BIOTECNOLOGIE PER IL MIGLIORAMENTE GENETICO

Miglioramento genetico:

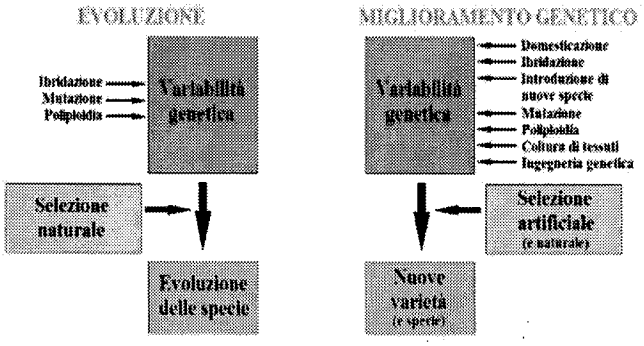
a) Fondamenti per il miglioramento genetico di popolazione e di genetica dei caratteri quantitativi applicati ai vegetali:

La **genetica** è la scienza che studia i meccanismi/leggi che regolano la trasmissione dei caratteri.
Il **miglioramento genetico** è l'applicazione della genetica con lo scopo di migliorare, ossia migliorare in maniera "stabile" (in grado da essere trasmessa alla progenie) le caratteristiche di un organismo, al fine di una maggiore produzione, qualità, ecc.
Ogni caratteristica è determinata da fattori ambientali (=E) e fattori genetici (=G): P = G + E, con diversa preponderanza degli uni o degli altri, ovvero i caratteri possono essere soprattutto determinati dal genotipo e soprattutto determinati dall'ambiente, questo concento sono spiegati prendendo per esempio il colore del fiore, studiato da Mendel, strettamente determinato da genotipo e meno dall'ambiente, se si prendono altri fiori come l'ortensia se coltivata in una ambiente acido ottengo fiori blu mentre saranno rossi/rosa in ambiente basi, quindi in questo caso l'ambiente è fondamentale rispetto al genotipo. Perciò è sempre necessario conoscere se è predominante un fattore ambientale o genomico, importante se si vuole migliorare geneticamente un individuo, infatti se esso non è particolarmente influenzato dal genotipo ma dall'ambiente risulterà inutile fare un miglioramento di tipo genetico, viceversa se l'individuo è influenzato dal genotipo si può agire al livello genetico.
Genotipo significa **controllo genetico** di un certo carattere, che può essere diversamente complesso:

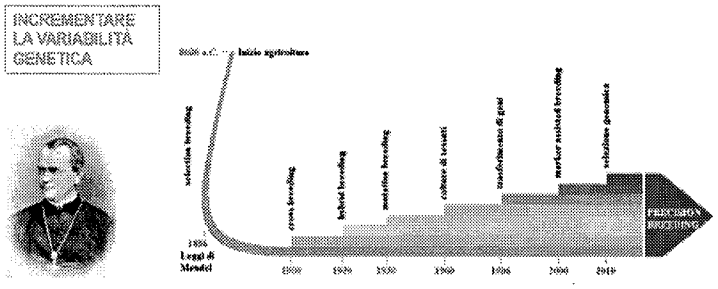
- ***Carattere monogenico***, carattere più semplice, sono i caratteri studiati da Mendel noti come i sette caratteri monogenici (colore del fiore, colore del seme, forma del seme, colore del baccello, forma del baccello, lunghezza dello stelo e posizione dei fiori). Andando ad analizzare questi caratteri essi risultavano molto più complessi di quelli descritti da Mendel, per esempio il coloro rosso del fiore è (associato alla funzionalità degli enzimi) determinato dalla produzione di xantofilla, infatti nel fiore rosso presentava tutti gli enzimi funzionati quindi permetteva la produzione di xantofilla mentre quella a fiore bianco, probabilmente tutti gli enzimi erano attivi meno che uno che non permetteva la produzione di xantofille; ciò sta a significare che i caratteri monogenici non sono monogenici ma sono determinati da tanti geni che agiscono in serie (la perdita di uno ha come conseguenza una risposta finale differente). Quindi un carattere monogenico nasconde una notevole complessità anche in considerazione del fatto che un gene può influenzare, attraverso le varie catene metaboliche, altri caratteri.
- ***Carattere poligenici***, quantitativi (perché effetto additivo), determinati cioè dall'azione dei geni con effetto additivi dai vari geni sul carattere (esempi di carattere quantitativo sono: altezza, produttività, resistenza a condizioni ambientali avverse e qualità dei prodotti, caratteri di interesse per il miglioramento genetico), ossia ciascun gene contribuisce al carattere sommando il suo effetto a quello degli altri (=geni che agiscono in parallelo e non più in serie).

