

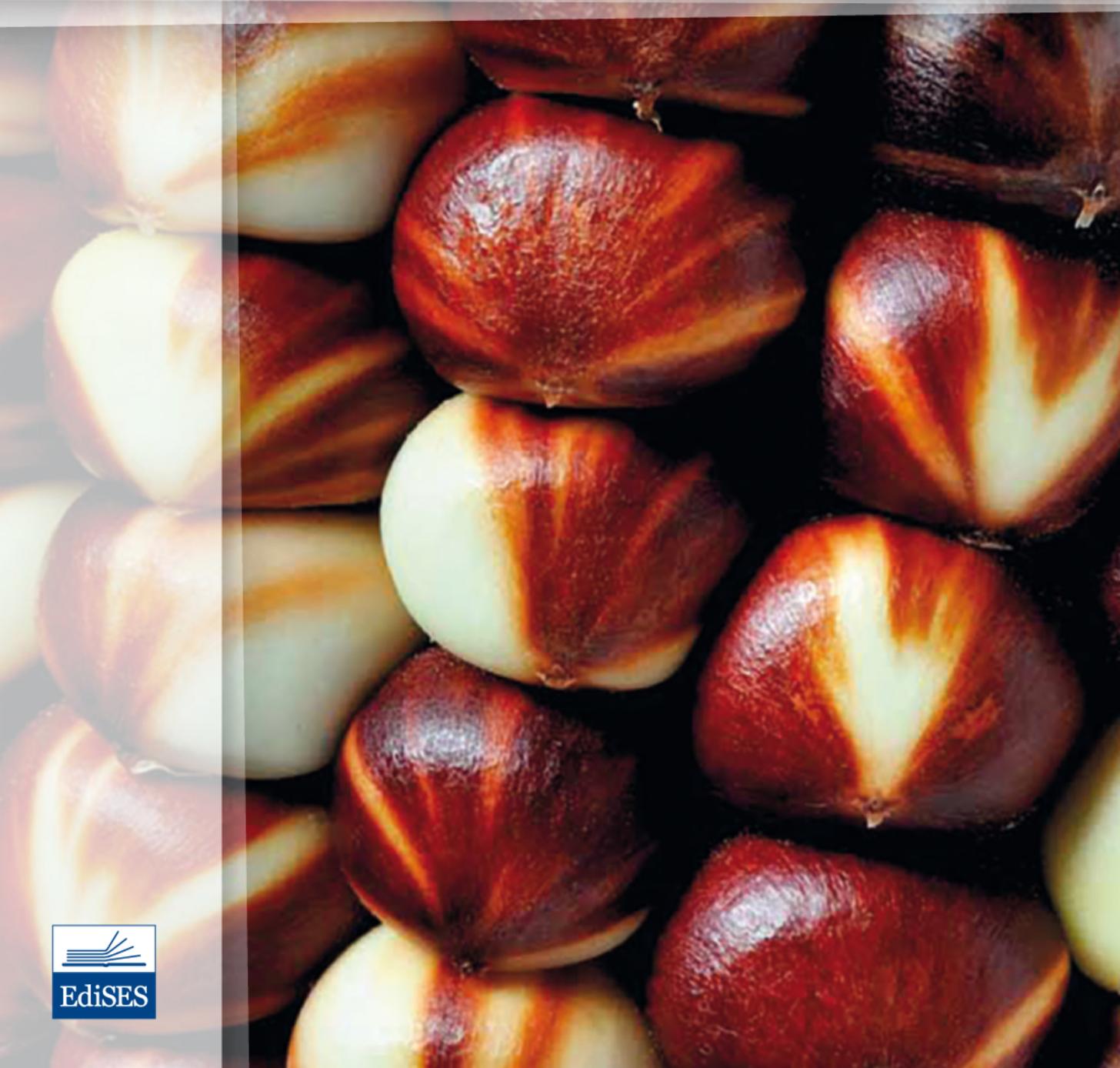
Peter J. Russell • Stephen L. Wolfe • Paul E. Hertz
Cecie Starr • Beverly McMillan



Genetica Agraria

Edizione integrata a cura di

M. Busconi • C. Comino • G. Consonni • A. Marocco • A. Porceddu • E. Portis • R. Rao



Accedi all'ebook e ai contenuti digitali

Espandi le tue risorse

un libro che **non pesa**
e si **adatta** alle dimensioni
del **tuo lettore!**



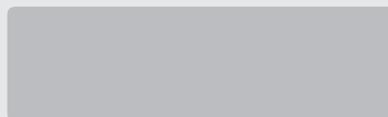
COLLEGATI AL SITO
EDISES.IT

ACCEDI AL
MATERIALE DIDATTICO

SEGUI LE
ISTRUZIONI

Utilizza il codice personale contenuto nel riquadro per registrarti al sito **edises.it**
e accedere alla **versione digitale** del testo e al **materiale didattico**.

Scopri il tuo **codice personale** grattando delicatamente la superficie



Il volume NON può essere venduto, né restituito, se il codice personale risulta visibile.
L'**accesso al materiale didattico** sarà consentito **per 18 mesi**.

Per attivare i **servizi riservati**, collegati al sito **edises.it** e segui queste semplici istruzioni

Se sei registrato al sito

- clicca su *Accedi al materiale didattico*
- inserisci email e password
- inserisci le ultime 4 cifre del codice ISBN, riportato in basso a destra sul retro di copertina
- inserisci il tuo **codice personale** per essere reindirizzato automaticamente all'area riservata

Se non sei già registrato al sito

- clicca su *Accedi al materiale didattico*
- registrati al sito o autenticati tramite facebook
- attendi l'email di conferma per perfezionare la registrazione
- torna sul sito **edises.it** e segui la procedura già descritta per *utenti registrati*



P.J. Russell • S.L. Wolfe • P.E. Hertz • C. Starr • B. McMillan

Genetica Agraria

Edizione integrata a cura di

Matteo Busconi

Cinzia Comino

Gabriella Consonni

Adriano Marocco

Andrea Porceddu

Ezio Portis

Rosa Rao



M. Busconi, C. Comino, G. Consonni, A. Marocco, A. Porceddu, E. Portis, R. Rao
Genetica Agraria

Copyright © 2016 EdiSES S.r.l. – Napoli

Edizione integrata sulla base di “Elementi di Genetica”

P. J. Russell, S. L. Wolfe, P. E. Hertz, C. Starr, B. McMillan

9 8 7 6 5 4 3 2 1 0

2020 2019 2018 2017 2016

Le cifre sulla destra indicano il numero e l'anno dell'ultima ristampa effettuata

A norma di legge è vietata la riproduzione, anche parziale, del presente volume o di parte di esso con qualsiasi mezzo.

L'Editore

L'Editore ha effettuato quanto in suo potere per richiedere il permesso di riproduzione del materiale di cui non è titolare del copyright e resta comunque a disposizione di tutti gli eventuali aventi diritto.

Si ringrazia il Prof. Adriano Marocco per l'immagine di copertina.

Progetto grafico e fotocomposizione:

doma book di Di Grazia Massimo – Napoli

Fotoincisione e stampa:

Petruzzi S.r.l. – Via Venturelli, 7/B – 06012 Città di Castello (PG)

per conto della

EdiSES s.r.l. – Piazza Dante, 89 – Napoli

Tel. 0817441706/07 Fax 0817441705

www.edises.it info@edises.it

ISBN 978 88 7959 893 4

Autori

Edizione integrata a cura di:

Matteo Busconi – Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza

(Integrazione Capitolo 1 e stesura Capitolo 6)

Cinzia Comino – Università degli Studi di Torino

(Integrazione Capitolo 9)

Gabriella Consonni – Università degli Studi di Milano

(Integrazione Capitoli 4 e 7)

Adriano Marocco – Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza

(Integrazione Capitolo 1 e stesura Capitolo 6)

Andrea Porceddu – Università degli Studi di Sassari

(Integrazione Capitolo 9)

Ezio Portis – Università degli Studi di Torino

(Stesura Capitolo 11)

Rosa Rao – Università degli Studi di Napoli “Federico II”

(Integrazione Capitolo 5)

Prefazione

Questo libro di testo è stato preparato per gli studenti che seguono corsi di Genetica, Genetica Agraria e Genetica Vegetale delle lauree triennali e magistrali. A questo scopo, il testo originale “Elementi di Genetica” di Russell et al. è stato integrato in diversi capitoli con specifici riferimenti alle piante. Inoltre, sono stati preparati due nuovi capitoli riguardanti i sistemi riproduttivi delle piante e il miglioramento genetico vegetale.

Tradizionalmente un testo di Genetica presenta prima la trasmissione dei caratteri ereditari seguita dalla genetica molecolare. Tuttavia, gli approcci molecolari alla Genetica sono diventati sempre più sofisticati e le conoscenze della Genetica molecolare sono aumentate in modo esplosivo. La direzione intrapresa dalla ricerca genetica richiede che il cuore di un testo di Genetica sia molecolare. Di conseguenza, nell'organizzare i capitoli, abbiamo voluto iniziare il testo con due argomenti riguardanti la struttura del DNA e la trasmissione dell'informazione genetica dal DNA alle proteine. Nel Capitolo 1 gli studenti imparano come è stato identificato il DNA in quanto molecola ereditaria, qual è la sua struttura e quali sono i meccanismi di replicazione. Il capitolo include anche l'organizzazione del DNA negli eucarioti e nei procarioti e descrive gli elementi trasponibili e il loro effetto sull'evoluzione dei genomi. Nel Capitolo 2 gli studenti scoprono la connessione tra DNA, RNA e proteine attraverso i processi di trascrizione e traduzione.

I Capitoli 3-6 costituiscono una unità di genetica della trasmissione dei caratteri ereditari. Partendo dalla meiosi come meccanismo in grado di generare variabilità genetica, si passa alla genetica mendeliana e alle successive estensioni, allo studio dell'associazione e della ricombinazione e ai meccanismi di ereditarietà non tradizionali. Inoltre, nel Capitolo 6 gli studenti possono comprendere come le modalità di riproduzione influenzino la struttura genetica delle popolazioni vegetali.

I Capitoli 7-9 presentano tre aspetti della genetica molecolare: il controllo dell'espressione genica nei procarioti e negli eucarioti, la trasmissione del materiale genetico nei procarioti e le tecnologie per la modificazione del DNA e lo studio dei genomi.

Il testo si conclude con due capitoli sulla genetica delle popolazioni (Capitolo 10) e sulla genetica dei caratteri quantitativi analizzati a livello molecolare (Capitolo 11).

Una caratteristica di questo testo è l'approccio sperimentale: il piano di studio di ciascun capitolo è preceduto dalla sezione “Perché è importante”, in cui sono poste domande e risposte a fatti di natura genetica. Inoltre, domande, esperimenti e risultati sono riportati nelle figure “Ricerca sperimentale” in ciascun capitolo. Al termine di ciascun capitolo, gli studenti trovano “Domande di autovalutazione”, “Domande per una discussione”, “Analisi sperimentale” e “Un richiamo all'evoluzione”. Questo testo ha l'obiettivo di dimostrare che la Genetica, come molte altre scienze, non è una collezione di fatti, ma un modo per affrontare problemi e ottenere risposte su aspetti riguardanti la natura degli organismi viventi.

Gli Autori

SUPPORTI PER I DOCENTI

I docenti che utilizzano il testo a scopo didattico possono scaricare dal sito www.edises.it, previa registrazione all'area docenti, le immagini del libro in formato PowerPoint.

