

I marcatori molecolari

Strumento per l'analisi genetica

Strumento → non oggetto di studio

Molecolari → biologia molecolare

Analisi genetica → Studio delle differenze genetiche

Marcatori → Approccio indiretto

Alcune definizioni

Marcatore genetico: Locus genico che identifica univocamente una regione cromosomica

Mappa genetica: Definisce le RELAZIONI LINEARI tra marcatori molecolari
E' IL RISULTATO DELL'ANALISI GENETICA

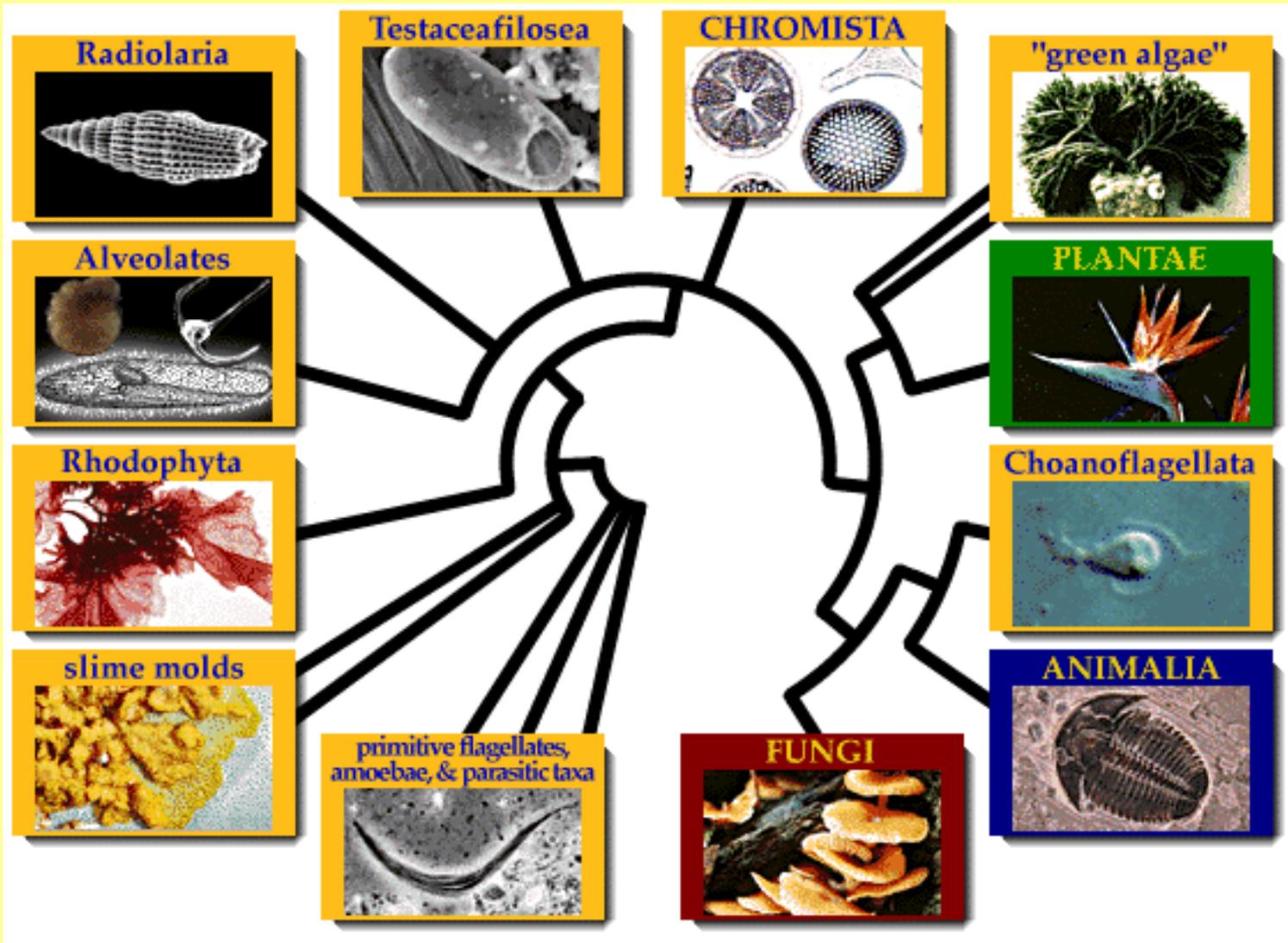
Distanza genetica: Stima della distanza esistente tra due MM calcolata sulla frequenza di ricombinazione

- Si esprime in cM
- $1\text{cM} = 1$ ricombinante / 100 prodotti meiotici

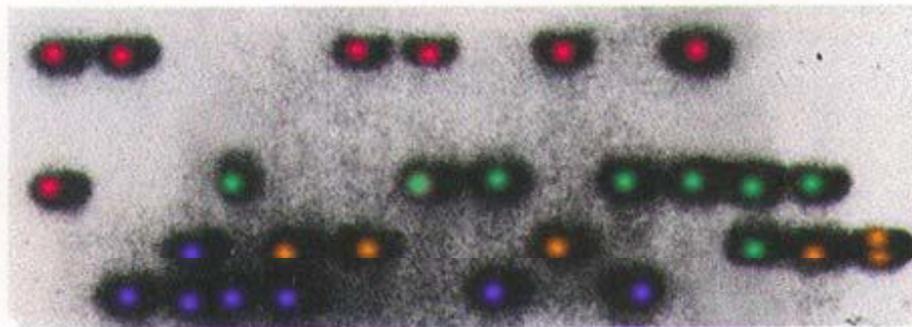
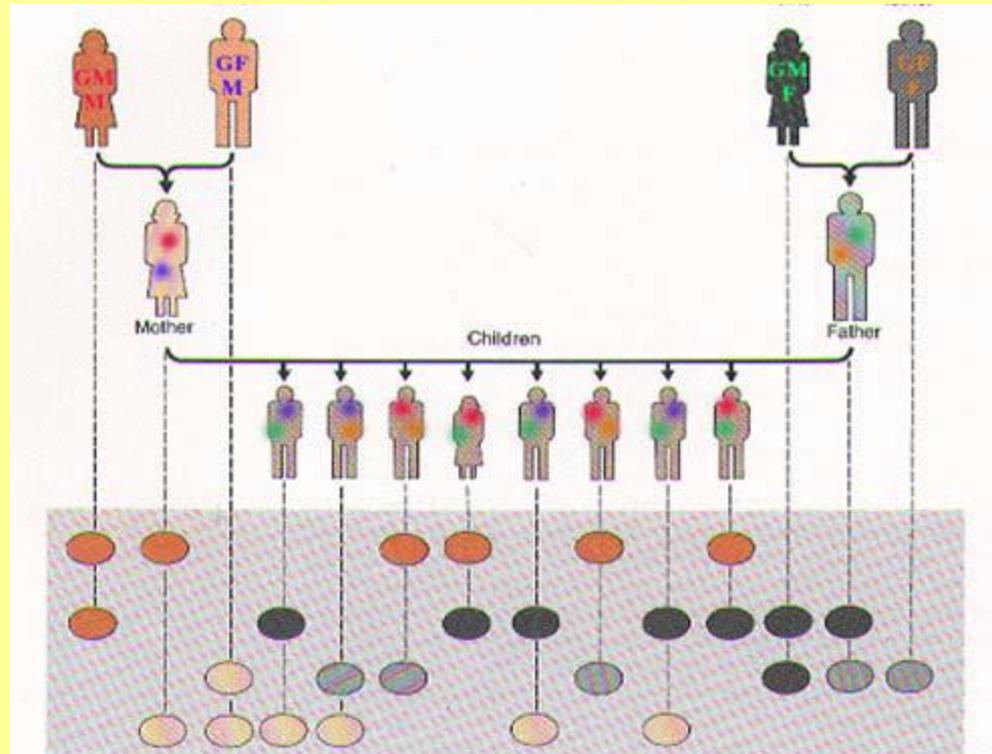
Polimorfismo: Presenza di varianti alleliche per un dato gene o marcatore

Polimorfismo molecolare: Differenze evidenziabili a livello di DNA

I marcatori molecolari sono **UNIVERSALI**



I marcatori molecolari sono **EREDITABILI**

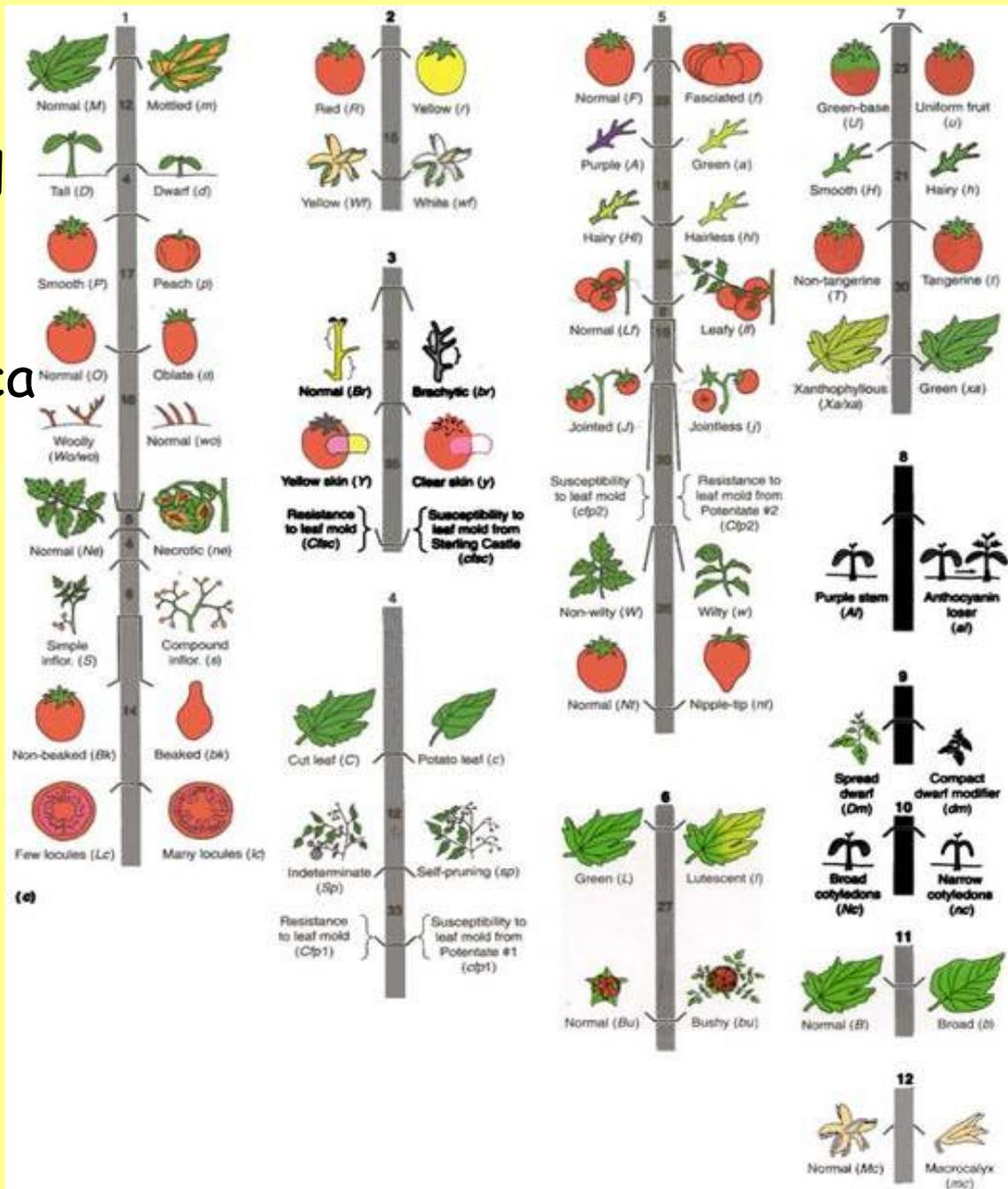


I marcatori genetici

- ▶ **Marcatori morfologici** - caratteri mendeliani (colore della cariosside, forma della foglia, presenza assenza di corna)
 - ▶ Problemi: 1) non sono molto numerosi
2) dipendono dalla specie (ploidia ecc.)
- ▶ **Marcatori biochimici**
 - gruppi sanguigni
 - isoenzimi
 - proteine (dell'endosperma, del plasma, del latte ecc.)
- ▶ **Marcatori molecolari** una sequenza DNA o proteica facilmente identificabile e la cui ereditabilità sia monitorabile
 - ▶ Identificano polimorfismo a livello di DNA
 - ▶ Offrono la possibilità di coprire tutto il genoma
 - ▶ Sono applicabili universalmente

N.B. consideriamo solo quelli basati sul DNA che sono quelli oggi usati

Marcatori fenotipici del genoma del pomodoro: un set classico di marcatori a base genetica



Marcatori Molecolari del DNA

Sequenze di DNA variabili che vengono ereditate in modo mendeliano. La loro trasmissione viene seguita con specifiche tecniche

Un MM è un locus genomico rilevabile con sonde o primer specifici, che contraddistingue quel tratto cromosomico

La presenza del MM si basa sulla rilevanza di polimorfismi nel DNA di un individuo

I MM non sono generalmente riferibili all'attività di geni specifici

Marcatore genetico ideale

- ▶ Comportamento mendeliano
- ▶ Non influenzato dall'ambiente
- ▶ Stabile
- ▶ Facile da monitorare
- ▶ Numeroso
- ▶ Codominante
- ▶ Polimorfico (includendo anche sequenze non codificanti)
- ▶ Presente in qualsiasi tessuto
- ▶ Indipendente da sesso ed età
- ▶ Analisi automatizzabile
- ▶ Analisi veloce ed economica

N.B. Peccato che non ci sia !!

Impieghi dei marcatori molecolari

- ▶ Analisi di paternità
- ▶ Diagnosi di anomalie genetiche
- ▶ Analisi forensi
- ▶ Identificazione di QTL e geni utili
- ▶ Miglioramento delle specie vegetali ed animali (MAS)
- ▶ Studio della struttura, evoluzione e biodiversità delle popolazioni
- ▶ Studi di epidemiologia
- ▶ Tracciabilità dei prodotti animali e/o dei *GMO*
- ▶ Conservazione della natura
- ▶ Analisi di campioni da erbari e collezioni
- ▶ Studi di filogenesi ed evoluzione

Teoria della neutralità (Kimura 1983)

Ha reso i marcatori molecolari appropriati per caratterizzare il polimorfismo genomico finalizzato

- ▶ al mappaggio genico
- ▶ allo studio di diversità o similarità genetiche

[solo una piccolissima frazione dei cambiamenti del DNA hanno significato in termini di adattamento.....

