitelli, con vantaggi per il benessere animale. Il fenotipo assenza è dominante sulla presenza, cioè animali eterozigoti per la mutazione sono acorni come quelli omozigoti, mentre gli animali con le corna sono omozigoti per l'allele selvatico (Fig. 2).

La mutazione è definita "polled", dall'inglese ed è presente in diverse razze, tra cui: Holstein, Jersey, Limousine, Charolaise, Blond d'Aquitaine e Aberdeen Angus. Quest'ultima è fissata e selezionata per la mutazione acorne, i riproduttori non vengono abilitati alla monta se presentano corna. Mutazioni in loci diversi provocano l'assenza delle corna, alcune di queste provocano o sono associate a difetti genetici, per cui non possono essere selezionate a favore ed introdotte nei programmi di breeding (Gehrke *et al.*, 2020). Le mutazioni presenti sul cromosoma 1 non hanno effetti secondari indesiderati (Stuckey et al., 1996) e possono essere sfruttate nei programmi di selezione.

Figura 2 - Tori di razza Hereford con corna a sinistra e senza corna perché portatori della mutazione "polled Celtica" sul cromosoma 1[1]

Due sono gli alleli dominanti per l'assenza di corna più diffusi, uno definito "Celtico" (PC) per la sua origine scandinava e britannica, il secondo "Frisone" (PF) perché identificato nei bovini di razza Frisona. PC è originato da un complesso di inserzioni e delezioni del

[1] Fonti: www.afs.ca.uky.edu/livestock/beef/breeds/Hereford, www.britannica.com/animal/Hereford-breed-of-cattle

DNA (Allais-Bonet *et al.*, 1013), PF è determinato da una duplicazione in tandem di 80 nucleotidi (Rothammer *et al.,* 2014). Le mutazioni non sono in porzioni del genoma dove risiedono geni codificanti. È stato ipotizzato che influenzino l'espressione di RNA non codificanti importanti per la formazione dei primi abbozzi delle corna durante lo sviluppo embrionale (Simon *et al.*, 2022), in realtà i meccanismi che collegano le mutazioni al fenotipo acorne non sono ancora stati ben compresi.

Anche in questo caso nelle razze in cui la mutazione è rara, è necessario che i programmi di accoppiamento per aumentarne la frequenza siano ben progettati, per evitare un eccesso di consanguineità e mantenere la biodiversità necessaria per il miglioramento di altri caratteri oggetto di selezione.

LA MUTAZIONE "SLICK"

Il terzo fenotipo mendeliano che vorrei discutere è apparentemente poco importante ma sostanzialmente interessantissimo per la futura sostenibilità, oserei dire, dell'intero settore zootecnico. Il fenotipo è denominato "slick", letteralmente "liscio", per la presenza di un mantello a pelo cortissimo e appunto liscio (Fig. 3).

La mutazione è dominante e induce uno stop prematuro nella coda citoplasmatica del gene *PRLR* che codifica per il recettore dell'ormone prolattina (Littlejohn *et al.*, 2014). Oltre al mantello "liscio" la mutazione sembra sia responsabile di altri cambiamenti fisiologici, come una maggiore capacità di sudorazione (Dikmen et al., 2014), che rendono gli animali "lisci" più tolleranti alle alte temperature rispetto a quelli omozigoti per l'allele selvatico.

La mutazione è stata inizialmente scoperta in due razze sudamericane, di origine spagnola, Senepol e Carora (Olson *et al.*, 2003), un esempio paradigmatico dell'utilità di conservare razze locali adatte ad ambienti difficili, anche se non molto produttive.

Utilizzando incroci ricorrenti, la mutazione è stata trasferita con successo nella razza Holstein, cioè la Frisona americana, cosmopolita, e ha dimostrato di indurre termotolleranza anche in questo background genetico. Durante l'estate della Florida, calda e umida, le bovine Holstein in lattazione portatrici della mutazione hanno mantenuto una temperatura vaginale inferiore di 0,6°C rispetto alle bovine non mutate (Carmickle *et al.*, 2022). Questo dato è interessante perché il caldo estivo è causa di stress per le bovine ad alta produzione e determina una netta perdita di produttività a causa di una minore ingestione (Bernabucci *et al.*, 2014). La perdita è evidente soprattutto quando lo stress da caldo coincide con il periodo del periparto, periodo durante il quale la produzione di latte cresce rapidamente e non è accompagnata da un analogo aumento di capacità di ingestione. In conseguenza di questo fatto le bovine vanno incontro ad un bilancio energetico negativo e devono mobilizzare le riserve corporee per far fronte alle richieste energetiche necessarie per mantenere la produzione di latte. Al contrario delle bovine "wild type", le bovine "slick" hanno mostrato la stessa capacità produttiva indipendentemente dalla stagione di parto (inverno o estate; Dikmen et al., 2014). Il mantenimento della produzione estiva è stato osservato sia in ambienti caldo-umidi, quali quelli della Florida, che caldo-secchi, come in California (Carmickle *et al.*, 2022).

Recentemente sono state scoperte nuove varianti nel gene del recettore della prolattina in altre razze, sempre dei Caraibi (Flores *et al.*, 2021). Tutte inducono codoni di stop prematuro e di conseguenza proteine tronche, e tutte sono associate a tolleranza a stress da alte temperature.

UTILIZZO DI CARATTERI MENDELIANI NEI PROGRAMMI DI SELEZIONE

Come fare ad integrare questi geni nei programmi di selezione? Abbiamo a disposizione fondamentalmente due strategie: la prima è quella dell'uso su larga scala di riproduttori

portatori delle mutazioni nell'ambito di un programma di miglioramento genetico, mentre la seconda è il ricorso all'editing del genoma.

Figura 3. Confronto tra un bovino portatore della mutazione slick (a sinistra) e un bovino omozigote per l'allele selvatico (a destra)[1]

Nel primo caso è necessario che le associazioni di razza interessate definiscano un programma combinato di miglioramento all'interno del quale inserire tori che possiedano i geni di interesse, aumentandone la frequenza, mantenendo un buon livello genetico dei portatori e facendo attenzione a conservare la biodiversità della razza.

Nel secondo si tratterebbe, invece, di effettuare una modificazione genetica inserendo la mutazione nel genoma degli animali attraverso "gene editing" (Doudna e Charpentier, 2014). In questo caso la mutazione potrebbe essere inserita in modo "chirurgico" anche in razze che non la possiedono. Un confronto tra i due approcci ha mostrato come velocità e costi siano minori con l'applicazione del gene editing, rispetto all'approccio tradizionale (Mueller *et al.*, 2021).

Tutte le mutazioni prima descritte sono state oggetto di gene editing. Diverse specie sono state "editate" al fine di disattivare il gene della miostatina: bovini (Proudfoot *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2017; Gim *et al.*, 2022a) ovini Proudfoot *et al.*, 2015), capre (Kalds *et al.*, 2022) suini (Proudfoot *et al.*, 2015; Wang et al., 2015) e conigli (Zheng *et al.*, 2022). Gli interventi di editing hanno ottenuto i risultati desiderati e nei bovini è stata dimostrata la trasmissibilità dell'intervento di editing della miostatina alla generazione successiva. (Gim *et al.*, 2022b).

[1] Fonte: www.researchgate.net/figure/Slick-coat-type-Photographs-contrasting-slick-and-nonslick-Senepol-crossbreeds-The_fig4_269698991

L'editing della mutazione polled ha invece avuto esiti diversi, almeno fino ad ora. Alcuni interventi hanno avuto successo, dimostrando la trasmissione della mutazione introdotta e del fenotipo acorne (Young et a., 2021), altri hanno introdotto il fenotipo, ma i nati non sono sopravvissuti (Schuster *et al.*, 2021), altri ancora hanno confermato la presenza della mutazione introdotta ma non hanno dato origine al fenotipo (Hennig *et al.*, 2022). La complessità delle varianti esistenti e la mancanza di conoscenza dei complessi meccanismi molecolari che determinano l'insorgenza e lo sviluppo degli abbozzi delle corna a livello embrionale non hanno per ora permesso di ottenere risultati consistenti.

Anche la mutazione slick è stata oggetto di editing. È stato prodotto un modello murino (Liu *et al.*, 2022) che si pensa permetterà di studiare in maggior dettaglio i meccanismi fisiologici che determinano la tolleranza al caldo osservata nei bovini, sebbene dal punto di vista biologico le due specie siano profondamente diverse. Nei bovini l'editing del gene *PRLR* è in corso, anche se i risultati non sono ancora pubblicati (Tad Sonstegard – Accelligen-Recombinetics, comunicazione personale 2022). L'intervento è previsto nell'ambito di un progetto dedicato al miglioramento della zootecnica africana finanziato dalla fondazione Bill e Melinda Gates. Nello stesso progetto sono programmati interventi di editing anche per migliorare la produzione di latte e la resistenza alla tubercolosi.

Nell'Unione Europea questa strada non risulta ancora perseguibile, mentre sarebbe una via da adottare per poter inserire varianti favorevoli con rapidità e direttamente in animali di alto valore genetico. Da questo punto di vista varianti associate all'adattamento ai cambiamenti climatici, come la mutazione slick, e alla resistenza alle malattie sarebbero prioritarie. I rischi associati a questa tecnologia sono minimi considerato che le modificazioni sono di una o pochi nucleotidi e che sono già avvenute durante la storia evolutiva della specie. Inoltre, i risultati dell'editing sono facilmente controllabili attraverso sequenziamento, che permette di identificare la presenza di eventuali variazioni "off target" e stimarne gli effetti (Zhou *et al.*, 2019). Mentre l'Europa riflette, diversi altri Paesi hanno adottato la tecnologia e la stanno usando per accelerare il miglioramento genetico in diverse specie, animali e vegetali.

REFERENZE

Allais-Bonnet A., Grohs C., Medugorac I., Krebs S., Djari A., Graf A., Fritz S., Seichter D., Baur A., Russ I., et al. Novel insights into the bovine polled phenotype and horn ontogenesis in Bovidae. PLoS ONE. 2013;8:e63512.

Bernabucci U, Biffani S, Buggiotti L, Vitali A, Lacetera N, Nardone A. The effects of heat stress in Italian Holstein dairy cattle. J Dairy Sci. 2014;97(1):471-86. doi: 10.3168/jds.2013-6611. Epub 2013 Nov 7. PMID: 24210494.

Bongiorni S, Valentini A, Chillemi G. Structural and Dynamic Characterization of the C313Y Mutation in Myostatin Dimeric Protein, Responsible for the "Double Muscle" Phenotype in Piedmontese Cattle. Front Genet. 2016 Feb 11;7:14. doi: 10.3389/fgene.2016.00014. PMID: 26904102; PMCID: PMC4749705.

Carmickle AT, Larson CC, Hernandez FS, Pereira JMV, Ferreira FC, Haimon MLJ, Jensen LM, Hansen PJ, Denicol AC. Physiological responses of Holstein calves and heifers carrying the SLICK1 allele to heat stress in California and Florida dairy farms. J Dairy Sci. 2022 Nov;105(11):9216-9225. doi: 10.3168/jds.2022-22177. Epub 2022 Sep 14. PMID: 36114060.

Dikmen S, Khan FA, Huson HJ, Sonstegard TS, Moss JI, Dahl GE, Hansen PJ. The SLICK hair locus derived from Senepol cattle confers thermotolerance to intensively managed lactating Holstein cows. J Dairy Sci. 2014 Sep;97(9):5508-20. doi: 10.3168/jds.2014-8087. Epub 2014 Jul 2. PMID: 24996281.

Dikmen, S., E. Alava, E. Pontes, J. M. Fear, B. Y. Dikmen, T. A. Olson, and P. J. Hansen. 2008. Differences in thermoregulatory ability between slick-haired and wild-type lactating Holstein cows in response to acute heat stress. J. Dairy Sci. 91:3395–3402. https: //doi.org/10.3168/jds.2008-1072.

Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science. 2014 Nov 28;346(6213):1258096. doi: 10.1126/science.1258096. PMID: 25430774.

Flórez Murillo, J. M., A. J. Landaeta-Hernández, E. S. Kim, J. R. Bostrom, S. A. Larson, A. M. Pérez O'Brien, M. A. Montero-Urdaneta, J. F. Garcia, and T. S. Sonstegard. 2021. Three novel nonsense mutations of prolactin receptor found in heat-tolerant Bos taurus breeds of the Caribbean Basin. Anim. Genet. 52:132–134. https://doi.org/10.1111/age.13027.

Gehrke, L.J., Upadhyay, M., Heidrich, K. et al. A de novo frameshift mutation in ZEB2 causes polledness, abnormal skull shape, small body stature and subfertility in Fleckvieh cattle. Sci Rep 10, 17032 (2020). https://doi.org/10.1038/s41598-020-73807-5.

Gim GM, Kwon DH, Eom KH, Moon J, Park JH, Lee WW, Jung DJ, Kim DH, Yi JK, Ha JJ, Lim KY, Kim JS, Jang G. Production of MSTN-mutated cattle without exogenous gene integration using CRISPR-Cas9. Biotechnol J. 2022b Jul;17(7):e2100198. doi: 10.1002/biot.202100198. Epub 2021 Jul 22. PMID: 34247443.

