

LA STORIA E LE RADICI GENETICHE
DEL CUORE DELL'ITALIA:
LA PROSPETTIVA FORNITA
DALLA PRIMA ANALISI MITOCONDRIALE
DELLE POPOLAZIONI UMBRE

HOVIRAG LANCIONI · GIULIA PERUZZI · NORA BABUDRI
LAURA BONOMI PONZI · FAUSTO PANARA · ALESSANDRO ACHILLI

RIASSUNTO

L'Umbria ha rappresentato fin dalla preistoria un punto nodale della comunicazione tra il mar Tirreno e il mare Adriatico. In particolare gli altipiani di Colfiorito, o altipiani plestini, furono occupati stabilmente fin dalla prima età del Ferro (tra il x e il ix secolo a.C.) dagli Umbri Plestini, riportati da fonti letterarie antiche come un'aristocrazia montanara simile a quella degli Etruschi con cui vennero in contatto grazie alla via del ferro.

Lo scopo della nostra ricerca è stato quello di applicare per la prima volta i più recenti metodi di analisi molecolare alla caratterizzazione genetica delle popolazioni umbre attraverso l'analisi del DNA mitocondriale (mtDNA). Questa piccola molecola (16569 basi) rappresenta solo una porzione minima del nostro genoma (circa 3 miliardi di basi), ma essendo ereditata esclusivamente per via materna e non presentando il normale rimescolamento (ricombinazione) cui va incontro il patrimonio genetico nucleare, costituisce un registro molecolare uniparentale della 'storia' delle donne, attraverso le quali è stato trasmesso e permette, quindi, di ricostruire i processi genetici e demografici che hanno portato alle popolazioni umane attuali.

Basandoci su tali premesse abbiamo campionato 200 soggetti, di cui, ad una prima analisi genealogica, 145 sono risultati non imparentati e con la nonna materna di origine umbra. Il DNA mitocondriale di questi soggetti è stato caratterizzato per sequenziamento portando all'identificazione di ben 126 diversi aplotipi – intendendo per aplotipo mitocondriale l'insieme delle mutazioni dell'mtDNA di un individuo. I risultati testimoniano da un lato la non consanguineità dei soggetti studiati e quindi la bontà del campionamento, dall'altro una notevole diversità mitocondriale all'interno delle popolazioni umbre. L'analisi delle varianti di questi aplotipi ha consentito una classificazione in ben 35 diverse linee mitocondriali principali (aplogruppi e sottoaplogruppi). La linea di gran lunga più frequente risulta essere l'H con un valore vicino al 50%, percentuale simile a quella di altre popolazioni tipiche dell'Europa occidentale; dato confermato dal confronto con altre 57 popolazioni europee e mediorientali. Risulta, infatti, evidente una vicinanza genetica tra gli Umbri e le popolazioni della penisola iberica piuttosto che con il Medio Oriente, diversamente da quanto riportato per le popolazioni della vicina Toscana, le quali hanno conservato nel loro mtDNA tracce genetiche di un evento migrazionale recente dal Medio Oriente verso le coste dell'Italia centrale. Tale risultato avvalorava l'idea di una origine alloctona degli Etruschi probabilmente da ricercare nella Lidia, come sostenuto da alcune fonti classiche.

Da questi primi dati sembrerebbe che le popolazioni umbre antiche non abbiano avuto contatti diretti o mescolamento con le popolazioni etrusche. Piuttosto, l'origine delle popolazioni umbre sarebbe da ricercare in un arco temporale molto più antico tra le popolazioni di cacciatori-raccoglitori che all'epoca dell'ultima glaciazione, circa 20-15 mila anni fa, si rifugiarono nel nord della penisola iberica; da qui, in seguito al miglioramento delle condizioni climatiche, ripopolarono il continente europeo e quindi anche la parte centrale della penisola italiana.

Uno scenario ancora più interessante vedrebbe un possibile rifugio italico localizzato proprio negli Appennini, per il quale sono state finora identificate tracce esclusivamente archeologiche, ma non 'ancora'

genetiche. Certamente, poter confermare quest'ultima teoria sarebbe scientificamente molto affascinante, tuttavia richiederebbe un'ulteriore espansione del campione moderno e il confronto dei dati ottenuti con quelli sul DNA antico (aDNA), attualmente in corso di analisi. Tale DNA è stato estratto da reperti ossei rinvenuti nella necropoli di Colfiorito, dove sono state scavate dalla Soprintendenza per i Beni Archeologici dell'Umbria 190 sepolture databili dalla fine del x secolo a.C. agli inizi dell'età romana imperiale, che rappresentano la principale fonte archeologica di informazioni sulla cultura dei Plestini.