La maggior parte dei cambiamenti sarebbero silenti, lasciano il prodotto genico inalterato

Con effetti piccolissimi sulla capacità di sopravvivenza e riproduttiva]

I marcatori molecolari sono riconducibili a loci uniformemente distribuiti sul genoma

TAM107

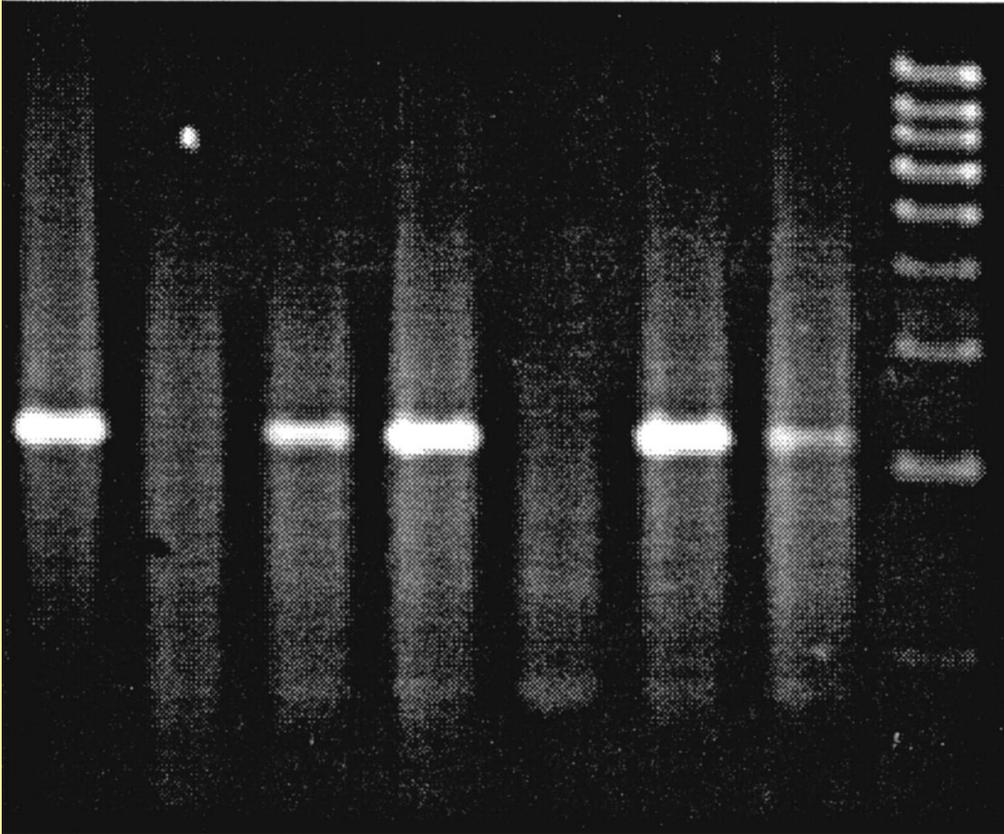
Tomahawk

F₂ s

R R S R R

100 bp Ladder

In frumento
Resistenza ad un insetto



Marcatore Molecolare:

Marcatore genetico descritto come un frammento di DNA (50-3000 bp) compreso tra due regioni oligonucleotidiche note (6-30 bp)

Sequenze fiancheggianti riconosciute
da enzimi di restrizione (RLFP)
primers (DNA polimerasi) RADP, SSR, I-SSR
da entrambi (AFLP)

marcatori singolo-locus

ibridazione o amplificazione di tratti cromosomici a sequenza nota
utilizzo di sonde o primer specifici per determinati loci
(es. RFLP, SSR)

marcatori multi-locus

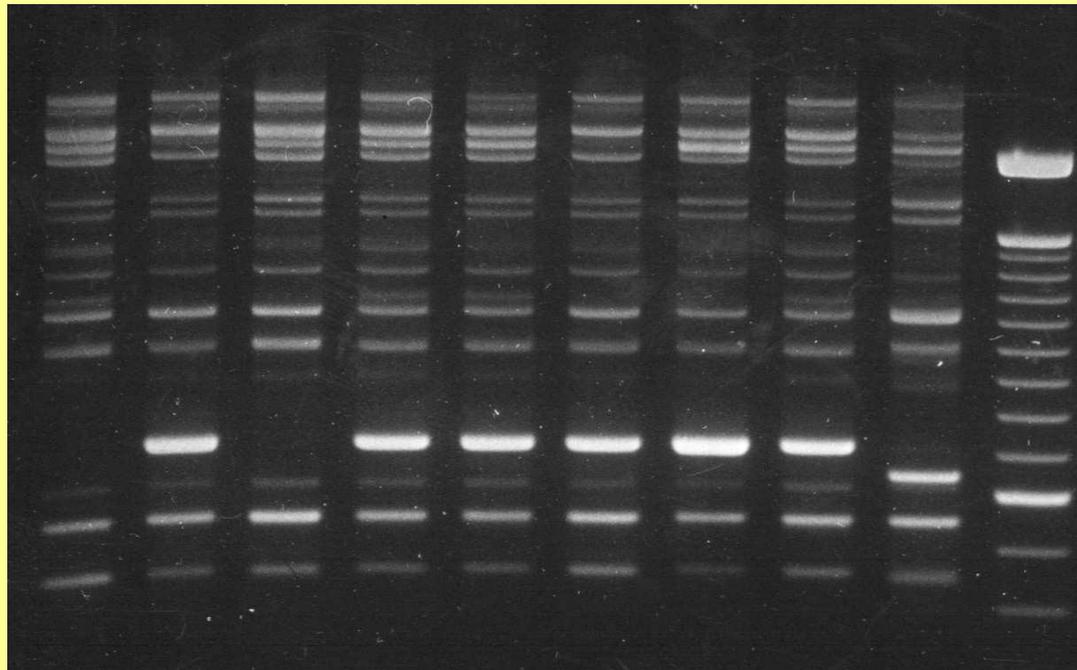
analisi simultanea di molti loci genomici
amplificazione simultanea di tratti cromosomici casuali
primer a sequenza nota arbitraria
(es. RAPD, I-SSR e AFLP)

Marcatori multi-locus



marcatori dominanti

Ad ogni locus si può evidenziare la presenza o assenza della banda, ma non è possibile distinguere la situazione eterozigote da quella omozigote per lo stesso allele marcatore

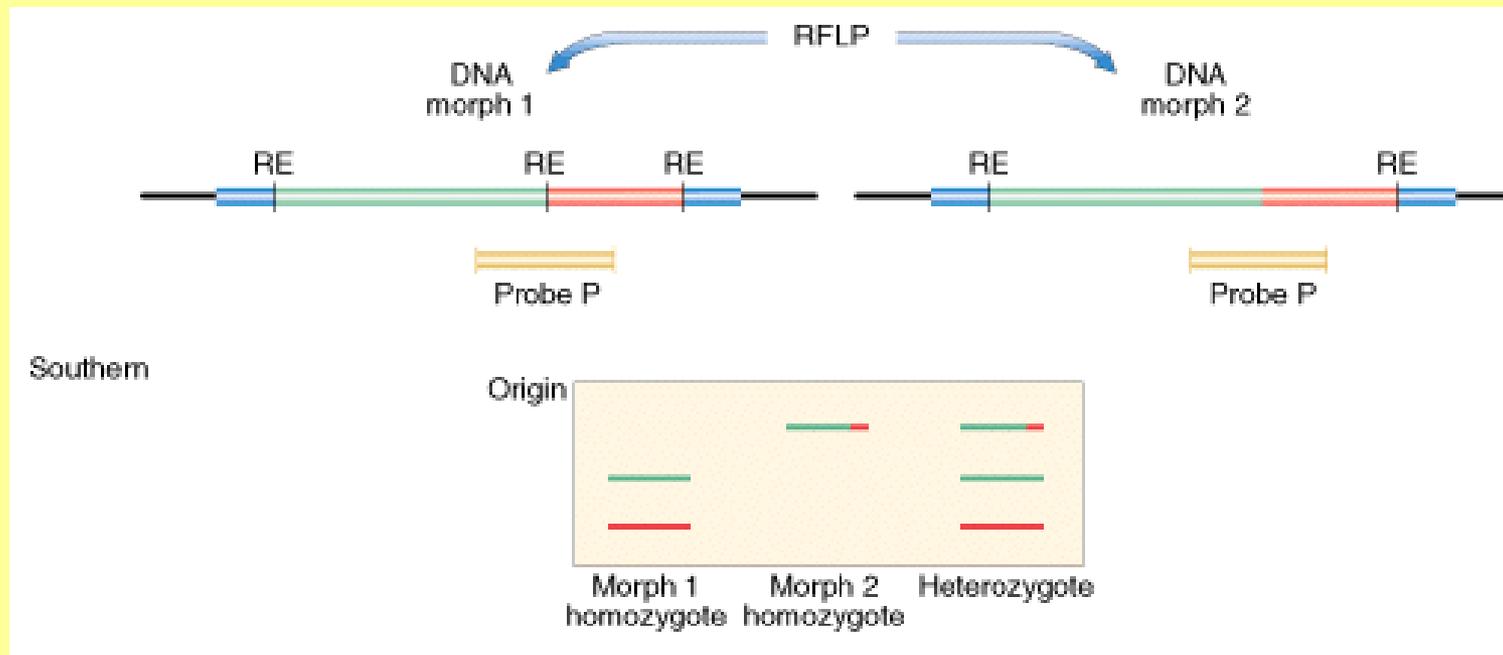


RAPD

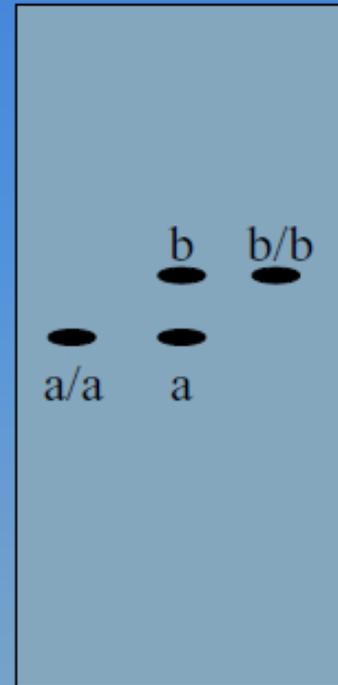
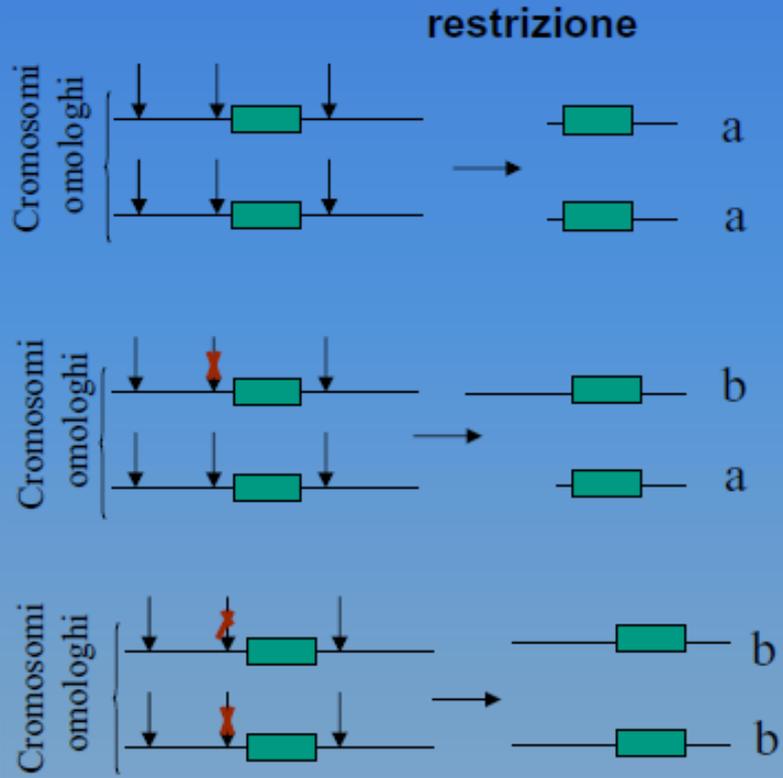
Marcatore singolo-locus

→ marcatori co-dominanti

Permettono di distinguere i loci omozigoti da quelli eterozigoti, rappresentati da una sola banda (uno o l'altro allele) e da bande diverse (entrambi gli alleli marcatori)



Esempio di marcatore codominante



Lastra fotografica

Attraverso una opportuna tecnica di laboratorio definita *Southern blotting*, è possibile evidenziare i frammenti su una lastra fotografica

Tecniche per la produzione di marcatori molecolari

- ▶ **Ibridazione molecolare**
 - ▶ Southern blot
 - ⇒ es. RFLP
- ▶ **Amplificazione del DNA**
 - ▶ PCR (Polymerase Chain Reaction)
 - ⇒ RAPD, SSR o STR (short tandem repeat)
- ▶ **Approcci misti**
 - ▶ Digestione enzimatica e amplificazione
 - ⇒ CAPS, AFLP

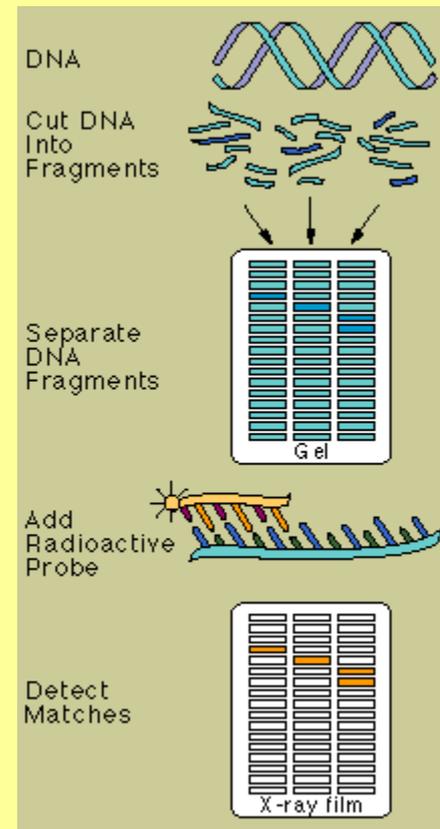
Marcatori basati su DNA

RFLPs - restriction fragment length polymorphisms

sono frammenti di DNA che si formano in seguito all'azione degli enzimi di restrizione fatti agire sul DNA da analizzare.

Confronto elettroforetico della dimensione di specifici frammenti di restrizione derivati dal DNA genomico

1. Isolare DNA di alta qualità
2. Digerire con una combinazione di enzimi
3. Frazionare i campioni digeriti mediante elettroforesi
4. Trasferire i frammenti su membrana
5. Ibridare con sonde radioattive
6. Individuare il segnale mediante autoradiografia



RFLPs: tipi di origine dei polimorfismi

A = pattern di base (es. WT)

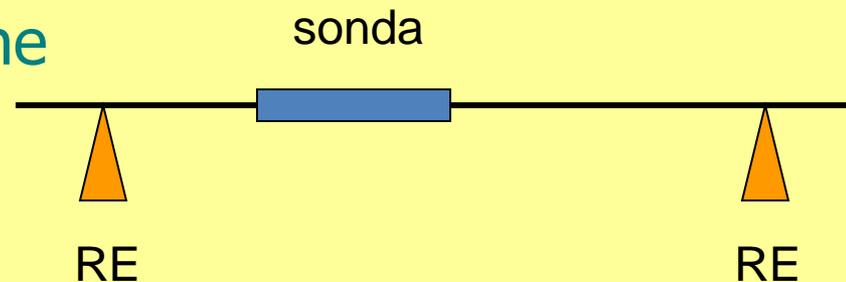
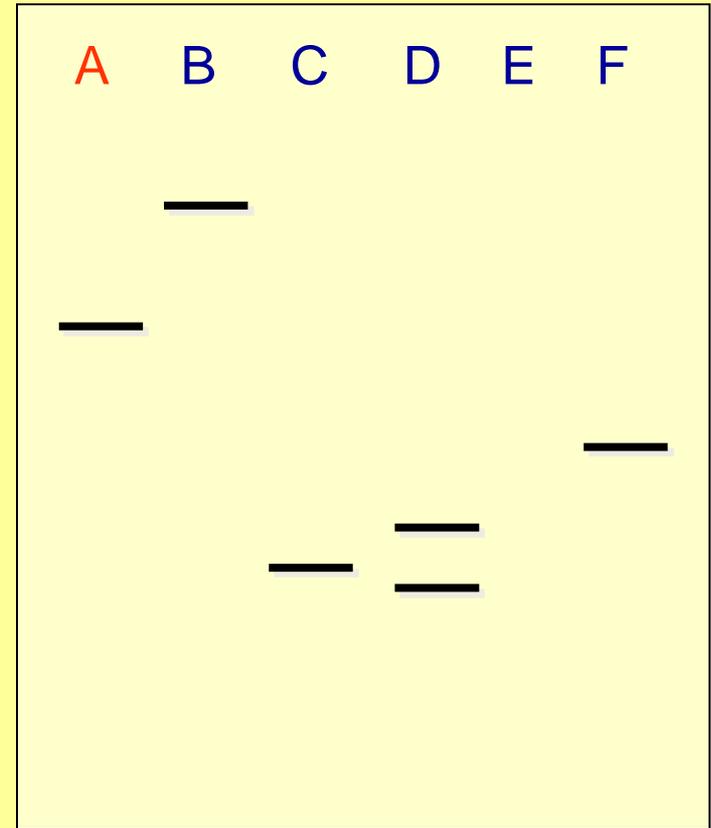
B = inserzione

C = delezione

D = nuovo sito di restrizione nella sonda

E = perdita del sito di restrizione

F = nuovo sito di restrizione fuori dalla sonda



Considerazioni circa l'uso degli RFLP

Occorre DNA di alta qualità (quantità)

