

MARCATORI MOLECOLARI





Come possiamo identificare questa grande eterogeneità biologica?



IDENTIFICARE

Identificare un organismo rappresenta l'elemento fondamentale per poter 'utilizzarlo' in attività applicative. Sapere che pianta abbiamo davanti, che tipo di alga vive in quel luogo e se una certa matrice ha determinate specie è fondamentale per la ricerca ma anche per molti settori produttivi.

SPECIE: in botanica la specie più considerata è quella morfologica in quanto viene descritta sulla base di tratti esteriori, macro e micro-morfologici. Non sempre i caratteri considerati sono sufficienti per distinguere due taxa!



Cypripedium calceolus,
Frauschuh



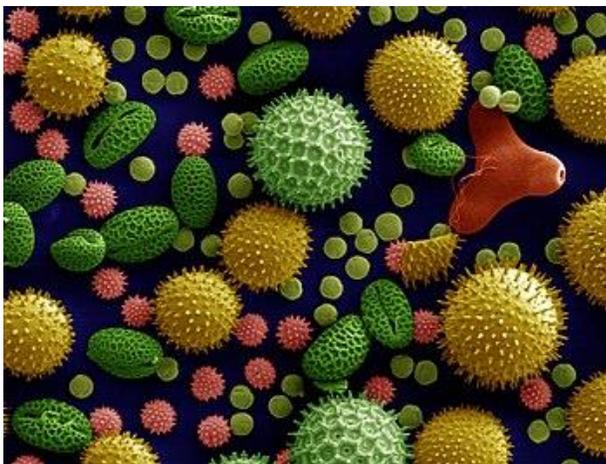
???

IDENTIFICARE

Per rendere efficiente il sistema di identificazione dei taxa e anche per poter effettuare dei confronti tra individui differenti sono stati sviluppati i marcatori. Esistono almeno 3 tipi di marcatori:

► **Marcatori morfologici** - caratteri esteriori che si possono rilevare sia con semplici osservazioni, sia con strumenti di ingrandimento. Spesso non è il singolo carattere ad essere discriminante ma è la co-presenza di numerosi tratti distintivi che permettono di identificare un taxa.

Criticità: 1) non sono molto numerosi e spesso non sono sufficienti per distinguere taxa affini; 2) dipendono dalla fenologia della pianta, dalle condizioni ambientali che agiscono sul fenotipo, possono essere soggettivi. Inoltre i tratti micromorfologici spesso richiedono strumenti di analisi come microscopi, competenze tecniche e buona conoscenza del gruppo di studio.

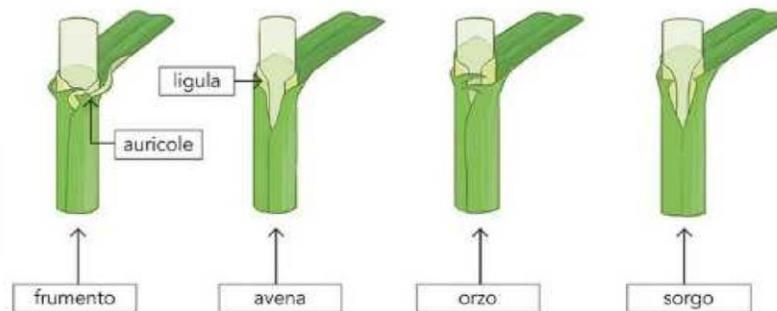


Esempi di caratteri micro-morfologici del polline

Auricole o orecchiette, appendici di diverso sviluppo e forma, posti alla base delle foglie. Insieme alla ligula rappresentano caratteri importanti per il riconoscimento delle specie. Assenti in alcune specie



Ligula: piccola membrana che assume diversi sviluppi nelle varie specie; può mancare e si trova dove la lamina si inserisce sulla guaina