Indice generale

I Struttura, replicazione ed organizzazione del DNA

Perché è importante

I.1 L'identificazione del DNA come la molecola ereditaria

Gli esperimenti iniziarono quando Griffith trovò una sostanza che poteva trasformare geneticamente i batteri che causano la polmonite

Avery e i suoi collaboratori identificarono il DNA come la molecola responsabile della trasformazione dello *Streptococcus ruvido* nella forma infettiva

Hershey e Chase fornirono l'evidenza conclusiva che dimostrava che il DNA è la molecola ereditaria

I.2 La struttura del DNA

Watson e Crick misero insieme informazioni provenienti da fonti diverse per definire la struttura del DNA

Il nuovo modello proponeva che due catene polinucleotidiche si avvolgessero a formare una doppia elica di DNA

I.3 La replicazione del DNA

Meselson e Stahl dimostrarono che la replicazione del DNA è semiconservativa

Le DNA polimerasi sono gli enzimi principali della replicazione del DNA

Le elicasi svolgono il DNA per esporre i filamenti stampo per la sintesi del nuovo DNA

Inneschi di RNA forniscono alla DNA polimerasi il punto di inizio per cominciare a sintetizzare una nuova catena di DNA

Un filamento di DNA è sintetizzato in modo continuo, l'altro in modo discontinuo

Enzimi multipli coordinano le loro attività durante la replicazione del DNA

Le telomerasi risolvono un problema specifico della replicazione alle terminazioni di molecole lineari di DNA

La replicazione del DNA inizia a livello di origini di replicazione

I.4 I meccanismi che correggono gli errori della replicazione

La correzione di bozze dipende dalla capacità della DNA polimerasi di tornare indietro e rimuovere gli appaiamenti errati tra le basi

La riparazione del DNA corregge gli errori che sfuggono alla correzione di bozze

I.5 L'organizzazione del DNA negli eucarioti e nei procarioti

Gli istoni impacchettano il DNA eucariotico in successivi livelli di organizzazione

Molte proteine non istoniche hanno un ruolo chiave nella regolazione dell'espressione genica

Il DNA è organizzato più semplicemente nei procarioti che negli eucarioti

I.6 Elementi trasponibili

Le sequenze d'inserzione e i trasposoni sono i due tipi principali di elementi trasponibili batterici

Gli elementi trasponibili furono inizialmente scoperti negli eucarioti

Gli elementi trasponibili eucariotici sono classificati come trasposoni e retrotrasposoni

I retrovirus sono simili ai retrotrasposoni

Classificazione degli elementi trasponibili delle piante

Effetti degli elementi trasponibili sulla struttura dei genomi vegetali

Effetti degli elementi trasponibili sui geni delle piante

Riepilogo

Domande

2 Dal DNA alle proteine

Perché è importante

2.1 La connessione tra DNA, RNA e proteine

Le proteine sono codificate dai geni

Il percorso dal gene al polipeptide include la trascrizione e la traduzione

Il codice genetico è scritto in parole di tre lettere mediante l'utilizzo di un alfabeto di quattro lettere

VIII Indice generale

2.2	La trascrizione: sintesi di RNA guidata dal DNA	52			
	Le RNA polimerasi funzionano come le DNA polimerasi, ma non richiedono inneschi	52			
	Specifiche sequenze di nucleotidi nel DNA indicano dove inizia e dove finisce la trascrizione di un gene	52			
2.3	Sintesi dell'mRNA negli eucarioti	55			
	I geni che codificano per le proteine degli eucarioti sono trascritti in mRNA precursori che vengono modificati nel nucleo	55			
	Gli introni vengono rimossi durante la maturazione dei pre-mRNA per produrre RNA messaggeri traducibili	57			
	Gli introni contribuiscono alla variabilità delle proteine	58			
2.4	La traduzione: sintesi di un polipeptide guidata dall'mRNA	59			
	I tRNA sono piccole molecole di RNA altamente specializzate che portano gli aminoacidi al ribosoma	59			
	I ribosomi sono complessi di RNA e proteine che funzionano come macchine automatizzate per l'assemblaggio dei polipeptidi	61			
	L'inizio della traduzione assembla le subunità ribosomiali, un mRNA e il primo aminoacil-tRNA	63			
	La catena polipeptidica cresce durante la fase di allungamento della traduzione	65			
	Con la terminazione della traduzione si ha il rilascio di un polipeptide completo dal ribosoma	67			
	Molti ribosomi traducono simultaneamente un singolo mRNA	69			
	I polipeptidi di nuova sintesi vengono maturati e ripiegati nella loro forma definitiva	69			
	Le proteine mature contengono segnali di localizzazione che le dirigono nelle appropriate sedi cellulari	70			
	Mutazioni di coppie di basi possono influenzare la struttura e la funzione delle proteine	72			
	Riepilogo	74			
	Domande	75			
SPUNTI DALLA RIVOLUZIONE MOLECOLARE					
	Un righello molecolare per misurare i ribosomi	66			
3	Meiosi: le basi cellulari della riproduzione sessuata	78			
	Perché è importante	79			
3.1	I meccanismi della meiosi	79			
	La meiosi si basa sulle interazioni e sulla distribuzione delle coppie di cromosomi omologhi	79			
	Il ciclo cellulare meiotico produce quattro cellule figlie geneticamente diverse, ciascuna con la metà dei cromosomi della cellula progenitrice	80			
3.2	I meccanismi che producono variabilità genetica	85			
	La variabilità prodotta dalla ricombinazione è conseguente all'appaiamento cromosomico e agli scambi fisici che avvengono tra cromatidi omologhi	85			
	La segregazione casuale dei cromosomi materni e paterni costituisce la seconda fonte principale di variabilità genetica durante la meiosi	86			
	L'unione casuale dei gameti maschile e femminile alla fecondazione produce ulteriore variabilità genetica	89			
3.3	Momento e sede della meiosi nel ciclo vitale degli organismi	90			
	Negli animali predomina la fase diploide, mentre la fase aploide è ridotta e la formazione dei gameti segue direttamente la meiosi	90			
	Nella maggior parte delle piante e dei funghi si ha alternanza di generazioni, entrambe pluricellulari, in fase aploide e diploide	90			
	In alcuni funghi e in altri organismi predomina la fase aploide, mentre la fase diploide è ridotta ad una sola cellula	91			
	Riepilogo	92			
	Domande	93			
4	Mendel, i geni e l'ereditarietà	95			
	Perché è importante	96			
4.1	La nascita della genetica: i piselli di Mendel	97			
	Mendel scelse per i suoi esperimenti linee pure di piselli	97			
	Mendel fece prima incroci prendendo in considerazione un solo carattere	98			
	Gli incroci fatti considerando un solo carattere portarono Mendel a formulare il principio della segregazione	100			

Grazie alle sue ipotesi Mendel poteva prevedere sia le classi sia le proporzioni della progenie	101	5.2 Geni legati al sesso	138
Mendel utilizzò il testcross per verificare la validità delle sue ipotesi	104	Le femmine hanno cromosomi sessuali XX e i maschi XY sia nell'uomo che in <i>Drosophila</i>	138
Mendel verificò con gli incroci l'indipendenza di geni diversi	104	La determinazione del sesso nell'uomo dipende dal cromosoma Y	139
Incroci di triibridi	106	I geni legati al sesso furono scoperti in <i>Drosophila</i>	139
Gli studi di Mendel determinarono la nascita della genetica	107	I geni legati al sesso nell'uomo vengono ereditati come in <i>Drosophila</i>	140
La teoria cromosomica dell'ereditarietà di Sutton mise in relazione i geni di Mendel con i cromosomi	107	L'inattivazione di un cromosoma X compensa gli effetti della doppia dose di geni presente nelle femmine dei mammiferi	142
4.2 Successive modifiche ed estensioni alle ipotesi di Mendel	110	La determinazione del sesso nelle piante	142
Nella dominanza incompleta gli alleli dominanti non mascherano completamente quelli recessivi	110	5.3 Alterazioni cromosomiche che hanno effetti sull'eredità	145
Nella codominanza gli effetti di alleli diversi sono egualmente evidenziabili negli eterozigoti	111	Delezioni, duplicazioni, traslocazioni e inversioni sono le alterazioni cromosomiche più comuni	145
Nell'allelia multipla più di due alleli di un gene sono presenti in una popolazione	111	Anche il numero complessivo dei cromosomi può cambiare	149
Penetranza ed espressività	113	5.4 Genetica umana e consulenza genetica	156
Nell'epistasia i geni interagiscono tra loro: l'azione di un gene influenza l'azione di un altro gene	115	Nell'eredità autosomica recessiva gli eterozigoti sono portatori sani e gli omozigoti recessivi sono malati	156
Nell'eredità poligenica un carattere è determinato dalla somma degli effetti di molti geni	117	Nell'eredità autosomica dominante solo gli omozigoti recessivi sono sani	157
Nella pleiotropia due o più caratteri sono influenzati da un unico gene	117	I maschi hanno una maggiore probabilità di essere affetti da caratteri recessivi legati all'X	158
4.3 Verifica delle ipotesi genetiche	119	Le malattie genetiche dell'uomo possono essere previste e molte di esse curate	158
Il test del chi-quadro	121	5.5 Meccanismi di eredità non tradizionali	159
Riepilogo	124	L'eredità citoplasmatica segue il meccanismo di trasmissione ereditaria dei mitocondri e dei cloroplasti	159
Domande	124	Nell'imprinting genomico l'allele ereditato da un genitore viene espresso, mentre quello ereditato dall'altro genitore è silente	160
SPUNTI DALLA RIVOLUZIONE MOLECOLARE		Riepilogo	161
Perché le piante di pisello nane sono così basse?	109	Domande	163
5 Geni e cromosomi	127	UNO SGUARDO ALLA RICERCA	
Perché è importante	128	Organismi modello per la ricerca	133
5.1 Associazione genetica (linkage) e ricombinazione	128	6 I sistemi riproduttivi delle piante	165
I principi dell'associazione e della ricombinazione furono scoperti in <i>Drosophila</i>	129	Perché è importante	166
La frequenza di ricombinazione può essere usata per realizzare le mappe dei cromosomi	134	6.1 La riproduzione sessuata	166
Il calcolo delle distanze di mappa si può effettuare mediante il test a due e a tre punti	134	6.2 La riproduzione asessuata	170
Geni associati molto distanti tra loro assortiscono in maniera indipendente	137	Propagazione vegetativa	171
		Apomissia	171
		6.3 La determinazione del sesso nelle piante	178

X Indice generale

6.4 Autoincompatibilità e sterilità nelle piante	181	Molti tumori sono causati da geni che hanno perso il loro normale controllo	222
Autoincompatibilità sporofitica	182	Il cancro si sviluppa gradualmente attraverso una serie di fasi	223
Autoincompatibilità gametofitica	184		
Maschio-sterilità	185		
6.5 Influenza del sistema riproduttivo sulla struttura genetica delle popolazioni	190	7.5 Geni della domesticazione	224
6.6 Mutazioni meiotiche nella gametogenesi	192	Riepilogo	224
Riepilogo	197	Domande	226
Domande	199		
7 Il controllo dell'espressione genica	201	8 La genetica dei batteri e dei virus	228
Perché è importante	202	Perché è importante	229
7.1 La regolazione dell'espressione genica nei procarioti	203	8.1 Trasferimento genico e ricombinazione genetica nei batteri	229
L'operone è l'unità di trascrizione nei procarioti	203	In <i>E. coli</i> avviene la ricombinazione genetica	231
L'operone <i>lac</i> per il metabolismo del lattosio è trascritto quando un induttore inattiva un repressore	203	La coniugazione batterica porta in contatto i DNA di due cellule, permettendo lo svolgersi della ricombinazione	231
La trascrizione dei geni dell'operone <i>trp</i> per la biosintesi del triptofano è repressa quando il triptofano attiva un repressore	205	Trasformazione e trasduzione forniscono un'ulteriore fonte di DNA per la ricombinazione	236
La trascrizione dell'operone <i>lac</i> è controllata anche da un sistema di regolazione positiva	207	La procedura di replica plating permette di identificare e contare i ricombinanti	237
7.2 La regolazione della trascrizione negli eucarioti	207	8.2 I virus e la ricombinazione virale	239
Negli eucarioti la regolazione dell'espressione genica si verifica a diversi livelli	209	I virus in forma libera consistono in un nucleo centrale di acido nucleico circondato da un rivestimento proteico	239
La struttura della cromatina gioca un ruolo importante nel determinare se un gene è attivo o inattivo	210	I batteriofagi di <i>E. coli</i> sono ampiamente usati nella ricerca genetica	239
La regolazione dell'inizio della trascrizione coinvolge gli effetti di proteine che si legano al promotore e a siti regolatori del gene	210	Riepilogo	242
La metilazione del DNA può controllare la trascrizione genica	216	Domande	243
7.3 Regolazione post-trascrizionale, traduzionale e post-traduzionale	217	UNO SGUARDO ALLA RICERCA	
La regolazione post-trascrizionale controlla la disponibilità dell'mRNA	217	Organismi modello per la ricerca: <i>Escherichia coli</i>	230
La regolazione traduzionale controlla la velocità della sintesi proteica	219		
La regolazione post-traduzionale controlla la disponibilità delle proteine funzionali	220	9 Tecnologie del DNA e genomica	245
7.4 La perdita del controllo regolatorio nel cancro	221	Perché è importante	246
		9.1 Clonaggio del DNA	247
		Enzimi di origine batterica, chiamati endonucleasi di restrizione, costituiscono la base del clonaggio del DNA	247
		I plasmidi batterici forniscono un esempio di applicazione degli enzimi di restrizione nel clonaggio	249
		Le librerie di DNA contengono collezioni di frammenti di DNA clonati	251
		La reazione di polimerizzazione a catena (polymerase chain reaction, PCR) amplifica il DNA <i>in vitro</i>	253

