

Dottorato di Ricerca
in
Colture Arboree ed
Agrosistemi Forestali
Ornamentali e
Paesaggistici
XX ciclo

**ISOLAMENTO DI MARCATORI
MICROSATELLITI
STRETTAMENTE ASSOCIATI
AL GENE DI RESISTENZA A
TICCHIOLATURA Vm IN MELO**

Candidato: Dott.ssa
Valentina Cova

Settore Disciplinare: AGR/03
Esame finale anno 2008

<u>1. INTRODUZIONE</u>	1
1.1 MELO: ORIGINE, DISTRIBUZIONE ED IMPORTANZA ECONOMICA	1
1.2 LE MALATTIE DEL MELO: ciclo vitale della ticchiolatura e sintomatologia.	2
1.3 LE RAZZE FISILOGICHE DI <i>V. inaequalis</i>	6
1.4 SINTOMATOLOGIA E CLASSI DI CHEVALIER	8
1.5 PROTEINE RECETTORIALI IMPLICATE NELLA RESISTENZA AI PATOGENI	10
1.5.1. Proteine con domini non omologhi a chinasi recettoriali di membrana o RLK	12
1.5.2. Proteine con moduli ricchi il Leucina (LRR) extracitoplasmatiche e regioni transmembrana	13
1.5.3. Proteine con LRR citoplasmatiche	15
1.5.4. Proteine Serina/Treonina Chinasi citoplasmatiche	17
1.6 GENI DI RESISTENZA A TICCHIOLATURA IN MELO	18
1.7 MIGLIORAMENTO GENETICO	23
1.7.1 Miglioramento Genetico Classico	23
1.7.2 <i>MAS</i> (Miglioramento genetico assistito da marcatori)	25
1.8 ISOLAMENTO DI NUOVI GENI	25
1.8.1 ‘ <i>TRANSPOSON TAGGING</i> ’ - ‘etichettatura con trasposoni’	26
1.8.2 ‘ <i>CHROMOSOME LANDING</i> ’ - ‘atterraggio sul cromosoma’	27
1.8.3 ‘ <i>CHROMOSOME WALKING</i> ’ - ‘camminata sul cromosoma’	27
1.9 ELETTROFORESI CAPILLARE (SSR E SEQUENZE).	28
1.10 IL GENE <i>Vm</i>	30
1.11 SCOPO DELLA TESI	34
<u>2. MATERIALI E METODI</u>	35
2.1 MATERIALE VEGETALE	35
2.1.1 Materiale vegetale già presente presso il Dipartimento di Colture Arboree di Bologna	35
2.1.2 Impollinazioni manuali, stratificazione e semina dei nuovi semi	36
2.1.3 La popolazione ‘Fiesta’ × ‘Discovery’	38
2.2 INOCULI CON <i>V. INAEQUALIS</i> E RILIEVI DEI SINTOMI	38
2.3 VALUTAZIONE AL MICROSCOPIO OTTICO DELLO SVILUPPO DEL FUNGO: COLORAZIONE DELLE IFE FUNGINE E	

ASSEMBLAGGIO VETRINI	39
2.4 ESTRAZIONE DEL DNA	40
2.4.1 Estrazione del DNA delle vecchie popolazioni	40
2.4.2 Estrazione del DNA delle nuove popolazioni	42
2.5 COSTRUZIONE DI UNA BAC LIBRARY DELLA CULTIVAR MURRAY	43
2.6 REPLICA DELLA BAC LIBRARY DELLA CULTIVAR FLORINA	45
2.7 <i>POOLING</i> DELLE BAC LIBRARY	46
2.7.1 <i>PLATE POOL</i>	46
2.7.2 A1-A2-B1-B2 <i>POOL</i> della BAC di Florina	47
2.7.3. <i>POOL</i> RIGHE e COLONNE (PRC) della BAC di Murray	50
2.8 ESTRAZIONE PLASMIDICA	50
2.9 SCREENING DEL <i>POOLING</i> : PCR ED ELETTROFORESI	52
2.9.1 Condizioni di PCR	52
2.9.2 Elettroforesi capillare	53
2.9.3 Elettroforesi su gel di poliacrilamide (PAGE)	54
2.10 <i>BAC ENDS SEQUENCING</i> -SEQUENZIAMENTO DELLE ESTREMITÀ DEI CLONI	58
2.11 <i>CHROMOSOME WALKING</i> E COSTRUZIONE DEL <i>CONTIG</i>	60
2.12 DIGESTIONE CON ENZIMI DI RESTRIZIONE ED ELETTROFORESI DEL DNA SU GEL D'AGAROSIO	60
2.13 <i>SOUTHERN BLOTTING</i>	62
2.13.1 Trattamento del gel d'agarosio	62
2.13.2 Trasferimento su membrana	62
2.13.3 Fissaggio del DNA sulla membrana	64
2.14 MARCATURA DELLE SONDE, PRE-IBRIDAZIONI ED IBRIDAZIONI	64
2.14.1 Marcatura a freddo delle sonde con il metodo della fosfatasi alcalina diretta (AlkPhosDirect™)	64
2.14.2 Preibridazione ed ibridazione per il metodo della fosfatasi alcalina diretta (AlkPhos Direct™)	65
2.14.3 Rilevazione del segnale di sonde marcate in modo diretto	65
2.15 DISEGNO PRIMER MICROSATELLITI E MAPPAGGIO	66

<u>3. RISULTATI E DISCUSSIONE:</u>	69
3.1 NUOVE POPOLAZIONI: ‘Golden Delicious’ × ‘Murray’ e ‘Galaxy’ × ‘Murray’	69
3.2 <i>POOLING</i> E ISOLAMENTO CLONI POSITIVI	70
3.3 COSTRUZIONE DEL <i>CONTIG</i>	75
3.3.1 Digestioni ed ibridazioni	75
3.3.2 BAC END <i>sequencing</i> e creazione del <i>contig</i> iniziale	77
3.4 ISOLAMENTO MICROSATELLITI SULLE BAC ENDS E MAPPAGGIO DEL MICROSATELLITE 91F7T7.	81
3.5 SCREENING DEL <i>POOLING</i> DELLA BAC DI FLORINA CON IL NUOVO MARCATORE MICROSATELLITE 91F7T7.	85
3.6 ISOLAMENTO MICROSATELLITI SULLE BAC ENDS E MAPPAGGIO DEL MICROSATELLITE 55A5Sp6: NUOVO <i>CONTIG</i> E RICOMBINANTI.	87
3.7 FENOTIPIZZAZIONE E GENOTIPIZZAZIONE DELLE POPOLAZIONI E NUMERO DI RICOMBINANTI	90
3.7.1. Caratterizzazione fenotipica delle popolazioni “MURRAY2004” e “MURRAY2005”	90
3.7.2. Caratterizzazione genotipica con i markers SSRs più strettamente associati alla resistenza e numero di ricombinanti	92
3.8 FOGLIE DI ‘MURRAY’ INOCULATE CON <i>V. inaequalis</i> : VETRINI	94
3.9 <i>CONTIG</i> ON LINE DI 300Kb DELL’S-LOCUS	95
3.10 BAC LIBRARY DELLA CULTIVAR MURRAY	97
3.11 SCREENING DEL PLATE <i>POOL</i> DELLA BAC LIBRARY DELLA CULTIVAR MURRAY	98
<u>4. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE</u>	103
<u>5. BIBLIOGRAFIA:</u>	107
<u>APPENDICE</u>	i

Indice delle Tabelle:

Tabella I: Classificazione del patogeno fungino <i>Venturia inaequalis</i> , agente causale della ticchiolatura in melo.	3
Tabella II: Definizione delle razze di <i>V. inaequalis</i> .	7
Tabella III: Popolazioni utilizzate in questo studio.	36
Tabella IV: Endonucleasi di restrizione utilizzate	59
Tabella V: Segregazioni e codici da utilizzare nel software JoinMap 3.0.	66
Tabella VI: Posizione bidimensionale dei presunti cloni positivi con le dimensioni degli amplificati e l'altezza di ogni picco.	72
Tabella VII: Rilievi fenotipici sulle popolazioni "Murray2004"	90
Tabella VIII: Rilievi fenotipici sulle popolazioni "Murray2005"	91
Tabella IX: Insieme dei rilievi fenotipici sulle popolazioni del 2004 e 2005	92
Tabella X: Schema riassuntivo degli eventi di ricombinazione osservati.	92
Tabella XI: Ricombinanti e distanze dal gene <i>Vm</i> nei tre casi possibili.	93
Tabella XII: Primer utilizzati in questo studio.	iii

Indice delle Figure:

Figura 1: Ciclo vitale dell'agente eziologico della ticchiolatura del melo (Fonte: http://www.nysaes.cornell.edu/pp/extension/tfabp/apscpm.shtml).	4
Figura 2: A e B. Sintomi di ticchiolatura su foglie. C. Lesioni su una vecchia foglia ticchiolata con patogeno secondario che emerge a formare le macchie biancastre. D. Giovane lesione su un frutticino in sviluppo. E e F. Lesioni ben sviluppate su un frutto maturo (Fonte: Turechek and Koller, 2004).	5
Figura 3: Foto di alcune classi di reazioni a seguito di inoculo con <i>V. inaequalis</i> (circa 21 giorni dopo l'inoculo): A. Classe 0 o mancanza di sintomi; B. Classe 1 o 'pinpoint pits' (<i>Vm</i> e <i>Vh4</i>); C. Classe 2; D. Classe 3a; E. Classe 3b; F. Classe 4 o completa suscettibilità; G. Necrosi stellata (<i>Vh2</i> and <i>Vh8</i>); H. <i>Vg</i> -necrosi (Fonte: Gessler et al., 2006).	10
Figura 4: Prodotti delle diverse classi di geni di resistenza conosciuti nelle specie vegetali.	12
Figura 5: Localizzazione genomica dei principali geni di resistenza alla ticchiolatura in melo: nel LG1 sono localizzati i geni <i>Vf</i> e <i>Va</i> ; nel LG2 sono mappati i geni <i>Vr2</i> , <i>Vh2</i> , <i>Vh8</i> , <i>Vbj</i> ; nel LG10 c'è il gene <i>Vd</i> ; nel LG12 sono localizzati i geni <i>Vb</i> e il gene <i>Vg</i> ; mentre nel LG17 è mappato nella parte distale del cromosoma il gene <i>Vm</i> (Fonte: Gessler et al., 2006).	23
Figura 6: Schema esplicativo della tecnica del <i>Chromosome walking</i> , in cui un'estremità di un clone BAC è utilizzata come sonda per isolare un secondo clone BAC adiacente e così via.	28
Figura 7: Sequenziatore automatico ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer a 16 capillari della ditta Applied Biosystem, con particolare dell'array e dei capillari.	29
Figura 8: Schema di funzionamento dell'elettroforesi capillare: il capillare, nel quale c'è la finestra attraverso cui passa il laser, è immerso in due vaschette contenenti un tampone (buffer) appropriato e gli elettrodi che causano la differenza di potenziale grazie alla quale si ha la migrazione delle molecole. Un computer riceve e salva i dati grezzi che poi verranno trasformati in elettroferogrammi.	30
Figura 9: Foglia con i tipici sintomi 'pin-point pit' caratteristici delle reazioni di ipersensibilità causate dalla presenza del gene di resistenza a ticchiolatura <i>Vm</i> .	31
Figura 10: Reazione di ipersensibilità (classe 1) del clone 9AR2T196, che porta il gene di resistenza a ticchiolatura <i>Vm</i> , alla razza 1 di <i>V. inaequalis</i> : al fondo della depressione un conidio (C) forma un appressorio.	

Fonte: Guillaumès et al 1995.	32
Figura 11: Abbattimento della resistenza a ticchiolatura nel clone 9AR2T196 da parte della razza 5 di <i>V. inaequalis</i> : il micelio subcuticolare (M) è abbondante come anche la sporulazione. In tal caso la sintomatologia è riferibile ad una classe 4 di Chevalier (et al., 1991). Fonte: Guillaumès et al 1995.	33
Figura 12: Pedigree della cultivar Murray, utilizzata in questo studio (Fonte: Hidras DataBase, comunicazione personale).	35
Figura 13: Semi germinati dopo due mesi a 4°C e messa in dimora in serra a Cadriano-DCA-BO.	37
Figura 14: Schema del posizionamento e della nomenclatura data alle piantine seminate nei vassoi a partire dal cartoncino in cui è indicato il nome del vassoio, quindi i campioni saranno A1, A2 e così via fino ad A60.	38
Figura 15: A. Foglia con sintomi “ <i>pin-point pit</i> ”, classificata come resistente. B. Foglia con evidente sporulazione, classificata come sensibile.	39
Figura 16: Schema di funzionamento del kit DNeasy della ditta Qiagen.	42
Figura 17: A. Vettore di clonaggio pCC1BAC™ in cui sono stati clonati frammenti del DNA della cv. Murray. B. Sequenze dei primer specifici per l’amplificazione dei frammenti inseriti nel sito di clonaggio.	44
Figura 18: Rappresentazione schematica della creazione della genoteca BAC a partire dal DNA genomico di Murray di grandi dimensioni che viene ligato nel vettore pCC1BAC™ e poi viene usato per trasformare le cellule di E. Coli ingegnerizzate. I cloni sono selezionati su terreno contenente Cloramfenicolo e poi raccolti e messi in coltura per ottenerne molte copie.	44
Figura 19: Utilizzo del replicatore da 384 punte per l’ottenimento in breve tempo di una replica identica di una piastra madre da 384 pozzetti.	45
Figura 20: Schema della strategia seguita per ottenere il PLATE POOL: l’insieme dei 384 cloni di ogni plate è stato posizionato in un pozzetto della nuova piastra da 96 pozzetti denominata “PLATE POOL”. Ad ogni pozzetto è stato dato un numero per convenzione ed ogni pool ottenuto da ogni plate da 384 è stato numerato da 1 a 96 in funzione del nome dalla piastra madre di volta in volta utilizzata. Le piastre madri erano 96 numerate da 1 a 96.	46
Figura 21: Posizionamento di un replicatore da 96 punte in una plate da 384 pozzetti: tra una punta è l’altra del replicatore c’è lo spazio di un pozzetto vuoto. Posizionando invece lo stesso replicatore in una plate da 96 pozzetti tutti i pozzetti ricevono un puntale.	47
Figura 22: Schema seguito per la creazione dei 4 <i>pools</i> denominati A1, B1, A2 e B2, secondo il quale ogni plate da 384 pozzetti viene suddivisa in 4 quadranti virtuali individuabili posizionando un replicatore da 96 punte nelle posizioni A1, B1, A2 e B2 rispettivamente. I campioni vengono spostati dalla posizione originale dalla plate da 384 alla nuova posizione in una plate da 96, mantenendo lo stesso identico ordine spaziale. Ogni plate da 384 subisce lo stesso trattamento, quindi i campioni del quadrante A1 di ogni plate originale sono spostati mantenendo lo stesso ordine nella nuova plate A1.	48
Figura 23: Robot automatico TECAN-Freedom EVO, con particolare della “testa” da 96 punte utilizzata per effettuare il pooling della libreria BAC della cv. Florina (Vinatzer et al., 1998).	49
Figura 24: <i>Southern Blot</i> : trasferimento capillare del DNA, digerito con endonucleasi di restrizione, da un gel di agarosio, a seguito di corsa elettroforetica, ad una membrana di nylon sulla quale verranno poi effettuate le ibridazioni con sonde specifiche.	63
Figura 25: Foto di insieme delle piantine “Murray2005” ottenute dagli incroci	

- manuali effettuati durante la primavera del 2005 a Cadriano-Bologna. 70
- Figura 26:** Elettroferogramma capillare prodotto con il marcatore microsatellite Hi07h02 sul *pooling* delle plate 19, 42, 56, 91 e delle cultivar ‘Florina’ e ‘Murray’. Come si può notare le plate 19 e 91 hanno un picco a 244 bp mentre le plate 42 e 56 hanno il picco a 255 bp. ‘Florina’ ha entrambi questi picchi come atteso e ‘Murray’ presenta picchi specifici a 224 bp, normalmente associato alla resistenza a ticchiolatura (freccia), e a 271 bp. 72
- Figura 27:** Schema dei risultati dello screening delle piastre A1-A2-B1-B2 del *pooling* riferiti alla size 244 bp. Ad ogni quadratino verde acqua corrisponde un pozzetto del pool A1, ad ogni quadratino rosa corrisponde un pozzetto del pool A2, ad ogni quadratino bianco corrisponde un pozzetto del pool B1 e ad ogni quadratino giallo corrisponde un pozzetto del pool B2, come vengono prelevati dalla plate madre da 384 pozzetti e riposizionati nella piastra da 96 nello stesso identico ordine spaziale. La numerazione più interna non in grassetto rappresenta la plate madre. Ogni quadrato costituito da quattro quadratini invece rappresenta una singola posizione in piastra da 96, indicato anche dalla numerazione in grassetto. I pozzetti colorati in blu sono quelli che indicano cloni positivi (F7 e K21), quelli verdi indicano probabili falsi positivi dovuti verosimilmente a contaminazione. 74
- Figura 28:** Schema dei risultati dello screening del *pooling* delle plate A1-A2-B1-B2 della size 255 bp: come in Figura precedente ad ogni colore corrisponde una diversa piastra dei pool A1 o A2 o B1 o B2. I pozzetti colorati in blu rappresentano i cloni positivi: qui sono le posizioni K4 e O20. 75
- Figura 29:** **A.** Gel di agarosio sottoposto ad elettroforesi contenente digestioni con l’enzima di restrizione *EcoR* I dei cloni BAC che danno un segnale di amplificazione via PCR con i primer Hi07h02 for/rev. **B.** Ibridazione del filtro ottenuto dal gel in Figura 29 A con sonda specifica prodotta su DNA della cultivar ‘Murray’ utilizzando inneschi che amplificano l’intera sequenza sulla quale è localizzato il marcatore Hi07h02. 76
- Figura 30:** Gel d’agarosio sottoposto ad elettroforesi pulsata di campioni contenenti digestioni con l’enzima di restrizione *Not* I sui cloni presunti positivi al fine di valutare le dimensioni dell’inserito nei singoli cloni. 77
- Figura 31:** Gel di agarosio con le PCR sui sette cloni BAC iniziali amplificati con i primers 19K21T7 for/rev disegnati sull’estremo T7 del clone 19K21. Risulta un amplificato solo nel clone 19K21 stesso e nel 91F7. L= ladder 1 Kb. 78
- Figura 32:** **A.** Ibridazione con sonda preparata utilizzando gli inneschi 91F7Sp6 f/r di un altro filtro (dato non mostrato) con le digestioni di 6 cloni BAC con *EcoR* I. **B.** Ibridazione dello stesso filtro della Figura precedente con sonda preparata con i primers 91F7T7 f/r. **C.** Ibridazione del filtro ottenuto dal gel in Figura 25 A con sonda specifica prodotta su DNA di ‘Murray’ con gli inneschi Hi07h02 f/r. 79
- Figura 33:** Allineamento delle sequenze degli estremi Sp6 dei cloni 19K21 e 91F7.
A. Le due sequenze risultano identiche allineate con il software on line Clustal W.
B. Allineamento delle stesse sequenze con il software Sequencer. 80
- Figura 34:** Contig costituito da due cloni BAC, 19K21 e 91F7, che si sovrappongono per gran parte della loro lunghezza. 80
- Figura 35:** Sequenza microsatellite GA (24) isolata nell’estremo T7 del clone 91F7 visualizzata col software Sequencing Analysis. 81
- Figura 36:** Gel di acrilammide per valutare il polimorfismo di coppie di primer microsatelliti disegnati sull’estremo 91F7T7. E’ stato riscontrato un buon polimorfismo pulito e facile da seguire. Le frecce mostrano che la banda indicata è presente solo nel parentale Murray che porta il gene di resistenza *Vm* e nelle progenie resistenti, sia della popolazione

	'Golden Delicious' × 'Murray' sia di 'Galaxy' × 'Murray', mentre è assente nei genotipi fenotipizzati come sensibili a seguito di inoculo con <i>V. inaequalis</i> .	82
Figura 37:	Elettroferogrammi ottenuti con i primers 91F7T7 sugli individui della popolazione 'Golden Delicious' × 'Murray'. Dall'alto sono mostrati: i due parentali, 'Golden Delicious', sensibile a ticchiolatura, e 'Murray', resistente, ed i quattro esempi di segregazione del carattere. La banda associata alla resistenza è quella di size 416 paia di basi, indicata nel disegno con una freccia, presente in 'Murray' e negli ultimi due genotipi mostrati in figura.	83
Figura 38:	A. Minimappa del cromosoma 17 di Murray ottenuta utilizzando la popolazione segregante 'Golden Delicious' × 'Murray'. B. Mappa del LG 17 di 'Discovery' ottenuta usando la popolazione segregante 'Fiesta' × 'Discovery' (Liebhard et al., 2003; Silfverberg-Dilworth et al., 2006).	84
Figura 39:	Allineamento di sequenze prodotte con il primer 91F7T7 for sui cloni BAC 55A5 e 91F7 della genoteca di Florina. Le sequenze mostrano un'altissima identità ma ci sono differenze a livello del primo microsatellite, dove il clone 91F7 mostra di avere 4 ripetizioni GA in più rispetto al clone 55A5, e del terzo microsatellite, una ripetizione TA in più.	86
Figura 40:	Allineamento di sequenze prodotte con il primer 91F7T7 for sui cloni BAC 91F7, 55A5 e 42K4 della genoteca di Florina. Le sequenze mostrano come il 55A5 e il 42K4 abbiano 4 ripetizioni GA e una TA in meno.	87
Figura 41:	Gel di agarosio con prodotti di PCR ottenuti con primers 19K21T7 f/r sui BAC 55A5 e 91F7 e con primer 55A5T7 f/r sui BAC 91F7 e 19K21.	88
Figura 42:	A. Digestione con l'enzima di restrizione <i>EcoR</i> I dei BAC della regione del gene di resistenza a ticchiolatura <i>Vm</i> . B. Reazione di PCR sul clone BAC 42K4 con i primer della regione del <i>Vm</i> per creare il <i>contig</i> dell'altro allele di Florina. C. <i>Contig</i> dei due alleli: uno costituito da 91F7 e 19K21; l'altro contenente i cloni BAC 42K4 e 55A5. Gli asterischi indicano la presenza di microsatelliti polimorfici.	88
Figura 43:	Elettroferogramma ottenuto su 'Murray' e 'Golden' con i primers 55A5Sp6.	89
Figura 44:	Gruppo di associazione 17 di 'Murray' con mappati i due nuovi microsatelliti associati alla resistenza a ticchiolatura: 91F7T7 e 55A5Sp6.	89
Figura 45:	Regione del gene di resistenza <i>Vm</i> , con numero di ricombinanti e distanza genetica da questo calcolata.	93
Figura 46:	A. Foto al microscopio ottico con ingrandimento 40x a 68h dall'infezione con <i>V. inaequalis</i> . B. Altra foto al microscopio ottico con ingrandimento 40x a 68h dall'infezione. Ben visibili i peli. C. Foto al microscopio ottico con ingrandimento 40x a 92h post-infezione.	96
Figura 47:	Digestione con l'enzima <i>Not</i> I di 28 BAC scelti casualmente ed estratti. La banda comune nella foto è il vettore pCC1BAC (8.1Kb) mentre il marker è il MidRange II della ditta NEB con bande ogni 24.5Kb.	97
Figura 48:	Elettroferogrammi del <i>PLATE POOL</i> analizzato con il marcatore microsatellite 91F7T7. Le prime tre lane (campioni 4-13-24 e 66) mostrano l'allele "426"bp sensibile, mentre le ultime tre lane (campioni 1-27 e 55) mostrano l'allele "415"bp associato alla resistenza.	99
Figura 49:	Elettroferogramma del <i>PLATE POOL</i> della BAC di Murray screenata con il marcatore microsatellite Hi07h02. Le 4 lane mostrate si riferiscono all'allele "274"bp associato alla sensibilità.	100
Figura 50:	Elettroferogramma del <i>PLATE POOL</i> della BAC di Murray screenata con il marcatore microsatellite Hi07h02. La lane mostrata rappresenta il <i>pool</i>	

della plate 27 che contiene un clone che amplifica la banda associata alla resistenza.	100
Figura 51: : Elettroferogramma del PRC della BAC di Murray analizzata con il marcatore microsatellite 91F7T7. Le lane mostrate rappresentano i <i>pools</i> delle righe G e O e delle colonne 10 e 12 che contengono un clone che amplifica la banda associata alla resistenza.	101
Figura 52: Elettroferogramma del PRC della BAC di Murray analizzata con il marcatore microsatellite Hi07h02. Le lane mostrate rappresentano i <i>pools</i> della riga G e della colonne 12 che contengono un clone che amplifica la banda associata alla resistenza.	102
Figura 53: Schema delle posizioni relative delle diverse <i>plate</i> sul piano di lavoro del robot come vengono visualizzate dall'operatore.	i

1. INTRODUZIONE

1.1 MELO: ORIGINE, DISTRIBUZIONE ED IMPORTANZA ECONOMICA

Le Maloideae sono una grande sottofamiglia delle Rosaceae con circa 1,100 specie (Phipps et al. 1990) la cui distribuzione è abbondante soprattutto nelle regioni temperate del mondo. Le Maloideae si differenziano dalle altre tre sottofamiglie delle Rosaceae - Rosoideae, Spiraeoideae, Amygdaloideae- per il loro numero cromosomico di base, pari a $x=17$, rispetto alle altre sottofamiglie che hanno x pari a 7, 8 e 9 rispettivamente (Rohrer et al., 1994). Il melo appartiene alle Rosaceae, insieme con pero (*Pyrus communis*), cotogno (*Cydonia oblonga*), sorbo (*Sorbus domestica*), nespolo giapponese (*Eryobotrya japonica*), nespolo comune (*Mespilus germanica*), pesco (*Prunus persica*), mandorlo (*P. dulcis*), albicocco (*P. armeniaca*), susino (*P. domestica*), ciliegio (*P. avium*), fragola (*Fragaria vesca*), lampone (*Rubus idaeus*). Si pensa che il melo comune coltivato si sia originato tra le Montagne presenti all'estremità ovest della Cina, la vecchia Unione Sovietica e l'Asia centrale, e sia un complesso ibrido interspecifico, nominato *Malus × domestica* Borkh. (Korban and Skirvin, 1984; Phipps et al., 1990).

Storicamente, nei tempi medievali i monasteri furono gli unici responsabili della selezione, propagazione e perpetuazione di centinaia di diverse cultivar. Queste piante divennero in seguito la maggior sorgente di variabilità per il miglioramento genetico condotto durante il 1800 dagli orticoltori, i quali svilupparono nuove tecniche per creare incroci mirati tra le selezioni interessanti (Mac Hardy, 1996).

Negli ultimi due secoli, le cultivar di *M. × domestica* coltivate in Europa, Russia, Nord America, Nuova Zelanda, Giappone e Australia sono state introdotte in tutto il mondo e sono diventate la base per la maggior parte della produzione commerciale attuale (Way et al., 1991; Janick et al., 1996). Tuttavia, anche se sono state descritte più di 7.000

varietà e ogni anno i breeders creano in tutto il mondo nuove selezioni, ai nostri giorni solo una dozzina di cultivar è estesamente utilizzata con scopi commerciali (Janick et al., 1996).

Il melo riveste una notevole importanza dal punto di vista economico; si calcola, infatti, che nel Nord America la produzione di mele per l'anno commerciale (Luglio - Giugno) 2006/07 sia stata di circa 5.074 Milioni di tonnellate (Mt), l'Emisfero Sud ha prodotto 5.060 Mt mentre la Cina addirittura 25.000 Mt.

Nel 2004 le mele sono state la terza coltura frutticola più estesamente coltivata al mondo (5,280 Milioni di ettari) e la terza come produzione (59,059 Mt), dopo agrumi e banane.

Oltre che per la sua importanza economica, il melo è diventato una pianta arborea modello tra le angiosperme per ciò che riguarda gli studi genomici poiché possiede un genoma relativamente di piccole dimensioni (769 Mb/aploide) (Patocchi et al., 1999) distribuito in 17 cromosomi. La maggior parte dei meli coltivati è diplode ($2n = 34$) ed auto-incompatibile.

1.2 LE MALATTIE DEL MELO: ciclo vitale della ticchiolatura e sintomatologia.

Il melo è ospite di un vasto numero di agenti patogeni diversi, come ad esempio funghi, batteri, nematodi, virus e fitoplasmi (Way et al., 1991), che causano gravi malattie, tra cui le più severe sono la ticchiolatura (*Venturia inaequalis*), il colpo di fuoco batterico (*Erwinia amylovora*), l'oidio (*Podosphaera leucotricha*), il cancro batterico (*Nectria galligena*) e gli scopazzi (fitoplasmosi i cui vettori sono *Cacopsilla picta*, *C. melanoneura*). Le perdite economiche sono molto variabili in funzione della malattia, in alcuni casi si può arrivare anche alla morte degli alberi, mentre in altri casi i danni

causati sui frutti colpiti li rendono non commercializzabili perché pesantemente macchiati o deformati.

Tabella I: Classificazione del patogeno fungino *Venturia inaequalis*, agente causale della ticchiolatura in melo.

<i>Venturia inaequalis</i>	
Classificazione	
Regno:	Fungi
Divisione:	Ascomycota
Subdivisione:	Pezizomycotina
Classe:	Dothideomycetes
Ordine:	Pleosporales
Famiglia:	Venturiaceae
Genere:	<i>Venturia</i>
Specie:	<i>inaequalis</i>
Nome Binomiale	
<i>Venturia inaequalis</i> (Cooke) Winter	

La malattia più importante per questa coltura è la ticchiolatura del melo, causata dal fungo *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint., anamorph *Spilocaea pomi* Fr. (Hughes, 1953).

Questo fungo appartiene alla divisione Ascomycota, ordine Pleosporales e famiglia Venturiaceae (Tabella I).

Il numero cromosomico aploide del fungo *V. inaequalis* è sette.

Il conidio di *Venturia inaequalis* emerge attraverso la cuticola di una foglia di melo ammalata (Figura 1) e viene trasportato dall'acqua sulle superfici fogliari di alberi suscettibili dove forma un tubetto germinativo che può penetrare direttamente le cere della cuticola della pianta. A questo punto si forma un micelio fungino tra la cuticola e il tessuto epidermico sottostante. Una volta che il fungo si è stabilito su una foglia o frutto, i conidi si formano sulla superficie della lesione e diventano la sorgente per un inoculo secondario per il resto della stagione.

I conidi vengono disseminati sulle foglie o sui frutticini in crescita tramite gocce di pioggia. Possono susseguirsi diversi cicli secondari di infezione durante la stagione di crescita, in funzione sia della frequenza dei periodi di infezione stessi che della suscettibilità dell'ospite, finché le foglie e frutti non cadono a terra all'inizio dell'inverno. Il patogeno fungino *V. inaequalis* sverna principalmente come pseudotecii

immaturi, nei quali ha luogo la riproduzione sessuale che produce una nuova generazione di ascospore che saranno rilasciate durante la seguente primavera.

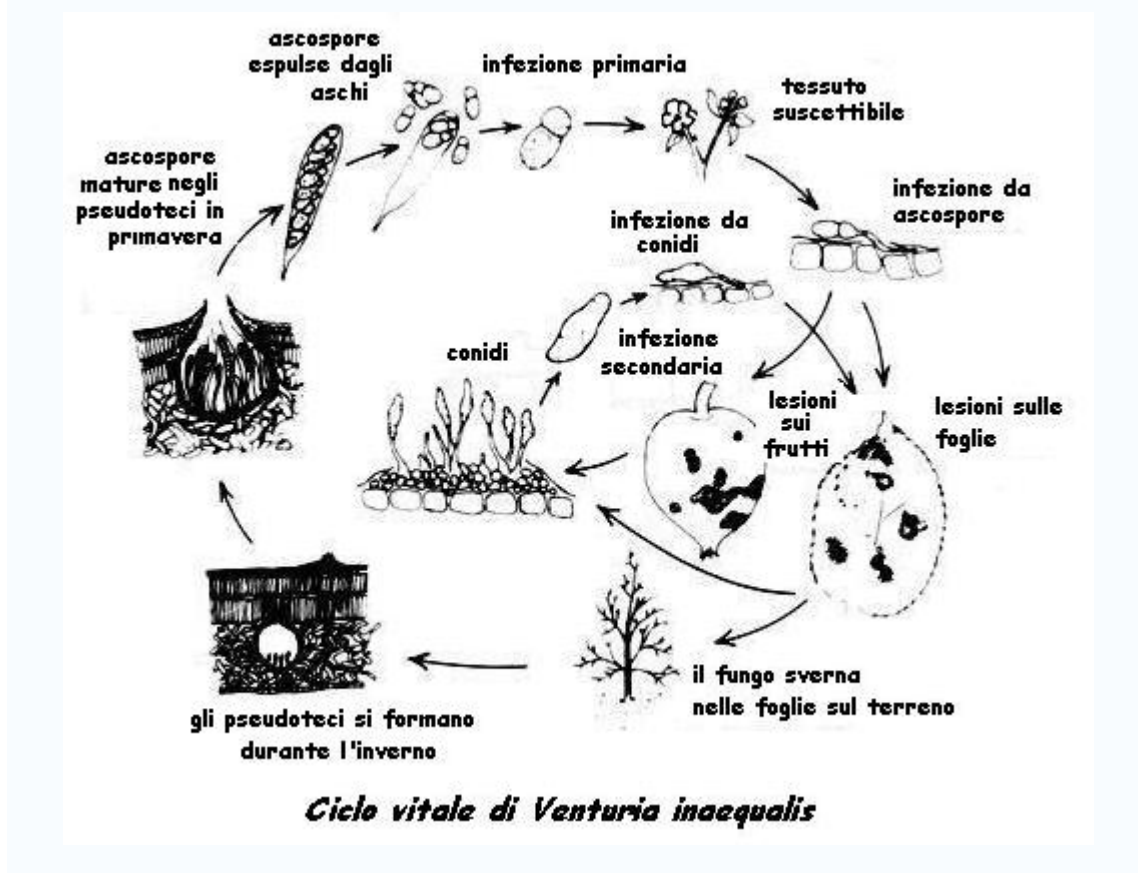


Figura 1: Ciclo vitale dell'agente eziologico della ticchiolatura del melo (Fonte: <http://www.nysaes.cornell.edu/pp/extension/tfabp/apscpm.shtml>).

La ticchiolatura del melo può essere osservata su foglie, pezioli, fiori, sepal, frutti, pedicelli e meno frequentemente anche su giovani getti e brattee. Le prime lesioni si trovano spesso sulla pagina inferiore delle foglie poiché appena emergono sono subito esposte all'infezione primaverile. Più tardi, dopo che le foglie si sono distese, entrambe le superfici sono esposte e possono venire infettate. Le giovani lesioni sono vellutate con margini non definiti e con un colore che va dal marrone al verde oliva. Col tempo, i margini diventano più distinti, ma possono essere oscurati se più lesioni dovessero arrivare a confluenza. Quando una foglia infetta invecchia, il tessuto adiacente alla lesione si ispessisce e la superficie fogliare si deforma. Le giovani foglie possono arricciarsi o rimanere piccole e deformi se le infezioni sono numerose. Le lesioni

possono restare o sulla pagina superiore della foglia o su quella inferiore per l'intera stagione; occasionalmente, le cellule sottostanti diventano scure e muoiono, così la lesione scura diventa visibile su entrambe le superfici. Le giovani foglie completamente coperte di ticchiolatura spesso cadono dall'albero. Le infezioni di pezioli e pedicelli causano una prematura abscissione di foglie e frutti, rispettivamente. Nella tarda estate o all'inizio dell'autunno, le lesioni possono apparire biancastre a causa della crescita di un fungo secondario. Le lesioni sui giovani frutti risultano simili a quelle delle foglie, ma laddove un frutto infetto si allarga, la lesione diventa dapprima scura e sugherosa. Le infezioni che compaiono all'inizio della stagione causano uno sviluppo irregolare del frutto poiché la porzione non infetta continua a crescere normalmente. In tal caso possono comparire rotture sia a livello della buccia sia nella polpa oppure il frutto cresce deformato.

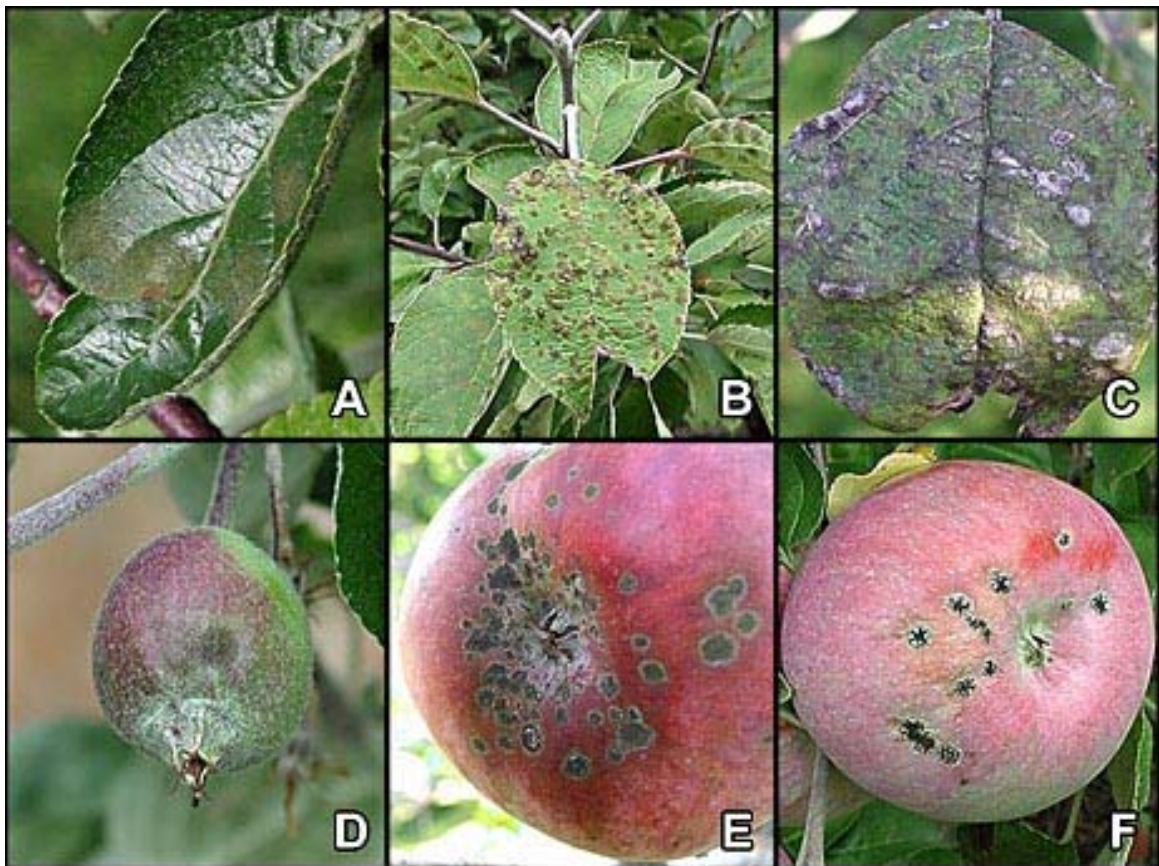


Figura 2: A e B. Sintomi di ticchiolatura su foglie. C. Lesioni su una vecchia foglia ticchiolata con patogeno secondario che emerge a formare le macchie biancastre. D. Giovane lesione su un frutticino in sviluppo. E e F. Lesioni ben sviluppate su un frutto maturo (Fonte: Turechek and Koller, 2004).