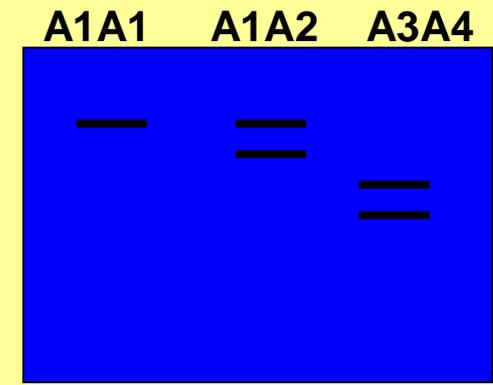
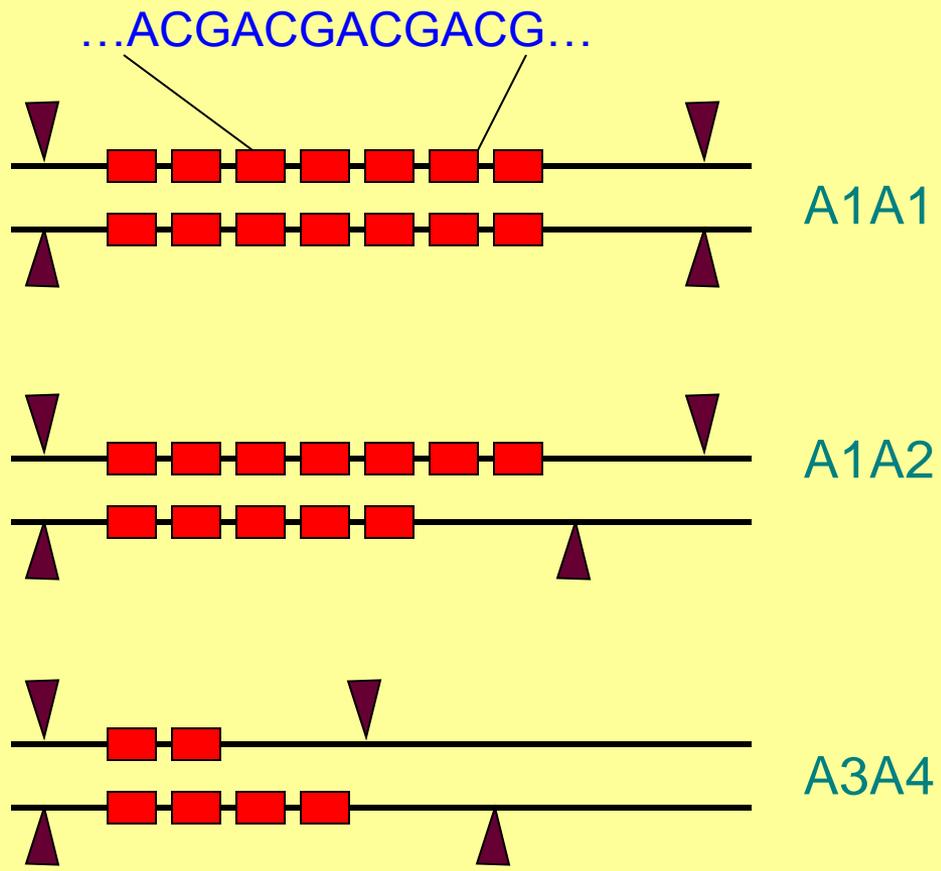
Occorrono sonde polimorfiche (costa il trovarle!)

Relativamente lento

Per lo più radioattivo

Marcatori Co-dominanti; spesso specie specifici

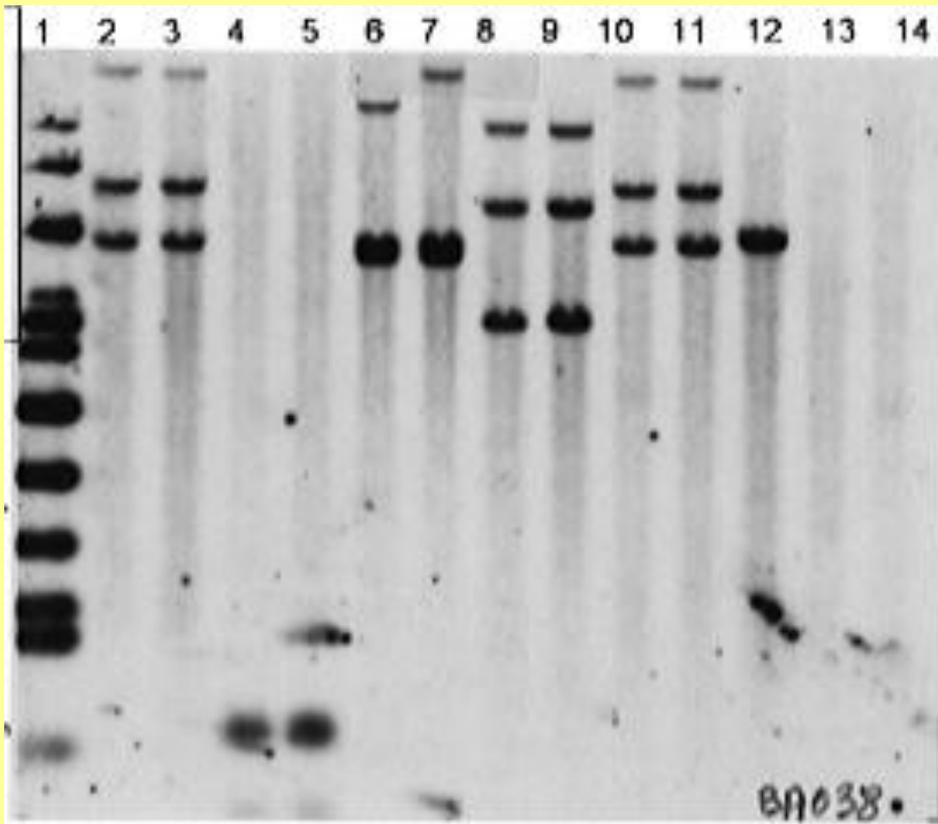
RFLPs possono anche derivare da minisatelliti
 (10-60 bp tandem repeats) (**VNTR**) o microsatelliti
 (1-5 bp repeats) (**SSRs**)



- altamente variabile
- sensibile
- genera spesso dei pattern multi-locus che consentono di discriminare anche singoli individui

Un esempio: RFLP Data da GrainGenes

EcoR1 EcoRV HindIII DraI

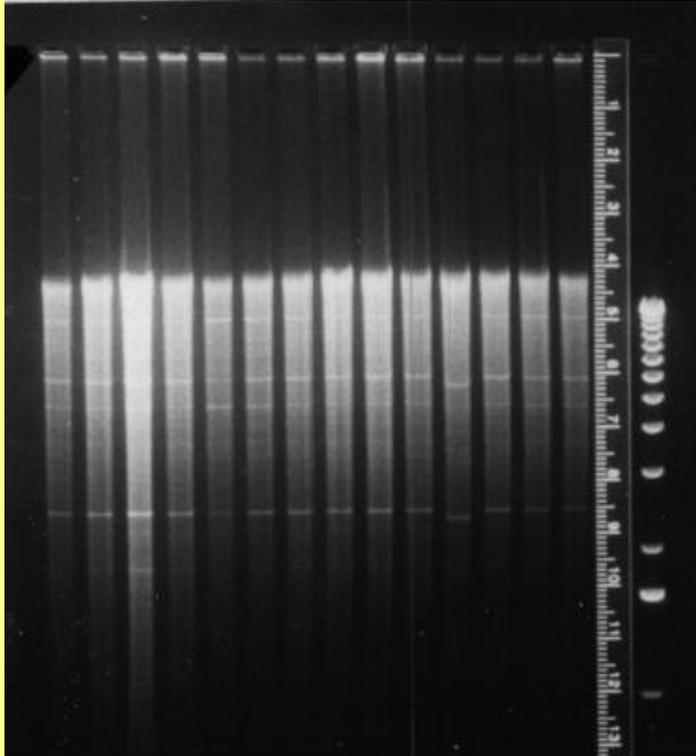


Lane

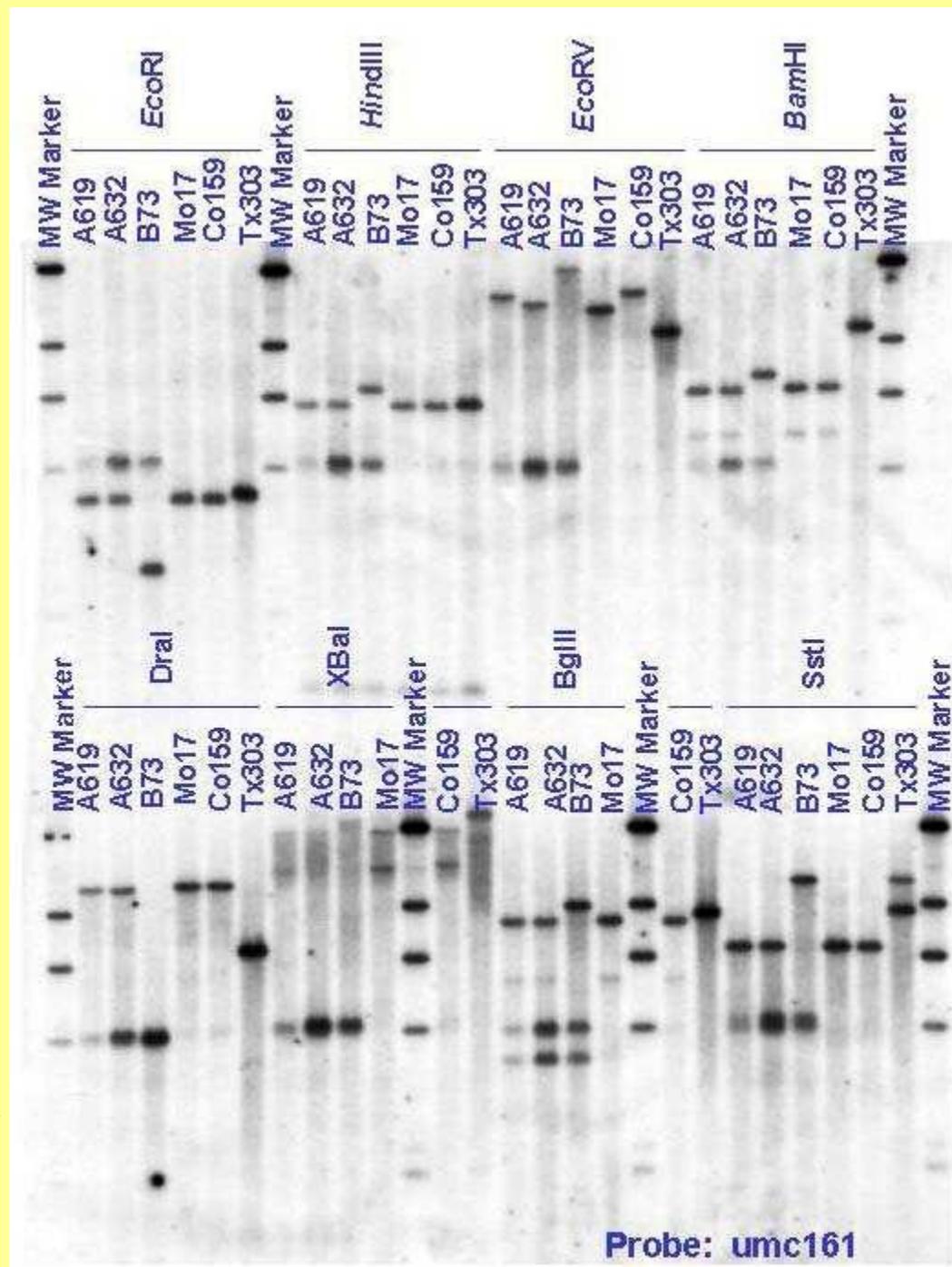
1. Molecular Weight Marker
2. Chinese Spring (T.a.) – DraI
3. Courtot (T.a.) - DraI
- 4,6,8,10. Synthetic (T.a. W7976)
- 5,7,9,11. Opata M 85 (T.a.)
12. T. monococcum
13. Barley – HindIII
14. Maize - HindIII

Altro esempio di RFLP

Restrizione di DNA genomico



6 Linee pure di mais tagliate con 8 enzimi di restrizione e ibridate con una sonda di DNA genomico



Marcatori molecolari basati sulla PCR

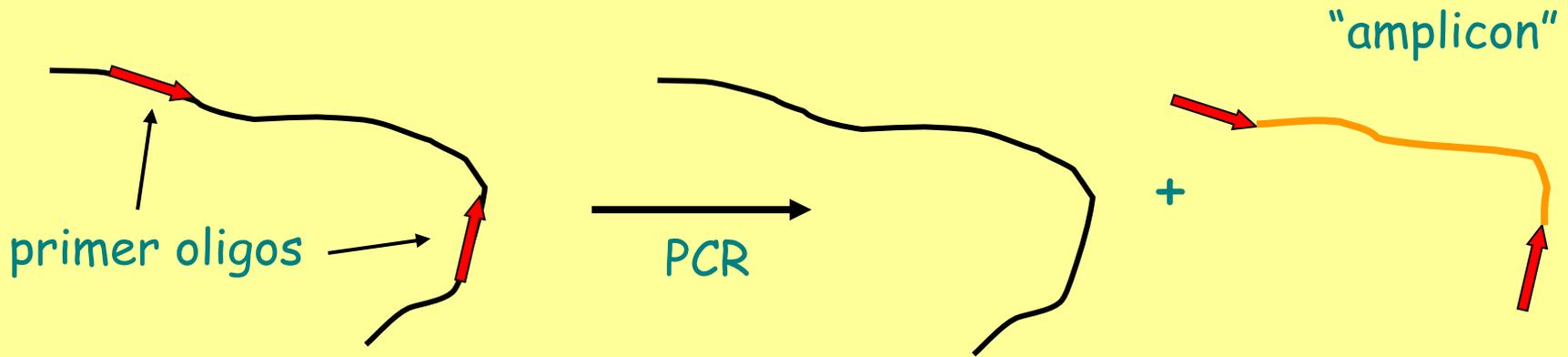
PCR: polymerase chain reaction

amplificazione di tratti di DNA definiti da sequenze fiancheggianti che ibridano con primer di innesco della DNA polimerasi

Occorre:

- sequenza del DNA target (non sempre)
- thermostable DNA polymerase (Taq)
- oligonucleotide primer(s) (7-30nt)
- dNTPs + Mg⁺⁺

La PCR

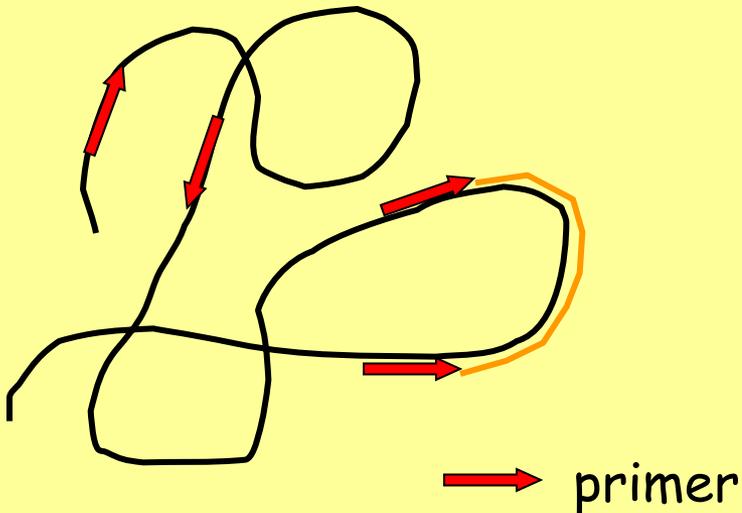


- ▶ Richiedono poco DNA e non DNA di qualità
- ▶ Non sono necessari dati di sequenza
- ▶ Primer corti e di sequenze casuali
- ▶ Molto sensibile (attenzione alle contaminazioni)
- ▶ Ottimizzazione e controllo della reazione
- ▶ Temperatura di annealing è bassa: 37°C
- ▶ Automatizzabili
- ▶ Tecnica facile ed abbastanza economica e veloce