9.2 Applicazioni delle tecnologie del DNA	255	10.3 Gli agenti responsabili della microevoluzione	305
Le tecnologie del DNA sono impiegate per la diagnosi molecolare di molte malattie genetiche umane	257	Le mutazioni creano nuove variazioni genetiche	305
Il DNA fingerprinting è utilizzato per identificare in modo univoco gli individui	259	Il flusso genico introduce nuove varianti genetiche nelle popolazioni	306
L'ingegneria genetica utilizza le tecnologie del DNA per modificare i geni di una cellula o di un organismo	261	La deriva genetica riduce la variabilità genetica all'interno delle popolazioni	307
Le nuove sfide del miglioramento genetico: la cisgenesi e l'editing genomico	275	La selezione naturale plasma la variabilità genetica favorendo alcune caratteristiche rispetto ad altre	308
9.3 Analisi del genoma	280	La selezione sessuale spesso rende esageratamente evidenti alcuni caratteri nei maschi	313
Le tecniche di sequenziamento del DNA	281	L'accoppiamento non casuale può influenzare le frequenze genotipiche	313
La genomica strutturale determina la sequenza completa del DNA dei genomi	286	Riepilogo	315
La genomica funzionale si occupa della funzione dei geni e di altre parti del genoma	286	Domande	315
Lo studio delle proteine espresse è il livello successivo nell'analisi genomica	289	UNO SGUARDO ALLA RICERCA	
La biologia dei sistemi è la disciplina che studia le interazioni tra le diverse componenti di un organismo	291	Ricerca di base: applicare il principio di Hardy-Weinberg	303
Riepilogo	292		
Domande	293	II Miglioramento genetico vegetale	317
SPUNTI DALLA RIVOLUZIONE MOLECOLARE		Perché è importante	318
Ingegnerizzazione del riso per la resistenza alla ruggine	274	11.1 Genetica dei caratteri quantitativi	319
		La relazione tra genotipo e fenotipo	320
10 Microevoluzione: cambiamenti genetici all'interno delle popolazioni	295	Eredità poligenica	321
Perché è importante	296	Ereditabilità dei caratteri quantitativi	326
10.1 Variabilità delle popolazioni presenti in natura	296	Risposta alla selezione	329
I biologi evolucionisti descrivono e quantificano la variabilità fenotipica	297	11.2 Analisi QTL	331
La variabilità fenotipica può avere cause genetiche e ambientali	298	Sviluppo di popolazioni di mappaggio e loro caratterizzazione	332
Diversi processi generano la variabilità genetica	299	Mappaggio di QTL basato su analisi linkage	336
Le popolazioni spesso contengono notevole variabilità genetica	300	Mappaggio per associazione	342
10.2 Genetica di popolazioni	301	Popolazioni multiparentali	349
Tutte le popolazioni hanno una struttura genetica	301	11.3 Selezione assistita da marcatori molecolari	350
Il principio di Hardy-Weinberg è un modello basato sull'ipotesi zero che consente di determinare se sia avvenuta o meno evoluzione	302	Mappaggio ad alta risoluzione dei QTL	351
		Validazione e conversione dei marcatori associati	351
		Costi e benefici della MAS	352
		Principali applicazioni della MAS	352
		Riepilogo	355
		Domande	356
		Appendice - Risposte	359
		Indice analitico	371



La genetica dei batteri e dei virus

Piano di studio

8.1 Trasferimento genico e ricombinazione genetica nei batteri

In *E. coli* avviene la ricombinazione genetica. La coniugazione batterica porta in contatto i DNA di due cellule, permettendo lo svolgersi della ricombinazione.

Trasformazione e trasduzione forniscono un'ulteriore fonte di DNA per la ricombinazione.

La procedura di replica plating permette di identificare e contare i ricombinanti.

8.2 I virus e la ricombinazione virale

I virus in forma libera consistono in un nucleo centrale di acido nucleico circondato da un rivestimento proteico.

I batteriofagi di *E. coli* sono ampiamente usati nella ricerca genetica.

Perché è importante

Nel 1885, un pediatra viennese, Theodor Escherich, scoprì un batterio che causava una severa forma di diarrea nei neonati. Egli chiamò il batterio *Bacterium coli*. Sorprendentemente, però, i ricercatori scoprirono che questo *Bacterium coli* era anche presente nei neonati sani ed era un normale abitante dell'intestino umano. Solo certi ceppi causano malattie nell'uomo. Inoltre, i ricercatori, nel ventesimo secolo, scoprirono che batteri di ceppi diversi, mischiati tra loro, producevano una progenie che in parte aveva caratteristiche miste, provenienti da più di un ceppo, una prova che i batteri potevano avere qualche forma di riproduzione sessuata.

Essendo un organismo facile da isolare e crescere, dopo la sua scoperta, il batterio, ribattezzato *Escherichia coli* in onore di Escherich, ha attirato molto interesse da parte dei ricercatori. Il batterio fornisce diversi vantaggi per la ricerca scientifica: può crescere rapidamente, producendo popolazioni enormi in soluzioni nutritive che sono semplici da preparare. Inoltre, può essere infettato da un gruppo di virus, detti **batteriofagi (fagi in breve)**, che sono stati utili ai ricercatori quanto lo stesso *E. coli*, perché anch'essi possono essere cresciuti a miliardi in colture di batteri. I rapidi tempi di generazione di *E. coli*, i suoi fagi e le ampie popolazioni che se ne possono ottenere l'hanno reso particolarmente utile ai genetisti. I genetisti l'hanno utilizzato per analizzare incroci genetici e loro risultati in tempi molto più rapidi di quanto potessero fare con gli eucarioti. In questo modo, è stato possibile osservare eventi genetici che si verificano solamente in un individuo su milioni. Le caratteristiche di questi eventi rari hanno aiutato i ricercatori a capire la struttura, l'attività e la ricombinazione dei geni a livello molecolare.

Poiché può essere cresciuto in soluzioni chimiche completamente definite – vale a dire soluzioni di cui sono note l'identità e la concentrazione di ciascun componente – *E. coli* è di particolare utilità per indagini biochimiche. Utilizzando batteri normali o recanti mutazioni e batteri infettati da virus è possibile identificare e seguire da vicino quello che viene assorbito, quello che viene rilasciato e i cambiamenti biochimici che avvengono internamente alle cellule. Questi studi biochimici hanno contribuito immensamente alla definizione dei geni

e della loro attività ed hanno portato all'identificazione di molti processi biochimici e degli enzimi che li catalizzano (l'inserto *Uno sguardo alla ricerca* analizza ulteriormente i vantaggi di *E. coli* come organismo modello in laboratorio).

Aperta la strada con la ricerca sui batteri e sui loro virus, i biologi hanno applicato con successo le stesse tecniche agli eucarioti, come ad esempio la *Neurospora* e l'*Aspergillus*, funghi con un breve tempo di generazione, che possono essere cresciuti e analizzati biochimicamente in gran numero. Oggi, studi molecolari sono condotti facilmente su una grande varietà di eucarioti, inclusi i lieviti, il moscerino della frutta *Drosophila* e la pianta *Arabidopsis*. I risultati di questa ricerca hanno rivelato che le caratteristiche molecolari dei geni, scoperte nei procarioti, si applicano anche agli eucarioti.

Questo capitolo illustra le scoperte di base della genetica molecolare dei batteri e dei loro fagi. Cominciamo la nostra discussione con la vita sessuale dei batteri.

8.1 Trasferimento genico e ricombinazione genetica nei batteri

Nella prima metà del ventesimo secolo, esperimenti genetici fondamentali rivelarono il processo di ricombinazione genetica negli organismi eucariotici durante la riproduzione sessuata e condussero alla costruzione di mappe genetiche di cromosomi per un certo numero di organismi (vedi Capitoli 4 e 5). I batteri divennero il soggetto della ricerca genetica nella metà del ventesimo secolo. Una delle prime domande cruciali fu se il trasferimento genico e la ricombinazione potessero avvenire anche nei batteri, sebbene questi non si riproducano sessualmente per meiosi. Per batteri particolari, la risposta a questa domanda è sì – geni possono essere trasferiti da un batterio ad un altro attraverso diversi meccanismi distinti e il nuovo DNA introdotto può ricombinare con quello residente. Questa ricombinazione genetica svolge la stessa funzione che svolge negli eucarioti: genera variabilità genetica attraverso lo scambio di alleli tra regioni omologhe su molecole di DNA provenienti da due individui diversi.

E. coli è uno dei batteri in cui può avvenire ricombinazione genetica. Dal 1940 i genetisti sanno che *E. coli* e molti altri batteri possono essere cresciuti in un **terreno minimo**, costituito da acqua, da una sorgente di carbonio organico come il glu-

UNO SGUARDO ALLA RICERCA

Organismi modello per la ricerca: *Escherichia coli*

Probabilmente si conosce di *E. coli* più di quanto si sappia di qualsiasi altro organismo. Per esempio, i microbiologi hanno decifrato la sequenza completa del DNA genomico del ceppo di *E. coli* comunemente utilizzato in laboratorio, che consta di circa 4400 geni. La funzione di circa un terzo di questi è però ancora ignota.

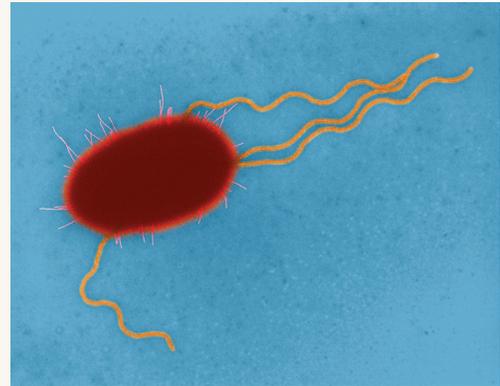
E. coli cominciò ad essere utilizzato in laboratorio perché era facile da crescere in coltura. Poiché in condizioni ottimali le cellule di *E. coli* possono dividersi all'incirca ogni 20 minuti, è possibile crescere un clone di un miliardo di cellule nel giro di ore in soli 10 mL di mezzo di coltura. Lo stesso quantitativo di mezzo di coltura può sostenere fino a 10 miliardi di cellule prima che il ritmo di crescita cominci a declinare. I ceppi di *E. coli* possono essere cresciuti in laboratorio con un'attrezzatura minima, poiché richiedono poco più di recipienti di coltura e un incubatore tenuto a 37°C.

Il maggior vantaggio di *E. coli* per la ricerca scientifica, però, all'epoca in cui cominciò ad essere utilizzato, si può riassumere in una semplice parola: sesso. Quando Joshua Lederberg ed Edward Tatum scoprirono che *E. coli* può effettuare una forma di riproduzione sessuale, essi ed altri scienziati realizzarono che avrebbero potuto condurre incroci con il batterio, producendo ricombinanti genetici che potevano indicare le posizioni relative dei geni sul cromosoma. Conoscendo le posizioni relative, Lederberg, Tatum e altri ricercatori furono in grado di generare una mappa genetica del cromosoma di *E. coli*. La

mappa mostrava che i geni con funzioni correlate erano raggruppati insieme, un fatto che ebbe significative implicazioni per la regolazione dell'espressione dei geni. Per esempio, il lavoro di François Jacob e Jacques Monod sui geni per il metabolismo del lattosio condusse al modello pionieristico dell'operone (descritto nella Sezione 7.1). Nel loro lavoro all'Istituto Pasteur di Parigi essi utilizzarono la coniugazione per mappare i geni e generare diploidi parziali, allo scopo di comprendere i dettagli della regolazione della trascrizione genica.

Lo sviluppo di *E. coli* come organismo modello per lo studio dell'organizzazione genica e la regolazione dell'espressione dei geni diede inizio alla genetica molecolare. La caratterizzazione di plasmidi che esistono in natura in *E. coli* e degli enzimi che tagliano il DNA in sequenze specifiche condusse allo sviluppo di tecniche per combinare DNA di sorgenti diverse, ad esempio per inserire un gene di un organismo in un plasmide. Oggi *E. coli* è usato per creare plasmidi che contengono inseriti geni o altre sequenze e per la loro amplificazione (clonaggio), una volta ottenuti.

In sostanza, lo studio della genetica molecolare di *E. coli* ha posto le fondamenta dell'industria biotecnologica; colture in larga scala di *E. coli* sono ampiamente utilizzate come "fabbriche" per la produzione di proteine



Dennis Kunkel Microscopy, Inc.

d'interesse. Ad esempio, l'ormone umano insulina, richiesto per il trattamento di certe forme di diabete, può essere prodotto da fabbriche di *E. coli*. (Il Capitolo 9 spiega in dettaglio il clonaggio e gli altri tipi di manipolazione del DNA).

I ceppi di laboratorio di *E. coli* sono innocui per l'uomo. Analogamente, le cellule di *E. coli* che in natura vivono nel colon dell'uomo e di altri mammiferi sono in genere innocue. Esistono però ceppi di *E. coli* patogeni; qualche volta si legge di essi sui giornali quando persone sviluppano sintomi, quali diarrea e febbre, in seguito all'assunzione di cibo contaminato da ceppi patogeni di *E. coli*. I genomi di diversi ceppi patogeni di *E. coli* sono stati sequenziati e ciò ha rivelato che essi hanno più geni dei ceppi di laboratorio o del ceppo che vive nel colon dell'uomo. I geni extra includono quelli che rendono il batterio patogeno.

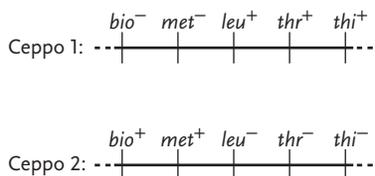
cosio e da una selezione di sali inorganici che includa una fonte di azoto, come ad esempio il cloruro di ammonio. Il mezzo di crescita può essere in forma liquida o in forma di gelatina, preparata aggiungendo agar al mezzo liquido (l'agar è un polisaccaride estratto dalle alghe che non è digeribile dalla maggior parte dei batteri).