Gim GM, Uhm KH, Kwon DH, Kim MJ, Jung DJ, Kim DH, Yi JK, Ha JJ, Yum SY, Son WJ, Lee JH, Park JH, Song KY, Lee WW, Jang G. Germline transmission of MSTN knockout cattle via CRISPR-Cas9. Theriogenology. 2022a Oct 15;192:22-27. doi: 10.1016/j.theriogenology.2022.08.021. Epub 2022 Aug 18. PMID: 36037573.

Grobet L., Martin L.J., Poncelet D., Pirottin D., Brouwers B., Riquet J., Schoeberlein A., Dunner S., Ménissier F., Massabanda J., Fries R., Hanset R., Georges M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. Nat Genet. 1997 Sep;17(1):71-4. doi: 10.1038/ng0997-71. PMID: 9288100.

Gu M, Wei Z, Wang X, Gao Y, Wang D, Liu X, Bai C, Su G, Yang L, Li G. Myostatin Knockout Affects Mitochondrial Function by Inhibiting the AMPK/SIRT1/PGC1α Pathway in Skeletal Muscle. Int J Mol Sci. 2022 Nov 8;23(22):13703. doi: 10.3390/ijms232213703. PMID: 36430183.

Hennig, S.L., Owen, J.R., Lin, J.C. et al. A deletion at the polled PC locus alone is not sufficient to cause a polled phenotype in cattle. Sci Rep 12, 2067 (2022). https://doi.org/10.1038/s41598-022-06118-6.

K. Wang, H. Ouyang, Z. Xie, C. Yao, N. Guo, M. Li, Jiao, H., Pang, D. Efficient generation of myostatin mutations in pigs using the CRISPR/Cas9 system Sci Rep, 5 (2015), Article 16623.

Kalds P, Crispo M, Li C, Tesson L, Anegón I, Chen Y, Wang X, Menchaca A. Generation of Double-Muscled Sheep and Goats by CRISPR /Cas9-Mediated Knockout of the Myostatin Gene. Methods Mol Biol. 2022;2495:295-323. doi: 10.1007/978-1-0716-2301-5_16. PMID: 35696040.

Littlejohn, M. D., K. M. Henty, K. Tiplady, T. Johnson, C. Harland, T. Lopdell, R. G. Sherlock, W. Li, S. D. Lukefahr, B. C. Shanks, D. J. Garrick, R. G. Snell, R. J. Spelman, and S. R. Davis. 2014. Functionally reciprocal mutations of the prolactin signalling path way define hairy and slick cattle. Nat. Commun. 5:5861. https://doi.org/10.1038/ncomms6861.

Liu J, Verma PJ. Generating a Heat-Tolerance Mouse Model. Methods Mol Biol. 2022;2495:259-272. doi: 10.1007/978-1-0716-2301-5_14. PMID: 35696038.

Luo J, Song Z, Yu S, Cui D, Wang B, et al. (2014) Efficient Generation of Myostatin (MSTN) Biallelic Mutations in Cattle Using Zinc Finger Nucleases. PLOS ONE 9(4): e95225. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095225.

Marchitelli C, Savarese MC, Crisà A, Nardone A, Ajmone Marsan P, Valentini A. Double muscling in Marchigiana beef breed is caused by a stop codon in the third exon of myostatin gene. Mamm Genome. 2003 Jun;14(6):392-5. doi: 10.1007/s00335-002-2176-5. PMID: 12879361.

McPherron, A.C.; Lawler, A.M.; Lee, S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. Nature 1997, 387, 83–90.

Mueller ML, Cole JB, Connors NK, Johnston DJ, Randhawa IAS, Van Eenennaam AL. Comparison of Gene Editing Versus Conventional Breeding to Introgress the POLLED Allele Into the Tropically Adapted Australian Beef Cattle Population. Front Genet. 2021 Feb 11;12:593154. doi: 10.3389/fgene.2021.593154. PMID: 33643378; PMCID: PMC7905321.

Olson TA, Lucena C, Chase CC Jr, Hammond AC. Evidence of a major gene influencing hair length and heat tolerance in Bos taurus cattle. J Anim Sci. 2003 Jan;81(1):80-90. doi: 10.2527/2003.81180x. PMID: 12597376.

Proudfoot, C., Carlson, D.F., Huddart, R. et al. Genome edited sheep and cattle. Transgenic Res 24, 147–153 (2015). https://doi.org/10.1007/s11248-014-9832-x.

Rothammer S., Capitan A., Mullaart E., Seichter D., Russ I., Medugorac I. The 80-kb DNA duplication on BTA1 is the only remaining candidate mutation for the polled phenotype of Friesian origin. Genet. Sel. Evol. 2014;46:44. doi: 10.1186/1297-9686-46-44.

Schuster, F., Aldag, P., Frenzel, A. et al. CRISPR/Cas12a mediated knock-in of the Polled Celtic variant to produce a polled genotype in dairy cattle. Sci Rep 10, 13570 (2020). https://doi.org/10.1038/s41598-020-70531-y.

Simon R, Drögemüller C, Lühken G. The Complex and Diverse Genetic Architecture of the Absence of Horns (Polledness) in Domestic Ruminants, including Goats and Sheep. Genes (Basel). 2022 May 6;13(5):832. doi: 10.3390/genes13050832. PMID: 35627216; PMCID: PMC9140736.

Stookey J.M., Goonewardene L.A. A comparison of production traits and welfare implications between horned and polled beef bulls. Can. J. Anim. Sci. 1996;76:1–5. doi: 10.4141/cjas96-001.

Wu D, Gu M, Wei Z, Bai C, Su G, Liu X, Zhao Y, Yang L, Li G. Myostatin Knockout Regulates Bile Acid Metabolism by Promoting Bile Acid Synthesis in Cattle. Animals (Basel). 2022 Jan 15;12(2):205. doi: 10.3390/ani12020205. PMID: 35049827; PMCID: PMC8772948.

Young, A.E., Mansour, T.A., McNabb, B.R. et al. Genomic and phenotypic analyses of six offspring of a genome-edited hornless bull. Nat Biotechnol 38, 225–232 (2020). https://doi.org/10.1038/s41587-019-0266-0.

Zheng Y, Zhang Y, Wu L, Riaz H, Li Z, Shi D, Rehman SU, Liu Q, Cui K. Generation of Heritable Prominent Double Muscle Buttock Rabbits via Novel Site Editing of Myostatin Gene Using CRISPR/Cas9 System. Front Vet Sci. 2022 May 20;9:842074. doi: 10.3389/fvets.2022.842074. PMID: 35669173; PMCID: PMC9165342.h

Zhou S, Cai B, He C, Wang Y, Ding Q, Liu J, Liu Y, Ding Y, Zhao X, Li G, Li C, Yu H, Kou Q, Niu W, Petersen B, Sonstegard T, Ma B, Chen Y, Wang X. Programmable Base Editing of the Sheep Genome Revealed No Genome-Wide Off-Target Mutations. Front Genet. 2019 Mar 15;10:215. doi: 10.3389/fgene.2019.00215. PMID: 30930940; PMCID: PMC6428697.

GENOME EDITING, TRADIZIONE E INNOVAZIONE IN AGRICOLTURA

Giulio Vicentini[1], *Vittoria Brambilla*[2] *e Fabio Fornara*[3]
Università degli Studi di Milano

Riassunto

Le recenti innovazioni nel campo del genome editing sono state rapidamente utilizzate nelle piante, soprattutto quelle di interesse agrario. La possibilità di utilizzare enzimi programmabili per fare mutagenesi diretta, rapida e specifica, apre possibilità enormi al miglioramento genetico e molte applicazioni del metodo sono già state convertite in prodotti, pronti per raggiungere il mercato di alcuni paesi. Tuttavia, l'avanzamento rapidissimo dei metodi scientifici richiede che i governi di tutto il mondo siano altrettanto rapidi nell'implementare normative adeguate, che tengano conto del progresso scientifico, difendendo allo stesso tempo la competitività dei propri comparti agricoli. L'atteggiamento recente dell'Europa nei confronti dell'innovazione in agricoltura è però restrittivo, e mette sotto pressione l'intero sistema agricolo.

Abstract

Genome editing: tradition and innovation in agriculture

Recent innovations in the field of genome editing have been rapidly adopted by plant scientists, especially those working on agriculturally-relevant species. The use of programmable nucleases to rapidly and precisely introduce mutations in genes of interest opens enormous possibilities for genetic improvement, and many applications of the method have already been converted into products, ready to reach the market of some countries. However, the very rapid advancement of scientific methods requires governments around the world to be equally fast in implementing appropriate regulations. They should take scientific advancements into account while defending the competitiveness of their agricultural sectors. Europe's recent attitude towards innovation in agriculture is restrictive and puts the entire agricultural system under pressure.

INTRODUZIONE

La nascita dell'agricoltura viene comunemente collocata a 10-13000 anni fa. Avvenne ad opera di cacciatori-raccoglitori che in varie parti del mondo e in una lunga fase di transizione dal nomadismo alla vita stanziale, hanno imparato ad utilizzare le piante

[1] Dottorando
[2] Ricercatrice di Botanica Generale
[3] Professore ordinario di Botanica Generale

presenti in una specifica regione del globo, modificandole secondo le proprie necessità ed iniziandone la coltivazione consapevole. Quelle modifiche hanno comportato l'aumento della produttività delle piante, garantendo il soddisfacimento dei bisogni nutrizionali di una popolazione in crescita, lo sviluppo tecnologico (l'invenzione di strumenti agricoli, i calendari, la gestione dell'acqua, ecc.) e soprattutto la nascita di grandi civiltà.

La domesticazione ha interessato migliaia di specie (non solo vegetali), alcune di queste ormai domesticate totalmente, ossia non più in grado di riprodursi autonomamente senza l'intervento umano (Meyer and Purugganan, 2013).

Con essa è iniziato un lungo processo, non ancora terminato, di modifica genetica delle piante. La selezione di caratteri fenotipici favorevoli è avvenuta su base fenotipica, più o meno volontaria, da parte di proto-agricoltori ed ha causato l'aumento della frequenza di varianti geniche specifiche nel genoma delle piante coltivate. Nel corso dei secoli, la pratica agricola ha plasmato i caratteri delle piante, modificandone la taglia, il numero e la dimensione dei frutti, il contenuto in sostanze tossiche, ecc. Molte delle piante oggi coltivate sono così diverse dalle specie ancestrali da cui sono derivate che a volte è stato difficile capire quale fosse l'ancestrale selvatico e ricostruirne la storia evolutiva (Doebley et al., 2006).

Da allora l'uomo-agricoltore non si è più fermato. Ha continuato un incessante lavoro di modificazione genetica delle piante, una forma di evoluzione artificiale accelerata che ha portato tutte le piante agrarie a manifestare l'ampissimo potenziale fenotipico che era "mascherato" all'interno del genoma della specie selvatica. Con la domesticazione l'uomo non ha prodotto variabilità genetica ma l'ha sfruttata, prima semplicemente selezionandola e poi, attraverso l'incrocio fra specie sessualmente compatibili, ha iniziato a "rimescolarla" creando combinazioni alleliche nuove, utili e inesistenti in natura.

Le tecniche di biologia molecolare consentono oggi di sequenziare ed esplorare i genomi degli esseri viventi e di identificare nella lunghissima serie di nucleotidi che li compongono, le sequenze che sono responsabili dei caratteri manifestati dalle piante coltivate. Decenni di ricerche hanno evidenziato che molta della variabilità genetica che distingue varietà diverse è dovuta a minuscoli cambiamenti nel genoma che chiamiamo mutazioni. Spesso tratti agronomi di interesse e fondamentali per mantenere in coltura una pianta (ad es. la mancata perdita dei frutti a maturazione o la crescita determinata) sono dovuti a mutazioni che interessano un unico nucleotide. Il cambiamento di un'unica lettera, fra le centinaia di milioni che compongono il genoma di una specie, può essere sufficiente a generare drastici cambiamenti nella forma e funzione dell'organismo (Li et al., 2006).

Questi cambiamenti possono manifestarsi occasionalmente a causa di mutazioni spontanee che occorrono con una frequenza molto bassa. Se la modifica nel DNA non è neutra e induce il cambiamento di una qualche caratteristica ritenuta utile, essa può essere selezionata e mantenuta nella progenie dell'individuo mutato. Questo processo è molto lento e incerto e ha richiesto migliaia di anni per produrre effetti apprezzabili sulle piante di interesse agrario. È stato notevolmente accelerato facendo ricorso a mutageni, chimici o fisici: trattamenti in grado di indurre modifiche o danni a carico del DNA e quindi ereditabili. Trattamenti con mutageni come l'etilmetansulfonato (EMS) o la nitrosometiluera (NMU) causano mutazioni puntiformi, interessano cioè un singolo nucleotide nel DNA. Il trattamento con questi composti genera piante con numerose mutazioni (nell'ordine delle molte centinaia) per ogni individuo. Il metodo è efficiente perché in una generazione vengono introdotte milioni di mutazioni in una popolazione di piante, molte delle quali in grado di migliorare alcuni caratteri fenotipici. La mutagenesi fisica fa invece ricorso a isotopi radioattivi per modificare il DNA. Questo trattamento induce cambiamenti di portata più ampia, inclusi riarrangiamenti di ampie porzioni di DNA. Poiché questi sistemi inducono mutazioni casuali nel genoma, molte possono essere dannose per la pianta ma non è possibile controllare a priori l'esito del trattamento.