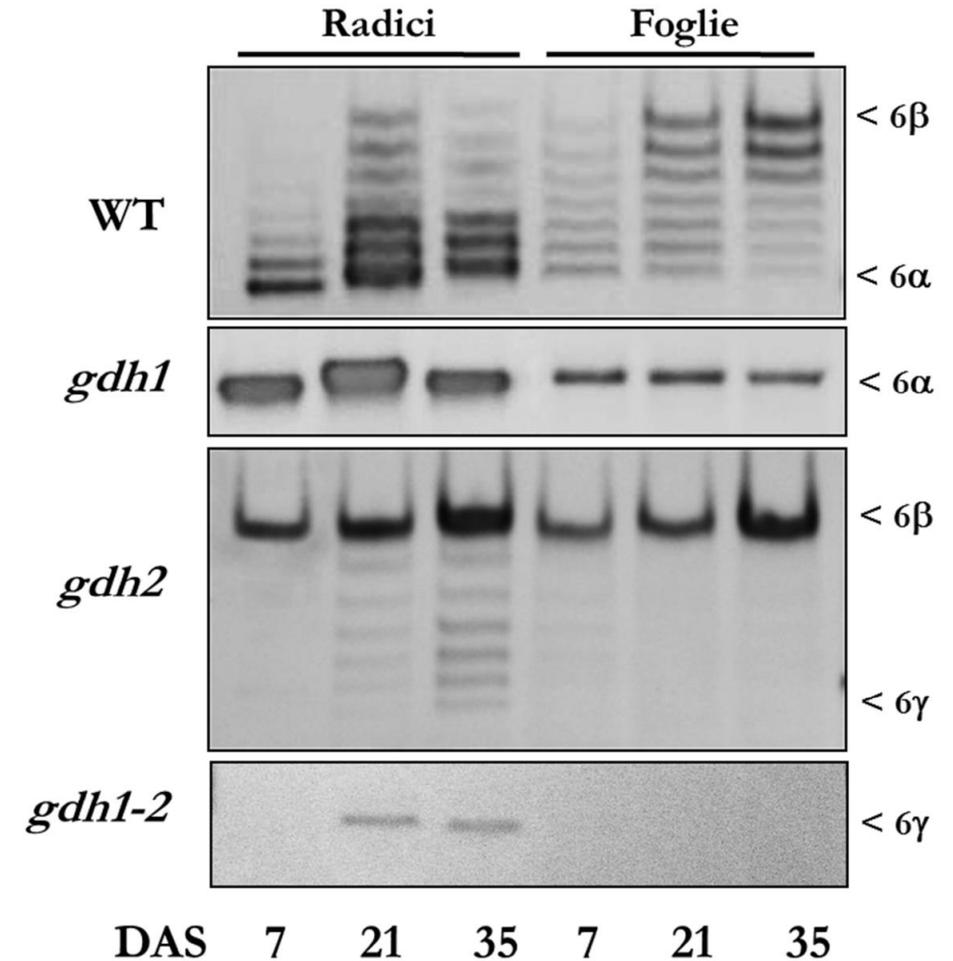


► **Marcatori biochimici.** Si tratta di marcatori legati a tratti molecolari 'espressi' e quindi possono riguardare proteine o loro prodotti. Spesso sono proteine ubiquitarie che possono presentare piccole variazioni tra diversi taxa. - gruppi sanguigni - isoenzimi - proteine (dell'endosperma, del plasma, del latte ecc.)

Gli isoenzimi (o isozimi) sono enzimi che catalizzano la stessa reazione, ma hanno una struttura differente legata a polimorfismi strutturali. Questo determina modifiche delle caratteristiche chimico-fisiche, del punto punto isoelettrico, delle variabili cinetiche, ecc