Poiché non è pratico studiare un singolo batterio, i ricercatori hanno sviluppato presto delle tecniche per iniziare colture batteriche a partire da una singola cellula, generando popolazioni costituite da un grandissimo numero di cellule identiche. Colture di questo tipo sono chiamate **cloni**. Per dare inizio ad un clone batterico, il ricercatore sparge una goccia di

coltura batterica su una piastra di coltura contenente del mezzo agarizzato sterile. La coltura è sufficientemente diluita da garantire l'ampia separazione delle cellule sulla superficie dell'agar. Ciascuna singola cellula si divide molte volte per produrre una colonia separata, che è un clone della cellula originale. Cellule possono essere prelevate dal clone e introdotte in un liquido di coltura o sparse su agar e cresciute praticamente in quantità illimitata.

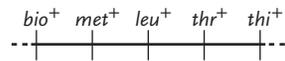
In *E. coli* avviene la ricombinazione genetica

Nel 1946, due scienziati presso l'Università di Yale, Joshua Lederberg ed Edward L. Tatum, si accinsero a determinare se la ricombinazione genetica avvenisse nei batteri, utilizzando *E. coli* come organismo sperimentale. In sostanza, essi volevano stabilire se i batteri avessero processi di riproduzione sessuata. Come primo passo, indussero mutazioni genetiche in batteri *E. coli*, esponendo le cellule a mutageni, quali i raggi X o la luce ultravioletta. Dopo l'esposizione, Lederberg e Tatum trovarono che alcuni batteri erano diventati auxotrofi, ovvero incapaci di crescere su terreno minimo (vedi Sezione 2.1). Un ceppo mutante poteva crescere solo se la vitamina biotina e l'aminoacido metionina erano aggiunti al mezzo di coltura; evidentemente in quel ceppo i geni che codificano per gli enzimi richiesti per produrre queste sostanze erano mutati. Un secondo ceppo mutante non aveva bisogno di biotina o metionina nel mezzo di crescita, ma poteva crescere solamente se erano aggiunti gli aminoacidi leucina e treonina, unitamente alla vitamina tiamina. Questi due ceppi genetici di *E. coli* erano rappresentati, nella stenografia genetica, come



In questa stenografia, *bio* si riferisce al gene che controlla la capacità della cellula di sintetizzare la biotina a partire da precursori inorganici. La designazione *bio*⁺ indica che l'allele è selvatico; *bio*⁻ rappresenta l'allele mutante, che produce cellule che non possono sintetizzare biotina. Analogamente, *met*⁺, *met*⁻, *leu*⁺, *leu*⁻, *thr*⁺, *thr*⁻ e *thi*⁺, *thi*⁻ sono, rispettivamente, gli alleli normali e mutanti per la sintesi di metionina, leucina, treonina e tiamina.

Lederberg e Tatum mischiarono tra loro 100 milioni di cellule dei due ceppi mutanti e le misero in terreno minimo (**Figura 8.1**). Era atteso che nessuna delle cellule fosse in grado di crescere su terreno minimo, a meno che non fosse avvenuta una forma di ricombinazione tra molecole di DNA dei due tipi parentali, a generare una nuova combinazione con alleli selvatici per tutti i cinque geni:



Diverse centinaia di colonie crebbero sul terreno minimo, ad indicare che la ricombinazione genetica era in realtà avvenuta nei batteri. Lederberg e Tatum esclusero la possibilità che le colonie fossero originate da mutazioni casuali che ripristinassero la forma allelica selvatica piastrandoci centinaia di migliaia di cellule dei ceppi 1 o 2, separatamente, sulla superficie di un mezzo minimo: nessuna colonia crebbe.

La coniugazione batterica porta in contatto i DNA di due cellule, permettendo lo svolgersi della ricombinazione

I risultati di Lederberg e Tatum condussero ad una importante domanda: come è possibile che due molecole di DNA, recanti alleli diversi, si incontrino per effettuare ricombinazione genetica? La ricombinazione negli eucarioti avviene in cellule diploidi, attraverso lo scambio di segmenti tra cromatidi di coppie di cromosomi omologhi (discusso nella Sezione 5.1). I batteri tipicamente hanno un singolo cromosoma circolare e sono organismi aploidi (vedi Sezione 1.5). Dapprima si pensò che le cellule batteriche potessero fondersi insieme, producendo l'equivalente procariotico di uno zigote diploide. In seguito venne però stabilito che, piuttosto che fondersi, le cellule batteriche *coniugano*: esse entrano in contatto l'una con l'altra, inizialmente connettendosi attraverso una lunga struttura tubulare chiamata *pilus sessuale* (**Figura 8.2a**), e quindi formano un ponte citoplasmatico che mette in comunicazione le due cellule (**Figura 8.2b**). Durante la **coniugazione**, una copia di parte del DNA di una cellula, la *donatrice* (la cellula a sinistra nella Figura 8.2a), si trasferisce nell'altra cellula, la *ricevente*, attraverso il ponte citoplasmatico. Una volta che il DNA della cellula donatrice è entrato nella ricevente, si appaia con la regione omologa del DNA della cellula

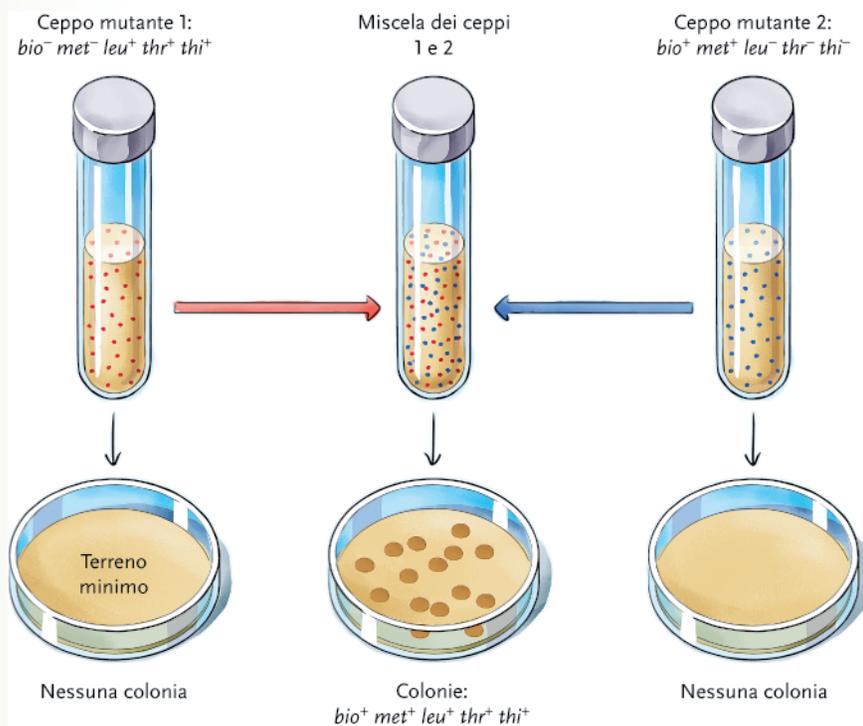
FIGURA 8.1 RICERCA SPERIMENTALE

La ricombinazione genetica nei batteri

DOMANDA: La ricombinazione genetica avviene nei batteri?

ESPERIMENTO: Lederberg e Tatum analizzarono se la ricombinazione genetica potesse avvenire tra due ceppi mutanti di *E. coli*. Il ceppo mutante 1 richiedeva biotina e metionina per crescere, ma non leucina, treonina o tiamina. Il suo genotipo era $bio^- met^- leu^+ thr^+ thi^+$. Il ceppo mutante 2 richiedeva leucina, treonina e tiamina per crescere, ma non biotina o metionina, e il suo genotipo era $bio^+ met^+ leu^- thr^- thi^-$.

Lederberg e Tatum mischiarono un gran numero di batteri dei due ceppi e li piastrarono su terreno minimo, mancante di qualsiasi nutriente richiesto per la crescita. Come controllo, piastrarono su terreno minimo un gran numero di ciascuno dei due ceppi separatamente.



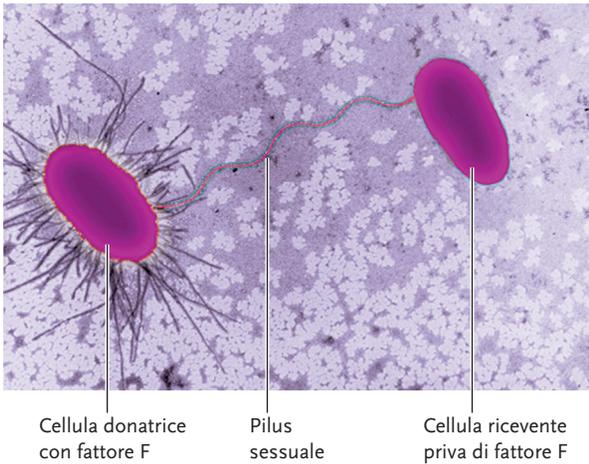
RISULTATI: Nessuna colonia crebbe sulle piastre di controllo, indicando che nei due ceppi gli alleli mutanti non erano retromutati alla forma normale, cosa che avrebbe prodotto crescita su terreno minimo. Però molte colonie crebbero sulle piastre seminate con una miscela del ceppo mutante 1 e del ceppo mutante 2.

CONCLUSIONI: Per poter crescere su terreno minimo, i batteri dovevano avere un genotipo $bio^+ met^+ leu^+ thr^+ thi^+$. Lederberg e Tatum conclusero, pertanto, che le colonie sulla piastra dovevano essere risultate dalla ricombinazione genetica tra i ceppi mutanti 1 e 2.

ricevente e ha luogo la ricombinazione genetica. Attraverso questo trasferimento unidirezionale di DNA, la coniugazione batterica realizza una forma di riproduzione sessuata tipica dei procarioti.

Il fattore F e la coniugazione. La cellula batterica donatrice in un accoppiamento dà inizio alla coniugazione batterica. La capacità di coniugare dipende dalla presenza nella cellula donatrice di un plasmide, chiamato **fattore F** (F = fertilità). I

a. Unione tramite pilus sessuale



b. Formazione del ponte citoplasmatico

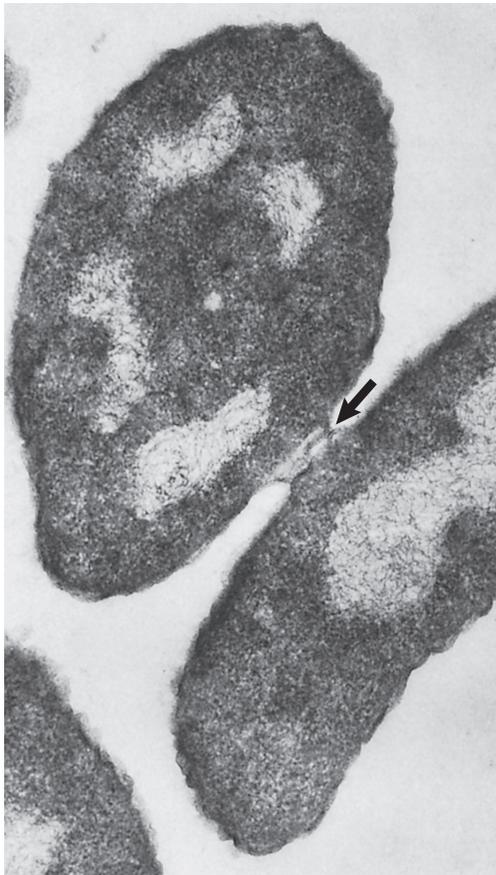
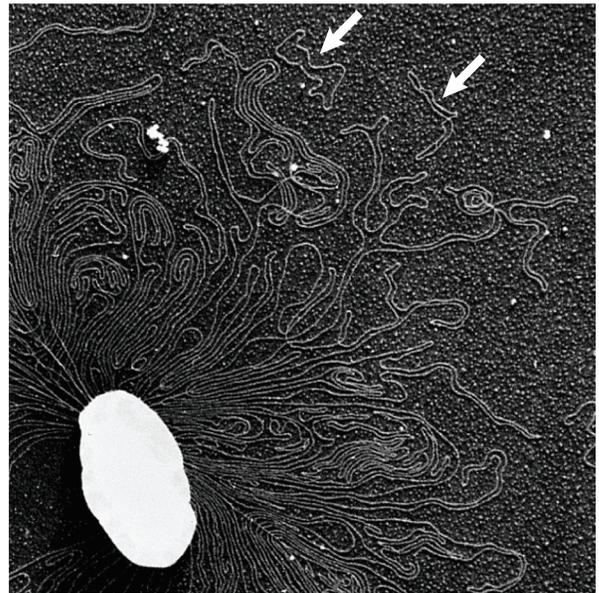


Figura 8.2
 Cellule di *E. coli* in coniugazione. **(a)** Contatto iniziale tra due cellule tramite il pilus sessuale. **(b)** Tra le due cellule si è formato un ponte citoplasmatico (freccia), attraverso il quale il DNA viene trasferito da una cellula all'altra.

a. DNA batterico rilasciato dalla cellula



b. Plasmide



Figura 8.3
 Fotografie al microscopio elettronico di DNA rilasciato da una cellula batterica distrutta. **(a)** Plasmidi (freccie) vicino alla massa del DNA cromosomico. **(b)** Un singolo plasmide a più alto ingrandimento (colorato).

plasmidi sono piccoli cerchietti di DNA che sono presenti nei batteri in aggiunta alla molecola circolare di DNA cromosomico principale (**Figura 8.3**). I plasmidi contengono da alcuni a molti geni e un'origine di replicazione che permette loro di essere duplicati e trasmessi durante la divisione batterica. Le cellule donatrici nella coniugazione sono chiamate **cellule F⁺** perché contengono il fattore F. Esse sono in grado di accoppiarsi con le cellule riceventi ma non con altre cellule donatrici. Le cellule riceventi mancano del fattore F e pertanto sono dette **cellule F⁻**.