Marcatori molecolari basati sulla PCR

RAPDs: random amplified polymorphic DNA markers

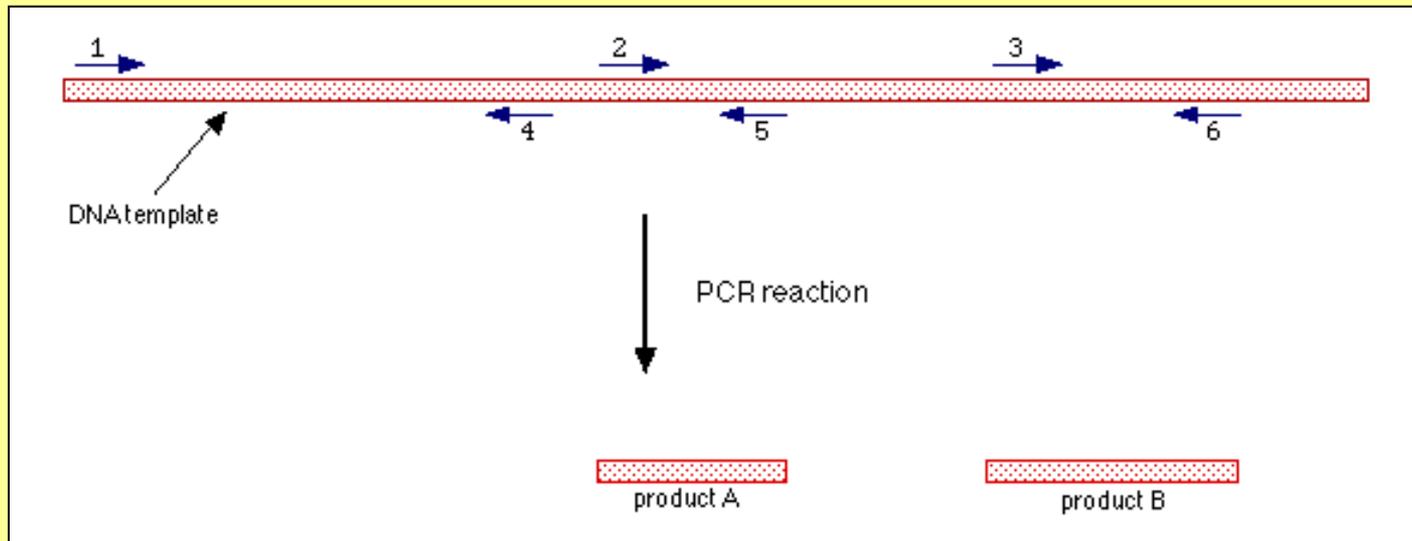
Primers arbitrari usati per amplificare il DNA da genomico totale



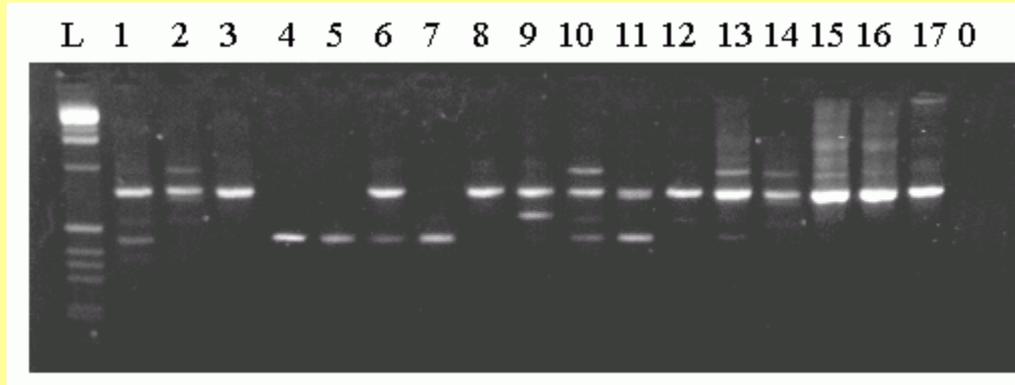
A	B	C
==	—	—
==	==	==
==	—	==
—	—	—
—	—	—

RAPDs

- Un oligo di 10 bp amplifica il DNA genomico.
- Si genera un prodotto se la sequenza è fiancheggiata da uno o più siti di annealing del primer e questi si trovano in una regione di 5000 bp max.
- Il DNA genomico dai 2 individui spesso produce dei pattern di amplificazione molto diversi

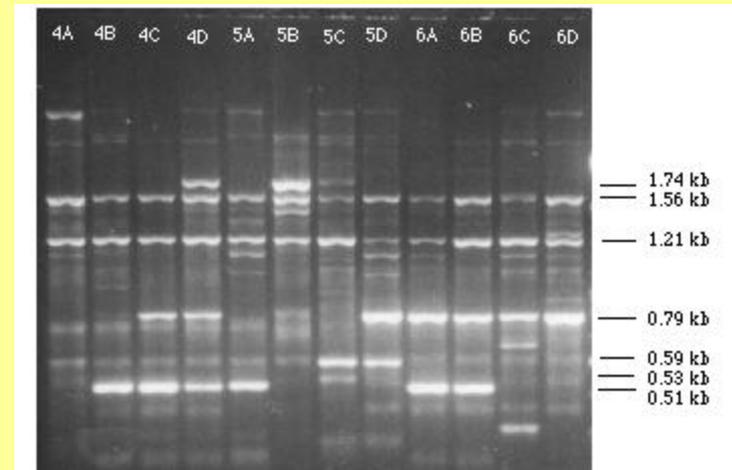


RAPDs

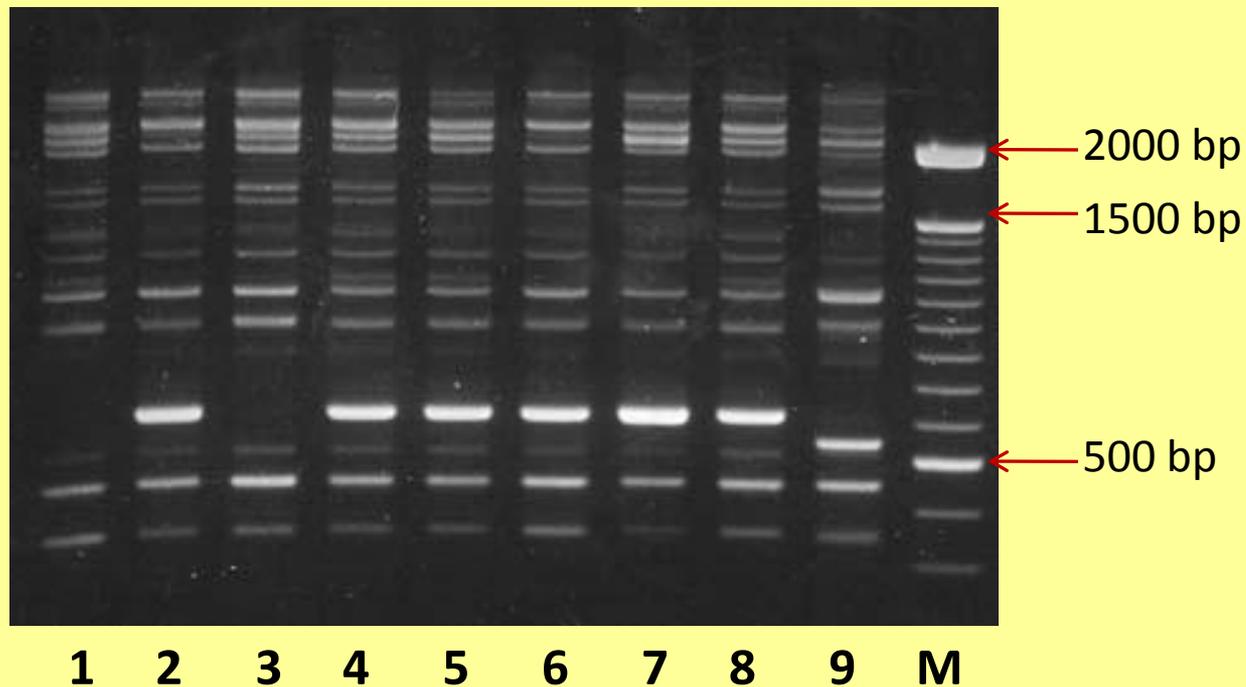


fragola

Ricci di mare



Analisi RAPD di 9 varietà di ciliegio



I campioni 1 e 3 provengono dalla stessa varietà, così come i campioni 2 e 6; nella corsia 9 è stato usato DNA di amareno

RAPDs

Sono marcatori anonimi - ma possono essere convertiti in SCAR

Sono dominanti

Fast, easy and cheap - esistono dei set di primer commerciali

PROBLEMI:

Non molto riproducibili (scarsa ripetibilità),

non sono esportabili

La stessa banda su due gel rappresenta lo stesso frammento di DNA?

Ogni banda rappresenta un solo frammento di DNA?

Si è cercato di migliorare i RAPDs...

SSR: short sequence repeats (microsatelliti)

SCARs: sequence-characterized amplified regions

CAPS: cleaved amplified polymorphic sequences

I microsatelliti o SSR

- ▶ Highly variable and somatically stable marker
- ▶ Specific primers designed for target species (18-25 nt)
- ▶ Highly reproducible and yet evolve quickly (mutation rate is higher than normal)
- ▶ A co-dominant marker with high heritability

I microsatelliti sono presenti in tutti gli eucarioti superiori dagli animali alle piante.

Non sembrano avere una funzione specifica, ma si è visto che sono presenti lungo tutto il genoma.

Dal punto di vista genetico queste sequenze hanno una notevole importanza in quanto sono molto polimorfiche all'interno di una specie e di conseguenza sono un ottimo marcatore molecolare:



in pratica individui diversi si possono riconoscere perché portano un numero di ripetizioni diverse del microsatellite.

un individuo può portare n . ripetizione del microsatellite e un altro può portarne $n+1$... Questa differenza non si manifesta a livello fenotipico, ma può essere rilevata sfruttando la PCR!

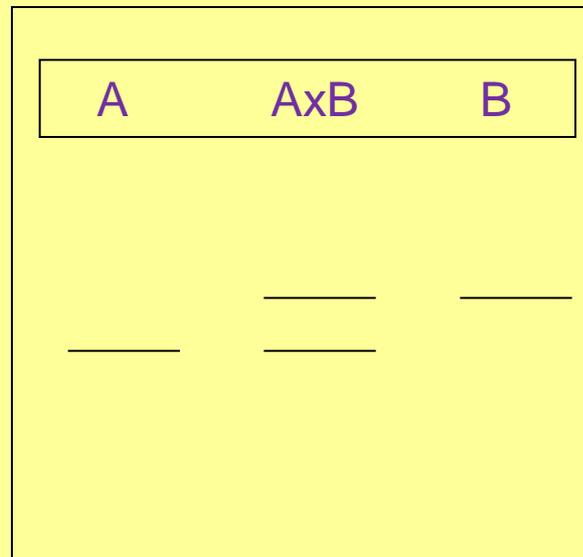
I microsatelliti o SSR (Simple Sequence Repeat)

Disegnando una coppia di primer che fiancheggia i microsatelliti è possibile amplificare selettivamente il tratto di DNA che contiene il microsatellite

Genotype A **CCATGAT**TATATATATAT**CCAATACGAACCC**

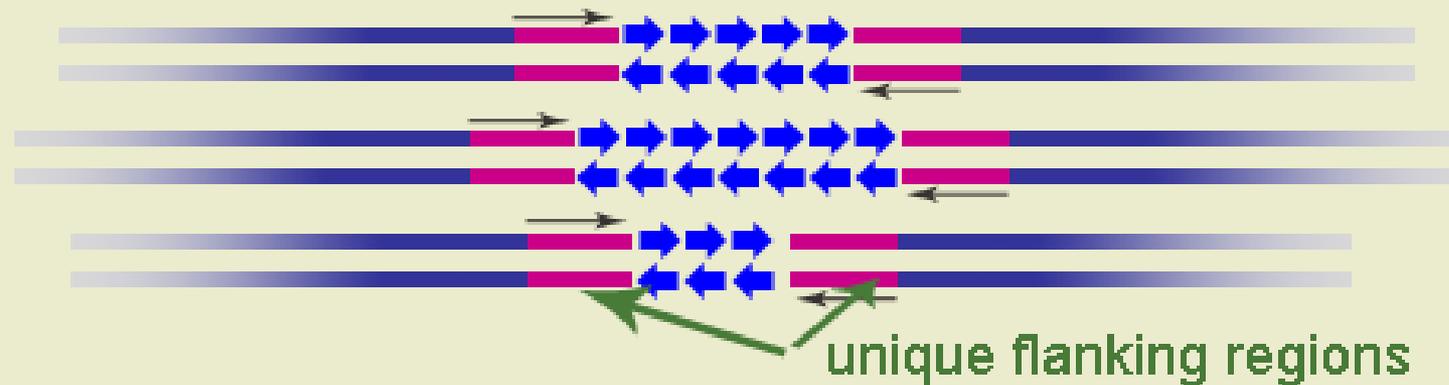
Genotype B **CCATGAT**TATATATATATATATAT**CCAATACGAACCC**

Il frammento generato avrà una lunghezza definita dalla distanza tra i due primer utilizzati.



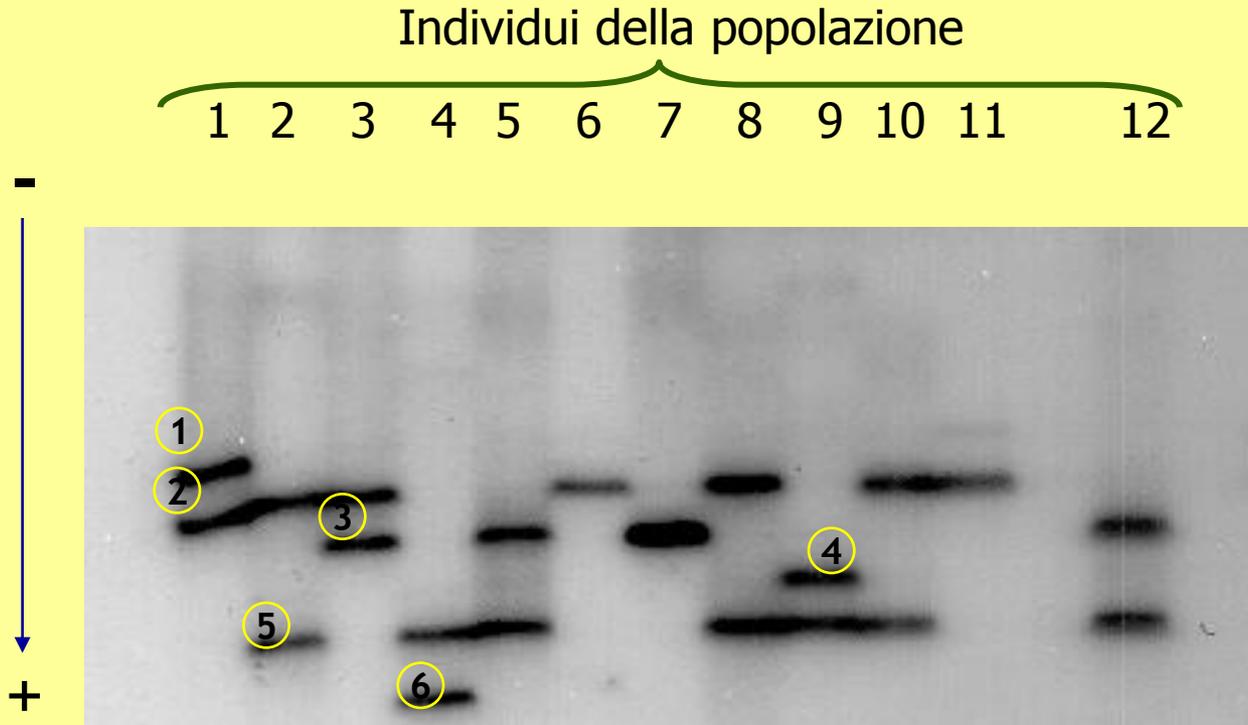
la presenza di varianti alleliche per la lunghezza delle ripetizioni genera frammenti di amplificazione di lunghezza differenti

The number of SSRs is highly variable among individuals



The flanking regions tend to be conserved within the species, although sometimes they may also be conserved in higher taxonomic levels.