Nonostante questi inconvenienti, la mutagenesi chimica e fisica è uno strumento comune di miglioramento genetico. L'International Atomic Energy Agency (IAEA) e la FAO collaborano a programmi di miglioramento genetico basato sull'utilizzo dell'energia atomica per creare e sfruttare mutazioni. Il risultato di questi sforzi è una collezione di più di 3200 varietà modificate geneticamente (https://mvd.iaea.org/) e introdotte nei programmi di miglioramento di molti paesi, soprattutto in via di sviluppo. L'uso della mutagenesi chimica è inoltre comune in molti laboratori di ricerca di tutto il mondo.

L'avvento delle tecnologie di genome editing ha consentito di superare la limitazione principale delle tecniche di mutagenesi, ossia l'imprevedibilità della natura e posizione delle mutazioni. Ora è possibile decidere dove inserire la mutazione con precisione, evitando di introdurne centinaia casuali in tutto il genoma.

GENERALITÀ SULL'EDITING DEL GENOMA

Le tecnologie di genome editing comprendono un vasto insieme di strumenti molecolari che consentono la modifica di una regione del DNA in modo mirato e preciso. La modifica viene innescata dal taglio della doppia elica, chiamato *double strand break* (DSB). La precisione del metodo risiede nel fatto che il taglio è mediato da nucleasi sito-specifiche, ossia enzimi di restrizione in grado di essere programmati dall'operatore per riconoscere una specifica sequenza lungo la doppia elica. La cellula interessata dalla digestione del proprio DNA attiva delle vie di riparazione che possono essere distinte in due categorie definite *Non Homologous End Joining* (NHEJ) e *Homology-Directed Repair* (HDR) (fig.1).

Il NHEJ sfrutta la chiusura delle estremità libere del DNA fra loro per effettuare la riparazione ed è un sistema più soggetto ad errori, che si manifestano con l'inserzione o delezione di uno o pochi nucleotidi a cavallo della sequenza tagliata. Si parla in questo caso di *indels* (inserzioni/delezioni) che possono essere considerate mutazioni qualora avvengano all'interno di una regione codificante di un gene. L'*indel* modificando la lettura della sequenza codificante, altera la formazione della proteina corrispondente o ne modifica alcuni aminoacidi importanti, compromettendone la funzione. Contrariamente al NHEJ, il sistema di riparazione HDR è più accurato. Infatti, esso utilizza del DNA come stampo per la riparazione, normalmente derivante dal cromosoma omologo o dal cromatidio fratello duplicato durante il ciclo cellulare. Questo genere di riparazione non introduce errori. Tuttavia, se DNA esogeno con un sufficiente livello di omologia con le sequenze che fiancheggiano il DSB viene fornito alla cellula assieme alla nucleasi sito-specifica, esso potrebbe essere usato come stampo per la riparazione e ricombinare al sito di DSB. Qualsiasi sequenza di DNA potrebbe essere introdotta al sito di taglio, se le estremità hanno sufficiente omologia di sequenza da indurre HDR. Questo meccanismo ha aperto la possibilità di modificare a piacimento il locus di interesse, eventualmente introducendo anche sequenze di natura transgenica. La ricombinazione omologa nelle piante avviene con bassa frequenza, ma è aumentata quando il DNA è danneggiato da DSB (Puchta et al., 1993). Pertanto, sebbene il meccanismo di NHEJ sia preferenziale per la riparazione del taglio mediato da nucleasi, la letteratura si sta rapidamente arricchendo di esempi di ricombinazione omologa per la modifica di caratteri di interesse nelle piante (Steinert et al., 2016). Al contrario delle modifiche mediate da NHEJ, in cui è definita con precisione la posizione dell'*indel* ma non la sua sequenza finale, l'HDR rappresenta vero *genome editing*, in cui la modifica genomica è totalmente prevedibile.

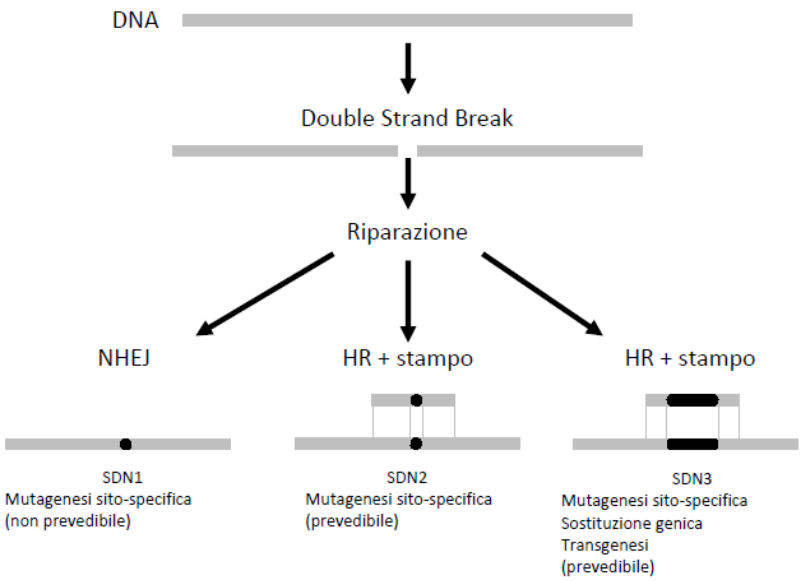


Figura 1 – Vie di riparazione del DNA

LE NUCLEASI SITO-SPECIFICHE

Esistono quattro classi di nucleasi sito-specifiche che sono state utilizzate in varie applicazioni di editing del genoma (fig. 2). Le meganucleasi, note anche come *Homing Endonucleases* (HE) sono un gruppo di enzimi diffusi fra i batteri e gli Archea, ma si trovano anche negli organelli (cloroplasti e mitocondri) degli eucarioti. Riconoscono sequenze di DNA che vanno dalle 14 alle 40 paia di basi, rendendole molto specifiche per la sequenza target (Hafez and Hausner, 2012). Tuttavia, il loro utilizzo applicativo è limitato dal fatto che la funzione di riconoscimento e di taglio del DNA è mediata da un unico dominio della proteina. Pertanto, modificare la specificità di sequenza dell'enzima senza intaccare l'attività nucleasica è molto complesso.

Al contrario delle HE, le *zinc-finger nucleases* (ZFN) sono enzimi di restrizione sintetici. Queste proteine sono formate da un dominio con attività endonucleasica, derivato dall'enzima di restrizione FokI, fuso a domini zinc-finger che sono in grado di riconoscere e legare specifiche sequenze di DNA (Kim et al., 1996). Ogni dominio ZF è in grado di riconoscere una sequenza di tre nucleotidi, e concatenando domini ZF diversi fra loro è possibile costruire artificialmente una proteina in grado di riconoscere sequenze multiple di 3. Ad esempio, una proteina ZFN formata da 4 domini zinc-finger legati a loro volta a FokI è in grado di riconoscere una sequenza di 12 nucleotidi e tagliarla. Tuttavia, FokI taglia la doppia elica del DNA solo se accoppiato a un'altra molecola di FokI, assemblando un omodimero. La costruzione dell'endonucleasi sito-specifica è pertanto complicata dal fatto che per ogni sito del genoma che si intende tagliare, è necessario costruire due ZFN a ridosso dello stesso sito e distanziate in modo tale da avvicinare due molecole di FokI a sufficienza perché possano agire contemporaneamente sulla sequenza (fig. 2). Nonostante queste difficoltà tecniche, le ZFN sono state utilizzate con successo nell'editing delle piante per produrre mais con ridotti livelli di fitati nei semi, attraverso modifica di un gene di biosintesi, oppure piante resistenti agli erbicidi imidazolinoni attraverso modifica del sito attivo dell'acetolattato sintasi (Shukla et al., 2009).

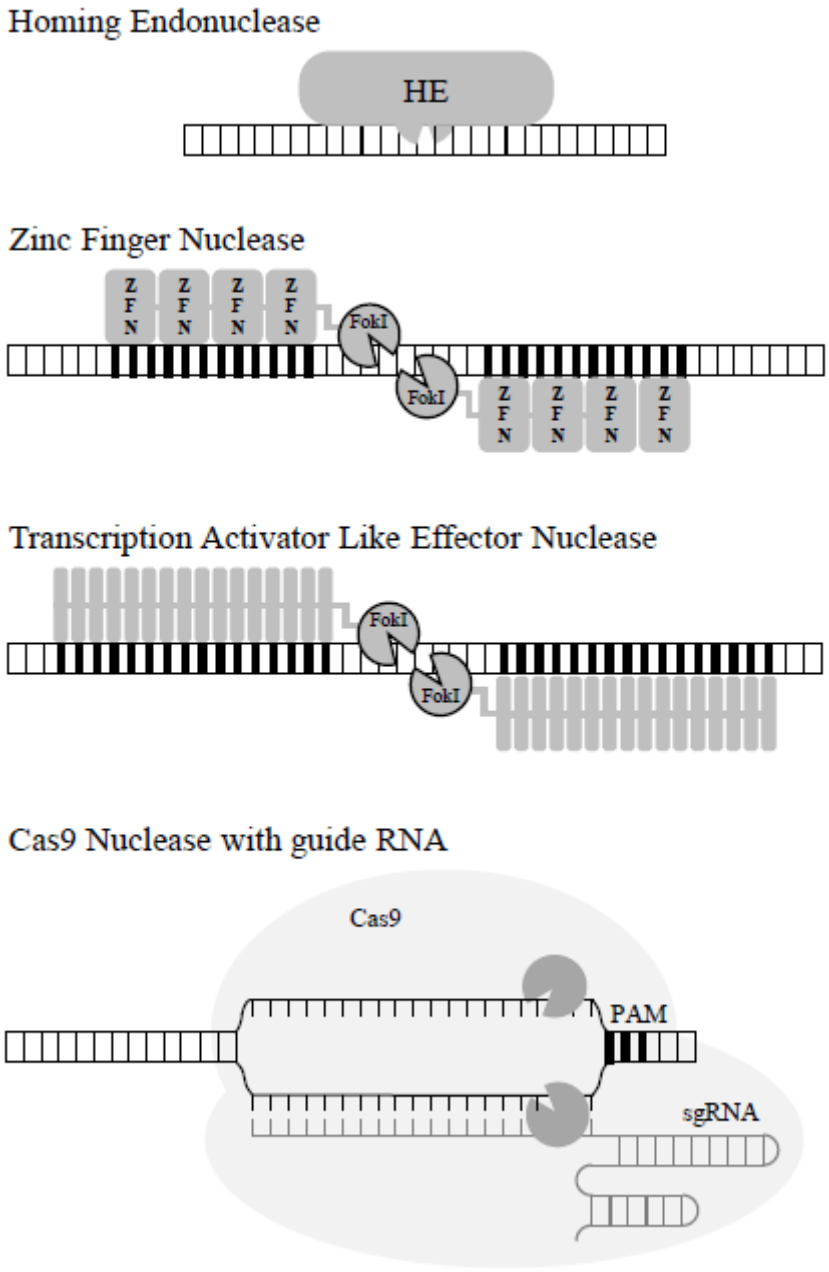


Figura 2 – Tipologie di endonucleasi sito-specifica

La terza classe di enzimi di restrizione programmabili è costituita dai *Transcription Activator Like Effector Nucleases* (*TALEN*). Si tratta di enzimi sintetici formati da domini di legame al DNA chiamati TALE che vengono uniti, come nel caso precedente, al dominio di restrizione del DNA di FokI. I domini TALE sono tutti identici fra loro, tranne due aminoacidi variabili nella sequenza e che servono a contattare uno specifico nucleotide. Si crea quindi una sorta di codice TALE-DNA, in cui uno specifico dominio è in grado di riconoscere un nucleotide (Boch et al., 2009; Moscou and Bogdanove, 2009). Unendo domini TALE diversi è quindi possibile produrre una proteina sintetica in grado di riconoscere una specifica sequenza sul DNA. Come nel caso precedente, FokI deve dimerizzare per tagliare completamente la doppia elica, quindi per riconoscere una sequenza e causare DSB, è necessario disegnare due TALEN adiacenti che portino le subunità di FokI in contatto fra loro. La tecnologia TALEN è stata usata in riso, per introdurre mutazioni che conferissero resistenza al patogeno batterico *Xanthomonas*

oryzae o in frumento tenero per conferire resistenza all'oidio (Li et al., 2012; Wang et al., 2014). Quest'ultimo esempio indica come anche il genoma di specie poliploidi possa essere modificato efficientemente e in modo preciso, inserendo mutazioni in molti cromosomi simultaneamente.