Tutta la superficie del frutto è suscettibile all'infezione, ma le infezioni che si sviluppano precocemente durante la stagione sono generalmente localizzate attorno al calice, mentre quelle che avvengono in tarda estate o in autunno possono non essere visibili finché la frutta non sia in magazzino. Il controllo di questa malattia è essenzialmente chimico e spesso possono essere necessari anche più di 20 trattamenti con fungicidi per stagione.

1.3 LE RAZZE FISILOGICHE DI *V. inaequalis*

L'interesse attorno alle diverse razze di ticchiolatura del melo si è presentato presto, anche se il primo autore era più interessato alle differenze morfologiche e al pattern di infezione. Aderhold nel 1899 osservò che *V. inaequalis* può essere divisa in diversi isolati fisiologici distinguibili in funzione alla loro abilità nell'indurre sporulazione o semplicemente macchie sulle diverse cultivar (Gessler et al., 2006). Successivamente Shay & Williams (1956) identificarono tre razze fisiologiche di *V. inaequalis*, definendole come razza 1, 2 e 3. La razza 1 è quella comunemente trovata in USA e in altri stati che produceva buona sporulazione su tutte le cultivar domestiche ma solo macchie o lesioni necrotiche senza sporulazione su Dolgo, 'R12740-7A' e 'Geneva'; la **razza 2**, invece, infettava e sporulava su queste tre cultivar: 'Dolgo', alcuni segreganti della varietà russa 'R12740-7A' e 'Geneva'. La **razza 3** infettava 'Geneva'.

Nel 1969 Williams & Kuć identificarono la cosiddetta **razza 4** su semenzali ticchiolatura-resistenti (*M. pumila* R12740-7A) presso l'università di Purdue, USA (1969).

Evidenza della comparsa di una nuova razza fisiologica (**razza 5**) in Inghilterra è stata presentata da Williams & Brown (1968): questa razza era capace di infettare piante, superando una resistenza di tipo 'pin-point pit' in *M. micromalus* e *M. atrosanguinea*

804. Selezioni che si supponeva fossero resistenti alla ticchiolatura furono spedite dagli USA all'Inghilterra, ma alcune selezioni di *M. micromalus* svilupparono lesioni sporulanti.

La **Razza 6** è stata per prima descritta da Parisi et al. (1993). Sintomi della malattia su Prima (*Vf*) furono notati ad Ahrensburg, Germania già nel 1984. Gli isolati di questa razza sono risultati capaci di infettare altre selezioni con il gene *Vf* ma non il progenitore *M. floribunda* 821 che resta tuttora resistente alla razza 6. La patogenicità della razza 6 è stata ulteriormente studiata da Parisi & Lespinasse (1996) su cloni di melo. La razza 6 ha dato sintomi su quasi tutte le 37 *Vf*-cultivar testate, ma 'Granny Smith' e tre cultivar con un altro tipo di resistenza (*Vbj*, *Vr* e *Va*) non vennero infettate.

Tabella II: Definizione delle razze di *V. inaequalis*.

Razza	Fonte	Materiale suscettibile
1	Ovunque	La maggior parte delle cultivar mondiali
2	Sud Dakota, USA	<i>M. baccata</i> , Dolgo, Alexis, Bittercrab, progenie segreganti di R12740-7A, Geneva
3	Nuova Scozia, Canada	Geneva
4	Lafayette, Indiana, USA	Progenie segreganti di R12740-7A
5	Norwich, Inghilterra	<i>M. micromalus</i> (pit type), <i>M. atrosanguinea</i> 804
6	Ahrensburg, Germania	Prima (<i>Vf</i>) ma non Evereste, Perpetu e <i>M. floribunda</i> 821
7	Inghilterra	<i>M. floribunda</i> 821
8	Nuova Zelanda	Metà dell'incrocio 'Royal Gala' x <i>M. sieversii</i> W193B

Un'altra razza è stata scoperta in Inghilterra e descritta da Roberts & Crute (1994): la **razza 7**. Un isolato raccolto da un albero di *M. floribunda* naturalmente infetto diede lesioni su *M. floribunda* 821 ed alcune cultivar con il gene *Vf* mentre altre cultivar con *Vf* non risultarono infette. Più tardi un secondo gene dominante fu scoperto in *M. floribunda* 821 (*Vfh*). È stato confermato che 'Golden Delicious', suscettibile a tutte le altre razze del patogeno, risulta resistente alla razza 7 (Bénaouf & Parisi, 2000) grazie alla presenza del gene *Vg*.

Bus et al., 2005b hanno descritto un'ulteriore **razza, 8**, isolata da un incrocio 'Royal Gala' x *M. sieversii* W193B capace di rompere una resistenza effimera denominata *Vh8*. Le razze di *Venturia* dalla 1 alla 8 finora conosciute sono elencate in Tabella II.

1.4 SINTOMATOLOGIA E CLASSI DI CHEVALIER

Sintomi particolari sono correlati con la presenza nell'ospite di un particolare tipo di resistenza, per esempio, la tipica reazione ipersensibile visibile come piccoli '*pin-point pits*' è storicamente associata alla presenza del gene *Vm*, anche se recentemente questo tipo di risposta è stato riportato anche per altre forme di resistenza. La formazione di questi '*pin-point pits*' e l'imbrunimento dei tessuti è visibile sulle foglie a 72 h dall'inoculo con il patogeno (Chevalier, 1988). Hough nel 1944 classificò tutto il suo materiale ticchiolatura-resistente utilizzando un sistema quantitativo suddiviso in 5 classi di sintomi:

- classe 0**: mancanza di sintomi visibili,
- classe 1**: '*pin-point pits*' osservati nelle selezioni con il gene *Vm* sono il segno evidente di una tipica risposta ipersensibile con morte cellulare rapida ed estesa, che causa anche cambiamenti a livello del tessuto a palizzata nelle cellule venute a contatto col patogeno;
- classe 2**: macchie o lesioni clorotiche e necrotiche ma senza sporulazione;
- classe 3**: macchie o lesioni clorotiche e necrotiche con presenza di una ristretta sporulazione;
- classe 4**: interazione suscettibile con abbondante sporulazione (Hough and Shay, 1949).

Questo interessante approccio è stato rifinito con l'introduzione della classe M (lesioni necrotiche, alcune con sporulazione) tra le classi 2 e 3 (Williams and Brown, 1968)

equivalente alla classe 3a inserita tra la 2 e la 3b (Chevalier et al., 1991).

La **classe 3b** di Chevalier indica la presenza di stroma del fungo subcuticolare, mentre l'epidermide e il tessuto a palizzata mostrano significativi cambiamenti se comparati ad un tessuto sano. Le differenze tra le classi 2, 3a e 3b sono puramente quantitative.

La variabilità dei sintomi associata alla resistenza del gene *Vf* è ascrivibile all'ambiente genetico in cui il *Vf* è posizionato (Rouselle et al., 1975; Gessler, 1989). Le progenie che portano il cluster di geni *Vf* si dividono, infatti, tra le classi 0, 2, 3a and 3b, con alcuni individui anche in classe 4 (Gianfranceschi et al., 1996).

Altri geni di resistenza elicitano sintomi specifici (Figura 3), come ad esempio il gene *Vh2* causa necrosi stellare dopo circa 4-6 giorni (Bus et al., 2005a), come anche la resistenza effimera recentemente descritta del gene *Vh8* a seguito di infezione con la razza fisiologica 8 (Bus et al., 2005b-Figura 3g). La caratteristica forma a stella deriva dal collasso e necrosi del tessuto a palizzata sotto lo stroma fungino, che cresce radialmente dal punto in cui il fungo è penetrato, e coincide con la morte di un'estesa area di epidermide che forma un alone (Bus et al., 2005b). *Vh4* e *Vm* elicitano la classica risposta ipersensibile (Figura 3b), *Vfh* causa anch'esso una risposta ipersensibile ma ritardata; *Vb*, *Vbj* e le altre varie resistenze sconosciute presenti in *M. × domestica* (Koch et al., 2000) elicitano macchie che vanno dal giallo alla necrosi e anche alla necrosi con sporulazione sparsa simile a quella trovata nelle selezioni con il gene *Vf* (Gessler et al., 2006).

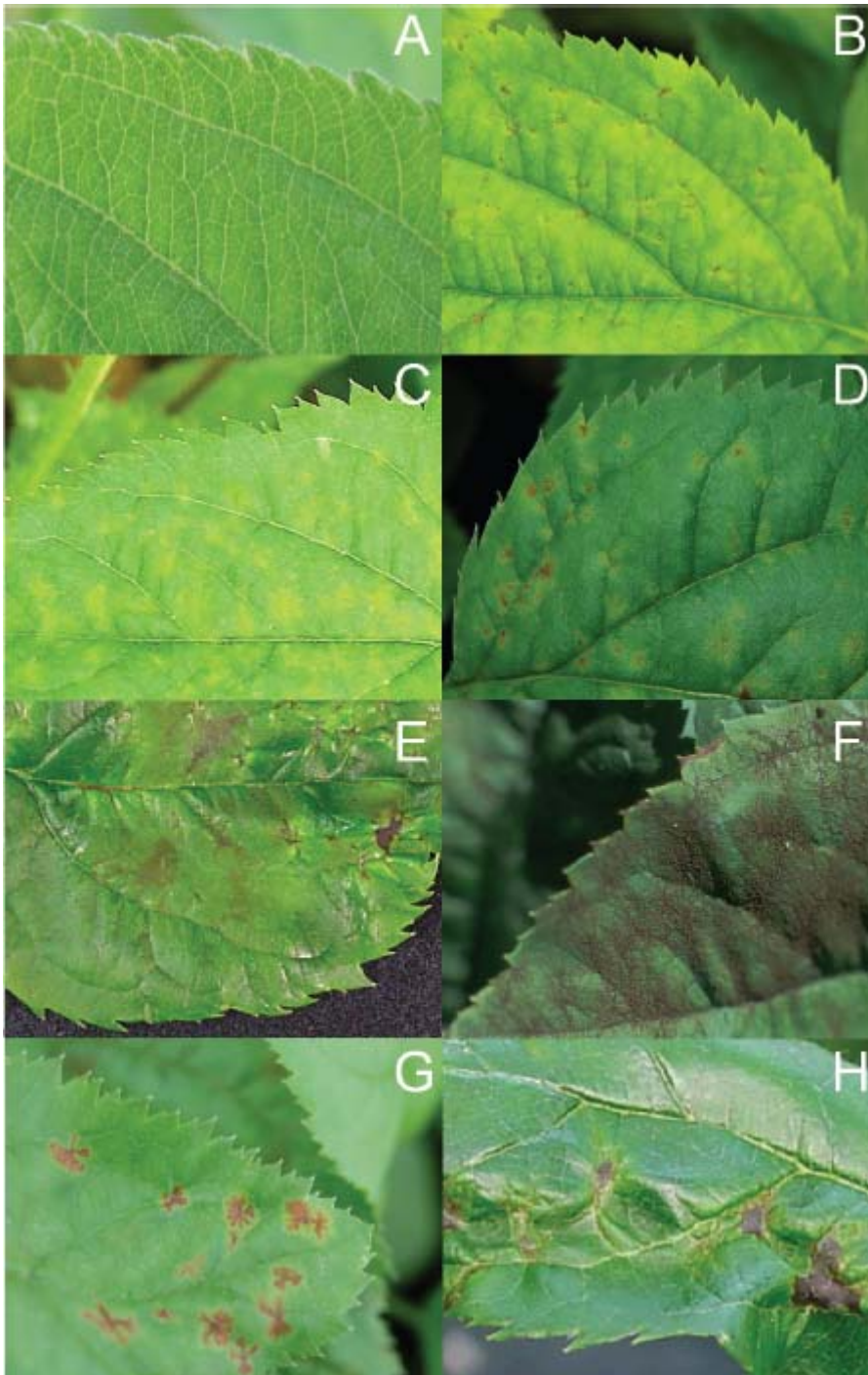


Figura 3: Foto di alcune classi di reazioni a seguito di inoculo con *V. inaequalis* (circa 21 giorni dopo l'inoculo): **A.** Classe 0 o mancanza di sintomi; **B.** Classe 1 o 'pinpoint pits' (*Vm* e *Vh4*); **C.** Classe 2; **D.** Classe 3a; **E.** Classe 3b; **F.** Classe 4 o completa suscettibilità; **G.** Necrosi stellata (*Vh2* and *Vh8*); **H.** *Vg*-necrosi (Fonte: Gessler et al., 2006).

1.5 PROTEINE RECETTORIALI IMPLICATE NELLA RESISTENZA AI PATOGENI

Negli ultimi anni, sono stati identificati numerosi geni nelle piante che conferiscono

resistenza a patogeni; questi geni sono stati chiamati geni R e codificano per proteine che permettono alla pianta di riconoscere il patogeno e attivare i meccanismi di difesa per combatterlo.

Numerosi di questi geni identificati possiedono domini omologhi alle proteine LRR-RLKs; l'omologia può essere osservata a livello del dominio extracellulare (come nel caso di Cf-9) o a livello del dominio chinasi (come nel caso di Pto) (Hammond-Kosack and Jones, 1997).

Nel corso della loro vita, le piante sono continuamente esposte all'azione di numerosi patogeni (quali funghi, batteri, nematodi, virus), ciò ha portato le piante a sviluppare e selezionare diversi geni di resistenza che conferiscono loro la capacità di riconoscere l'agente patogeno e attivare una serie di meccanismi di difesa per limitarne la crescita.

Il riconoscimento specifico del patogeno richiede la presenza del gene di avirulenza (Avr) nello stesso patogeno e il corrispondente gene di resistenza (R) nella pianta, questa è la cosiddetta “teoria gene per gene” postulata da Flor nel 1956 studiando il sistema lino-Melampsora lini (Flor H.H., 1971). L'assenza di uno di questi geni provoca il venir meno della resistenza (Hammond-Kosack e Jones, 1997).

I geni di avirulenza codificano per un gruppo eterogeneo di proteine, tra cui proteasi; ciò indica che il ruolo primario di questi geni sia, in realtà, di superare le barriere poste dall'ospite e, in modo incidentale, di essere “elicitori” specifici della resistenza (Rathjen et al., 2003).

I geni di resistenza delle piante, invece, codificano proteine che compongono il sistema di riconoscimento extracellulare del prodotto dei geni di avirulenza del patogeno e permettono la trasmissione, attraverso il plasmalemma, di segnali che portano all'attivazione dei meccanismi di difesa tramite un complesso turnover metabolico che si concretizza nella produzione di composti antimicrobici (fitoalessine), di proteine di

patogenesi (chitinasi e glucanasi) e di specie intermedie reattive dell'ossigeno (anione superossido, perossido di idrogeno e radicale ossidrilico) (Bent, 1996; Gachomo et al., 2003).

E' stato ipotizzato che le regioni LRR agiscano da sito di legame dei ligandi prodotti dai geni Avr o facilitino l'interazione tra i prodotti dei geni R e altre proteine del sistema di trasduzione del segnale (Bent, 1996).

Queste proteine codificate dai geni di resistenza sono nella maggior parte dei casi delle proteine chinasi.

I geni di resistenza possono essere raggruppati in quattro diverse classi in base alle caratteristiche strutturali della proteina dedotta (Figura 4):

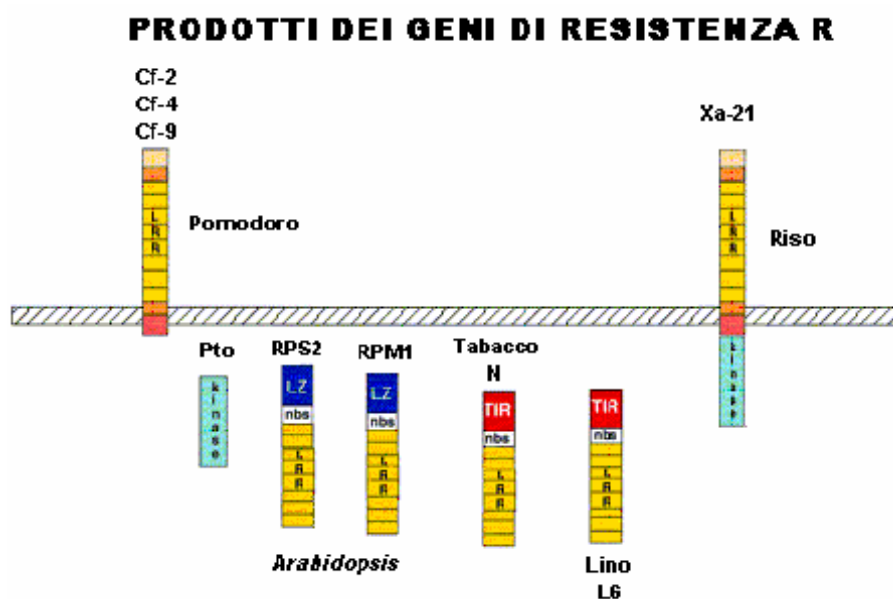


Figura 4: Prodotti delle diverse classi di geni di resistenza conosciuti nelle specie vegetali.

1.5.1. Proteine con domini non omologhi a chinasi recettoriali di membrana o RLK

La prima classe è rappresentata solo dal gene di mais *HMI1*, che codifica per una reduttasi che detossifica una tossina fungina ma non contiene domini che mostrino omologia con le RLK (Johal and Briggs, 1992).

1.5.2. Proteine con moduli ricchi in Leucina (LRR) extracitoplasmatiche e regioni transmembrana

A questa classe appartengono geni le cui proteine contengono domini LRR extracitoplasmatici con una regione transmembrana e una coda citoplasmatica all'estremità carbossi-terminale. Un "modulo LRR", che può essere presente all'interno di una proteina da una a trenta volte contiene comunemente 24 amminoacidi ma ci sono dei casi in cui il numero dei residui varia da 20 a 29 (Kobe and Deisenhofer, 1994). La sequenza consenso (data dalla presenza di un residuo particolare nel 50% dei casi ed oltre) tipica delle LRR-RLKs è "LxxLxLxxNxLxGxxPxxLxxLxx".

I geni rappresentativi di questa classe codificano per proteine divisibili in due sottoclassi:

a) PRIVE DI DOMINI CHINASICI: i geni ***Cf*** di **pomodoro** associati alla resistenza a diverse razze di *Cladosporium fulvum*. Sono stati, finora, isolati cinque membri di questa famiglia: *Cf-2*, *Cf-3*, *Cf-4*, *Cf-5*, *Cf-9* (Hammond-Kosack and Jones, 1995). A ciascuno di questi geni di resistenza corrisponde un gene di avirulenza (*Avr*) del patogeno che codifica per proteine di basso peso molecolare (<15kDa) ricche in cisteina che agiscono da elicitatori di una rapida necrosi nelle cultivar di pomodoro che possiedono i geni *Cf* specifici (Jones *et al.*, 1994; Dixon *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 1997).

Il gene di resistenza *Cf-9*, ad esempio, codifica per una proteina di 863 amminoacidi con 27 motivi LRRs imperfetti nella regione extracellulare e la resistenza conferita da *Cf-9* si esplica con una risposta di ipersensibilità. Il gene *avr9* di *Cladosporium fulvum* è stato clonato e codifica per un peptide

capace di indurre la risposta ipersensibile nei tessuti fogliari compatibili (Van den Ackerveken *et al.*, 1992).

Data l'assenza, nelle proteine della famiglia Cf, di una regione chinastica con funzione di trasduzione del segnale, il modo in cui si trasmette il segnale rimane non del tutto chiaro (Jones and Jones, 1997). L'analisi molecolare del sistema di CLAVATA (CLV) di *Arabidopsis*, può fornire delle informazioni circa il possibile meccanismo di trasduzione del segnale. È stato, infatti, proposto che le proteine Cf possano agire come CLV2 e la proteina a basso peso molecolare Avr9 di *Cladosporium fulvum* possa agire come CLV3. Tuttavia, il recettore transmembrana con dominio chinastico del sistema Cf, che dovrebbe agire come CLV1, non è ancora stato identificato (Jeong *et al.*, 1999).

Recentemente sono stati isolati geni analoghi alla famiglia di Cf in cultivar di melo resistenti a ticchiolatura in cui è stato introgresso il gene Vf da *Malus floribunda*, che fornisce una resistenza monogenica (Vinatzer *et al.*, 2001). Questi geni sono stati associati alla resistenza al patogeno fungino *Venturia inaequalis*, agente eziologico della ticchiolatura, una delle malattie più gravi e diffuse del melo.

b) CON DOMINI CHINASICI: il gene *Xa21* di **riso** conferisce resistenza a numerose razze di *Xantomonas oryzae* pv. *oryzae* (Song *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996). Il gene *Xa21* codifica per un recettore chinastico costituito da 23 moduli LRR nel putativo dominio extracellulare (simile a Cf-9 di pomodoro), un dominio transmembrana e un dominio serina/treonina chinastico intracellulare. Analisi genetiche hanno rivelato che *Xa-21* appartiene ad una famiglia multigenica contenente almeno sette membri che mappano in

un singolo locus sul cromosoma 11, ed è vicino ad almeno nove geni maggiori di resistenza e ad un QTL (quantitative trait locus) per la resistenza (Ronald et al., 1992b; Song et al., 1995).

Una caratteristica interessante dei membri della famiglia di *Xa21* è la presenza di 15 sequenze simili a trasposoni. Tredici di questi elementi, simili a trasposoni, sono presenti in regioni non codificanti mentre due elementi si trovano nelle regioni codificanti di due membri della famiglia, questo arrangiamento ha portato alla distruzione dell'open reading frame (ORF) di questi due geni (Song et al., 1997)

La maggior parte dei geni di resistenza appartengono a famiglie multigeniche. Questo indica che la duplicazione e ricombinazione genica sono eventi che avvengono comunemente nell'evoluzione dei geni delle piante. Il lavoro di Song et al. (1997), che mette in evidenza la presenza di elementi trasponibili in alcuni membri della famiglia di *Xa21*, dimostra come si formino nuove specificità geniche.

1.5.3. Proteine con LRR citoplasmatiche

La maggior parte dei geni R clonati appartiene a questa classe e codifica per proteine con un sito di legame per i nucleotidi (NBS: Nucleotide Binding Site) seguito da un dominio LRR. La classe NBS-LRR è divisa in due sottoclassi.

- a) TIR-NBS-LRR: questa sottoclasse contiene geni con regioni citoplasmatiche omologhe ai domini del gene Toll di *Drosophila* e ai recettori dell'interleuchina-1 all'estremità N-terminale (TIR: Toll/interleukin-1-receptor). Il gene **N** di **tabacco**, che conferisce resistenza al virus del mosaico del tabacco, **L6** di **lino** per la resistenza a

Melampsora lini e **RPP5** di *Arabidopsis* per la resistenza alla *Peronospora parasitica*, appartengono ad essa (Ellis et al., 2000; Richter et al., 2000; Jones and Jones, 1997). La presenza della regione TIR suggerisce che la porzione ammino-terminale della proteina sia coinvolta nell'invio del segnale, mentre la regione LRR potrebbe essere coinvolta nella ricezione del ligando specifico (Whitman et al., 1994). Recentemente due alotipi di RPP5 sono stati completamente sequenziati ed analizzati: differiscono per l'alto livello di polimorfismo dei geni fiancheggiati i loci. Il polimorfismo è dovuto anche alla posizione e alle sequenze degli elementi trasponibili inseriti nei due loci (Ellis et al., 2000).

- b) LZ-NBS-LRR: la seconda sottoclasse contiene geni che codificano per proteine con all'estremità amminotermale motivi di cerniere di leucina (LZ: leucine zipper). A questa categoria appartengono i geni **RPS2** e **RPM1** di *Arabidopsis*, entrambi conferiscono resistenza ai ceppi di *Pseudomonas syringae* che portano il gene di avirulenza *avrRpt2* (Richter et al., 2000). Il dominio LZ presente in RPS2 sembra formare un' α -elica anfipatica in grado di formare omo o etero-dimeri.

È evidente che RPS2 non sia una chinasi, ma la presenza di un NBS suggerisce che possa attivare una chinasi (Jones and Jones, 1997).

Il gene *RPM1* mostra la stessa organizzazione strutturale e una significativa omologia con RPS2 tranne che per la mancanza del dominio idrofobico amminotermale (Grant et al., 1995).

1.5.4. Proteine Serina/Treonina Chinasi citoplasmatiche

Il gene *Pto* di pomodoro appartiene a questa classe di proteine e finora non è stato ancora isolato nessun altro gene R appartenente a questa classe. Il gene *Pto* codifica per una proteina serina-treonina chinasi citoplasmatica priva di regioni LRR e presenta omologia con la regione chinasi delle proteine RLKs (Martin *et al.*, 1993).

Il gene *Pto* conferisce la resistenza ai ceppi di *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* che portano il gene di avirulenza *avrPto*, che codifica per una piccola proteina idrofila (Scofield *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1996). È stato dimostrato che il prodotto proteico del gene *avrPto* del patogeno viene traslocato direttamente all'interno della cellula vegetale dove interagisce direttamente con il prodotto del gene di resistenza *Pto* (Ronald *et al.*, 1992b; Martin *et al.*, 1993). *Pto* fa parte di un cluster di geni che contiene almeno cinque membri. Un altro membro di questo cluster è *Fen* che codifica per una chinasi che conferisce suscettibilità all'insetticida Fenthion (Martin *et al.*, 1994). *Pto* e *Fen* mostrano un'omologia nella sequenza amminoacidica dell'87% ed entrambi richiedono l'azione di un altro gene, *Prf*, per la segnalazione della presenza di uno specifico patogeno o dell'insetticida. *Prf* codifica per una proteina con cerniera di leucine-sito di legame per nucleotidi-LRR (LZ-NBS-LRR) ed interagisce sia con *Pto* che con *Fen* a creare complessi recettoriali con diversa specificità.

È stato identificato anche il gene *Pti1* che codifica per una seconda serina/treonina chinasi, che partecipa alla risposta *avrPto*-specifico di difesa al patogeno. *Pti1* agisce a valle di *Pto* nella cascata chinasi di traduzione del segnale (Bent, 1996).

Recenti analisi hanno confermato che *Pto* è il recettore per il corrispondente ligando prodotto dal gene di avirulenza *avrPto* e che *Prf* non agisce a monte di *Pto* nella trasduzione del segnale (Rathjen *et al.*, 1999).

1.6 GENI DI RESISTENZA A TICCHIOLATURA IN MELO

La resistenza di un particolare genotipo può essere sia costitutiva, cioè preformata, sia basata su una reazione post-infezione.

La *Resistenza orizzontale* non è razza specifica, è di natura poligenica (geni minori) o quantitativa ed ha una minore efficacia ma risulta stabile contro tutte le razze del patogeno e quindi è difficilmente superabile.

La *Resistenza verticale* è razza specifica, cioè funziona solo contro particolari razze del patogeno. Essendo controllata da uno o pochi geni risulta facilmente superabile e quindi non duratura poiché causa una elevata pressione selettiva sul parassita con la finale selezione di nuovi patotipi virulenti.

I genotipi che recano questo tipo di resistenza sono altamente resistenti, la resistenza viene trasmessa alla progenie in modo Mendeliano semplice, poiché, come già detto, questa resistenza è determinata da un singolo locus o comunque da un numero limitato di loci. Nei casi in cui questa forma di resistenza possa essere imputabile alla presenza di singoli fattori, il confronto tra genotipi suscettibili e resistenti può indirizzare all'identificazione del gene responsabile o almeno alla regione cromosomica in cui tale gene risiede. Nella maggior parte dei casi finora conosciuti, a seguito di contatto cellulare tra patogeno e pianta ospite si ha una reazione che normalmente porta alla morte veloce delle cellule attorno al patogeno ed è detta reazione ipersensibile.

Questo tipo di resistenza è molto ben studiato nelle piante modello: la cascata di difesa, che termina macroscopicamente con l'ipersensibilità e biochimicamente con la sintesi di fitoalessine, è attivata poco dopo il riconoscimento del patogeno da parte dell'ospite.

I sintomi in una interazione compatibile tra *V. inaequalis* e una specie suscettibile di *Malus* è il risultato della crescita dello stroma fungino tra la cuticola e le cellule epidermiche. In un primo stadio il fungo è strettamente biotrofico, in seguito le cellule

dell'ospite sottostanti muoiono e la crescita del fungo si arresta anche se la sporulazione continua.

Le dimensioni delle lesioni, la quantità della sporulazione, il periodo di latenza e il numero di sintomi risultanti da un determinato numero di spore può variare in funzione della cultivar. Alcune cultivar possono mostrare solo dei '*pin-point pits*', lesioni a forma di stella, macchie giallastre o lesioni necrotiche senza sporulazione o, semplicemente, l'assenza di qualunque sintomo visibile: questi fenotipi sono attribuiti tutti alla resistenza.

Il prodotto di un gene di 'resistenza' causa il riconoscimento diretto o indiretto di una molecola elicitrice prodotta dal patogeno. Il gene patogeno che codifica per l'elicitore è detto gene di 'avirulenza' poiché la sua perdita o mutazione fa sì che l'ospite non riconosca più il patogeno. La pressione selettiva facilita nel patogeno la selezione di nuovi mutanti capaci di sorpassare le prime fasi di riconoscimento da parte della pianta ospite: quindi un patogeno con un gene di avirulenza mutato è virulento poiché l'effetto del gene di riconoscimento (gene di resistenza) viene meno (Gessler et al., 2006).

Questo sistema di resistenza monogenica non è stabile ed evolve continuamente con la formazione di nuovi alleli di resistenza e di avirulenza, infatti, la coevoluzione di meli domestici e delle popolazioni di *V. inaequalis* ha portato alla creazione di nuovi alleli di riconoscimento e dei corrispondenti alleli di avirulenza in funzione della pressione selettiva generata dalla nuova resistenza (Sierotzky et al., 1994; Koch et al., 2000; MacHardy et al., 2001).

Il rischio di un venir meno della resistenza di tipo monogenico è molto alto quindi diventa necessaria la ricerca di nuove fonti di resistenza e lo sviluppo di cultivar con combinazioni di più geni che diano una resistenza più duratura e difficile da superare.

L'isolamento dei singoli geni responsabili della resistenza a ticchiolatura da diverse

specie del genere *Malus* è iniziato recentemente ed è tuttora in pieno svolgimento.

La presenza e l'identificazione di marcatori molecolari legati ad importanti caratteri fenotipici sono essenziali per accorciare i tempi e diminuire di conseguenza i costi di un programma di selezione (Tartarini et al., 1999). Alcuni marcatori RAPD (random amplified polymorphic DNA) strettamente associati a geni di resistenza sono stati isolati (Koller et al., 1994, Yang and Kruger, 1994, Hemmat et al., 1995, Gardiner et al., 1996, Tartarini et al., 1996, Yang et al., 1997a,b) e alcuni di questi sono poi stati trasformati in marcatori SCAR, SSR (simple sequence repeat o microsatelliti) e CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) (Gianfranceschi et al., 1996, Yang and Korban, 1996, Yang et al., 1997a, b, Tartarini et al., 1999, Liebhard et al., 2003b, Bus et al., 2000 and 2005).

Sulla regione genomica attorno al gene *Vf* si sono concentrati e si concentrano tuttora un gran numero di studi. Il gene *Vf* è, infatti, quello più estesamente studiato da un punto di vista genetico ed è anche il più utilizzato nei programmi di breeding classico in tutto il mondo.

Utilizzando diversi marcatori molecolari è stato costruito un 'contig' della regione del *Vf* (Vinatzer et al., 1998, Patocchi et al., 1999, Tartarini et al., 1999, Vinatzer et al., 2001, Xu and Korban, 2002, Vinatzer et al., 2004) e si è arrivati all'identificazione e all'isolamento di almeno quattro geni in cluster posizionati nel linkage group 1 (LG). Gli autori hanno chiamato i membri del cluster '*HcrVf*' per la loro omologia ai geni di resistenza trovati in *Cladosporium fulvum* (Vinatzer et al., 2001). Gli stessi geni sono stati in seguito chiamati anche col nome *Vfa1* (*syn. HcrVf1*), *Vfa2* (*syn. HcrVf2*), *Vfa3* (*syn. HcrVf3*) e *Vfa4* (*syn. HcrVf4*) nel lavoro di Xu e Korban (2002). La dimostrazione che alcuni di questi geni *HcrVf* siano correlati alla resistenza a *Venturia inaequalis* deriva dal fatto che linee trasformate di Gala che portano il gene *HcrVf2*, posto sotto il

controllo del promotore forte CaMV35S, mostrano resistenza contro *V. inaequalis* (Belfanti et al., 2004), mentre linee transgeniche di McIntosh con *Vfa1* e *Vfa2*, sotto il loro stesso promotore, mostrano un'augmentata ma non completa resistenza (Malnoy et al., 2006). Nello stesso lavoro Malnoy e i suoi collaboratori dimostrano come il gene *Vfa4* sembri non essere coinvolto nella resistenza poiché tutte le linee transgeniche ottenute hanno mostrato piena suscettibilità al fungo. Un recente studio svizzero mostra che geni omologhi all'*HcrVf2* sono stati trovati anche in altre regioni genomiche, come nel LG6 (Broggini et al., 2007). La grande mole di studi e risultati riguardo la regione del gene *Vf* potrà presto spiegare se la resistenza è attribuibile al solo *HcrVf2* o se tale gene interagisca con altri del cluster ed eventualmente in che modo. Purtroppo, nonostante tutti questi successi ottenuti da un punto di vista puramente genetico, le cultivar-*Vf* non incontrano un grosso successo commerciale.

Oltre al gene *Vf* anche altri geni responsabili della resistenza monogenica contro *V. inaequalis* sono stati studiati dal punto di vista genetico e la regione genomica nella quale sono localizzati è stata identificata (Figura 5).

Il gene *Va* è stato isolato dall'accessione PI172623 derivata dalla cultivar Russa 'Antonovka' ed induce una risposta ipersensibile di tipo 'pit' (Dayton and Williams, 1968). È stato recentemente mappato nel linkage group 1 (Hemmat et al., 2003) a circa 25 cM dal gene *Vf* in *trans* ma non si sa ancora da che parte del cromosoma rispetto al gene *Vf* (Zini 2005).

Il gene *Vb* da Hansen's baccata #2 fu putativamente posizionato da Hemmat et al. (2003) nel linkage group 1 a 25 cM dalla regione del *Vf* ma successivamente Erdin et al. (2006) lo hanno posizionato nel LG 12 tra due marcatori SSR chiamati Hi07f01 e Hi02d05 (Silfverberg-Dilworth et al., 2006). Finora non si riportano superamenti della resistenza recata dal gene *Vb*.

Il gene *Vbj* da *Malus baccata jackii* è stato mappato nella parte distale del LG 2 e il marcatore molecolare più strettamente associato al gene di resistenza è il microsatellite CH05e03, localizzato a circa 0,6 cM (Gygax et al., 2004). Anche per questo gene non si segnalano per ora superamenti della resistenza da parte di nuove razze di *V. inaequalis*.

Il gene *Vd* da 'Durello di Forlì' conferisce resistenza contro la razza 6 di *V. inaequalis* (Tartarini et al., 2004) ed è stato posizionato nel LG10 vicino ad alcuni geni NBS (Nucleotide Binding Site).

Il gene *Vg* da 'Golden Delicious', che conferisce una resistenza verticale alla razza 7 di *V. inaequalis*, fu identificato da Bènaouf et al. (1997, 2000) e poi mappato nel LG12 da Durel et al. (2000). La resistenza conferita dal gene *Vg* dà grandi lesioni necrotiche con increspamento della foglia già a 10 giorni dall'inoculo con la razza 7. Degno di nota è il fatto che questa razza colpisca *Malus floribunda* 821 ma non 'Golden Delicious' che risulta pur sensibile a tutte le razze fisiologiche di *V. inaequalis*.

I geni *Vh2*, *Vh4* (Bus et al., 2005a) e *Vx* (Hemmat et al. 2002) sono localizzati nel linkage group 2. Poiché i marcatori molecolari per *Vx* e *Vh4* mappano molto vicini ed entrambi i geni promuovono una risposta ipersensibile, Bus et al. (2005a) conclusero che verosimilmente *Vx* e *Vh4* siano lo stesso gene.

Il gene *Vh8* (Bus et al., 2005b), che deriva da *M. sieversii* W193B e conferisce una resistenza effimera già superata dalla razza 8 di *V. inaequalis*, è stato mappato sempre nel LG2 vicino ad altre resistenze tra cui il *Vbj* e la resistenza effimera *Vh2*.

Il gene *Vr2* da 'GMAL 2473' è stato mappato anch'esso nel LG2 vicino al gene *Vh4*. Il marcatore per ora più vicino è il microsatellite CH02c02a posizionato a circa 2 cM dal gene di resistenza (Patocchi et al., 2004) ma presto si avranno nuovi marcatori più strettamente associati (Galli, comunicazione personale).

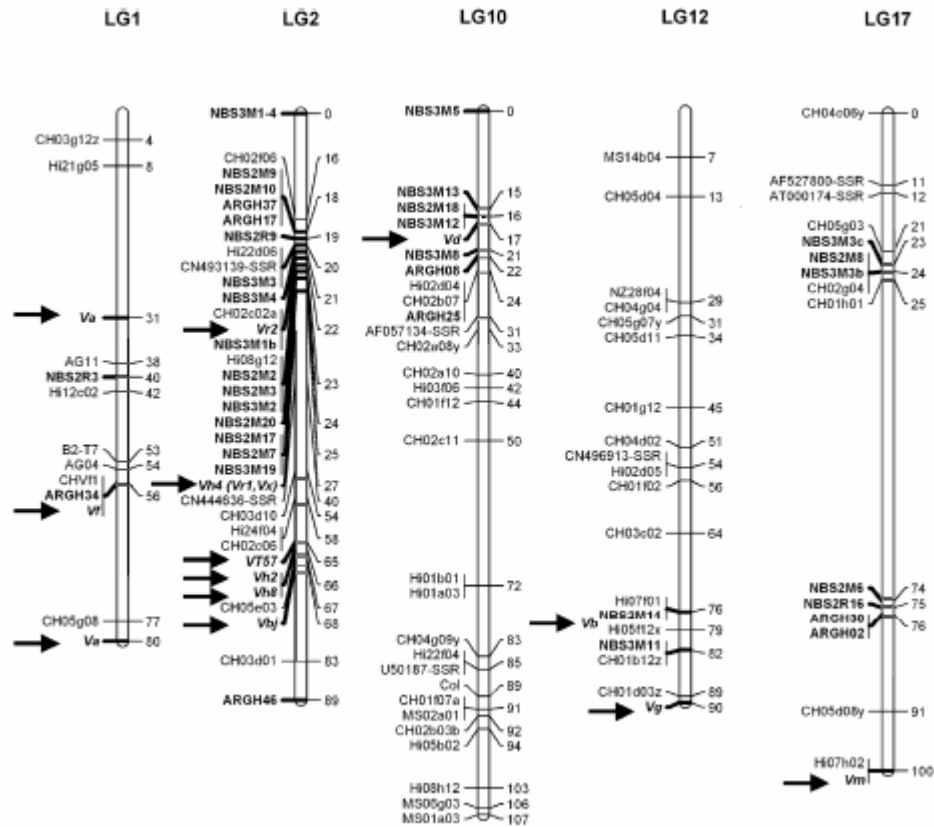


Figura 5: Localizzazione genomica dei principali geni di resistenza alla ticchiolatura in melo: nel LG1 sono localizzati i geni *Vf* e *Va*; nel LG2 sono mappati i geni *Vr2*, *Vh2*, *Vh8*, *Vbj*; nel LG10 c'è il gene *Vd*; nel LG12 sono localizzati i geni *Vb* e il gene *Vg*; mentre nel LG17 è mappato nella parte distale del cromosoma il gene *Vm* (Fonte: Gessler et al., 2006).

