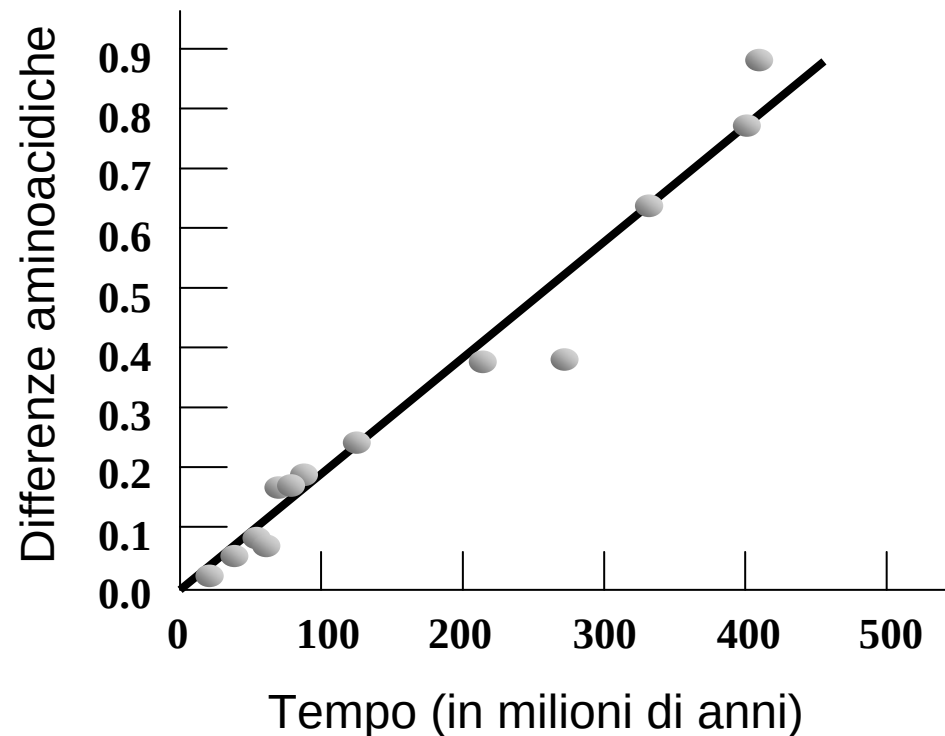


L'OROLOGIO MOLECOLARE

L'idea di datare gli eventi evolutivi attraverso le differenze calibrate fra le proteine fu espressa per la prima volta nel 1965 da Zuckerkandl and Pauling.

Da osservazioni fatte su differenti globine, questi autori postularono che la differenza genetica tra due specie diverse, espressa dalla sequenza aminoacidica, è funzione del tempo di divergenza dall'antenato comune.

La dimostrazione di questa affermazione fu fatta confrontando le sequenze proteiche e, quindi, i tassi di sostituzione aminoacidica, di diverse specie con i tempi di divergenza stimati sulla base dei fossili.



Secondo l'ipotesi dell'orologio molecolare, quindi, i geni e i prodotti genici evolvono con tassi che sono *approssimativamente costanti* nel tempo e lungo le differenti linee evolutive.

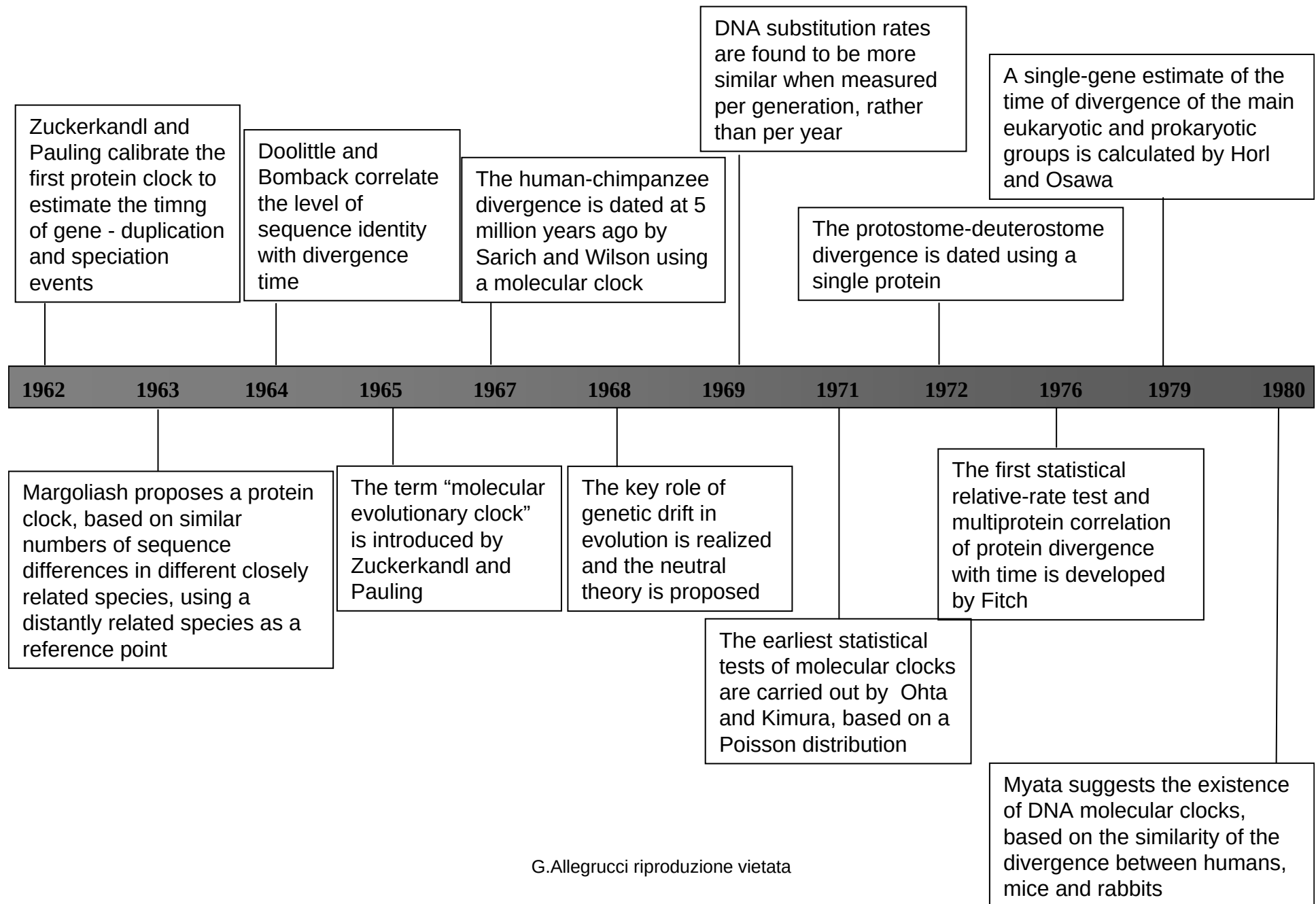
Perciò, se la divergenza genetica si accumula in modo regolare con il passare del tempo, allora è possibile dedurre i tempi di divergenza anche in assenza di evidenze fossili.

La validità dell'ipotesi di un orologio molecolare universale è stata subito molto discussa.

Mayr nel 1965 affermò:

"evolution is too complex and too variable a process, connected too many factors, for the time dependence of the evolutionary process at the molecular level to be a simple function"

Inizialmente ci si riferì ad un orologio molecolare proteico, dal momento che negli anni 60, i dati sul DNA erano ancora troppo scarsi, ed intenso fu il dibattito fino agli anni 80.



G.Allegrucci riproduzione vietata

Fin dal 1971 è stato chiaro che proteine diverse evolvono con tassi ampiamente diversi, per es., i fibrinopeptidi evolvono molto più rapidamente del citocromo c.

Di conseguenza venne esclusa la possibilità di osservare un *orologio proteico universale*.

Test statistici condotti da Ohta e Kimura (1971), da Fitch (1976) da Gillespie e Langley (1979) hanno restituito risultati contrastanti, suggerendo che l'ipotesi dell'orologio molecolare proteico deve essere rifiutata per la maggior parte delle proteine sia nei confronti fra vertebrati che fra invertebrati.