L'UMBRIA ha rappresentato fin dalla preistoria un punto nodale della comunicazione tra il mar Tirreno e il mare Adriatico. In particolare gli altipiani di Colfiorito, o altipiani plestini, furono occupati stabilmente fin dalla prima età del Ferro (tra il x e il ix secolo a.C.) dagli Umbri Plestini, riportati da fonti letterarie antiche come un'aristocrazia montanara simile a quella degli Etruschi con cui vennero in contatto grazie alla via del ferro.

Lo scopo della nostra ricerca è stato quello di applicare per la prima volta i più recenti metodi di analisi molecolare alla caratterizzazione genetica delle popolazioni umbre attraverso l'analisi del DNA mitocondriale (mtDNA).

GLI UMBRI PLESTINI

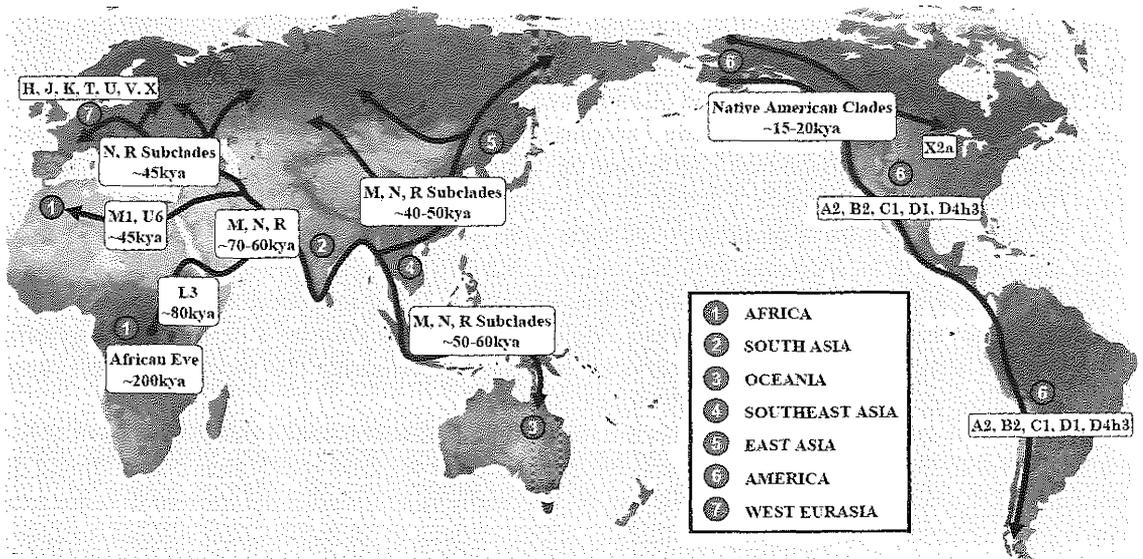
Gli altipiani di Colfiorito o altipiani plestini rappresentarono fin dalla preistoria un punto nodale della comunicazione tra il mar Tirreno e il mare Adriatico. L'area fu occupata stabilmente e senza soluzione di continuità fin dalla prima metà dell'età del Ferro (a cavallo tra il x e il ix secolo a.C.) dagli Umbri Plestini, ricordati dalle fonti letterarie antiche. I Plestini abitarono dapprima sulle sponde dell'antico lago Plestino, ora piano di Casone, in villaggi di capanne in parte identificati ed esplorati, che appaiono abbandonati nella seconda metà del vii secolo a.C. principalmente a causa di un mutamento climatico che determinò l'innalzamento del livello del lago con conseguenti alluvioni degli abitati. Furono così occupate alcune delle alture circostanti, mentre sulle sponde del lago rimase il santuario dedicato alla dea Cupra, la principale divinità femminile del pantheon umbro. Agli inizi del vi secolo a.C. si riscontrò un significativo aumento demografico nella zona e i Plestini arrivarono ad occupare un territorio di 120-130 km². L'abitato principale dell'area plestina appare essere stato quello identificato sulla sommità di Monte Orve, situato quasi al centro dell'altipiano di Colfiorito, che assunse fin dalla fine del vi secolo a.C. caratteristiche urbane. Ai piedi di Monte Orve, sul versante sud-orientale, si estende una vasta necropoli, dove tra il 1970 e il 2006 sono state scavate dalla Soprintendenza per i Beni Archeologici dell'Umbria, sotto la direzione della dott.ssa Laura Bonomi, 190 sepolture in fossa terragna che rappresentano la principale fonte archeologica di informazioni sulla cultura dei Plestini, sulla loro economia, sulla loro organizzazione politica e sociale. Lo scavo è stato condotto in modo sistematico partendo da uno dei limiti dell'area sepolcrale e le sepolture scavate fino ad ora sono databili dalla fine del x secolo a.C. agli inizi dell'età romana imperiale. L'identificazione delle singole sepolture è avvenuta attraverso l'esame del terreno che dopo l'asportazione dello strato di terreno arativo, mostrava delle chiazze nerastre di forma rettangolare od ovoidale in corrispondenza delle fosse sepolcrali. Lo scavo delle singole tombe è stato effettuato a mano con strumenti idonei ai materiali che venivano via via alla luce. Anche le ossa degli scheletri dei defunti (un centinaio in totale) sono state asportate manualmente, senza particolari accorgimenti, e depositate in cassette lignee o di plastica.