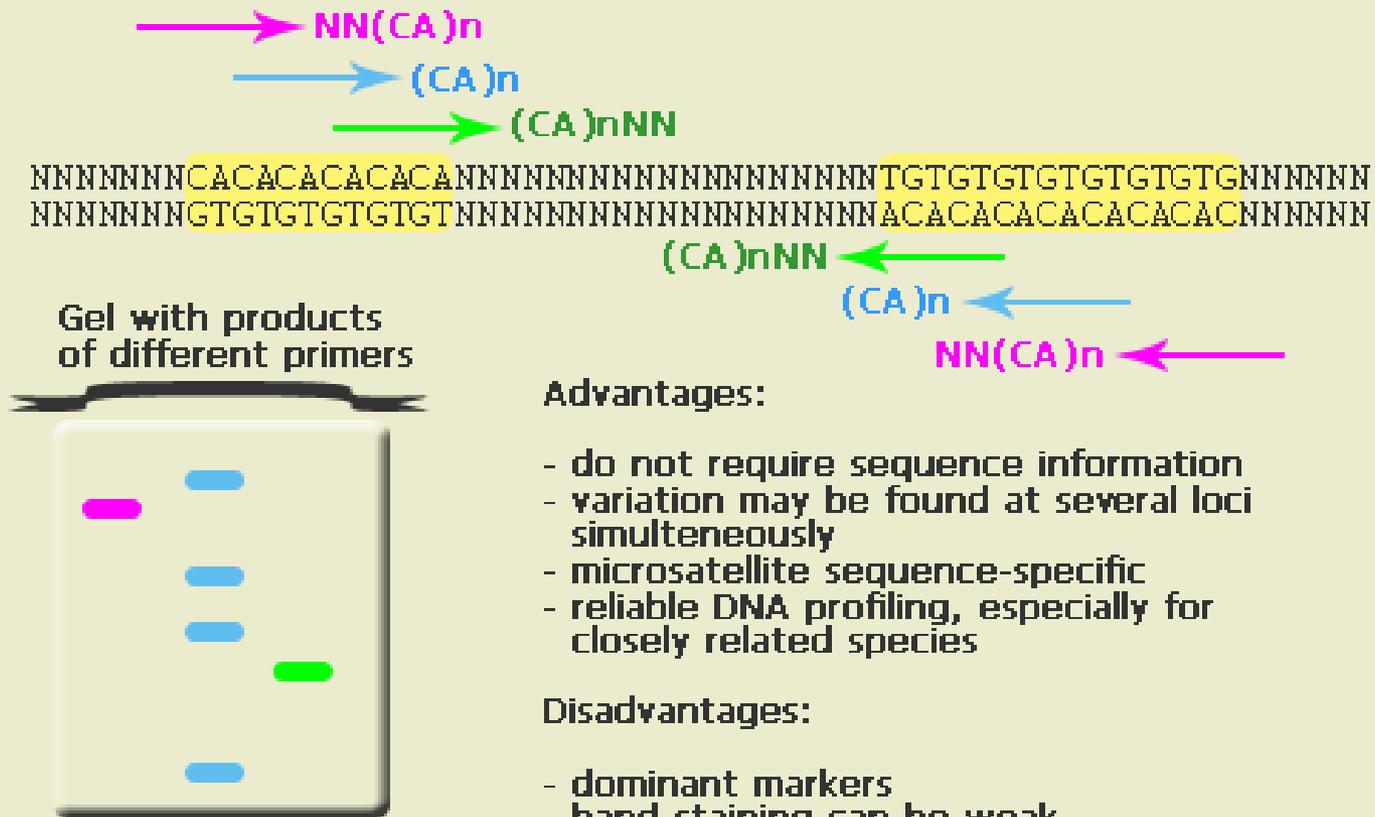
Analisi SSR di alcuni individui di una popolazione naturale



In una popolazione segregante si caratterizzano i suoi individui per centinaia di MM alla fine si può costruire una mappa di concatenazione (programmi al computer)

I-SSR (Inter-Small Sequence Repeats)

Designing primers for ISSR polymorphism



Advantages:

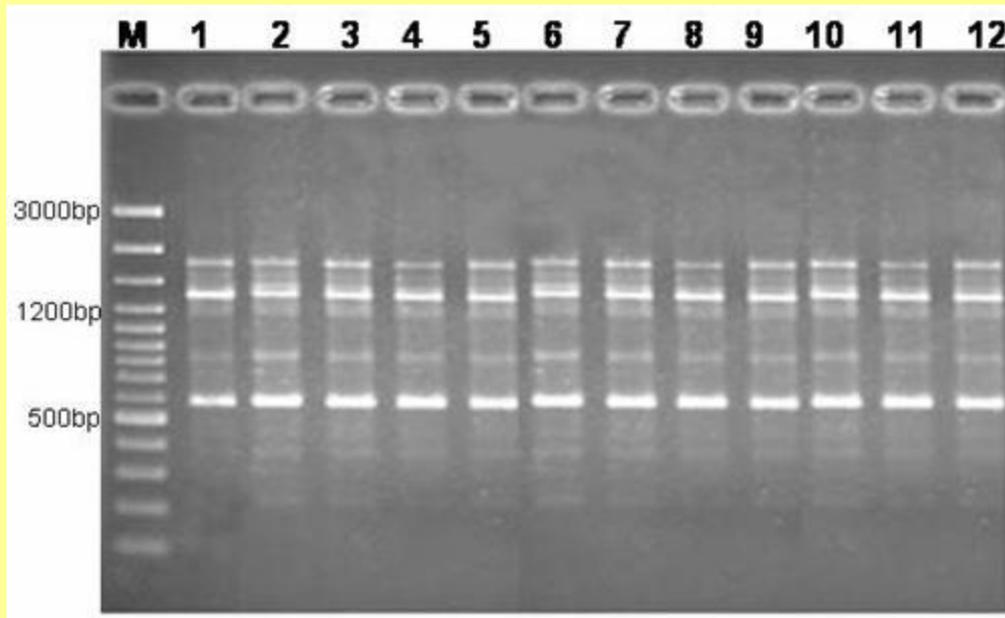
- do not require sequence information
- variation may be found at several loci simultaneously
- microsatellite sequence-specific
- reliable DNA profiling, especially for closely related species

Disadvantages:

- dominant markers
- band staining can be weak

Con primer ancorati al 5' si amplificano interamente anche i 2 microsatelliti

Con primer ancorati al 3' si amplifica soltanto la regione terminale dei 2 microsatelliti



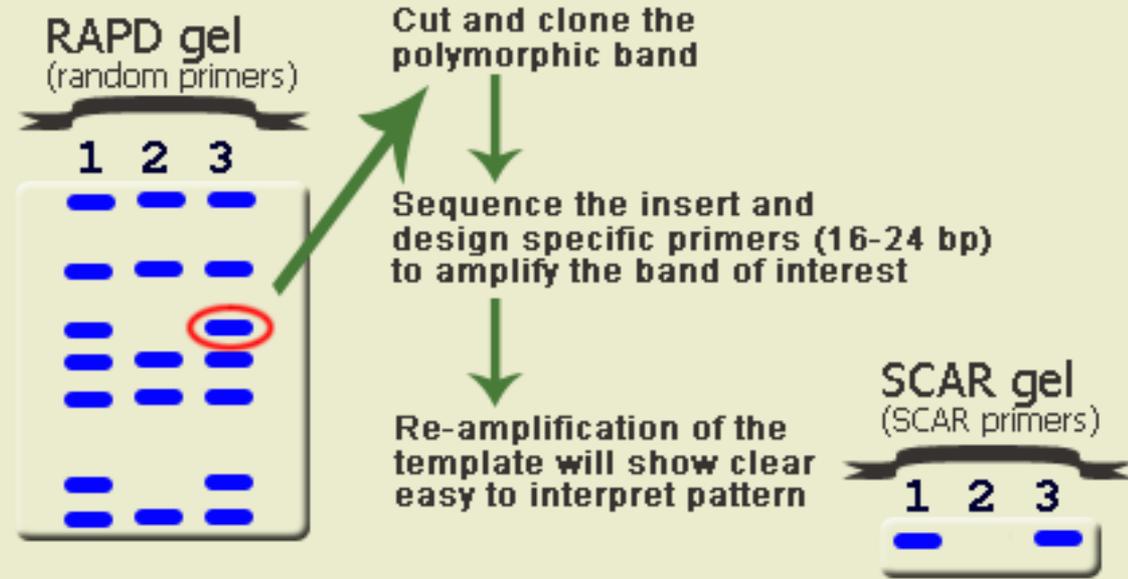
Inter Small Sequence Repeats (ISSR) amplification pattern obtained for DNA of mother plant (lane 1) and long-term micropropagated shoot cultures (lanes 2-12) generated by primer UBC 811. M: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus.

Utile per la conservazione del materiale genetico,
per lo studio della biodiversità

SCAR procedure

SCARs

sequence-
characterized
amplified
regions



- ▶ An informative RAPD-generated fragment is sequenced - \therefore **no longer anonymous**
- ▶ Sequence-specific PCR primers (22-30 nt) are then designed to target this locus
- ▶ SCARS are more **reproducible** (long specific primers)
- ▶ SCARS are **co-dominant** markers; detectable in both homozygotes and heterozygotes

Marcatori basati sulla PCR

CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)

Il polimorfismo viene identificato con le differenze in lunghezza dei frammenti di restrizione causate da SNP o INDEL che creano o eliminano il sito di restrizione in un amplicone di PCR

Questa tecnica ha lo scopo di convertire bande di prodotti di PCR che non mostrano polimorfismo in frammenti polimorfici

1. Primers used to amplify a particular locus
2. Amplicon digested with a restriction enzyme
3. Fragments electrophoretically resolved
4. Polymorphisms detected as differences in fragment sizes

Marcatori basati sulla PCR

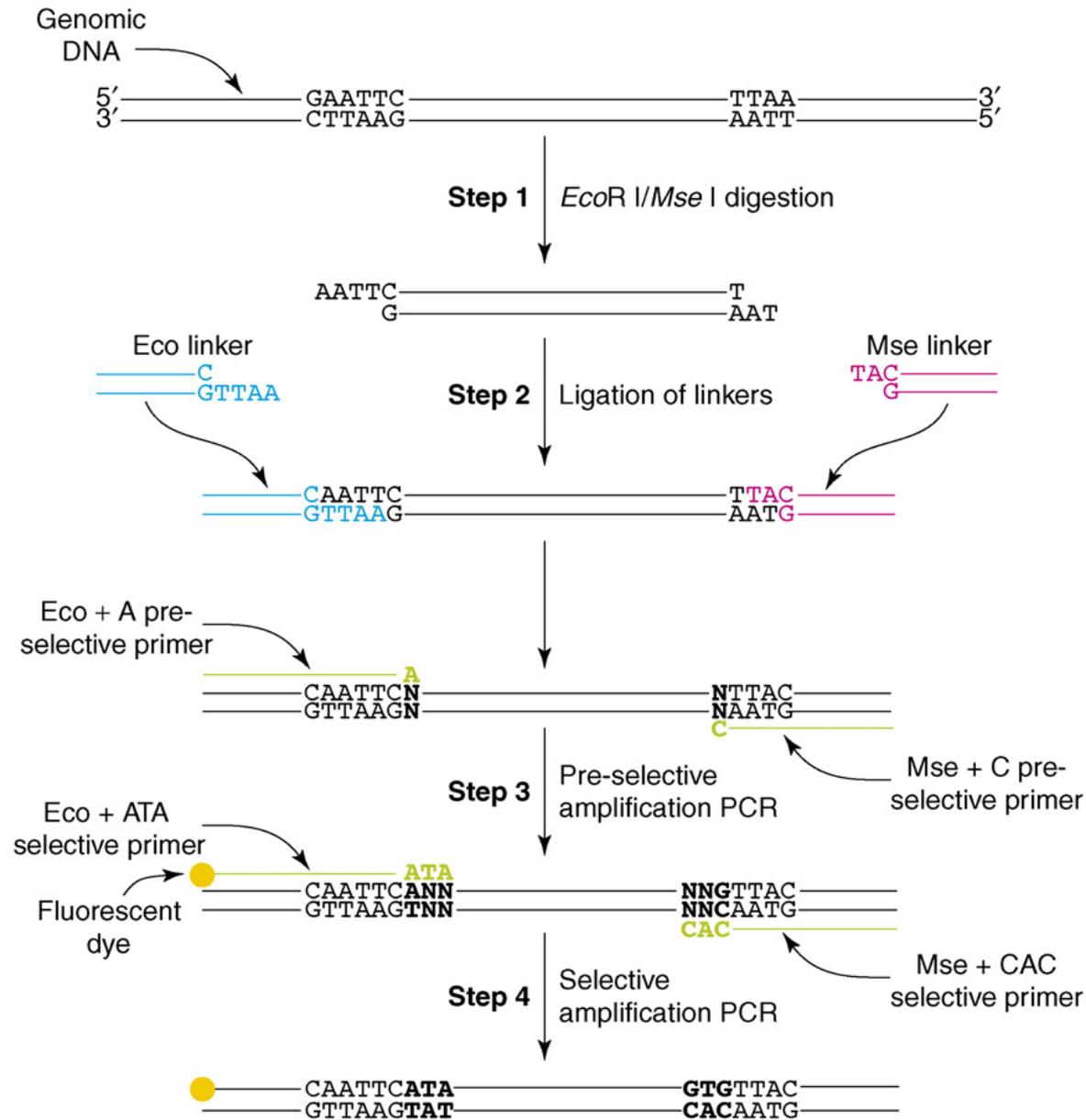
AFLPs: amplified fragment length polymorphisms

- ◆ A combination of PCR and RFLP
- ◆ Informative fingerprints of amplified fragments

I prodotti vengono frazionati in un gel ad alta risoluzione

Si monitorano i prodotti di amplificazione usando i dNTP radioattivi nel secondo step della PCR, seguita da autoradiografia o con marcatori fluorescenti

Tecnica AFLP



EcoR1-EcoR1
EcoR1-MseI
MseI-MseI

Ligazione con adattatori

Amplificazione pre-selettiva
(con A, T, C o G)

Amplificazione selettiva
(con NN)

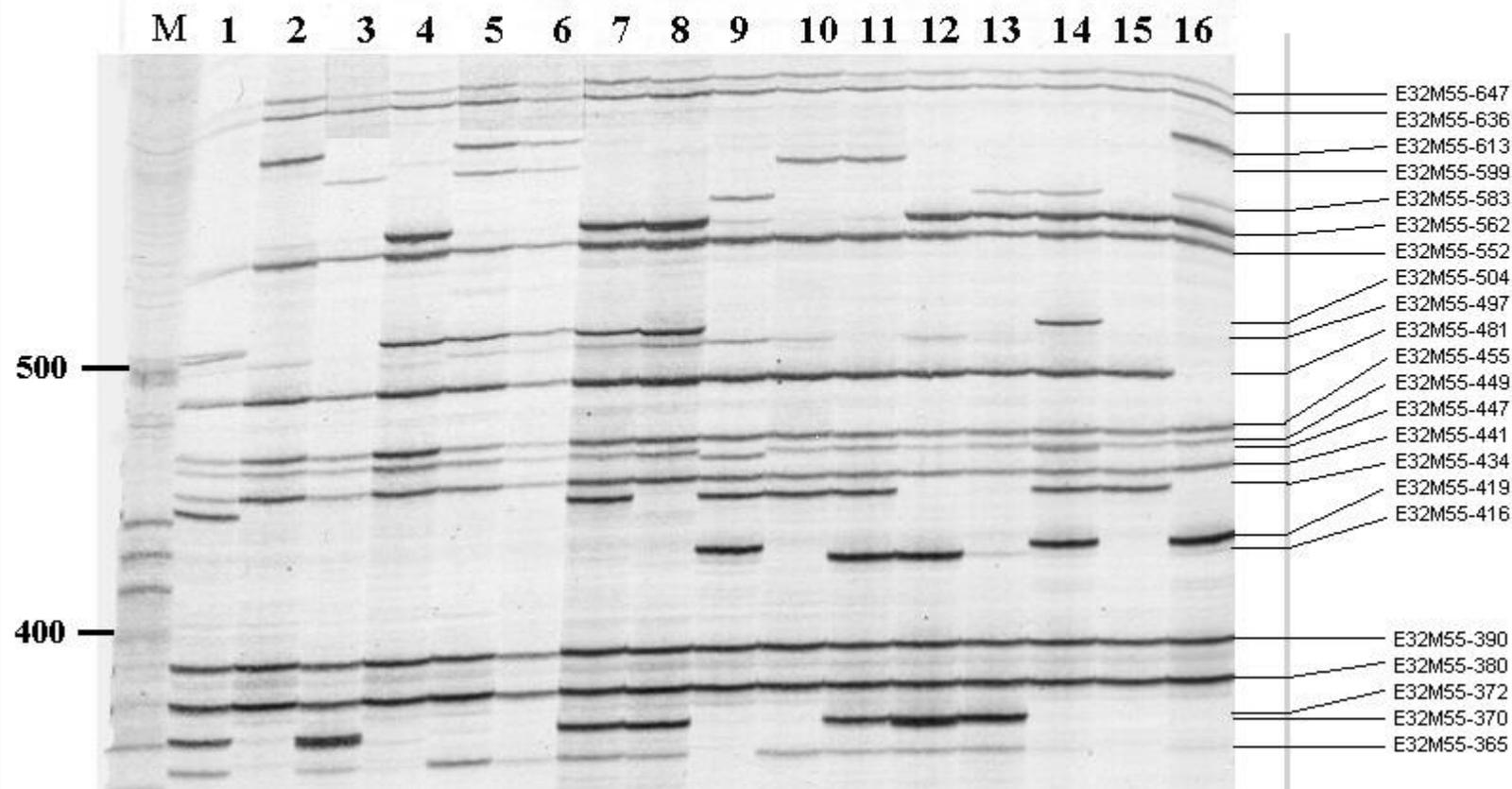
Per ottenere un numero di
frammenti visualizzabili con
l'elettroforesi