Rappresenta, comunque, un mezzo molto utile per stimare i tempi evolutivi e per capire i processi e i meccanismi dell'evoluzione.

Inoltre, bisogna osservare che le differenze nei tassi di evoluzione fra le proteine sono, comunque, immensamente più piccole di quelle nei tassi di cambiamento morfologico

Fino agli anni 80 molti studi di genetica di popolazione e/o filogenesi sono stati eseguiti utilizzando come marcatori molecolari gli allozimi.

Molti sono stati gli studi che si sono avvalsi della relazione descritta da Nei fra la distanza genetica, a livello degli allozimi, e il tempo di divergenza, ovvero

$$t = 5 \times 10^6 D$$

Sulla base di questa relazione molti autori hanno cercato di datare gli eventi cladogenetici all'interno di molti gruppi animali e vegetali.

I tempi di divergenza ottenuti venivano poi confrontati con lo scenario paleogeografico e con gli eventi geologici per capire i meccanismi e i processi evolutivi.

Un esempio riguarda il differenziamento genetico, a livello degli allozimi, fra due specie di *Dolichopoda* (Orthoptera, Raphidophoridae): *D.baccettii* e *D.aegilion*, l'una endemica del Monte Argentario e l'altra dell'isola del Giglio. La distanza genetica fra queste due specie corrisponde a un tempo di divergenza di 850.000 anni.

Questo valore ricade completamente nell'intervallo di tempo in cui sarebbe avvenuta la separazione dell'isola del Giglio dal continente, suggerendo che il differenziamento delle due specie è dovuto ad un processo di vicarianza piuttosto che di dispersione (Allegrucci et al., 1982).

La separazione dell'Isola del Giglio dal continente è avvenuta durante una trasgressione marina avvenuta nell'interglaciale Gunz-Mindel e può essere datata a 0.700 - 1.000 milioni di anni fa (Lipparini, 1976; Mazzanti, 1983).



G.Allegrucci riproduzione vietata

A partire dai primi anni 80, lo sviluppo delle tecniche molecolari, ha permesso il sequenziamento di molti geni di cui erano già state analizzate le sequenze proteiche.

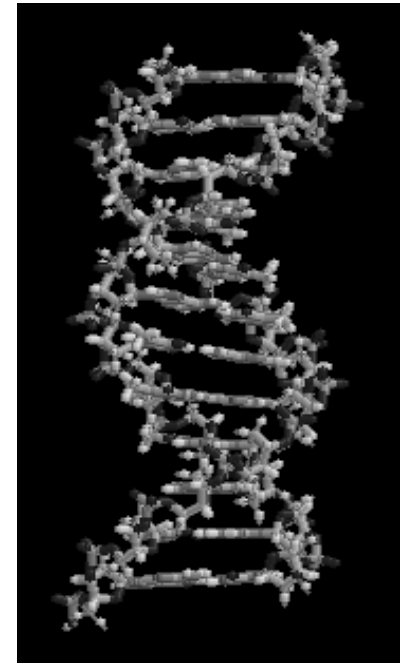
L'idea dell'orologio molecolare fu quindi applicata anche al DNA.

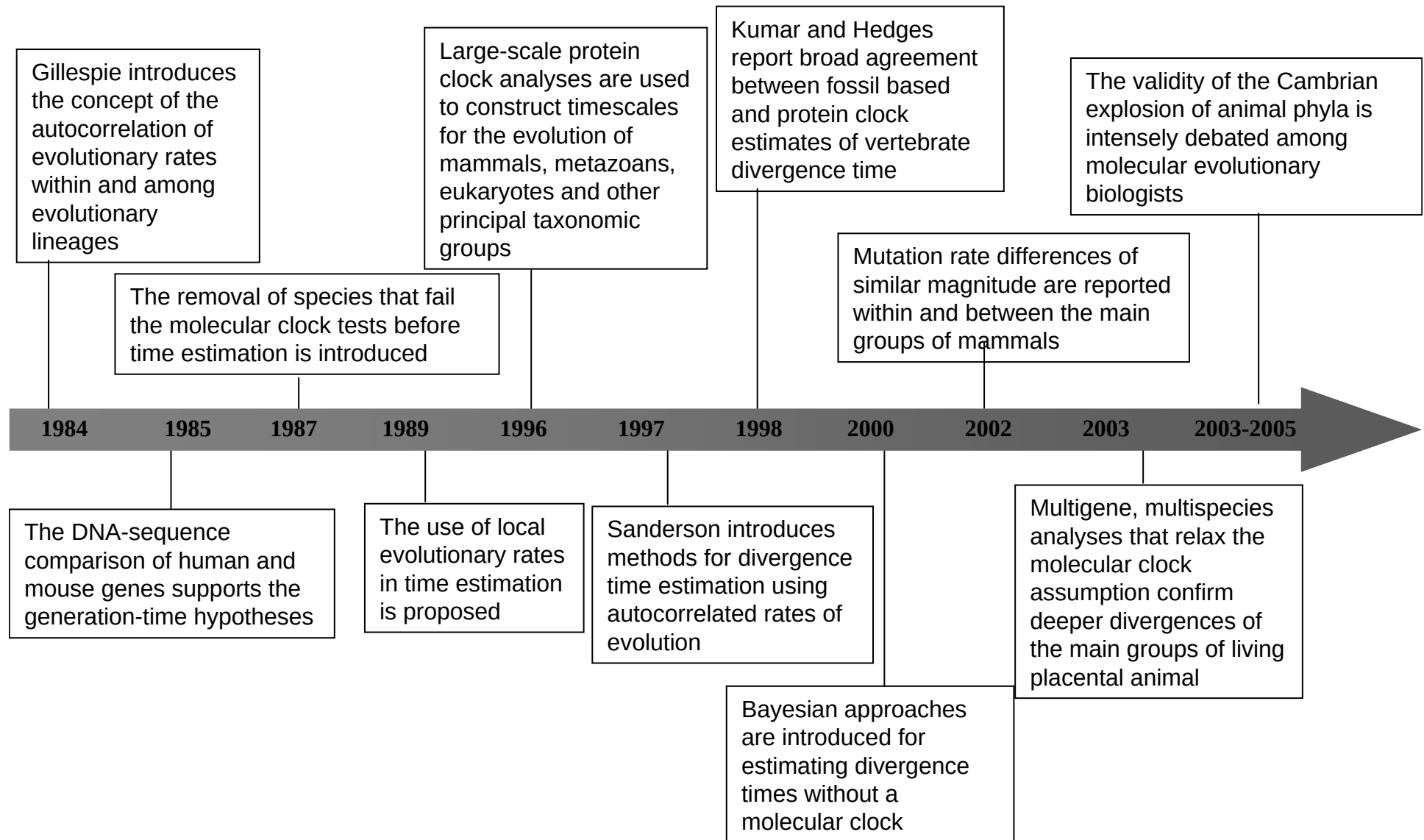
Nel 1980 Miyata et al. hanno ottenuto un tasso di mutazione molto simile fra i diversi gruppi di mammiferi.

Mentre Bonner et al. hanno riscontrato un tasso significativamente più basso nei primati malgasci rispetto a tutti gli altri primati.

Wu e Li hanno dimostrato differenze significative fra l'uomo e i roditori.

Tali differenze furono attribuite al tempo di generazione, alla diversa efficienza nei meccanismi di riparazione del DNA, al differente tasso metabolico.