Prendendo in esame l'equazione che determina il fenotipo: P = E + G, l'ambiente può modificare anche notevolmente l'espressione di un certo carattere, sia *monogenico* che *poligenico*. Quindi nei

caratteri monogenici il carattere importante è il genotipo, mentre i caratteri poligenici, dove gli effetti dei singoli geni si fondono e danno il carattere finale sono molto influenzati dall'ambiente. Perciò si può agire su **E** andando a migliorare e tenere sotto controllo le condizioni ambientali in cui un organismo vive, tale controllo deve essere continuo ma ci sono certe situazioni ambientali che non sono controllabili, come per esempio, il caso dell'agricoltura industriale: l'irrigazione, la concimazione (condizioni da mantenere continue controllabili) in modo da ottenere il massimo dei risultati ma ci sono delle situazioni che non possono essere controllate come il cambiamento climatico con un grande impatto. Oppure si può agire su **G**, con risultati più stabili, prevedibili e duraturi (anche se non in termini assoluti, in quanto **E** e **G** sono soggetti a continue variazioni).
Lo scopo del **miglioramento genetico** è agire su **G** e quindi sulle caratteristiche che sono ereditabili e che, se modificate, si trasmettono in quel modo alle generazioni successive; quindi consiste nel modificare le caratteristiche genetiche di una popolazione in modo stabile, presenti anche nelle generazioni successive.



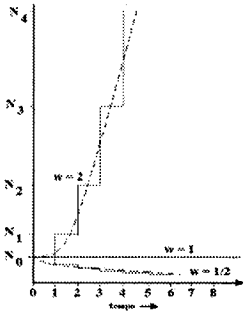
Quindi il **miglioramento genetico** utilizza le leggi della genetica ossia le forze già presenti che agiscono in natura riassunte l'evoluzione della specie: si basa, esattamente, sulle stesse forze che hanno agito nell'evoluzione, cioè nello sviluppo di forme particolari e la selezione di queste a scapito delle altre.
Il miglioramento genetico ha utilizzato gli stessi processi che hanno operato nell'evoluzione (come mutazione, ibridazione e poliploidia presenti nell'evoluzione e applicate per il miglioramento genetico con aggiunte di nuovi metodi come la domesticazione), velocizzandoli, mediante la realizzazione di incroci controllati (dall'operatore) che creano nuove combinazioni genotipiche e grazie all'applicazione di una selezione stringente (ossia viene fatta la scelta delle piante adatte ed eliminazione delle piante non adatte) e sistematica.
Questa è la regione per cui nel breve periodo (in termini evolutivi) che va dall'inizio dell'agricoltura ad oggi (circa 10000 anni) le piante coltivate hanno assunto caratteristiche estremamente diverse da quelle dei progenitori selvatici, fino a rappresentare vere e proprie specie nuove; per esempio il frumento tenue, scelto per la produzione del pane, non esiste in natura/selvatico, è un ibrido tra due specie diverse apparso casualmente/inconsapevolmente, quindi è una specie "artificiale".
Prima delle leggi di Mendel, dove non si conoscevano le leggi che regolavano la trasmissione, l'evoluzione delle piante coltivate, addomesticate, consisteva nella selezione delle vegetazioni dai coltivatori con risultati clamorosi (come il frumento tenue).
Nel XX secolo, la conoscenza e la consapevolezza delle leggi genetiche di Mendel, che regolano la trasmissione dei caratteri ha consentito di rendere ancora più efficiente il processo di incrocio e selezione. La scoperta del DNA e la sua caratterizzazione funzionale hanno inoltre aperto la strada alla manipolazione del DNA stesso per ottenere mutanti più produttivi e più adatti ai diversi ambienti, ossia l'acquisizione delle biotecnologie (ultimi 30 anni) si sono avuti e si attendono progressi ancora più rapidi.