Per quanto riguarda l'esame dei corredi funerari, si va dalla semplicità di quelli della prima età del Ferro composti da un solo vaso di impasto e da pochi oggetti ornamentali di bronzo alla ricchezza principesca dei corredi di età orientalizzante (vii secolo a.C.) ed arcaica (vi-v secolo a.C.). Questo ha permesso di ricostruire l'evoluzione della società plestina e dei complessi rapporti di interscambio con le popolazioni confinanti e con quelle più lontane, come gli Etruschi e i Piceni prima, e i Romani poi.

Considerato che da tutti gli studi finora condotti sono stati ricavati dati estremamente utili per la ricostruzione della storia del popolamento del territorio plestino in età antica e che il settore con ogni probabilità più carente è proprio quello delle ricerche sui reperti ossei umani, è stato estremamente importante poter svolgere esami genetici sulla popolazione che attualmente risiede nella stessa area sperando in un futuro prossimo di poter disporre delle risorse necessarie allo studio anche del DNA antico estratto dai resti scavati nella necropoli di Colfiorito.

IL DNA MITOCONDRIALE NELLO STUDIO DELL'ORIGINE DELLE POPOLAZIONI UMANE

Alla fecondazione lo zigote riceve metà del DNA dalla madre e metà dal padre. Il contributo dello spermatozoo differisce da quello della cellula uovo, poiché esso non fornisce mitocondri vitali. Questi organelli possiedono un proprio genoma circolare (16569 paia di basi), chiamato appunto mtDNA che viene trasmesso esclusivamente per via materna. In conseguenza di ciò, l' mtDNA non presenta il normale rimescolamento cui va incontro il patrimonio genetico nucleare durante la meiosi, e ciò fa sì che, per la specie umana, esso rappresenti un registro molecolare uniparentale della 'storia' delle donne, attraverso le quali è stato trasmesso. Data l'assenza di ricombinazione, il differenziamento dell' mtDNA è dovuto soltanto all'accumulo sequenziale di nuove mutazioni lungo linee di radiazione materna. Nel corso del tempo, questo processo di divergenza molecolare ha dato origine ad entità monofiletiche, gli aplogruppi. Poiché il processo di differenziazione molecolare è avvenuto, ed avviene tuttora, durante il processo di colonizzazione umana delle varie regioni e continenti, gli aplogruppi ed i sottoaplogruppi tendono ad essere limitati a specifiche aree geografiche e gruppi di popolazioni. In conclusione, l'analisi molecolare di questa piccola parte del genoma umano, l'identificazione degli aplogruppi, la quantificazione della loro variabilità interna, e l'analisi della loro distribuzione etnico-geografica possono fornire dati importanti sull'origine dell'uomo e sui processi genetici e demografici che hanno generato le popolazioni umane attuali (GRAF. 1).