Il fattore F porta circa 20 geni. Alcuni dei geni codificano per proteine del **pilus sessuale**, anche chiamato **pilus F** (plurale, *pili*). Il pilus sessuale è una struttura lunga e tubulare presente sulla superficie cellulare, che permette alle cellule donatrici F^+ di attaccarsi alle cellule riceventi F^- (vedi Figura 8.2a). Una volta attaccate, le cellule formano un ponte citoplasmatico e coniugano (**Figura 8.4a**, passaggio 1, e vedi Figura 8.2b). Durante la coniugazione, il plasmide F si replica, utilizzando uno speciale tipo di replicazione del DNA. Quando i due filamenti del DNA plasmidico si separano durante la replicazione, uno dei filamenti viene trasferito dalla cellula F^+ a quella F^- attraverso il ponte citoplasmatico (Figura 8.4a, passaggio 2). Nella cellula ricevente avviene la sintesi del filamento complementare al filamento di DNA entrante (Figura 8.4a, passaggio 3). Quando l'intero filamento del fattore F è entrato e il suo filamento complementare è stato sintetizzato, il fattore F circolarizza in un fattore F completo, rendendo la cellula F^+ (Figura 8.4a, passaggio 4). In questo processo, nessun DNA cromosomico è trasferito tra le cellule, pertanto nessuna ricombinazione genetica può avvenire in seguito ad un incrocio $F^+ \times F^-$.

Le cellule Hfr e la ricombinazione genetica.

Come può avvenire ricombinazione genetica di geni batterici tramite coniugazione se nessun DNA cromosomico viene trasferito quando il fattore F è traslocato durante l'accoppiamento? La risposta è che in alcune cellule F^+ (**Figura 8.4b**, passaggio 1), il fattore F si integra per ricombinazione nel cromosoma batterico (Figura 8.4b, passaggio 2), producendo una donatrice che può trasferire geni del cromosoma batterico alla cellula ricevente. Queste cellule donatrici speciali sono conosciute come **cellule Hfr** (Hfr = alta frequenza di ricombinazione). Poiché i geni del fattore F sono ancora attivi quando il plasmide è integrato nel cromosoma batterico, una cellula Hfr può coniugare con una cellula F^- . La Figura 8.4b, passaggio 3, illustra un incrocio $Hfr \times F^-$ nel quale i due tipi cellulari hanno alleli diversi. La replicazione del DNA inizia a metà del fattore F integrato e un segmento del fattore F si muove attraverso il ponte di coniugazione nella cellula ricevente (Figura 8.4b, passaggio 4), portando dietro di sé il DNA cromosomico (Figura 8.4b, passaggio 5). Nella cellula ricevente avviene la sintesi del filamento di DNA complementare al filamento entrante, che proviene dalla donatrice. In breve, il ponte di coniugazione tra le cellule appaiate si

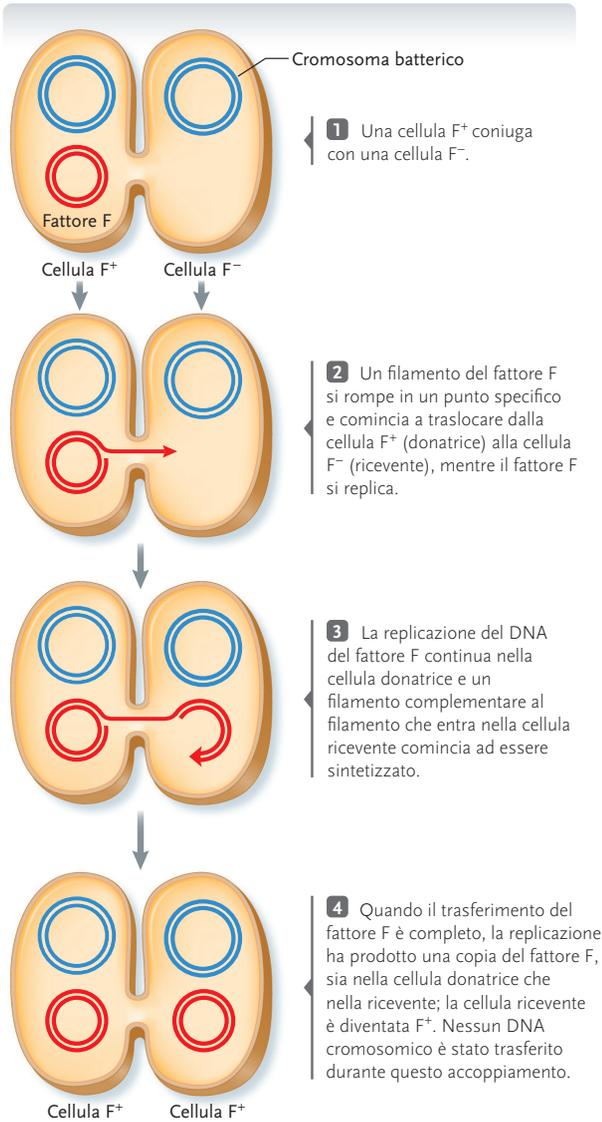
rompe, ma il trasferimento di DNA in genere procede abbastanza a lungo da permettere che alcuni geni della cellula donatrice seguano il filamento F nella cellula ricevente. La cellula ricevente diventa così un **diploide parziale** a causa del frammento di DNA cromosomico della cellula donatrice che ha attraversato il ponte di coniugazione.

Nel nostro esempio, la cellula ricevente nella Figura 8.4b, passaggio 5, è diventata a^+b^+/a^-b^- . Il DNA della ricevente e il frammento di DNA omologo della donatrice possono appaiarsi e ricombinare. La ricombinazione genetica avviene attraverso un doppio evento di crossing-over, che scambia i geni del donatore con quelli del ricevente, utilizzando essenzialmente gli stessi meccanismi degli eucarioti (discussi nella Sezione 5.1). La Figura 8.4b, passaggio 6, mostra la generazione di un ricombinante b^+ . In altre coppie nella popolazione coniugante, il gene a^+ potrebbe ricombinare con il gene omologo del ricevente, o entrambi i geni a^+ e b^+ potrebbero ricombinare. I ricombinanti osservati nell'esperimento di Lederberg e Tatum descritto in precedenza originarono attraverso questo stesso meccanismo generale. Poiché la coniugazione in genere si interrompe molto prima che la seconda metà del plasmide F venga trasferita (sarebbe l'ultimo pezzo di DNA ad essere trasferito), la cellula ricevente rimane F^- .

I ricombinanti prodotti durante la ricombinazione possono essere identificati solamente se gli alleli dei geni sul DNA trasferito dalla cellula donatrice differiscono da quelli sul cromosoma della cellula ricevente. In seguito a ricombinazione, il DNA batterico si replica e la cellula si divide normalmente, producendo una linea di cellule con la nuova combinazione allelica. Qualsiasi residuo del frammento di DNA che è entrato originariamente nella cellula viene degradato al procedere della divisione e non contribuisce ulteriormente alla ricombinazione genetica o all'eredità della cellula.

Mappaggio dei geni per coniugazione. La ricombinazione genetica per coniugazione venne scoperta da due scienziati, François Jacob (lo stesso ricercatore che propose il modello dell'operone per la regolazione dell'espressione genica nei batteri; vedi Sezione 7.1) ed Elie L. Wollman all'Istituto Pasteur, a Parigi. Questi cominciarono i loro esperimenti incrociando cellule Hfr e F^- che differivano in un certo numero di alleli. Ad intervalli regolari successivamente all'inizio della coniugazione, essi prelevarono alcune cellule e le

a. Trasferimento del fattore F



b. Trasferimento di geni batterici

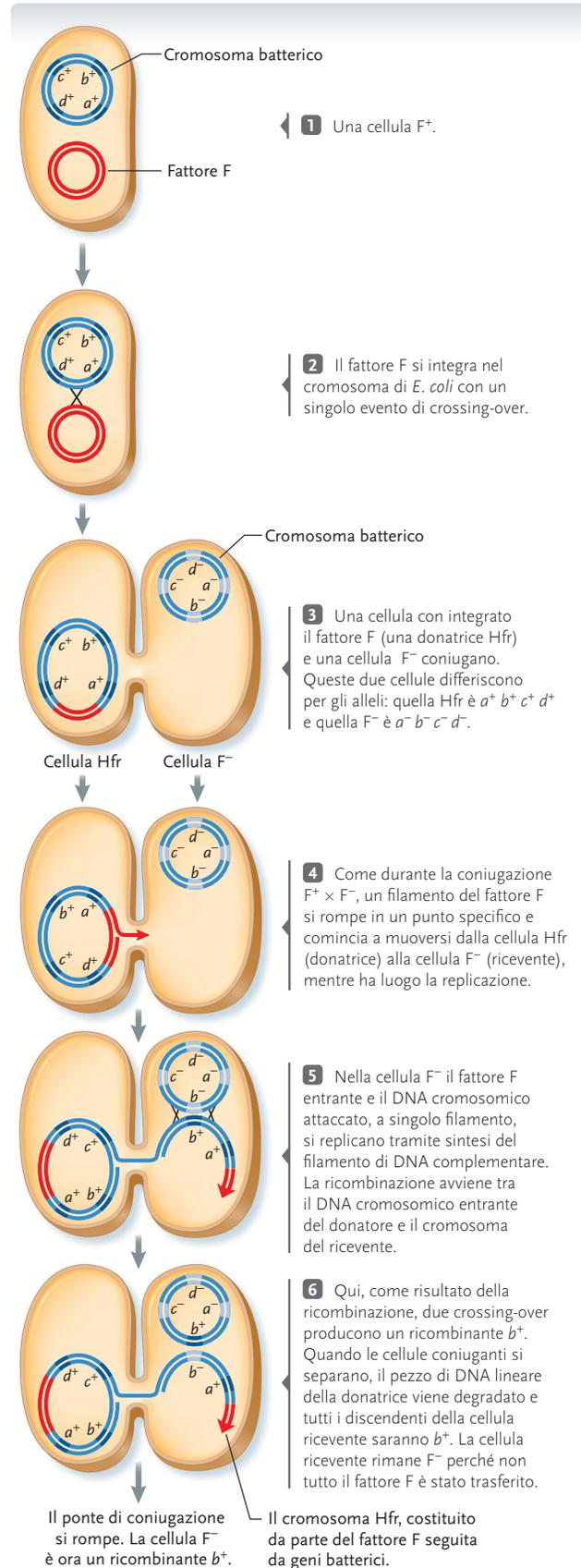
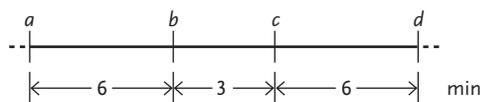


Figura 8.4
Trasferimento di materiale genetico durante la coniugazione tra cellule di *E. coli*. **(a)** Trasferimento del fattore F durante la coniugazione tra cellule F⁺ e F⁻. **(b)** Trasferimento di geni batterici e produzione di ricombinanti durante la coniugazione tra cellule Hfr e F⁻.



agitarono in un frullatore per separare le cellule in accoppiamento. Quindi coltivarono le cellule separate e le analizzarono per la presenza di ricombinanti. Essi trovarono che quanto più a lungo lasciavano procedere la coniugazione prima di separare le cellule, tanto più elevato era il numero di geni del ceppo donatore che entravano nel ricevente, producendo ricombinanti. Da questo risultato, Jacob e Wollman conclusero che durante la coniugazione le cellule Hfr iniettano lentamente una copia del loro DNA nelle cellule F⁻. Il trasferimento completo di una molecola di DNA alla cellula F⁻ richiederebbe circa 90-100 minuti. In natura, però, l'intera molecola di DNA è trasferita di rado, perché il ponte citoplasmatico tra le cellule coniuganti è fragile e si rompe facilmente a causa dell'agitazione molecolare casuale, prima che il trasferimento sia completo.