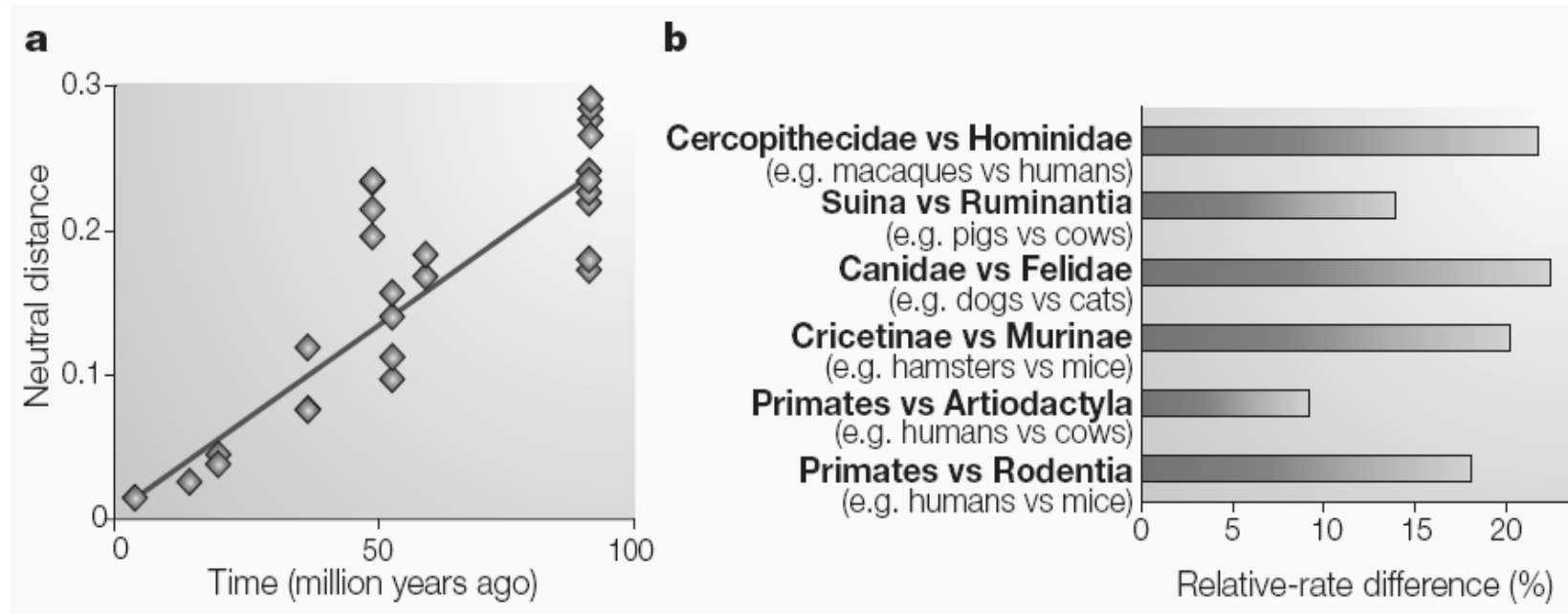


G.Allegrucci riproduzione vietata

Con l'avvento della PCR (reazione a catena della polimerasi), a partire dal 1985, i dati di sequenza sono aumentati enormemente ed è stato possibile confrontare gruppi consistenti di organismi.

Sono stati proposti diversi orologi molecolari "*universal*", come l'orologio mtDNA, secondo cui il DNA mitocondriale animale evolve con un tasso di divergenza pari al 2% per sequenza per milione di anni.

Nel 2002 Kumar e Subramanian hanno potuto caratterizzare le differenze nel tasso di mutazione all'interno e fra i principali gruppi di mammiferi.



E' chiaro, quindi che il tasso di mutazione in differenti gruppi di mammiferi è piuttosto diverso

G.Allegrucci riproduzione vietata

Nella seconda metà degli anni 90, la rapida crescita di dati di sequenza ha permesso la stima dei tempi di divergenza agli alti livelli tassonomici.

In particolare:

- Doolittle et al.(1996) e Feng et al.(1997) riportano i tempi di divergenza dei principali gruppi di eucarioti e procarioti;
- Wray et al.(1996) hanno datato il differenziamento dei Metazoi
- Hedges et al.(1996) e Kumar e Hedges (1998) hanno proposto una scala di tempo per l'evoluzione di vertebrati

I risultati di questi studi hanno restituito stime dei tempi di divergenza circa doppie rispetto a quelle ricavate dai fossili, ponendo le principali radiazioni adattative dei mammiferi, al confine tra il Cretaceo e il Terziario (65 milioni di anni fa) e quelle degli altri phyla, all'inizio del Cambriano (500-600 milioni di anni fa).

Tali differenze sono state spiegate pensando che i reperti fossili ci restituiscono le stime minime di divergenza. Il dibattito è, comunque molto acceso, anche perché, in altri casi le stime ricavate dalle due differenti fonti coincidono.

La validità delle assunzioni riguardanti gli orologi molecolari viene discussa ogni volta che le stime provenienti dai fossili e dai dati molecolari non sono in accordo.

Le discussioni riguardano anche le metodologie usate per testare l'esistenza di un orologio molecolare universale.

Nel 2000 Bromhan ha criticato i test dell'orologio molecolare, sostenendo che spesso hanno un basso potere nel rifiutare l'ipotesi per le proteine e/o i geni che non presentano tassi di sostituzione costanti. Ciò avviene soprattutto quando la divergenza nelle sequenze fra specie diverse è piccola e, quindi, la mancanza di un numero sufficiente di sostituzioni non permette di testare statisticamente l'ipotesi dell'orologio molecolare.

In questo scenario di continui dibattiti, fu quindi abbandonata l'idea di un orologio universale e si cominciò a pensare agli orologi molecolari *tassonomicamente "locali"*, ovvero che possono essere trovati in particolari geni e in taxa strettamente affini.

Gli orologi molecolari locali sono più probabili degli universali in quanto le principali fonti di eterogeneità fra linee sono rappresentate da differenze

- nella dimensione di popolazione
- nel tasso metabolico
- nel tempo di generazione
- nell'efficienza di riparazione del DNA

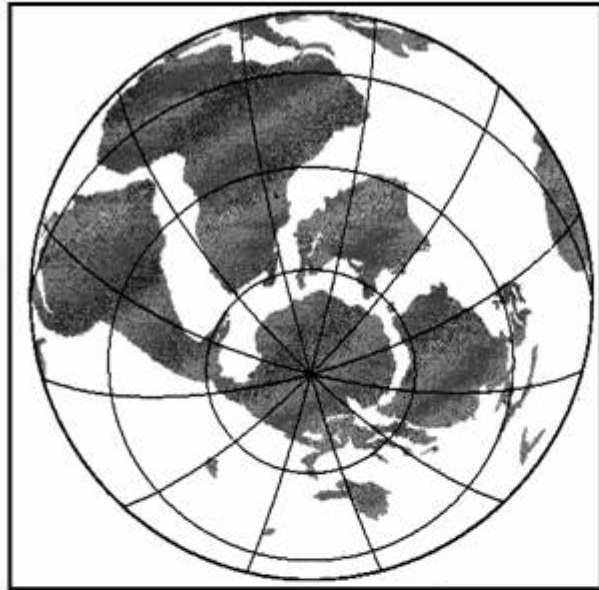
Ci si aspetta che questi parametri siano più simili fra taxa affini che quindi potranno presentare tassi di evoluzione molecolare piuttosto simili

Per ottenere stime accurate dei tempi di divergenza è quindi necessario che i tassi di sostituzione siano omogenei fra le diverse linee evolutive.

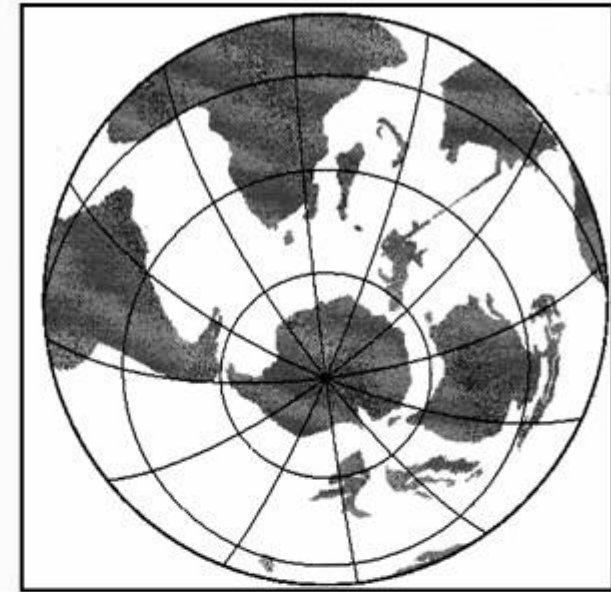
La calibrazione dell' orologio molecolare rappresenta un altro problema. Normalmente si utilizzano le datazioni ricavate dai reperti fossili per un particolare evento di speciazione o le datazioni di particolari eventi biogeografici.