AFLP process

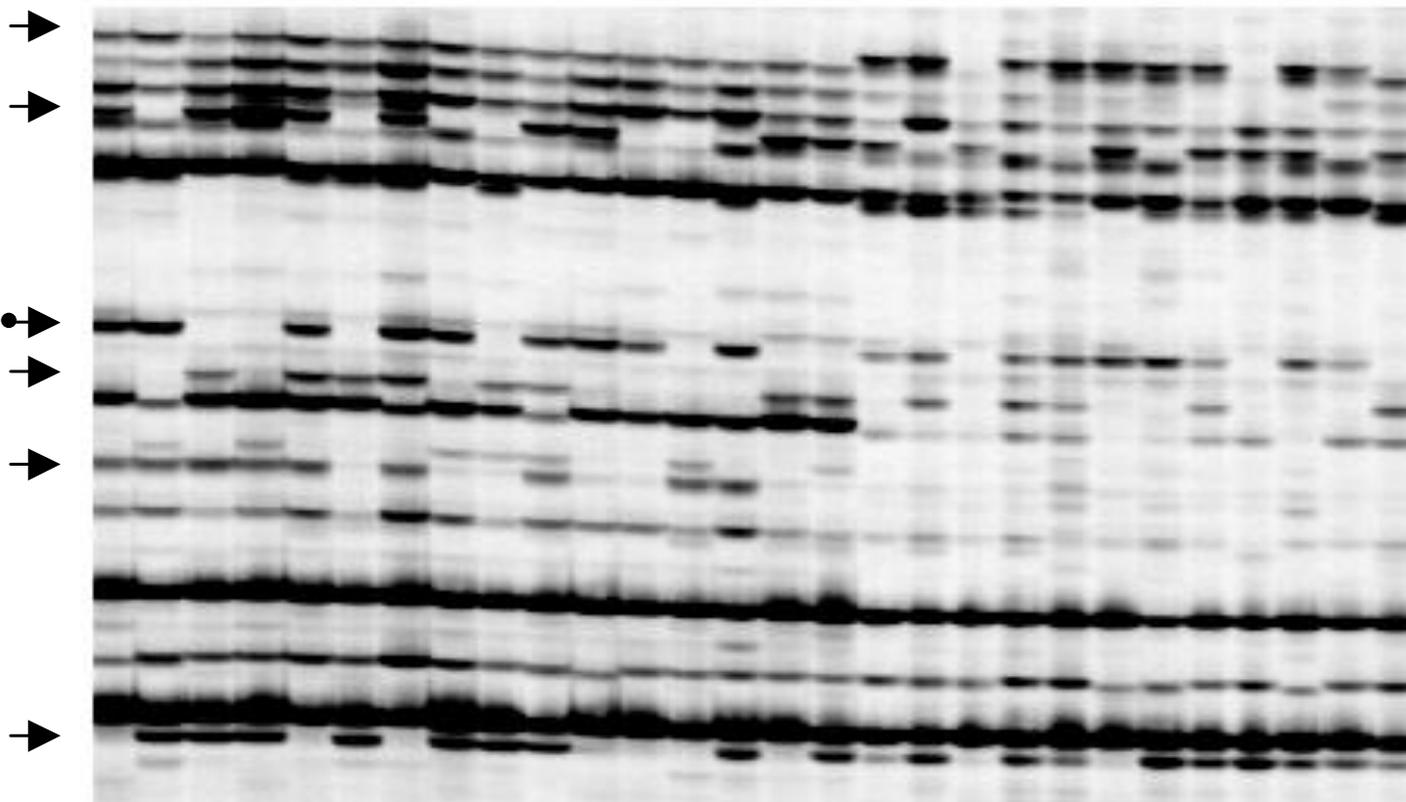
1. Digest genomic DNA with restriction enzymes
2. Ligate commercial adaptors (defined sequences) to both ends of the fragments
3. Carry out PCR on the adaptor-ligated mixture, using primers that target the adaptor, but that vary in the base(s) at the 3' end of the primer

AFLP profile of 16 barley lines by E32/M55

M: 10 bp DNA size markers	3: Steptoe	6: Franka	9: Apex	12: C118	15: Vada
1: Harrington	4: Morex	7: Proctor	10: Prisma	13: C123	16: 116-5
2: TR306	5: Igri	8: Nudinka	11: C92	14: L94	



E32 5' GACTGCGTACCAATTCAAC
M55 5' GATGAGTCCTGAGTAA CGA



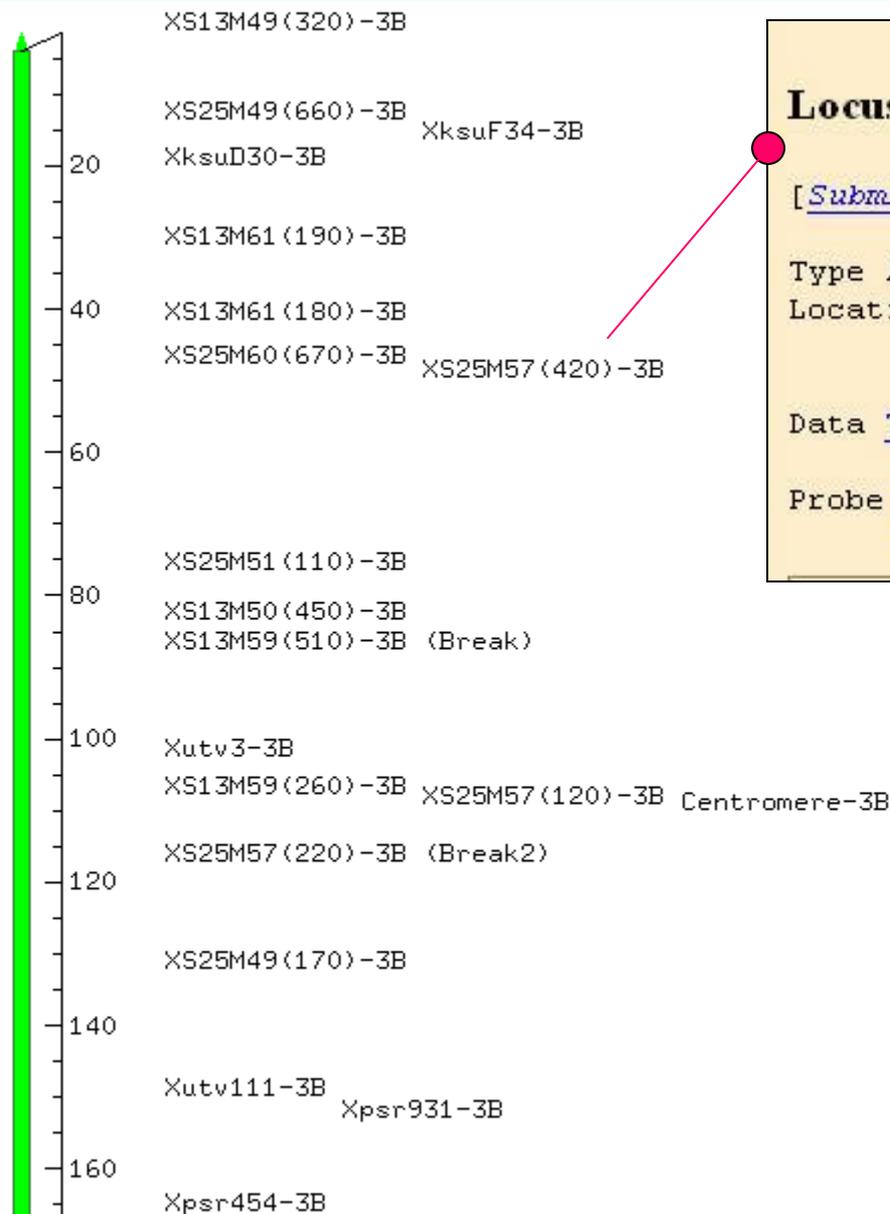
Linanthus -
AFLP Gel
Dr. C. Goodwille

Analisi dei dati:

Truly homology fragment

Intensity thresholds above which fragments are scored as present

Artefactual shoulder peak



Locus : XS25M57(420)-3B

[[Submit comment/correction](#)]

Type AFLP

Location Chromosome 3B

Chromosome_arm 3BS

Map Tturgidum-MxM-AFLP-3B Position 48.3

Data T. turgidum, Messapia x dicoccoides,

AFLP

Probe S25M57

Probe : S25M57

[[Submit comment/correction](#)]

Locus XS25M57(240)-1A

XS25M57(420)-3B

XS25M57(120)-3B

XS25M57(220)-3B

XS25M57(215)-7A

XS25M57(290)-7B

Type PCR

AFLP_primers S25 5' GACTGCGTACATGCAGGTG

M57 5' GATGAGTCCTGAGTAACGG

AFLPs

Very sensitive

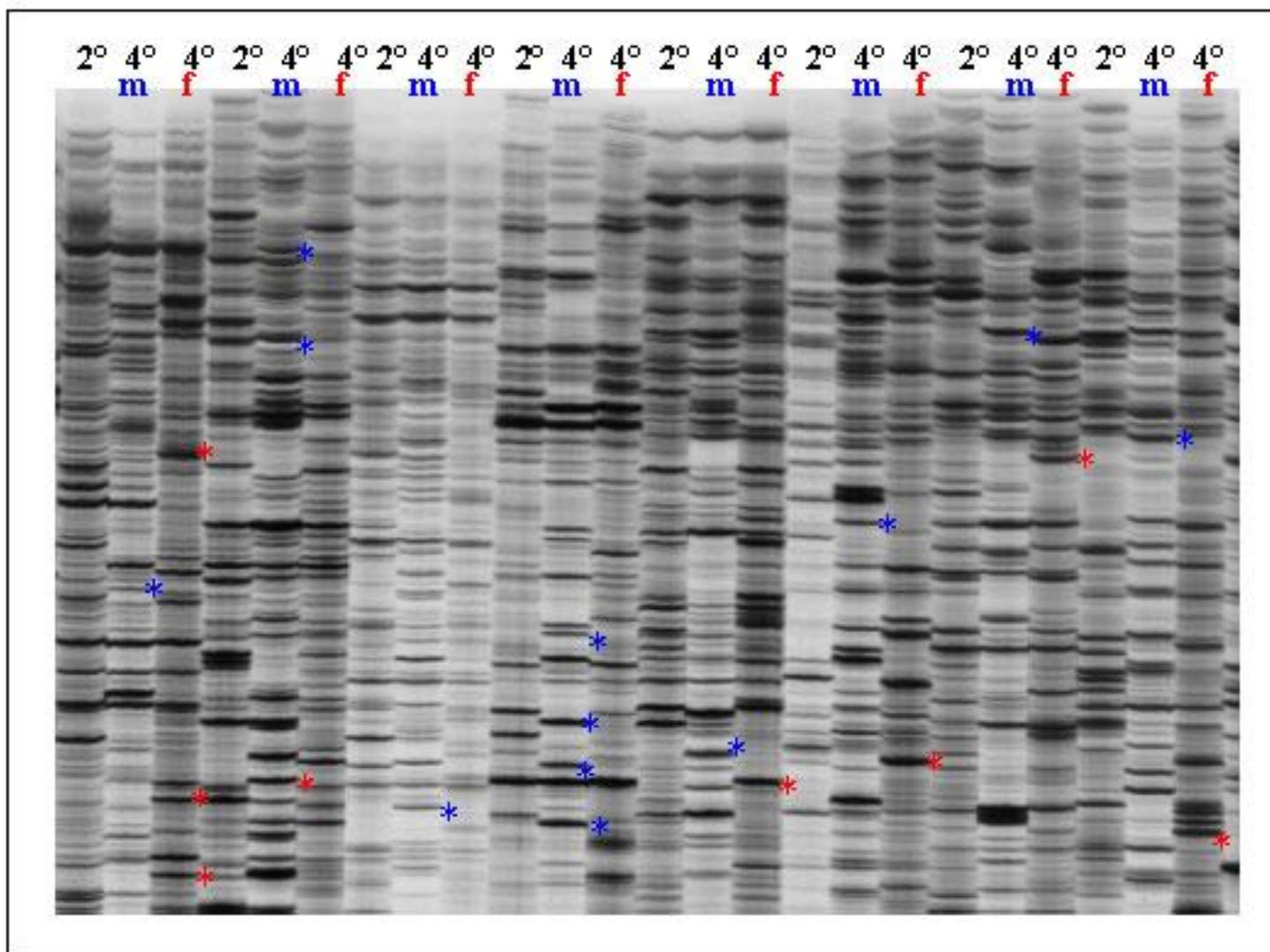
Good reproducibility but technically demanding

Relatively expensive technology

Discriminating homozygotes from heterozygotes requires **band quantitation** (comparison of pixel density in images from a gel scanner)

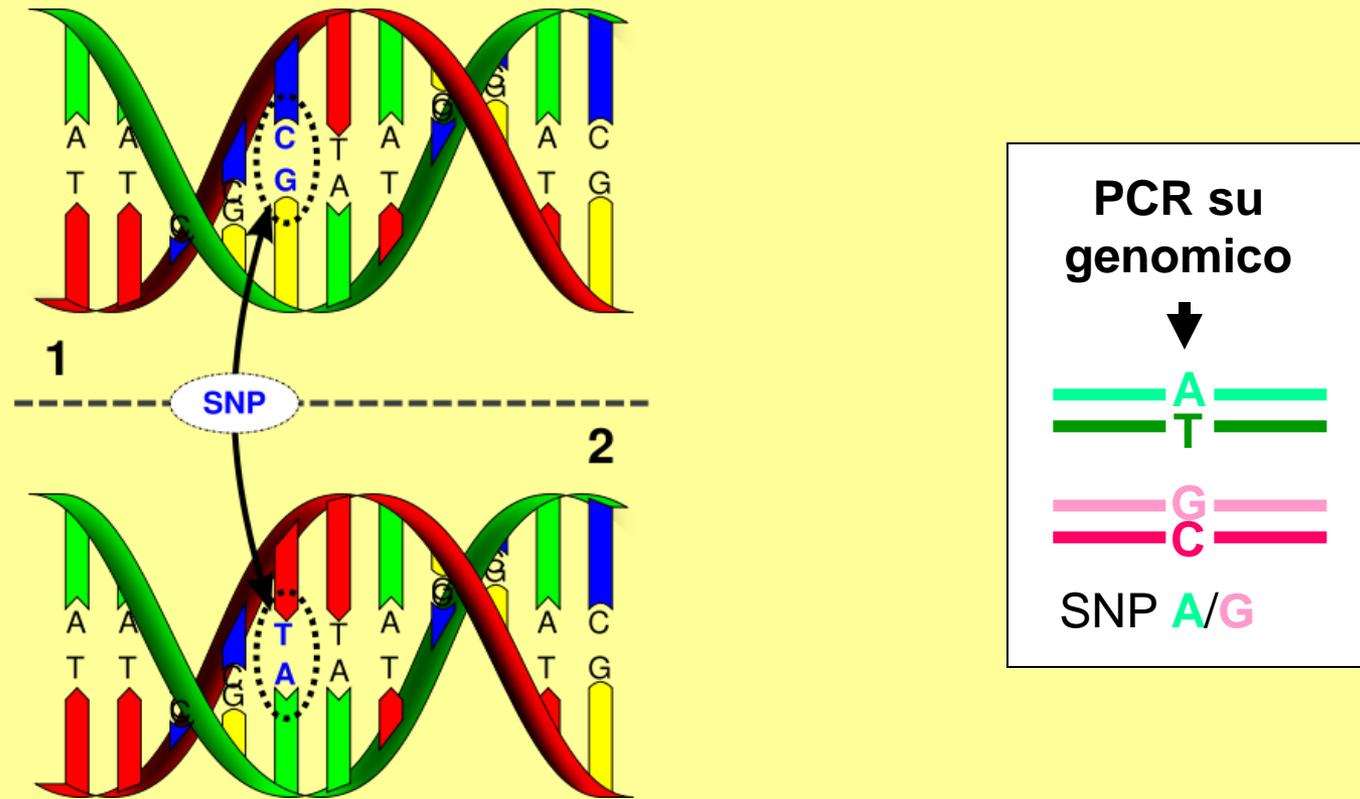
Bands are **anonymous** - interpretation of patterns can be challenging

Sono stati convertiti in cDNA-AFLP per studiare l'espressione differenziale



Gel cDNA-AFLP dei trascritti di piantine di canapa a diversi stadi. I numeri si riferiscono allo stadio di sviluppo (2° o 4° nodo); m ed f si riferiscono alle corsie corrispondenti ai maschi e alle femmine dello stadio "4° nodo". Gli asterischi indicano la posizione di frammenti espressi differenzialmente nelle piante maschili e femminili.