IL SISTEMA CRISPR/CAS9

La più recente tra le tecnologie di editing del genoma è emersa solo pochi anni fa, e si tratta del sistema CRISPR/Cas9 (Jinek et al., 2012). Il termine CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) deriva dal nome assegnato ad alcune particolari sequenze batteriche osservate inizialmente in *Escherichia coli* e poi ritrovate in moltissimi altri batteri e archea (Mojica et al., 1993). All'interno delle sequenze CRISPR vi sono segmenti di DNA di derivazione virale o plasmidica, e le stesse sequenze sono spesso adiacenti a geni *Cas* (*CRISPR-associated*), un gruppo di geni che codificano per proteine generalmente in grado di interagire con acidi nucleici. Nel 2007 si dimostrò che i loci *CRISPR/Cas* sono responsabili dell'immunità adattativa contro elementi genetici esterni, e solo pochi anni dopo è stato identificato il meccanismo con cui ciò avviene (Barrangou et al., 2007). Un frammento di DNA esogeno (virale o plasmidico) viene integrato all'interno di un locus *CRISPR*, e viene quindi espresso in un cosiddetto *crRNA*; questo si appaia parzialmente ad un secondo RNA, detto *tracrRNA* e insieme possono quindi interagire con l'enzima Cas9 (Deltcheva et al., 2011). La Cas9 è una endonucleasi in grado di indurre DSB e che agisce guidata dall'RNA. Il sito di taglio è riconosciuto dal *crRNA* stesso, permettendo un'azione di taglio mirata verso il materiale genetico esogeno menzionato inizialmente.

Dopo averne definito la biologia e le caratteristiche funzionali, il sistema CRISPR/Cas9 è stato ingegnerizzato, riunendo le caratteristiche del duplex crRNA:tracrRNA in un'unica molecola di RNA in grado di guidare efficacemente l'azione della Cas9, questo RNA ingegnerizzato prende il nome di sgRNA (*single guide RNA)* (Jinek et al., 2012). Il primo aspetto rilevante del sistema è che il sgRNA può essere disegnato a piacimento dall'operatore in modo da guidare Cas9 verso qualsiasi sito di taglio. L'altra importante novità introdotta con la scoperta di questi meccanismi è che il riconoscimento del sito di taglio da parte delle nucleasi Cas non dipende da domini specifici della proteina (come invece avviene nei sistemi di editing antecedenti a CRISPR) ma dipende da una piccola molecola di RNA con omologia per il DNA bersaglio. Queste caratteristiche hanno reso il sistema CRISPR/Cas9 lo strumento più diffuso per operare editing genomico, data l'elevata specificità e la semplicità di utilizzo, unitamente ai bassi costi necessari per usarlo.

Dai primi esperimenti sui batteri alle prove che il meccanismo è in grado di funzionare anche nelle cellule eucariotiche, il passo è stato breve. Le prime evidenze in tal senso sono arrivate da esperimenti su cellule umane isolate, che hanno anche dimostrato la possibilità di effettuare tagli multipli nel genoma, sfruttando l'espressione di più sgRNA contemporaneamente, e la possibilità di causare sia NHEJ che HDR.

Le applicazioni del sistema CRISPR/Cas9 nelle piante sono già state moltissime e in aumento esponenziale. Fra le applicazioni già validate (alcune delle quali in procinto di essere commercializzate in alcuni paesi) ritroviamo la modifica dei caratteri di resistenza ai patogeni (revisionata da Borrelli et al., 2018), l'incremento delle rese (Park et al., 2014; Miao et al., 2018), la modifica delle caratteristiche nutrizionali (Sánchez-León et al., 2018; Andersson et al., 2017), solo per menzionarne alcune.

Un altro esempio molto illustrativo di applicazione del sistema CRISPR/Cas9 è la ri-domesticazione di alcune specie per ottenere piante che hanno sia i vantaggi delle specie selvatiche sia i vantaggi accumulati durante la domesticazione dalle cultivar oggi coltivate. Le caratteristiche genetiche che sono state selezionate dall'uomo nel corso dei secoli di domesticazione sono note, ma visto che il processo di domesticazione non era pienamente

consapevole, alcuni tratti favorevoli sono stati persi e rimangono soltanto nelle specie ancestrali. La specie *Solanum galapagense* è affine a quella del pomodoro attuale, tuttavia è molto più tollerante a suoli con elevata salinità e all'attacco di parassiti, ma porta piccoli frutti di circa 1 centimetro di diametro. Partendo da questa specie sono state introdotte precise modifiche genetiche simili a quelle già avvenute durante la domesticazione del pomodoro, e in brevissimo tempo sono state ottenute piante più resistenti agli stress, ma molto più simili al pomodoro domesticato (Li et al., 2018). Questo esempio dimostra come lo stesso processo alla base dell'evoluzione artificiale delle specie agrarie può essere replicato in tempi estremamente ridotti, con un approccio che parte dalla profonda conoscenza dei geni responsabili dei caratteri modificati.

ASPETTI LEGISLATIVI SULL'UTILIZZO DELL'EDITING IN AGRICOLTURA

Il progresso scientifico velocissimo che caratterizza le tecnologie di genome editing e del sistema CRISPR/Cas9 in particolare, impone un ripensamento della normativa che regola l'immissione nell'ambiente di piante modificate artificialmente con metodi biotecnologici. Questi aspetti sono normati in Europa dalla Direttiva 2001/18/EC che definisce giuridicamente un organismo geneticamente modificato (OGM) come "un organismo, diverso da un essere umano, in cui il materiale genetico è stato modificato in un modo differente da quanto avviene in natura, con l'accoppiamento e/o la ricombinazione genetica naturale". Ricadono all'interno di questa definizione non solo le piante ottenute attraverso transgenesi, ma anche le piante ottenute per mutagenesi chimica o fisica, essendo queste tecniche differenti da metodi naturali. Tuttavia, l'Art.3 della Direttiva introduce un'esenzione per la mutagenesi classica, poiché era ampiamente utilizzata già decenni prima dell'introduzione della Direttiva stessa e aveva dato origine a centinaia di varietà coltivate. A supporto dell'esenzione si utilizza il concetto di "lunga tradizione di sicurezza" secondo il quale le tecnologie di mutagenesi classica possono essere esentate dall'ambito di applicazione della Direttiva. Questo impianto normativo definisce un OGM, e ne regola il rilascio nell'ambiente, sulla base del metodo attraverso cui ha avuto origine e non sulla base delle caratteristiche del prodotto finale.

La scoperta e l'applicazione dei metodi di mutagenesi sito-specifica mediata da nucleasi ha fatto emergere alcune limitazioni della Direttiva. In particolare, il genome editing può dare origine a mutazioni che sono indistinguibili da quelle prodotte con metodi classici chimico-fisici o da quelle spontanee artificialmente selezionate dall'uomo. Il prodotto finale della mutagenesi può essere identico nei tre casi, ma il metodo che ha originato questi prodotti è diverso. Questo aspetto ha generato incertezze nell'interpretazione della Direttiva, poiché i metodi di mutagenesi biologica mediati da nucleasi sono di fatto tecniche di mutagenesi e generano prodotti identici a quelli ottenuti da mutagenesi fisico-chimica la cui esenzione è dettagliatamente normata.

Sull'interpretazione dell'esenzione relativa alla mutagenesi si è recentemente espressa la Corte di Giustizia Europea, in risposta a una causa (C-528/16) intentata da un gruppo di associazioni contadine francesi. Le specifiche questioni pregiudiziali sono riassunte di seguito:

1. Se gli organismi ottenuti attraverso qualsiasi tecnologia di mutagenesi (anche successiva al 2001) devono considerarsi OGM. E di conseguenza se tutti gli organismi mutagenizzati (anche con tecniche sito-specifiche) devono considerarsi esentati dall'applicazione della Direttiva 2001/18/EC o solo gli organismi ottenuti con metodi tradizionali di mutagenesi classica.
2. Se le varietà ottenute per mutagenesi sono varietà geneticamente modificate anche ai fini dell'iscrizione nei cataloghi varietali (disciplinata dalla Direttiva 2002/53).

3. Se gli Stati Membri hanno discrezionalità nel definire il regime applicabile agli organismi ottenuti tramite mutagenesi.
4. Se la validità della Direttiva 2001/18/EC in relazione agli OGM ottenuti tramite mutagenesi può essere messa in discussione rispetto al principio di precauzione, considerando la rapida evoluzione dei metodi di modifica genetica.

La Corte ha emesso la propria sentenza il 25 Luglio 2018, specificando che

1. Gli organismi ottenuti mediante tecniche o metodi di mutagenesi costituiscono OGM e sono esclusi dall'ambito di applicazione della Direttiva solo gli organismi ottenuti con tecniche o metodi utilizzati convenzionalmente in varie applicazioni con una lunga tradizione di sicurezza.
2. Sono esentate dagli obblighi previsti le varietà geneticamente modificate ottenute con metodi di mutagenesi utilizzati convenzionalmente in varie applicazioni con una lunga tradizione di sicurezza.
3. Gli Stati Membri hanno discrezionalità nel definire il regime applicabile agli organismi ottenuti tramite mutagenesi, nel rispetto del Diritto dell'Unione.
4. Non occorre rispondere per via delle disposizioni di cui al punto 1: il principio di precauzione non si applica perché gli organismi ottenuti mediante tecniche di mutagenesi che non sono stati utilizzati convenzionalmente in varie applicazioni con una lunga tradizione di sicurezza, sono assoggettati agli obblighi previsti dalla 2001/18/EC.

POSSIBILI SCENARI FUTURI E CONSIDERAZIONI FINALI

Sebbene la sentenza non rappresenti un'iniziativa legislativa, che è di competenza della Commissione europea, essa definisce con chiarezza l'ambito di applicazione della Direttiva 2001/18/EC, includendo gli organismi ottenuti tramite metodi di mutagenesi biologica fra gli OGM, sottoponendoli alle stesse regole restrittive per la libera coltivazione. Il paradosso è ora evidente: due varietà, di cui una portante una mutazione ottenuta con metodi classici chimico-fisici e una portante un'identica mutazione ma ottenuta tramite genome editing, saranno regolamentate in modo completamente diverso. La prima sarà liberamente utilizzabile in programmi di miglioramento e commerciabile, mentre la seconda sarà soggetta a costosissimi controlli, nell'ordine delle centinaia di milioni di euro, e di fatto non utilizzabile (Mcdougall, 2011). Soprattutto in Italia, dove il recepimento della Direttiva 2015/412/EC consente di vietare la coltivazione di OGM facendo riferimento a motivazioni non scientifiche.

Questo confuso contesto normativo apre scenari potenzialmente disastrosi per l'agricoltura italiana o europea. Gli Stati Membri saranno penalizzati nei confronti dei Paesi dove l'innovazione biotecnologica portata dall'editing potrà essere liberamente utilizzata tramite normative meno restrittive e costose. La nostra agricoltura dovrà competere con metodi e varietà obsolete. I costi elevati per i controlli delle piante OGM precludono l'accesso a queste tecnologie da parte di piccole e medie imprese, che soprattutto in Italia, potrebbero trarre grossi vantaggi economici. Le Università e gli istituti di ricerca pubblici, che stanno acquisendo con rapidità le tecnologie di genome editing, saranno penalizzate, non potendo offrire strumenti concreti al comparto agricolo, pur avendone le competenze. In questo modo, saranno limitate le collaborazioni fra pubblico e privato che potrebbero fornire nuovo impulso al comparto.

Infine, il tema più importante che dovrà essere normato, ma che al momento rimane irrisolvibile, è legato alla tracciabilità delle nuove varietà ottenute tramite mutagenesi sito-specifica. Le modifiche genetiche che queste originano sono indistinguibili da quelle ottenute tramite mutagenesi classica. Varietà ottenute tramite editing potrebbero essere

prodotte ma non dichiarate come tali e sicuramente potranno essere importate, almeno per l'alimentazione animale che già dipende totalmente da prodotti GM.

Per uscire da questo stato di confusione legislativa sarebbe sufficiente passare da una normativa che regola il metodo ad una che regola il prodotto, come avviene già in altri stati come ad esempio il Canada. In alternativa, potrebbero essere introdotti diversi gradi di scrutinio dove il peso della normativa potrebbe essere calibrato sulla base degli effetti della tecnologia sul genoma finale. Ad esempio, nel caso in cui una mutazione sia indotta da una nucleasi sito-specifica espressa in modo transiente nella cellula ma non stabilmente integrata nel genoma, il livello di attenzione potrebbe essere basso, poiché il prodotto non avrebbe natura transgenica e non sarebbe diverso da quello ottenuto direttamente tramite mutagenesi classica. Altri casi potrebbero includere le mutazioni ottenute tramite integrazione stabile nel genoma della nucleasi, seguite da segregazione della stessa nelle generazioni successive. Il prodotto sarebbe transgenico, ma solo per una generazione e il prodotto finale comunque sarebbe identico alla sua controparte ottenuta per mutagenesi chimica.

In generale, una valutazione caso per caso sarebbe logica e soprattutto sarebbe auspicabile che questa avvenisse sulla base di informazioni scientificamente provate e verificabili.