1.7 MIGLIORAMENTO GENETICO

1.7.1 Miglioramento Genetico Classico

Il miglioramento genetico classico per ottenere una cultivar di melo commerciale è molto lungo e costoso. Nel primo passo di questo lungo *iter*, sul fiore portaseme emasculato (madre) viene posto del polline di origine conosciuta (padre) conosciuto. La scelta dei due parentali è chiaramente molto importante ed è in funzione dei caratteri che vogliamo selezionare. Il fiore viene poi protetto in un piccolo sacchetto a seguito dell'impollinazione manuale, per evitare contaminazioni con polline indesiderato, e a maturazione il frutto viene raccolto. Durante la stagione seguente i semi estratti dai frutti ottenuti vengono seminati e viene fatta una selezione già sui semenzali. La fase giovanile è lunga e va da 4 anni fino a più di 7-8. Alcune volte il reincrocio con il

parentale che porta i caratteri qualitativi d'interesse risulta necessario per ottenere le caratteristiche ricercate poiché normalmente i caratteri di resistenza derivano da varietà selvatiche che portano caratteristiche ben distanti da quelle ricercate dal mercato. Purtroppo il reincrocio è una strada poco praticabile per le specie arboree a causa soprattutto della lunghezza della fase giovanile, infatti a causa delle limitazioni del miglioramento genetico convenzionale il potenziale del germoplasma del melo rimane tuttora poco esplorato (Hammerschlag, 2000).

In ogni caso se i tratti desiderati sono sotto controllo poligenico può evidenziarsi un 'range' di differenze molto marcato (Janick & Moore, 1996).

Come già detto, nonostante l'alta diversità genetica nel genere *Malus*, la grande maggioranza della produzione mondiale consiste di una ristretta base genetica (Way et al., 1991). Le cultivar commerciali più importanti sono incluse in programmi di miglioramento genetico su ampia scala per aumentare la qualità della frutta. La cultivar 'Golden Delicious' e i suoi derivati, come 'Gala', sono i parentali più spesso usati negli incroci. Anche se il breeding convenzionale ha prodotto nuove cultivar con qualità migliorate, un gran numero di piante commercialmente coltivate derivano sia da semenzali ottenuti per caso, come 'Delicious', 'McIntosh' e 'Granny Smith', sia da mutazioni spontanee che si sono originate nel tessuto somatico di alcune importanti varietà coltivate (Korban and Chen 1992).

Ai giorni nostri, le nuove tecniche colturali permettono di soddisfare una grossa domanda di mercato con cultivar altamente produttive, uniformi e che sopportano lunghi tempi di immagazzinamento. Certamente la resistenza a fattori biotici e alle malattie del post-raccolta sono tratti molto ricercati per una produzione di frutta su larga scala.

1.7.2 MAS (Miglioramento genetico assistito da marcatori)

Il termine MAS (Marker Assisted Selection) indica un nuovo metodo di selezione che consente di accelerare il trasferimento di un gene di interesse da una specie all'altra in programmi di incrocio mediante l'ausilio di marcatori molecolari associati a tale gene. In genere l'introggressione di caratteri utili presenti in specie selvatiche porta con sé anche una parte di patrimonio genetico molto diverso rispetto a quello delle varietà coltivate incluse anche caratteristiche che si vogliono eliminare nella cultivar finale. Con l'ausilio di marcatori molecolari è possibile seguire l'introggressione di tali geni in genotipi coltivati per la costituzione di nuove varietà che portino solo le caratteristiche ricercate. Invece di selezionare per il carattere, che spesso si esprime in fase tardiva di sviluppo della pianta, si può selezionare direttamente sul DNA della pianta, in fase precoce di sviluppo.

Per poter ottenere una buona selezione assistita da marcatori è necessario sviluppare dei 'marker' strettamente associati al gene oggetto di studio, in modo da diminuire o eliminare la selezione di ricombinanti ossia di piante nelle quali il fenotipo non corrisponda al genotipo. Questo perché man mano che ci si allontana dal gene la probabilità che avvenga un evento di ricombinazione aumenta e quindi il numero di ricombinanti in una popolazione segregante per un dato carattere ci dà la "misura" della distanza genetica del marcatore dal gene oggetto di studio. Si valuta che i tempi di ottenimento di cultivar migliorate si riduca del 50-80% se si utilizza un approccio di questo tipo.

1.8 ISOLAMENTO DI NUOVI GENI

L'obiettivo è "*trovare un ago in un pagliaio*", ma "*sapere dove o almeno dove non sia l'ago può facilitare grandemente l'isolamento dell'ago stesso*" (Du and Hwang, 1993).

Per fare questo si possono seguire tre diversi approcci; gli ultimi due descritti di seguito sono basati sullo screening di librerie di DNA ricombinante costituite da migliaia di cloni per poter isolare quelli che contengano una particolare sequenza di DNA. Questo genere di screening è stato spesso la base da cui partire nell'isolamento di geni di resistenza e nel mappaggio su ampia scala e può facilitare un ampio spettro di ricerche biologiche di base ed applicate.

1.8.1 'TRANSPOSON TAGGING' - 'etichettatura con trasposoni'

L'isolamento di elementi trasponibili permette di sfruttare queste sequenze "mobili" di DNA per il clonaggio di geni. Il maggior vantaggio di questo sistema è che si possono clonare geni la cui funzione non sia ancora nota. Il primo passaggio di questa procedura è quello di identificare un mutante per un tratto specifico a causa dell'inserzione di un elemento trasponibile che inattiva il gene.

Questo approccio è stato utilizzato da Jones et al. nel 1994 per clonare il gene *Cf-9* di pomodoro che conferisce resistenza contro le razze di *C. fulvum* che esprimono il gene *Avr9* di avirulenza. Jones et al. hanno sviluppato una linea di pomodoro contenente l'elemento trasponibile Ds di mais a circa 4 cM dal gene *Cf-9*. Per attivare l'elemento, questa linea è stata incrociata con un'altra linea contenente un elemento Ac di mais. Questa nuova linea è stata incrociata con una linea transgenica contenente il gene *Avr9* di avirulenza. La nuova popolazione così prodotta esprimeva quindi sia il gene *Cf-9* che il gene *Avr-9*. Di circa 160.000 piante ottenute da questo incrocio solo 63 sopravvivevano; di questi 63 mutanti quelli che non mostravano risposta ipersensibile avevano un trasposone localizzato all'interno della sequenza del gene *Cf-9*. Con questo metodo di selezione hanno isolato i prodotti genici che rispondono specificamente all'*Avr-9*.

1.8.2 'CHROMOSOME LANDING' - 'atterraggio sul cromosoma'

Questo approccio necessita della presenza di uno o più marcatori molecolari ad una distanza fisica dal gene target inferiore alla dimensione media degli inserti della libreria genomica usata per isolare il clone contenente tale gene. Il marcatore è usato per screenare la libreria ed isolare (o 'land' on-atterrare sul) clone contenente il gene. Questo approccio, utilizzato con successo in molte ricerche, ha permesso di isolare i geni *Vfa1* (*syn. HcrVf1*), *Vfa2* (*syn. HcrVf2*), *Vfa3* (*syn. HcrVf3*) e *Vfa4* (*syn. HcrVf4*) nel lavoro di Xu e Korban (2002) precedentemente descritto nel paragrafo 1.6.

1.8.3 'CHROMOSOME WALKING' - 'camminata sul cromosoma'

Il *Chromosome walking* è una tecnica impiegata per identificare, a partire da una sequenza nota, sequenze nucleotidiche adiacenti in una libreria genomica. Questa tecnica è utilizzata per trovare geni adiacenti (positional cloning) o per analizzare lunghi frammenti di DNA.

Un corto frammento di DNA presente ad una estremità del clone genomico è utilizzata come sonda per isolare cloni che contengano questa stessa sequenza e che quindi siano sovrapposti al precedente e permettano di allungare la sequenza in una nuova parte del genoma (Figura 6). L'estremità della sequenza del secondo clone è usata per isolare un terzo clone e così via finché non si isolano una serie di cloni che si sovrappongano e coprano la regione d'interesse.

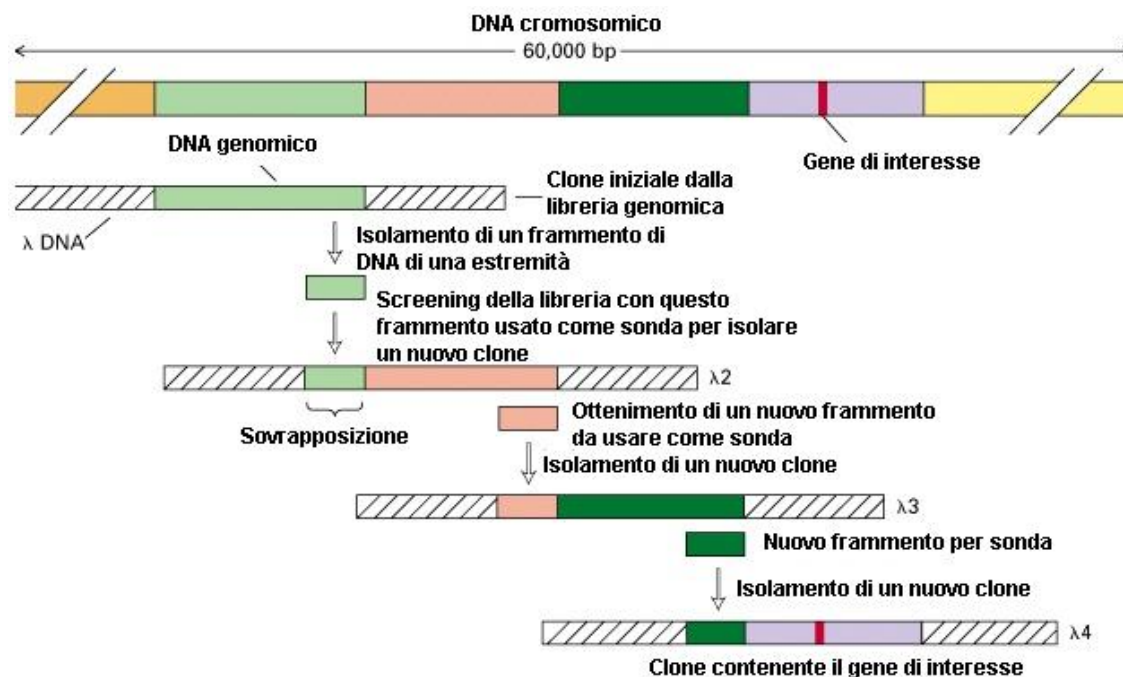


Figura 6: Schema esplicativo della tecnica del *Chromosome walking*, in cui un'estremità di un clone BAC è utilizzata come sonda per isolare un secondo clone BAC adiacente e così via.

Questo approccio è stato utilizzato sul melo da Patocchi et al. (1999) per isolare i geni *HcrVf* di resistenza a ticchiolatura. Lo screening è stato effettuato su una libreria BAC contenente inserti della cultivar Florina, eterozigote per il gene *Vf*, a partire da due marcatori molecolari (M18-CAPS and AM19-SCAR) fiancheggianti il gene *Vf* stesso. Sono stati isolati 13 cloni BAC nella regione tra i due marcatori in 9 step di *Chromosome walking* fino a creare un *contig* di circa 550 Kb. Per arrivare a posizionare più dettagliatamente la regione contenente il gene *Vf* sono state analizzate più di 2000 piante di diverse popolazioni segreganti per *Vf* con marcatori prodotti dalle sequenze degli estremi dei BAC. In questo modo la regione di possibile localizzazione del gene *Vf* è stata ridotta a cinque cloni BAC che coprono un intervallo di circa 350 Kb.

1.9 ELETTROFORESI CAPILLARE (SSR E SEQUENZE).

Il termine elettroforesi indica la migrazione differenziata di molecole elettricamente cariche all'interno di un campo elettrico. Molte molecole di interesse biologico

possiedono gruppi ionizzabili, cosicché queste possono esistere in soluzione sia come cationi che come anioni. Per la corsa elettroforetica capillare si utilizza un sequenziatore automatico, come quello in Figura 7, con capillari in silice fusa, con diametro interno compreso tra 10 e 100 micron e di lunghezza compresa tra i 30 e i 50 cm, riempiti con una sostanza che funge da “setaccio molecolare”: il polimero.



Figura 7: Sequenziatore automatico ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer a 16 capillari della ditta Applied Biosystem, con particolare dell’array e dei capillari.

Il funzionamento è il seguente: una piccola quantità di soluzione contenente il campione viene introdotta dall'estremità anodica di un capillare contenente un tampone appropriato.

L’introduzione si ha applicando una differenza di pressione fra le estremità del capillare, mentre per la separazione viene applicata una differenza di potenziale tra le due estremità del capillare (Figura 8).

Le molecole del campione cominciano quindi a migrare con velocità differenti lungo il capillare, e la migrazione elettroforetica vede lo spostamento dei cationi (+) verso il catodo (-), mentre gli anioni(-) si muovono verso l’anodo(+).

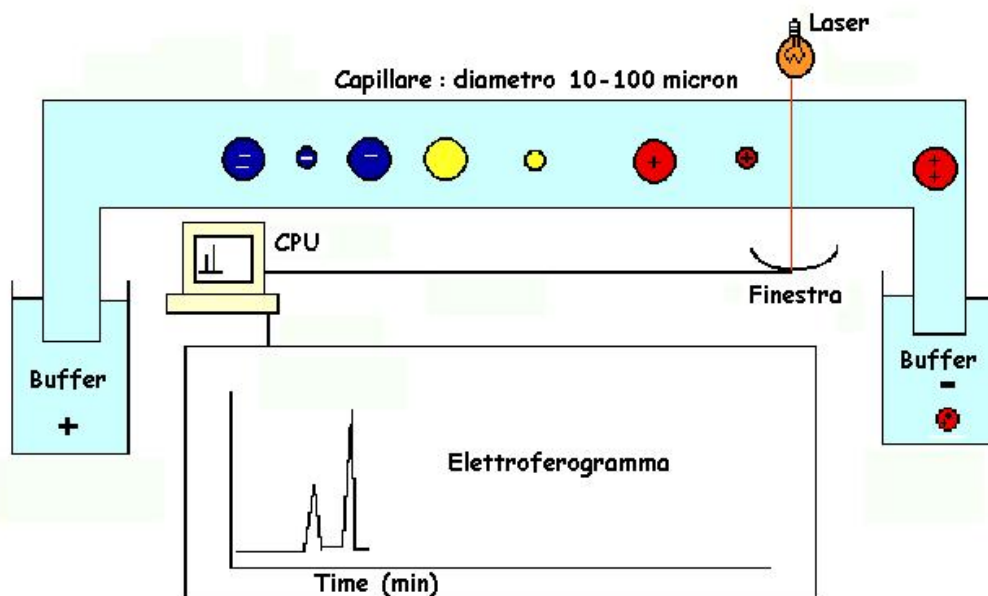


Figura 8: Schema di funzionamento dell'elettroforesi capillare: il capillare, nel quale c'è la finestra attraverso cui passa il laser, è immerso in due vaschette contenenti un tampone (buffer) appropriato e gli elettrodi che causano la differenza di potenziale grazie alla quale si ha la migrazione delle molecole. Un computer riceve e salva i dati grezzi che poi verranno trasformati in elettroferogrammi.

Questa metodica può essere utilizzata solo con primer marcati con un fluorocromo poiché nel capillare si trova una finestra attraverso la quale passa un laser che eccita il fluorocromo permettendo, così, l'emissione e la rilevazione di un segnale.

Questa tecnologia permette di “multiplexare” le reazioni, cioè, utilizzando primer marcati con fluorocromi diversi, si possono allestire reazioni con più coppie di primer per amplificare, in una singola reazione, anche quattro diverse sequenze specifiche che saranno poi differenziate dallo strumento in funzione del diverso colore che emettono.

1.10 IL GENE *Vm*

Il gene di resistenza a ticchiolatura *Vm* fu identificato alla fine degli anni '60 dopo la scoperta che la razza 5 di *V. inaequalis* attaccava sia *Malus micromalus* 245-38 che *Malus atrosanguinea* 804 (Dayton and Williams, 1970). Entrambe queste specie derivano probabilmente da un antenato comune e portano almeno due major genes, uno allelico al *Vf* e l'altro è appunto il *Vm* che causa risposta ipersensibile 'pit-type'.

A seguito di incroci mirati si riuscì a verificare la presenza di due geni diversi ed indipendenti e a capire che a volte la risposta di tipo 3, con lesioni necrotiche ristrette ma con sporulazione sparsa o abbondante (Shay and Hough, 1952), governata dal locus *Vf* era mascherata da una risposta di ipersensibilità prodotta dal gene *Vm* (Dayton and Williams, 1968).

Come già detto precedentemente, la resistenza basata sull'ipersensibilità è un sistema molto studiato: la cascata di difesa, che termina a livello macroscopico con l'ipersensibilità e a livello biochimico con la formazione di fitoalessine, è attivata a seguito del riconoscimento da parte della pianta ospite di un patogeno. Questo genere di risposta è molto veloce, infatti già 2-3 giorni post-infezione è possibile riconoscere i sintomi tipici (Shay and Hough, 1952), costituiti da piccole macchie necrotiche rotondeggianti, detti appunto, 'pin-point pit' (Figura 9).



Figura 9: Foglia con i tipici sintomi 'pin-point pit' caratteristici delle reazioni di ipersensibilità causate dalla presenza del gene di resistenza a ticchiolatura *Vm*.

Il sintomo 'pin-point' è l'evidenza macroscopica di una depressione di 100-500 μm di diametro dove le cellule epidermiche sono collassate. Nel centro di questa depressione è

presente un conidio che può originare uno stroma subcuticolare molto ridotto.

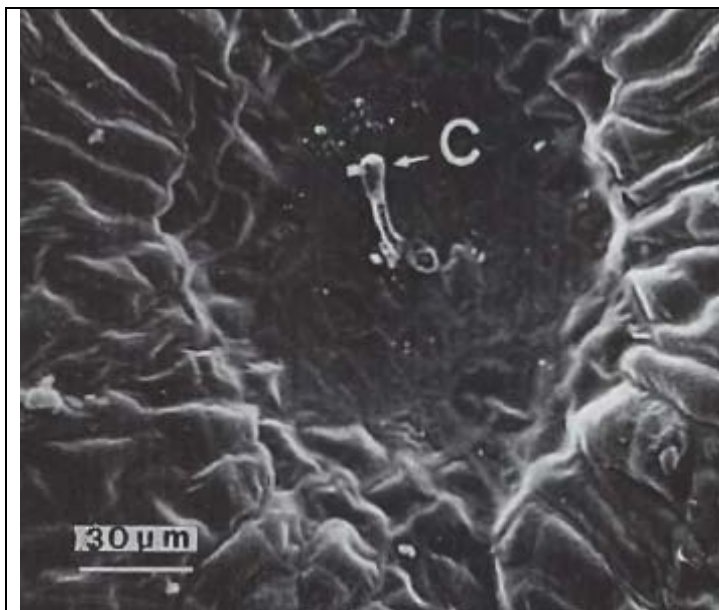


Figura 10: Reazione di ipersensibilità (classe 1) del clone 9AR2T196, che porta il gene di resistenza a ticchiolatura *Vm*, alla razza 1 di *V. inaequalis*: al fondo della depressione un conidio (C) forma un appressorio. Fonte: Guillaumès et al 1995.

Le cellule dello stroma fungino sono rare e le ife diventano necrotiche. La parete delle cellule stromatiche presto collassa e il citoplasma diventa necrotico. Da una sezione assiale, il numero di cellule epidermiche modificate varia da 4 a 20. Lo spazio intercellulare delle cellule a palizzata si riduce e spesso è riempito da depositi omogenei che si colorano con la colorazione di Schiff. Il citoplasma è abbondante e i piccoli vacuoli sono ricchi di granuli. Le cellule del mesofillo e le cellule dell'epidermide inferiore invece non subiscono modificazioni importanti laddove comparate con cellule non inoculate di controllo (Chevalier et al., 1991). Nell'area che rimane sana, numerosi conidi germinano e formano uno o più appressori che però non producono alcuno stroma subcuticolare; le cellule epidermiche risultano identiche a quelle controllo non inoculate.

Una cultivar che reca il gene *Vm* inoculata con la razza 5 di *V. inaequalis* invece risulta sensibile con sintomatologia di classe 4 caratterizzata da intensa sporulazione. Il clone 9AR2T196 per esempio laddove è inoculato con la razza 1 di *V. inaequalis* dà il 100% di risposta ipersensibile (vedi Figura 10), se invece è trattato con la razza 5 dà circa il 94% di piante sensibili con la presenza di micelio subcuticolare e abbondante

sporulazione (Figura 11-Guillaumès et al., 1995).

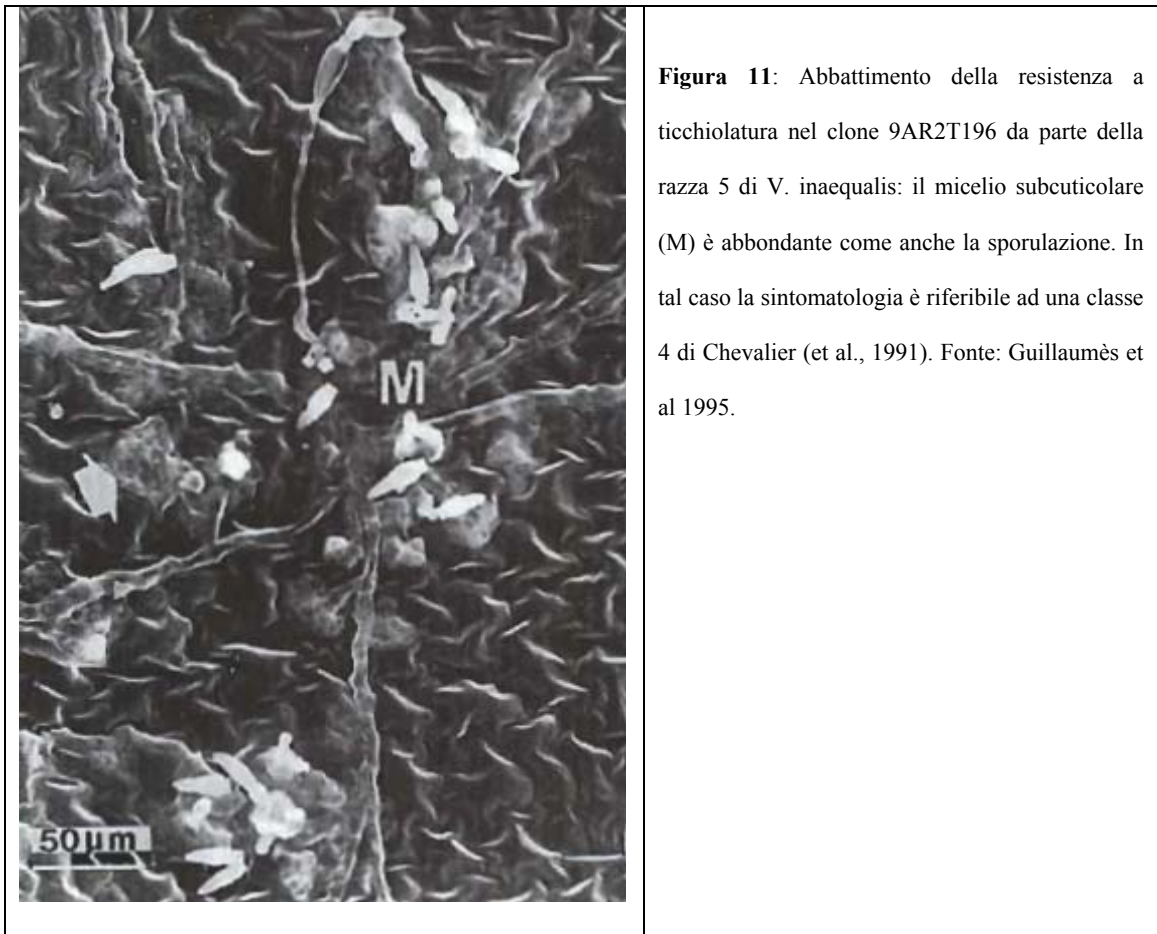


Figura 11: Abbattimento della resistenza a ticchiolatura nel clone 9AR2T196 da parte della razza 5 di *V. inaequalis*: il micelio subcuticolare (M) è abbondante come anche la sporulazione. In tal caso la sintomatologia è riferibile ad una classe 4 di Chevalier (et al., 1991). Fonte: Guillaumès et al 1995.

Alcuni studi sono stati condotti anche a livello del patogeno in modo da isolare la frazione proteica capace di elicitarne la risposta ipersensibile su una pianta che porti il gene *Vm*, come 9AR2T196, ciò ha portato all'isolamento di tre proteine con un basso punto isoelettrico compreso tra 3.0 e 4.5 (Win et al., 2003).

Da un punto di vista puramente genetico un QTL molto forte per la resistenza a *V. inaequalis* è stato identificato nel gruppo di linkage 17 (Durel et al., 2004). Al momento in bibliografia sono presenti due marcatori, OPB12 SCAR (Cheng et al., 1998) e Hi07h02 (Patocchi et al., 2005), per il gene *Vm*, entrambi mappati sul linkage group 17. L'interesse che questo gene suscita dipende dal fatto che conferisce una resistenza di tipo monogenico, come il gene *Vf*, ed è quindi relativamente facile da introgredire attraverso incroci mirati. La selezione assistita da marcatori punta all'introggressione di più resistenze monogeniche in una singola cultivar per rallentare il facile superamento

della resistenza grazie alla veloce evoluzione del fungo patogeno. Un altro motivo di forte interesse per questa resistenza monogenica deriva dal fatto che sarebbe molto interessante poter disporre della sequenza per poter valutare se la struttura di questo gene sia o meno simile a quella postulata per l'unico gene di resistenza a ticchiolatura per ora conosciuto e lungamente studiato e cioè il gene *Vf*.

1.11 SCOPO DELLA TESI

Sulla base di queste conoscenze si è voluto realizzare un lavoro di Dottorato che creasse i presupposti perché si arrivi a breve all'isolamento del gene *Vm* di resistenza a ticchiolatura in melo. Le fasi di sviluppo di questa tesi hanno previsto: l'ampliamento delle popolazioni segreganti per il gene *Vm*, la loro fenotipizzazione, l'analisi di una genoteca BAC di melo della cv. Florina (contenente il gene *Vf* di resistenza alla *Venturia inaequalis*) mediante l'uso della tecnica del *Chromosome walking*, l'individuazione di regioni microsatelliti, strettamente associate al gene di resistenza *Vm*, e il loro posizionamento su una mappa di melo pre-esistente (popolazione 'Fiesta' × 'Discovery', Liebhard et al, 2003b) e su una nuova mappa del LG 17 della popolazione 'Golden Delicious' × 'Murray'. E' poi stata creata una nuova genoteca BAC della cv. Murray (contenente il gene *Vm*) ed analizzata con i marcatori microsatelliti associati al gene di resistenza precedentemente individuati.

Questa ricerca assume un'importanza rilevante al fine dell'isolamento del gene *Vm* poichè ha portato alla preparazione dei materiali essenziali a tale scopo e ha prodotto 'marker' strettamente associati al gene oggetto di studio. Ciò permetterà, quindi, anche di fornire nuovi strumenti utili per una selezione assistita nel miglioramento genetico di genotipi contenenti resistenze monogeniche multiple.

2. MATERIALI E METODI

2.1 MATERIALE VEGETALE

2.1.1 Materiale vegetale già presente presso il Dipartimento di Colture Arboree di Bologna

Il materiale vegetale utilizzato in questo lavoro è tutto derivato dalla cultivar (cv.) di melo Murray (Figura 12), che, avendo come lontano parentale *M. atrosanguinea* 804, reca il gene di resistenza a ticchiolatura *Vm*.

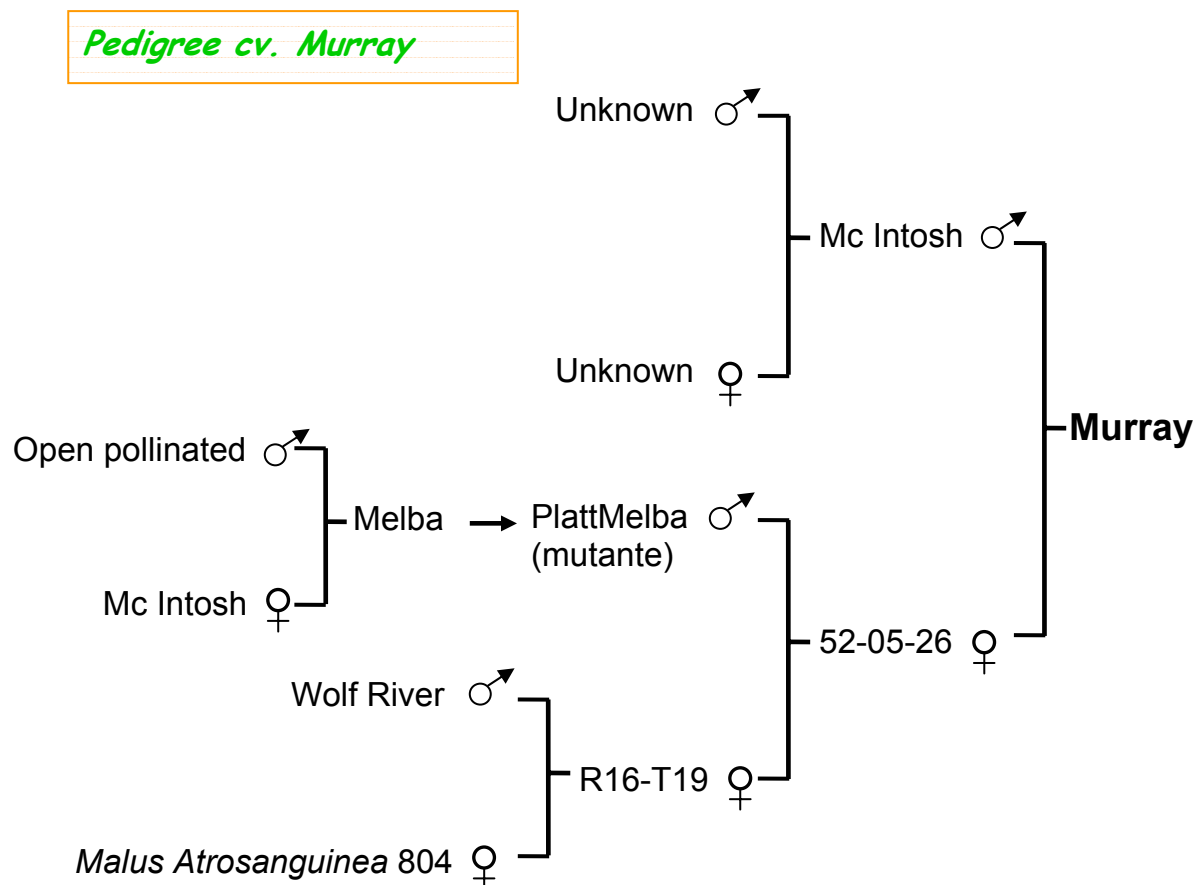


Figura 12: Pedigree della cultivar Murray, utilizzata in questo studio (Fonte: Hidras DataBase, comunicazione personale).

Nei campi sperimentali di Cadriano presso il Dipartimento di Colture Arboree di Bologna (DCA-BO) erano già presenti diverse piccole popolazioni di melo nelle quali uno dei genitori era la cv. Murray (Tabella III).

Tabella III: Popolazioni utilizzate in questo studio.

Popolazione	Individui	Geni di resistenza oltre al Vm
Durello x Murray	16	Vd
Fiesta x Murray	19	
GoldRush x Murray	50	Vf
Harmonie x Murray	164	Vf
Mondial Gala x Murray	8	
Royal Gala x Murray	14	
Braeburn x Murray	6	
Murray x Realka	63	Vr
Golden B x Murray	116	
Murray x PI172612	29	Va

Il numero totale di piante era di 485 unità; è stato così deciso di ampliare il numero di genotipi base in modo da arrivare ad avere almeno 1500 piante da analizzare. Nel prosieguo del testo ci si riferirà alle 485 piante presenti in pieno campo presso i campi sperimentali del DCA-BO come ad un insieme denominato “Murray2004”, poiché i campioni fogliari sono stati raccolti nel 2004.

2.1.2 Impollinazioni manuali, stratificazione e semina dei nuovi semi

È stato prelevato il polline dalla cv. Murray e sono stati fatti degli incroci manuali su due piante di forte interesse commerciale, come ‘Golden Delicious’ e ‘Galaxy’.

Le branche su cui sono state fatte le impollinazioni sono state poi racchiuse in sacchetti in modo da evitare la contaminazione con polline estraneo da parte di insetti pronubi o vento.

Dall’albero di ‘Golden Delicious’ impollinato con polline di Murray si sono ottenute 89 mele dalle quali sono stati estratti 574 semi; mentre dall’albero della cv. ‘Galaxy’ sono state raccolte 108 mele da cui si sono ottenuti 701 semi.

I semi così raccolti sono stati sterilizzati per 10’ in ipoclorito al 3% ed in seguito

asciugati con carta assorbente sterile.

In ogni piastra petri è stato posizionato un dischetto di carta sterile che coprisse il fondo e sopra ad esso sono stati posizionati 25 semi ben spaziati. Sono stati poi aggiunti 2ml di una soluzione anticrittogamica formata da acqua sterile, sumilex (procimidone p.a.) 1,8 g/L e bavistin (carbendazim p.a.) 2 g/L direttamente sui semi. Ogni piastra petri è stata poi chiusa utilizzando del parafilm e posta a 4°C per circa 2 mesi (Figura 13 a).

È stato preparato un substrato di semina, costituito da 60-80% torba bionda poco concimata, 20-30% sabbia media, trattato preventivamente con l'insetticida OFTANOL COMBI granulare (Bayern) per la messa a dimora dei semi.




Figura 13: Semi germinati dopo due mesi a 4°C e messa in dimora in serra a Cadriano-DCA-BO.

Tutte le piantine ottenute dalle impollinazioni manuali effettuate nella primavera del 2005 saranno nel seguito di questo testo chiamate col nome di “Murray2005”.

Le nuove piantine sono quindi germogliate in seminiere contenenti 60 vasetti in 6 righe e 10 colonne. Ad ogni vassoio è stata attribuita una lettera consecutiva dell'alfabeto italiano (A-Z) mentre i semi venivano posizionati nel substrato di semina (Figura 13 b). Per non sbagliarsi e dare una nomenclatura univoca e certa alle piantine si è posizionato un cartoncino nell'angolo in alto a sinistra di ogni vassoio con indicata la lettera progressiva e l'incrocio da cui i semi derivavano. Le piantine sono state quindi nominate con la lettera del vassoio di appartenenza e un numero progressivo da 1 a 60 a

partire dall'angolo in cui è stato posizionato come controllo il cartoncino di cui sopra (Figura 14).



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60

Figura 14: Schema del posizionamento e della nomenclatura data alle piantine seminate nei vassoi a partire dal cartoncino in cui è indicato il nome del vasoio, quindi i campioni saranno A1, A2 e così via fino ad A60.

2.1.3 La popolazione 'Fiesta' × 'Discovery'

In questo studio è stata usata anche la popolazione 'Fiesta' × 'Discovery' (Liebhard et al., 2003; Silfverberg-Diltworth et al., 2006) per il mappaggio dei nuovi marcatori isolati nel corso del lavoro come conferma della loro corretta localizzazione genomica.

2.2 INOCULI CON *V. INAEQUALIS* E RILIEVI DEI SINTOMI

Durante la primavera le nuove piantine sono state inoculate con una sospensione di conidi (60.000 conidi/ml) preparata a partire da foglie ticchiate di 'Gala', 'Red Chief' e 'Golden Delicious' cresciute in un frutteto non trattato. Gli inoculi sono stati effettuati in serra mantenendo delle condizioni di temperatura e umidità controllate: temperatura $19 \pm 5^\circ\text{C}$ e 100 % UR.

Poiché il gene *Vm*, dà una risposta molto veloce al patogeno il primo rilievo è stato eseguito già dopo tre giorni (72 ore) dall'inoculo. Ne sono seguiti altri due a distanza di tre giorni l'uno dall'altro per conferma fino alla sporulazione del fungo sulle piante sensibili.

Per la classificazione dei sintomi è stata seguita la scala di Chevalier et al. (1991), considerando resistenti le piante con sintomi ‘pin-point’ e sensibili quelle con una sporulazione abbondante nelle quali risultava evidente un “feltrino” fungino sulla pagina fogliare (Figura 15).



Figura 15: A. Foglia con sintomi “*pin-point pit*”, classificata come resistente. B. Foglia con evidente sporulazione, classificata come sensibile.

2.3 VALUTAZIONE AL MICROSCOPIO OTTICO DELLO SVILUPPO DEL FUNGO: COLORAZIONE DELLE IFE FUNGINE E ASSEMBLAGGIO VETRINI

Dopo l’infezione con *V. inaequalis* sulle 3 foglioline più giovani, sono state prelevate sezioni di tessuto fogliare ai tempi 0h, cioè subito dopo l’infezione, 1h, 2h, 4h, 20h, 48h, 68h e 92h.

Immediatamente il tessuto fogliare è stato inserito in una eppendorf contenente la Soluzione di decolorazione ed incubato a 75°C per un’ora. Questo trattamento elimina la clorofilla e rende il tessuto completamente privo di colore. Passata l’ora in Soluzione di decolorazione le foglie vengono colorate utilizzando la Soluzione di colorazione a 75°C per circa 10 minuti.