Gli SNP (single nucleotide polymorphism)



Perché utilizzare gli SNPs?

- ▶ Sono la base molecolare della maggior parte delle differenze tra individui
- ▶ Possono contribuire alla suscettibilità a malattie e all'adattabilità delle specie
- ▶ Sono presenti in un elevato numero e sono distribuiti lungo tutto il genoma

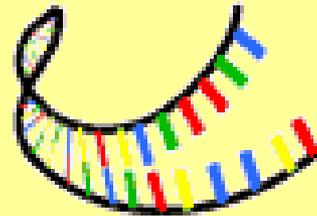
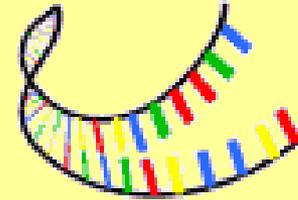
SNP o mutazioni?

E' una differenza, o polimorfismo, di un singolo nucleotide nella sequenza di DNA esistente in alcuni individui della stessa specie.

- Il loro numero varia notevolmente a seconda della specie

Polymorphism

"Poly" *many* "morpho" *form*



SNP (Polimorfismi di Singolo Nucleotide)

Abbondanza ed elevato potenziale di automazione dell'analisi

- Sono i polimorfismi più abbondanti nei genomi:

Uomo 1/Kb, Soia 2/400 bp, Mais fino 1/40 bp, Riso 10/Kb

- Maggiore frequenza in regioni non codificanti:
analisi di 3'/ 5' UTR e introni

(Aplotipo = Collezione di alleli di marcatori strettamente associati e quindi ereditati insieme)

IDENTIFICAZIONE DI SNP 'IN SILICO'

Le EST presenti in banca dati rappresentano un'ottima risorsa per la ricerca di **SNP** (Ridondanza sequenze e diversi genotipi rappresentati)

Identificazione di SNP 'in silico' allineando EST di orzo derivanti dallo stesso gene ma prodotte da otto genotipi diversi presenti in banca dati

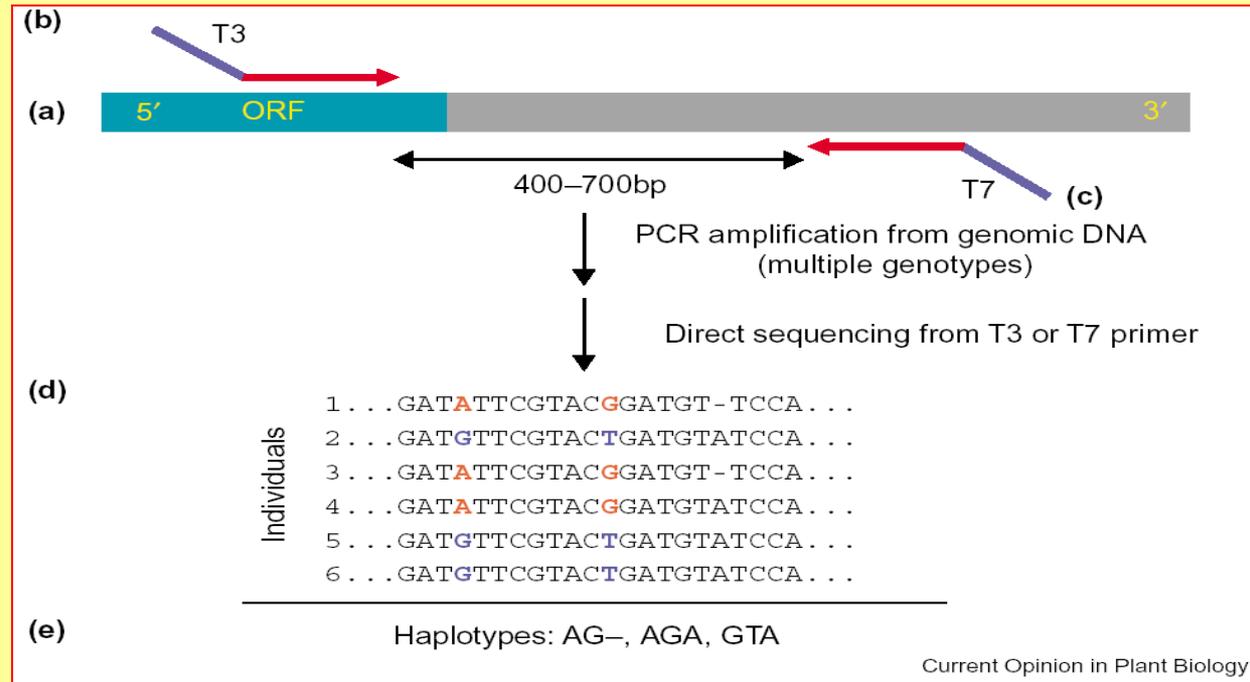


AV942623	H602	G	T	G	G	C	G	T	T	G	A	C	C	A	G	C	G	A	G	C	T	G	A	G	T	G	G	C	G	A	G	G	G	C	C	T	G	A	A	G	C	C	G	G	C	C	A	T	G	G
AV945760	H602	G	T	G	G	C	G	T	T	G	A	C	C	A	G	C	G	A	G	C	T	G	A	G	T	G	G	C	G	A	G	G	G	C	C	T	G	A	A	G	C	C	G	G	C	C	A	T	G	G
AV947409	H602	G	T	G	G	C	G	T	T	G	A	C	C	A	G	C	G	A	G	C	T	G	A	G	T	G	G	C	G	A	G	G	G	C	C	T	G	A	A	G	C	C	G	G	C	C	A	T	G	G
BJ486949	H602	G	T	G	G	C	G	T	T	G	A	C	C	A	G	C	G	A	G	C	T	G	A	G	T	G	G	C	G	A	G	G	G	C	C	T	G	A	A	G	C	C	G	G	C	C	A	T	G	G
AV943786	H602	G	T	G	G	C	G	T	T	G	A	C	C	A	G	C	G	A	G	C	T	G	A	G	T	G	G	C	G	A	G	G	G	C	C	T	G	A	A	G	C	C	G	G	C	C	A	T	G	G
AL511133	barke	G	T	G	G	C	G	T	T	G	A	C	C	A	G	C	G	A	G	C	T	G	A	G	C	G	G	C	G	A	G	G	G	C	C	T	G	A	A	G	C	C	G	G	C	C	A	T	G	G
BQ660568	barke	G	T	G	G	C	G	T	T	G	A	C	C	A	G	C	G	A	G	C	T	G	A	G	C	G	G	C	G	A	G	G	G	C	C	T	G	A	A	G	C	C	G	G	C	C	A	T	G	G
BQ660676	barke	G	T	G	G	C	G	T	T	G	A	C	C	A	G	C	G	A	G	C	T	G	A	G	C	G	G	C	G	A	G	G	G	C	C	T	G	A	A	G	C	C	G	G	C	C	A	T	G	G
BQ665172	barke	G	T	G	G	C	G	T	T	G	A	C	C	A	G	C	G	A	G	C	T	G	A	G	C	G	G	C	G	A	G	G	G	C	C	T	G	A	A	G	C	C	G	G	C	C	A	T	G	G

Il risequenziamento e l'allineamento delle sequenze mediante appositi software (PHRAP, PHRED, CONSED) è la via più diretta per individuare nuovi SNP.

SEQUENZIAMENTO DIRETTO

Informazioni su alleli e sequenze adiacenti (necessarie per la successiva fase di scoring ad alta efficienza)



Primers su sequenze note

PCR e sequenziamento degli amplificati

Allineamento di sequenze per identificare i polimorfismi SNP

Individuare gli **aplotipi**



le possibili varianti alleliche permettono di individuare inequivocabilmente un singolo genotipo

Marcatori SNP per individui diversi della stessa specie possono essere identificati interrogando le banche dati di EST

Per molte specie esistono collezioni EST molto consistenti

Problemi:

la trascrittasi inversa per la sintesi del cDNA può commettere errori (falsi SNP)

amplificaz. di DNA genomici la DNA polimerasi può commettere errori
sequenze EST hanno normal. dimensioni ridotte, necessaria la valutaz.
di molti cloni per identificare i possibili SNP di un gene completo

Il polimorfismo legato a regioni espresse del genoma:

permette di seguire i meccanismi adattativi messi in atto dalle specie in risposta alla pressione selettiva ;

identificare la variabilità associata a geni che controllano i caratteri di interesse agronomico che possono essere migliorati;

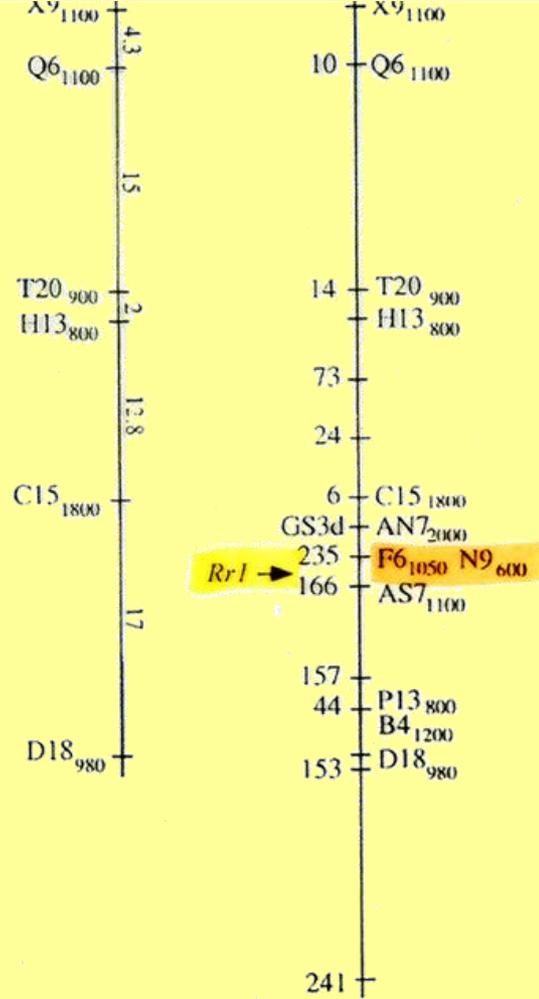
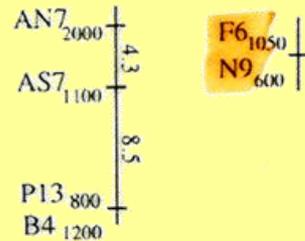
sono molto adatti alle analisi filogenetiche ed evolutive e per l'analisi dei QTL

Table 1.
Comparison of the most common used marker systems in cereals.

Feature	RFLPs	RAPDs	AFLPs	SSRs	SNPs
DNA required (μg)	10	0.02	0.5-1.0	0.05	0.05
DNA quality	high	high	moderate	moderate	high
PCR-based	no	yes	yes	yes	yes
Number of polymorph loci analysed	1.0-3.0	1.5-50	20-100	1.0-3.0	1.0
Ease of use	not easy	easy	easy	easy	easy
Amenable to automation	low	moderate	moderate	high	high
Reproducibility	high	unreliable	high	high	high
Development cost	low	low	moderate	high	high
Cost per analysis	high	low	moderate	low	low

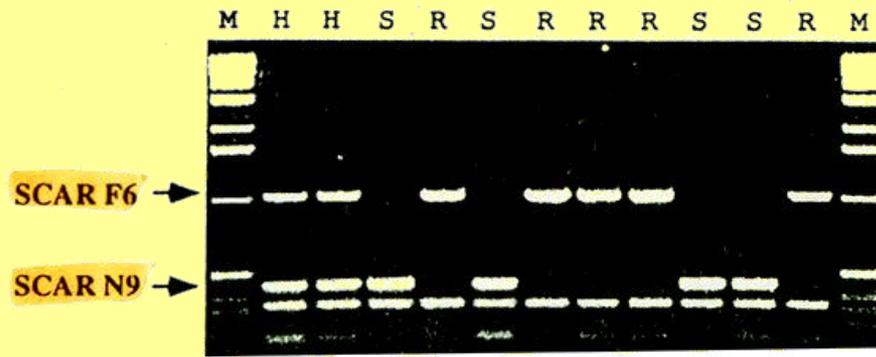
Alcuni esempi

La malattia più grave della barbabietola causata da un virus trasmesso da un fungo



Rrl →

Identificati i marcatori attraverso la BSA



Rhizomania



MAS per la resistenza alla ticchiolatura

Un esempio pratico in melo

Svantaggi:

- Specie allogama obbligata (forte sistema di autoincompatibilità)
 - Non sono possibili dei veri reincroci
 - Non sono disponibili linee pure
- Periodo giovanile molto lungo (3-5 anni)

Vantaggi:

- Elevato livello di eterosi
- Pianta perenne
- Possibile riproduzione vegetativa (talea)

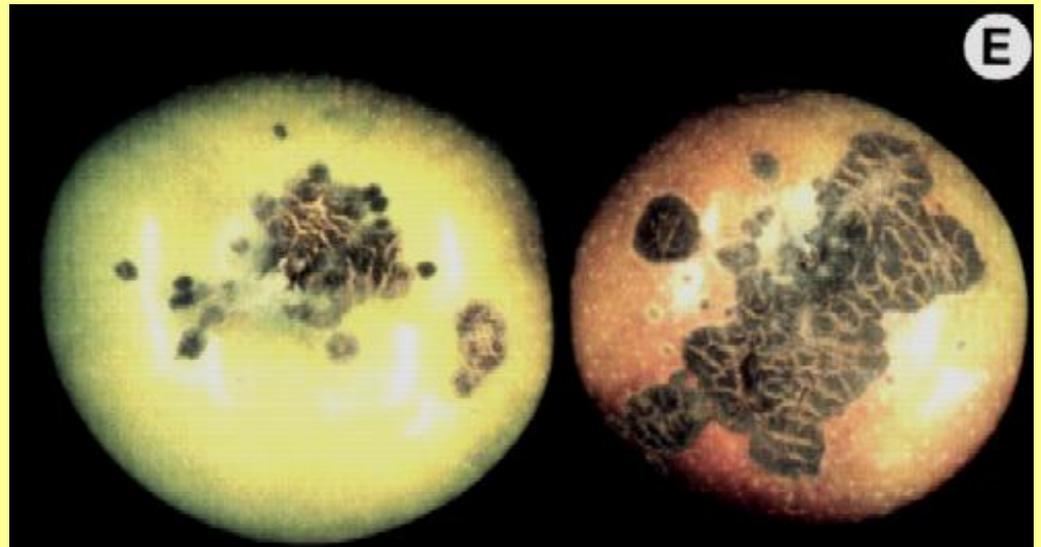
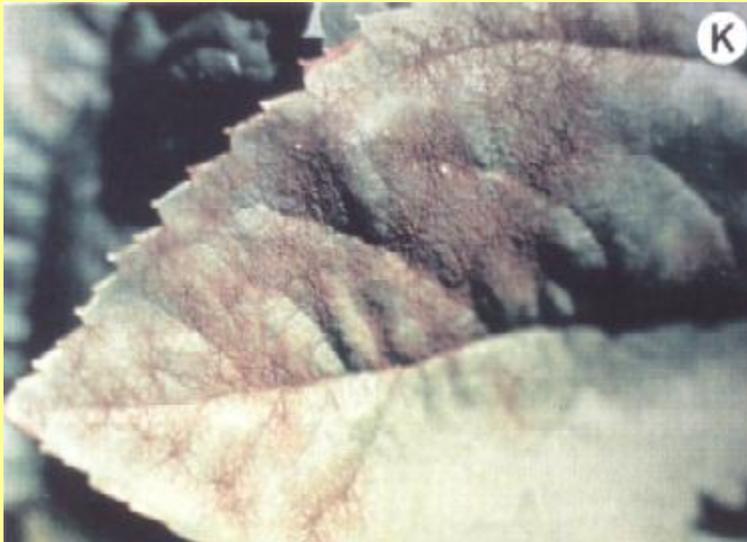


La ticchiolatura del melo

E' la più importante patologia del melo.