Negli ultimi anni, la Commissione Europea ha richiesto studi di approfondimento da parte di esperti e promosso consultazioni pubbliche. Il più recente documento denominato "Study on the status of new genomic techniques under Union law and in light of the Court of Justice ruling in Case C-528/16" pubblicato il 29 aprile 2021[1] cita il *genome editing* e le new breeding techniques come fondamentali per il raggiungimento degli obiettivi del Green Deal e della Farm to Fork Strategy.

La più recente consultazione pubblica[2], di cui sono usciti i risultati a settembre 2022 riporta che il 79% degli intervistati sono favorevoli ad una modifica della normativa in modo che i prodotti delle new breeding techniques (includendo *genome editing* e cisgenesi) non siano regolamentati come gli OGM. Riguardo alla valutazione del rischio il 61% degli intervistati sostiene che l'analisi del rischio nei prodotti delle NBTs deve essere differente rispetto agli OGM.

Nel secondo trimestre del 2023 la Commissione dovrebbe adottare una risoluzione e che aggiorni la situazione normativa.

BIBLIOGRAFIA

Andersson M., Turesson H., Nicolia A., Fält A.-S., Samuelsson M., And Hofvander P., (2017): Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (Solanum tuberosum) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. «Plant cell reports», 36, pp.117–128.

Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., And Horvath P., (2007): CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. «Science», 315, pp.1709–1712.

Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A., And Bonas U., (2009): Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. «Science», 326, pp.1509–1512.

Borrelli V.M.G., Brambilla V., Rogowsky P., Marocco A., And Lanubile A., (2018): The Enhancement of Plant Disease Resistance Using CRISPR/Cas9 Technology. «Frontiers in plant science», 9, pp.1245.

[1] https://ec.europa.eu/transparency/documents-register/detail?ref=SWD(2021)92&lang=en

[2] (https://ec.europa.eu/info/law/better-regulation/have-your-say/initiatives/13119-Legislazione-per-le-piante-prodotte-con-alcune-nuove-tecniche-genomiche_it)

Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., And Charpentier E., (2011): CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. «Nature», 471, pp.602–7.

Doebley J.F., Gaut B.S., And Smith B.D., (2006): The Molecular Genetics of Crop Domestication. «Cell», 127, pp.1309–1321.

Hafez M., And Hausner G., (2012): Homing endonucleases: DNA scissors on a mission. «Genome», 55, pp.553–569.

Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., And Charpentier E., (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. «Science (New York, N.Y.)», 337, pp.816–21.

Kim Y.G., Cha J., And Chandrasegaran S., (1996): Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. «Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America», 93, pp.1156–60.

Li C., Zhou A., And Sang T., (2006): Rice Domestication by Reducing Shattering. «Science», 311, pp.1936–1939.

Li T., Liu B., Spalding M.H., Weeks D.P., And Yang B., (2012): High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. «Nature Biotechnology», 30, pp.390–392.

Li T., Yang X., Yu Y., Si X., Zhai X., Zhang H., Dong W., Gao C., And Xu C., (2018): Domestication of wild tomato is accelerated by genome editing. «Nature Biotechnology».

Mcdougall P., (2011): The cost and time involved in the discovery, development and authorisation of a new plant biotechnology derived trait.

Meyer R.S., And Purugganan M.D., (2013): Evolution of crop species: genetics of domestication and diversification. «Nature Reviews Genetics», 14, pp.840–852.

Miao C., Xiao L., Hua K., Zou C., Zhao Y., Bressan R.A., And Zhu J.-K., (2018): Mutations in a subfamily of abscisic acid receptor genes promote rice growth and productivity. «Proceedings of the National Academy of Sciences», 115, pp.6058–6063.

Mojica F.J., Juez G., And Rodríguez-Valera F., (1993): Transcription at different salinities of Haloferax mediterranei sequences adjacent to partially modified PstI sites. «Molecular microbiology», 9, pp.613–21.

Moscou M.J., And Bogdanove A.J., (2009): A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. «Science», 326, pp.1501–1501.

Park S.J., Jiang K., Tal L., Yichie Y., Gar O., Zamir D., Eshed Y., And Lippman Z.B., (2014): Optimization of crop productivity in tomato using induced mutations in the florigen pathway. «Nature genetics», 46, pp.1337–42.

Puchta H., Dujon B., And Hohn B., (1993): Homologous recombination in plant cells is enhanced by in vivo induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. «Nucleic acids research», 21, pp.5034–40.

Sánchez-León S., Gil-Humanes J., Ozuna C. V., Giménez M.J., Sousa C., Voytas D.F., And Barro F., (2018): Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. «Plant Biotechnology Journal», 16, pp.902–910.

Shukla V.K., Et Al., (2009): Precise genome modification in the crop species Zea mays using zinc-finger nucleases. «Nature», 459, pp.437–41.

Steinert J., Schiml S., And Puchta H., (2016): Homology-based double-strand break-induced genome engineering in plants. «Plant Cell Reports», 35, pp.1429–1438.

Wang Y., Cheng X., Shan Q., Zhang Y., Liu J., Gao C., And Qiu J.-L., (2014): Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. «Nature biotechnology», 32, pp.947–51.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Silvio Salvi[1]
Società Italiana di Genetica Agraria

Quanto riportato e discusso in questa giornata rappresenta un *excursus* incredibile nel mondo Mendeliano, dagli albori dello stesso Mendelismo fino alle ultimissime applicazioni della genetica molecolare, e ne ha evidenziato l'interconnessione con la disciplina della genetica agraria e più in generale con l'agricoltura. Vorrei aggiungere alcune osservazioni e poi tentare una sintesi della giornata.

La prima osservazione, che fa anche un po' da *trait d'union* tra le relazioni è come, tramite l'agricoltura e l'allevamento, l'umanità stia da molto tempo utilizzando variazioni genetiche di tipo Mendeliano, ovvero mutazioni genetiche. Le prime erano di tipo spontaneo, ovvero avvenute a causa della naturale 'imprecisione' del processo della duplicazione della sequenza nucleotidica del DNA; successivamente si sono aggiunte quelle indotte, ovvero prodotte da mutagenesi sperimentale che l'uomo ha gradualmente imparato a controllare. Per esempio, l'identificazione di piante di cereali e legumi che portano mutazioni spontanee che bloccano la dispersione dei semi ha accompagnato e verosimilmente consentito la nascita dell'agricoltura, delle prime organizzazioni di vita di tipo stanziale e quindi l'inizio della civiltà moderna. L'utilizzo delle mutazioni è ovviamente continuato e accelerato con l'avvento della genetica come disciplina scientifica e con lo sviluppo del miglioramento genetico. Non avremmo oggi molte delle diverse forme di crucifere coltivare, pomodori che crescono e producono all'infinito, adatti per le serre più automatizzate, e pomodori con fioritura e maturazione concentrate in un breve lasso di tempo, per la coltivazione di precisione a pieno campo, non avremmo colori, forme eduli di frutti privi di molecole velenose, e molto altro. A partire dal 1920, a fianco dei geni Mendeliani identificati tramite l'identificazione di mutazioni spontanee, viene introdotta la mutagenesi indotta sperimentalmente o artificiale. La mutagenesi artificiale nasce nei laboratori di Thomas Morgan, uno dei padri della genetica moderna, al quale per l'importanza dei suoi studi è stata dedicata l'unità di misura della distanza sui

[1] Professore Ordinario di Genetica Agraria - Alma Mater Studiorum, Università di Bologna

geni sui cromosomi. Fu uno dei suoi studenti di dottorato, Hermann Muller, il primo ricercatore ad utilizzare radiazioni X per indurre mutazioni in drosofila, l'organismo modello utilizzato nei loro laboratori. Dopo questi primi esperimenti, i raggi X furono adottati velocemente dalla comunità scientifica ed applicati sulle piante da Lewis Stadler. I risultati di Stadler, e l'introduzione di altri strumenti di mutagenesi artificiale (altri tipi di radiazioni, e mutagenesi chimica) servirono come base per estendere le applicazioni al miglioramento genetico. Le mutazioni prodotte artificialmente rivaleggiano oggi con quelle identificate spontaneamente per importanza nel miglioramento genetico, sebbene l'indagine della variazione genetica spontanea, ovvero della diversità genetica entro specie, rimanga un campo di grande potenziale. Infatti, un settore di grande interesse è quella della dissezione delle basi Mendeliane, ovvero dei geni, che controllano la variabilità genetica di tipo continuo o quantitativo, detta analisi QTL (Quantitative Trait Loci).

Cosa condividono le mutazioni spontanee e quelle indotte? Condividono il fatto di essere casuali dal punto di vista di quale posizione della doppia elica del DNA sia interessata dalla modifica, e di quale modifica sia avvenuta. In altre parole, qualunque genetista che si occupi di mutazioni spontanee o di mutazioni indotte ha a che fare con eventi rarissimi, che non si sa dove capitino e di che natura siano. Il lavoro richiesto dal ricercatore a valle, per l'identificazione e la caratterizzazione di tali eventi è in genere piuttosto gravoso. La stessa gravosità si ripercuote e si amplifica quando la mutagenesi è utilizzata nel miglioramento genetico.

Cos'è successo però nel 2012? Come illustrato in alcune relazioni di questa giornata, con l'introduzione delle tecniche di Editing genomico basato sulle componenti CRISPR-CAS, si è resa disponibile una tecnologia che consente di indurre mutazioni in punti precisi della doppia elica con grande affidabilità. Ulteriori sviluppi della stessa tecnologia, come il Base editing ed il Prime editing, stanno rapidamente consentendo il controllo completo della modifica della sequenza del DNA, e non solo della posizione. In altre parole, il mondo delle mutazioni Mendeliane si sta liberando dalla casualità. La transizione è di tipo epocale e lo dimostra il fatto che il premio Nobel alle due pioniere del settore, Emmanuelle Carpentier e Jennifer Doudna, sia stato aggiudicato nel 2020, a pochi anni dalla scoperta.

Un'altra considerazione che possiamo fare oggi, con piacere, è come noi genetisti guardiamo un mutante (ovvero una pianta o un animale che porti una mutazione con un effetto sul fenotipo) senza considerarlo una mostruosità. È un punto di vista molto diverso da quello, ritengo, del cittadino medio. La ragionevolezza di tale punto di vista è suffragata dall'esperienza empirica. Per esempio, abbiamo ascoltato in diverse relazioni come molte mutazioni, tra cui quelle già citate legate alla domesticazione dei cereali e dei legumi, siano dannose per le piante che le portano nell'ambiente naturale ma siano positive nel contesto coltivato. Tuttavia, il mutante, il diverso, è invece associato facilmente a qualcosa di pericoloso, o quantomeno di difettoso, di disturbante. Ciò può essere vero, ma mai in maniera inequivocabile. Fortunatamente la genetica ci aiuta ad affrontare e demolire questo concetto. Trovo questo particolarmente affascinante ed utile per la nostra società. Recentemente leggendo una biografia su Ligabue, il pittore naif della bassa Reggiana, sono incappato nell'episodio in cui Ligabue era intervistato da Indro Montanelli, il famoso giornalista ormai scomparso. Intervistando Ligabue, Montanelli raccontava il proprio imbarazzo, la propria difficoltà, e rifletteva: "non sono più sicuro chi sia il matto dei due". Noi genetisti lo sappiamo: sappiamo guardare ed apprezzare "il diverso".

La terza considerazione è relativa all'importanza della conoscenza della storia della genetica come disciplina che si evolve, e colgo con piacere il riferimento, in una delle relazioni, a Carlo Jucci, uno dei fondatori della Società Italiana di Genetica Agraria. Avere la comprensione che esista una storia nelle discipline scientifiche, e che esiste una

evoluzione continua delle sue applicazioni, nel nostro caso nei settori dell'agricoltura e nell'industria, vuol dire comprendere quanto siano importanti per creare ricchezza e prosperità e contribuire positivamente alle trasformazioni della società umana. È curioso e ovviamente triste osservare tuttavia che, in Europa ed in Italia, questo cammino stia progredendo a fatica, impedito da una normativa generata da una ingiustificata paura verso gli studi e le applicazioni della genetica agraria moderna.

RICORDI E TESTIMONIANZE

Angelo Bianchi, Carlo Lorenzoni, Ercole Ottaviano e Michele Stanca

ANGELO BIANCHI (1926 – 2020)

di Francesco Salamini

Se verrà scritta una storia della Genetica Agraria Italiana, i contenuti dell'autobiografia di Bianchi (*Genetica Agraria, missione di vita*; Edizioni Informatore Agrario) sono essenziali: lo scritto contiene la descrizione della vita dell'autore ma anche una grande quantità di informazioni sullo sviluppo della Genetica vegetale in Italia. Già da questo libretto emerge la figura di Bianchi: un mendeliano, caratterizzabile con l'aggettivo "puro". Questo perché nel suo percorso scientifico si è sempre rivolto ai caratteri a variabilità discontinua: lo studio dei mutanti e dei sistemi di mutanti delle piante agrarie. Fu scienziato severo nel pubblicare: in italiano solo sulla politica di ricerca agraria; in inglese quasi tutti i dati dei suoi esperimenti.