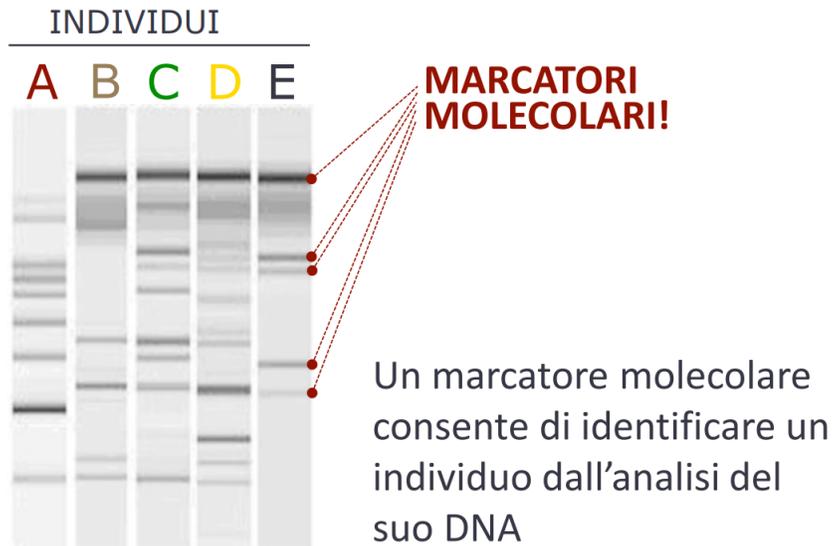
L'analisi degli isoenzimi viene svolta mediante elettroforesi in cui si possono visionare le diverse isoforme sulla base di diversi parametri come le dimensioni o il pH.

Nonostante siano stati utilizzati per molto tempo questi strumenti presentando diversi limiti come il ridotto numero di marcatori, la presenza di numerose copie di geni e quindi di proteine per lo stesso enzima, i ridotti livelli di polimorfismi in taxa più affini ecc.



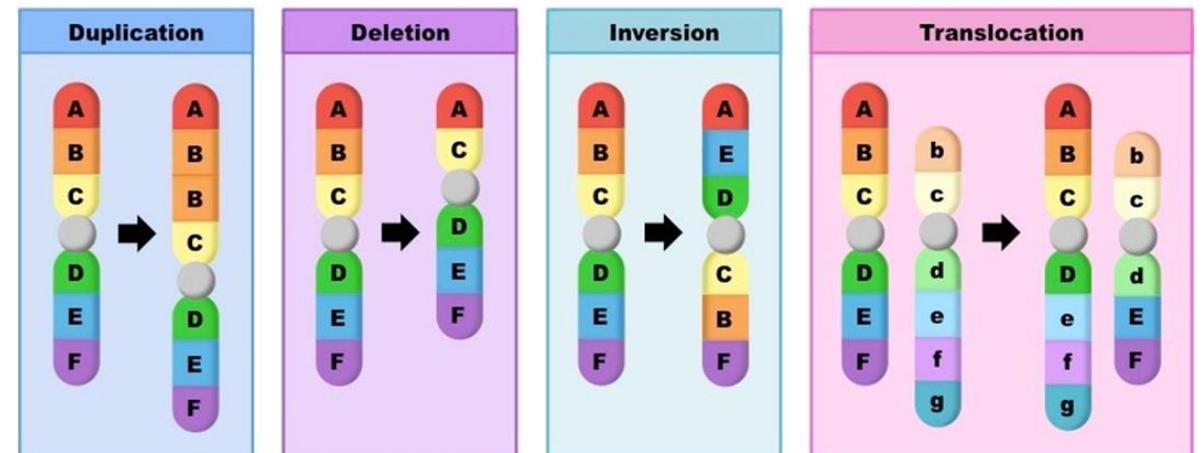
Es di isoenzima: NAD(H)-glutamate dehydrogenase

► **Marcatori molecolari.** I marcatori molecolari si riferiscono solitamente a caratteri legati al genoma rilevabili con tecniche di biologia molecolare capaci di contraddistinguere in modo caratteristico ed inequivocabile un organismo



I marcatori molecolari non sono associati necessariamente ad una variazione misurabile del fenotipo (variazione neutra di DNA) per questa ragione due taxa morfologicamente identici potrebbero presentare diversità genetica così come due individui morfologicamente diversi potrebbero presentare alcuni marcatori del DNA identici.