E' causata dal fungo *Venturia inaequalis*

E' diffusa in tutte le regioni del mondo in cui vengono coltivati meli.



from: Apple scab, W.E. MacHardy, APS press

Fonti monogeniche di resistenza alla ticchiolatura

- *Vf* *Malus floribunda* 821
- *Vr* *M. pumila*, Russian selection R12740
- *Vb* Hansen's *baccata* #2
- *Vbj* *M. baccata jackii*
- *Vm* *M. micromalus*
- *Va* Antonovka P.I. 172623

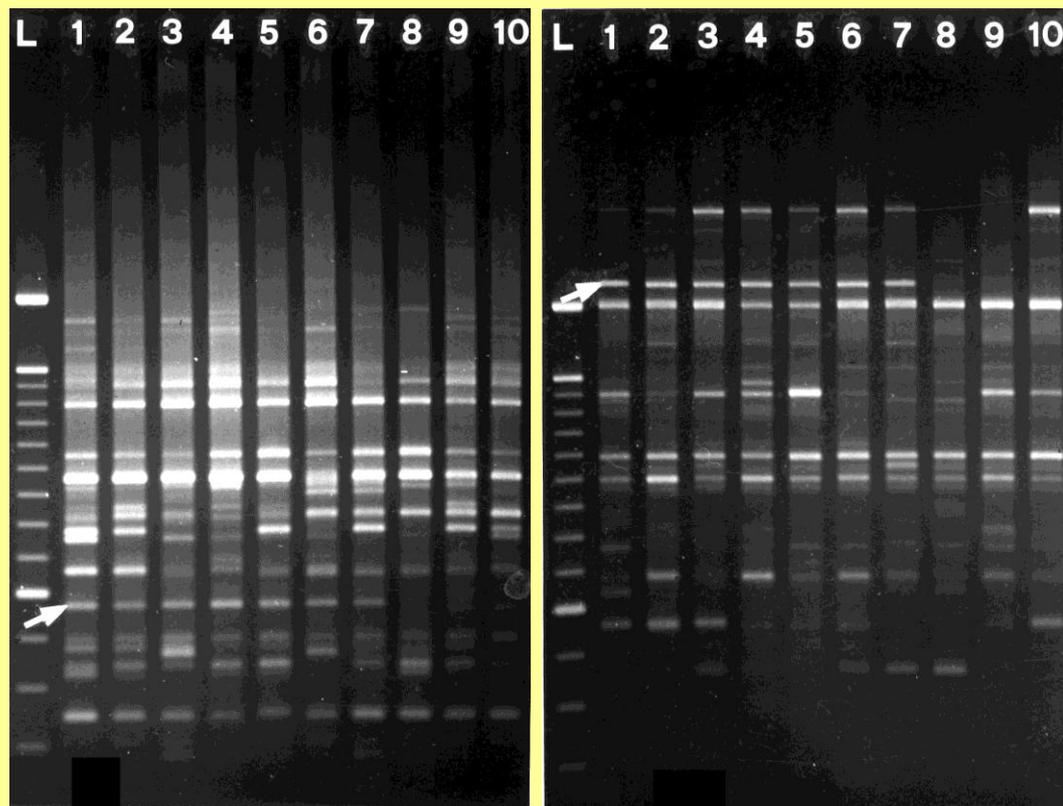
La maggior parte delle resistenze si trova in specie selvatiche di melo che producono mele di bassissima qualità, più simili a bacche che a frutti

La resistenza Vf

- Derivata da *Malus floribunda* 821
- Carattere monogenico
- I sintomi dell'attacco del fungo su piante Vf-resistenti vanno dall'assenza completa di sintomi, alla presenza di alcune macchie clorotiche o necrotiche



Analisi RAPD di alcune varietà di melo



OPAL07₅₆₀

OPAM19₂₂₀₀

1 = Jonafree

2 = GoldRush

3 = Enterprise

4 = Freedom

5 = Relinda

6 = Florina

7 = Britegold

8 = Murray (*Vm*)

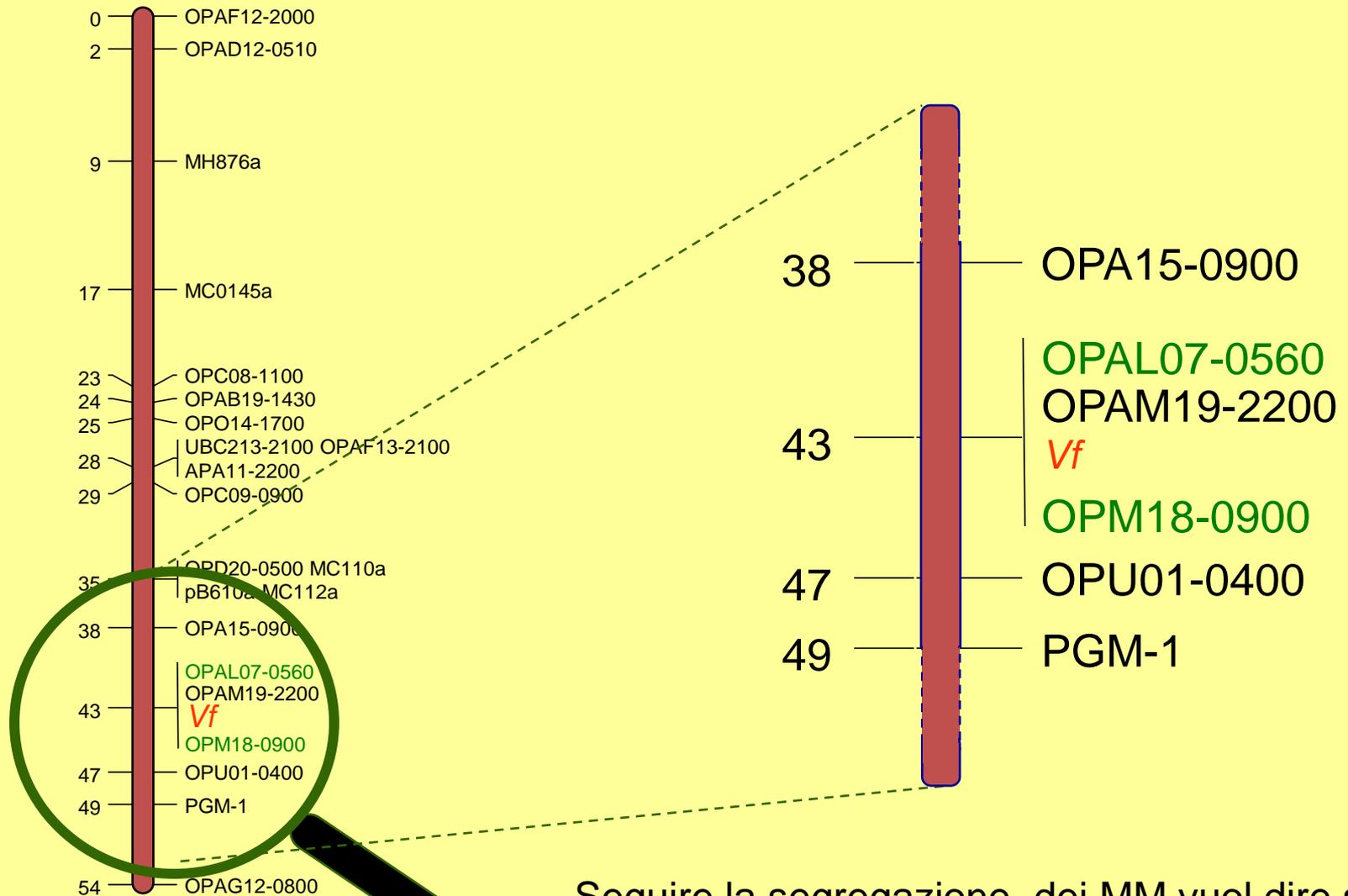
9 = Royal Gala

10 = Jonagold

cultivar *Vf*

Consente di identificare le varietà, (i genotipi, che portano l'allele dei marcatori OPAL07-560 e OPAM19-2200 associato al gene *Vf*, che conferisce la resistenza alla ticchiolatura.

Mappa di associazione della regione di *Vf*



Seguire la segregazione dei MM vuol dire seguire il destino di quel tratto cromosomico e quindi del gene di resistenza in esso contenuto

Vantaggi della selezione assistita da marcatori

- **Analisi molto precoce**
- **Possibilità di seguire direttamente il gene**
- **Si evita di dover infettare le piante**
- **Possibilità di individuare combinazioni geniche complesse**
- **Si possono selezionare più caratteri contemporaneamente**

In accordo con la teoria della neutralità di Kimura, però, la maggior parte delle mutazioni è silente (mutazioni neutrali) e dal punto di vista selettivo non ha effetti sulla fitness.

I loci marcatori saggiati di solito sono selettivamente neutrali, cioè non hanno un significato particolare nell'adattamento degli individui all'ambiente

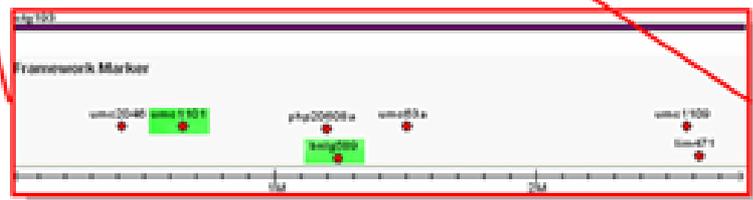
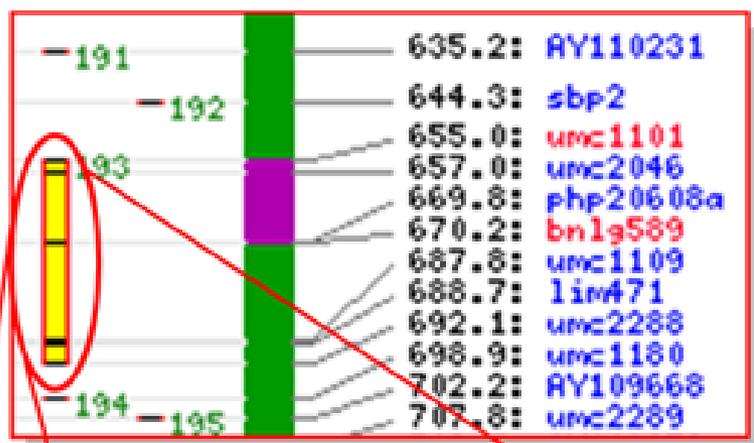
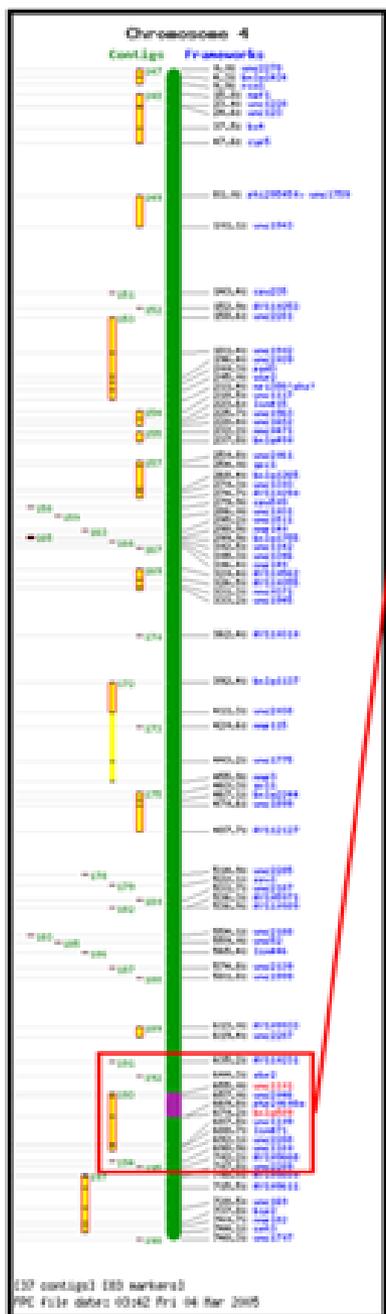
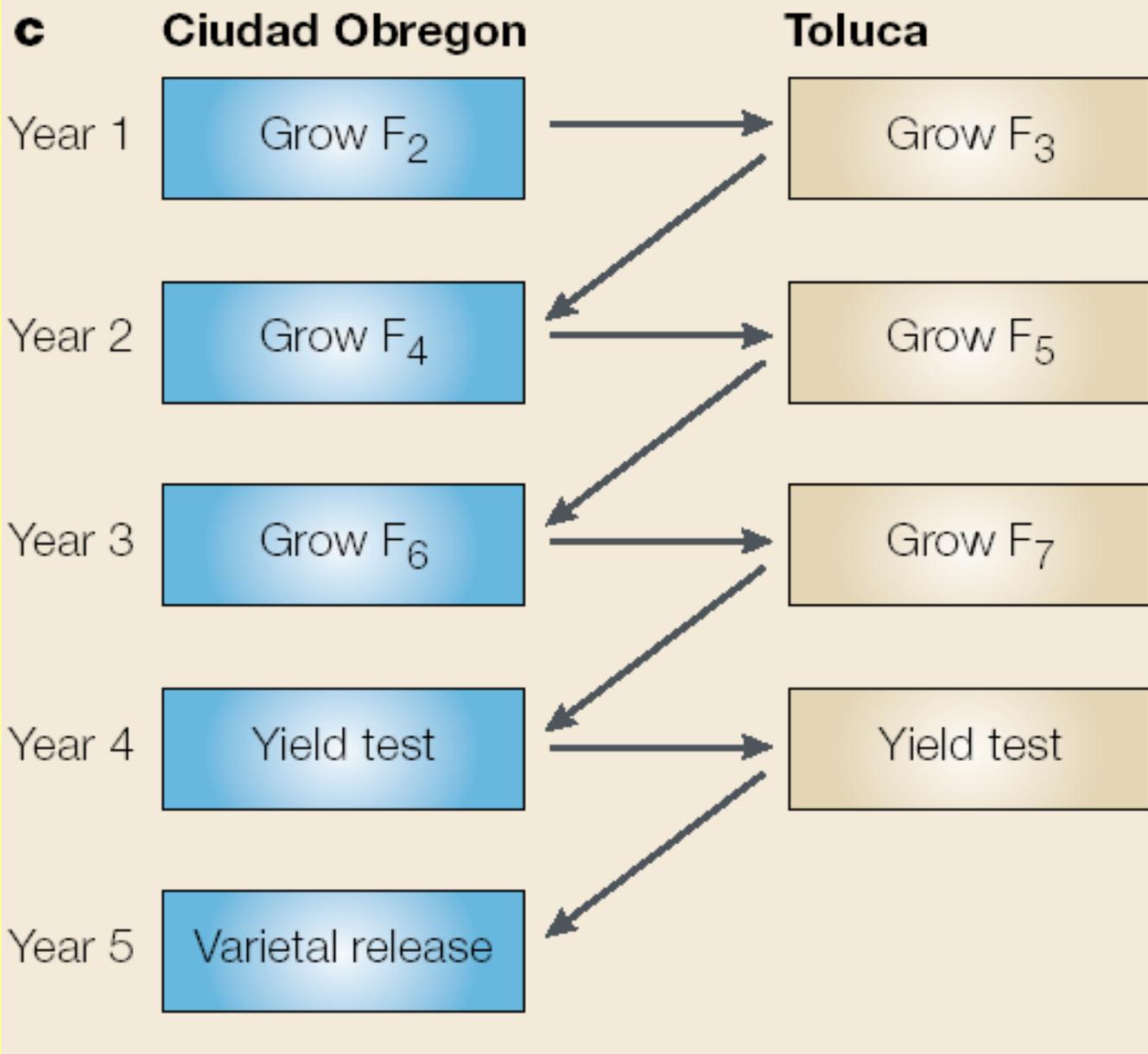


Figura 3. Porzione del cromosoma 4 di mais dove è stato mappato un QTL per l'eterosi per diversi caratteri. Nel pannello di sinistra è indicata la mappa integrata pubblica, con i marcatori molecolari (in blu) e i corrispondenti contigui di BAC assemblati (barre gialle) ancorati alla mappa genetica. Nei riquadri ingranditi, è riportato il dettaglio della regione contenente il QTL (indicata in viola), e del relativo singolo contiguo di circa 3 Mb che copre l'intera regione del QTL. Sono evidenziati i marcatori fiancheggianti il QTL nella mappa genetica B73xH99.

Shuttle breeding



República Mexicana