LE DATE SIGNIFICATIVE DELLA SUA VITA PROFESSIONALE

Nato nel **1926** a Mezzanino nell'Oltrepò pavese. **1943**: diploma di maestro. **1944**: consegue la maturità scientifica e si iscrive all'Università. **1948**: laurea in Scienze naturali. **1951**: laurea in Scienze biologiche. Allievo di Carlo Jucci. **1954**: libero docente in Genetica. **1954-1956**: borsista (Nat. Acad. Science) ad Harward con Paul Mangelsdorf. **1957**: chiamato come ricercatore ad Edmonton, Canada. Non accetta. **1958**: è a Brookheven (borsa Nat. Acad. Science). Vi incontra B. Mc Clintock. **1961**: alla Purdue University da Oliver Nelson. Genetica del polline. **1951-1980**: insegnante di Genetica all'Università di Piacenza. **1964-1996**: direttore di diversi Istituti del Ministero Agricoltura. È stato tra i fondatori, Segretario e Presidente della Società Italiana di Genetica Agraria, SIGA.

LO SCIENZIATO

Trasmettere con uno scritto l'essenza scientifica e deontologica di una persona è impegnativo. Nel nostro caso si è facilitati dall'attingere a quanto lo stesso Bianchi ha scritto; ho, tuttavia, considerato anche i miei numerosi ricordi: sono stato suo assistente volontario a Piacenza, borsista e poi sperimentatore a Bologna nell'Istituto da lui diretto; sperimentatore a Montanaso lombardo con Bianchi direttore (dell'Istituto di Salerno), sperimentatore e poi direttore di Sezione presso l'Istituto di Cerealicoltura, ancora diretto da Bianchi. Scrive, relativamente alla Genetica agraria, «*Mi sento sedotto dalla Genetica*» (cita Paul Erdöss che «*soccombeva alla seduzione di ogni bel problema che gli si prospettava*»)". "*Una disciplina biologica non è moderna se non è genetizzata*". «*Nel miglioramento genetico pratico la componente di genetica agraria è indispensabile*» (specifica l'etimo di *Potenza* da *Pontem facere,* per definire il ruolo della genetica nel miglioramento genetico).

Il suo modo di essere genetista si rifaceva direttamente agli esperimenti di Mendel (aveva, tra l'altro, per primo tradotto in italiano il testo di Mendel *"Versuche über Pflanzen-Hybriden. Gastl's Buchdruckerei, Brünn, 1866"*). Il mendelismo si è basato sulla raccolta di mutanti per uno o più caratteri e sul controllo di allelismo e delle segregazioni; sarà completato dalla mappatura sui cromosomi dei fattori genetici responsabili di fenotipi alternativi, dopo la scoperta che il linkage tra fattori ereditari interferiva con la seconda legge di Mendel. Bianchi era un accanito mendelista: un uomo delle segregazioni, dei test di allelismo, delle descrizioni fenotipiche, dell'uso della mutagenesi per utilizzare i mutanti indotti o per comprendere aspetti di genetica. La mia prima pubblicazione (Bianchi, A., F. Salamini. 1963. *Detection of linkage in maize by means of balanced lethal systems*. Maydica 8: 52-58), è un esempio: il contributo considerava la possibilità di mappare fattori genetici ospitati dallo stesso cromosoma ma distanti, in termini di ricombinazione, di più di 50 centimorgan.

La sua visione che descriveva la genetica di una specie, anche applicata, come influenzata dalla conoscenza dei sistemi di mutanti, non ebbe molti seguaci. Questo perché negli anni Sessanta-novanta del secolo scorso il miglioramento genetico aveva la sua base teorica nell'eredità dei caratteri a variabilità continua. Questa visione considerava i mutanti mendeliani, frequentemente letali o paraletali, quasi come presenze negative per le loro interferenze con i responsabili della variazione, allora creduti essere rappresentati da un numero elevatissimo di determinanti ereditari. La sopravvenuta centralità scientifica del mutante ha, oggi, rivalutato il contributo di Bianchi. Il mutante in biologia ha un ruolo pivotale nel clonaggio genico e per le assegnazioni di funzione ai geni studiati; per quanto riguarda la variabilità continua, con la scoperta ed uso applicativo dei QTL essa è confluita nel mendelismo diventando così discontinua.

Bianchi ha smesso relativamente presto di disegnare esperimenti e pubblicarli. Questo perché mirò a genetizzare la scienza agronomica italiana, assumendo responsabilità direttive negli Istituti tutelati dal Ministero dell'agricoltura, impegno che lo assorbiva quasi totalmente. In questa nuova funzione sviluppò l'attenzione alla scelta di collaboratori di sicura fede genetica e si dedicò, lui genetista teorico, all'applicazione della genetica alla costituzione varietale. La sua attitudine alla lettura di pubblicazioni scientifiche continuò puntigliosamente: per esempio, sapeva tutto quanto ai suoi tempi si conosceva del DNA e del suo ruolo.

UN ESPERIMENTO DI BIANCHI

Tra i materiali genetici che Bianchi si era portato dagli Stati Uniti dopo aver concluso i due anni di borsa di studio ad Harvard, oltre a molti mutanti e alle linee con marcatori multipli disponibili per il mais (il *Mangelsdorf Multiple Tester* divenne famigliare ai suoi allievi

perché portava un marcatore genetico per ciascun cromosoma), aveva ottenuto da Barbara Mc Clintock diversi ceppi genetici, tra i quali uno ospitava quattro marcatori sul braccio corto del cromosoma 9: *yellow green 2* (recessivo; plantula giallo-verde), *Colored seed* (seme colorato; dominante al suo allele *c* ma recessivo all'inibitore *I*), *bronze 2* (recessivo; colore bronzeo e non viola dell'endosperma), *waxy* (recessivo; amido composto solo da amilopectina colorabile in rosso con la soluzione iodo-iodurata). I quattro marcatori erano localizzati sul cromosoma nell'ordine qui citato, con *yg2* distale e *wx* prossimale rispetto al centromero. Il polline di una seconda linea che ospitava gli alleli dominanti dei quattro loci veniva trattato con raggi X e utilizzato per impollinare le infiorescenze femminili della prima linea. Venivano poi selezionate plantule F1 giallo-verdi (*yg2*) e, tra queste, quelle *wx* (poche) caratterizzate da granuli di polline colorabili in rosso. L'esperimento voleva isolare piante *wx* (che evidentemente avevano perso l'allele *Wx* per la rottura, indotta dai raggi X, di parte del braccio corto del cromosoma 9) al fine di studiare la frequenza di reversione dell'allele *wx* a *Wx* in condizioni diploidi o emizigoti, questo determinando la frequenza di granuli di polline colorati in nero in piante doppio recessive *wx wx* e in piante wx emizigoti. Avevo collaborato marginalmente alla cura delle piante F1 e alla loro selezione. L'esperimento fu completato e pubblicato a Milano dove Bianchi era associato all'Istituto del Prof. Barigozzi. Il Professore mi ringraziò e siccome una spiga *wx* emizigote aveva prodotto alcune cariossidi con evidenti variegazioni del colore derivanti da cicli cromosomici "rottura-ponte-fusione" (erano in gioco gli alleli dei due fattori genetici *C* e *Bz2*), questa spiga mi fu assegnata. Nella generazione successiva le piante derivate avevano antere variegate: era stato indotto l'allele mutabile *bz2 m1* (così battezzato da Mc Clintock alla quale avevo spedito i semi per ottenere lumi). Incrociate con opportuni ceppi genetici, le piante dimostrarono attività riferibili all'azione dei trasposoni *Ac* e *Spm*, entrambi al tempo studiati da Mc Clintock. La pubblicazione - del 1970 - che descriveva i risultati è stata largamente citata: senza volerlo si era confermata la possibilità sperimentale di attivare trasposoni (in quegli anni gli esperimenti di Mc Clintock erano ancora accettati con riserve) (Bianchi, A., F. Salamini, R. Parlavecchio, 1970. *On the origin of regulatory elements in maize*. Atti Ass. Genet. Ital. 15: 335-344).

IL RAPPORTO CON GLI ALLIEVI E IL SUO ESSERE UN ESEMPIO

Bianchi ha sempre scelto collaboratori dotati di capacità intellettuali tali da garantire un loro futuro successo professionale. Sapeva di questa sua importante dote; scrive «*ho raramente sbagliato nel giudicare le persone*». Credeva anche che il successo nella professione implichi un legame emotivo con il proprio lavoro. Per questa ragione sosteneva che "*La vostra professione nella vita non è essere genetisti; la genetica è la vostra vita*", e che «*Mentre si possono fare scarpe comuni e scarpe capolavori, la ricerca mediocre serve a poco (nel caso delle scarpe comuni, invece, esse servono a tutti*»). Aveva prodotto un testo di genetica vegetale utilizzabile per preparare il suo esame. Senza dubbio il testo ha stimolato alcuni studenti che seguivano il corso a chiedere di preparare una tesi di laurea in genetica, a riprova che il messaggio trasmesso dal professore era stimolante e convincente. Rimarchevole è stata l'impronta di serietà e ambizione positiva che lasciava nei collaboratori: pur non avendo avuto accesso alla dignità accademica di cattedratico, circa 15 suoi allievi hanno ottenuto una cattedra universitaria (o una posizione assimilabile, come nel mio caso). Non praticava l'*honorary authorshi*p ed aveva fiducia, delegando molto ai collaboratori dei quali accettava suggerimenti tematici e operativi. Per esempio, dall'incontro a Sant'Angelo lodigiano con R. Forlani, attivo in cerealicoltura, gli derivò l'interesse per l'ibridazione interspecifica e intergenerica.

Da giovane ha collezionato insetti, una indicazione della sua tendenza all'analisi poi applicata alla ricerca. Era un uomo buono che si ricordava e citava la raccomandazione

della sua maestra delle elementari: quanto si fa di male è sempre troppo, quanto di bene, sempre poco. Una sintesi di chi era Bianchi è stata proposta da Carlo Soave che gli aveva scritto. Alla fine della lettera citava una terzina di Dante: *Facesti come quei che va di notte / che porta il lume e Sé non giova, / ma dopo Sé fa le persone dotte*.

È stato un accanito lettore di riviste scientifiche e di politica della scienza, ma anche di quotidiani e periodici tecnici. Nell'autobiografia cita Biometrical Soc., Biotechnology, Agronomy J., Economist, Exper. Agriculture, Enciclopedia Treccani, Enciclopedia Agraria, Genetica Agraria, Genetics, Il Sole 24 ore, L'Informatore agrario, Maydica, Monografie Genet, Agr., Nature (12 volte!), Repubblica, Science, Scienza genetica, Sistema Univ., TAG, Zeitsshrift Ver., Terra e Vita, The J. Genet. Breed. Cita anche i suoi maestri: Jucci (22 volte), Mangelsdorf (12), Barigozzi (4). Era ben noto negli Stati Uniti: compare nell'albero delle genealogie scientifiche dei genetisti-cultori del mais preparato da Brown e Wallace (1956. *Corn and its early fathers*. Michigan University Press). A suo modo mi ha voluto bene. Soprattutto, già a 22 anni mi aveva indicato come sarebbe andata a finire la mia vita.

Composizione (di certo incompleta) del gruppo Bianchi (meglio sottogruppo, perché relativo solo alla fine del periodo di direzione di Bianchi alla Cerealicoltura di Roma; il gruppo è stato molto più numeroso): da sinistra, Michele Stanca, Basilio Borghi, Carlo Lorenzoni, Francesco Salamini, Carlo Soave, Tommaso Maggiore.

CARLO LORENZONI (1936 – 2020)

di Adriano Marocco

Commemorare la figura del prof. Carlo Lorenzoni rappresenta per me, che con lui iniziai la ricerca scientifica e l'attività didattica, un elevato onore. Sono intercorsi più di 2 anni dal giorno della sua imprevedibile scomparsa ed oggi possiamo valutare con univocità ed obiettività la sua figura di docente universitario e di ricercatore.

In primo luogo, ricordo le tappe e i momenti della sua carriera universitaria in modo riassuntivo. Iniziò il suo insegnamento a Piacenza nel 1969, dapprima come libero docente, in seguito come professore incaricato e dal 1983 al 2008 come professore ordinario di Genetica agraria. Per breve tempo tenne la cattedra di Genetica agraria all'Università di Udine. Per quasi un trentennio è stato direttore dell'Istituto di Botanica e Genetica vegetale dell'Università Cattolica.

Le origini della sua carriera furono a Piacenza, alla Facoltà di Agraria, all'interno del gruppo del prof. Angelo Bianchi che dal 1954 al 1963 fu docente di Genetica agraria. Bianchi trasmise ad un gruppo di giovani, fra i quali uno dei primi fu Lorenzoni, l'entusiasmo per la genetica agraria e l'esperienza acquisita all'Harvard University sulla mutagenesi, la genetica del polline, le traslocazioni e le applicazioni al breeding.