Queste date devono essere scelte con molta attenzione per non influenzare l'accuratezza dell'orologio molecolare.

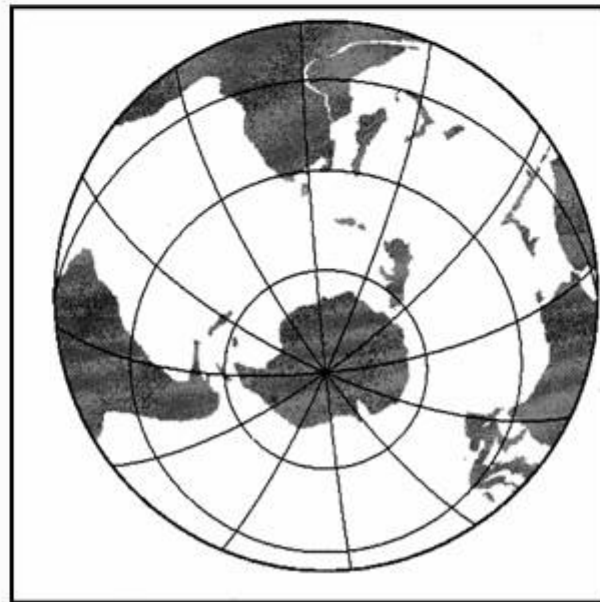
Plate Tectonics Maps



100 Myr



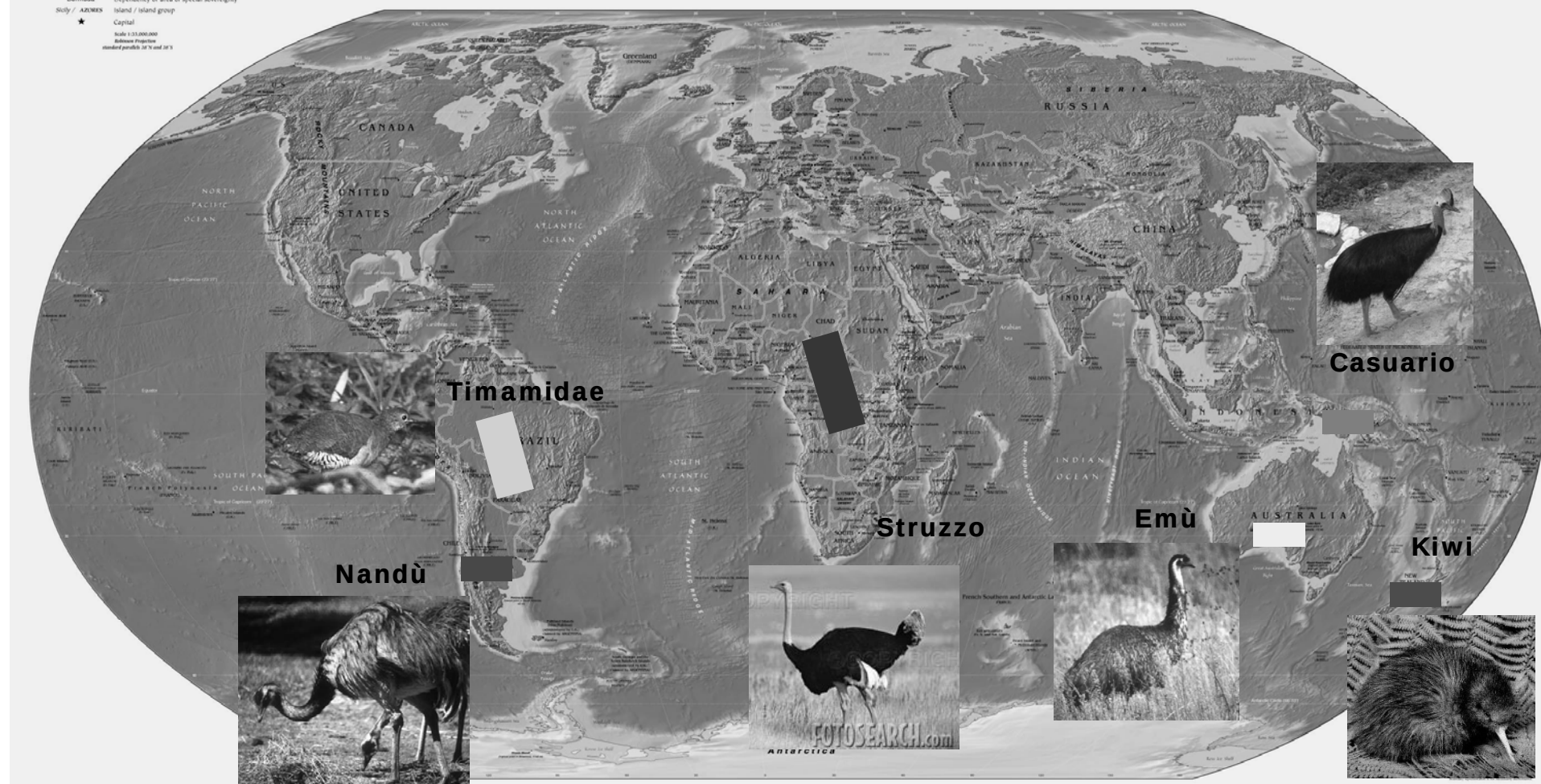
50 Myr



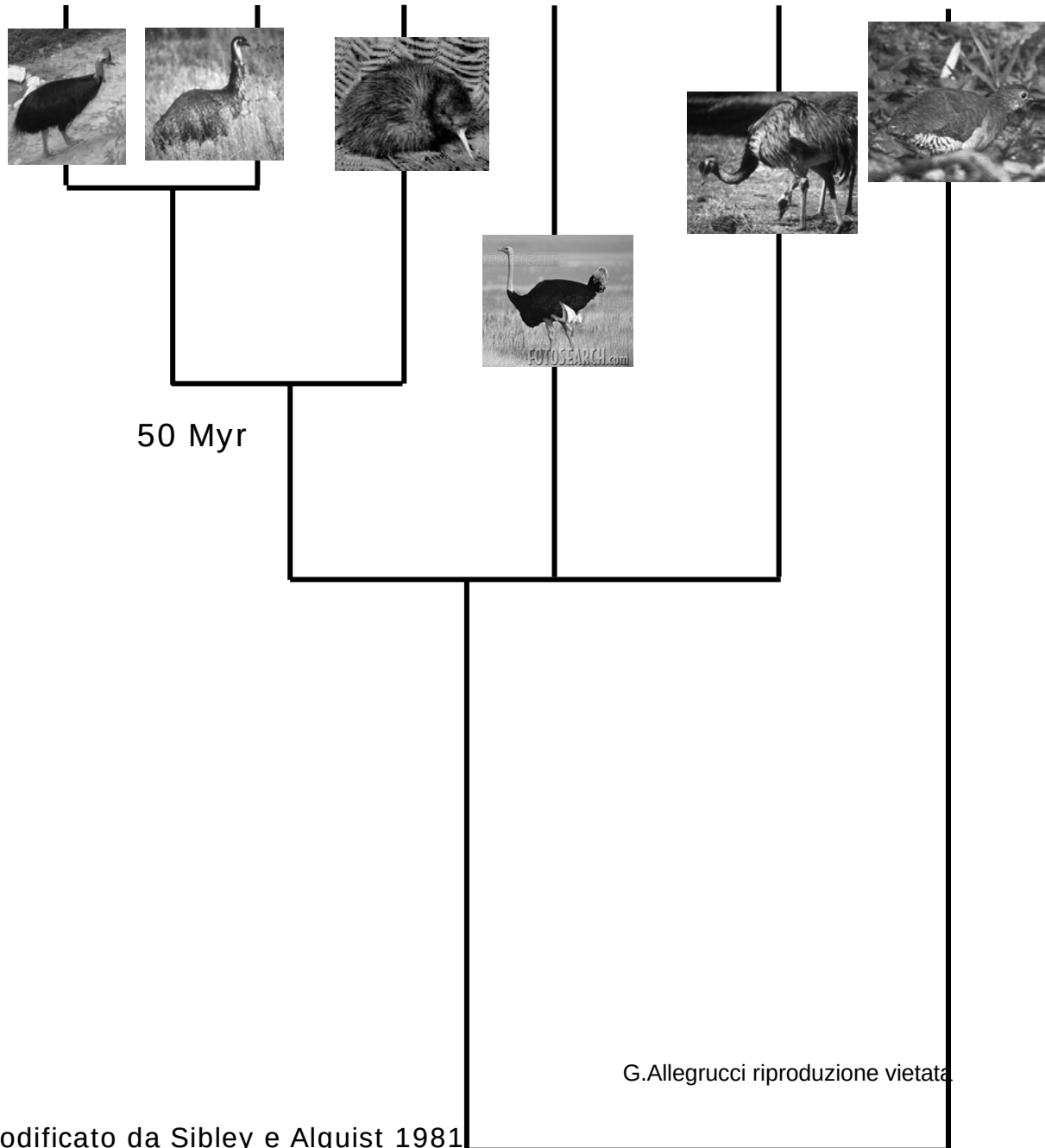
25 Myr

Physical Map of the World, April 2001

AUSTRALIA
Bermuda
Sicily / AZORES
★ Capital
Scale 1:15,000,000
Reference: Equator
standard parallel 36° N and 36° S



Casuario Emù Kiwi Struzzo Nandù Tinamidi

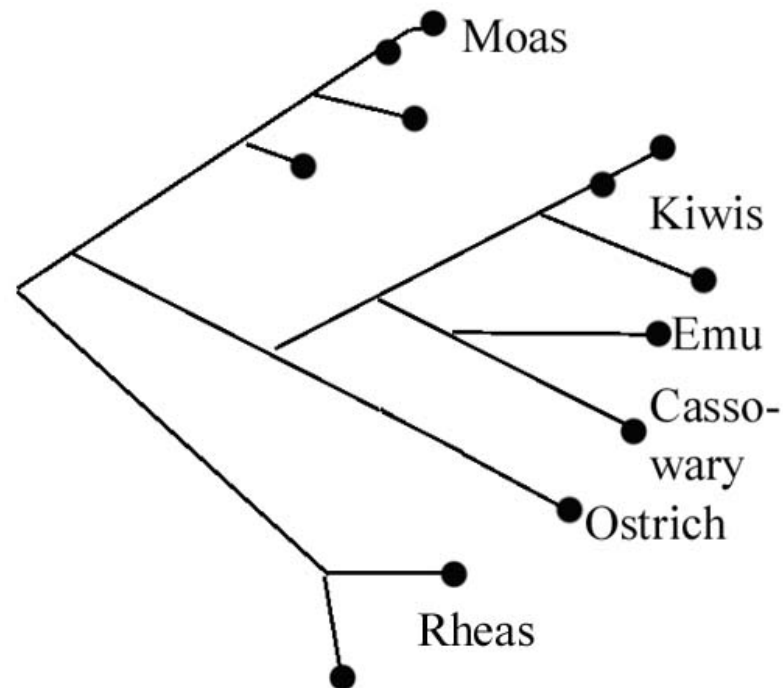


I primi tentativi di datare la divergenza in questo gruppo di specie risalgono agli anni ottanta, quando Sibley e Alquist, studiarono il differenziamento fra queste specie utilizzando la tecnica dell'ibridazione DNA-DNA. Gli autori calibrarono l'orologio molecolare con la data di separazione tra Africa e sud America, risalente al Cretaceo superiore, ovvero 80 milioni di anni fa. Ottennero, quindi un tempo di divergenza fra ratiti australiani e neo-zelandesi pari a 50 milioni di anni fa. Questo risultato era in disaccordo con l'ipotesi di una separazione tra Australia e Nuova Zelanda coeva con quella fra America del sud e Africa.