Vengono poi effettuati tre lavaggi con etanolo al 70% a temperatura ambiente per eliminare i residui della soluzione colorante. Le foglie vengono sistemate in Soluzione

di conservazione 1 per circa 2 ore e poi possono essere mantenute in Soluzione di conservazione 2 per diverse settimane in frigorifero.

Si possono assemblare dei vetrini per la visualizzazione al microscopio ottico dei campioni adagiando su un vetrino portaoggetti la foglia con la faccia superiore in alto, poiché l'infezione è stata fatta su questo lato. Il tessuto fogliare verrà ricoperto da qualche goccia di Soluzione di conservazione 2 e coperto da un vetrino coprioggetto. Il tutto sarà sigillato da smalto per unghie trasparente.

Soluzioni utilizzate:

	% sul totale	Sostanza
<u>Soluzione di decolorazione</u>	96	Etanolo assoluto
	4	Acido acetico
<u>Soluzione di colorazione</u>	70	Etanolo assoluto
	29.9	Acqua
	0.1	Blu di Metilene
<u>Soluzione di lavaggio</u>	100	Etanolo 70%
<u>Soluzione di conservazione 1</u>	50	Etanolo assoluto
	50	Acido lattico 90%
<u>Soluzione di conservazione 2</u>	100	Acido lattico 90%

2.4 ESTRAZIONE DEL DNA

2.4.1 Estrazione del DNA delle vecchie popolazioni

Il tessuto fogliare (circa 1 grammo) delle piante delle popolazioni "Murray2004" è stato polverizzato in azoto liquido con mortaio e pestello. Alla polvere ottenuta, posta in falcon da 15 ml, sono stati aggiunti 4.5 ml di Tampone di Estrazione preriscaldato a 60°C. I campioni sono poi stati incubati a 60°C per circa 30 minuti, agitando di tanto in tanto.

Al campione raffreddato è stato aggiunto un uguale volume di cloroformio-alcool

isoamilico (24:1), detto IAC e poi è stato centrifugato per 20 minuti a 5000 rpm. E' stata prelevata la fase acquosa (superiore) e posta in una nuova falcon da 15 ml: l'intero passaggio è stato ripetuto finché l'interfaccia tra la fase acquosa e quella organica non fosse pulita.

Alla fase acquosa sono stati aggiunti 2/3 di volume di isopropanolo freddo e i campioni sono stati centrifugati a 7000 rpm per 20 minuti.

Il pellet ottenuto è stato lavato con il Tampone di Lavaggio e, una volta asciutto, è stato risospeso in un volume adeguato di acqua sterile.

A 100 µl di DNA risospeso si sono aggiunti 3 µl di RNasi A (10 mg/ml); è poi seguita un'incubazione a 37 °C per 60 minuti. Successivamente è stata fatta un'estrazione con un volume di fenolo-cloroformio-alcool isoamilico (in rapporto 25:24:1) e poi una con un volume di IAC, prelevando in entrambi i casi la fase acquosa superiore, cui si è aggiunto un uguale volume di cloruro di sodio 5 M (NaCl 5 M). Si è poi centrifugato per 10 minuti a 14000 rpm ed è stato recuperato il surnatante, cui son stati aggiunti 2.5 volumi di etanolo assoluto (EtOH 100%), i campioni sono stati posti a -80 °C per almeno 30 minuti, per far precipitare il DNA.

Il pellet, ottenuto dopo una centrifugazione di 30 minuti a 14000 rpm, è stato lavato con EtOH 70% e, una volta asciutto, risospeso in un adeguato volume di acqua sterile.

Soluzioni utilizzate per l'estrazione del DNA:

1. **Tampone di Estrazione:** Tris-HCl (pH 8.0) 1 M, NaCl 2 M, EDTA 25 mM, CTAB 3% (Hexadecyltrimethyl-Ammonium Bromide); prima dell'uso è stato aggiunto β-mercaptoetanol 5 µl/ml.
2. **Tampone di Lavaggio:** EtOH 76%, NH₄Ac 10 mM (o 2.5 ml di NH₄Ac 4 M) .
3. **IAC:** cloroformio-alcool isoamilico (24:1).

2.4.2 Estrazione del DNA delle nuove popolazioni

Per l'estrazione del DNA delle nuove piantine "Murray2005", invece, è stato usato il "DNeasy 96 Plant Kit" della Qiagen (Cat. no. 69181) che permette l'estrazione direttamente in piastra da 96 (Figura 16). Questo kit permette di purificare il DNA senza usare fenolo-cloroformio o precipitazione con alcool ma mediante l'uso delle membrane DNeasy, che assicurano la rimozione completa di tutti gli inibitori degli enzimi utilizzati nella PCR (Polymerase Chain Reaction-reazione a catena della polimerasi) o nelle digestioni.

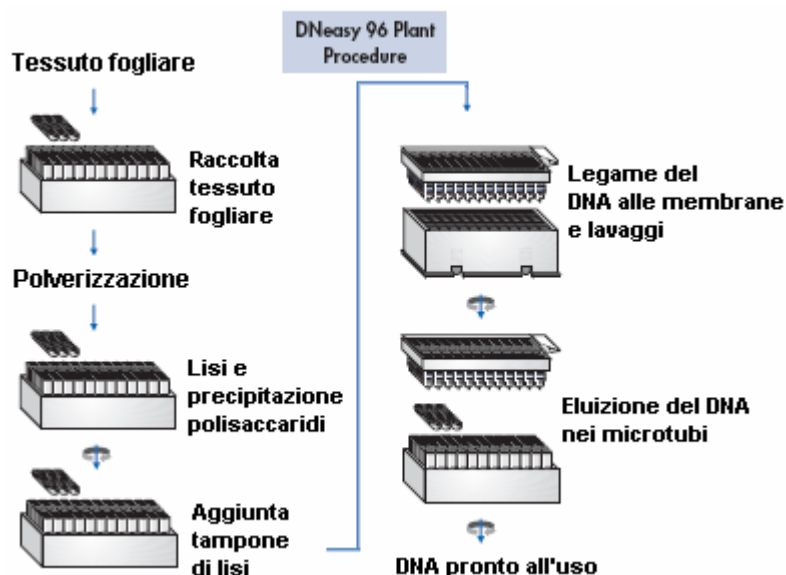


Figura 16: Schema di funzionamento del kit DNeasy della ditta Qiagen.

I campioni fogliari sono stati quindi raccolti ed inseriti nei tubini delle piastre fornite dal kit assieme a del carburo di silicio; sono stati poi liofilizzati e polverizzati utilizzando un mulino Mixer Mill MM 301 (Retsch®). In seguito è stato seguito il protocollo fornito dalla ditta Qiagen con l'unico accorgimento di scaldare a 70°C il tampone di eluizione. Poiché il DNA viene eluito in un tampone a bassa concentrazione di sali è pronto per future applicazioni.

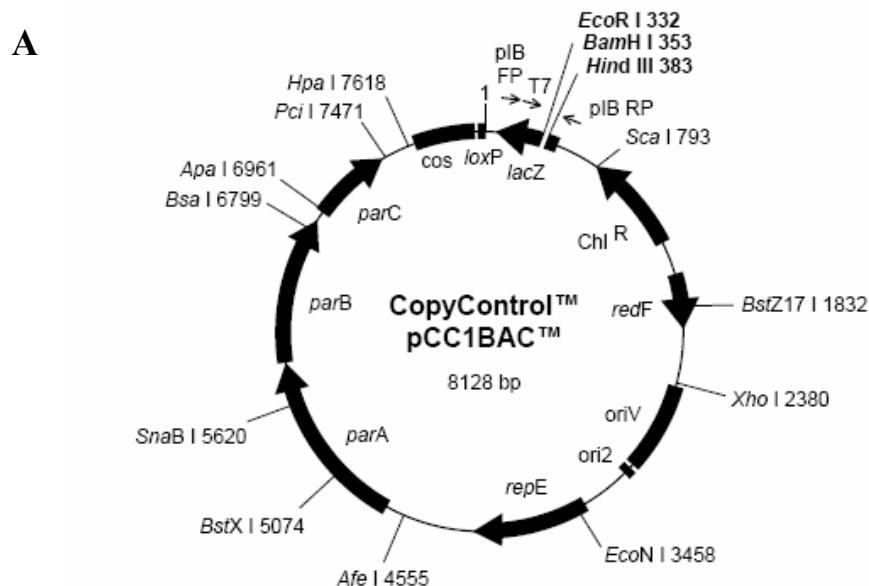
2.5 COSTRUZIONE DI UNA BAC LIBRARY DELLA CULTIVAR MURRAY

La nuova genoteca BAC è stata costruita presso la ditta Amplicon Express (Pullman, Washington, USA; <http://www.amplicon-express.com>).

Il vettore in cui sono stati clonati i frammenti del DNA di Murray è pCC1BAC™Vector (Figura 17 a), che deriva da pBeloBAC11 e contiene una origine di replicazione a singola copia *E. coli* F-factor e un'origine di replicazione *oriV* che viene selettivamente indotta per produrre un alto numero di copie. L'inizio della replicazione da *oriV* richiede il prodotto del gene *trfA* fornito da un secondo componente del sistema e cioè il ceppo EPI300™ di *E. coli*.

Le caratteristiche del CopyControl pCC1BAC™ Vector:

- Resistenza al Chloramphenicol come marcatore di selezione.
- Origine di replicazione *oriV* per alto numero di copie.
- Sito *Not* I adiacente ai siti di clonaggio *Bam*H I, *Hind* III ed *Eco*R I.
- Sito P1 *loxP* di Batteriofago per taglio delle Cre-ricombinasi.
- Promotore della T7 RNA polimerasi di batteriofago fiancheggiante il sito di clonaggio (Figura 17 b).



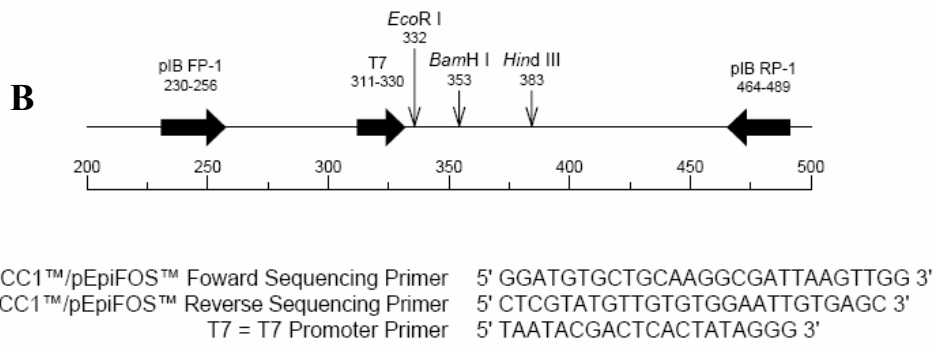


Figura 17: A. Vettore di clonaggio pCC1BAC™ in cui sono stati clonati frammenti del DNA della cv. Murray.
 B. Sequenze dei primer specifici per l'amplificazione dei frammenti inseriti nel sito di clonaggio.

Il ceppo di *E. coli* EPI300™ offre un gene *trfA* mutato il cui prodotto è essenziale per l'inizio della replicazione da *oriV*. Queste cellule sono state ingegnerizzate in modo che il gene *trfA* sia sotto stretto controllo di un promotore inducibile.

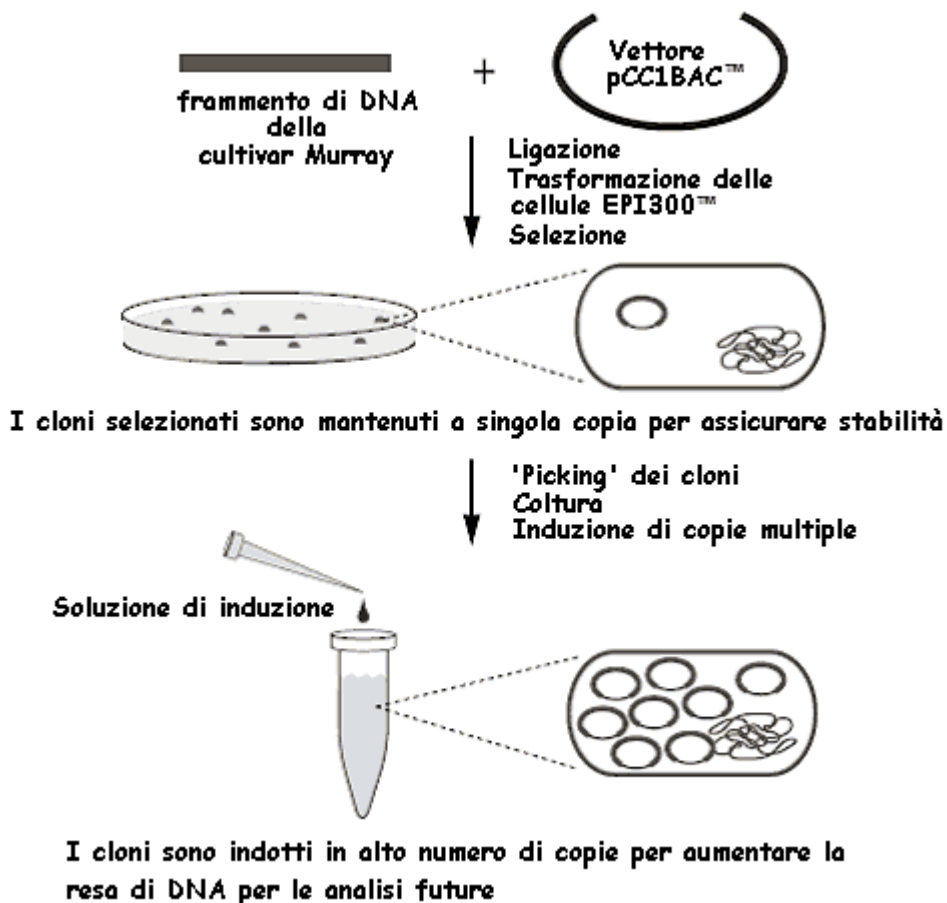


Figura 18: Rappresentazione schematica della creazione della genoteca BAC a partire dal DNA genomico di Murray di grandi dimensioni che viene ligato nel vettore pCC1BAC™ e poi viene usato per trasformare le cellule di *E. Coli* ingegnerizzate. I cloni sono selezionati su terreno contenente Cloramfenicolo e poi raccolti e messi in coltura per ottenerne molte copie.

I protocolli per il processo di clonaggio, ligazione del DNA genomico di Murray nel vettore pCC1BAC™, la trasformazione delle cellule competenti EPI300™ di *E. coli*, l'induzione di un alto numero di copie dei BAC (Figura 18) si possono scaricare dal link della ditta EPICENTRE® Biotechnologies (Madison, Wisconsin, USA): <http://www.epibio.com/pdftechlit/202pl066.pdf>.

2.6 REPLICA DELLA BAC LIBRARY DELLA CULTIVAR FLORINA

La genoteca BAC, ottenuta dal DNA di *Malus × domestica* cv. Florina (eterozigote per il gene di resistenza *Vf*), era disponibile presso il DCA-BO (Vinatzer et al., 1998). Questa libreria BAC è costituita da 36.864 cloni BAC che rappresentano approssimativamente cinque equivalenti di genoma aploide della varietà Florina.

Per le analisi sull'intera genoteca si è preferito evitare l'uso delle piastre originali in modo da non compromettere la vitalità dei batteri, quindi, l'intera genoteca è stata replicata tre volte: la prima replica ha permesso di avere una copia identica e vitale della libreria, la seconda e la terza replica sono state utilizzate per effettuare il 'pooling'.

Per le repliche sono state utilizzate piastre da 384 pozzetti a fondo piatto con coperchio (COSTAR CC 3860) perché resistenti anche a -80° C. Ogni pozzetto è stato riempito con 65 µl di 2x LB Broth (Sigma) addizionato di cloramfenicolo (12.5 µg/ml) con l'ausilio di un apparecchio automatico, il Q-fill (Cat X3050-Genetix) che permette di aliquotare agevolmente soluzioni liquide in piastre da 384. I campioni sono stati prelevati dalle piastre originali utilizzando un replicatore (V & P Scientific INC.) con 384 punte che permette di inoculare circa un microlitro di coltura dalla piastra madre alla piastra replica (Figura 19).

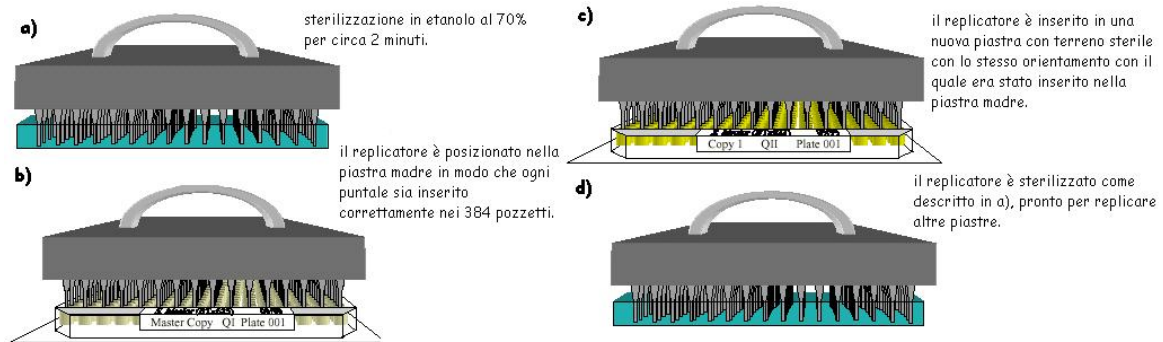


Figura 19: Utilizzo del replicatore da 384 punte per l'ottenimento in breve tempo di una replica identica di una piastra madre da 384 pozzetti.

2.7 POOLING DELLE BAC LIBRARY

2.7.1 PLATE POOL

E' stato studiato un disegno sperimentale del *pooling* che permettesse di sistemare i campioni delle 96 piastre da 384 della BAC library originale in piastre da 96, che è un formato comodo per screening *via* PCR e in seguito *via* sequenziatore.

Per diminuire la presenza di falsi positivi e falsi negativi si è deciso di eseguire un *pooling* in 2 dimensioni, in modo da ottenere con la massima accuratezza i cloni positivi comparando i risultati ottenuti dalle analisi sulle diverse *plate*.

Si è quindi utilizzata una replica della BAC library per ottenere una nuova piastra da 96 campioni denominata "PLATE POOL". Il "PLATE POOL" contiene in ogni pozzetto 384 cloni, cioè l'insieme di tutti i cloni di ogni singola *plate* originale uniti assieme.

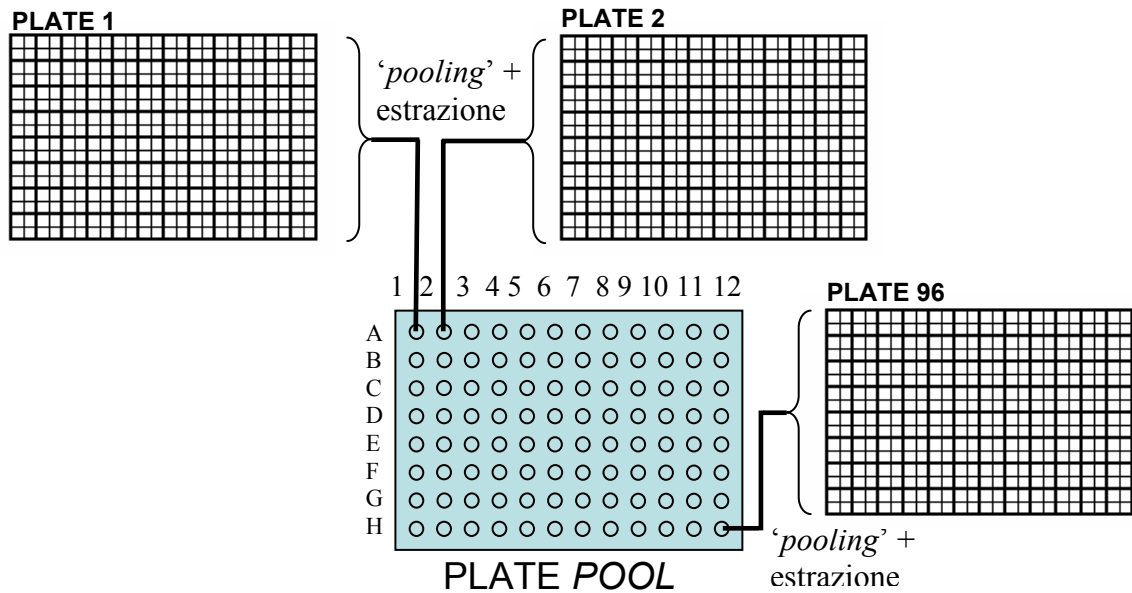


Figura 20: Schema della strategia seguita per ottenere il *PLATE POOL*: l'insieme dei 384 cloni di ogni *plate* è stato posizionato in un pozzetto della nuova piastra da 96 pozzetti denominata "*PLATE POOL*". Ad ogni pozzetto è stato dato un numero per convenzione ed ogni *pool* ottenuto da ogni *plate* da 384 è stato numerato da 1 a 96 in funzione del nome dalla piastra madre di volta in volta utilizzata. Le piastre madri erano 96 numerate da 1 a 96.

Il "*PLATE POOL*" si è ottenuto in modo molto veloce attuando una centrifugazione inversa con ogni *plate* replicata capovolta in maniera tale che il contenuto di ogni pozzetto confluisse in un contenitore sterile delle stesse dimensioni della *plate* sigillato con parafilm in modo da evitare le contaminazioni tra le varie piastre. Ogni *pool* così formato è stato raccolto in falcon per poi essere estratto ed in seguito aliquotato nella nuova piastra chiamata appunto "*PLATE POOL*" nella corretta posizione: il *pool* della *plate* 1 è stato messo nel pozzetto numero 1 per convenzione, cioè in posizione A1; il *pool* della *plate* 2 è stato posizionato nel pozzetto in posizione B1 e così via fino a sistemare il *pool* della *plate* 96 nel pozzetto in H12 (Figura 20).

2.7.2 A1-A2-B1-B2 POOL della BAC di Florina

Ogni *plate* da 384 pozzetti può essere suddivisa in 4 "quadranti" virtuali che hanno come origine la posizione A1 (A2, B1 e B2) e che vengono identificati idealmente posizionando nella suddetta origine il primo puntale di un replicatore da 96 punte (4 x

96 = 384). I 4 quadranti sono identificati nella Figura 22 da colori diversi. Il replicatore da 96 punte utilizzato virtualmente per individuare le posizioni dei 4 quadranti ha le stesse dimensioni relative che ci sono tra i pozzetti di una normale piastra da 96, mentre su una piastra da 384 ogni puntale si posiziona a distanza di un pozzetto vuoto rispetto al puntale precedente in ogni direzione, sia nelle righe sia nelle colonne (Figura 21).

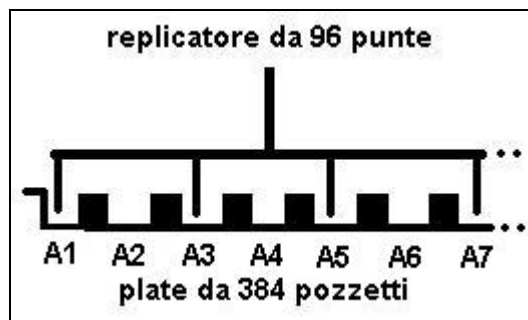


Figura 21: Posizionamento di un replicatore da 96 punte in una *plate* da 384 pozzetti: tra una punta è l'altra del replicatore c'è lo spazio di un pozzetto vuoto. Posizionando invece lo stesso replicatore in una piastra da 96 pozzetti tutti i pozzetti ricevono un puntale.

Quindi valutando il *POOL* A1, ogni pozzetto individuato sulla *plate* madre da 384 viene virtualmente spostato in una piastra da 96 mantenendo lo stesso identico ordine spaziale, lo stesso avviene per i campioni individuati nel quadrante definito A2 per il *POOL* A2 e così via.

Si sono quindi create altre 4 piastre da 96 chiamate rispettivamente “*pool* A1” (in rosso in figura), “A2” (in verde), “B1” (in blu) e “B2” (in giallo) unendo i campioni posizionati nella stessa identica posizione delle 96 *plate* da 384 pozzetti della genoteca iniziale replicata (Figura 22).

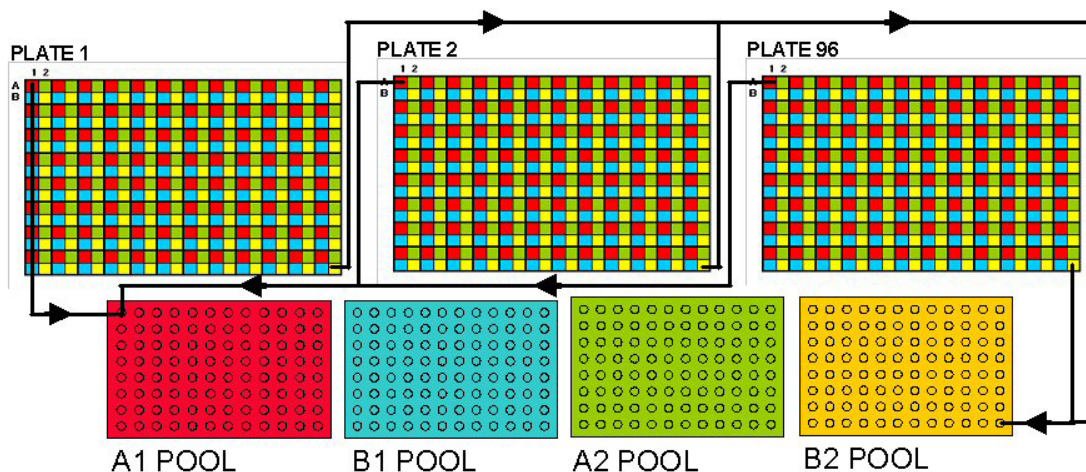


Figura 22: Schema seguito per la creazione dei 4 *pools* denominati A1, B1, A2 e B2, secondo il quale ogni *plate* da 384 pozzetti viene suddivisa in 4 quadranti virtuali individuabili posizionando un replicatore da 96 punte nelle posizioni A1, B1, A2 e B2 rispettivamente. I campioni vengono spostati dalla posizione originale dalla *plate* da 384 alla nuova posizione in una piastra da 96, mantenendo lo stesso identico ordine spaziale. Ogni *plate* da 384 subisce lo stesso trattamento, quindi i campioni del quadrante A1 di ogni *plate* originale sono spostati mantenendo lo stesso ordine nella nuova *plate* A1.

Quindi tutti campioni della posizione A1 (in rosso) di tutte le 96 *plate* da 384 verranno mescolati insieme e posizionati nella nuova piastra “A1 *POOL*” in posizione A1; tutti i campioni dello stesso quadrante virtuale A1 (per esempio A3-A5 e così via) saranno mescolati e posizionati nella nuova piastra “A1 *POOL*” in posizione A2-A3 e così via secondo uno schema spaziale ben definito dalla distanza fisica tra i puntali del robot utilizzato.

Tutto questo lavoro è stato eseguito su una seconda replica della libreria BAC originale con l’ausilio della stazione automatizzata Freedom EVO della ditta TECAN presente presso il Dipartimento di Biologia e Genetica Molecolare dell’Istituto Agrario di San Michele all’Adige (Figura 23).

I parametri specifici utilizzati per programmare il robot sono visualizzabili in appendice.

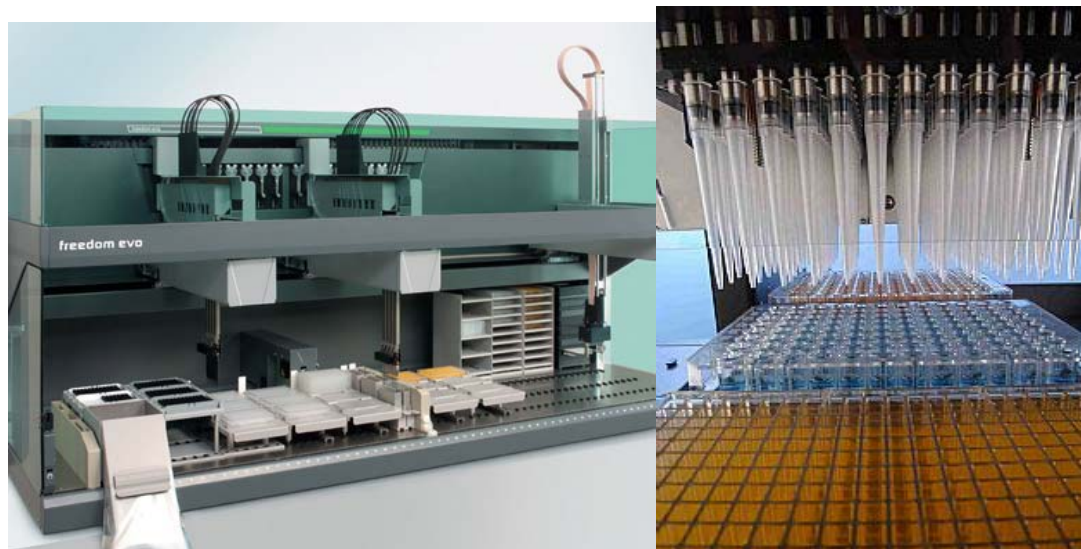


Figura 23: Robot automatico TECAN-Freedom EVO, con particolare della “testa” da 96 punte utilizzata per effettuare il *pooling* della libreria BAC della cv. Florina (Vinatzer et al., 1998).

2.7.3. POOL RIGHE e COLONNE (PRC) della BAC di Murray

Il *pooling* in 2 dimensioni della BAC di Murray è stato eseguito a seguito dello screening del *PLATE POOL* della nuova genoteca e solo sulle *plate* risultate positive a tale analisi.

Si è utilizzato un approccio diverso da quello descritto al paragrafo 2.7.2 che ha portato alla formazione dei 4 *pools* operativi riferibili ai 4 quadranti A1-A2-B1 e B2 di Florina. In questo caso si è costruito un *pool* di righe e colonne unendo, ad esempio, tutti i pozzetti della colonna 1 delle diverse *plate* risultate positive dallo screening del *PLATE POOL*, unendo tutti i pozzetti della colonna 2 e così via fino ad ottenere 24 *pools* delle colonne e 16 delle righe per un totale di 40 *pools* operativi.

2.8 ESTRAZIONE PLASMIDICA

Usando un puntale sterile sono stati prelevati circa 10 microlitri di ogni singolo *pool* da ogni pozzetto di una piastra da 96 del *pooling* ed è stato cresciuto in singola falcon contenente 6 ml di LB Broth (Sigma) addizionato di cloramfenicolo (12.5 µg/ml). I

batteri sono stati incubati over-night a 37 °C, in agitazione a 180 rpm.

La coltura è stata trasferita in più eppendorf da 2 ml e le cellule sono state precipitate centrifugando a 13000 g per 10 minuti. Il terreno è stato eliminato e il pellet è stato completamente risospeso in 300 µl di PREP1 (soluzione per la risospensione delle cellule) e tenuto in ghiaccio per 30 minuti.

Sono stati aggiunti 300 µl di PREP2 (soluzione per lisare le cellule) e, dopo aver invertito l'eppendorf 6-8 volte, la soluzione è stata incubata a temperatura ambiente per 5 minuti; sono stati poi aggiunti 300 µl di PREP3 (soluzione neutralizzante) mantenendo l'eppendorf in ghiaccio per circa un'ora.

Dopo centrifugazione a 14000 g per 10 minuti il surnatante è stato trasferito in una nuova eppendorf, prestando attenzione a non prelevare alcun precipitato bianco. Alla soluzione sono stati aggiunti 0.8 ml d'isopropanolo freddo e, dopo aver invertito l'eppendorf alcune volte, è stato lasciato in ghiaccio per 10 minuti.

Il pellet, ottenuto dopo una centrifugazione di 15 minuti a 14000 g, è stato lavato con 500 µl d'etanolo 70% e lasciato asciugare a temperatura ambiente. Il pellet poi è stato risospeso in 300 µl d'acqua milliQ sterile.

Successivamente è stata fatta un'estrazione con un volume di fenolo-cloroformio-alcool isoamilico (in rapporto 25:24:1) e poi con un volume di cloroformio-alcool isoamilico (24:1) prelevando ogni volta la fase acquosa superiore.

Il DNA è stato quindi precipitato con 1/10 di NH₄Ac 4 M e 2.5 volumi di EtOH assoluto e incubato a -80 °C per 30 minuti. Dopo una centrifugazione di 15 minuti a 14000 g il pellet ottenuto è stato lavato con etanolo 70%, asciugato a temperatura ambiente. Il DNA è stato alla fine risospeso in 20-100 µl d'acqua milliQ sterile. Per sequenziare gli inserti dei plasmidi, risultati in seguito positivi, è stato necessario ottenere del DNA molto pulito, quindi si è provveduto ad una ulteriore purificazione.

Una volta risospeso il DNA in un volume adeguato è stato aggiunto un uguale volume di una soluzione contenente NaCl 5 M e PEG (Polietilenglicole) 13%, si è mescolato e posto in ghiaccio per 60 minuti.

Il pellet ottenuto dopo una centrifugazione di 10 minuti a 14000 g a 4°C è stato lavato con EtOH 70% e risospeso in 20 µl, quantificato con l'ausilio dello spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies), diluito alla concentrazione d'uso (200ng/µl) e posizionato in piastra da 96 mantenendo lo stesso ordine del *pooling*.

Soluzioni per l'estrazione del DNA da cloni BAC:

Prep1: 15 mM Tris (pH8), 10 mM EDTA.

Prep2: 0.2 N NaOH, 1% SDS.

Prep3: 3 M KOAc (pH5.5)

2.9 SCREENING DEL *POOLING*: PCR ED ELETTROFORESI

Come già detto in precedenza lo screening della libreria BAC si può effettuare sia *via* ibridazione che *via* PCR, in questo studio abbiamo deciso di scegliere la seconda strada. Per essere sicuri che il numero di cloni inseriti in ogni *pool* non fosse troppo grande perché un singolo clone in esso contenuto fosse correttamente amplificato, abbiamo anche testato, sempre *via* PCR, che i *pool* con più cloni (384) amplificassero con primer specifici, come ad esempio quelli già pubblicati per il gene *Vf* se contenevano un clone conosciuto della regione *Vf*.

2.9.1 Condizioni di PCR

Di volta in volta le condizioni sono state adattate in funzione della temperatura di annealing dei primer.

Le reazioni di PCR sono state effettuate con il termociclatore 9600 GeneAmp PCR

System (Perkin Elmer) ed allestite, in piastra da 96, come segue:

T10x	1,5 μ l
MgCl ₂ [50mM]	0,45 μ l
dNTPs [1mM]	3,0 μ l
primer forward	0,2 μ M
primer reverse	0,2 μ M
BioTaq	0,2 μ l
<u>H₂O</u>	<u>a volume</u>
Volume finale	15 μ l

Tutti i primer reverse utilizzati sono stati modificati al 5' con fluorescein fosforamidite (6-FAM) in modo da essere visualizzabili tramite elettroforesi capillare.

Le condizioni di PCR utilizzate, in accordo con l'articolo di Gianfranceschi et al. (1998), sono state:

denaturazione 94°C per 2' 30''

denaturazione 94°C 30''

annealing 60°C 1' per 30 cicli

estensione 72°C 1'

estensione 72°C 10'

2.9.2 Elettroforesi capillare

I prodotti di PCR precedentemente ottenuti sono stati trattati come segue:

formammide	9,3 μ l
ROX	0,15 μ l
Prodotto di PCR	0,5 μ l

Le mix sono state denaturate per 3 minuti a 95°C poi poste in ghiaccio per alcuni minuti, quindi separate in elettroforesi capillare con l'ausilio dello strumento ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer.

I reagenti (Applied Biosystem) utilizzati in questa analisi sono:

1. 3100 Performance Optimized Polymer 4: POP-4™ (Cat.no.4316355)
2. 3100 Genetic Analyzer 10x Running Buffer con EDTA (Cat.no.402824)
3. HI-DI formammide (Cat.no.4311320)
4. GeneScan-500 ROX size standard (Cat.no.401734)

I parametri di corsa utilizzati sul sequenziatore automatico sono visualizzabili in appendice.

2.9.3 Elettroforesi su gel di poliacrilamide (PAGE)

La corsa elettroforetica è stata condotta in un sistema verticale dotato di due lastre di vetro di dimensioni di 38x50 cm e spaziatori, inseriti tra le due, dello spessore di 0.4 mm. Il gel di poliacrilamide, denaturante al 5%, è stato ottenuto miscelando 105 ml di urea 7 M con 15 ml di Acrilamide 40%.

a) Preparazione delle lastre

Le due lastre, *base plate* e *glass plate*, sono state lavate accuratamente con detersivo e, successivamente, con etanolo 100%. La *base plate* è stata trattata

con 0.5 ml di soluzione *Repel xilano* in modo tale da distribuire in maniera uniforme il prodotto e lasciata asciugare 5 minuti. L'eccesso di *Repel xilano* è stato rimosso con una salvietta inumidita con etanolo. La *glass plate* è stata trattata con 1 ml di soluzione *Bind xilano* (5 µl di *bind xilano* in 1 ml di soluzione 95% etanolo e 0.5% acido acetico) in modo analogo, rimuovendo l'eccesso con una salvietta inumidita con etanolo.

Sono stati posizionati gli spaziatori, lavati con etanolo, sulla *base plate*. La *glass plate* è stata posizionata al di sopra, cercando di evitare il contatto tra le due lastre. Sono stati inseriti i clamps ai lati dell'apparato; il sandwich così ottenuto è stato inserito nel tray, chiudendo le viti e disponendo il tutto su un piano orizzontale.

b) Preparazione della soluzione di acrilamide

Sono stati miscelati 105 ml di urea 7 M in TBE 1X, a 15 ml Acrilamide 40% in un becker; successivamente, sono stati aggiunti 500 µl di APS 10% e 60 µl di TEMED, che garantiscono la polimerizzazione del gel in tempi brevi. La soluzione è stata poi caricata nella siringa, eliminando le eventuali bolle d'aria formatesi, ed iniettata nell'apparato, facendo attenzione di non formare bolle. All'estremità alta del sistema è stato inserito il pettine, girato al contrario necessario per creare il fronte. Il gel è stato lasciato polimerizzare *overnight*.

c) Corsa elettroforetica

Sono stati preparati 1 L di tampone TBE 1X e 0.6 L di tampone TBE addizionato di 24 g di sodio acetato, e sono stati riscaldati per 4-8 minuti, in un forno a microonde. Il pettine e le pinze sono stati tolti dall'apparato col gel. Il

tampone TBE con sodio acetato è stato versato nella base; mentre il tampone TBE è stato versato tra i due vetri fino a 1 cm sopra il livello del *glass plate*. Il fronte del gel è stato accuratamente ripulito con una siringa, eliminando l'urea in eccesso e evitando la formazione di bolle. Il gel è stato sottoposto a pre-corsa a 110 W fino a raggiungere la temperatura ottimale di circa 47°C.

In contemporanea, i campioni diluiti con *loading buffer* sono stati denaturati per 5 min a 95°C ed immediatamente raffreddati in ghiaccio.