GRAF. 1. Rotte di migrazione rivelate dall'analisi di aplogruppi mitocondriali (Achilli, Perego 2010).

Lo studio della variazione di questi aplogruppi nello spazio e nel tempo (approccio 'filogeografico'), ha portato alla dimostrazione dell'origine recente ed africana delle popolazioni uma-

ne.¹ Le potenzialità di questo tipo di approccio si sono rivelate comunque anche in contesti microgeografici come dimostrato, riguardo proprio alle popolazioni dell'Italia centrale, nella prestigiosa rivista internazionale «American Journal of Human Genetics» (www.journals.uchicago.edu/AJHG/home.html),² che ha gettato nuova luce sulla controversa e dibattuta questione dell'origine degli Etruschi.³ I risultati ottenuti hanno rivelato che nonostante i vari processi di mescolamento e diluizione genetica avvenuti negli ultimi 2.500 anni, alcune delle comunità toscane attuali hanno conservato nel loro mtDNA tracce genetiche rilevanti di un evento di migrazione recente dal Medio Oriente verso le coste dell'Italia centrale. Tale risultato avvalorerebbe l'idea di una origine alloctona degli Etruschi, probabilmente da ricercare nella Lidia, da dove, come sostenuto da alcune fonti classiche, una parte della popolazione locale migrò per arrivare alle terre dell'Italia centrale, Lazio, Toscana e Umbria dando origine alla civiltà etrusca.⁴

CAMPIONAMENTO DEL MATERIALE BIOLOGICO DAGLI ABITANTI DELL'UMBRIA

Sono stati raccolti 200 campioni, tra cui, da una prima analisi genealogica, 145 sono risultati non imparentati e con la nonna materna di origine umbra. Questi campioni selezionati sono diventati l'oggetto della nostra successiva analisi molecolare e quindi utilizzati per il sequenziamento delle regioni specifiche del mtDNA. Tra questi, 61 provenivano dall'area appenninica umbra (soprattutto da diversi paesi dell'altopiano plestino: Colfiorito, Annifo, Belfiore) e 84 dalla regione di valle (comprendente anche la città di Perugia). Il campionamento, completamente non invasivo e assolutamente privo di fastidi, dolore o effetti collaterali, consisteva nel prelevare cellule di sfaldamento della mucosa boccale utilizzando bastoncini cotonati sterili e strofinandoli ripetutamente sulla superficie interna delle guance. Ad ogni soggetto partecipante è stato presentato e fatto firmare un modulo di consenso informato.⁵ Ogni campione è stato quindi siglato con un numero di codice progressivo per la tutela dell'anonimato.

LA VARIABILITÀ MITOCONDRIALE DELLA POPOLAZIONE UMBRA

I campioni sono stati sottoposti, in condizione di massima sterilità, all'estrazione del DNA mediante kit commerciale Wizard Genomic DNA purification (Promega). Una volta estratti, i DNA sono stati sottoposti a determinazione quantitativa, mediante spettrofotometro. Il primo passo dell'analisi molecolare del mtDNA è stato l'amplificazione mediante PCR della regione di controllo dell'mtDNA (unica porzione non codificante del genoma mitocondriale). Questa parte del genoma mitocondriale comprende il primo ed il secondo segmento ipervariabile (HVS-I e HVS-II), le cui variazioni sono state largamente analizzate nelle popolazioni umane. La combinazione di mutazioni presenti nella sequenza della regione di controllo permette spesso di affiliare l'mtDNA in esame ad uno specifico aplogruppo o sottoaplogruppo. Il sequenziamento completo di numerosi genomi mitocondriali ha permesso, negli ultimi anni, di chiarire e definire la filogenesi di un numero sempre maggiore di aplogruppi del DNA mitocondriali che rappresentano i rami dell'albero filogenetico schematico riportato nel GRAF. 2.