G.Allegrucci riproduzione vietata

Modificato da Sibley e Alquist 1981

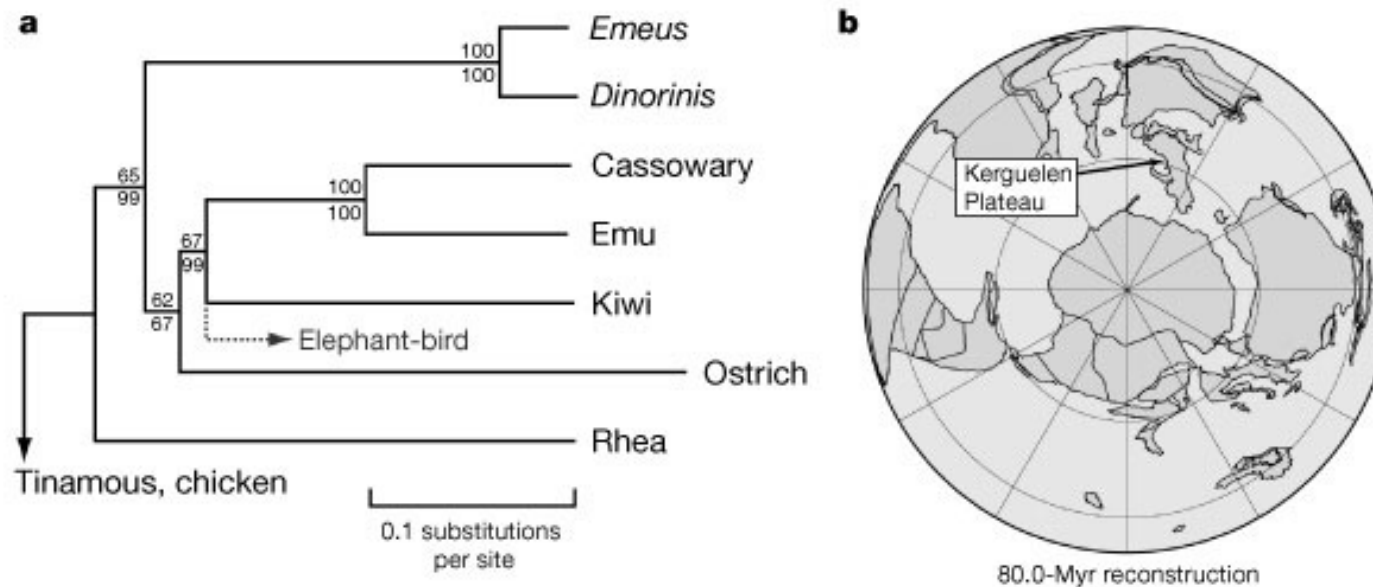
Nel 1992, Cooper *et al.* (PNAS 89:8741-8744) hanno sequenziato il 12SrDNA (parte dell'mtDNA) dei ratiti, comprendendo anche materiale subfossile delle moa giganti estinte. La filogenesi ottenuta mette in risalto una maggiore affinità dei kiwi della Nuova Zelanda con gli emù australiani e gli struzzi africani piuttosto che con le moa neozelandesi.



Moa, estinte presenti in Nuova Zelanda

Nel 2001, Cooper et al. (Nature 409: 704-707) sono riusciti a sequenziare l'intero genoma mitocondriale di due specie estinte di moa, *Emeus crassus* e *Dinornis giganteus*, dai resti sub-fossili vecchi 1330-1500 anni.

Gran parte del genoma mitocondriale è stato ottenuto anche da Emù, Casuari, Kiwi e da due generi di Tinamous (sister taxon alato dei ratiti).