Nel XX secolo il miglioramento genetico è stato utilizzato soprattutto per aumentare la produttività: aumento della produzione di alimenti quindi riduzione delle

percentuale di persone che soffrono la fame, è però da considerare il carico ambientale, l'impoverimento dei suoli e la perdita della biodiversità.
Le condizioni ambienta stanno cambiando con sempre maggiore velocità: aumento delle temperature, riduzione dell'acqua disponibile (e precipitazione abbondanti e concentrate), migrazione/affermazione di patogeni in ambientali fino ad oggi immuni e depauperamento dei suoli. Da un analisi fatta sulla coltivazione della vite poche sono le arre che nel 2050 rimarranno ancora attive di quelle attuali mentre le restanti saranno perdute nel 2050 (a questi ritmi di cambiamenti climatici), quasi la totali e l'aggiunta di nuovi terreni del nord Europa adatti per la coltivazione; è possibile contrastare il climate change riducendo gli effetti dirompenti sull'ambiente, oppure, in alternativa mantenere e incrementare la variabilità genetica per favorire l'adattamento a nuovi ambienti: in modo naturale oppure artificialmente (metodo rapido e precisamente).
La genetica di popolazione è la disciplina che studia la frequenza dei geni e dei genotipi nelle popolazioni, e la variazione delle frequenze nelle generazione successive.
Esistono tre gradi di studio l'individuo = studio del gene e di come determina il carattere, famiglia = studio delle frequenze di segregazione e di ricombinazione, la dominanza e la recessività, e poi le popolazioni = studio delle frequenze alleliche e i loro cambiamenti nel corso delle generazioni.
Si utilizzano *popolazioni mendeliane* dove si considera un locus, con due alleli, che seguono le leggi di Mendel, in cui si indica, per esempio, L (A, a) per il locus dove L (A_1, A_2) in caso di dominanza e L (a_1, a_2) in caso di recessività, tale definizione è una semplificazione ma necessaria per capire il concetto; e *popolazioni panmittiche* dove non c'è accoppiamento preferenziale tra i gameti, ovvero ogni individuo ha la stessa probabilità di incrociarsi con qualsiasi altro individuo della popolazione (idealistico).
Il **numero di componenti di una popolazione**, per la legge della genetica della popolazione, sono da considerare valide per popolazioni teoricamente *infinite*, semplificazione e assunzione in quanto le popolazioni finite sono soggette a perturbazioni che ne modificano le frequenze. Questo numero può essere soggetto a modificazione per effetto di 3 fattori: morte di individui, nascita di nuovi individui e migrazione di individui.
La dinamica con cui cambia il numero di componenti una popolazione cambia a seconda che si abbiano:

- *Popolazioni a generazioni separate/discrete* (per esempio le piante annuali) in cui non c'è coesistenza fra individui di una generazione e quelli della successiva, ossia in un dato momenti, di tempo, è presente un'unica generazione (non sovrapposizioni tra generazioni). Tale cambiamento nel numero di componenti, in questo caso: ammettendo che N_0 indica il numero di componenti iniziali e N_1 indica il numero di componenti della prima generazione e w rappresenta il numero di figli per individui (costante), ossia il **tasso di riproduzione**: $N_1 = N_0 * w \rightarrow N_2 = N_1 * w = N_0 * w^2 \rightarrow$ .... Quindi per *n* generazioni si avrà $N_n = N_0 * w^n$.
- *Popolazioni a generazioni sovrapposte* (per esempio le piante perenni) è quando c'è coesistenza fra individui di una generazione e quelli della successiva, co-presenti.



Tale cambiamento nel numero di componenti, in questo caso: considerando r la frazione di popolazione che ha prodotto una discendenza nell'unità di tempo dt, quindi dopo questo tempo si avrà una popolazione composta da N + rN, ovvero la variazione di popolazione nell'unità di tempo: $\frac{dN}{dt} = rN$. Nel risolvere questa equazione si ottiene differenziale, al tempo t la popolazione sarà composta da: $N_t = N_0 e^{tr}$ dove *r* è detto **coefficiente malthusiano**.
Il rapporto che lega il coefficiente malthusiano (r) e il tasso di riproduzione (w) è rappresentato da **r = ln(w)**.