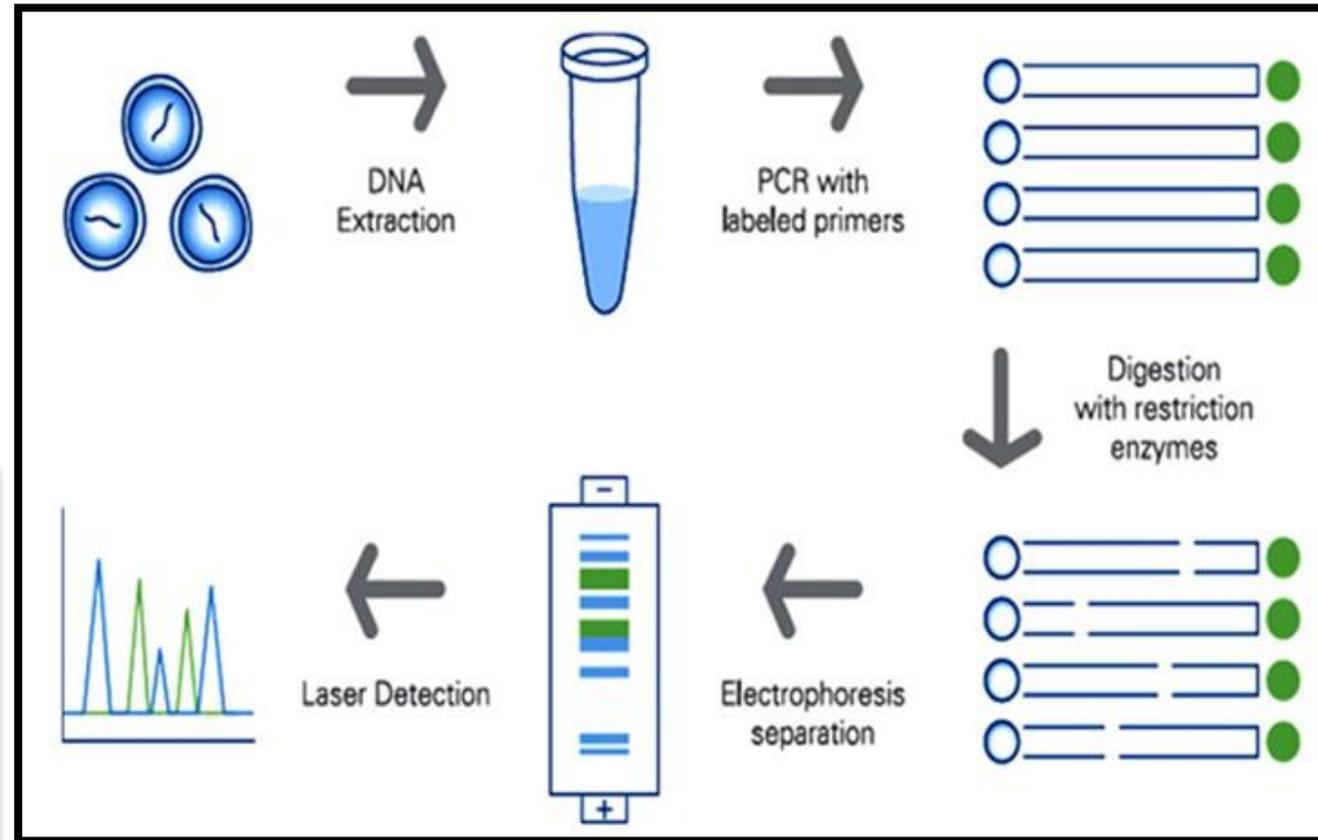
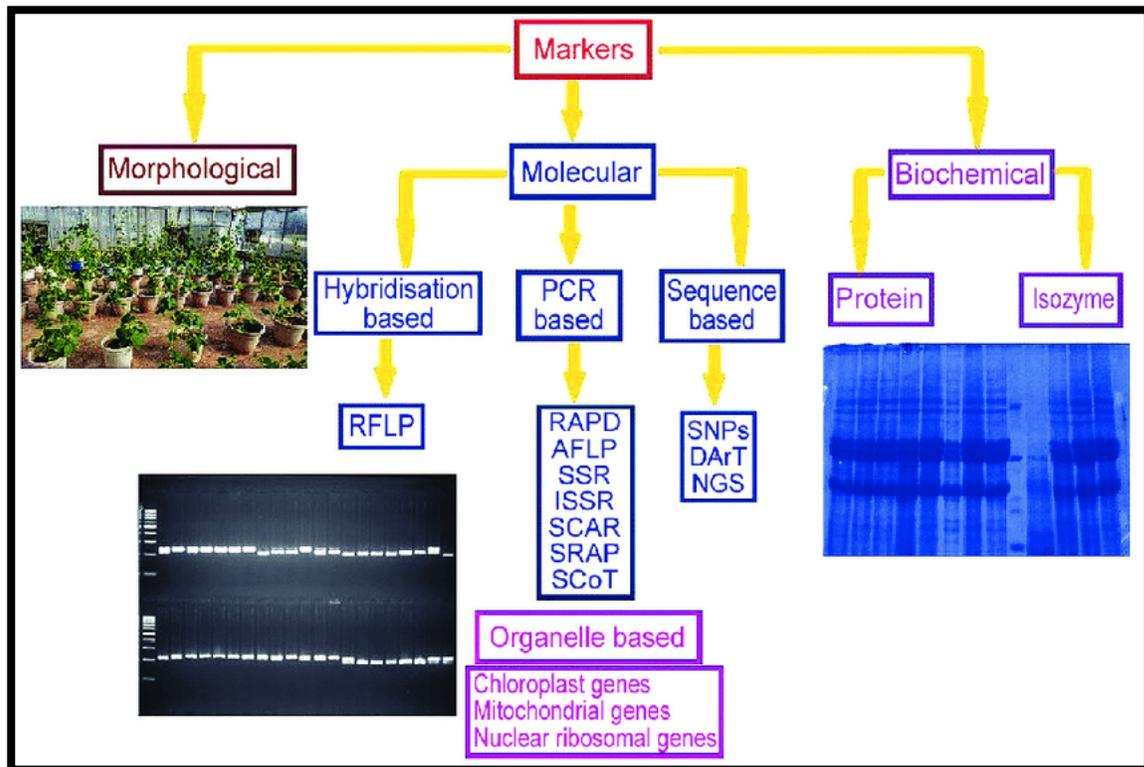
I marcatori molecolari nascono grazie alle MUTAZIONI, fenomeni che avvengono naturalmente e che portano a variazioni nella sequenza del DNA noti come polimorfismi. Più è elevata la frequenza di mutazioni, più il DNA oggetto di tali modifiche presenterà dei polimorfismi e risulterà quindi un ottimo marcatore molecolare capace di distinguere taxa che sono stati oggetto di mutazioni differenti.