Questi recenti dati hanno reso più veloce e immediata la classificazione dei campioni in aplogruppi, permettendo di conoscere i motivi specifici sia nella regione codificante che in quella di controllo. Al momento, è spesso possibile capire, mediante la sola analisi del motivo di sequenza della regione di controllo, l'esatta (o probabile) appartenenza di un mtDNA non solo ad un aplo-

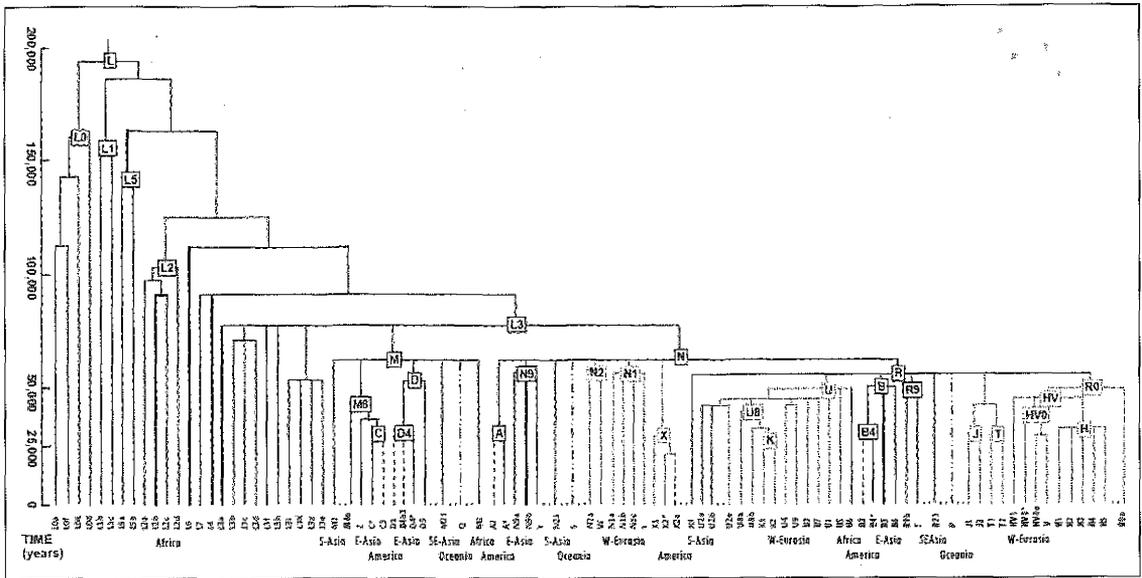
¹ CANN, STONEKING, WILSON 1987; VIGILANT *et alii* 1991.

² Si veda anche il contributo di VERNESI *et alii* 2004; GUIMARAES *et alii* 2009.

³ ERODOTO, *Le storie* 1 94, circa 430 a.C.

⁴ Autorizzazione al trattamento dei dati genetici del 22 febbraio 2007, da parte del Garante per la Protezione dei Dati Personali, Gazzetta Ufficiale n. 65 del 19 marzo 2007.

⁵ ACHILLI *et alii* 2007.



GRAF. 2. Albero filogenetico mondiale dei principali aplogruppi mitocondriali umani (Achilli, Perego 2010).

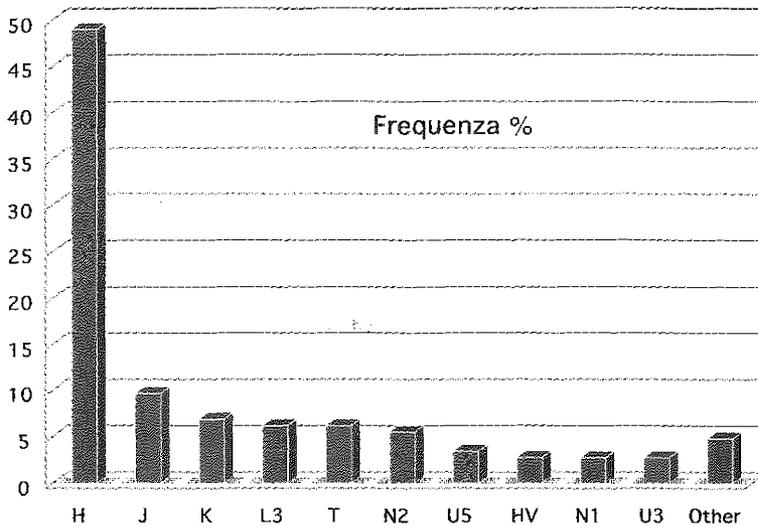
gruppo, ma ad uno specifico sottoaplogruppo. Questo nuovo approccio ci ha permesso di fare una classificazione precisa della variabilità mitocondriale della popolazione umbra in un tempo relativamente breve e con costi di analisi accettabili.