Vorrei ricordare tra i vari filoni di ricerca seguiti dal prof. Lorenzoni, tre principali che hanno contribuito alla notorietà. Il primo caratterizzò l'attività del gruppo Bianchi e

riguardò vari aspetti genetici e citogenetici del mais. Da ricordare un lavoro pionieristico sulla ricombinazione intracistronica tra mutanti glossy-1 di mais (MGG,108:225, 1970). Elemento caratterizzante l'attività del gruppo di Piacenza è stato lo studio sulla variabilità mendeliana nelle varietà italiane di mais. Il primo rapporto compare nel 1964 sulla rivista, al tempo più nota, Maize Genetics Cooperative News Letter (MGCNL 38: 89). Nel 1975 (MGCNL 49: 91) un contributo particolarmente rilevante riporta la scoperta di un caso di variegazione al locus opaque-2 (o2), un punto di partenza per una lunga strada percorsa insieme a molti collaboratori che ha portato all'identificazione di uno dei primi fattori di trascrizione specifici dell'endosperma di mais che regola l'espressione dei geni zeinici che codificano per le proteine di 22 kDa e della proteina b-32 che inattiva i ribosomi. L'interesse per i mutanti opachi e fluory data dal 1964 e riguardò il maggior valore biologico delle proteine di riserva del seme. Gli effetti sulla produzione dei mutanti opachi e farinosi vengono precisati con esperimenti dedicati (Euphytica,19: 531, 1970; 27: 411, 1978). La caratterizzazione genetica, biochimica e nutrizionale di queste classi di mutanti inizia dal 1964 ed è coperta da numerose pubblicazioni. L'applicazione di queste conoscenze di base inizia dal 1970 con lo svolgimento delle prove in campo mirate allo sviluppo di linee e ibridi o2 (una sperimentazione di rilievo internazionale assieme a quella del CIMMYT e di una privata USA).

Un secondo interesse di ricerca di primaria importanza è stato nel campo del breeding. Il prof. Lorenzoni ha partecipato allo sviluppo specialmente di linee di mais precoci, medie e tardive, molte linee opache. Questa attività è stata condotta in collaborazione con L'Istituto sperimentale per la Cerealicoltura di Bergamo (oggi CREA). Sempre con lo stesso Ente sono state sviluppate molte popolazioni sintetiche di mais: precoci, medio-tardive, opaco-2 e o2 modificate, da secondo raccolto. I materiali costituiti sono in parte descritti in Sementi Elette, 29: 21, 1983 e nelle esaustive rassegne in Maydica 36: 87, 1991 e Maydica 45: 73, 2000. Dal 1976, partecipa ad una novità nel contesto italiano: le prova varietali nazionali basate sul concetto di cooperazione tra istituzioni per produrre dati di valore nazionale utili per la scelta varietale in mais, frumento e orzo.

La grande esperienza nel miglioramento genetico lo avvicinò ad una terza linea di ricerca riguardante le biomasse inizialmente prodotte da mais (34 lavori dal 1976) e nell'ultimo periodo di attività, a quelle derivate dal sorgo: 15 lavori dal 1998 (una pubblicazione sui QTL per il contenuto zuccherino del sorgo è stata la prima a caratterizzare in questo senso i sorghi da zucchero (Maydica 47: 311,2002). Sempre in sorgo si è occupato di resistenza a siccità, stay green, sorgo perenne, conversioni delle biomasse in bioenergie, sviluppo di linee, ibridi e la costituzione di una banca del seme con oltre 700 accessioni.

Fra i molteplici interessi di ricerca, ricordo, ancora, dal 1977 il sodalizio con l'Istituto sperimentale per la cerealicoltura sezione di Fiorenzuola d'Arda per attività di teoria del miglioramento di una autogama con metodi mutuati dalle allogame. Attenzione anche a studi fisiologici e molecolari sulla tolleranza alle alte temperature e allo stress idrico in orzo.

Infine, in campo viticolo, collaborando con L'Istituto sperimentale per la viticoltura di Conegliano Veneto, si è occupato di ereditarietà di caratteri importanti (precocità, apirenia), uso di dati ampelografici per la caratterizzazione varietale, uso di marcatori molecolari per la discriminazione varietale, ricerca di geni indotti durante lo sviluppo e la maturazione della bacca. È stato accademico della Vite e del Vino ma anche riconosciuto estimatore del prodotto finale. È stato Segretario della Società Italiana di Genetica Agraria (SIGA) per 16 anni, dal 1972 al 1987.

Questa, in sintesi, la figura del prof. Lorenzoni come genetista e breeder. Su Lorenzoni uomo il discorso può, ovviamente (come del resto avverrebbe per chiunque altro) essere meno coincidente, può risultare soggettivo. Penso, tuttavia, di avere validi motivi per affermare di essere fra coloro che lo conobbero bene: la mia vicinanza collaborativa

assomma a quasi 30 anni includendo i periodi in cui ne fui studente e quelli di natura professionale di quotidiano ed operoso rapporto. In questo contesto sono significativi alcuni risvolti della sua personalità e che rappresentano per noi altrettanti insegnamenti:

Per primo, ha professato sia l'etica della competenza sia l'etica della responsabilità, ed ha praticato risposte intellettualmente oneste: ha trasmesso certezze, ma anche condiviso i nostri dubbi. Non da ultimo, ha preteso il massimo impegno e come è noto sono i professori più esigenti quelli che, oltre a onorare il loro nome e il loro lavoro, sono negli anni i più ricordati ed amati dagli studenti.

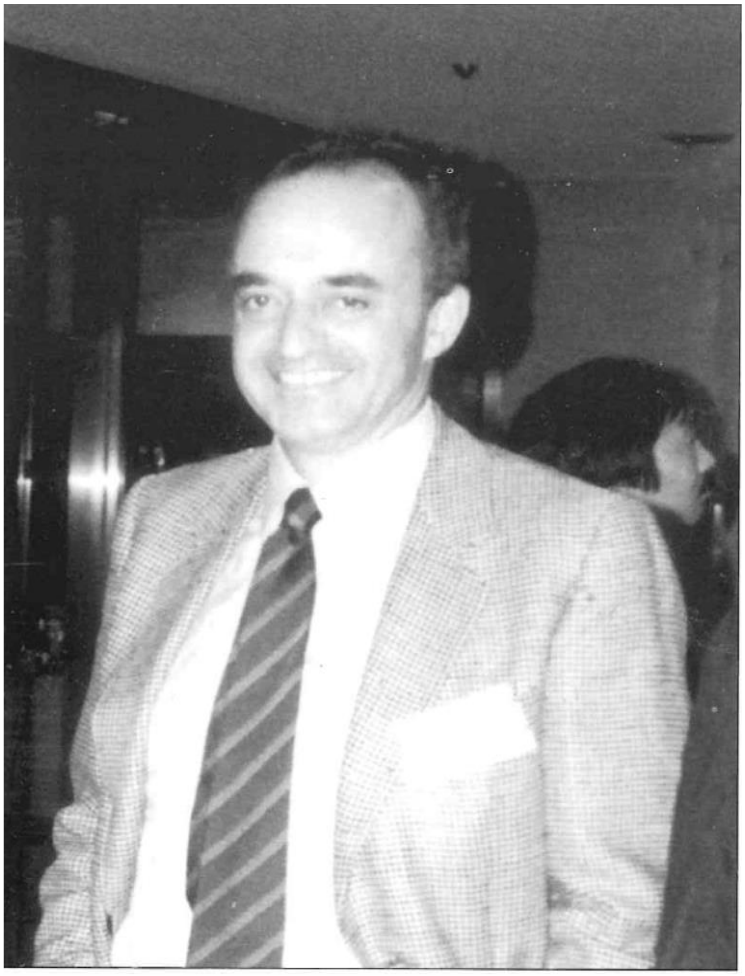
Era disponibile al dialogo. Ha dedicato molto del suo tempo a chi, solo, chiedeva ascolto, attenzione. Il tempo dedicato derivava da una ricca e risolutiva capacità di interrogare e rispondere in vari settori non solo in quello della ricerca. Dunque, era un uomo libero perché, come diceva Platone, il tempo è prerogativa degli uomini liberi e quelli ne hanno sempre a disposizione.

Non desiderava niente di troppo e il suo comportamento ruotava attorno a parole chiave quali misura, limite, temperanza, lontananza dagli estremi, rifiuto degli eccessi, equilibrio. La dottrina del giusto mezzo, insegnata da Orazio con la celeberrima sentenza "Est modus in rebus".

Infine, ai suoi collaboratori ha lasciato percorrere ruoli attivi, autonomi, addirittura antagonistici nella consapevolezza, penso, che ciò che abbiamo ereditato, dobbiamo conquistalo per possederlo, come ci ricorda Goethe. Ma questa libertà non deve impedire a noi il dovere della riconoscenza nei confronti del Prof. Lorenzoni.

ERCOLE OTTAVIANO (1937-1991)[1]

di Mirella Sari-Gorla



This issue is dedicated to Ercole Ottaviano, Professor of Genetics at the University of Milan, who died suddenly on 7 June 1991. He was born at Vasto (Italy) in 1937 and began his studies in Agricultural Sciences at the Bologna University. His subsequent life and career were decisively influenced, at the end of the 1950s, by the start of an important project, supported by Felice Ippolito, Secretary of CNEN (National Committee for Nuclear Energy, currently named ENEA), which provided funds to the Italian Institutes of Genetics for the study of the effects of ionizing radiations. This led to the arrival at the Institute of Genetics of Milan University, directed by Professor Claudio Barigozzi, of Angelo Bianchi, at that time the leading maize geneticist in Italy, coming from Pavia University. In the context of this research project, some fellowships for undergraduate students were created, one of which was awarded to Ercole Ottaviano, who came to Milan to carry out his thesis work on the genetic effects of X-ray in maize under the guidance of Bianchi, and graduated in Agronomy in 1960.

In 1964, during a period of post-graduate study under Kenneth Mather at the University of Birmingham, his interest extended to the field of biometrics and quantitative genetics and, on his return to Milan, he was appointed professor of Statistics in the Faculty of Science, a teaching activity that, after 1975, when he became Full Professor of Genetics, was continued by members of his group: Mirella Sari Gorla and, later, Alessandro Camussi.

[1] Maydica 39 (1994): 79-82

This was the starting-point for the development of a succession of researches of methodological character in the field of quantitative genetics for crop improvement: analysis of genotype-environment interaction, hybrid performance prediction, use of multivariate methods for the genetic analysis of complex traits, estimation of genetic distances. His expertise as a quantitative plant geneticist has been decisive in the planning and realization of the first project specifically devoted to maize improvement in Italy, sponsored by the Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste in the person of Giovanni Marcora, Minister of Agriculture at the end of the seventies, and coordinated by Francesco Salamini, Director of the Experimental Institute of Cereal Crops at Bergamo.

A fruitful scientific collaboration in the field of quantitative genetics developed between Prof. Ottaviano's group and a group of Polish biometrics: in 1972 Tadeusz Calinski, Professor of Mathematical and Statistical Methods at the Academy of Agriculture of Poznan, was invited by Ettore Marubini, Director of the Institute of Biometry and Medical Statistics of Milan University, to give a course on multivariate analysis. During this first meeting Cahnski and Ottaviano established the basis of their collaboration, with the co-operation also of Zygmunt Kaczmarek, of the Institute of Plant Genetics of Polish Academy of Sciences. This collaboration is still in course in the framework of a cooperative program of the CNR and the Polish Academy of Science, and has led to the production of numerous important joint papers, as the one published in Genetics (1985).

Experiences in the field of biometrical genetics were influential in determining the character of Prof. Ottaviano's research group: in those years the use of the statistical methodology for the study of biological problems was uncommon in Italy, in spite of the pioneering work in this field made by Cavalli-Sforza, and, above all, extraneous to the mentality of most of the biologists. The credit for being the first to convey the importance of a rigorous treatment of experimental data and a correct planning of experiments is undoubtedly due to Giulio Maccacaro, who dedicated his attention to the medical fields, while Ottaviano, not without a great personal commitment, achieved a perhaps even greater success in getting these principles accept-ed and applied in the area or biological and agronomical sciences. His group thus came to play an important didactic role in this regard, with the organization of courses for researchers on behalf of the Biometrical Society (Italian Region), of which Ottaviano was a member of the committee and president for the Italian Region, and other scientific societies.

The 1960s saw the institution of the School of Applied Genetics at Milan University, in which Ottaviano played a major part; many Italian researchers now active in plant genetics and breeding in Italy came from that School, as well as young researchers from abroad, Latin America and Albania in particular, who came to the Milan School to complete their training in this field.

In the 1970s Ottaviano began to be interested in the genetics of pollen: expression and molecular analysis of pollen-specific genes, detection of genes expressed in both pollen and plant by isozyme analysis, methods of gametophytic selection and their application for genetic improvement of crops. Since until a few years earlier the pollen of higher plants had been considered genetically silent, these studies led to major changes in this field, suggesting new formulations for population genetic models of higher plants and offering unexpected possibilities for the use of pollen as a particularly powerful tool for genetic manipulation. In this research area Ottaviano produced many important papers, confirmed by the quality of the journals in which they were published, such as Science (1980) and Advances in Genetics (1989). The two works cited above were the result of a scientific collaboration with David Mulcahy, of the University of Massachussets (USA), which began in 1975, when Mulcahy came to the Institute of Genetics of Milan for his Sabbatical year, and soon developed into a lasting friendship. Together with Mulcahy, Ottaviano established the practice of organizing periodical international meetings

dedicated to these research topics, which were attended by increasing numbers of researchers.