I dati ricavati dalle due equazioni numeriche, nei due casi di popolazione, vengono riportati su grafico (riportato precedentemente) non c'è una grande differenza tranne per il tipo di rappresentazione, ma entrambe presentano uno stesso andamento/comportamento.
In realtà, poiché l'energia non è infinita, la crescita non può essere esponenziale, ma raggiunge un valore limite (=situazione di equilibrio).
Nel caso delle popolazioni formata da gruppi differenti questi "competono" fra loro. Per esempio, il genotipo AA con numero di partenza A_0 e w come tasso di riproduttività, e il genotipo BB con numero di parte B_0 e z come tasso di riproduttività; quindi si avrà, dopo n numero di generazioni: $N_n = A_0 * w^n + B_0 * z^n$, dove a seconda del tasso di riproduttività uno dei due prenderà il sopravvento sull'altro.
Il tasso di riproduttività è detto fitness (nei piante è genetica mentre nell'uomo e animali non solo): se il fitness è di origine genetica (cioè determinata dal genotipo, quindi ereditabile), un gruppo/popolazione avente maggiore fitness tenderà, aventi maggiore possibilità, andrà a sostituire gli altri. Essa può essere riferita all'intero genotipo, ma anche ai singoli alleli: se la fitness di due alleli è diversa, questo è sufficiente a cambiare la frequenza di tali alleli nella popolazione (due fiori: rosso e bianco fecondati mediante l'intervento di insetti che sono attratti dal rosso, quindi il fiore rosso sarà maggiormente favorito).
Un esempio di fitness è dato dal frumento che si riproduzione per autofecondazione, dove sono presenti due diversi genotipi, se uno dei due questi presenta un tasso maggiore rispetto all'altro dopo diverse generazioni sarà unicamente presente un solo genotipo. Pertanto, a seconda della **fitness** si ha una sostituzione nella popolazione di certi genotipi con altri.
Lo scopo della genetica di popolazione è lo studio di variazioni delle frequenze genetiche (alleliche) e delle frequenze genotipiche.
La legge di Hardy-Weinberg (1908), prende in considerazioni popolazione mendeliana: locus A costituito da alleli A, a con possibilità di 3 genotipi: AA, Aa e aa. Tale legge afferma: "*In una popolazione infinitamente grande, ad accoppiamento casuale, sulla quale agiscono forze evolutive, le frequenze alleliche non variano nel tempo e, dopo una generazione di accoppiamento casuale, le frequenze alleliche si stabiliranno sulle proporzioni:* p^2 *(per AA)* pq *(per Aa)* q^2 *(per aa)*
Dove p è la frequenza allelica di A e q è quella di a".
Quindi $p^2 + 2pq + q^2 = 1$
Questa legge pone delle **assunzioni**:

- *Popolazione infinitamente grande* → teoricamente impossibile ma indispensabile: in realtà deve essere sufficientemente grande per l'equilibrio di Hardy-Weinberg perché se la popolazione è piccola si osserva il fenomeno della deriva genetica (da evitare). L'effetto del caso può causare variazioni significative delle frequenze genetiche.
- *Accoppiamento casuale* → tale assunzione significa che l'accoppiamento avvenga con la stessa proporzione dei genotipi nella popolazione, ovvero la probabilità che gli individui si incrocino è uguale al prodotto delle frequenze genotipiche (se in una popolazione il 90% è rappresentato da AA quindi $p^2 = 0,9$, la probabilità che due individui AA e AA si incrocino è uguale al prodotto delle frequenze genotipiche 0,9 * 0,9 permesso dall'accoppiamento causale). Condizione non realisti per i genotipi ma è possibile per tutti i geni a effetto "neutro" come gli alleli del gruppo sanguigno.
- *Agiscono forze evolutive* → si intende per forze evolutive: selezione, mutazione e migrazione, processi genetici che possono avvenire in qualunque popolazione. Nella selezione esistono geni che non sono soggetti alla forza evolutiva della selezione, ad esempio i geni neutri.

Se la popolazione rispetta la legge di Handy-Weinberg, essa si trova all'equilibrio; questo comporta che:

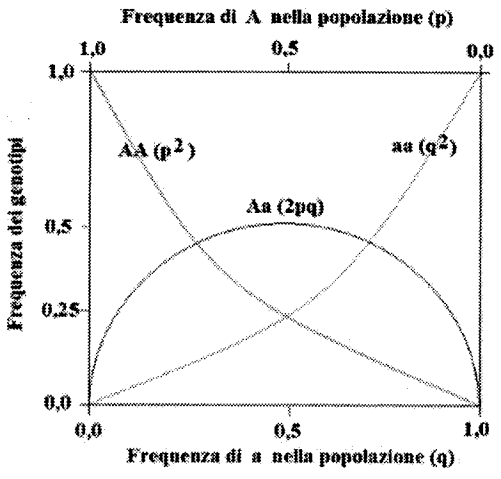
1. Le frequenze alleliche siano costanti nelle popolazioni: $p + q = 1$.
2. Le frequenze genotipiche saranno costanti dopo una generazione di accoppiamento di accoppiamento casuale, nelle proporzioni di: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$.