Tra i 145 campioni che abbiamo analizzato finora, siamo stati in grado di identificare ben 126 diversi aplotipi, il che ha confermato la non consanguineità dei soggetti studiati e quindi la bontà del campionamento. Il dato testimonia, anche, una notevole diversità mitocondriale all'interno della popolazione umbra studiata. L'analisi degli aplotipi e delle mutazioni diagnostiche presenti nella regione di controllo ha consentito una classificazione dei campioni nelle diverse linee mitocondriali: questo approccio ha permesso di classificare i 145 mtDNA in ben 35 diversi aplogruppi e sottoaplogruppi.

Considerando le sole linee principali, l'aplogruppo di gran lunga più frequente risulta essere l'H con una frequenza vicina al 50% (GRAF. 3). Tale frequenza è simile a quella di altre popolazioni della parte più occidentale dell'Europa¹ e i sottoaplogruppi dell'H (H1 e H3) sono considerati marcatori del ripopolamento europeo a partire dal rifugio iberico dopo l'ultimo picco glaciale. Il restante gruppo delle linee mitocondriali identificate sono quelle tipiche dell'Europa e dell'Eurasia occidentale, come risulta evidente confrontando i GRAFF. 2 e 3.

Una particolare eccezione è quella relativa alla linea tipicamente mediorientale X che è presente con una frequenza di circa il 6% nel nostro campione. Certo si potrebbe pensare ad un evento migrazionale molto recente e ad un possibile effetto del fondatore. Tuttavia, il fatto di avere identificato questo aplogruppo sia nel campione 'perugino', più soggetto a fenomeni di immigrazione recente, che nel campione plestino di certo geneticamente più isolato, sembrerebbe non supportare tale ipotesi. Sarà interessante indagare più a fondo questa particolarità, per esempio attraverso l'analisi del genoma completo di questi campioni.

¹ ACHILLI *et alii* 2004.



GRAF. 3. Frequenze degli aplogruppi mitocondriali principali identificati nel campione umbro.

IL CONFRONTO CON LE POPOLAZIONI DELL'EURASIA OCcidentALE

Sono state prese in esame numerose altre popolazioni sia italiane che dell'Eurasia occidentale; per cercare di riassumere e rappresentare graficamente le informazioni ottenute si è ricorso all'analisi delle componenti principali (PCA). Tale sistema permette di riassumere in semplici figure gran parte dell'informazione contenuta in dati numerici strutturati in una tabella di M osservazioni (popolazioni)/ N variabili

(aplogruppi); in sostanza si tratta di una proiezione delle nostre osservazioni da uno spazio n -dimensionale (dato dal numero delle variabili iniziali) a uno spazio bi/tri-dimensionale (delimitato dalle nostre PC), cercando di ridurre al minimo la perdita di informazione. Basandoci su questo tipo di analisi abbiamo cercato di collocare geneticamente la popolazione umbra presa in esame rispetto alle 57 popolazioni mediorientali ed europee analizzate in Achilli *et alii* 2007, ottenendo il risultato riportato nel GRAF. 4.