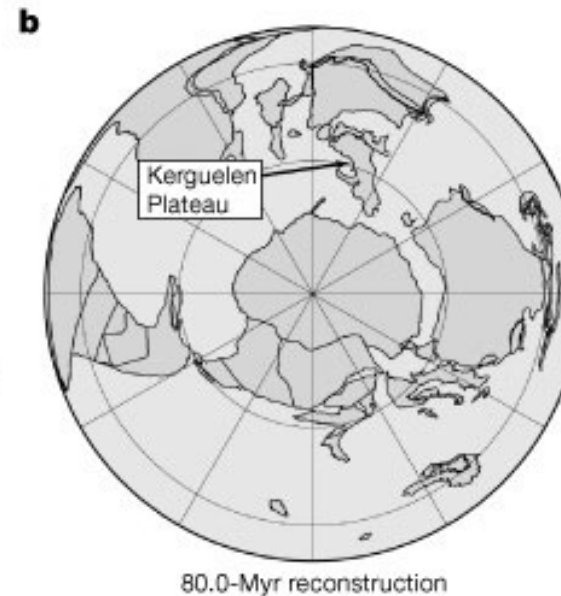
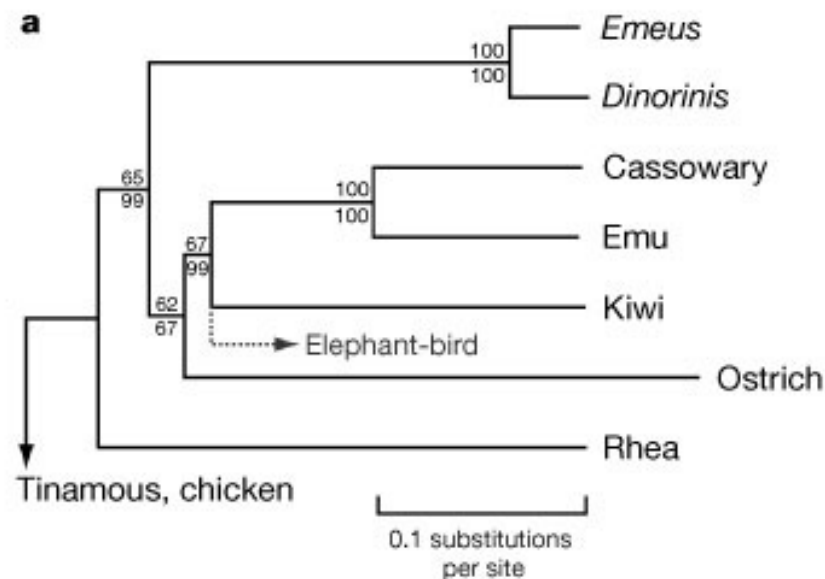


I test dell'ipotesi dell'orologio molecolare hanno indicato che l'evoluzione molecolare nei ratiti è avvenuta con tassi approssimativamente costanti. E' stato, perciò, possibile stimare i tempi di divergenza.

Dai reperti fossili e geologici:

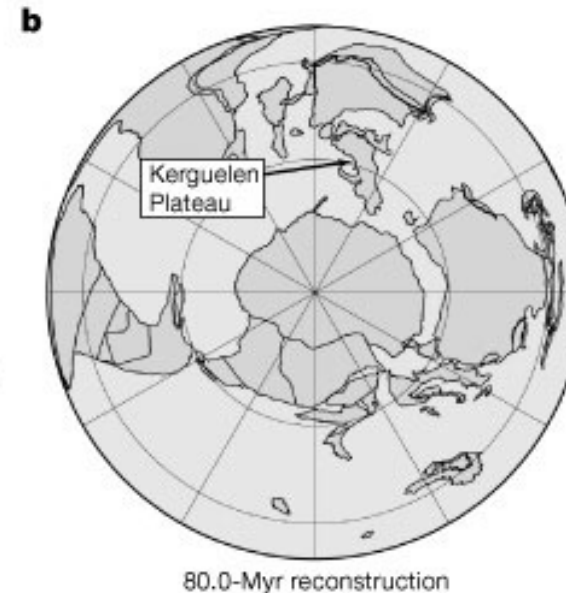
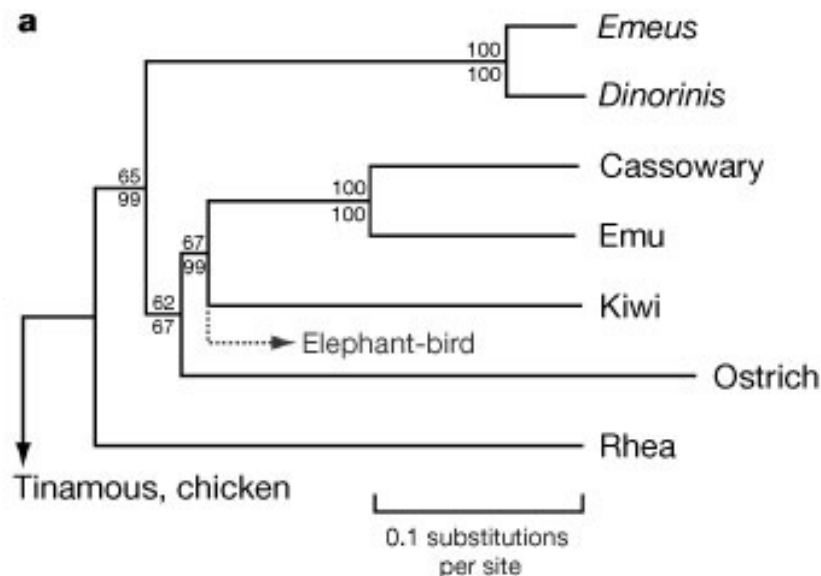
Emù-Casuari si sono diversificati almeno 25 e probabilmente 30-35 milioni di anni fa

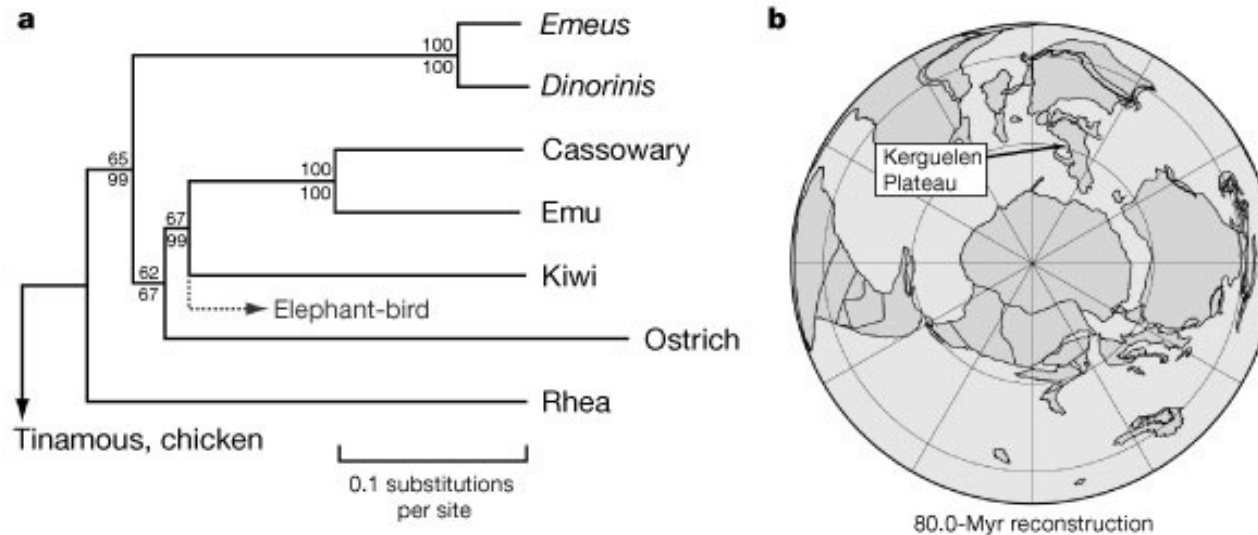
La Nuova Zelanda si è divisa dall'Australia + Antartide circa 82-85 milioni di anni fa.



Gli autori hanno calibrato l'orologio molecolare, utilizzando la separazione fra la Nuova Zelanda e l'Australia e hanno ottenuto un tempo di divergenza fra Emù e Casuari pari a circa 35 milioni di anni, stima che ben si adatta alle stime ottenute dai fossili.