Al termine della Pre-corsa è stata ripulita la parte superiore del gel con una siringa ed è stato inserito il pettine a denti di squalo per creare i pozzetti di caricamento. Sono stati caricati 3,5 µl di ciascun campione e il ladder 100 bp. Il gel è stato infine sottoposto a corsa elettroforetica, a 10-15 W, per 5 min. e proseguita a 110 W per circa 2,5 ore, fino a quando la linea del blu di bromofenolo ha raggiunto il fondo.

Al termine della corsa i gel sono stati fissati in una soluzione di acido acetico al 10% (v/v) per 30 min e sono stati dunque colorati.

d) Silver Staining

Per visualizzare le bande ottenute dagli amplificati, i gel sono stati colorati con la tecnica *silver staining*, secondo il protocollo descritto da Bassam et al. (1991). La colorazione sfrutta la precipitazione degli ioni Ag⁺⁺, precedentemente legati ai frammenti di DNA, a seguito della riduzione in ambiente alcalino.

<u>Soluzioni per SILVER STAINING</u>	
- FIX / STOP SOLUTION:	200 ml acido acetico 1800 ml acqua ultrapura
- STAINING SOLUTION:	2 g nitrato di argento 3 ml formaldeide 37% 2000 ml acqua ultrapura
- DEVELOPING SOLUTION:	60 g carbonato di sodio 2000 ml acqua ultrapura Raffreddato in freezer
Appena prima dell'uso aggiungere:	3 ml formaldeide 37% 400 µl tiosolfato

Il procedimento utilizzato per la colorazione è il seguente: è stata preparata, in anticipo, la Developing solution ed è stata raffreddata in freezer. L'apparato di corsa, smontato, è stato raffreddato con acqua e le due lastre sono state separate in modo tale che il gel rimanesse attaccato alla *glass plate*. Il vetro è stato posto in un vassoio contenente la Fix/Stop solution e lasciato in agitazione per 30 minuti, fino alla scomparsa della linea blu di xylene cianolo. La soluzione è stata poi recuperata.

Successivamente, la lastra è stata sottoposta a due risciacqui da 5 min. in 1 L di acqua ultrapura ciascuno, mantenendo il vassoio in agitazione. La lastra è stata poi trasferita per 30 min., in un vassoio contenente la Staining solution in agitazione, per indurre la colorazione.

Nel frattempo è stata completata la Developing solution, aggiungendo 3 ml di formaldeide 37% e 400 µl di tiosolfato di sodio. La soluzione è stata poi suddivisa 1L+1L in due vassoi posizionati sotto cappa. Il gel è stato appoggiato su una superficie piana ed immerso per non più di 4 secondi in un vassoio con 2 L di acqua ultrapura, per un rapido risciacquo, e

immediatamente posto nel vassoio con la Developing solution.

Per indurre lo sviluppo, il vassoio è stato agitato in modo che l'intera superficie del gel venga a contatto con la soluzione, fino a quando incominciano ad apparire le prime bande, relative al ladder. A questo punto, il gel è stato trasferito nel secondo vassoio, proseguendo l'agitazione fino alla completa comparsa delle bande.

La reazione di sviluppo è stata bloccata poco prima dell'imbrunimento del gel, aggiungendo 1 L della soluzione Fix/Stop recuperata, e agitando per qualche minuto. Infine, la lastra è stata posta in 2 L di acqua ultrapura per 2 min per un risciacquo finale e lasciata asciugare sottocappa *overnight*, in posizione verticale.

Le immagini sono state acquisite per mezzo di uno scanner ed i pattem elettroforetici rilevati mediante Gel Documentation System (Quantity One Programme, BioRad); la lastra è stata posta in una soluzione di 2 L NaOH 5% (preparata con acqua di rubinetto) per almeno 2 ore. Il vetro è stato lavato con sapone e risciacquato con acqua distillata.

2.10 BAC ENDS SEQUENCING-SEQUENZIAMENTO DELLE ESTREMITÀ DEI CLONI

Il sequenziamento delle estremità dei cloni BAC risultati positivi allo screening precedente è stato effettuato utilizzando il Big Dye[®] Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit fornito dalla ditta Applied Biosystem (Cat.no.4336774).

Le reazioni di sequenza sono state preparate modificando leggermente quanto suggerito dal protocollo del kit:

Ready reaction premix	4 μ l
Primer	3.2 pmol
DNA	0.5-1.0 μ g

Le temperature utilizzate sono state:

<u>94°C</u>	<u>5'</u>	
94°C	30''	
50°C	20''	per 40 cicli
60°C	4'	

Per il sequenziamento delle BAC ends sono stati utilizzati i primer specifici T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') ed Sp6 (5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3') che amplificano a partire dalla sequenza del plasmide verso l'inserto.

Le reazioni di sequenza sono state purificate mediante cromatografia su colonna di Sephadex G-50 (0.052 g di resina sono stati equilibrati con 800 μ l di acqua milliQ sterile e lasciati idratare per almeno 2 ore a temperatura ambiente) e quindi trattate come segue:

Reazione di sequenza	5 μ l
<u>Formammide</u>	<u>15 μl</u>
Volume finale	20 μ l

Queste mix sono state poi denaturate a 95°C per 3 minuti e caricate al sequenziatore automatico l'ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Le sequenze ottenute sono state analizzate e assemblate mediante i programmi

Sequencing Analysis e AutoAssembler forniti dalla ditta Applied Biosystems.

Reagenti utilizzati:

Sephadex: G50 Medium (Amersham Pharmacia Biotech).

HI-DI formammide (Cat.no.4311320).

2.11 CHROMOSOME WALKING E COSTRUZIONE DEL CONTIG

Il *Chromosome walking* è stato effettuato a partire dalle sequenze sulle estremità dei primi BAC positivi, su queste estremità si sono disegnati nuovi primer con il software Primer3 (disponibile on line all'indirizzo http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). I nuovi primer sono serviti per fare un nuovo screening della libreria BAC per isolare altri cloni della regione, le cui estremità sono state a loro volta sequenziate per continuare nella costruzione del *contig*.

2.12 DIGESTIONE CON ENZIMI DI RESTRIZIONE ED ELETTROFORESI DEL DNA SU GEL D'AGAROSIO

Il DNA dei BAC risultati positivi è stato digerito con endonucleasi di restrizione secondo il metodo descritto da Sambrook et al. (1989).

Il volume finale della reazione è stato di 100 µl e si è lasciato che la digestione avvenisse *over-night* alla temperatura ottimale d'attività dell'enzima (Tabella IV).

Tabella IV: Endonucleasi di restrizione utilizzate

ENZIMA	SEQUENZA TARGET	TEMPERATURA
<i>Not I</i>	GC'GGCCGC CGCCGG'CG	37 °C
<i>EcoR I</i>	G'AATTC CTTAA'G	37 °C

Un'aliquota o l'intera miscela di digestione è stata poi sottoposta ad elettroforesi su gel

d'agarosio nel caso di digestione con *EcoR* I, mentre nel caso di *Not* I si è proceduto con una elettroforesi pulsata, che permette di differenziare frammenti molto grandi come nel caso dei BAC. *Not* I infatti è un enzima usato per conoscere le effettive dimensioni del clone BAC su cui si sta lavorando poiché sul plasmide sono presenti 2 siti di taglio che permettono di tagliare subito fuori dall'inserto e quindi separano fisicamente il plasmide PECBAC1 dall'inserto.

In relazione alle dimensioni del DNA da analizzare sono stati utilizzati gel d'agarosio a differente porosità; l'agarosio è stato fornito dalla ditta Life Technology in forma ultrapura per biologia molecolare. La preparazione del gel è stata fatta pesando la quantità d'agarosio necessaria e sciogliendola in tampone TAE 0,5X.

Per la visualizzazione del DNA è stato usato il Gel Star[®] (Bio Whittaker Molecular Application) o il Sybr[®]Gold (Molecular Probes) aggiunti direttamente al campione da analizzare (1 µl, della diluizione 1:10.000 della soluzione madre in DMSO, ogni 10 µl di campione) assieme al loading buffer (2 µl per 10 µl di campione). Gel Star[®] e Sybr[®]Gold sono coloranti fluorescenti che permettono di rilevare sia il DNA che l'RNA legandosi agli acidi nucleici stessi.

La corsa elettroforetica normale è stata condotta a voltaggio costante di 5-6 V/cm e il gel è stato visualizzato agli UV (300-320 nm) e fotografato con pellicola Polaroid in bianco e nero (ISO 3000), con un filtro compatibile con l'emissione del Gel Star[®] o del Sybr[®]Gold (attorno ai 520-550nm) che blocca la luce sotto ai 500nm.

Per la calibrazione si usa il DNA del fago lambda digerito con l'enzima *Hind*III che dà un bandeggio a dimensioni ben definite e conosciute e permette quindi per confronto di "misurare" i frammenti d'interesse.

La risoluzione massima di un gel di agarosio va dalle 100 bp a circa 20.000 bp; tuttavia per lavorare con frammenti di grandi dimensioni, come i BAC, si fa ricorso

all'elettroforesi in campo pulsato, in cui il DNA di grosse dimensioni è sottoposto ad un campo elettrico il cui orientamento è periodicamente cambiato (13°C in TAE 1x; 180V; 20 ore di corsa; 5 secondi tempo iniziale e 20 secondi tempo finale).

Il gel dopo aver effettuato la corsa elettroforetica in campo pulsato viene post-colorato in una soluzione di Bromuro di Etidio, colorante intercalante di base che emette fluorescenza se eccitato con la corretta lunghezza d'onda, in cui il gel viene posto per circa 20 minuti in leggera agitazione.

Soluzioni per l'elettroforesi del DNA:

-TAE 50X: 2 M Tris acetato, 0.05 M EDTA.

-Loading buffer: 0.25% xilene cianolo, 0.25% blu di bromofenolo, 30% glicerolo.

2.13 SOUTHERN BLOTTING

2.13.1 Trattamento del gel d'agarosio

Data la dimensione dei frammenti attesi dalle digestioni dei cloni BAC, sono stati utilizzati gel di agarosio allo 0.8% in TAE 0.5X.

I gel sono stati incubati a temperatura ambiente per 30 minuti nella soluzione denaturante e per altri 15 minuti nella soluzione neutralizzante.

Soluzioni per il trattamento del gel d'agarosio:

-TAE 50X: 2 M Tris acetato, 0.05 M EDTA.

-Soluzione denaturante: 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH.

-Soluzione neutralizzante: 1 M Tris-HCl, pH 8.0; 1.5 M NaCl.

2.13.2 Trasferimento su membrana

Il DNA separato su gel è stato trasferito per capillarità su una membrana di nylon

HybondTM-N+ (Amersham Pharmacia Biotech).

Il trasferimento è stato predisposto nel modo seguente (Figura 24):

- vaschetta contenente SSC buffer 20X, con supporto, per il gel, appoggiato sopra la vaschetta e carta da filtro a ponte (Whatman 3MM bagnata prima in SSC2X);
- gel d'agarosio adagiato sulla carta da filtro (posizionato come in cella elettroforetica);
- membrana di nylon, precedentemente bagnata in SSC buffer 2X, a diretto contatto con il gel (evitando di formare bolle d'aria che impedirebbero il trasferimento capillare);
- fogli di carta da filtro (Whatman 3MM): due bagnati in SSC 2X, a contatto con la membrana di nylon, e l'ultimo asciutto sopra;
- più strati di carta assorbente sopra ai quali si pone un peso proporzionale alle dimensioni ed alla percentuale di agarosio nel gel.

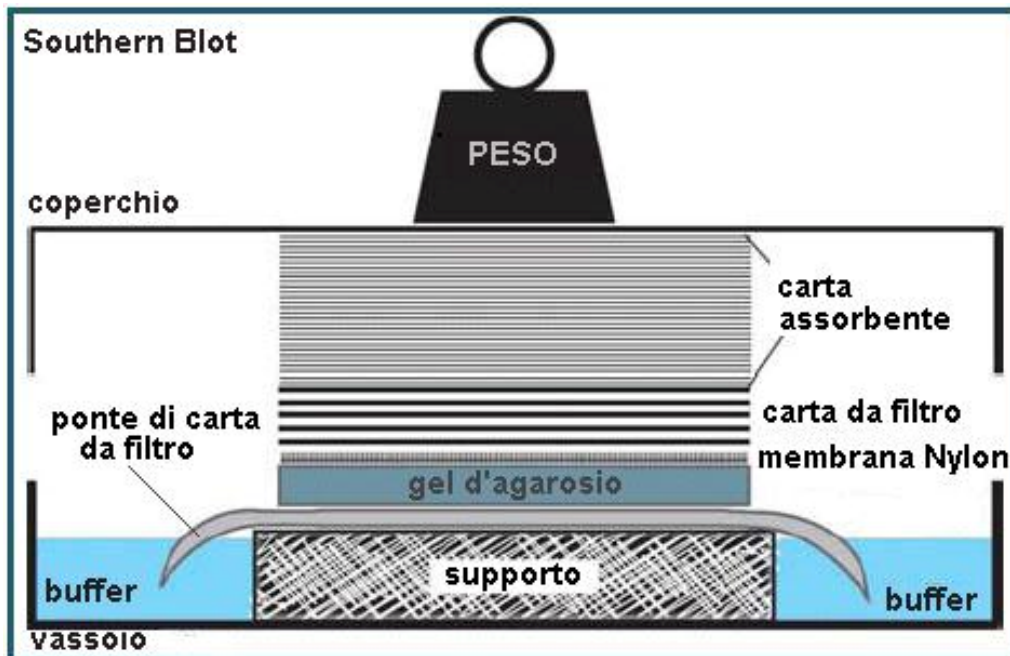


Figura 24: *Southern Blot*: trasferimento capillare del DNA, digerito con endonucleasi di restrizione, da un gel di agarosio, a seguito di corsa elettroforetica, ad una membrana di nylon sulla quale verranno poi effettuate le ibridazioni con sonde specifiche.

Il trasferimento capillare viene fatto procedere *over-night*.

Soluzione per il trasferimento:

-SSC 20X: 3 M NaCl, 0.3 M sodio citrato.

2.13.3 Fissaggio del DNA sulla membrana

Dopo aver segnato i pozzetti del gel sulla membrana e aver tagliato un angolo prefissato come punto di riferimento, la membrana di nylon è stata rimossa dal gel, lavata brevemente con SSC 2X e poi adagiata su carta assorbente e posta in stufa a 80 °C per circa un'ora; successivamente il DNA è stato fissato esponendo ciascun lato per 30 secondi agli UV.

2.14 MARCATURA DELLE SONDE, PRE-IBRIDAZIONI ED IBRIDAZIONI

2.14.1 Marcatura a freddo delle sonde con il metodo della fosfatasi alcalina diretta

(AlkPhosDirect™)

Le sonde specifiche, utilizzate per confermare lo screening della genoteca BAC effettuato *via* PCR, sono state ottenute marcando, con un metodo non radioattivo, frammenti di PCR ottenuti con i primer disegnati sulle BAC ends. Per la marcatura è stato usato il kit Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System fornito dalla ditta Amersham Pharmacia Biotech (Cat. No. RPN3680) che prevede la marcatura diretta del frammento con l'enzima fosfatasi alcalina.

Il DNA da marcare è stato diluito alla concentrazione di 10 ng/μl e sono poi stati prelevati 10 μl a cui sono stati aggiunti, dopo una denaturazione di 5 minuti, 10 μl di Reaction Buffer, 2 μl Labelling Reagent e 10 μl di Cross-linker (diluito 1:10).

La reazione è stata incubata a 37 °C per 30 minuti.

2.14.2 Preibridazione ed ibridazione per il metodo della fosfatasi alcalina diretta

(AlkPhos Direct™)

Il filtro è stato incubato per almeno 15 minuti nel tampone di preibridazione a 65 °C. Poi è stata aggiunta la sonda (5-10 ng per ml di tampone) e si è lasciato ibridare overnight a 65 °C.

Soluzioni di preibridazione ed ibridazione:

-Tampone di preibridazione: Tampone di ibridazione fornito dalla ditta a cui è stato aggiunto NaCl fino ad ottenere una concentrazione 0.5M e 4% (w/v) di 'blocking reagent' (fornito nel kit).

-Tampone di ibridazione: Tampone di preibridazione a cui è stata aggiunta la sonda.

2.14.3 Rilevazione del segnale di sonde marcate in modo diretto

Dopo l'ibridazione, si sono effettuati i lavaggi di stringenza che prevedevano due lavaggi di 15 minuti a 65 °C con il 'Primary wash buffer' (precedentemente riscaldato a temperatura) e ulteriori due lavaggi di 10 minuti a temperatura ambiente con il 'Secondary wash buffer'. La membrana è stata quindi adagiata su una pellicola di cellophane e vi è stato sopra dispensato il 'CDP-star detection reagent' (30-40 µl/cm²) e messo per 5 minuti al buio. La membrana è stata posta su supporto rigido, avvolta in pellicola e quindi messa a contatto con una lastra autoradiografica (Hyperfilm ECL Amersham Pharmacia Biotech).

Soluzioni per la rilevazione del segnale:

Primary wash buffer: 2 M Urea; 0.1% SDS; 50 mM NaH₂PO₄ , pH 7.0; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 0.2% Blocking reagent.

Secondary wash buffer 20X: 1 M Tris-HCl, pH 10.0; 2 M NaCl. Al momento dell'uso va aggiunto MgCl₂ alla concentrazione finale di 2 mM.

2.15 DISEGNO PRIMER MICROSATELLITI E MAPPAGGIO

Le sequenze ottenute sono state valutate anche alla ricerca di ripetizioni microsatelliti, che per loro natura sono molto informativi, facilmente trasferibili ad altre specie e risultano perciò i marcatori più utili per il mappaggio nelle popolazioni oggetto di studio.

Laddove siano stati trovati microsatelliti sono stati disegnati primer specifici sulle sequenze adiacenti le ripetizioni utilizzando il link: http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi.

Le reazioni di PCR sono state allestite con le condizioni descritte da Gianfranceschi et al. (1998) e separate tramite elettroforesi capillare sul sequenziatore automatico ABI PRISM 3100, come precedentemente descritto.

I dati grezzi ottenuti sono stati analizzati con i software GeneScan[®] e Genotyper[®] (Applied Biosystem) e dove si è rilevato polimorfismo all'interno della popolazione è stato possibile, sfruttando le frequenze di ricombinazione tra coppie di caratteri e le loro segregazioni, provvedere al mappaggio di tali marcatori nella popolazione preesistente 'Golden Delicious' × 'Murray' (116 individui) e, per conferma, anche nella mappa di riferimento 'Fiesta' × 'Discovery' (Liebhard et al., 2003) utilizzando il software JoinMap[®]3.0 (Van Ooijen, J.W. & R.E.Voorrips, 2001).

I microsatelliti sono marcatori codominanti ed i risultati di segregazione dei diversi marcatori sono stati suddivisi nelle seguenti classi (Tabella V).

Tabella V: Segregazioni e codici da utilizzare nel software JoinMap 3.0.

<u>codice</u>	<u>descrizione</u>	<u>numero alleli</u>	<u>genotipi</u>
<u>possibili</u>			
<abxcd>	locus eterozigote in entrambi i parentali	4 alleli diversi: ac, ad, bc, bd	
<efxeg>	locus eterozigote in entrambi i parentali	3 alleli diversi: ee, ef, eg, fg	
<hcxhk>	locus eterozigote in entrambi i parentali	2 alleli diversi: hh, hk, kk, h-, k-	
<lmxll>	locus eterozigote nel genitore femminile		lm, ll
<nnxnp>	locus eterozigote nel genitore maschile		nn, np

Dopo aver assegnato gli alleli corretti ad ogni campione della popolazione viene costruito un foglio elettronico (file *.loc) che contiene le informazioni di tutti i loci analizzati in una struttura sequenziale in cui è necessario inserire il nome della popolazione, il tipo di popolazione (in questo caso le popolazioni utilizzate sono tutte CP, cioè derivate da incrocio tra due genitori diploidi eterogeneamente eterozigoti ed omozigoti), il numero di loci analizzato ed il numero di individui.

Il file *.loc così ottenuto è stato importato in un nuovo progetto del software JoinMap®3.0 (Van Ooijen, J.W. & R.E.Voorrips, 2001). A questo punto sono state eseguite diverse analisi tra cui lo studio della frequenza genotipica di ogni individuo per poter individuare i campioni che danno poca informatività alla mappa poiché mancano di molti dati, in tal modo si possono escludere dall'analisi utilizzando il comando "Exclude"; una seconda analisi effettuata riguarda la segregazione distorta di alcuni loci attraverso il calcolo delle frequenze genotipiche di ogni locus per individuare il grado di distorsione di ogni marcatore utilizzato: quelli che mostravano un alto grado di distorsione sono stati esclusi dalle seguenti analisi. A questo punto i marcatori rimanenti sono stati raggruppati automaticamente nei diversi gruppi di associazione grazie ad un test di indipendenza basato sul valore LOD. Per queste analisi

il valore di LOD scelto è stato pari a 5, ma per alcuni cromosomi si è utilizzato anche il LOD=4. Dopo aver selezionato i diversi gruppi con il LOD prescelto sono state disegnate in automatico da una a tre mappe, in base alla presenza o meno di loci che creino dei conflitti all'elaborazione; in tal caso si può valutare la bontà di tali loci controllando il contributo medio che ogni locus dà attraverso il test del CHI QUADRO. Quella descritta è un'analisi approfondita utilizzata nel caso della popolazione 'Fiesta' × 'Discovery', per la quale esiste una mappa ben satura e moltissimi dati genotipici di segregazione, per valutare correttamente la posizione effettiva di un nuovo marcatore individuato e mappato, soprattutto nel caso di marcatori multilocus per i quali risultava difficile la scelta della banda corretta. Nel caso del mappaggio in 'Golden Delicious' × 'Murray' invece si è costruita solo una mappa del gruppo di linkage 17 in cui risiede il gene di resistenza *Vm*. Questa si è ottenuta producendo i dati di segregazione solo dei marcatori che erano già stati posizionati nel LG17 di 'Fiesta' × 'Discovery' (Silfverberg-Dilworth et al., 2006), come ad esempio Hi07h02 (Patocchi et al., 2005), OPB12 SCAR (Cheng et al., 1998), Hi02f12 (Silfverberg-Dilworth et al., 2006) e CH04f08 (Tartarini, comunicazione personale).

3. RISULTATI E DISCUSSIONE:

3.1 NUOVE POPOLAZIONI: ‘Golden Delicious’ × ‘Murray’ e ‘Galaxy’ × ‘Murray’

Come già sottolineato precedentemente il primo passo di questo Dottorato è stato quello di ampliare il numero di genotipi derivanti da incroci con il parentale Murray, che presenta il gene di resistenza a ticchiolatura *Vm*. A tal proposito, nel corso della primavera 2005 sono state impollinate manualmente, presso i campi sperimentali di Cadriano dell’Università di Bologna, alcune branche di piante di melo delle cultivar ‘Golden Delicious’ e ‘Galaxy’. Dai fiori di ‘Golden Delicious’, impollinati con polline della cv. Murray (parentale recante il gene *Vm*), si sono ottenute 89 mele dalle quali sono stati estratti 574 semi; mentre da quelli della cv. ‘Galaxy’, impollinati con lo stesso polline, sono state raccolte 108 mele da cui si sono ottenuti 701 semi.

A gennaio 2006 questi semi, precedentemente stratificati e fatti germinare in condizioni appropriate, sono stati messi a dimora in serra e si è avuta una germinazione del 99% circa. Si sono ottenute 1260 piante a partire da 1275 semi: nel dettaglio 700 piantine della popolazione ‘Golden Delicious’ × ‘Murray’ e 560 semenzali di ‘Galaxy’ × ‘Murray’ (Figura 25). Tutte le piantine ottenute dalle impollinazioni manuali effettuate nella primavera del 2005 saranno nel seguito di questo testo chiamate col nome di “Murray2005” per differenziarle dalle piante nominate “Murray2004” che erano già presenti in precedenza presso il Dipartimento di Colture Arboree dell’Università di Bologna.



Figura 25: Foto di insieme delle piantine “Murray2005” ottenute dagli incroci manuali effettuati durante la primavera del 2005 a Cadriano-Bologna.

3.2 POOLING E ISOLAMENTO CLONI POSITIVI

La strategia con cui si effettua il “*pooling*” è molto importante in modo da minimizzare la selezione di cloni sbagliati. Ogni gruppo di cloni che si ottiene è detto “*pool*”. Ogni clone contenente una sequenza di interesse è detto “positivo”.

Per questo lavoro di Dottorato abbiamo ideato un disegno bidimensionale del “*pooling*” con l’idea di diminuire i costi delle reazioni, l’utilizzo di plastiche e di spazio nei freezer -80°C , senza però dimenticare le esigenze di ottenere il minor numero possibile di falsi positivi e falsi negativi.

Poiché la genoteca iniziale era costituita da 96 piastre da 384 pozzetti si è pensato immediatamente di lavorare in piastre da 96 pozzetti posizionando il *pool* di ognuna delle 96 piastre madri in un pozzetto; in tal modo si è reso più agile il lavoro di allestimento delle reazioni di PCR e di caricamento del sequenziatore, riducendo al

minimo gli errori dell'operatore poiché si lavorava in piastre delle stesse dimensioni.

Si sono così ottenute 5 piastre operative da 96 pozzetti contenenti i vari 'pools' o insiemi di cloni BAC, in totale si sono creati 480 *pools* operativi: 96 costituiti da 384 cloni BAC ognuno e 384 *pools* costituiti da 96 cloni BAC. Una piastra denominata "PLATE POOL" permetterà a seguito di PCR di individuare in quale *plate* madre da 384 cloni sia posizionato il clone di interesse. Le altre 4 piastre operative, nominate "A1"- "A2"- "B1" e "B2", indirizzano alla posizione bidimensionale del clone ricercato nella *plate* madre precedentemente individuata tramite analisi del PLATE POOL.

Nel prosieguo del testo sarà usato il termine "piastra" in riferimento alle 5 piastre operative da 96 pozzetti del *pooling*, mentre il termine "*plate*" sarà utilizzato per indicare le piastre madri della genoteca da 384 pozzetti.

A seguito dello screening con la coppia di primer Hi07h02 for/rev sono state individuate 4 *plate* positive nel PLATE POOL contenenti un insieme di cloni che mostravano un picco di amplificazione delle dimensioni attese. Tali dimensioni derivano dal fatto che la genoteca BAC è stata costruita con DNA estratto dalla cultivar Florina, la quale con la coppia di primer Hi07h02 for/rev produce amplificati delle dimensioni di 244 e 255 paia di basi (bp). Quindi per trovare i cloni BAC presunti positivi sono state ricercate le dimensioni corrette in ogni amplificazione. Le 4 *plate* contenenti presumibilmente almeno un clone positivo erano, a seguito del primo screening *via* PCR, la 19 e la 91 con dimensione 244 bp e la 42 e la 56 con dimensione 255 bp (Figura 26).

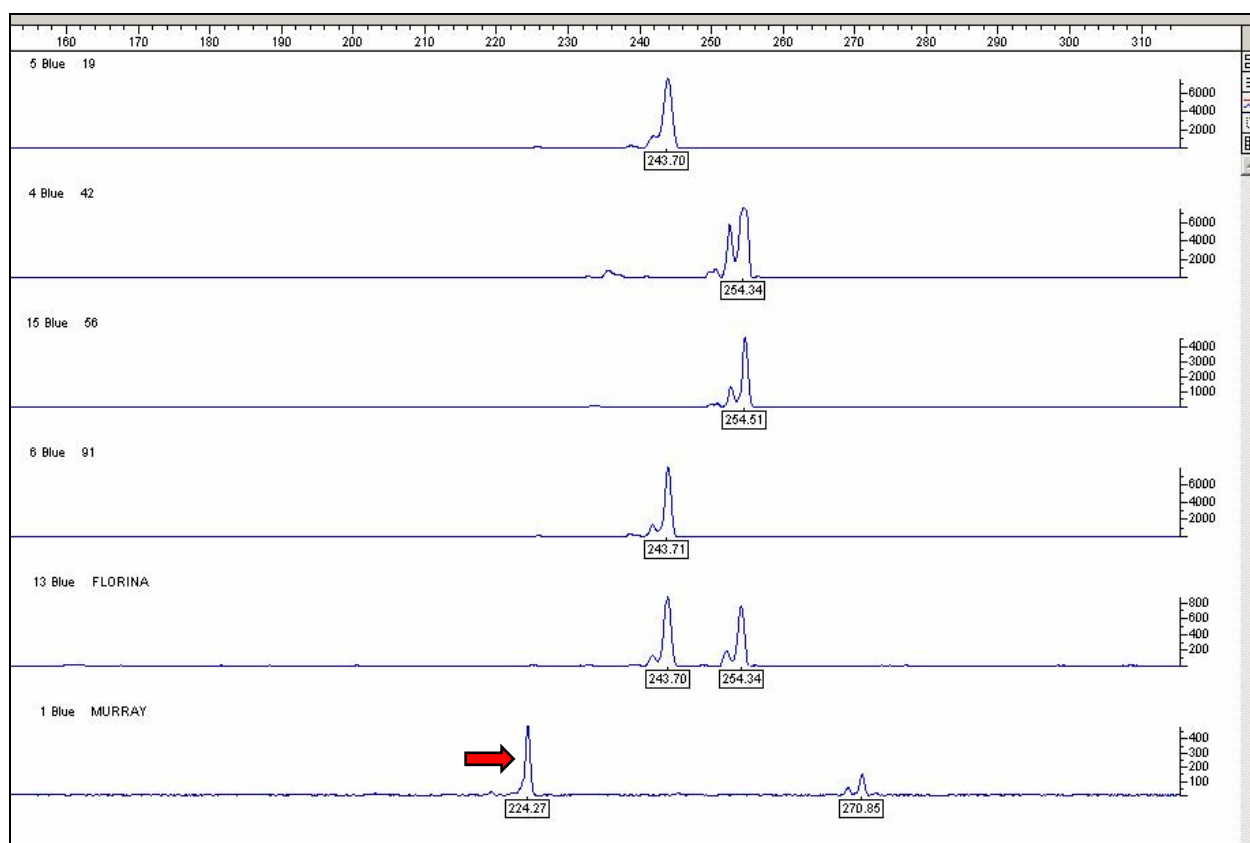


Figura 26: Elettroferogramma capillare prodotto con il marcatore microsatellite Hi07h02 sul *pooling* delle *plate* 19, 42, 56, 91 e delle cultivar ‘Florina’ e ‘Murray’. Come si può notare le *plate* 19 e 91 hanno un picco a 244 bp mentre le *plate* 42 e 56 hanno il picco a 255 bp. ‘Florina’ ha entrambi questi picchi come atteso e ‘Murray’ presenta picchi specifici a 224 bp, normalmente associato alla resistenza a ticchiolatura (freccia), e a 271 bp.

Una volta individuate le *plate* contenenti i BAC positivi si è tentato di isolare i singoli cloni a seguito dello screening delle altre 4 piastre del *pooling* via PCR con lo stesso primer microsatellite Hi07h02.

Si sono ottenute amplificazioni di dimensione attesa in tutte e 4 i *pools*, A1-A2-B1 e B2 come si può visualizzare nella Tabella seguente.

Tabella VI: Posizione bidimensionale dei presunti cloni positivi con le dimensioni degli amplificati e l’altezza di ogni picco.

PLATE	POZZETTO*	DIMENSIONE (bp)	ALTEZZA	PICCO
A1 POOL:	20	244	200	
	86	244	6000	
A2 POOL:	14	255	6000	

	80	255	6000
<u>B1 POOL:</u>	27	244	6000
	85	244	600
<u>B2 POOL:</u>	20	244	100

* I pozzetti sono numerati come sono analizzati dal sequenziatore, cioè in modo sequenziale lungo le singole colonne.

A questo punto sono stati divisi i campioni positivi in funzione della dimensione ottenuta, quindi seguendo la banda a 244 bp sono state individuate le *plate* 19 e 91 dal *PLATE POOL* e i pozzetti: 20-A1, corrispondente alla posizione nella *plate* madre G5; 86-A1, corrispondente a K21; 27-B1, cioè F7; 85-B1, cioè J21 e infine 20-B2, ovvero H6 (Figura 27).

Sono state valutate le altezze dei picchi ottenuti dall'amplificazione e le posizioni relative dei cloni positivi l'uno rispetto all'altro, quindi il campione 85-B1 (J21) dopo altre analisi è stato scartato poiché risulta probabilmente da una contaminazione avutasi durante la creazione dei *pools* operativi stessi, cioè è inferibile sia per la posizione molto vicina alla K21 sia per l'altezza del picco ottenuto che risulta molto bassa rispetto a quella di K21.

Anche i campioni 20-A1 (G5) e 20-B2 (H6) danno un picco molto basso (vedi Tabella VI) e infatti nelle analisi seguenti non è stato possibile isolare alcun frammento di DNA compatibile con la regione d'interesse e sono quindi stati scartati in seguito.

		BANDA 244bp				PIASTRE 19-91																			
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	A																								
A	B	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89												
	C																								
B	D	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90												
	E																								
C	F	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91												
	G																								
D	H	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92												
	I																								
E	J	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93												
	K																								
F	L	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94												
	M																								
G	N	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95												
	O																								
H	P	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96												

probabile contaminazione durante il pooling per gocciolamento dei capillari
 clone positivo

Figura 27: Schema dei risultati dello screening delle piastre A1-A2-B1-B2 del *pooling* riferiti alla dimensione 244 bp. Ad ogni quadratino verde acqua corrisponde un pozzetto del *pool* A1, ad ogni quadratino rosa corrisponde un pozzetto del *pool* A2, ad ogni quadratino bianco corrisponde un pozzetto del *pool* B1 e ad ogni quadratino giallo corrisponde un pozzetto del *pool* B2, come vengono prelevati dalla *plate* madre da 384 pozzetti e riposizionati nella piastra da 96 nello stesso identico ordine spaziale. La numerazione più interna non in grassetto rappresenta la *plate* madre. Ogni quadrato costituito da quattro quadratini invece rappresenta una singola posizione in piastra da 96, indicato anche dalla numerazione in grassetto. I pozzetti colorati in blu sono quelli che indicano cloni positivi (F7 e K21), quelli verdi indicano probabili falsi positivi dovuti verosimilmente a contaminazione.

Sono stati isolati dalla genoteca BAC i seguenti cloni per ulteriori analisi: 19F7-19K21-91F7 e 91K21.

Lo stesso si è fatto seguendo la banda delle 255 paia di basi; quindi le *plate* 42 e 56 risultavano positive insieme ai campioni 14-A2 e 80-A2 (Figura 28).

Sono quindi stati estratti dalla libreria BAC i cloni 42K4-42O20-56K4-56O20.

		BANDA 255bp				PIASTRE 42-56																			
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
	A																								
A	B	1		9		17		25		33		41		49		57		65		73		81		89	
	C																								
B	D	2		10		18		26		34		42		50		58		66		74		82		90	
	E																								
C	F	3		11		19		27		35		43		51		59		67		75		83		91	
	G																								
D	H	4		12		20		28		36		44		52		60		68		76		84		92	
	I																								
E	J	5		13		21		29		37		45		53		61		69		77		85		93	
	K																								
F	L	6		14		22		30		38		46		54		62		70		78		86		94	
	M																								
G	N	7		15		23		31		39		47		55		63		71		79		87		95	
	O																								
H	P	8		16		24		32		40		48		56		64		72		80		88		96	

Figura 28: Schema dei risultati dello screening del *pooling* delle piastre A1-A2-B1-B2 della dimensione 255 bp: come in figura precedente ad ogni colore corrisponde una diversa piastra dei *pool* A1 o A2 o B1 o B2. I pozzetti colorati in blu rappresentano i cloni positivi: qui sono le posizioni K4 e O20.

Si sono quindi allestite reazioni di PCR con Hi07h02 for/rev come innesco per confermare la presenza o meno di un amplificato di dimensione attesa- 244 e 255 bp- nei singoli cloni estratti dalla genoteca.

I cloni BAC che hanno prodotto un amplificato di una delle due dimensioni attese sono stati infine: 19K21-42K4-56O20 e 91F7.

3.3 COSTRUZIONE DEL *CONTIG*

3.3.1 Digestioni ed ibridazioni

I quattro cloni risultati positivi (19K21-42K4-56O20 e 91F7) ed altri ancora incerti (91H6-91G5-19J21) sono stati digeriti con *EcoR* I (Figura 29 a), blottati ed ibridati per valutare se contenessero una regione altamente omologa a quella ricercata. L'ibridazione è stata fatta con una sonda prodotta con gli inneschi Hi07h02 for/rev su DNA di Florina.

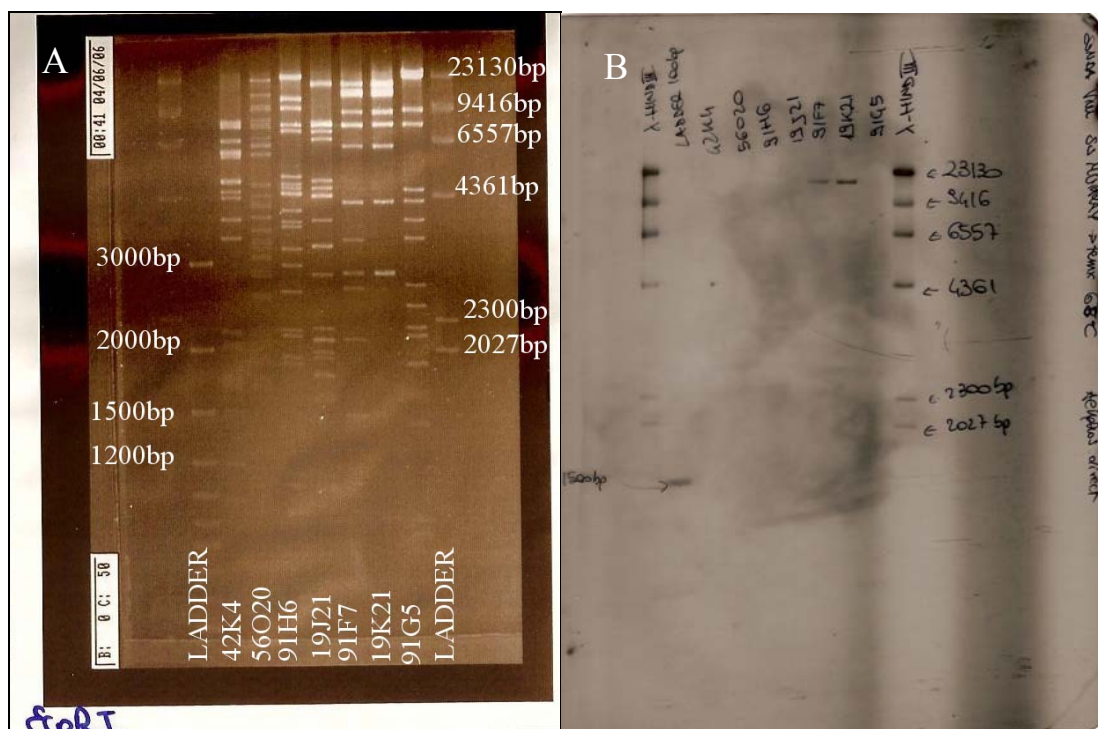


Figura 29: A. Gel di agarosio sottoposto ad elettroforesi contenente digestioni con l'enzima di restrizione *EcoR* I dei cloni BAC che danno un segnale di amplificazione *via* PCR con i primer Hi07h02 for/rev. B. Ibridazione del filtro ottenuto dal gel in figura 29 A con sonda specifica prodotta su DNA della cultivar 'Murray' utilizzando inneschi che amplificano l'intera sequenza sulla quale è localizzato il marcatore Hi07h02.