Il marcatore molecolare PERFETTO

Un buona marcatore molecolare deve essere:

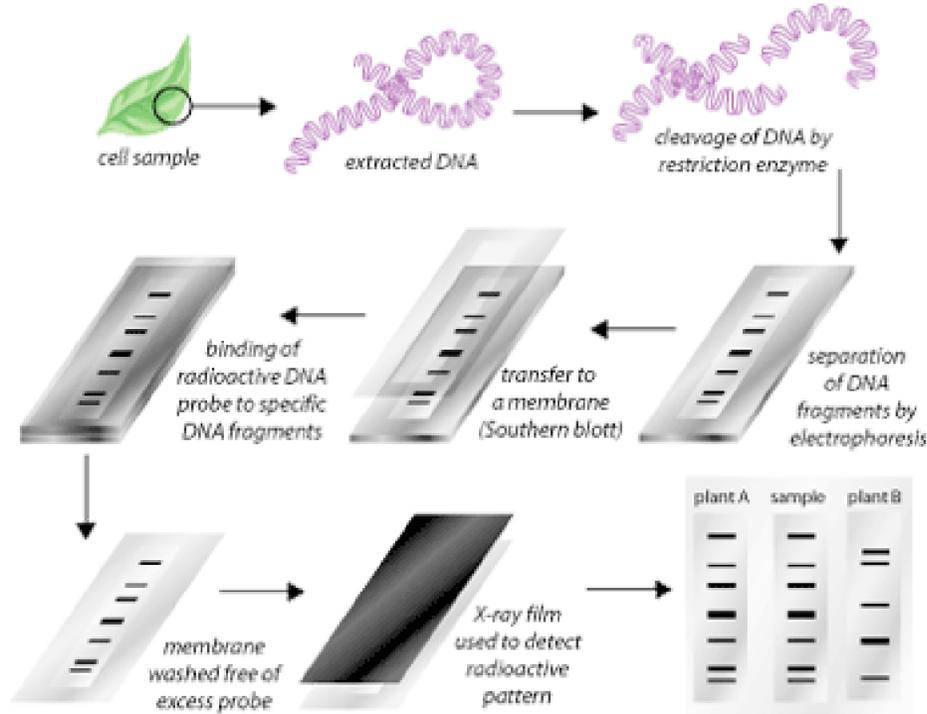
- Altamente polimorfico
- Non essere soggetto a pressione selettiva
- Codominanze per eventuali test di parentela
- Facile da analizzare
- Economico e automatizzabile