L'ordine di trasferimento genico da una cellula Hfr ad una F⁻ venne utilizzato per mappare il cromosoma di *E. coli*. Il fattore F si integra in una delle poche posizioni possibili e fisse nel DNA circolare di *E. coli*. Ne consegue che i geni del DNA batterico seguono il segmento del fattore F nella cellula ricevente in un ordine definito, in cui il gene immediatamente adiacente al fattore F entra per primo e i geni successivi di seguito. Nell'esempio teorico mostrato nella Figura 8.4b, i geni del donatore entreranno nell'ordine a⁺-b⁺-c⁺-d⁺. Interrompendo la coniugazione a tempi via via crescenti, i ricercatori permettevano il trasferimento di pezzi di DNA via via più lunghi nella cellula ricevente, portandovi sempre più geni della cellula donatrice (visibili come comparsa di ricombinanti). Seguendo l'ordine e il tempo con i quali i geni venivano trasferiti, i ricercatori furono in grado di mappare e assegnare la posizione relativa dei geni sul cromosoma di *E. coli*. La mappa genetica risultante ha distanze tra geni misurate in unità di minuti. Oggi, la mappa genetica di *E. coli* mostra le distanze di mappa come minuti, a riflettere la procedura di mappaggio per coniugazione.



Le mappe genetiche di *E. coli* ottenute tramite esperimenti di coniugazione indicavano che i geni erano disposti circolarmente, a riflettere la struttura circolare del cromosoma di *E. coli*. Più recen-

temente, il sequenziamento del genoma di *E. coli* ha confermato i risultati ottenuti tramite mappaggio genetico.

Oltre al plasmide F, i batteri contengono altri tipi di plasmidi. Alcuni plasmidi portano geni che conferiscono resistenza a condizioni sfavorevoli, quali l'esposizione ad antibiotici (i plasmidi che portano tali geni per la resistenza sono chiamati **plasmidi R**). Il vantaggio competitivo fornito dai geni portati da alcuni plasmidi può spiegarne l'ampia distribuzione in tutti i tipi di cellule procariotiche.

Trasformazione e trasduzione forniscono un'ulteriore fonte di DNA per la ricombinazione

La scoperta della coniugazione e della ricombinazione genetica in *E. coli* dimostrò che la ricombinazione genetica non è ristretta agli eucarioti. Ulteriori osservazioni dimostrarono che il DNA può essere trasferito da una cellula batterica ad un'altra attraverso altri due meccanismi, la *trasformazione* e la *trasduzione*. Come la coniugazione, questi meccanismi trasferiscono il DNA in una direzione e creano un diploide parziale nel quale può avvenire la ricombinazione tra alleli in regioni omologhe di DNA.

Trasformazione. Nella **trasformazione**, i batteri incorporano pezzi di DNA che sono rilasciati quando altre cellule si disintegrano. Fred Griffith, un ufficiale medico del Ministero Britannico della Salute, a Londra, scoprì questo meccanismo nel 1928, quando trovò che una forma non infettiva del batterio *Streptococcus pneumoniae*, incapace di causare polmonite nei topi, poteva essere trasformata in una forma infettiva se esposta a cellule di un ceppo infettivo uccise al calore. La differenza cruciale tra i ceppi risiedeva nella capsula di polisaccaridi che riveste il ceppo infettivo, assente nei ceppi non infettivi a causa di una differenza genetica tra i due. Nel 1944, Oswald Avery e i suoi colleghi all'Università di New York trovarono che la sostanza derivata dalle cellule infettive uccise, capace di convertire i batteri non infettivi nella forma infettiva, era il DNA (discusso nella Sezione 1.1).

In seguito, i genetisti stabilirono che nella trasformazione dello *Streptococcus* i frammenti di DNA lineare assunti e provenienti dalle cellule infettive distrutte ricombinavano con il DNA cromosomico delle cellule non infettive tramite doppio crossing-

over, in modo molto simile alla ricombinazione genetica che avviene nella coniugazione. La ricombinazione introduce l'allele normale, che controlla la formazione della capsula, nel DNA delle cellule non infettive; l'espressione di questo allele normale genera una capsula intorno alla cellula e alle sue discendenti, rendendole infettive.

Solo alcune specie di batteri possono assumere DNA dal mezzo circostante attraverso meccanismi naturali. Tali batteri tipicamente hanno una proteina che lega il DNA sulla superficie esterna della parete cellulare. Quando il DNA dall'ambiente circostante lega la proteina, un enzima deossiribonucleasico rompe il DNA in piccoli pezzi, che passano attraverso la parete della cellula e la membrana plasmatica fino al citoplasma. Il DNA che entra può quindi ricombinare con il cromosoma della cellula ricevente se questo contiene le regioni omologhe.

Le cellule di *E. coli* in condizioni normali non assumono il DNA dall'ambiente circostante, ma possono essere indotte ad assumerlo tramite *trasformazione artificiale*. Un modo in cui questo è realizzato è esponendo le cellule di *E. coli* a ioni calcio e al DNA di interesse, incubando il tutto in ghiaccio e dando quindi un rapido shock termico. Questo trattamento altera la membrana plasmatica in modo tale che il DNA possa attraversarla ed entrare. Il DNA entrante va incontro a ricombinazione se contiene regioni omologhe a parte del DNA cromosomico.

Un'altra tecnica per la trasformazione artificiale, chiamata *elettroporazione*, espone brevemente le cellule ad un rapido impulso elettrico. Lo shock elettrico altera la membrana plasmatica in modo tale che il DNA possa entrare. Il metodo funziona bene con la maggior parte delle specie batteriche che di per sé sono incapaci di assumere DNA e anche con molti tipi di cellule eucariotiche.

La trasformazione artificiale è spesso utilizzata per introdurre plasmidi contenenti sequenze di DNA d'interesse nelle cellule di *E. coli*, come parte delle tecniche di clonaggio. Quando le cellule sono state trasformate, i cloni di cellule sono cresciuti in grande numero per aumentare la quantità di DNA inserito, fino a raggiungere la quantità necessaria per il sequenziamento o la modificazione genetica. (Il clonaggio del DNA e l'ingegneria genetica sono discussi in dettaglio nel Capitolo 9).

Trasduzione. Nella **trasduzione** il DNA è trasferito alla cellula batterica ricevente da un fago

infettante (vedi Sezione 1.1). Quando nuove particelle fagiche sono assemblate in una cellula batterica, può capitare che i capsidi incorporino un frammento del DNA dell'ospite insieme o al posto del DNA virale. Quando poi i fagi sono rilasciati dalla cellula ospite, si attaccano ad un'altra cellula e iniettano in essa il DNA batterico (e il DNA virale, se presente). Come nella coniugazione e nella trasformazione, l'introduzione di questo DNA rende la cellula parzialmente diploide e permette la realizzazione della ricombinazione. Joshua Lederberg e il suo studente Norton Zinder, allora all'Università del Wisconsin a Madison, scoprirono la trasduzione nel 1952, nel corso di esperimenti con il batterio *Salmonella typhimurium* e il fago P22. Lederberg ricevette il premio Nobel nel 1958 per la sua scoperta della coniugazione e della trasduzione nei batteri.

La procedura di replica plating permette di identificare e contare i ricombinanti

Come fanno i ricercatori a identificare e contare i ricombinanti ottenuti negli esperimenti di coniugazione, trasformazione e trasduzione? Joshua Lederberg ed Esther Lederberg svilupparono a questo scopo una nuova tecnica, ora largamente usata, chiamata **replica plating** (piastramento di repliche). Nel replica plating, una piastra con mezzo di coltura solido su cui siano cresciute le colonie – chiamata piastra madre – viene premuta lievemente su del velluto sterile (**Figura 8.5**). Questo determina il trasferimento di un po' di ciascuna colonia sul velluto, mantenendo la stessa distribuzione delle colonie presente sulla piastra. Il velluto è quindi premuto gentilmente su nuove piastre di terreno di coltura solido – le piastre copia – e in questo modo alcune delle cellule di ciascuna colonia originale sono trasferite sulle nuove piastre. In tal modo le nuove piastre sono seminate ciascuna con una “replica” dell'originale collezione di colonie presente sulla piastra di partenza. Le nuove piastre sono quindi incubate per permettere la crescita delle colonie. Pertanto, un ricercatore può determinare le mutazioni che ciascun ceppo porta, effettuando un replica plating della piastra originale su piastre contenenti terreni di coltura con diversa composizione. In altre parole, la composizione del terreno di coltura sulle piastre è modificata per consentire la crescita di colonie con specifiche caratteristiche. Il **terreno completo** contiene l'intero complemento di sostanze nutritive, inclusi aminoacidi e altre sostanze che i

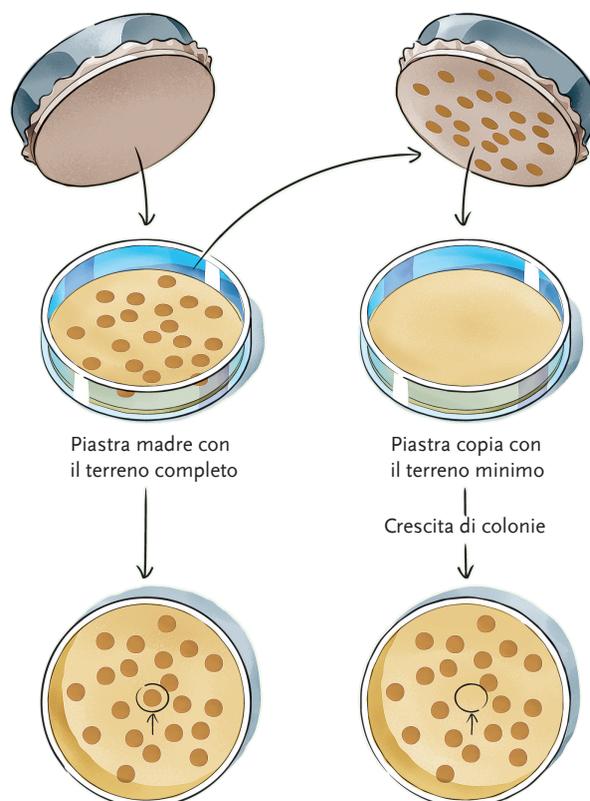
FIGURA 8.5 UN METODO DI RICERCA

Piastramento di repliche (replica plating)

SCOPO: Il replica plating è utilizzato per identificare ceppi batterici diversi in una miscela eterogenea di ceppi, in base alle loro necessità di crescita.

PROTOCOLLO:

1. Premi delicatamente il velluto sterile sulla piastra di terreno solido su cui sono cresciute le colonie. Un po' di ciascuna colonia si trasferisce al velluto, mantenendo la stessa distribuzione delle colonie presente sulla piastra. Nell'esempio, una miscela di colonie di ceppo normale e ceppo auxotrofo si trovano sulla piastra di terreno completo.
2. Premi delicatamente il velluto su una nuova piastra – la piastra copia – per trasferire un po' di ciascun ceppo. Nell'esempio, la piastra copia contiene terreno minimo. Incuba per permettere alle colonie di crescere e confronta la distribuzione delle colonie sulla piastra copia con quella sulla piastra madre.



INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI: Una colonia presente sulla piastra madre ma non sulla piastra copia indica che il ceppo richiede qualche sostanza nutritiva per crescere che non è presente nel terreno minimo. In altre parole, il ceppo è auxotrofo. Negli esperimenti reali, le composizioni della piastra madre e delle piastre copia sono scelte in modo appropriato allo scopo dell'esperimento.

ceppi normali producono da sé; in un terreno minimo le cellule normali sono in grado di crescere, ma non i mutanti auxotrofi, poiché sono incapaci di sintetizzare una o più delle sostanze mancanti.

La Figura 8.5 mostra l'identificazione di mutanti auxotrofi di *E. coli* tramite replica plating, su terreno minimo, di colonie che sono state cresciute in terreno completo. Tutti i ceppi crescono su terreno completo, ma i mutanti auxotrofi non crescono su terreno minimo. Perciò, comparando le colonie che crescono sul terreno completo (piastra originale) con quelle cresciute sul terreno minimo, un ricercatore può determinare quali colonie siano mancanti sulla piastra di terreno minimo. Le colonie corri-

spondenti sulla piastra originale saranno quindi prelevate e studiate a fondo. Nell'esperimento reale, la composizione dei terreni di coltura è disegnata in base allo scopo dell'esperimento. Per esempio, per identificare un ricombinante *met*⁺ in un esperimento di coniugazione, la piastra di partenza contiene metionina e le colonie sono replicate su una piastra che manca di metionina. Comparando la crescita di colonie sulle due piastre, i ricombinanti *met*⁺ verranno identificati perché crescono sulla piastra che manca di metionina, mentre le cellule parentali *met*⁻ non sono in grado di crescere.

I fagi menzionati in questa sezione infettano solamente i batteri, mentre i virus infettano tutti

gli organismi viventi. Molti virus sono diventati importante oggetto di ricerca, fra le altre cose nello studio dei meccanismi molecolari della ricombinazione e del controllo genetico dell'infezione virale. Virus e ricombinazione virale sono argomento della sezione successiva.

INTERVALLO

Descrivi le proprietà delle cellule di *E. coli* F⁺, F⁻ e Hfr.

8.2 I virus e la ricombinazione virale

I virus che infettano i batteri, in quanto agenti di trasduzione, sono strumenti importanti nello studio della genetica dei batteri. Gli stessi virus sono anche importanti per lo studio della ricombinazione e della *genetica virale*. I virus possono andare incontro a ricombinazione genetica quando i DNA di due virus, recanti alleli diversi per uno o più geni, infettano la stessa cellula. Utilizzando i fagi, i ricercatori studiano la genetica dei virus con le stesse tecniche molecolari e biochimiche utilizzate per studiare gli ospiti batterici.