Secondo questa calibrazione, i Kiwi si sono separati dai taxa australiani (Emù+Casuari) 68 milioni di anni fa, stima sostanzialmente in accordo con quella precedentemente ottenuta da Sibley e Alquist. Sembrerebbe quindi che il differenziamento dei kiwi sia successivo alla separazione dei continenti e alla diversificazione di Moa dalle altre linee australiane (Emu + Casuari + Kiwi).





Lo struzzo si è differenziato circa 75 milioni di anni fa e il nandù 89.

Perciò il quadro generale suggerisce che le principali linee corrispondono alla frammentazione del Gondwana.

I Kiwi, invece, si sarebbero diffusi dall'Australia alla Nuova Zelanda, attraverso un processo di dispersione, convalidando l'ipotesi della presenza di diversi arcipelaghi presenti tra i due territori e che avrebbero consentito la comunicazione fra di essi.

Recentemente sono stati sviluppati diversi metodi che "rilassano" le assunzioni dell'orologio molecolare quando si vanno a stimare i tempi di divergenza fra le specie.

Tali metodi permettono di modellare le variazioni nei tassi evolutivi fra le differenti linee, piuttosto che usare soltanto quei geni e quelle specie che passano i test di cambiamento costante.

Nel 1997 Sanderson ha utilizzato l'autocorrelazione dei tassi evolutivi per determinare automaticamente le differenze negli stessi fra le diverse linee evolutive.

In questo modo i tassi evolutivi possono variare da linea a linea. Si ottiene, quindi, un orologio "rilassato".

Per ottimizzare l'assegnazione del miglior tasso ad ogni linea, Sanderson ha proposto di minimizzare la differenza nel tasso evolutivo fra la linea ancestrale e quella discendente (penalized likelihood)

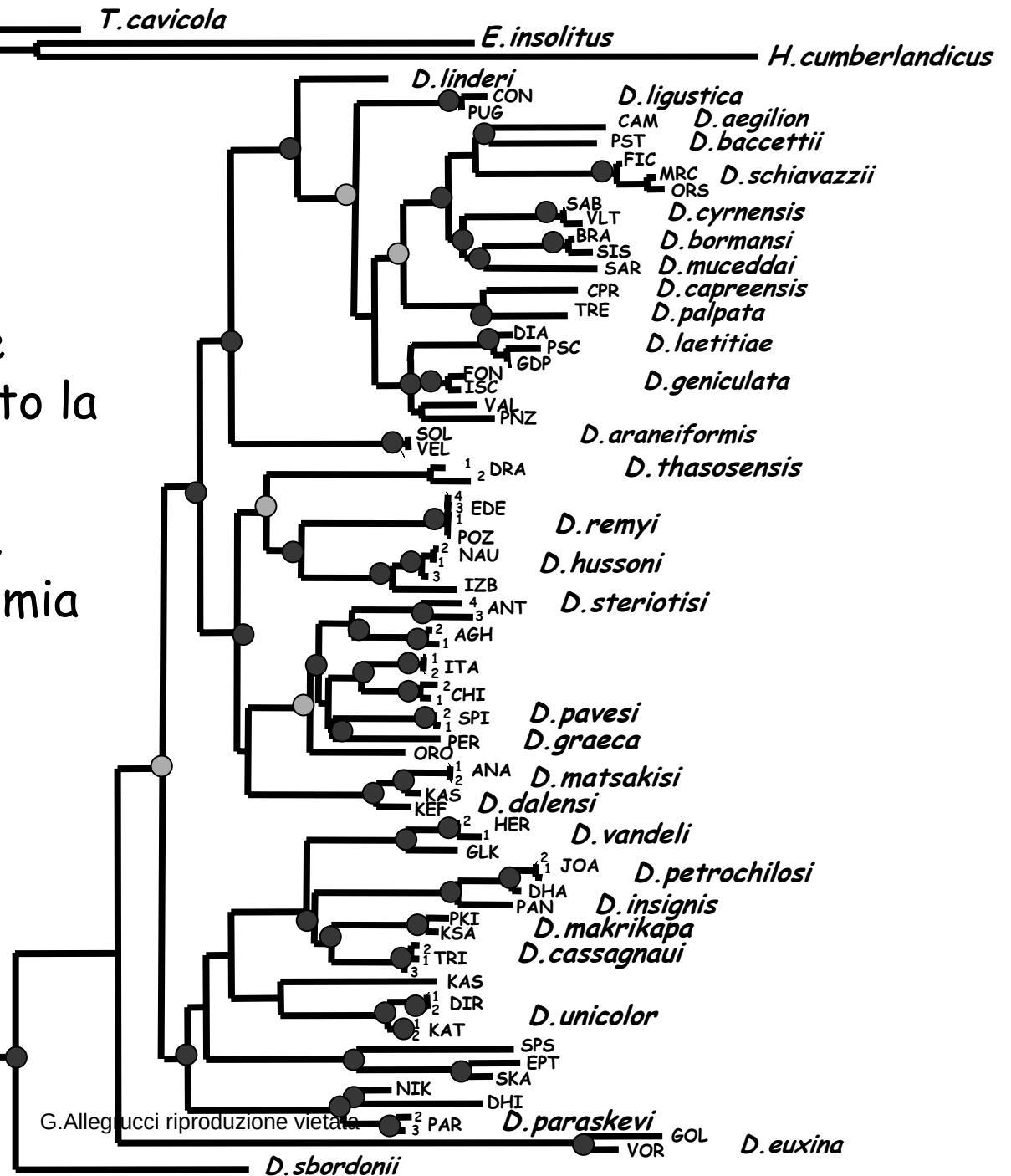
Nel 1998, Thorne et al., hanno proposto nuovi metodi per stimare la variazione dei tassi evolutivi fra le linee, utilizzando un ambiente Bayesiano che permette di incorporare nell'analisi i tempi minimo e massimo (ricavate dalle stime sui fossili e/o sulle datazione di eventi biogeografici) per la stima dei tempi di divergenza fra i taxa oggetto di studio.



Tutte le analisi (MP, ML e Bayesiana) hanno restituito la stessa topologia

La filogenesi molecolare è congruente con la tassonomia tradizionale e riflette un pattern filogeografico.

- 0.8 < P < 0.9
- 0.9 < P < 1.0

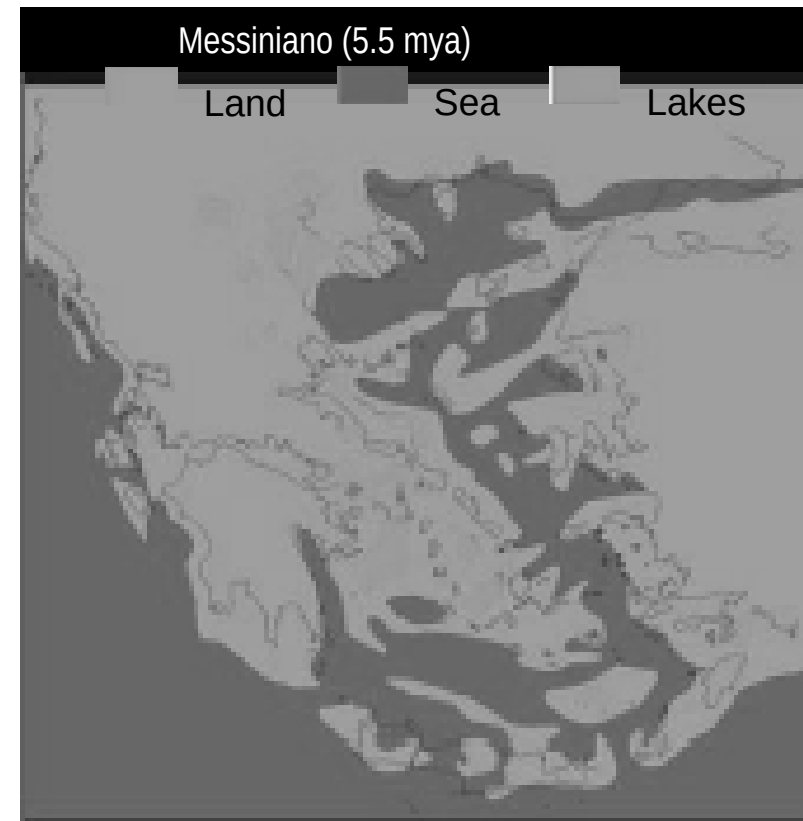


Test appropriati hanno indicato che i tassi di sostituzione, per ognuno dei geni analizzati, sono significativamente diversi nel gruppo di specie considerate.