Solo i cloni 19K21 e 91F7 hanno mostrato un bel segnale a seguito di ibridazione in condizioni altamente stringenti. Anche il clone 42K4 ha mostrato una piccola "ombra" di ibridazione nelle stesse condizioni. Le temperature dei lavaggi post ibridazione sono state progressivamente aumentate; nel caso illustrato in Figura 29 b fino alla temperatura di circa 68°C, a partire dai 55°C indicati nel kit utilizzato, poiché la regione su cui si preparata la sonda è multilocus e quindi produceva ibridazioni aspecifiche qualora venissero utilizzate temperature inferiori.

Infine per valutare le dimensioni dell'inserto nei vari BAC isolati si è proceduto alla digestione con *Not* I dei cloni presunti positivi.

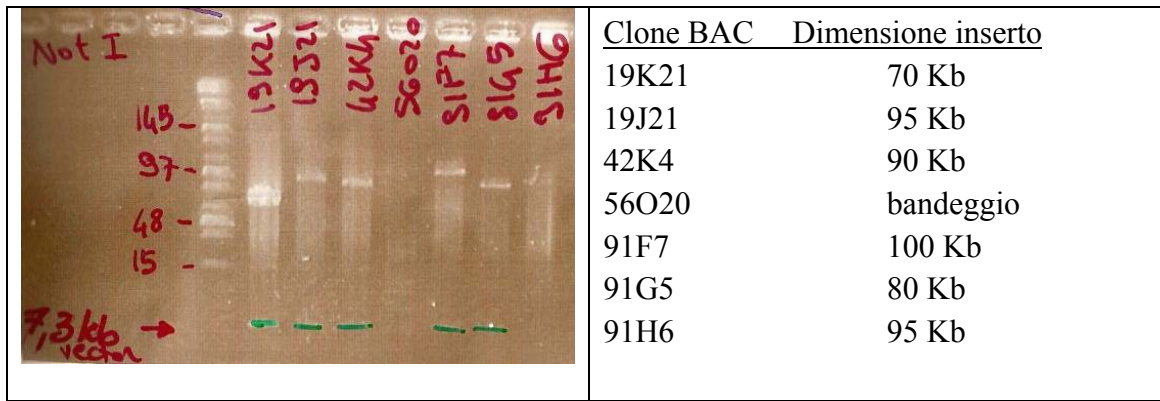


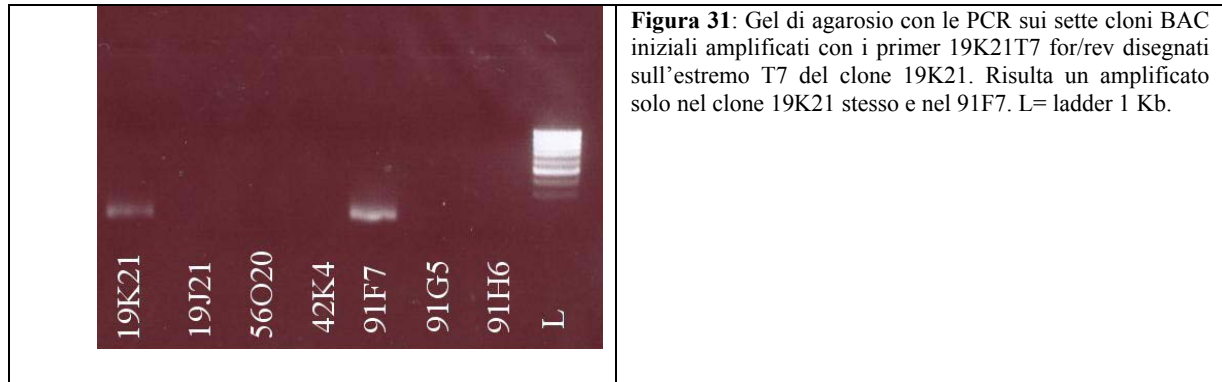
Figura 30: Gel d'agarosio sottoposto ad elettroforesi pulsata di campioni contenenti digestioni con l'enzima di restrizione *Not I* sui cloni presunti positivi al fine di valutare le dimensioni dell'inserto nei singoli cloni.

Dal gel di Figura 30 si ottengono le dimensioni degli inserti dei diversi cloni BAC sottoposti a digestione con l'enzima di restrizione *NotI*. Valutando le dimensioni degli inserti dei due cloni risultati positivi a seguito dell'ibridazione di Figura 29 b, si nota che l'inserto del clone 19K21 è più corto rispetto a quello presente nel clone 91F7. Il 19K21 risulta quindi essere un subclone del 91F7, come si può anche dedurre dalla presenza di molte bande comuni e di alcune in soprannumero presenti nel clone 91F7 ottenute nel gel con la digestione con *EcoR I* presentato in Figura 29 a.

3.3.2 BAC END sequencing e creazione del contig iniziale

Le BAC-ENDs di ognuno dei 7 cloni BAC precedenti sono state sequenziate a partire dagli inneschi specifici Sp6 e T7 che permettono di ottenere sequenze degli estremi dei BAC. Le sequenze ottenute dalle estremità dei cloni servono per poter disegnare inneschi specifici utili per identificare su quali cloni BAC ogni singola BAC-END produca un amplificato *via* PCR. Di conseguenza si può dedurre quale clone abbia una sequenza comune ad un altro o meno. In Figura 31, ad esempio, è riportata l'amplificazione sui 7 cloni BAC estratti dalla genoteca con una coppia di primer disegnata su una BAC-ENDs: in questo caso si tratta dell'estremo T7 del clone 19K21. Come si può notare si ottiene un amplificato solo nei cloni 91F7 e 19K21 stesso su cui è stata disegnata la coppia di primer, ciò indica che solo questi due cloni contengono

questa sequenza. Lo stesso è stato fatto per tutte le coppie di primer disegnate sulle BAC-ENDs senza ottenere altre indicazioni utili.



Questi dati sono stati poi confermati attraverso ibridazione con sonde specifiche ottenute anch'esse utilizzando i primer disegnati sulle BAC-ENDs usati per la precedente analisi *via* PCR. Utilizzando una sonda preparata con gli inneschi 91F7Sp6 f/r e anche con Hi07h02 f/r si ottengono due bande di ibridazione sugli stessi cloni 19K21 e 91F7 (Figura 32 a e c, rispettivamente), mentre usando una sonda preparata sull'estremo 91F7T7 si ottiene una bella banda di ibridazione solo sul clone 91F7 (Figura 32 b).

Quindi i due cloni si sovrappongono all'estremo 91F7Sp6 ma non all'estremo 91F7T7 e hanno in comune anche il frammento di DNA che contiene il marcatore Hi07h02.

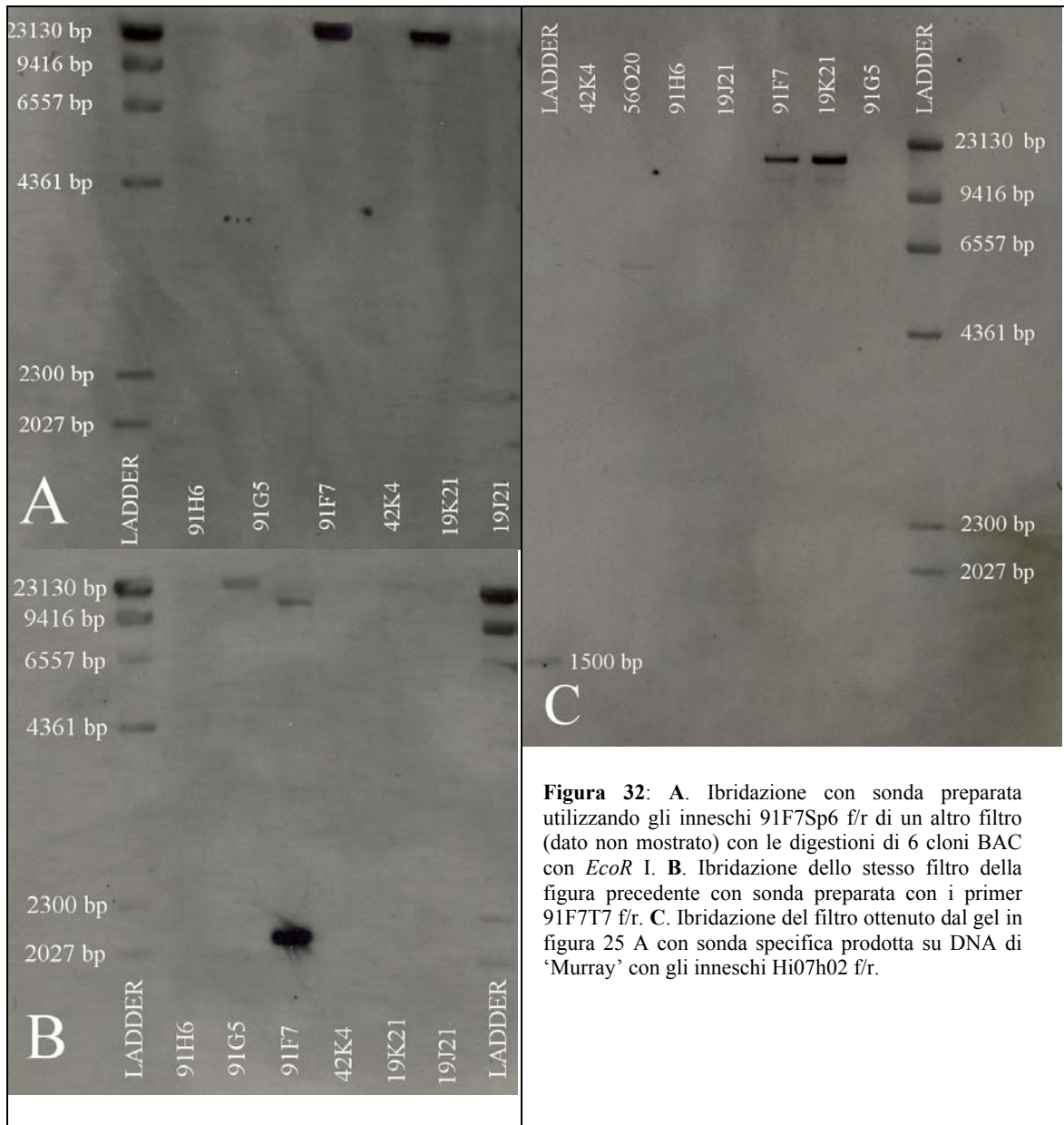


Figura 32: **A.** Ibridazione con sonda preparata utilizzando gli inneschi 91F7Sp6 f/r di un altro filtro (dato non mostrato) con le digestioni di 6 cloni BAC con *EcoR* I. **B.** Ibridazione dello stesso filtro della figura precedente con sonda preparata con i primer 91F7T7 f/r. **C.** Ibridazione del filtro ottenuto dal gel in figura 25 A con sonda specifica prodotta su DNA di 'Murray' con gli inneschi Hi07h02 f/r.

A seguito di sequenziamento l'estremo Sp6 di entrambi i cloni risulta essere identico e perfettamente allineabile (Figura 33 a b) confermando l'ipotesi che 19K21 sia un subclone del 91F7, come precedentemente postulato.

91f7sp6	2	ACAAAGTATTTGCACTTATAGCATGGGCTCTTAAATCCACCAAAATGAGAAAAATATAAT	61
19k21sp6	310	ACAAAGTATTTGCACTTATAGCATGGGCTCTTAAATCCACCAAAATGAGAAAAATATAAT	251
91f7sp6	62	AGCACAAGGATCTTCATCAAGAAAAGGGATTCAAAGTCCAGCAGTTGTACCTTCAGGTCA	121
19k21sp6	250	AGCACAAGGATCTTCATCAAGAAAAGGGATTCAAAGTCCAGCAGTTGTACCTTCAGGTCA	191
91f7sp6	122	CTGAATGTCTCAGTGGCAGCAAAGCGCACAGAAATGGGGAAAAATACAGATGGGTCTGCT	181
19k21sp6	190	CTGAATGTCTCAGTGGCAGCAAAGCGCACAGAAATGGGGAAAAATACAGATGGGTCTGCT	131

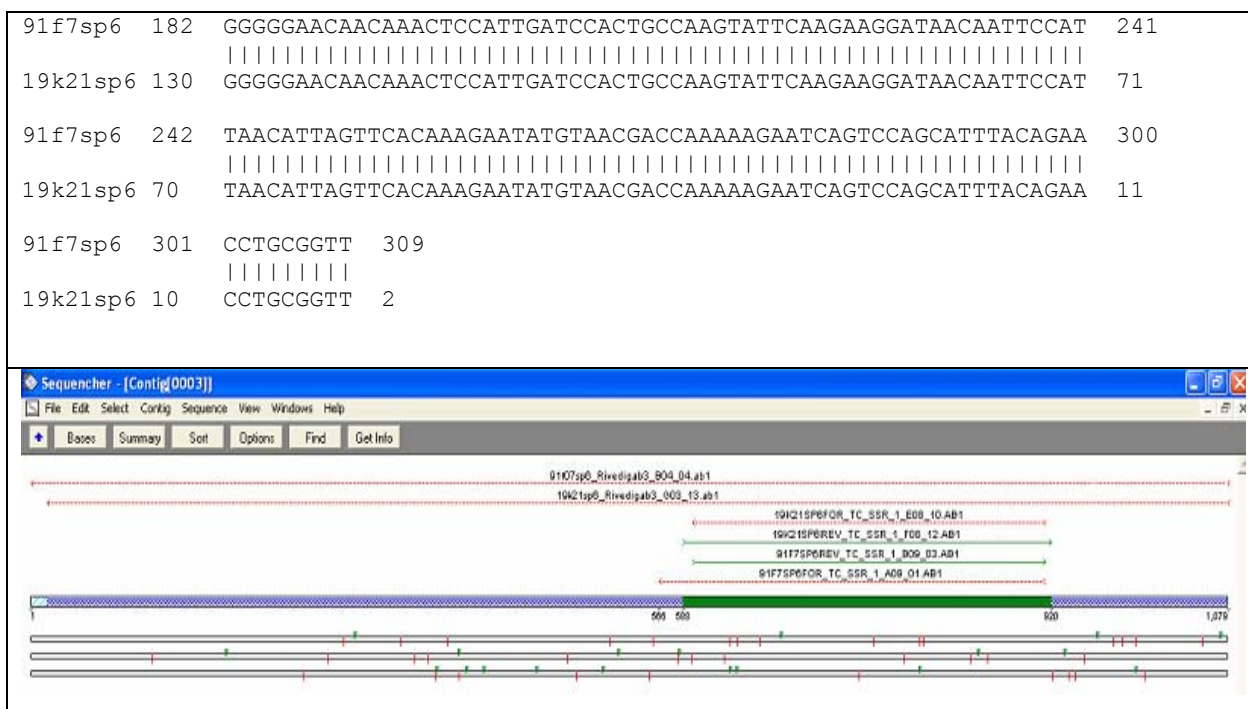


Figura 33: Allineamento delle sequenze degli estremi Sp6 dei cloni 19K21 e 91F7. **A.** Le due sequenze risultano identiche allineate con il software on line Clustal W. **B.** Allineamento delle stesse sequenze con il software Sequencer.

Da questi risultati si è quindi costruito un *contig* contenente l'allele di 244 bp del microsatellite Hi07h02 formato dai 2 cloni BAC 19K21 e 91F7 (Figura 34).

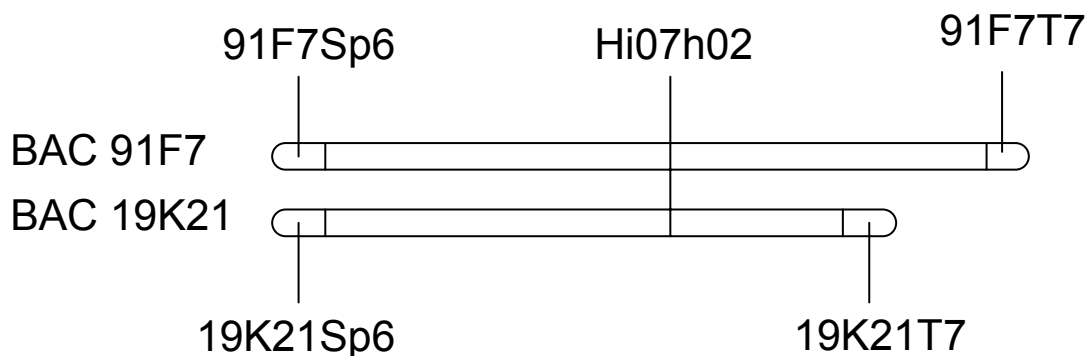


Figura 34: *Contig* costituito da due cloni BAC, 19K21 e 91F7, che si sovrappongono per gran parte della loro lunghezza.

Mentre per quanto riguarda l'altro allele, quello con dimensione 255 bp, al momento è presente un solo putativo clone cioè il 42K4 in quanto il 56O20 è stato eliminato dalle analisi poiché produce uno strano bandeggio sia in digestione con *Not I* sia con *EcoR I* e quindi è probabilmente un inquinamento.

'Delicious' × 'Murray' che 'Galaxy' × 'Murray', cosegrega con la resistenza a ticchiolatura causata dalla presenza del gene *Vm*.



Figura 36: Gel di acrilammide per valutare il polimorfismo di coppie di primer microsatelliti disegnati sull'estremo 91F7T7. E' stato riscontrato un buon polimorfismo pulito e facile da seguire. Le frecce mostrano che la banda indicata è presente solo nel parentale Murray che porta il gene di resistenza *Vm* e nelle progenie resistenti, sia della popolazione 'Golden Delicious' × 'Murray' sia di 'Galaxy' × 'Murray', mentre è assente nei genotipi fenotipizzati come sensibili a seguito di inoculo con *V. inaequalis*.

Alla fine delle diverse combinazioni di primer disegnate sull' estremo 91F7T7 si è scelto di utilizzare quella che amplificava tutti e tre i microsatelliti insieme poiché dava picchi più puliti al sequenziatore automatico.

Questo nuovo marcatore microsatellite è stato valutato come 'presenza' della banda a 416 paia di basi nella cv. 'Murray' e nei genotipi resistenti e 'assenza' nelle cv. 'Gala' e 'Golden D.', utilizzate come parentali delle popolazioni "Murray2005", e nei genotipi sensibili (Figura 37); quindi ai fini del mappaggio si è utilizzata una segregazione di tipo <nnxnp>, dove 'nn' è assenza del frammento nel genotipo materno e 'np' è presenza del frammento in quello paterno.

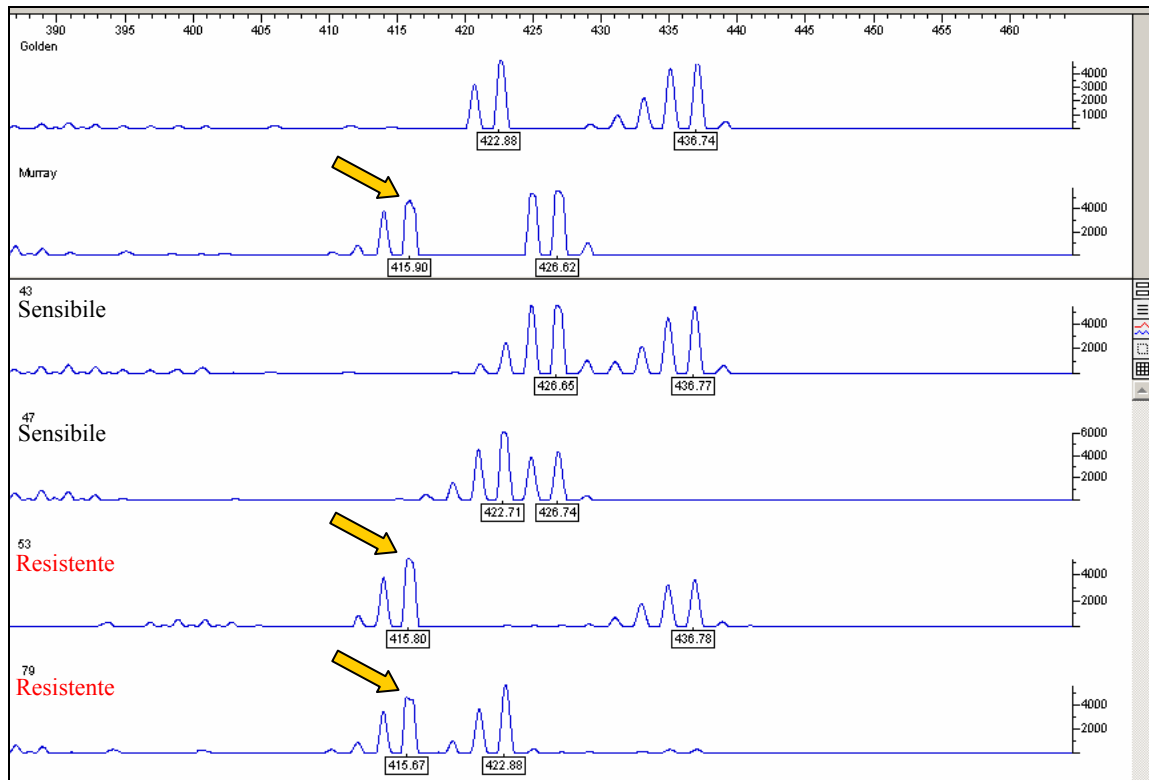


Figura 37: Elettroferogrammi ottenuti con i primer 91F7T7 sugli individui della popolazione ‘Golden Delicious’ × ‘Murray’. Dall’alto sono mostrati: i due parentali, ‘Golden Delicious’, sensibile a ticchiolatura, e ‘Murray’, resistente, ed i quattro esempi di segregazione del carattere. La banda associata alla resistenza è quella di dimensione 416 paia di basi, indicata nel disegno con una freccia, presente in ‘Murray’ e negli ultimi due genotipi mostrati in figura.

Si sono utilizzate due popolazioni per effettuare il mappaggio di questo microsatellite al fine di confermare l’effettiva localizzazione del nuovo marcatore. La prima popolazione utilizzata è stata ‘Golden Delicious’ × ‘Murray’, già utilizzata nello studio effettuato da Patocchi et al. nel 2005. Per ottenere una posizione di mappa il più possibile veritiera si è costruita una minimappa del cromosoma 17 di ‘Murray’ posizionando inizialmente i diversi microsatelliti già presenti in letteratura. Si è partiti dai marcatori più strettamente associati alla resistenza, come Hi07h02 (Patocchi et al., 2005) e OPB12 (Cheng et al., 1998), fino ad arrivare a coprire una distanza genetica di circa 36 cM dalla resistenza con il Hi02f12 (Silfverberg-Dilworth et al., 2006) e il CH04f08 (Tartarini, comunicazione personale), a cui si è aggiunto con successo il nuovo 91F7T7 (Figura 38 a).

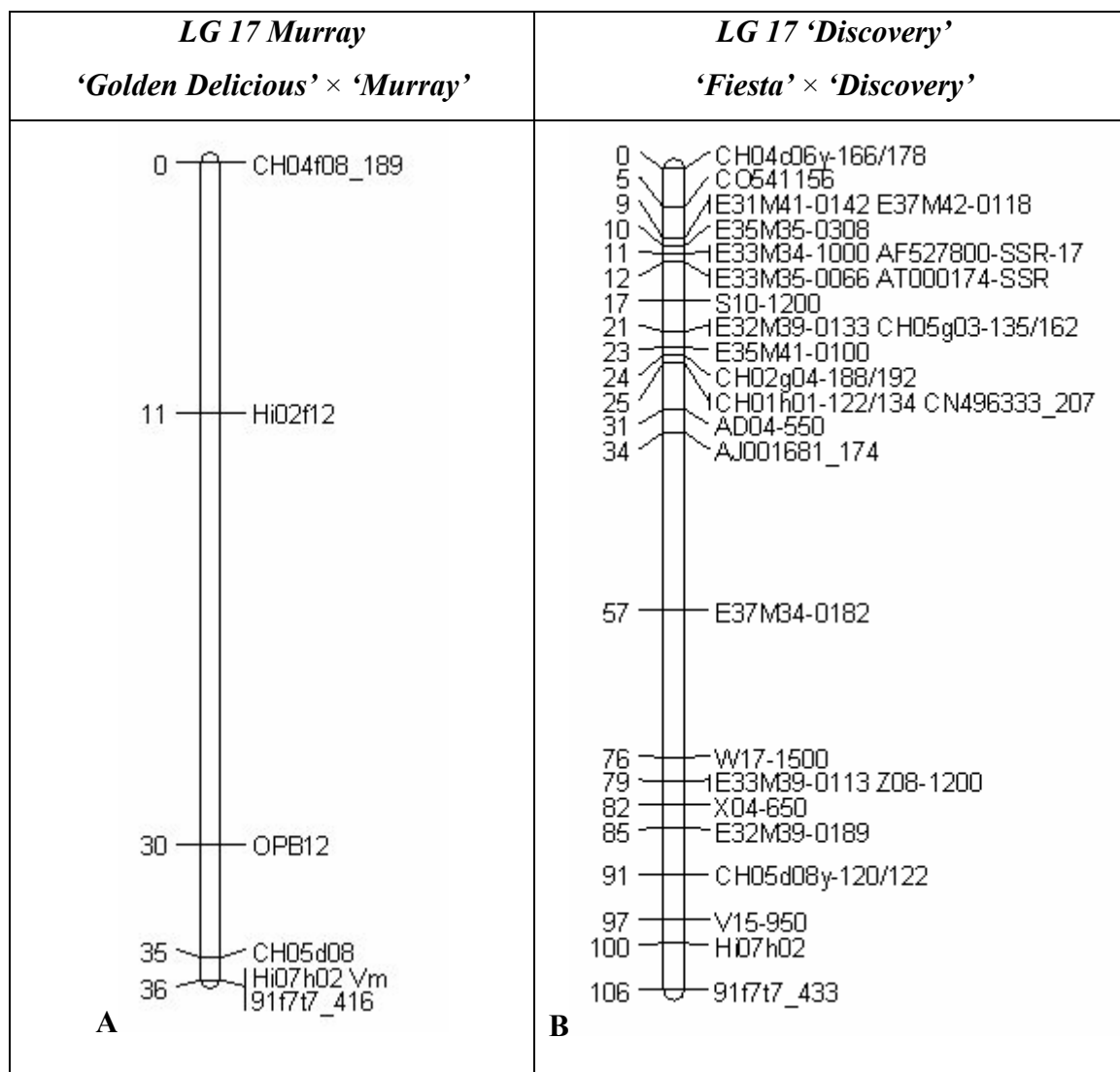


Figura 38: **A.** Minimappa del cromosoma 17 di Murray ottenuta utilizzando la popolazione segregante 'Golden Delicious' × 'Murray'. **B.** Mappa del LG 17 di 'Discovery' ottenuta usando la popolazione segregante 'Fiesta' × 'Discovery' (Liebhard et al., 2003; Silfverberg-Dilworth et al., 2006).

Utilizzando una popolazione di dimensioni ristrette (circa 96 individui) e non disponendo di una mappa satura della stessa si è preferito avere una controprova del corretto posizionamento del microsatellite 91F7T7 mappandolo anche su un'altra popolazione della quale fosse presente una mappa di associazione ben satura. Lo stesso microsatellite è stato quindi mappato anche nella mappa di riferimento del melo 'Fiesta' × 'Discovery' (Liebhard et al., 2003; Silfverberg-Dilworth et al., 2006) nella stessa posizione distale rispetto al marcatore Hi07h02, confermando il corretto posizionamento in mappa precedentemente effettuato sul LG 17 della cv. 'Murray'.

3.5 SCREENING DEL *POOLING* DELLA BAC DI FLORINA CON IL NUOVO MARCATORE MICROSATELLITE 91F7T7.

Il marcatore 91F7T7, che è stato utilizzato per un nuovo step di *Chromosome walking* sul *pooling* della genoteca BAC di 'Florina', ha prodotto molti cloni presunti positivi a seguito del primo screening con questa coppia di primer poiché essa probabilmente amplifica una regione multilocus. In effetti dalla letteratura si apprende che la parte distale del LG17 è duplicata nella parte iniziale del LG9 (Liebhard et al., 2003) ciò si deduce anche dalla presenza di marcatori microsatelliti che mappano in entrambi i loci come ad esempio il CH05d08. Anche il marcatore Hi07h02 è probabilmente multilocus ma per ora è stato mappato solo nel LG17. E' stato molto difficile identificare i cloni giusti da questo secondo step di *Chromosome walking* proprio per la natura multilocus di tale regione. Nello screening di una genoteca è vantaggioso usare sonde di DNA che risultino a singola copia nel genoma altrimenti è possibile identificare cloni diversi che però appartengono ad altre regioni genomiche. In questo lavoro, proprio il fatto che stessimo lavorando su una regione "multilocus", cioè regioni ripetute in posizioni diverse del genoma, ha causato alcuni problemi durante la fase di screening della libreria BAC. Più volte sono stati rianalizzati i dati e sono stati scelti nuovi cloni che dessero una "dimensione" opportuna a seguito di PCR con il nuovo marker. Alla fine si è deciso di optare per una selezione un po' empirica ma risolutiva: tra tutti gli elettroferogrammi che davano una dimensione attesa sono stati scelti quelli che visivamente producevano una curva più simile a quella che si ottiene sulla cv. 'Murray' (resistente) utilizzando la stessa coppia di primer. In tal modo si sono isolati 3 cloni che sono stati sottoposti a sequenziamento con i primer 91F7T7 forward o reverse al fine di trovare una sequenza omologa al 91F7T7. Un solo clone ha prodotto una sequenza leggibile che mostrava una buona identità anche se non del 100%: il 55A5 (Figura 39).


```

91f7          CCGCATTTCTACCGTGCCTGTGATCGAACCGGCCAAGACTCAAGACTCAAAGTTAATAA 180
55a5-91f7t7  CCGCATTTCTACCGTGCCTGTGATCGAACCGGCCAAGACTCAAGACTCAAAGTTAATAA 172
42k4-91f7t7  CCGCnTTTCTACCGTGCCTGTGATCGAACCGGCCAAGACTCAAGACTCAAAGTTAATAA 172
*****
91f7          ATAATTAGTATTAATAATTCTAGTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGGGAGAGAGACATCTTCCAC 240
55a5-91f7t7  ATAATTAGTATTAATAATTCTAGTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGGGAGAGAGACATCTTCCAC 232
42k4-91f7t7  ATAATTAGTATTAATAATTCTAGTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGACATCTTCCAC 232
*****
91f7          GGCACAAACATACAAATCCTTCACTTGTTTATATATATATATATATATTTAATCTGAAGTTG 300
55a5-91f7t7  GGCACAAACATACAAATCCTTCACTTGTTTATATATATATATATAT--TTAATCTGAAGTTG 290
42k4-91f7t7  GGCACAAACACACAAATCCTTCACTTGTTTATATATATATATATAT--TTAATCT----- 279
*****

```

Figura 40: Allineamento di sequenze prodotte con il primer 91F7T7 for sui cloni BAC 91F7, 55A5 e 42K4 della genoteca di Florina. Le sequenze mostrano come il 55A5 e il 42K4 abbiano 4 ripetizioni GA e una TA in meno.

Dall'allineamento delle sequenze ottenute sul 42K4 e il 55A5 con il primer 91F7T7 for (Figura 40) si può capire che in effetti i 2 cloni siano sovrapponibili e sull'altro allele rispetto al *contig* 91F7-19K21, come previsto.

3.6 ISOLAMENTO MICROSATELLITI SULLE BAC ENDS E MAPPAGGIO DEL MICROSATELLITE 55A5Sp6: NUOVO *CONTIG* E RICOMBINANTI.

Le BAC-ENDS dei 3 cloni ottenuti dal secondo step di *Chromosome walking* sulla genoteca BAC di Florina sono state sequenziate. Su ognuna di esse è stata disegnata una coppia di primer per valutare se i vari cloni fossero sovrapponibili l'uno con l'altro e con il *contig* precedentemente assemblato.

Solo il 55A5 amplificava con primer disegnati nella regione d'interesse. Dal gel mostrato nella figura seguente (Figura 41) si può notare come il clone 55A5 non contenga regioni di omologia con il clone 19K21, mentre produce una bella amplificazione con i primer disegnati sul clone 91F7.

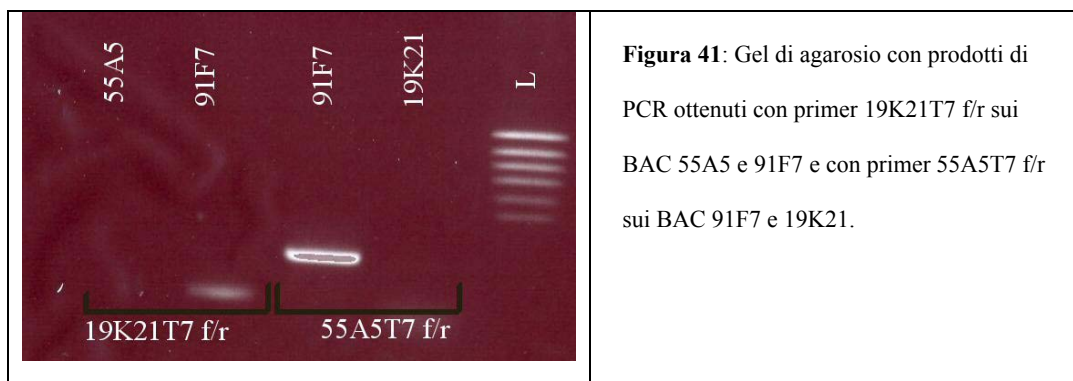
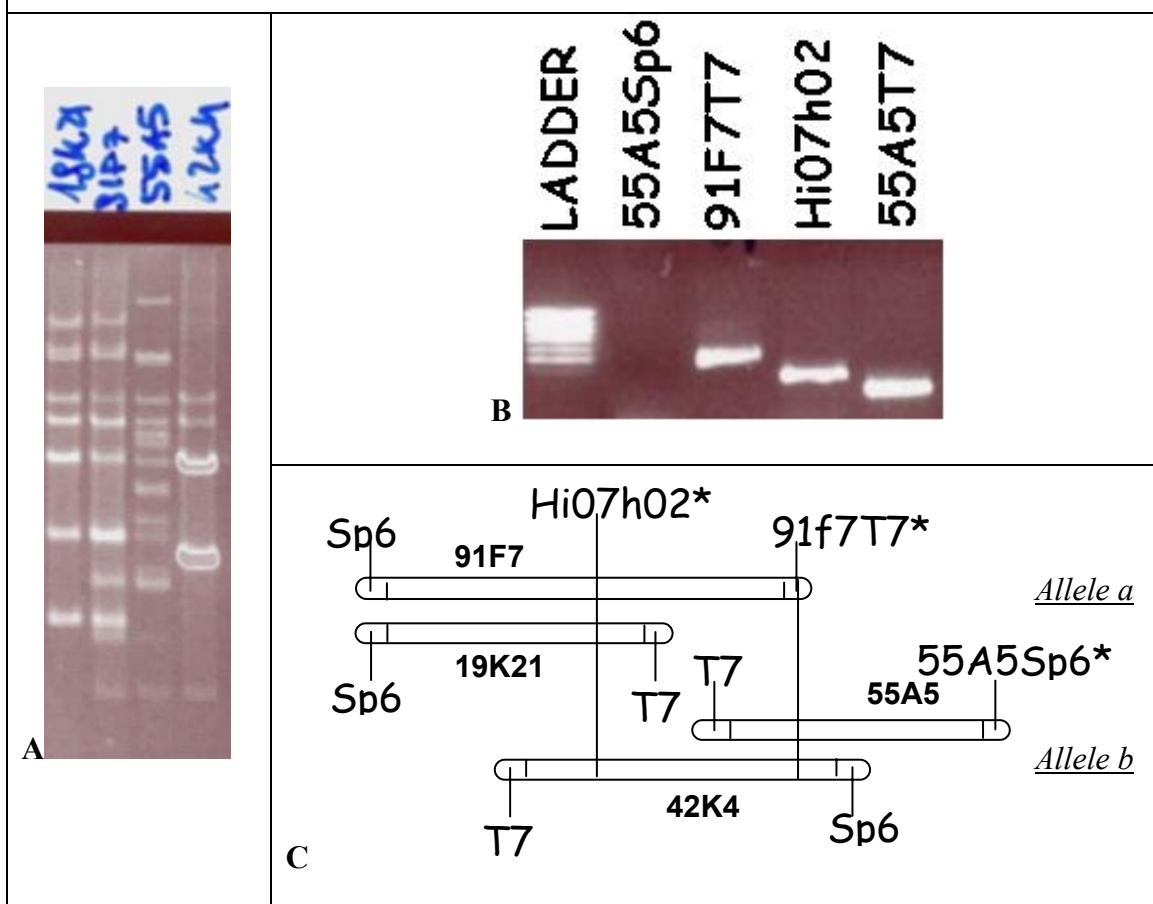


Figura 41: Gel di agarosio con prodotti di PCR ottenuti con primer 19K21T7 f/r sui BAC 55A5 e 91F7 e con primer 55A5T7 f/r sui BAC 91F7 e 19K21.

Anche a seguito di digestione con l'enzima di restrizione *EcoR* I (Figura 42 a) si può pensare che il 55A5 prolunghi il *contig* precedente sull'altro allele insieme al 42K4. In Figura 42 b è presentato un gel che mostra come il clone BAC 42K4 abbia regioni di omologia con gli estremi 91F7T7, 55A5T7 e il marcatore Hi07h02 ma non con l'estremo 55A5Sp6. Valutando i dati alla luce di questi nuovi risultati si è costruito un *contig* di entrambi gli alleli (Figura 42 c).

Figura 42: A. Digestione con l'enzima di restrizione *EcoR* I dei BAC della regione del gene di resistenza a ticchiolatura *Vm*.
 B. Reazione di PCR sul clone BAC 42K4 con i primer della regione del *Vm* per creare il *contig* dell'altro allele di Florina.
 C. *Contig* dei due alleli: uno costituito da 91F7 e 19K21; l'altro contenente i cloni BAC 42K4 e 55A5. Gli asterischi indicano la presenza di microsatelliti polimorfici.



Nell'estremità 55A5T7 sono presenti molte ripetizioni che potrebbero dare un utile polimorfismo ma purtroppo per ora non sono stati prodotti primer utili a tal fine. Sulla BAC-END 55A5Sp6 è presente un microsatellite imperfetto che ha mostrato polimorfismo nella popolazione 'Golden Delicious' × 'Murray'. Anche in tal caso è stato valutato come "presenza" in 'Murray' e "assenza" in 'Golden Delicious' (Figura 43).