I virus in forma libera consistono in un nucleo centrale di acido nucleico circondato da un rivestimento proteico

I virus in forma libera, al di fuori delle cellule ospiti, consistono in un nucleo centrale, o **core**, di acido

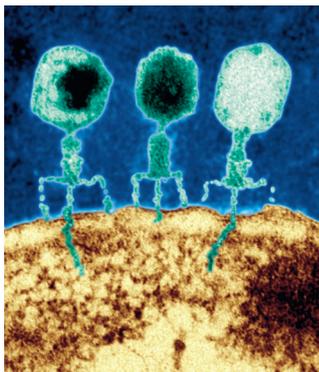
nucleico racchiuso da un **rivestimento** proteico protettivo. La **Figura 8.6** mostra un fago e un virus che infetta cellule animali. Alcuni virus animali hanno uno strato addizionale – l'involucro – che deriva dalla membrana plasmatica della cellula ospite. I virus sono trasportati passivamente da movimenti molecolari casuali e non effettuano alcuna delle attività metaboliche caratteristiche della vita. Però, una volta che essi o il loro acido nucleico genomico sono entrati in una cellula ospite, i virus tipicamente sovvertono l'apparato cellulare dell'ospite per effettuare la replicazione dell'acido nucleico virale e la sintesi delle proteine virali. Virus di tipo diverso infettano cellule batteriche, cellule vegetali e cellule animali.

Le molecole di acido nucleico virale – DNA in alcuni virus, RNA in altri – possono contenere da pochi fino a circa cento geni. Tutti i virus hanno geni che codificano almeno per le proteine del rivestimento e per gli enzimi richiesti per la replicazione dell'acido nucleico. Molti virus hanno anche geni che codificano per proteine di riconoscimento che si inseriscono nel rivestimento superficiale. Queste proteine del rivestimento riconoscono e legano la cellula ospite, promuovendo l'entrata della particella virale o del core di acido nucleico all'interno della cellula.

I batteriofagi di *E. coli* sono ampiamente usati nella ricerca genetica

Diversi batteriofagi che infettano *E. coli* sono utilizzati dai ricercatori per studiare la genetica sia dei batteri che dei virus. Questi includono **batteriofagi virulenti**, che uccidono la cellula ospite durante ciascun ciclo di infezione, e **batteriofagi tempe-**

a. Batteriofagi



b. Virus animale

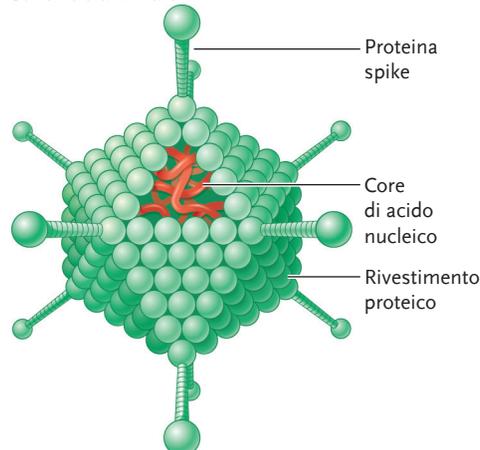


Figura 8.6

I virus. (a) Batteriofagi che iniettano il loro DNA in *E. coli*. (b) Virus animale. Una porzione del rivestimento proteico è stata eliminata per mostrare il core di acido nucleico. Le proteine spike sono proteine di riconoscimento che permettono alla particella virale di legare la superficie della cellula ospite.

rati, che possono entrare in una fase inattiva nella quale la cellula ospite replica e trasferisce il DNA del batteriofago attraverso le generazioni, prima che il fago diventi attivo e uccida l'ospite.

I batteriofagi virulenti di *E. coli*. Tra i batteriofagi virulenti che infettano *E. coli*, i **batteriofagi della serie T-pari**, T2, T4 e T6, sono quelli che sono stati di maggior utilità negli studi genetici (mostrato in Figura 8.6a). Il rivestimento di questi fagi è diviso in una *testa* e una *coda*. Impacchettata all'interno della testa c'è una molecola singola di DNA lineare. La coda, assemblata a partire da più proteine diverse, contiene proteine di riconoscimento alla sua estremità che possono legare la superficie della cellula ospite.

Come primo passaggio in un ciclo di infezione, un fago T-pari collide casualmente con la superficie di una cellula di *E. coli* e la coda si attacca alla parete della cellula (**Figura 8.7**, passaggio 1). La coda quindi si contrae e inietta il DNA del fago attraverso la parete della cellula e la membrana plasmatica nel citoplasma (passaggio 2). Le proteine dell'involucro rimangono all'esterno. Durante il suo ciclo vitale all'interno della cellula batterica, il fago utilizza il macchinario della cellula ospite per esprimere i suoi geni. Una delle proteine prodotte nella fase precoce dell'infezione è un enzima che degrada il cromosoma del batterio. Sempre nella fase precoce dell'infezione, viene espresso il gene del fago codificante per una DNA polimerasi che replica il suo cromosoma; così ha inizio la replicazione del DNA del fago, che dà origine a 100-200 nuove molecole di DNA virale (passaggio 3). A tempi tardivi dell'infezione, l'apparato dell'ospite trascrive gli altri geni del fago e traduce gli mRNA corrispondenti, sintetizzando le proteine dell'involucro virale (passaggio 4). Mentre si assemblano le proteine della testa e della coda, il DNA virale viene incluso nelle teste (passaggio 5).

Quando l'assemblaggio dei virus è completo, un ultimo enzima, codificato dal DNA virale, lisa la cellula. La rottura rilascia le particelle virali nel mezzo circostante; la progenie fagica può quindi infettare le cellule di *E. coli* che incontra (passaggio 6).

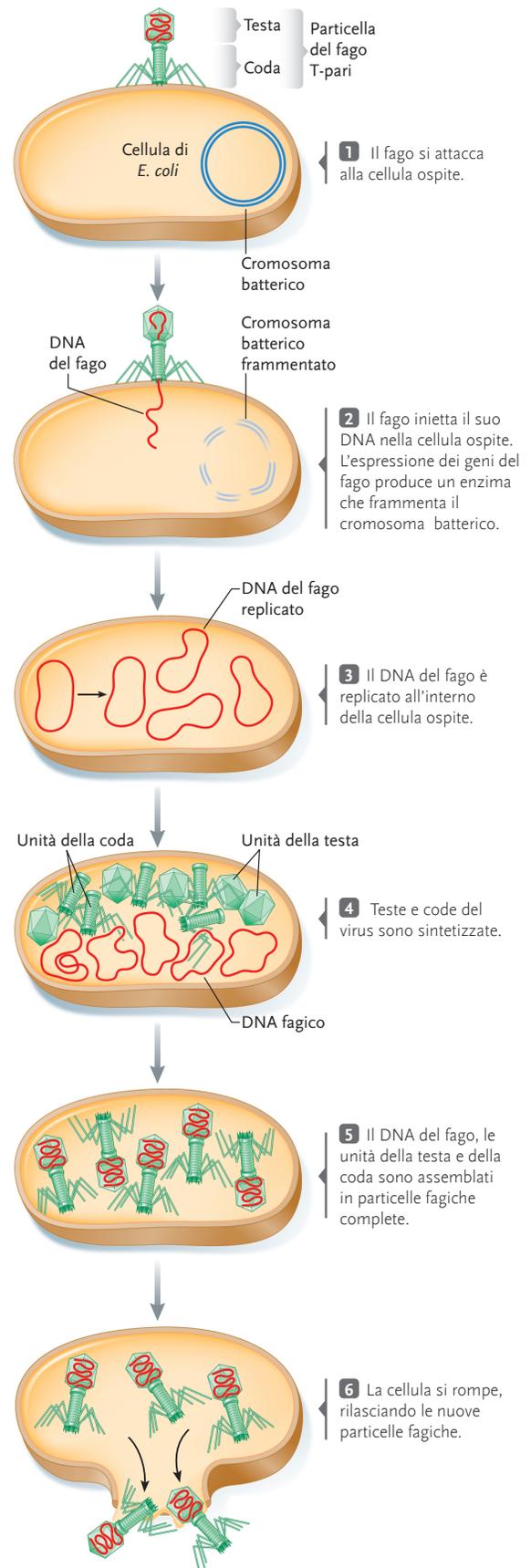


Figura 8.7
Ciclo infettivo di un batteriofago T-pari, un esempio di fago virulento.

Questa intera serie di eventi, dall'infezione di una cellula fino al rilascio della progenie del fago attraverso la cellula lisata, viene chiamata **ciclo litico**.

Per alcuni fagi virulenti (ma non i fagi T-pari) i frammenti del DNA dell'ospite possono essere incorporati nelle teste durante l'assemblaggio della particella virale, fornendo le basi della trasduzione dei geni batterici durante il successivo ciclo di infezione. Poiché i geni sono incorporati in modo casuale sostanzialmente da qualsiasi frammento di DNA, il trasferimento genico tramite questo meccanismo viene chiamato **trasduzione generalizzata**.

Uno dei batteriofagi temperati di *E. coli* preferiti dai ricercatori, il batteriofago lambda (λ). Il ciclo infettivo del batteriofago *lambda*, un batteriofago di *E. coli* molto usato nella ricerca,

è quello tipico di un batteriofago temperato. Il fago lambda infetta *E. coli* in modo molto simile ai fagi T-pari ed inietta il suo DNA cromosomico lineare nel batterio (**Figura 8.8**, passaggio 1). Una volta all'interno, il cromosoma lineare circolarizza e quindi segue una delle due possibili vie di propagazione. Regolatori molecolari sofisticati controllano quale dei due cicli verrà effettuato in seguito all'infezione.

Una via è il ciclo litico, che è in tutto simile al ciclo litico dei fagi virulenti. Il ciclo litico comincia con i passaggi 1 e 2 (infezione) e quindi procede direttamente al passaggio 7, di qui fino al 9 (produzione e rilascio di progenie virale) e quindi ritorna al passaggio 1.

La seconda via, più comunemente seguita, è il **ciclo lisogenico**. Questo ciclo comincia quando il cromosoma circolare di lambda si integra nel

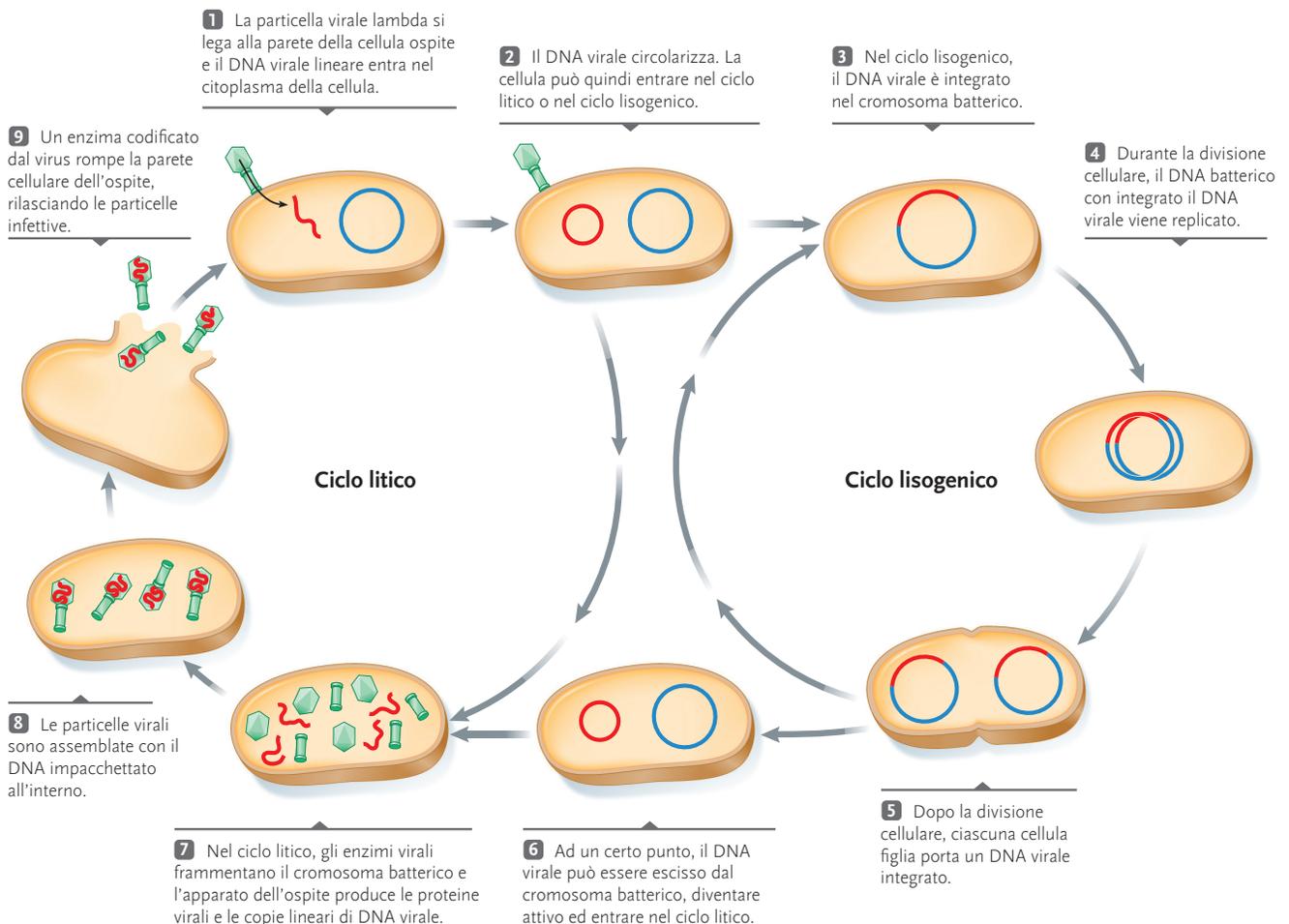


Figura 8.8

Il ciclo infettivo di lambda, un esempio di fago temperato, che può effettuare il ciclo litico o il ciclo lisogenico.