Si giunge a queste assunzioni basandosi su considerazioni mendeliane: si suppone una popolazione con un locus L (A, a) dove p è la frequenza di A mentre q è la frequenza di a. L'individuo produrrà gameti che seguono le frequenze alleliche (effetto dell'accoppiamento casuale), quindi si avrà p gameti maschili "A" e gameti maschili "a", e q gameti femminili "A" e gameti femminili "a". Dal loro incrocio si otterrà, nella prima generazione una popolazione formata da $p^2 + 2pq + q^2$.

È anche possibile stabilire le frequenze genotipiche sulla base della probabilità di avvenire di ciascun incrocio possibile, per esempio, AA x AA avverrà con probabilità p^2 x p^2 (grafico di fianco): AA x AA la frequenza di ciò è p^4 quindi della progenie sarà p^4, nel caso di incrocio di AA x Aa e l'alternativa di Aa x AA, con frequenza di $4p^3q$ (dove esponente 3 in p è dovuto alla presenza di 3 A, mentre esponente 1 in q alla presenza di 1 a, 4 per il numero di individui) allora la frequenza della progenie sarà per AA $2p^3q$ (2 sono gli individui formati dall'incrocio come AA) e per Aa $2p^3q$ (2 sono gli individui formati dall'incrocio come Aa). Si avrà come totale delle frequenze: $(p^2+2pq+q^2)^2 = 1$.

Tipo di incrocio	Frequenza	Frequenze della progenie		
		AA	Aa	aa
AA x AA	p^4	p^4	--	--
AA x Aa Aa x AA	$4p^3q$	$2p^3q$	$2p^3q$	--
AA x aa aa x AA	$2p^2q^2$	--	$2p^2q^2$	--
Aa x Aa	$4p^2q^2$	p^2q^2	$2p^2q^2$	p^2q^2
Aa x aa aa x Aa	$4pq^3$	--	$2pq^3$	$2pq^3$
aa x aa	q^4	--	--	q^4
Totali	$(p^2+2pq+q^2)^2=1$	$p^2(p^2+2pq+q^2)=p^2$	$2pq(p^2+2pq+q^2)^2=2pq$	$q^2(p^2+2pq+q^2)=q^2$

La legge di Hardy-Weinberg indica che, all'equilibrio le frequenze genotipiche dipendono dalle frequenze alleliche, quindi a seconda delle frequenze che hanno A e a si osserva diverse frequenze alleliche (grafico di fianco); quando la frequenza allelica è del 50% quindi la frequenza allelica di A è 0,5 e la frequenza allelica di a è 0,5 e dove metà degli individue sono Aa mentre il rimanete è rappresentato da AA (0,25) e aa (0,25) situazione noto del monoidrido mendeliano, popolazione monoibrida che nella generazione successiva presentava per il 50% è costituito da eterozigoti e i 2 omozigoti sono ciascuno il 25%.



Per determinare/stabilire se una popolazione è all'equilibrio di Hardy-Weinberg bisogna confrontare i valori osservati con i valori attesi, viene fatta un ipotesi zero "*la differenza è dovuta al caso*" per sapere se accettare o rifiutare tale ipotesi viene fatto il **test Chi-quadrato**. Per esempio, una popolazione L (A, a) a dominanza incompleta, come il colore del fiore in una specie anemofila, dove la popolazione è formata da 200 di cui 60 il fiore rosso (AA), 100 a fiore rosa (Aa) e 40 a fiore bianco (aa), la frequenza allelica (totale degli alleli 400) è $p = \frac{120 + 100}{400} = \frac{220}{400} = 0{,}55$ e $q = \frac{80 + 100}{400} = \frac{180}{400} = 0{,}45$. Allora le frequenze genotipiche saranno $p^2 = (0{,}55)^2 = 0{,}302$, $q^2 = (0{,}45)^2 = 0{,}202$ e $2pq = 0{,}495$ all'equilibrio di Hardy-Weinberg. Se tali valori vengono riportate per il numero della popolazione si otterrà i valori attesi/assoluti: AA = 0,302 * 200 = 60,5 Aa = 0,202 * 200 = 99 e aa = 40,5.

A questo punto adopero il **test Chi-quadrato**, test statistico per verificare se è una situazione di equilibrio di Hardy-Weinbeng, mediante confronto dei valori assoluti con i valori reali. Tale test è un test di verifica d'ipotesi usati in statistica necessaria per decidere se rifiutare o non rifiutare