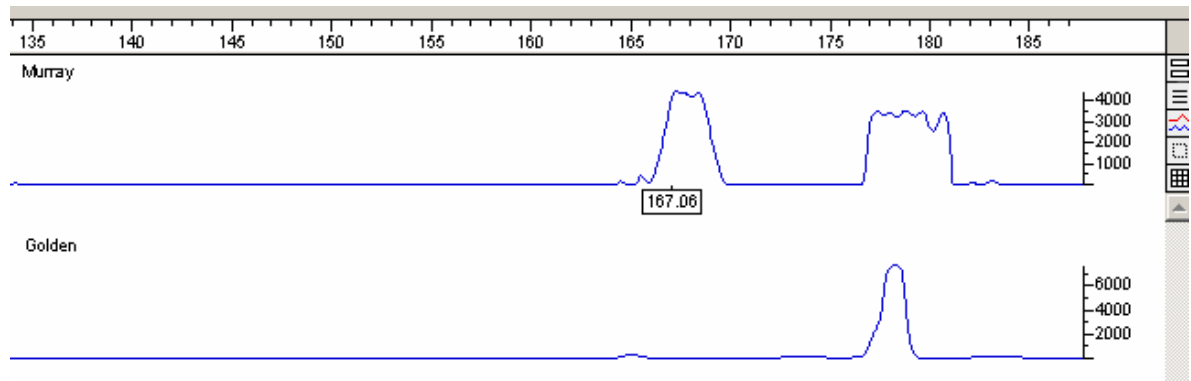


Figura 43: Elettroferogramma ottenuto su 'Murray' e 'Golden' con i primer 55A5Sp6.

Il nuovo marcatore microsatellite 55A5Sp6 è stato quindi mappato (Figura 44) in posizione distale al 91F7T7. Questo risultato era atteso, poiché il clone 55A5 è stato isolato nel secondo step di *Chromosome walking* effettuato a partire dal microsatellite 91F7T7.

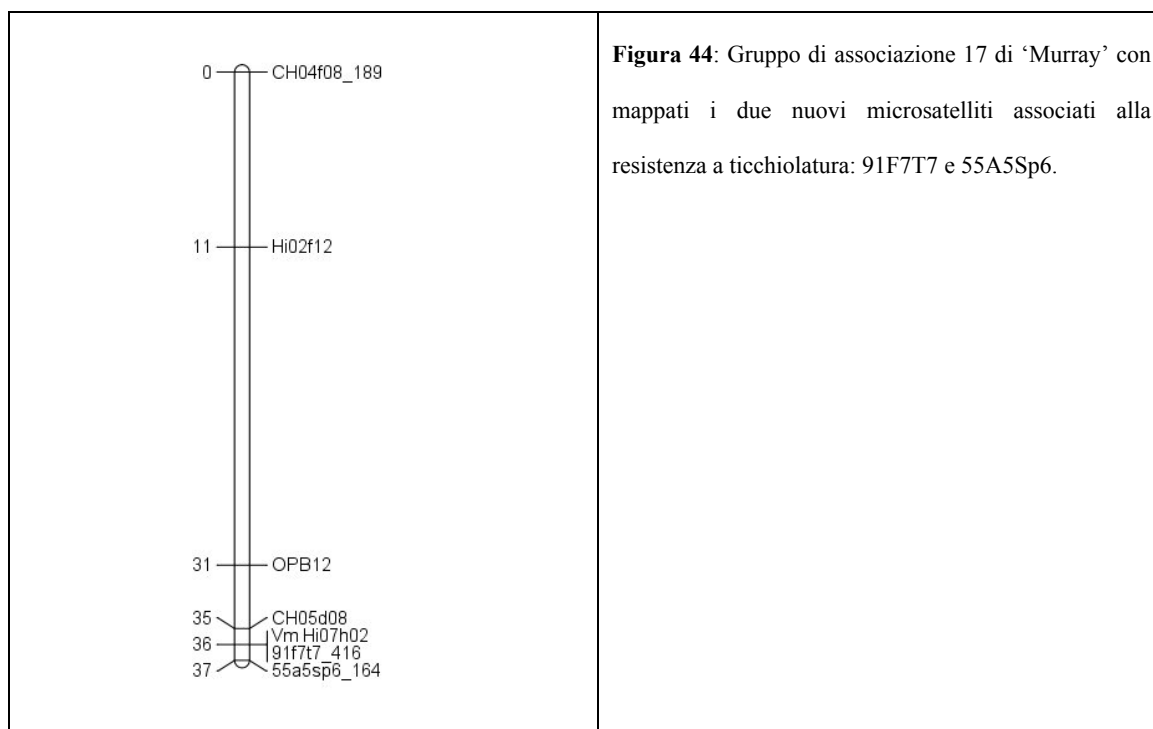


Figura 44: Gruppo di associazione 17 di ‘Murray’ con mappati i due nuovi microsatelliti associati alla resistenza a ticchiolatura: 91F7T7 e 55A5Sp6.

3.7 FENOTIPIZZAZIONE E GENOTIPIZZAZIONE DELLE POPOLAZIONI E NUMERO DI RICOMBINANTI

3.7.1. Caratterizzazione fenotipica delle popolazioni “MURRAY2004” e “MURRAY2005”

Tutte le piante delle popolazioni “Murray2004” e “Murray2005” sono state infettate con ticchiolatura come descritto precedentemente e i sintomi sono stati attentamente valutati (Tabella VII).

Tabella VII: Rilievi fenotipici sulle popolazioni “Murray2004”

Murray2004	tot	res	sens	geni	SENS		RES		HR
					classe4	classe3b	classe3a	classe2	classe1
Murray x PI172612	29	20	9	Va	P1-9	/	P10-19	P20-29	/
Durello x Murray	16	nc	nc	Vd	nc	nc	nc	nc	nc
Harmonie x Murray	164	144	20	Vf	H1-20	H21-42	H43-56	H57-164	
GoldRush x Murray	50	42	5	Vf	GR2-6	GR7-16		GR45-47	GR17-44
Murray x Realka	63	58	8	Vr	R1-8	/	R9-15 R21-63	R16-20	/
Golden B x Murray	116	64	52	/	GB1-52	/	GB53-116	/	/
Royal Gala x Murray	14	9	5	/	RG1-5	/	RG6	/	RG7-14
Mondial Gala x Murray	8	8	0	/	/	/	/	/	M1-8
Braeburn x Murray	6	nc	nc	/	nc	nc	nc	nc	nc
Fiesta x Murray	19	nc	nc	/	nc	nc	nc	nc	nc

nc=non classificato

Le popolazioni ‘Fiesta’ × ‘Murray’, ‘Braeburn’ × ‘Murray’ e ‘Durello’ × ‘Murray’ non sono state correttamente fenotipizzate. Le popolazioni ottenute incrociando ‘Murray’ con ‘PI172612’, ‘Realka’ e ‘Durello’ contengono anche altri geni di resistenza oltre al *Vm* per cui al momento non sono ancora disponibili marcatori strettamente associati al carattere e quindi risultava arduo il discernere tra la resistenza procurata dal gene *Vm* o dall’altro presente in queste popolazioni e individuare il corretto numero di piante ricombinanti. Per le popolazioni ottenute incrociando ‘Murray’ con ‘GoldRush’ o ‘Harmonie’ per valutare l’apporto del gene *Vm* sono stati utilizzati i marcatori microsatelliti associati al gene *Vf* CHVf1 e ChVf2 (Liebhard et al, 2003). In ogni caso tutte le popolazioni presenti presso il DCA-BO che non avessero altri geni di resistenza piramidati, tranne la ‘Golden B’ × ‘Murray’, erano di dimensioni troppo ridotte per poter essere rappresentative di un campione statistico e in tutte si può notare una preponderanza di piante resistenti forse a causa di ‘selezioni’, effettuate in campo da operatori in tempi passati, a cui oggi è difficile poter risalire. Quindi nel conteggio finale del numero di piante sensibili o resistenti, per ovviare sia al basso numero di piante negli incroci, sia alla presenza di altri geni di resistenza che potessero causare erronee interpretazioni dei dati, si è deciso di utilizzare solo la popolazione ‘Golden B’ × ‘Murray’.

Tabella VIII: Rilievi fenotipici sulle popolazioni “Murray2005”

	SENS	RES	
Murray2005	classe4	classe1	totale
Golden Delicious x Murray	228	332	560
Galaxy x Murray	323	377	700
	551	709	1260

Anche nelle due popolazioni “Murray2005” si è notata comunque una preponderanza di piante resistenti sul totale come si vede in Tabella VIII.

Tabella IX: Insieme dei rilievi fenotipici sulle popolazioni del 2004 e 2005

	SENS	RES	
Murray2005	classe4	Classe1	totale
Golden Delicious x Murray	228	332	560
Galaxy x Murray	323	377	700
Murray2004	classe4	Classe1	totale
Golden B x Murray	52	64	116
	603	773	1376

Infine sommando i risultati della fenotipizzazione delle popolazioni “Murray2005” e ‘Golden B’ × ‘Murray’ del 2004 (Tabella IX) si ottiene che su 1376 piante considerate 603 risultano sensibili (56,2%) e 773 resistenti (43,8%).

3.7.2. Caratterizzazione genotipica con i markers SSRs più strettamente associati alla resistenza e numero di ricombinanti

Una volta certi che i nuovi marcatori trovati andassero a posizionarsi nel LG 17 adiacenti al marcatore Hi07h02 con il quale si è iniziato il *Chromosome walking* sulla genoteca BAC di ‘Florina’ si è passati alla genotipizzazione di tutte le piante delle popolazioni “Murray2004” e “Murray2005” sia con il marcatore Hi07h02 sia con il 91F7T7 e il 55A5Sp6.

I dati fenotipici e quelli genotipici sono stati poi confrontati alla ricerca di presunti ricombinanti che dessero indicazione della distanza genetica dei marcatori utilizzati dal gene di resistenza *Vm* (Tabella X).

Tabella X: Schema riassuntivo degli eventi di ricombinazione osservati.

n° ricombinanti	Hi07h02	Fenotipo	91F7T7	55A5Sp6
6	S	R	R	R
1	R	S	S	S
5	S	S	S	R
1	R	R	R	S
da rivalutare 1	R	?	S	S
da rivalutare 5	S	?	R	R

Sei piante, che hanno banda resistente per il marcatore Hi07h02 ma mostrano la banda associata alla sensibilità per i marcatori 91F7T7 e 55A5Sp6 o viceversa, risultano dubbie dal punto di vista della fenotipizzazione poiché si tratta di piante piccole o di piante per le quali non è finora stato possibile riverificare il grado di resistenza in campo. Per cinque di queste sei piante (una è morta durante l'inverno) sono state prelevate le marze, per quelle di taglia normale, o l'intera pianta, per quelle nane e saranno rivalutate in serra durante la prossima primavera-estate. Eliminando dal conteggio queste sei piante, il numero di ricombinanti ottenuti su 1260 piante valutate della popolazione "Murray2005" è di 7 con il marcatore Hi07h02 e zero con il 91F7T7. Ciò significa che da una distanza genetica pari a circa un centimorgan del marcatore Hi07h02 rispetto al gene *Vm* stimata da Patocchi nel 2005 oggi possiamo ridurla a circa mezzo centimorgan. Inoltre con l'identificazione e il mappaggio del marcatore microsatellite 91F7T7 ci siamo avvicinati sostanzialmente al gene di resistenza fino ad arrivare all'eliminazione delle discrepanze tra genotipo e fenotipo indicate dalla presenza di ricombinanti.

Con il marcatore 55A5Sp6 sono state analizzate tutte le piante "Murray2004" e "Murray2005" e si sono ottenuti 6 ricombinanti pari ad una distanza genetica di circa 0.48 cM (Figura 45). Il fatto che non ci siano ricombinanti per il marcatore 91F7T7 e che i ricombinanti trovati con il marcatore 55A5Sp6 siano diversi da quelli trovati con il marker Hi07h02 dimostra che il gene *Vm* di resistenza a ticchiolatura è quasi certamente contenuto nel frammento di DNA presente tra i marcatori Hi07h02 e 91F7T7, nonostante la mancata fenotipizzazione di 6 ricombinanti (Tabella XI) poiché come si vede dalla tabella X in tutti e 6 i casi si ha ricombinazione tra i marcatori Hi07h02 e 91F7T7.

Tabella XI: Ricombinanti e distanze dal gene *Vm* (senza le 6 piante con fenotipizzazione dubbia).

	RICOMBINANTI	cM dal <i>Vm</i>
Hi07h02	7	0.56
91f7T7	0	0
55a5sp6	6	0.48

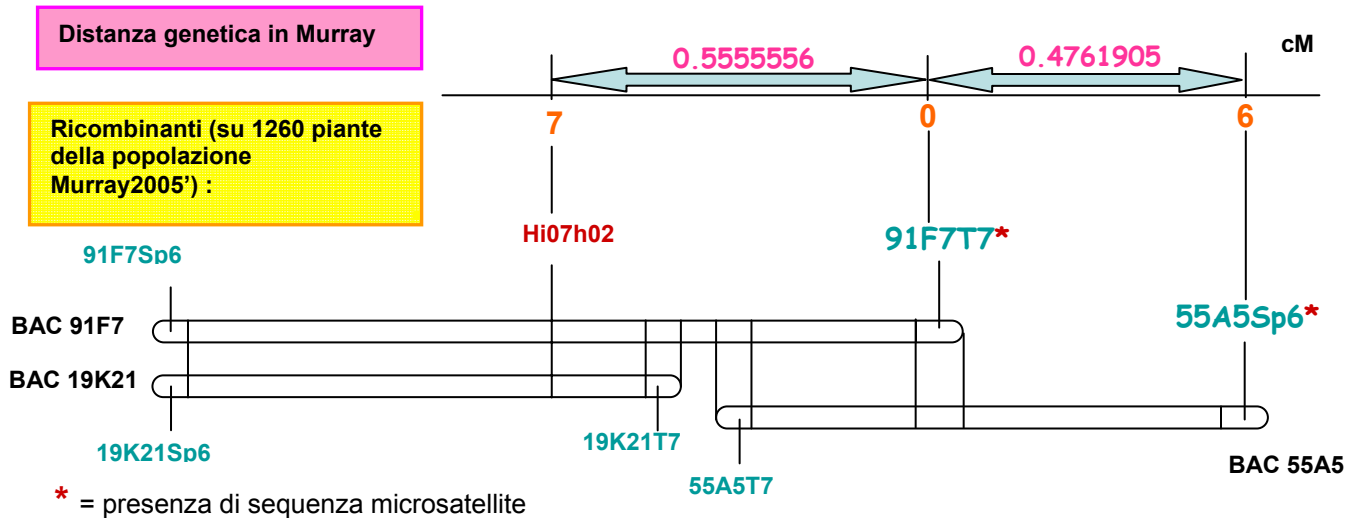
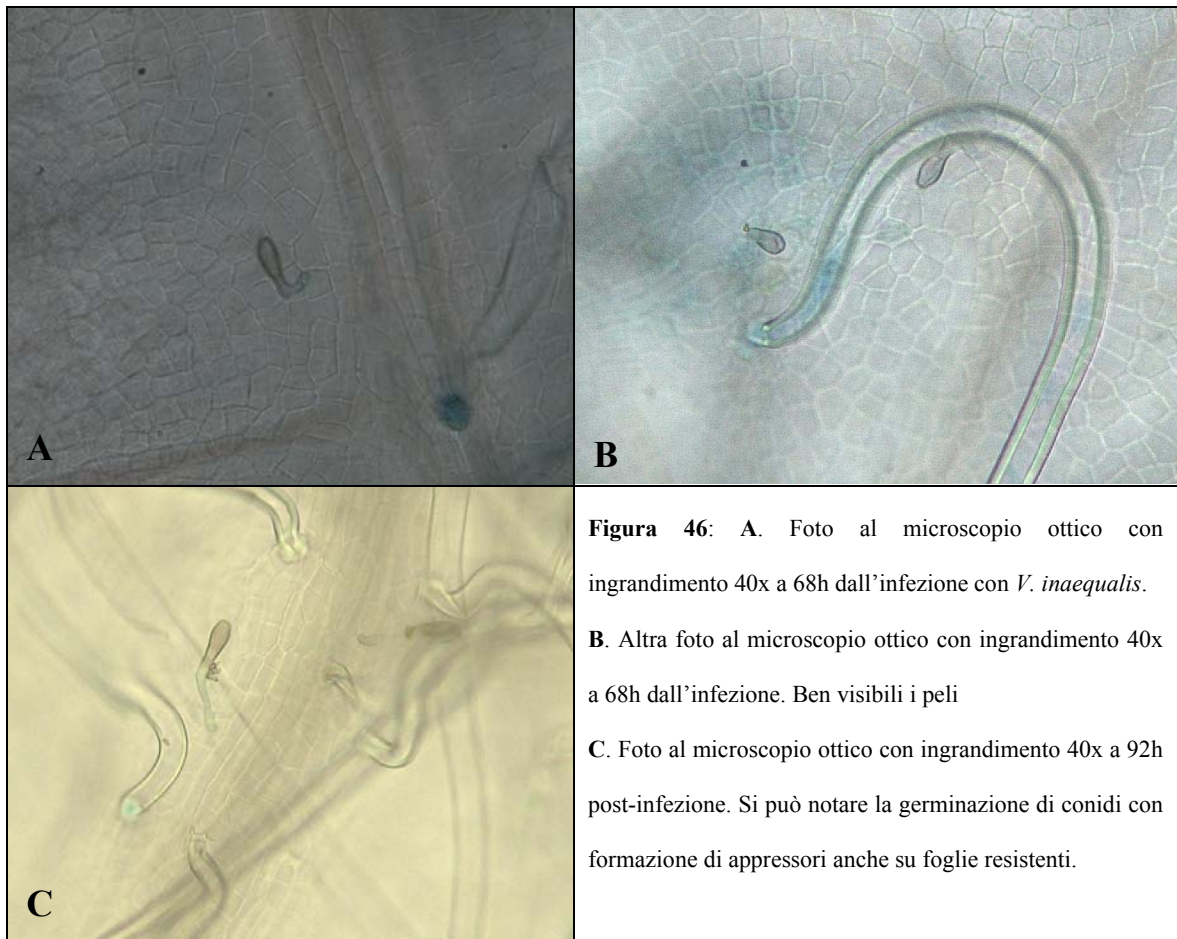


Figura 45: Regione del gene di resistenza *Vm*, con numero di ricombinanti e distanza genetica fra marcatori.

3.8 FOGLIE DI 'MURRAY' INOCULATE CON *V. inaequalis*: VETRINI

Dagli esperimenti di infezione sulle foglioline della cultivar Murray con una sospensione conidica mista di *Venturia inaequalis* abbiamo riportato una germinazione dei conidi indicativamente dell'80%. La superficie delle foglie di Murray appare ricca di peli e le foglie risultano abbastanza spesse, queste due caratteristiche forse rendono questa cultivar più resistente agli attacchi e alla penetrazione fungina. In ogni caso, come si vede dalle immagini seguenti (Figura 46 a-c), i conidi germinano bene anche sulle foglie di Murray ed arrivano a produrre un appressorio già a 2 giorni dall'infezione. I sintomi della risposta ipersensibile infatti si cominciano a vedere macroscopicamente già 3 giorni post-infezione.



3.9 CONTIG ON LINE DI 300Kb DELL'S-LOCUS

Dal primo screening del *PLATE POOL* della cv. Florina con il primer 91F7T7 per procedere nel secondo step di *Chromosome walking* si sono individuati alcuni cloni inizialmente presunti positivi che mostravano una dimensione compatibile con il BAC 91F7. L'analisi Blast delle sequenze delle BAC-ENDs di questi 4 cloni (12D6; 12M8; 19E12 e 67N14) ha dato come esito che tali BAC andavano a posizionarsi sempre nel LG17 di melo ma nella regione dell'S-locus che teoricamente dovrebbe essere localizzata a circa 10 cM più a monte sul cromosoma. Questo è asseribile valutando la posizione di mappa del microsatellite AY187627 (HiDRAS consortium: <http://www.hidras.unimi.it/>) rispetto al marcatore Hi07h02 sul LG17 di Fiesta. Purtroppo il marcatore associato alla regione dell'S-locus

(gi|28412290|gb|[AY187627.1](#)| *Malus x domestica* S-RNase (S) gene, S⁹ allele, partial cds) non mappa nella cultivar Murray e quindi non è possibile stimare l'effettiva distanza genetica. In ogni caso dalla ricerca con il Blast delle BAC-ENDs si è ottenuta la sequenza di un frammento di circa 370.000 bp dalla banca dati (AB270792 *Malus x domestica* MdSFBB9-alpha, S⁹-RNase).

Facendo degli allineamenti con diversi software si è notata un'alta similarità tra le BAC-ENDs identificate in questo lavoro e la sequenza estratta dalla banca dati ma mai un'identità del 100%.

Ciò, unito al fatto che utilizzando queste BAC-ENDs non sia riusciti a costruire una sequenza consenso che unisse la sequenza dell'S-locus pubblicata con il *contig* della regione del *Vm*, fa pensare che tra l'S-locus e il gene *Vm* siano presenti sequenze ripetute molto simili. Si è tentato a questo punto anche di utilizzare i BAC isolati da Sassa et al. (2007) sempre dalla BAC di Florina appartenenti all'S-locus per riempire il 'gap' tra le due regioni. Sono stati scelti i 3 cloni posizionati agli estremi del *contig* dell'S-locus costruito da Sassa e collaboratori (14P21, 45M19 e 90A15) in modo da capire se con le estremità di questi cloni si riusciva, tramite uno step di *Chromosome walking*, a chiudere il 'gap' tra la regione dell'S-locus e quella del *Vm* posizionando i 4 BAC isolati dal primo screening con il microsatellite 91F7T7. Purtroppo non si è ancora riusciti a formare un *contig* definitivo che contenga l'intera sequenza proprio a causa dell'alto numero di ripetizioni di sequenze molto simili in tandem tra queste due regioni. Anche nell'articolo di Sassa (2007) è riportata la presenza di diverse sequenze simili chiamate "S-locus *F-box* brothers di *M. domestica*" (SFBB) localizzate a valle del gene S⁹-RNase. In molti articoli (Entani et al., 2003; Ushijima et al., 2004) è riportato come alcuni di questi geni siano candidati ad essere i determinanti-S del polline nell'autoincompatibilità gametofitica basata sulla RNasi come nel caso delle

Rosaceae.

Dall'articolo di Gange et al. (2002) si scopre che in *Arabidopsis thaliana* ci sono almeno 694 geni F-box e quindi questa è una delle superfamiglie geniche più ampie ad oggi conosciute nelle piante. Circa il 35,9% di questi 694 geni F-box sono arrangiati in tandem da 2 a 7. Probabilmente ci sono stati diversi eventi di duplicazione nella regione dell'*S*-locus di *A. thaliana* che hanno contribuito a creare questa varietà di geni F-box (Entani et al., 2003). Lo stesso discorso può valere anche per il melo, infatti Sassa e collaboratori (2007) hanno identificato 2 SFBB dell'aplotipo 3 e altri 2 dell'aplotipo 9, più 2 pseudogeni ψ SFBB⁹ nella BAC library di Florina mentre in questo lavoro di Dottorato sono state isolate altre 4 sequenze altamente omologhe ai geni F-box che non vanno a sovrapporsi con i cloni BAC isolati da Sassa nel 2007. Quindi probabilmente nella regione di circa 10 cM che ancora non è stata indagata tra l'*S*-locus e il *contig* del gene *Vm* risiedono più copie di geni F-box.

3.10 BAC LIBRARY DELLA CULTIVAR MURRAY

La nuova genoteca BAC della cultivar Murray ha un inserto medio di circa 130Kb come si può vedere nella foto seguente (Figura 47).

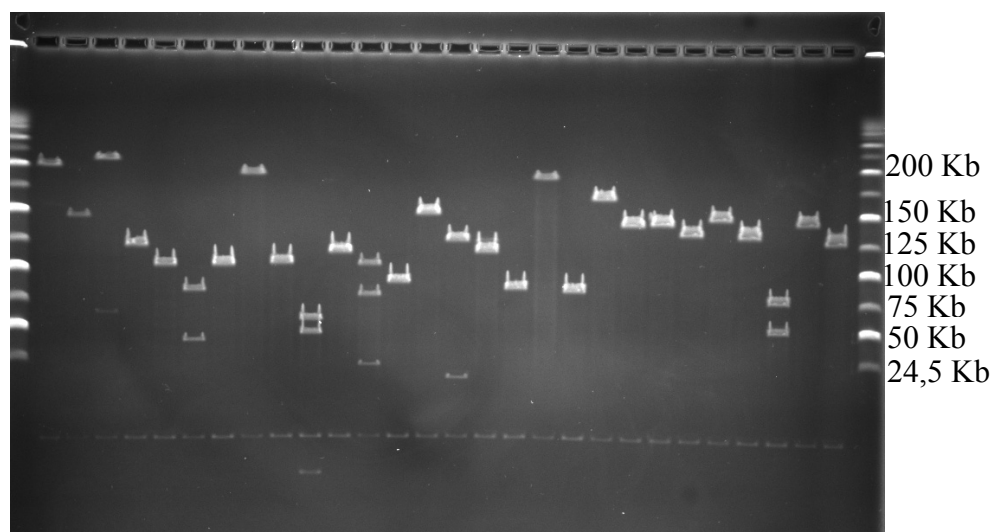


Figura 47: Digestione con l'enzima *Not I* di 28 BAC scelti casualmente ed estratti. La banda comune nella foto è il vettore pCC1BAC (8.1Kb) mentre il marker è il MidRange II della ditta NEB con bande ogni 24.5Kb.

La library fornisce una copertura teorica del genoma di 5,5x ed è costituita da 36.808 cloni (96 *plate* da 384 come era per la genoteca di Florina) invece che da 36.864 poiché alcuni pozzetti della madre risultavano vuoti.

3.11 SCREENING DEL *PLATE POOL* DELLA BAC LIBRARY DELLA CULTIVAR MURRAY

Dallo screening del *PLATE POOL* con il marcatore microsatellite 91F7T7 sono state isolate 3 *plate* positive contenenti un clone con la banda “415” associata all’allele resistente, 1-27-55, e 4 *plate* con la banda “426” associata all’allele sensibile, 4-13-24 e 66 (Figura 48).

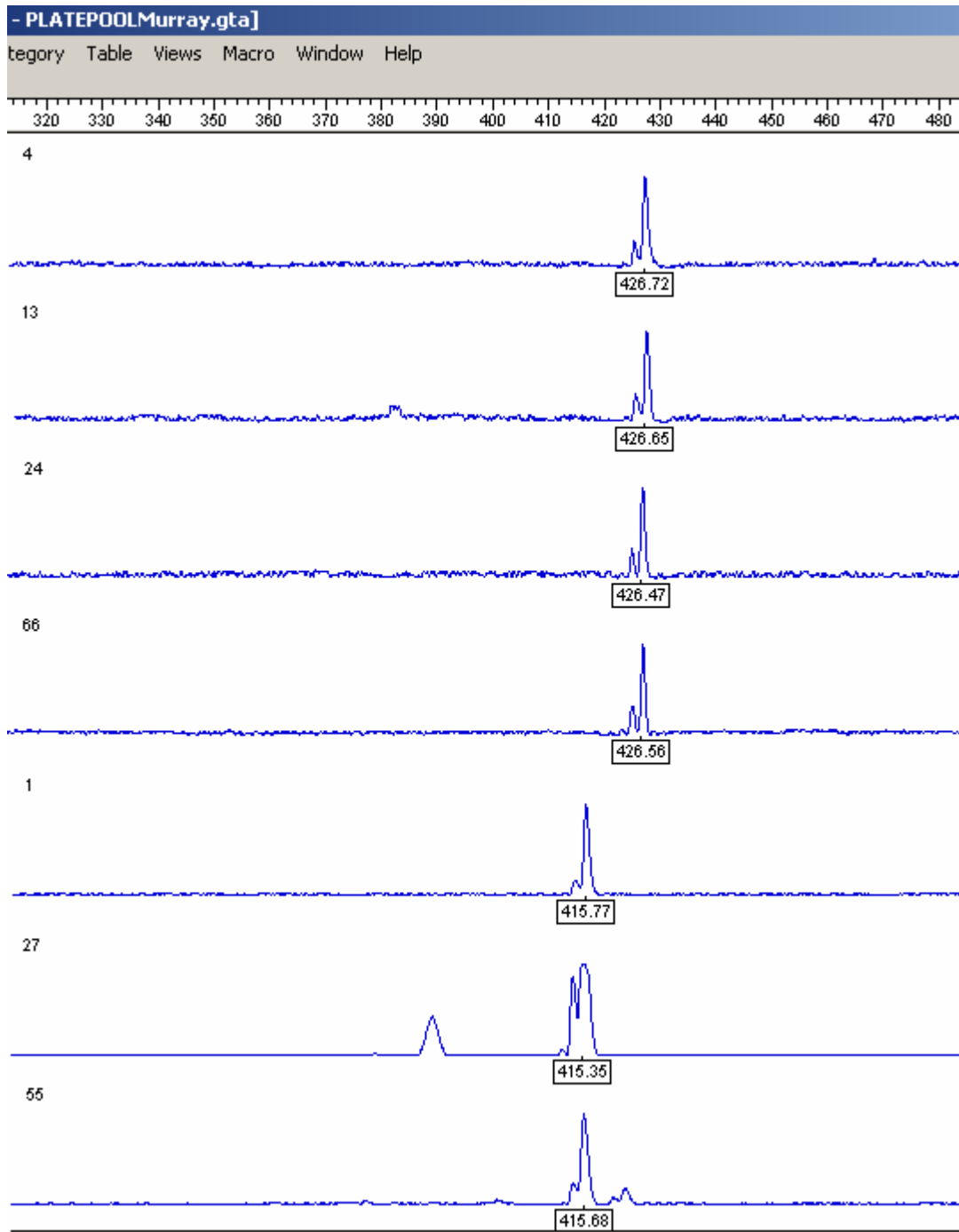


Figura 48: Elettroferogrammi del *PLATE POOL* analizzato con il marcatore microsatellite 91F7T7. Le prime tre lane (campioni 4-13-24 e 66) mostrano l'allele "426"bp sensibile, mentre le ultime tre lane (campioni 1-27 e 55) mostrano l'allele "415"bp associato alla resistenza.

Lo stesso screening si è effettuato con il marcatore Hi07h02 che ha indicato 1 *plate* positiva per la banda "225" associata alla resistenza, *plate* 27, e 5 con banda associata all'allele sensibile "274": cioè le *plate* 4-13-24-57-66 (Figura 49).

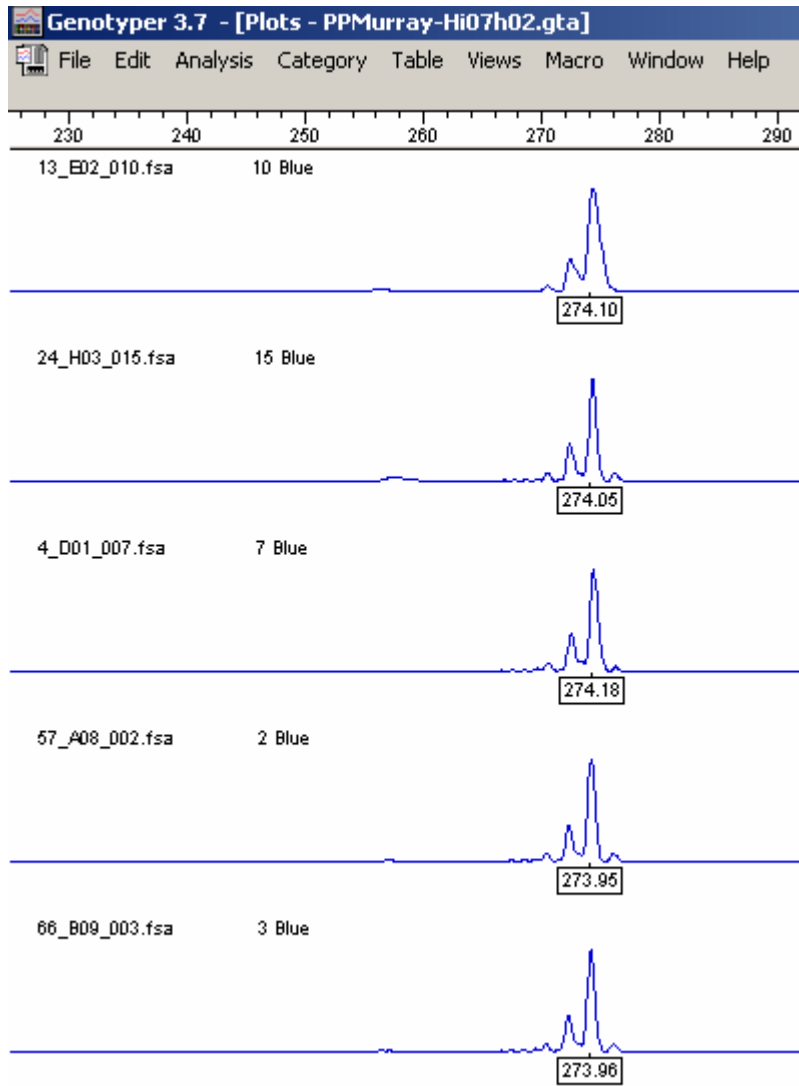


Figura 49: Elettroferogramma del *PLATE POOL* della BAC di Murray analizzata con il marcatore microsatellite Hi07h02. Le 4 lane mostrate si riferiscono all'allele "274"bp associato alla sensibilità.

Le *plate* contenenti cloni con l'allele sensibile sono le stesse in entrambi i casi ma con il marcatore Hi07h02 si isola un *plate* in più, la 57.

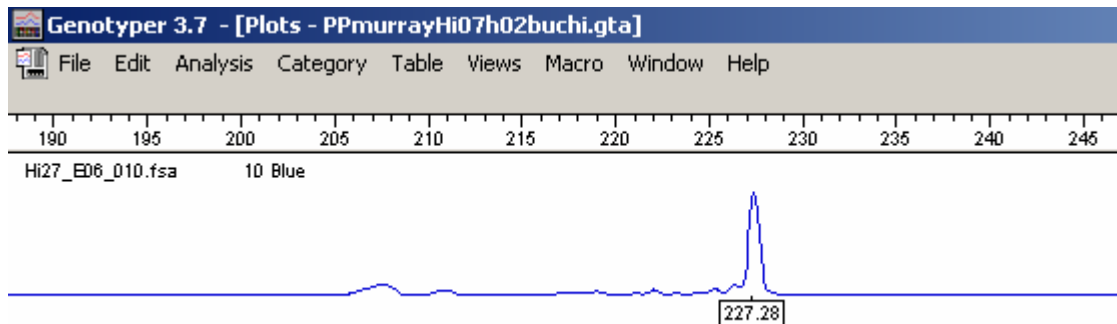


Figura 50: Elettroferogramma del *PLATE POOL* della BAC di Murray analizzata con il marcatore microsatellite Hi07h02. La lane mostrata rappresenta il *pool* della *plate* 27 che contiene un clone che amplifica la banda associata alla resistenza.

Per l'allele resistente invece solo una *plate*, la 27 (Figura 50), sembra contenere un clone che copra tutto il frammento di DNA compreso tra i marcatori Hi07h02 e 91F7T7 che verosimilmente è quello che dovrebbe contenere il gene di resistenza *Vm*. Resta da chiarire se nella *plate* 27 siano due cloni diversi probabilmente overlappanti oppure sia lo stesso clone che amplifica con entrambe le coppie di primer la corretta dimensione associata alla resistenza.

Dai risultati parziali al momento disponibili prodotti analizzando il *Pool* Righe e Colonne (PRC) della genoteca BAC di Murray con entrambi i marcatori microsatelliti risulta che i *pools* delle righe G e O e i *pools* delle colonne 10 e 12 amplificano con il marcatore 91F7T7 (Figura 51) ma solo i *pools* della riga G e della colonna 12 amplificano sia con il 91F7T7 che con il Hi07h02 (Figura 52).

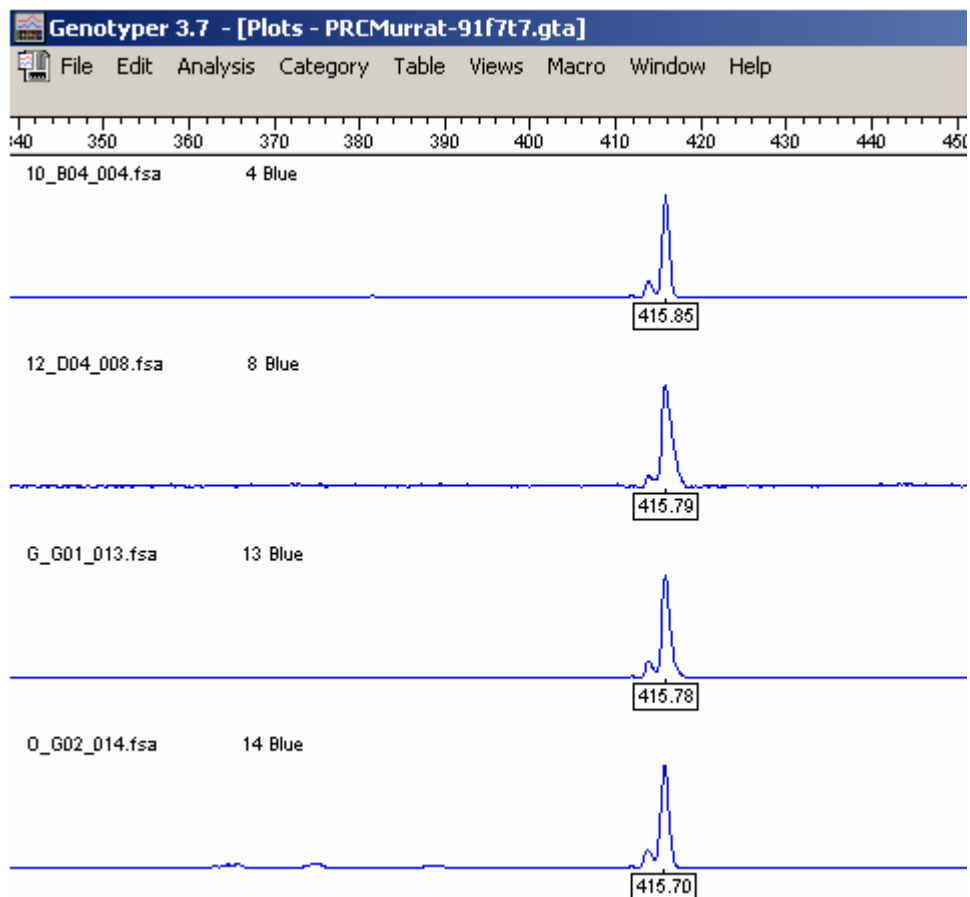


Figura 51: Elettroferogramma del PRC della BAC di Murray analizzata con il marcatore microsatellite 91F7T7. Le lane mostrate rappresentano i *pools* delle righe G e O e delle colonne 10 e 12 che contengono un clone che amplifica la banda associata alla resistenza.