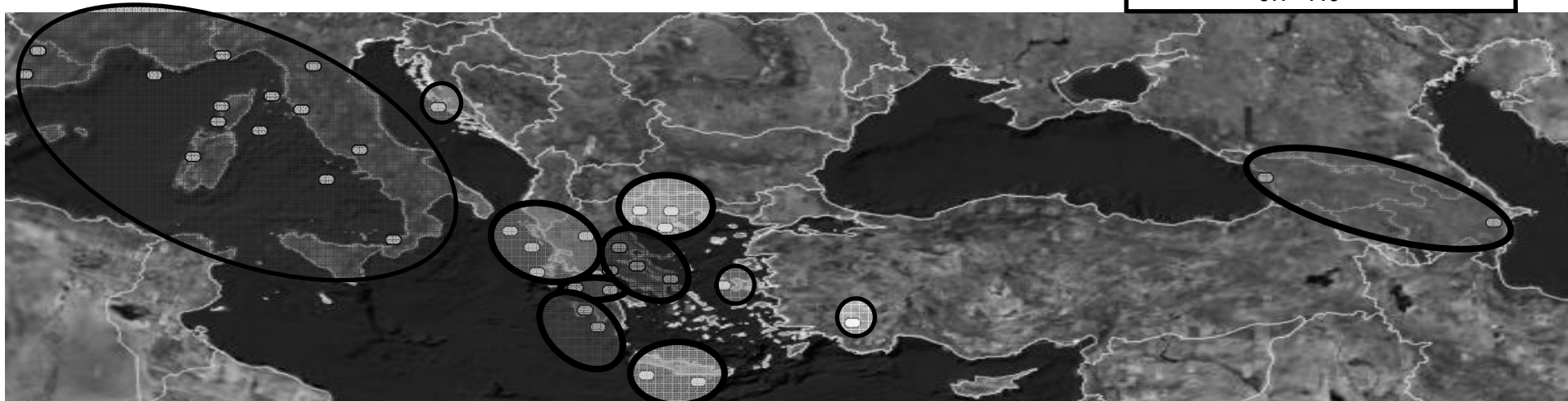
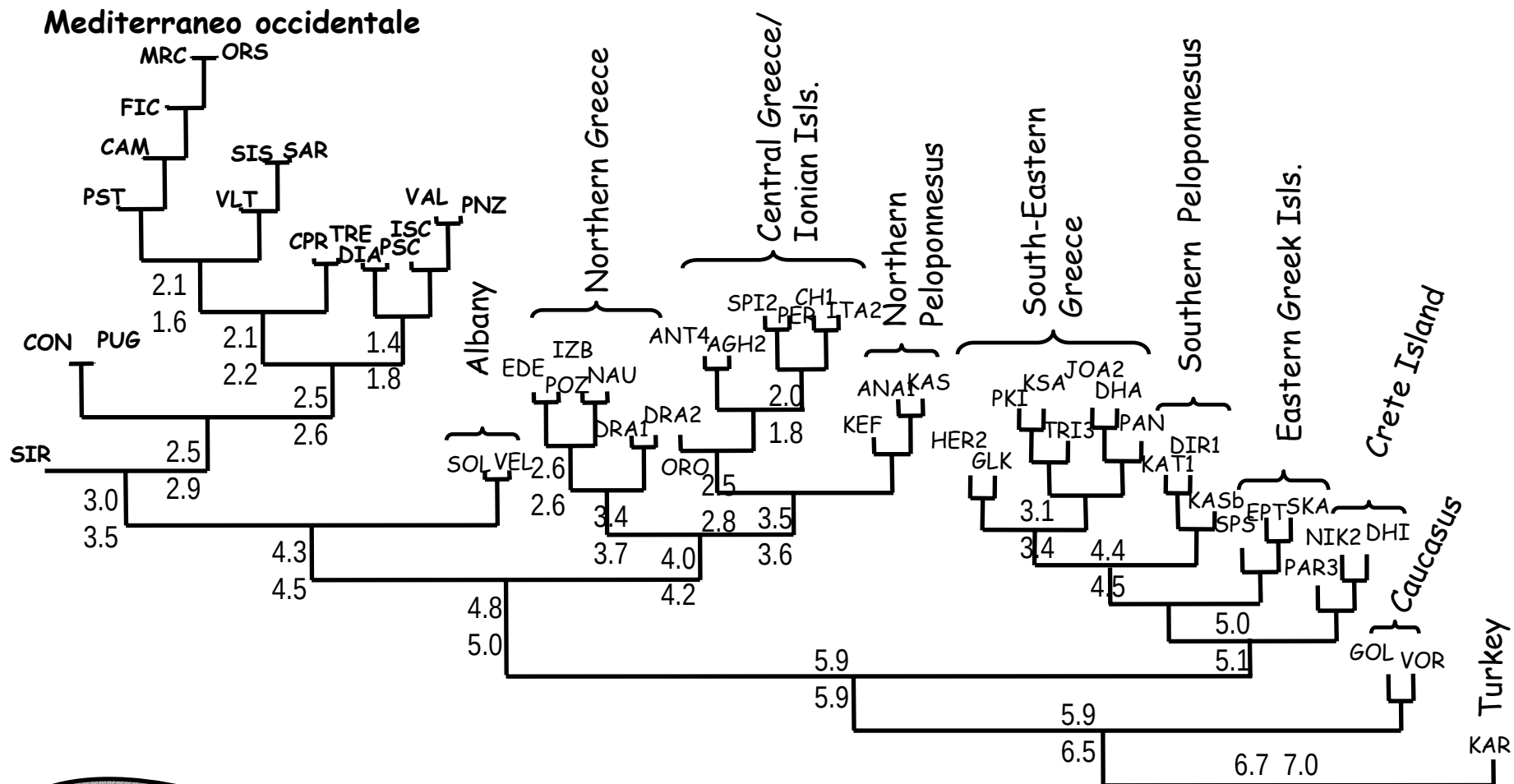
I tempi di divergenza sono stati stimati utilizzando due metodi che "rilassano" l'ipotesi dell'orologio molecolare

- a) utilizzando il metodo del likelihood "penalizzato"
- b) utilizzando l'analisi bayesiana



Come punto di calibrazione abbiamo utilizzato due eventi paleogeografici ben datati:

- a) L'isolamento di Creta dal vicino continente (circa 5.3 milioni di anni fa)
- b) L'isolamento dell'isola del Giglio, avvenuto circa 1 milione di anni fa, durante la transizione Calabro-Ionica.



CONCLUSIONI

Nella maggior parte dei casi, gli eventi cladogenetici hanno seguito la complessa storia della regione mediterranea durante il Plio-Pleistocene.

Il continuo alternarsi delle regressioni e trasgressioni marine potrebbe aver favorito la dispersione e la separazione allopatica delle specie insulari e continentali.

Le popolazioni continentali potrebbero essersi disperse attivamente nei boschi mesofili durante gli interglaciali e essersi frammentate, riducendo il flusso genico, durante le fasi climatiche più fredde e più secche.

I tempi di divergenza fra le specie più orientali (*D.euxina* del Caucaso e *D.sbordonii* della Turchia) e le altre variano fra 5.9 e 6.7 milioni di anni e sono consistenti con l'ipotesi di vicarianza avvenuta nel tardo Miocene e causata dal sorgere dell'Anatolia.

In conclusione gli orologi molecolari hanno rivoluzionato la biologia evuzionistica, offrendo un canovaccio su cui lavorare per ottenere le stime dei tempi di divergenza fra popolazioni e specie, di diversificazione delle famiglie geniche e dell'origine della variazione delle sequenze.

In assenza di reperti fossili o di notizie biogeografiche, l'orologio molecolare è l'unico strumento per capire i processi e i meccanismi dell'evoluzione.