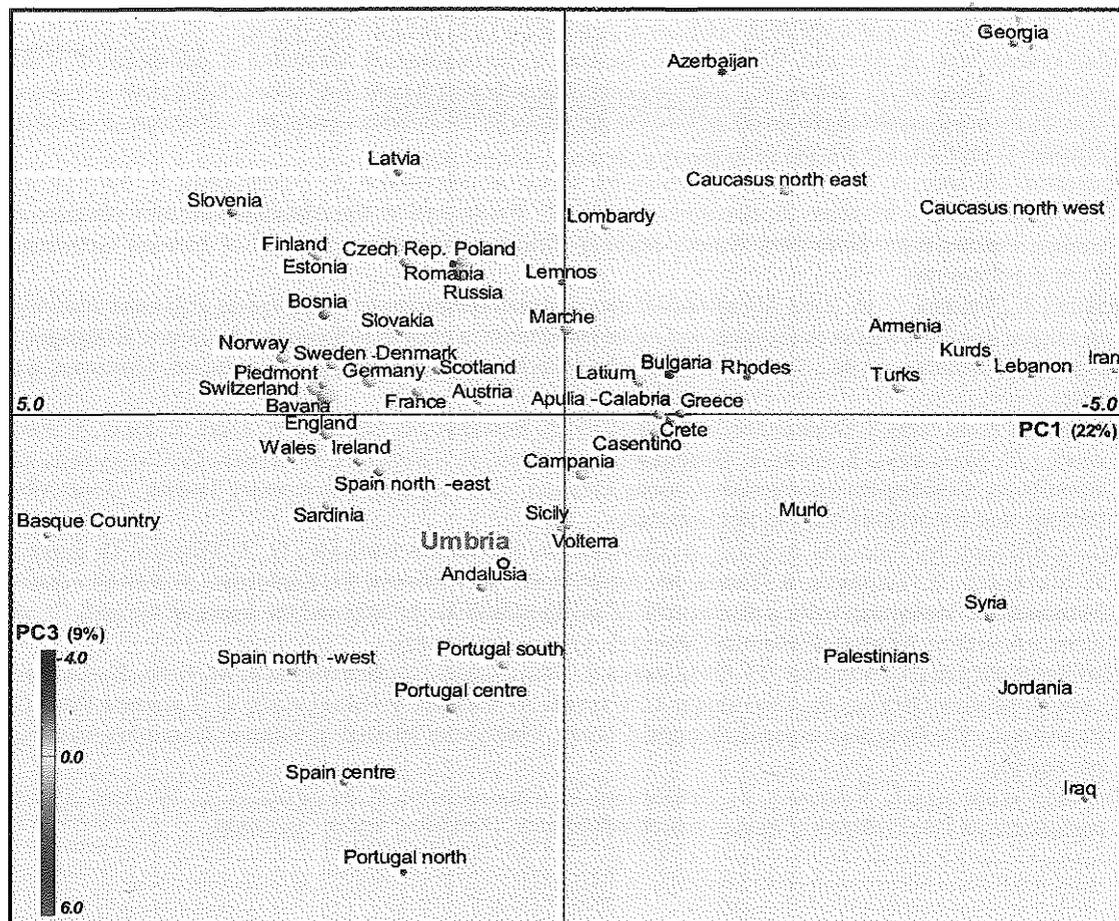
Risulta evidente la vicinanza tra gli Umbri e le popolazioni della penisola iberica, supportando quindi l'idea proposta in precedenza di una vicinanza genetica con l'Europa occidentale piuttosto che con il Medio Oriente, diversamente da quanto riportato per le popolazioni toscane e spiegato attraverso l'ipotesi della migrazione etrusca dall'Anatolia. Evidentemente da questi primi risultati la popolazione umbra antica sembrerebbe non avere avuto contatti diretti con le popolazioni etrusche. Piuttosto, l'origine della popolazione umbra sarebbe da ricercare in un arco temporale molto più antico tra le popolazioni di cacciatori-raccoglitori che circa 20-15 mila anni fa, durante l'ultima glaciazione, si rifugiarono nel nord della penisola iberica e che a partire da circa 13 mila anni fa, con il miglioramento delle condizioni climatiche, ripopolarono il continente europeo e quindi anche la parte centrale della penisola italiana.

L'IPOTESI DEL RIFUGIO GLACIALE APPENNINICO

Uno scenario ancora più interessante sarebbe quello di un possibile rifugio italico localizzato proprio negli Appennini e per il quale sono state finora identificate tracce esclusivamente archeologiche, ma non 'ancora' genetiche.

Certamente poter confermare questa ultima teoria sarebbe scientificamente molto affascinante e di rilevante interesse storico, ma anche piuttosto complicato e per poterlo fare sarà necessario analizzare il DNA antico, espandere ulteriormente il campione moderno in analisi e portare il livello di risoluzione molecolare al massimo possibile attraverso l'analisi di interi genomi mitocondriali.

Riguardo proprio all'ipotesi del rifugio italiano, in un lavoro pubblicato sulla prestigiosa rivista



GRAF. 4. Analisi PCA delle popolazioni dell'Eurasia occidentale.