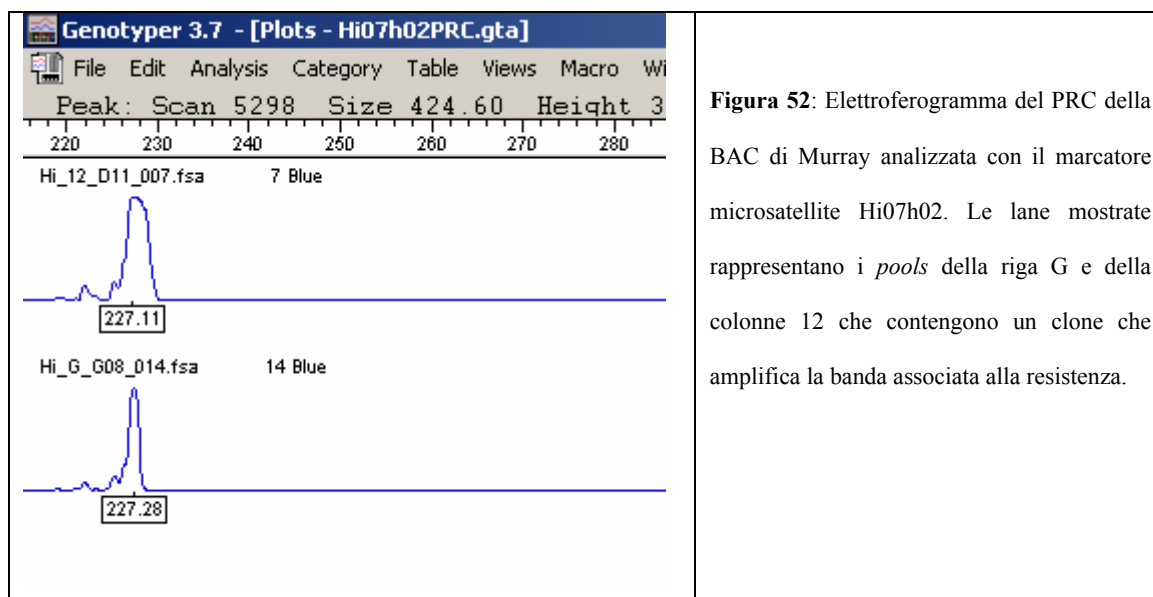


Figura 52: Elettroferogramma del PRC della BAC di Murray analizzata con il marcatore microsatellite Hi07h02. Le lane mostrate rappresentano i *pools* della riga G e della colonna 12 che contengono un clone che amplifica la banda associata alla resistenza.

Questi risultati uniti a quelli del *PLATE POOL* di Murray (Figure 49-50) fanno pensare che il clone BAC candidato a contenere il gene di resistenza sia il 27G12.

A questo punto si estrarranno dalle *plate* madri della genoteca della cv Murray tutti i cloni che risiedono negli “incroci” tra righe e colonne individuate dall’analisi del PRC sulle diverse *plate* risultate positive dal *PLATE POOL* quindi saranno: 1G10-1G12-1O10-1O12-27G10-27G12-27O10-27O12-55G10-55G12-55O10-55O12, per confermare che il clone 27G12 sia realmente positivo ed individuare gli altri che amplificano almeno la regione del 91F7T7 per poter costruire un *contig*.

Se si confermerà l’ipotesi che il 27G12 sia positivo per entrambi i marcatori si procederà con il sequenziamento dell’intero BAC alla ricerca del gene candidato ad essere il *Vm*.

4. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Questo lavoro assume un'elevata rilevanza scientifica poiché ha permesso di creare tutti i presupposti perché si arrivi in tempi brevi all'isolamento di un secondo gene di resistenza a ticchiolatura in melo oltre al già lungamente indagato gene *Vf* di *Malus floribunda* 821 (Vinatzer et al., 1998, Patocchi et al., 1999, Tartarini et al., 1999, Vinatzer et al., 2001, Xu and Korban, 2002, Vinatzer et al., 2004).

La creazione di un'ampia popolazione segregante per il gene di resistenza *Vm* ha permesso, a seguito di rilievi fenotipici e analisi molecolari, di isolare alcuni marcatori microsatelliti strettamente associati alla resistenza e di stimare la distanza genetica tra questi ed il gene stesso in funzione del numero di ricombinanti trovato.

Il marcatore microsatellite, identificato in questo studio, più vicino al gene *Vm* è il 91F7T7 e risulta essere posizionato ad una distanza genetica compresa tra zero e 0,5 centiMorgan. Ciò evidenzia un notevole avvicinamento al gene di resistenza rispetto al marcatore Hi07h02 (Patocchi et al., 2005) utilizzato all'inizio di questo lavoro per il primo step di *Chromosome walking*. Questo nuovo marcatore microsatellite 91F7T7, che si è dimostrato facilmente trasferibile su mappe di linkage diverse, potrà essere molto utile ai fini di una selezione assistita da marcatori laddove si tentasse l'introggressione di resistenze monogeniche multiple all'interno di una nuova cultivar migliorata per la resistenza a ticchiolatura.

La nuova genoteca BAC della cultivar Murray (*Vmvm*), già analizzata con i microsatelliti precedentemente isolati, ha mostrato la presenza di almeno tre cloni contenenti frammenti di DNA dell'allele associato alla resistenza e quattro contenenti frammenti dell'altro allele.

Nel prossimo futuro l'isolamento di questi cloni BAC della cv Murray contenenti tali marcatori microsatelliti sarà un altro passo molto importante verso il vero e proprio clonaggio del gene di resistenza.

Una volta identificato, il clone BAC positivo sarà interamente sequenziato e le sequenze ottenute verranno assemblate per costruire una sequenza consenso. Una delle parti più difficili sarà proprio l'assemblaggio delle sequenze a causa del fatto che, come già detto precedentemente in questo testo, si sta lavorando su una regione multilocus (duplicazione LG17-LG9) che contiene anche sequenze altamente ripetute in tandem nella regione che va dall'*S*-locus al gene *Vm*.

Una volta ottenuta una sequenza consenso sarà possibile individuare diverse presunte ORF (Open Reading Frame) sulle quali verrà poi effettuato uno studio di carattere bioinformatico per valutare similitudini tra le ORF stesse ed altri geni di resistenza conosciuti e presenti in banca dati. Sarà a questo punto molto interessante valutare se le ORF individuate abbiano caratteristiche riscontrate anche nel caso del gene *Vf* o in altre proteine putativamente associate a resistenza oppure se in questo caso si tratti di sequenze con caratteristiche diverse vista anche la particolare reazione di ipersensibilità che la presenza di questo gene causa in interazione compatibile con il patogeno fungino *V. inaequalis*. Questa parte di lavoro andrà ad implementare notevolmente le poche conoscenze sulle proteine dedotte dalle sequenze putativamente associate alla resistenza a ticchiolatura che per ora riguardano solo il cluster di geni *Vf*. Tali proteine possiedono ripetizioni LRR ma mancano della chinasi per la trasduzione del segnale all'interno della cellula. Sarà interessante scoprire se la proteina codificata dal gene *Vm* invece contenga sia sequenze LRR per il riconoscimento del patogeno sia una chinasi per la cascata di trasduzione del segnale oppure sia simile a quelle codificate dai geni al locus *Vf*.

Quando sarà stata identificata una od alcune putative ORF con caratteristiche peculiari riconducibili a geni di resistenza, per isolare il vero gene candidato ad essere il cosiddetto *Vm*, bisognerà creare dei costrutti e trasformare alcune piante di melo sensibili a ticchiolatura, tipo Gala o McIntosh già usate per altri studi di questo genere

per il gene *Vf*. Una volta rigenerate, le piante trasformate verranno sottoposte ad infezione con il patogeno fungino *Venturia inaequalis* e verranno valutati i sintomi. Laddove sarà riscontrata una reazione ipersensibile questa non potrà che essere causata dalla presenza del gene identificato al locus *Vm* e introgresso mediante trasformazione genetica.

5. BIBLIOGRAFIA:

- Aderhold, R. 1899. Auf welche Weise können wir dem immer weiteren Umsichgreifen des Fusicladiums in unseren Apfelkulturen begegnen und welche Sorten haben sich bisher dem Pilz gegenüber am widerstandsfähigsten gezeigt. *Pomol. Monatsh.* **XLV**: 899–890.
- Belfanti, E., Silfverberg-Dilworth, E., Tartarini, S., Patocchi, A., Barbieri, M., Zhu, J., Vinatzer, B. A., Gianfranceschi, L., Gessler, C., Sansavini, S. 2004. The *HcrVf2* gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **101**: 886–890.
- Bènaouf, G., and Parisi, L. 1997 Pathogenicity of *Venturia inaequalis* strains from *Malus floribunda* 821: comparison with race 6 on apple clones. *OILBWPRS Bull.* **20**: 8–11.
- Bènaouf, G., and Parisi, L. 2000 Genetics of the host-pathogen relationship between *Venturia inaequalis* races 6 and 7 and *Malus* species. *Phytopathology* **90**: 236–242.
- Bent, A.F. 1996 Plant disease resistance genes: function meets structure. *The Plant Cell* **8**: 1757–1771.
- Broggin, G. A. L., Galli, P., Gianfranceschi, L., Durante, C., Parravicini, G., Morello, S., Gessler, C. and Patocchi, A. 2007 Apple scab resistance gene *HcrVf2* homologues are present in multiple loci in the apple genome. PS 15-849 XIII International Congress on MPMI.
- Bus, V. G. M., Laurens, F. N. D., Van deWeg, W. E., Rusholme, R. L., Rikkerink, E. H. A., Gardiner, S. E., Bassett, H. C. M., and Plummer, K. M. 2005b. The *Vh8* locus of a new gene-for-gene interaction between *Venturia inaequalis* and the wild apple *Malus sieversii* is closely linked to the *Vh2* locus in *Malus pumila* R12740-7A. *New Phytol.* **166**: 1035–1049.
- Bus, V. G. M., Rikkerink, E. H. A., van de Weg, W. E., Rusholme, R. L., Gardiner, S. E., Bassett, H. C. M., Kodde, L. P., Parisi, L., Laurens, F. N. D., Meulenbroek, E. J., and Plummer, K. M. 2005a. The *Vh2* and *Vh4* scab resistance genes in two differential hosts derived from Russian apple R12740-7A map to the same linkage group of apple. *Mol. Breed.* **15**: 103–116.
- Cheng, F. S., Weeden, N. F., Brown, S. K., Aldwinckle, H. S., Gardiner, S. E., and Bus, V. G. 1998. Development of a DNA marker for *Vm*, a gene conferring resistance to apple scab. *Genome* **41**: 208-214.
- Chevalier, M., Lespinasse, Y., Renaudin, S. 1991. A microscopic study of the different classes of symptoms coded by the *Vf* gene in apple for resistance to scab (*Venturia inaequalis*). *Plant Pathology* **40**: 249–256.
- Chevalier, M. 1988. Contribution à l'étude des relations hôte-parasite dans le cas du couple *Malus × domestica* – *Venturia inaequalis*: 'étude histologique et cytologique de deux cas de résistance dépendant des gènes *Vf* et *Vm*. PhD dissertation, Université de Nantes, France.
- Dayton, D. F., & Williams, E. B. 1968 Independent genes in *Malus* for resistance to *Venturia inaequalis*. *Proceedings. American Society for Horticultural Science* **92**: 89–93.

- Dayton, D. F., and Williams, E. B. 1970. Additional allelic genes in *Malus* for scab resistance of two reaction types. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **95**:735-736
- Dixon, M., Jones, D., Keddie, J., Thomas, C., Harrison, K. and Jones, J. (1996) The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine rich repeat proteins. *Cell* **84**: 451-459.
- Du, D. and Hwang, F., 1993. Combinatorial Group Testing and Its Applications. , World Scientific, Singapore.
- Durel, C. E., Van de Weg, E., Venisse, J. S., and Parisi, L. 2000. Localization of a major gene for apple scab resistance on the European genetic map of the Prima × Fiesta cross. IOBC/WPRS Bull. **23**:245-248.
- Durel, C. E., Calenge, F., Parisi, L., van de Weg, W. E., Kodde, L. P., Liebhard, R., Gessler, C., Thiermann, M., Dunemann, F., Gennari, F., and Tartarini S. 2004. An overview of the position and robustness of scab resistance QTLs and major genes by aligning genetic maps of five apple progenies. ISHS. *Acta Hort.* **663**: 135–140.
- Ellis, J., Dodds, P. and Pryor, T. 2000 Structure, function and evolution of plant disease resistance gene. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 278-284.
- Erdin, N., Tartarini, S., Broggin, G. A. L., Gennari, F., Sansavini, S., Gessler, C., and Patocchi, A. 2006. Mapping of the apple scab-resistance gene *Vb*. *Genome* **49**: 1238-1245.
- Entani, T., Iwano, M., Shiba, H., Che, F.-S., Isogai, A., Takayama, S. 2003 Comparative analysis of the self-incompatibility (*S*-) locus region of *Prunus mume*: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity. *Genes Cells* **8**:203-213.
- Flor, H. H. 1971 Current status of gene for gene concept *Annu. Rev. Phytopatol.* **9**: 275-296.
- Gachomo, E. W., Shonukan, O. O. and Kotchoni, S. 2003 The molecular initiation and subsequent acquisition of disease resistance in plants. *African Journal of Biotechnology* **2**(2): 26-32.
- Gange, J. M., Downes, .P., Shiu, S.-H., Durski, A. & Vierstra, R.D. 2002 The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse-superfamily of genes in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 11519–11524.
- Gardiner, S. E, Bassett, H. C. M., Noiton, D. A. M., Bus, V. G., Hofstee, M. E., White, A. G., Ball, R. D., Forster, R. L. S., Rikkerink, E. H. A. 1996 A detailed linkage map around an apple scab resistance gene demonstrates that two disease resistance classes both carry the *Vf* gene. *Theoretical and Applied Genetics* **93**: 485–493.
- Gessler, C. 1989 Genetics of the interaction *Venturia inaequalis*–*Malus*: The conflict between theory and reality. IOBC/WPRS-Bull. **12**:168-190.
- Gessler, C., Patocchi, A., Sansavini, S., Tartarini, S. and Gianfranceschi, L. 2006 *Venturia inaequalis* Resistance in Apple. *Critical Reviews in Plant Sciences* **25**: 473-503.
- Gianfranceschi, L., Koller, B., Seglias, N., Kellerhals, M., and Gessler, C. 1996. Molecular selection in apple for resistance to scab caused by *Venturia inaequalis*. *Theor. Appl. Genet.* **93**: 199–204.

-
- Gianfranceschi, L., Seglias, N., Tarchini, R., Komjanc, M., and Gessler, C. 1998 Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple *Theoretical and Applied Genetics* **96** (8): 1069-1076.
- Grant, M. R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., Innes, R. W., and Dangl, J. L. 1995 Structure of the *Arabidopsis RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* **269**, 843–846.
- Guillaumès, J., Chevalier, M., and Parisi, L., 1995 Etude des relations *Venturia inaequalis* – *Malus x domestica* sur vitroplantes. *Can J Plant Pathol* **17**: 305–311.
- Gygas, M., Gianfranceschi, L., Liebhard, R., Kellerhals, M., Gessler, C., Patocchi, A. 2004 Molecular markers linked to the apple scab resistance gene *Vbj* derived from *Malus baccata jackii*. *Theoretical and Applied Genetics* **109**: 1702– 1709.
- Hammerschlag, F. A. 2000 Resistant responses of peach somaclone 122–1 to *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* and to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *HortScience* **35**: 141–143.
- Hammond-Kosack, K. E., and Jones, J.D.G. 1995 Plant disease resistance genes: unravelling how they work. *Can. J.Bot.* **73** (suppl.1): S495-S505.
- Hammond-Kosack, K. E., and Jones J.D.G. 1997 Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 575-607.
- Hemmat, M., Weeden, N. F., Brown, S. K. 1995 Molecular markers for scab resistance (*Vf*) region in apple. *Hortscience* **30** 850.
- Hemmat, M., Brown, S. K., Weeden, N. F. 2002 Tagging and mapping scab resistance genes from R12740-7A apple. *Journal of the American Society of Horticultural Science* **127**: 365– 370.
- Hemmat, M., Brown, S. K., Aldwinckle, H. S., Mehlenbacher, S. A., Weeden, N. F. 2003 Identification and mapping of markers for resistance to apple scab from ‘Antonovka’ and ‘Hansen's baccata #2’. *Acta Horticulturae* **622**: 153–161.
- Hough, L. F. 1944 A survey of the scab resistance of the foliage on seedlings in selected apple progenies. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science* **44**: 260–272.
- Hough, L. F., and Shay, J. R. 1949 Breeding for scab resistant apples. *Phytopathology* **39**: 10.
- Hughes, S. J. 1953 Some foliicolous hyphomycetes. *Can J Bot* **31**: 560-576.
- Janick, J., Cummings, J. N., Brown, S. K., and Hemmat, M. 1996 Apples. **In:** *Fruit Breeding. Tree and Tropical Fruits*, Vol. I, pp. 1-77. Janick, J., and Moore, J. N., Eds., John Wiley & Son, New York.
- Jeong, S., Trotochaud, A. E., and Clark, S. E. 1999 The *Arabidopsis* CLAVATA2 gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase. *The Plant Cell* **11**:1925-1933.

-
- Johal, G. S., and Briggs, S. P. 1992 Reductase activity encoded by the *HMI* disease resistance gene in maize. *Science* **258** (5084):985–987.
- Jones, D. A., Thomas, C. M., Hammond-Kosack, K. E., Balint-Kurti, P. J., Jones, J. D. G. 1994 Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science*. Nov 4; **266** (5186):789–793.
- Jones, D. A., and Jones, J. D. G. 1997 The role of leucine-rich repeats proteins in plant defences. *Advances in Botanical Research* **24**: 90-167.
- Kobe, B., and Deisenhofer, J. 1994 The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *TIBS* **19**:415-421.
- Koch, T., Kellerhals, M., and Gessler, C. 2000. Virulence pattern of *Venturia inaequalis* field isolates and corresponding differential resistance in *Malus × domestica*. *J. Phytopathol.* **148**:357-364.
- Koller, B., Gianfranceschi, L., Seglias, N., McDermott, J., and Gessler, C. 1994. DNA markers linked to the *Malus floribunda* 821 scab resistance. *Plant Mol. Biol.* **26**:597-602.
- Korban, S. S., Chen, H. 1992 Apple. In: Hammerschlag, F. A., Litz, R. E (eds) *Biotechnology of perennial fruit crops*. CAB, Wallingford, pp 203–227.
- Korban, S. S. & Skirvin, R. M. 1984 Nomenclature of the cultivated apple. *HortScience* **19**: 177–180.
- Kosambi, D. D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenetics* **12**: 172–175.
- Liebhard, R., Gianfranceschi, L., Koller, B., Ryder, C. D., Tarchini, R., Van de Weg, E., Gessler, C. 2002 Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Molecular Breeding* **10**: 217-241.
- Liebhard, R., Kellerhals, M., Pfammatter, W., Jertmini, M., Gessler, C. 2003 Mapping quantitative physiological traits in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Plant Molecular Biology* **52** (3): 511-526.
- Liebhard, R, Koller, B, Gianfranceschi, L, Gessler, C. 2003 Creating a saturated reference map for the apple (*Malus × domestica* Borkh.) genome. *Theoretical Applied and Genetics* **106**: 1497–1508.
- MacHardy, W. E. 1996 Apple Scab. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN
- MacHardy, W. E., Gadoury, D. M., and Gessler, C. 2001 Parasitic and biological fitness of *Venturia inaequalis*: Relationship to disease management strategies. *Plant Dis.* **85**:1036-1051.
- Malnoy, M., Xu, M., Borejsza-Wysocka, E., Korban, S. S., and Aldwinkle, H. S. 2006 The role of *Vfa1*, *Vfa2* and *Vfa4* genes in resistance to *Venturia inaequalis* in transgenic McIntosh apple plants. **In:** Proc. Int. Symp. Biotechnology of Temperate fruit crops and Tropical species, October 10-14, 2005, Daytona Beach, Florida, USA. ISHS. *Acta Hort.* (in press).

-
- Martin, G. B., Brommonschenkel, S. H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M. W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E. D., and Tanksley, S. D. 1993 Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* **262**: 1432-1436.
- Martin, G. B., Frary, A., Wu, T., Brommonschenkel, S., Chunwongse, J., Earle, E. D., Tanksley, S. D. 1994 A member of tomato *Pto* gene family confers sensitivity to fenthion resulting in rapid cell death. *Plant Cell* **6**(11): 1543-1552.
- Parisi, L., Lespinasse, Y., Guillaumes, J., and Krüger, J. 1993 A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the *Vf* gene. *Phytopathology* **83**:533-537.
- Parisi, L., Lespinasse, Y. 1996 Pathogenicity of *Venturia inaequalis* strains of race 6 on apple clones (*Malus* sp.). *Plant Disease* **80**: 1179–1183.
- Patocchi, A., Vinatzer, B. A., Gianfranceschi, L., Tartarini, S., Zhang, H.-B., Sansavini, S., and Gessler, C. 1999b. Construction of a 550 kb BAC contig spanning the genomic region containing the apple resistance gene *Vf*. *Mol. Gen. Genet.* **262**, 884–891.
- Patocchi, A., Bigler, B., Koller, B., Kellerhals, M., Gessler, C. 2004 *Vr₂*: a new apple scab resistance gene. *Theoretical and Applied Genetics* **109**: 1087–1092.
- Patocchi, A., Walser, M., Tartarini, S., Broggin, G. A. L., Gennari, F., Sansavini, S., and Gessler, C. 2005 Identification by genome scanning approach (GSA) of a microsatellite tightly associated with the apple scab resistance gene *Vm*. *Genome* **48**: 630–663.
- Phipps, J. B., Robertson, K. R., Smith, P. G. & Rohrer, J. R., 1990. A checklist of the subfamily Maloideae (Rosaceae). *Canadian Journal of Botany* **68**: 2209-2269.
- Rathjen, J. P., Chang, J. H., Staskawicz, B. J., and Michelmore, R. W. 1999 Constitutively active *Pto* induce a Prf-dependent hypersensitive response in absence of *avrPto*. *EMBO J* **18**: 3232-3240.
- Rathjen, J. P., Moffett, P. 2003 Early signal transduction events in specific plant disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 300-306.
- Richter, T. E., and Ronald, P. C. 2000 The evolution of disease resistance genes. *Plant Molecular Biology* **42**: 195-204.
- Ronald, P. C., Salmeron, J. M., Carland, F. M., and Staskawicz, B. J. 1992b The cloned avirulence gene *avrPto* induce disease resistance in tomato cultivars containing the *Pto* resistance gene. *J. Bacteriol* **174**: 1604-1611.
- Roberts, A. L. & Crute, I. R. 1994 Apple scab resistance from *Malus floribunda* 821 (*Vf*) is rendered ineffective by isolates of *Venturia inaequalis* from *Malus floribunda*. *Norw J Agr Sci*, Suppl No **17**: 403-406.
- Rousselle, G. L., Williams, E. B., & Hough, L. F. 1975 Modification in the level of resistance to apple scab and the *Vf* gene. Proc. 19th intl. Hort. Cong. (Warsaw) **3**: 1926.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis 1989 Molecular cloning. A Laboratory Manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Sassa, H., Kakui, H., Miyamoto, M., Suzuki, Y., Hanada T., Ushijima K., Kusaba M., Hirano H., and Koba T. 2007 *S Locus F-Box Brothers: Multiple and Pollen-Specific F-Box Genes With S Haplotype-Specific Polymorphisms in Apple and Japanese Pear*. *Genetics* **175**: 1869-1881.
- Scofield, S. R., Tobias, C. M., Rathjen, J. P., Chang, J. H., Lavelle, D. T., Michelmore, R. W., and Staskawicz, B. J. 1996 Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science* **274**: 2063-2065.
- Shay, J. R., Hough, L. F. 1952 Evaluation of apple scab resistance in selections of *Malus*. *American Journal of Botany* **39**: 288-297.
- Shay, J. R., Williams, E. B. 1956 Identification of three physiological races of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **46**: 190-193.
- Sierotzki, H., Eggenschwiler, M., Boillat, O., McDermott, J. M., and Gessler, C. 1994 Detection of variation in virulence toward susceptible apple cultivars in natural populations of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **84**: 1005-1009.
- Silfverberg-Dilworth, E., Matasci, C. L., van deWeg, W. E., Kaauwen, M. P. W., Walser, M., Kodde, L. P., Soglio, V., Gianfranceschi, L., Durel, C. E., Costa, F. 2006 Microsatellite markers spanning the apple (*Malus × domestica* Borkh.) genome. *Tree Genetics & Genomes* **2**:4, 202.
- Song, W., Wang, G., Chen, L., Kim, H., Pi, L., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W., Zhu, L., Fauquet, C., and Ronald, P. 1995 A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science* **270**: 184-186.
- Song, W., Pi, L., Wang, G., Gardner, J., Holsten, T., and Ronald, P. 1997 Evolution of the rice *Xa21* disease resistance gene family. *The Plant Cell* **9**: 1279-1287.
- Tang, X., Frederick, R. D., Zhou, J., Halterman, D. A., Jia, Y., and Martin, G. B., 1996 The avirulence protein AvrPto physically interacts with the Pto kinase. *Science* **274**: 2060-2063.
- Tartarini, S. 1996 RAPD markers linked to the *Vf* gene for scab resistance in apple. *Theor. Appl. Genet.*, **92**: 803-810.
- Tartarini, S., Gianfranceschi, L., Sansavini, S., and Gessler, C. 1999 Development of reliable PCR markers for the selection of the *Vf* gene conferring scab resistance in apple. *Plant Breed.* **118**:183-186.
- Tartarini, S., Gennari, F., Pratesi, D., Palazzetti, C., Sansavini, S., Parisi, L., Fouillet, A., Fouillet, V., and Durel, C. E. 2004b Characterisation of a race 6 scab resistance gene from Italian germplasm. ISHS. *Acta Hort.* **663**: 129-133.
- Thomas, C. M., Jones, D.A., Parniske, M., Harrison, K., Balint-Kurti, P. J., Hatzixanthis, K., Jones, J. D. G. 1997 Characterization of the tomato *Cf-4* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequences that determine recognitional specificity in Cf-4 and Cf-9. *The Plant Cell* **9**: 2209-2224.
- Turechek, W. W., and Köller, W. 2004. Managing resistance of *Venturia inaequalis* to the strobilurin fungicides. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2004-0908-01-RS.

- Ushijima, K., Yamane, H., Watari, A., Kakehi, E., Ikeda, K., Hauck, N. R., Iezzoni, A. F., Tao, R. 2004 The *S* haplotype-specific Fbox protein gene, *SFB*, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. *Plant J* **39**:573-586.
- Van den Ackerveken, G. F. J. M., Van Kan, J. A. L., and deWitt, P. J. G. M. 1992 Molecular analysis of the avirulence gene *avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* fully supports the gene-for-gene hypothesis. *PlantJ.* **2** (3): 359-366.
- van Ooijen, J. W., Voorrips, R. E.. 2001 *JOINMAP version 3.0, Software for the Calculation of Genetic Linkage Maps*. Wageningen, the Netherlands: Plant Research International.
- Vinatzer, B. A., Zhang, H-B., and Sansavini, S. 1998 Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of apple. *Theor. Appl. Genet.* **97**: 1183–1190.
- Vinatzer, B. A., Patocchi, A., Gianfranceschi, L., Tartarini, S., Zhang, H. B., Gessler, C., Sansavini, S. 2001 Apple contains receptor-like genes homologous to the *Cladosporium fulvum* resistance gene family of tomato with a cluster of genes cosegregating with *Vf* apple scab resistance. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **14**: 508– 514.
- Vinatzer, B. A., Patocchi, A., Tartarini, S., Gianfranceschi, L., Sansavini, S., and Gessler, C. 2004. Isolation of two microsatellite markers from BAC clones of the *Vf* scab resistance region and molecular characterization of scab-resistant accessions in *Malus* germplasm. *Plant Breed.* **123**: 321–326.
- Wang, Z. Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S., Chory, J. 2001 BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* **411**(6834): 219.
- Way, R. D., Aldwinckle, H. S., Lamb, R. C., Rejman, A., Sansavini, S., Shen, T., Watkins, R., Westwood, M. N., and Yoshida, Y. 1991 Apples (*Malus*), in J. N. Moore and J. R. Ballington (eds.), Genetic resources of temperate fruit and nut crops, Intl. Soc. Wageningen, pp. 1-62 (*Acta Hort* 290).
- Whitman, S., Dinesh-Kumar, S. P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., and Baker, B. 1994 The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to Toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* **78**: 1101-1115.
- Williams, E. B., and Brown, A. G. 1968. A new physiologic race of *Venturia inaequalis*, incitant of apple scab. *Plant Dis. Rep.* **52**:799-801.
- Williams, E. B., and Kuç, J. 1969. Resistance in *Malus* to *Venturia inaequalis*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **7**:223-246.
- Win, J., Greenwood, D. R., Plummer, K. M. 2003 Characterisation of a protein from *Venturia inaequalis* that induces necrosis in *Malus* carrying the *Vm* resistance gene. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **62**: 193–202.
- Xu ,M., Korban, S. S. 2002 A cluster of four receptor-like genes resides in the *Vf* locus that confers resistance to apple scab disease. *Genetics* **162**: 1995– 2006.
- Yang, H., and Korban, S. S. 1996. Screening apples for OPD20/600 using sequence-specific primers. *Theor. Appl. Genet.* **92**: 263–266.

- Yang, H. Y., and Krüger, J. 1994. Identification of a RAPD marker linked to the *Vf* gene for scab resistance in apples. *Plant Breed.* **112**: 323–329.
- Yang, H. Y. , J. Krüger, H. Schmidt 1997a A randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker tightly linked to the scab resistance gene *Vf* in apple . *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **122**: 47-52.
- Yang, H. Y. , J. Krüger, H. Schmidt, 1997b The use of a modified bulk segregant analysis to identify a molecular marker linked to a scab resistance gene in apple. *Euphytica*, **94**: 175-182.
- Zini, E. 2005 Costruzione di una mappa di associazione della popolazione di melo ‘Golden Delicious’ × ‘Freedom’ e caratterizzazione del gene di resistenza *Va* a ticchiolatura. PhD thesis, DCA-BO, Italy: 126 p.

1. PARAMETRI STRUMENTAZIONE:**-STAZIONE AUTOMATIZZATA FREEDOM EVO (TECAN):**

- Parametri utilizzati per la formazione dei POOL A1-A2-B1-B2:

-Liquid class: bacterial culture

Aspirate:

Aspiration speed: 50ul/s

Delay: 1000 ms

System Trailing Airgap: 10ul

Trailing Airgap: 5ul

Excess Volume: 15ul

Conditioning Volume: 5ul

Z max: 0

Retract:

Retract speed: 5mm/s

Dispense:

Dispense speed: 50ul/s

Delay: 200ms

Retract speed: 42mm/s

Z max: 1mm

- Programma e reiterazioni per la formazione dei POOL A1-A2-B1-B2:

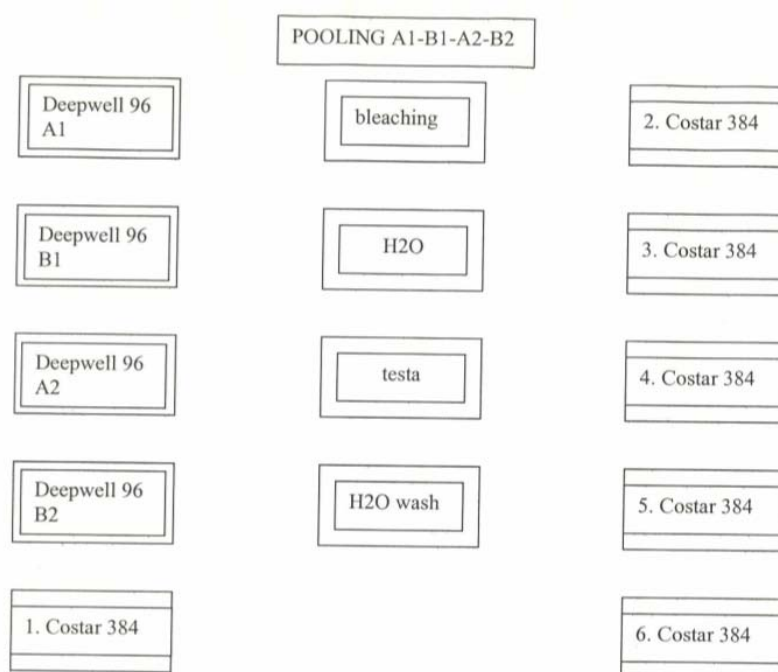


Figura 53: Schema delle posizioni relative delle diverse plate sul piano di lavoro del robot come vengono visualizzate dall'operatore.

1. Flush iniziale: WRC empty tips
Wash tips: 50 ul
2. Caricamento testa da 96 punte;
3. Aspirazione di 20 ul dal primo quadrante della 1° Costar (A1), poi dalla 2° Costar ecc fino alla 6° Costar;
4. Dispensamento di 120 ul nella Deepwell "A1"

5. Wash in H2O
6. Bleaching (70ml H2O + 30 ml candeggina commerciale)
7. Wash in H2O
8. Aspirazione di 20 ul dal secondo quadrante della 1° Costar (B1), poi dalla 2° Costar ecc fino alla 6° Costar;
9. Dispensamento di 120 ul nella Deepwell "B1";
10. Wash in H2O
11. Bleaching
12. Wash in H2O
13. Aspirazione di 20 ul dal terzo quadrante della 1° Costar (A2), poi dalla 2° Costar ecc fino alla 6° Costar;
14. Dispensamento di 120 ul nella Deepwell "A2";
15. Wash in H2O
16. Bleaching
17. Wash in H2O
18. Aspirazione di 20 ul dal quarto quadrante della 1° Costar (B2), poi dalla 2° Costar ecc fino alla 6° Costar;
19. Dispensamento di 120 ul nella Deepwell "B2";
20. Wash in H2O
21. Bleaching
22. Wash in H2O
23. cambio piastre dalla 7 alla 12 e ripetere dal punto 3. al 22.
24. cambio piastre dalla 13 alla 18 e ripetere dal punto 3. al 22.
25. cambio piastre dalla 19 alla 24 e ripetere dal punto 3. al 22.
26. cambio piastre dalla 25 alla 30 e ripetere dal punto 3. al 22.
27. cambio piastre dalla 31 alla 36 e ripetere dal punto 3. al 22.
28. cambio piastre dalla 37 alla 42 e ripetere dal punto 3. al 22.
29. cambio piastre dalla 43 alla 48 e ripetere dal punto 3. al 22.
30. cambio piastre dalla 49 alla 54 e ripetere dal punto 3. al 22.
31. cambio piastre dalla 55 alla 60 e ripetere dal punto 3. al 22.
32. cambio piastre dalla 61 alla 66 e ripetere dal punto 3. al 22.
33. cambio piastre dalla 67 alla 72 e ripetere dal punto 3. al 22.
34. cambio piastre dalla 73 alla 78 e ripetere dal punto 3. al 22.
35. cambio piastre dalla 79 alla 84 e ripetere dal punto 3. al 22.
36. cambio piastre dalla 85 alla 90 e ripetere dal punto 3. al 22.
37. cambio piastre dalla 91 alla 96 e ripetere dal punto 3. al 22.
38. wash in H2O
39. bleaching
40. wash in H2O
41. rilascio testa

-SEQUENZIATORE AUTOMATICO ABI PRISM 3100 (APPLIED BIOSYSTEM)

Parametri di corsa aggiustati per le nostre esigenze:

	Microsatelliti	Sequenze
Run temperature	60°C	50°C
Capillary fill volume	184	184
Current tolerance	100	100
Run current	100	100

Voltage tolerance	0,6	0,6
Pre run voltage	15	15
Pre run time	180	180
Injection voltage	3	1
Injection time	20	22
Run voltage	15	12,2
Numbers step	10	10
Voltage step int	60	60
Data delay time	1	1200
Run time	2000-3500s	3000-6500s

2. PRIMER UTILIZZATI IN QUESTO LAVORO

Tabella XI : Primer utilizzati in questo studio

PRIMER	FORWARD	REVERSE
19K21Sp6	ATCGCACGGGTTTTTAAGTC	AACCGCAGGTCTGTAAATGC
19K21T7	AAACCAGAAAAAGCCAACCA	GGCTAACCGACATTCACCTC
42K4Sp6	TTAGCAGGCTGAGGTCTCGT	CCTGCGGCTTAATTTGACTC
42K4T7	GAATGGTCCGGTGAAGTGTT	TTGCGTTCAAAGACTCGATG
55A5Sp6	GGGGTGACCCTTGCTAAGAT	TGAATCCATGTGTGCATGAG
55A5T7	CCCTGTGTCTGCATGGTATG	CTGCAAGCATTTGTTGGAAA
91F7Sp6	CATCGCACGGGTTTTTAAGT	CGAACCGCAGGTCTGTAAAT
91F7T7	GGTTTGAGCTGGGAGACAAA	ATTGGTGCAAAGGTCAAAGG
AY187627*	GAGGACTGAATTGGTTGAGGTC	GTTTCTCACCCGTATATAGGCCAAC
CH02C02a ^a	CTTCAAGTTCAGCATCAAGACAA	TAGGGCACACTTGCTGGTC
CH04f08*	ATTTGAGATTGGGGGTGGAC	ATTTCCCCGATTTAACCGTC
CH05d08*	TCATGGATGGGAAAAAGAGG	TGATTGCCACATGTCAGTGTT
CHVf1§	ATCACCACCAGCAGCAAAG	CATACAAATCAAAGCACAACCC
CHVf2§	TTTGTTTTTTCGAGCAGGAGC	TTTCACATTTCGGAGCATGAG
Hi02f12*	ACATGGCCGAAGACAATGAC	GTTTCAACCTTTATCCCTCCATCTTTC
Hi03c05*	GAAGAGAGAGGCCATGATAC	GTTTAACTGAACTTCAATCTAGG
Hi05c06*	TGCGTGTATGGTTGGTTTTG	TGTTTTCTTTGGTTTTAGTTGGTG
Hi07h02*	CAAATTGGCAACTGGGTCTG	GTTTAGGTGGAGGTGAAGGGATG
OPB12°	CCTTGACGCATCTACG	CCTTGACGCAGCTT
Hi07h02sonda	ACCTCCACCTACAGCCATTG	CTGCATTCCCAATTGTAGCC
T7	AATACGACTCACTATAG	
Sp6	ATTTAGGTGACACTATAG	

*Hidras Consortium (Silfverberg-Dilworth et al., 2006)

°Cheng et al., 1998

§Vinatzer et al., 2004

^aLiebhart et al., 2002