L'avvento della PCR ha completamente le ricerche verso i marcatori molecolari del DNA sia per semplicità di analisi, sia per valore delle informazioni ricavabili

Si è passati da dall'analizzare il DNA sfruttando gli enzimi di restrizioni che tagliano frammenti di DNA a seconda che vi siano siti di restrizioni e meno all'amplificazione di regioni (più o meno specifici) mediante primer dedicati a sfruttando la PCR.

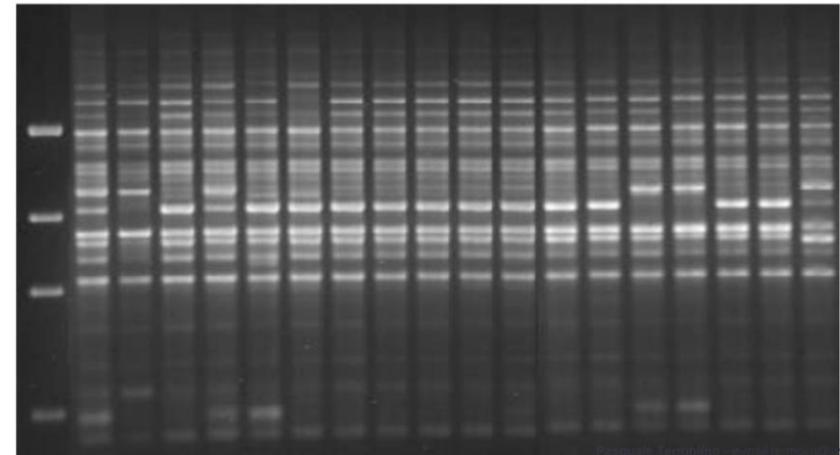
RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism



RAPD Random Amplified Polymorphic

Questo approccio sfrutta frammenti di DNA amplificati mediante PCR utilizzando brevi primer (generalmente 10 bp). Questi oligonucleotidi fungono da innesco sia forward che reverse, e di solito sono in grado di amplificare da 1 a 10 frammenti per ciascun campione. I frammenti amplificati hanno in media dimensioni da 0,5 a 5 kb e vengono separati mediante elettroforesi.

Genomi differenti avranno siti di appaiamento dei primer diversi e/o più o meno distanti pertanto genereranno profili molecolari diversi.