Since the first International Symposium organized in 1975 and dedicated to "Gamete competition in Plants and Animals", this plant research area and the number of scientists involved has greatly expanded, as is testified by the frequency of the international meetings on this subject, by the intensive courses organized on the various topics, such as the EEC courses organized in the context of the EEC BRIDGE program by Mauro Cresti at Siena University, and by the publication of international journals specifically dedicated to this field, such as Sexual Plant Reproduction, founded by Linskens in 1989. Its editor-in-chief is currently Joseph Mascarenhas, perhaps the most competent of pollen molecular biologist, to whom Ottaviano sent young researchers of his group to complete their preparation in this field.

More recently, another area of research that received Ottaviano's attention concerned the adaptability of plants to environmental stresses and the use of molecular markers for the analysis of the structure of the genome and for the localization of useful genes. Indeed, crop improvement for yield stability under stress conditions, particularly with regard to the possibility of colonizing marginal lands, has become in recent years a priority breeding target. In addition to the researches on tolerance to high temperature, chemicals and pathogens in maize, the starting point for the studies on sorghum species was the establishment of a collaborative program, still operating, with ICRISAT (International Crop Research Institute for Semi-Arid Tropics) at Patancheru, India, which Ottaviano visited many times.

To these purposes, a powerful tool for the identification and the chromosome localization of single genes, but in particular QTLs (quantitative trait loci), emerged in the eighties; with the idea of utilizing this methodology, based on molecular markers, and of promoting its diffusion among Italian plant geneticists, Ottaviano invited Ben Burr, who had published a fundamental paper on this subject in Genetics (1988), to the XXXII annual Meeting of the Italian Society of Agricultural Genetics (SIGA), of which he was President at that time, to give the opening lecture on gene mapping with recombinant inbreds in maize. After this, Ben Burr generously gave Ottaviano a particularly useful material: a population of recombinant inbred lines, constructed and typed for about 200 molecular markers (RFLP) by the Burr's group. Unfortunately, he had time to carry out only one work on this material, published in Theoretical and Applied Genetics in 1991, but in the following years many good papers based on this material have been published by the members of his group.

The last topic with which Ottaviano concerned himself only a short time before his death was the study of the genetic structure of, and environmental stress effects on forest tree populations, by means of molecular markers. The first phases of the work consisted in solving the technical problems of RFLP typing in this material, and setting up a new class of molecular markers, RAPD, proposed by the Scott Tingey group of Dupont in 1990, with whom later collaboration was developed. Unfortunately, Ottaviano did not live to see the paper on the first linkage map of molecular markers of spruce (*Picea abies*), to be published in Theoretical and Applied Genetics.

Ottaviano's scientific activity gave rise to over 100 papers, some of which have become classics in their particular sector, and to a number of books. He was also a member of the Italian Genetic Association (AGI) and of EUCARPIA, where he was councilor of the "Statistics and Plant Breeding" section.

Last but not least, mention should be made of his passionate dedication to teaching: in all his intense didactic activity (Statistics, General Genetics, Plant Genetics, Breeding Methods) his aim was always to make a proper cultural contribution, providing a wide and up-to-date view of the subject in all its aspects. And he was with his students, in the

lecture hall, when he died, during the final lesson of his course of Genetics, leaving avoid in the lives of all who knew him.

REFERENCES

BINELLI G., G. BUCCI, 1994 A genetic linkage map of *Picea abies* Karst. based on RAPD markers as a tool in population genetics. Theor. Appl. Genet. (In press).

CAMUSSI A., E. OTTAVIANO, T. CALINSKI, Z. KACZMAREK Z., 1985 Genet is distances based on quantitative traits. Genetics 111: 945-962.

OTTAVIANO E., D.L. MULCAHY, 1989 Genetics of angiosperm pollen. Adv. Genet. 26: 1-64.

OTTAVIANO E., M. SARI-GORLA, D.L. MULCAHY, 1980 Pollen tube growth rate in Zea mays Implications for genetic improvement of crops. Science 210: 437-438. OTTAVIANO E., M. SARI-GORLA, M.E. PE, C. FROVA, 1991 Molecular markers (RFLPs and HSPs) for genetic dissection of thermotolerance in maize. Theor. Appl. Genet. 81: 713-719.

MICHELE STANCA (1942 – 2020)

di Luigi Cattivelli

Michele Stanca è stato uno scienziato che ha dedicato la sua vita alla genetica dei cereali. Una persona molto nota in Italia ed all'estero che ha rivestito ruoli di grande prestigio nel mondo della ricerca agraria. Ha lasciato una grande eredità umana e scientifica, ma in particolare vorrei segnalare 5 aspetti che penso possano essere di esempio e di monito per tutti.

L'ATTIVITÀ SCIENTIFICA

Michele Stanca ha dedicato la sua attività al miglioramento genetico dell'orzo, puntando a selezionare varietà produttive, resistenti alle malattie, di elevata qualità e adatte all'ambiente mediterraneo. Michele è stato un pioniere in questo settore in Italia, il suo lavoro ha reso conveniente una coltura che era sempre relegata nelle aree marginali. La prima varietà selezionata da Michele (cv. ARDA, 1985) ha rappresentato un cambio di passo nelle varietà di orzo coltivate in Italia e Arda è diventata immediatamente il nuovo standard produttivo. La sua diffusione raggiunse fino il 30% di tutta la superficie ad orzo in Italia. Ad Arda seguirono molte altre varietà, alcune delle quali di grandissimo successo come NURE (1998) e COMETA (2006) che è ancora oggi tra le 3 varietà più diffuse in Italia.

Michele ha sempre lavorato per un obbiettivo molto concreto come la selezione varietale, se vogliamo vera ricerca applicata, ma aveva ben capito che per raggiungere risultati "pratici" serve la ricerca più avanzata possibile. Michele aveva pertanto promosso gli studi di fisiologia molecolare degli stress, applicato le più moderne biotecnologie sino a lanciarsi nei progetti internazionali di sequenziamento dei genomi. Michele era orgoglioso di aver

costruito un centro di ricerca dove ancora oggi coesistono le ricerche più avanzate con i risultati più applicativi, e (forse) è proprio perché ci sono le ricerche avanzate che poi si raccolgono risultati applicativi capaci di cambiare in meglio l'agricoltura italiana.

LA SCIENZA COME MOTORE DI SVILUPPO DELLA SOCIETÀ

Michele Stanca ha sempre sostenuto la ricerca come motore per il progresso dell'agricoltura italiana. Non il ritorno all'antico, ma l'uso delle conoscenze più moderne per realizzare un'agricoltura sostenibile e capace di coniugare la difesa dell'ambiente con la produzione di cibo per tutti. La scienza è il modo più razionale per gestire le grandi sfide del futuro e le conoscenze scientifiche devono essere messe alla base delle scelte politiche. Memorabili sono state le prese di posizione di Michele Stanca contro la scelta anti OGM dell'Italia, la posizione attendista nel caso Xylella ed in molte altre situazioni dove il parere chiaro della maggior parte dei ricercatori del mondo era offuscato da qualche voce fuori dal coro. La ricerca è un'assicurazione sul futuro di tutti e questo è particolarmente evidente in questi tempi dove l'agricoltura deve affrontare cambiamenti i che impongono di adeguare le piante ed i sistemi produttivi alle nuove condizioni.

NON C'È AGRICOLTURA SENZA GENETICA

Alla base di qualunque forma di agricoltura ci sono degli esseri viventi e quindi la genetica (ovvero la scienza che studia la vita). Michele Stanca ha dimostrato, con il suo lavoro e le sue varietà, che avere la capacità di selezionare nuove varietà e mantenere una competitività internazionale nel campo delle conoscenze genetiche e genomiche delle piante sono un aspetto fondamentale (quello che gli economisti chiamano un asset strategico) dell'agricoltura nazionale. Un paese che rinuncia alle conoscenze necessarie per sviluppare nuove varietà o ibridi lascia le chiavi della propria agricoltura nelle mani di altri.

LA SCIENZA SPIEGATA A TUTTI

Michele Stanca ha fatto della divulgazione scientifica un'arte, ha insegnato a raccontare le cose più difficili a tutti: dai bambini delle elementari sino ai membri del parlamento. La scienza non deve far paura ed i cittadini devono conoscere quello che succede nei laboratori, devono sapere che i ricercatori lavorano per il bene comune e non hanno secondi fini.

LE PERSONE PRIMA DELLA BUROCRAZIA, LA SOSTANZA PRIMA DELLA FORMA

Michele Stanca ha sempre cercato di fare ricerca secondo standard scientifici internazionali, privilegiando le capacità delle persone e i risultati scientifici all'applicazione letterale dei vincoli formali e burocratici. Visto oggi questo messaggio sembra surreale e totalmente fuori dal tempo, l'esperienza attuale infatti è quella di una ricerca imbrigliata da incredibili vincoli burocratici che aumentano i costi e limitano l'efficienza, una situazione che non ha eguali in nessun altro Paese.

Michele Stanca se ne è andato, ma il suo messaggio resta, nella speranza che trovi persone in grado di raccoglierlo e portarlo avanti.

DATE E ATTIVITÀ SIGNIFICATIVE DELLA SUA VITA PROFESSIONALE

Nato nel 1942 a Soleto (LE). 1960: maturità classica e si iscrive all'Università. 1965: laurea in Scienze Agrarie a Bari. 1972: ricercatore presso la Sezione di Fiorenzuola d'Arda dell'Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura e Direttore incaricato della stessa; 1976-78: visiting scientist del Plant Breeding Institute (P.B.I.) Cambridge (UK), frequenta anche la Summer School on Cereal Prodution presso il Trinity College di Dublino (Irlanda). 1984-

2006 Direttore della Sezione di Fiorenzuola d'Arda dell'Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura. 2006-2009: Direttore del Centro di ricerca per la genomica e la postgenomica animale e vegetale di Fiorenzuola d'Arda del Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA). 2000- 2020: Professore di "Miglioramento Genetico e OGM in agricoltura" presso l'Università di Modena e Reggio Emilia

Consigliere, Vicepresidente, Presidente, Past Presidente, socio emerito della Società Italiana di Genetica Agraria (SIGA). Presidente, Past President, Presidente emerito dell'Associazione Italiana delle Società Scientifiche Agrarie (AISSA).

Accademico dell'Accademia Nazionale di Agricoltura di Bologna. Accademico dell'Accademia dei Georgofili di Firenze, membro del Consiglio Accademico e per molto tempo Vice Presidente. Accademico degli Incamminati di Mogliana. Presidente dell'Unione Italiana delle Accademie per le Scienze Applicate allo Sviluppo dell'Agricoltura, alla Sicurezza Alimentare e alla Tutela Ambientale (UNASA). Presidente dell'Union of European Academies for Science Applied to Agriculture, Food and Nature- UEAA. Presidente della Sezione Cereali dell'European Association of Plant Breeding Research – EUCARPIA e membro onorario della stessa.

Costitutore di varietà di orzo di successo a livello nazionale ed internazionale. Arda (iscritta nel 1985) ha determinato un salto di qualità e produttività nella coltura dell'orzo in Italia dove negli anni '90 ha raggiunto il 30% della semente certificata. Arda è stata la prima varietà selezionata per l'area mediterranea ed è ancora popolare nel sud Italia e in Grecia. Nure (1998) è ancora oggi, dopo oltre 20 anni, la quarta varietà più venduta in Spagna, Cometa (2006) è da circa 10 anni tra le prime 3 varietà più diffuse in Italia.

Autore di circa 400 pubblicazioni su riviste scientifiche nazionali e internazionali, libri e capitoli di libri.

ASSOCIAZIONE MILANESE LAUZEREATI IN SCIENZE AGRARIE E IN SCIEN FORESTALI

ORDINE DEI DOTTORI AGRONOMI E DEI DOTTORI FORESTALI DI MILANO
Province di Milano, Lodi, Monza e Brianza, Pavia
Ministero della Giustizia

La pubblicazione riporta gli atti del seminario su «Gregor Mendel, il mendelismo e la genetica agraria» che si è svolto in occasione della Giornata mondiale dell'alimentazione 2022 dedicata al tema della sostenibilità e della sicurezza degli approvvigionamenti alimentari.

La Genetica come disciplina scientifica è nata dal genio e dalla caparbietà di Gregor Mendel e le attività di miglioramento genetico delle piante agrarie e degli animali domestici, che da essa sono scaturite, hanno rivestito e rivestono tuttora un ruolo decisivo nell'imprescindibile percorso verso la sicurezza alimentare globale.

syngenta
Planta Research and seeds
MI.SE MILANO SEMENTI
BAYER
PIONEER
CORTEVA agriscience