DNA della cellula ospite per crossing-over (Figura 8.8, passaggio 3). Il DNA di un fago temperato tipicamente si inserisce in uno o più dei possibili siti specifici nel cromosoma batterico, grazie all'azione di un enzima codificato dal fago che riconosce sequenze definite nel DNA dell'ospite. Nel caso di lambda, c'è un solo sito di integrazione nel cromosoma di *E. coli*. I geni di lambda, quando integrato, sono per lo più inattivi; pertanto, in questa condizione nessuna componente del fago viene prodotta. Di conseguenza, il fago non ha effetto sulla cellula ospite e sui suoi discendenti. Il genoma del virus, quando inserito nel DNA della cellula ospite, è chiamato **profago**. Nello stato integrato, il DNA virale è replicato e trasmesso nel corso delle divisioni insieme al DNA della cellula ospite (passaggi 4 e 5).

In risposta a certi segnali ambientali, come ad esempio l'irraggiamento con UV, il profago lambda diventa attivo ed entra nel ciclo litico. I geni che erano inattivi nel profago vengono trascritti e fra le prime proteine virali sintetizzate in risposta al segnale ambientale ci sono enzimi che escindono il cromosoma di lambda dal cromosoma dell'ospite (passaggio 6). L'escissione avviene attraverso un processo di crossing-over che reverte il passaggio d'integrazione. Il risultato è un cromosoma di lambda circolare, la cui replicazione dà origine a molte

copie di cromosoma di lambda in forma lineare. L'espressione dei geni di questi cromosomi genera le proteine del rivestimento, che si assemblano col cromosoma a produrre le particelle virali (passaggi 7 e 8). Questo stadio attivo culmina con la lisi della cellula ospite, il rilascio delle particelle virali infettive (passaggio 9) e l'inizio di un nuovo ciclo (passaggio 1).

A volte l'escissione del cromosoma di lambda dal DNA di *E. coli* non è precisa e dà luogo all'inclusione di uno o più geni della cellula ospite. Questi geni sono replicati con il DNA virale e impacchettati nei rivestimenti e possono essere portati in un'altra cellula nel corso di un nuovo ciclo di infezione. Chiaramente, solo geni che siano adiacenti al sito di integrazione del fago temperato possono essere escissi insieme al DNA virale e andare incontro a trasduzione. Per tale motivo, questo meccanismo di trasferimento genico è chiamato **trasduzione specializzata**.

INTERVALLO

Qual è la differenza tra un fago virulento ed uno temperato?

Riepilogo

8.1 Trasferimento genico e ricombinazione genetica nei batteri

- I tempi rapidi di generazione e l'ampia progenie di virus e batteri rendono possibile seguire gli scambi genetici e i loro effetti in tempi molto più rapidi di quanto si possa fare negli eucarioti. Queste proprietà permettono di individuare eventi genetici rari. I risultati di questi scambi mostrano che la ricombinazione può avvenire all'interno dei limiti di un gene così come tra due geni.
- La ricombinazione avviene sia nei batteri che negli eucarioti attraverso lo scambio di frammenti tra molecole di DNA omologhe. Nei batteri, il DNA di un cromosoma batterico può ricombinare con il DNA portato nella cellula dall'esterno.

- Tre meccanismi primari introducono DNA nelle cellule batteriche dall'esterno: coniugazione, trasformazione e trasduzione.
- Nella coniugazione, che è la base della riproduzione sessuata dei batteri, due cellule batteriche formano un ponte citoplasmatico e parte o tutto il DNA di una cellula trasloca nell'altra attraverso di esso. Il DNA donato può quindi ricombinare con sequenze omologhe nel DNA della cellula ricevente (Figure 8.1, 8.2 e 8.4).
- I batteri *E. coli* che sono capaci di agire come donatori nella coniugazione portano un plasmide F e sono designati con F⁺; i batteri riceventi non hanno un plasmide F e sono indicati come F⁻. Nei ceppi Hfr di *E. coli*, il plasmide F è inserito nel cromosoma principale. Come risultato, i geni del cromosoma batterico sono spesso trasferiti in cellule F⁻ insieme ad una porzione del DNA del plasmide F. I ricercatori hanno mappato i geni sul cromosoma di *E. coli* osservandone l'ordine di trasferimento da cellule Hfr a cellule F⁻ nel corso della coniugazione (Figura 8.4).

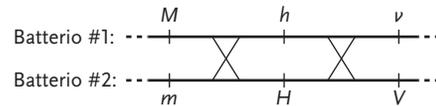
- Nella trasformazione, cellule batteriche intatte assumono pezzi di DNA rilasciati da cellule che si sono disintegrate. I frammenti di DNA entranti possono ricombinare con il DNA della cellula ricevente.
- Nella trasduzione, il DNA è trasferito da una cellula all'altra da virus infettanti.

8.2 I virus e la ricombinazione virale

- Quando in forma libera, un virus consiste in un core di acido nucleico, DNA o RNA, circondato da un rivestimento proteico (Figura 8.6).
- Il ciclo d'infezione di un virus comincia quando la molecola di acido nucleico virale è introdotta nella cellula ospite e replicata. Le proteine di rivestimento del virus sono prodotte e assemblate con il DNA in nuove particelle virali (Figura 8.7).
- I batteriofagi virulenti uccidono la cellula ospite, grazie alla sintesi di un enzima che rompe la membrana plasmatica e la parete cellulare, rilasciando le nuove particelle virali (Figura 8.7).
- I fagi temperati non uccidono sempre la cellula ospite. Essi possono entrare nel ciclo litico, nel quale il DNA virale diventa attivo, si escinde dal DNA dell'ospite e comincia a replicarsi, o nel ciclo lisogenico. Nel ciclo lisogenico, il DNA del fago è integrato nel DNA della cellula ospite, dove può rimanere per molte generazioni. Ad un certo punto, il virus può entrare nel ciclo litico e cominciare a replicarsi. Prodotti i rivestimenti virali, il DNA è assemblato nelle nuove particelle fagiche, che sono rilasciate alla rottura della cellula (Figura 8.8).
- Durante un ciclo d'infezione virale con fagi particolari, uno o più frammenti di DNA della cellula ospite possono essere incorporati nelle particelle virali. Quando la cellula infettata si lisa, rilascia le particelle virali contenenti il DNA della cellula ospite. Queste particelle, che formano la base della trasduzione batterica, possono infettare una seconda cellula e introdurre il segmento di DNA batterico, che a questo punto può ricombinare con il DNA dell'ospite.

- c. usano batteri diploidi per il loro intero genoma, perché questi possono crescere su terreno minimo
- d. possono studiare solamente un tratto genetico in un evento singolo di ricombinazione
- e. possono misurare il passaggio di geni tra cellule durante coniugazione, trasduzione e trasformazione

2. Se è avvenuto crossing-over tra due genomi batterici, come illustrato nella figura, il risultato sarà:



- a. *MHv* e *mbV*
 - b. *MHV* e *mbv*
 - c. *Mbv* e *mHv*
 - d. *MHV* e *mbV*
 - e. *mbv* e *MbV*
3. Nella coniugazione, quando un fattore batterico F è trasferito:
 - a. la cellula donatrice diventa F⁻
 - b. la cellula ricevente diventa F⁺
 - c. la cellula ricevente diventa F⁻
 - d. la cellula donatrice diventa una cellula ricevente
 - e. il DNA virale si integra nel DNA della ricevente
 4. Quale delle seguenti affermazioni *non* è corretta per la coniugazione batterica?
 - a. Sia batteri Hfr che batteri F⁺ hanno la capacità di codificare il pilus sessuale
 - b. Dopo che una cellula F⁻ ha coniugato con una cellula F⁺, il suo plasmide contiene il fattore F
 - c. La cellula ricevente dopo la coniugazione in genere diventa Hfr
 - d. In un incrocio Hfr × F⁻, il DNA del cromosoma principale viene trasferito nella cellula ricevente
 - e. I geni del fattore F codificano proteine del pilus sessuale
 5. Quale delle seguenti affermazioni *non* è corretta per la trasformazione batterica?
 - a. La trasformazione artificiale è usata nelle procedure di clonaggio
 - b. Avery fu in grado di trasformare batteri vivi non infettivi con il DNA di batteri infettivi morti
 - c. La parete cellulare e la membrana plasmatica devono essere attraversate perché la trasformazione proceda
 - d. Un virus è richiesto per il processo
 - e. L'elettroporazione è una forma di trasformazione artificiale usata per introdurre DNA nelle cellule

Domande

Domande di autovalutazione

1. Quando studiano le differenze nei geni dei batteri, i ricercatori:
 - a. non crescono i batteri su terreno minimo, perché il terreno manca di nutrienti essenziali
 - b. usano un clone batterico, che è un gruppo di cellule costituito da batteri differenti con diverso contenuto genetico



6. La trasduzione:
 - a. può permettere la ricombinazione di DNA appena introdotto con il DNA della cellula ospite
 - b. è il movimento di DNA da una cellula batterica ad un'altra per mezzo di un plasmide
 - c. può causare il cambiamento del DNA della cellula donatrice ma non quello del DNA della ricevente
 - d. è il movimento di DNA virale ma non di DNA batterico in un batterio ricevente
 - e. richiede il contatto fisico tra due batteri
7. I virus:
 - a. hanno un core proteico
 - b. hanno un rivestimento di acido nucleico
 - c. che infettano un batterio sono chiamati batteriofagi
 - d. furono probabilmente la prima forma di vita sulla Terra
 - e. se temperati, uccidono la cellula ospite
8. Un virus nel suo ciclo lisogenico:
 - a. lisa la cellula ospite
 - b. trasduce una cellula batterica
 - c. assembla particelle virali per la rottura della cellula
 - d. danneggia la cellula ospite
 - e. ha il genoma integrato del DNA dell'ospite

Domande per una discussione

1. Ipotizza di mettere in piedi un esperimento come quello effettuato da Lederberg e Tatum, mischiando milioni di cellule di *E. coli* di due ceppi con la seguente costituzione genetica:

Ceppo 1: $bio^- \quad met^- \quad thr^+ \quad leu^+$

Ceppo 2: $bio^+ \quad met^+ \quad thr^- \quad leu^-$

Tra i batteri ottenuti dopo il mescolamento, si trovano alcune cellule che non richiedono treonina, leucina o biotina per crescere, ma richiedono ancora metionina. Come potresti spiegare questo risultato?

2. Come controllo dei loro esperimenti di ricombinazione batterica, Lederberg e Tatum piastrarono cellule di tipo parentale, di ceppo 1 e ceppo 2, sulla superficie di un terreno minimo. Se effettuando questo controllo compaiono alcune colonie sparse, cosa potresti proporre come spiegazione? Come metteresti alla prova la tua spiegazione?

Analisi sperimentale

Hai una coltura di cellule di *E. coli* Hfr che non possono produrre biotina da sé. Aggiungi a questa coltura alcune cellule selvatiche di *E. coli* che sono state uccise al calore e quindi sottoponi la coltura ad elettroporazione. Dopo l'aggiunta, trovi che alcune cellule possono crescere su terreno minimo. Come puoi stabilire se l'allele delle cellule selvatiche *bio*⁺ sia stato inserito nel plasmide o nel DNA cromosomico delle cellule Hfr?

Un richiamo all'evoluzione

I virus sono derivati evolutivamente da organismi complessi che possono riprodursi o sono resti di una vita precellulare? Discuti la tua opinione.

Peter J. Russell • Stephen L. Wolfe • Paul E. Hertz
Cecie Starr • Beverly McMillan

Genetica Agraria

Accedi all'ebook e ai contenuti digitali > Espandi le tue risorse > con un libro che **non pesa** e si **adatta** alle dimensioni del tuo **lettore**



All'interno del volume il **codice personale** e le istruzioni per accedere alla versione **ebook** del testo e agli ulteriori servizi. L'accesso alle risorse digitali è **gratuito** ma limitato a **18 mesi dalla attivazione del servizio**.