«American Journal of Human Genetics»,¹ che ha visto coinvolto anche il nostro laboratorio, sono state individuate per la prima volta le tracce genetiche di un evento di espansione umana originatasi proprio nel rifugio appenninico e marcato da una particolare linea genetica a trasmissione materna, ossia l'aplogruppo mitocondriale u5b3. A differenza delle espansioni da altri rifugi europei, quella verso nord dei cacciatori-raccoglitori del rifugio glaciale italiano fu ostacolata dalla barriera alpina, pertanto la linea mitocondriale u5b3 si sarebbe diffusa principalmente verso occidente lungo le coste tirreniche, e verso oriente, con impatto nettamente ridotto, lungo le coste adriatiche. Cruciale è stato quindi il confronto con la popolazione umbra, particolarmente delle zone appenniniche. Degna di nota è la totale assenza della linea mitocondriale u5b3 nei campioni umbri che abbiamo finora analizzato. Ecco perché la nostra indagine sulla regione Umbria merita di essere ampliata e approfondita, sia in termini di numerosità del campione per cercare eventuali soggetti u5b3, sia in termini di livello di risoluzione molecolare. Pensiamo, infatti, che attraverso l'analisi di interi genomi mitocondriali potremo individuare nuovi e più affidabili marcatori genetici del rifugio appenninico, confermandone una volta per tutte l'esistenza anche da un punto di vista genetico.

¹ PALA *et alii* 2009.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- ACHILLI *et alii* 2004, A. ACHILLI, C. RENGO, C. MAGRI, V. BATTAGLIA, A. OLIVIERI, R. SCOZZARI, F. CRUCIANI, M. ZEVIANI, E. BRIEM, V. CARELLI *et alii*, *The molecular dissection of mtDNA haplogroup H confirms that the Franco-Cantabrian glacial refuge was a major source for the European gene pool*, «American Journal of Human Genetics», LXXV 5, pp. 910-918.
- ACHILLI *et alii* 2007, A. ACHILLI, A. OLIVIERI, M. PALA, E. METSPALU, S. FORNARINO, V. BATTAGLIA, M. ACCETTURO, I. KUTUEV, E. KHUSNUTDINOVA, E. PENNARUN *et alii*, *Mitochondrial DNA variation of modern Tuscans supports the Near Eastern origin of Etruscans*, «American Journal of Human Genetics», LXXX 4, pp. 759-768.
- ACHILLI A., PEREGO U. A. 2010, *Mitochondrial DNA: a female perspective in recent human origin and evolution, in Origins as a Paradigm in the Sciences and in the Humanities*, a cura di P. Spinozzi, A. Zironi, Göttingen.
- CANN R. L., STONEKING M., WILSON A. C. 1987, *Mitochondrial DNA and human evolution*, «Nature», 325, pp. 31-36.
- GUIMARAES *et alii* 2009, S. GUIMARAES, S. GHIROTTI, A. BENAZZO, L. MILANI, M. LARI, E. PILLI, E. PECCIOLI, F. MALLEGNI, B. LIPPI, F. BERTOLDI, S. GELICHI, A. CASOLI, E. M. BELLE, D. CARAMELLI, G. BARBUJANI, *Genealogical discontinuities among Etruscan, medieval, and contemporary Tuscans*, «Molecular Biology and Evolution», xxvi 9, pp. 2157-2166.
- PALA *et alii* 2009, M. PALA, A. ACHILLI, A. OLIVIERI, B. HOOSHIAR KASHANI, U. A. PEREGO, D. SANNA, E. METSPALU, K. TAMBETS, E. TAMM, M. ACCETTURO, V. CAROSSA, H. LANCIONI, F. PANARA *et alii*, *Mitochondrial haplogroup U5b3: a distant echo of the Epipaleolithic in Italy and the legacy of the early Sardinians*, «American Journal of Human Genetics», LXXXIV, pp. 814-821.
- VERNESI *et alii* 2004, C. VERNESI, D. CARAMELLI, I. DUPANLOUP, G. BERTORELLE, M. LARI, E. CAPPELLINI, J. MOGGI-CECCHI, B. CHIARELLI, L. CASTRÌ, A. CASOLI, F. MALLEGNI, C. LALUEZA-FOX, G. BARBUJANI, *The Etruscans: a population-genetic study*, «American Journal of Human Genetics», LXXIV 4, pp. 694-704.
- VIGILANT *et alii* 1991, L. VIGILANT, M. STONEKING, H. HARPENDING, K. HAWKES, A. C. WILSON, *African populations and the evolution of human mitochondrial DNA*, «Science», 253, pp. 1503-1507.