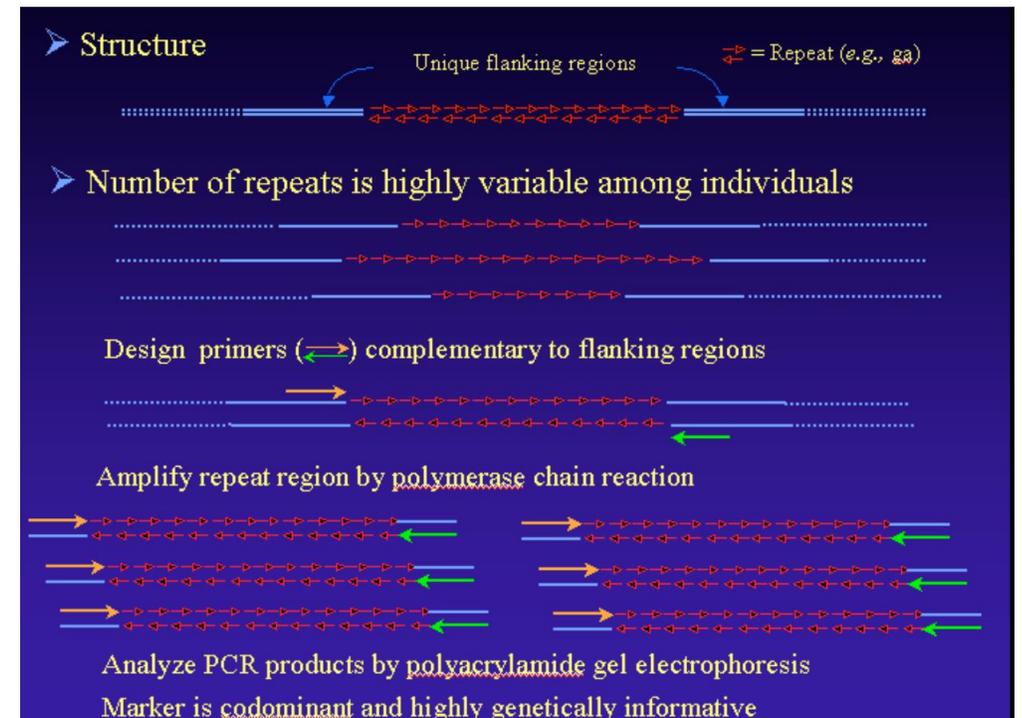


DA MARKERS ASPECIFICI A SPECIFICI

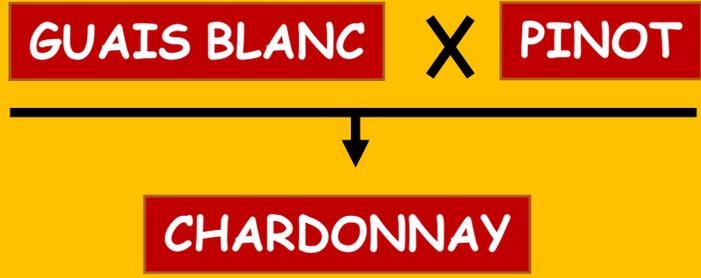
Con la PCR e il sequenziamento la conoscenza dei genomi è diventata sempre più accessibile. E' possibile amplificare un determinato gene o una sua porzione sfruttando primer specifici. Considerando che qualsiasi frammento di DNA è potenzialmente eleggibile come marcatore molecolare sono stati sviluppati marcatori 'sito specifici' con diversi gradi di polimorfismo. Questo processo guidò la transizione dai marcatori molecolari discontinui e aspecifici ai marcatori molecolari specifici.

Marcatori Molecolari Microsatelliti o SSR (Simple Sequence Repeats) sono regioni ripetute del DNA presenti in molti genomi. Si tratta di porzioni non codificanti che NON sono sotto pressione selettiva; questo li rende ottimi marker. Spesso il polimorfismo è legato al numero di unità ripetute.

Conoscendo le regioni fiancheggianti del microsatelliti è possibile sintetizzare primer specifici per amplificarlo. Successivamente usando un sistema elettroforetico o un analizzatore di frammenti è possibile valutare la dimensione del microsatellite in quel determinato genoma. Analizzando più regioni microsatelliti è possibile avere il DNA fingerprint di un taxa



MARCATORI	GENTORI		FIGLIO
	Pinot	Gouais	Chardonnay
VVMD5	228	234	234
	238	240	238
VVMD6	205	194	205
	205	214	214
VVMD7	239	239	239
	243	249	243
VVMD14	222	222	222
	241	234	234
VVMD21	249	249	249
	249	249	249
VVMD24	216	210	210
	218	210	218
VVMD25	243	243	243
	253	259	259
VVMD26	249	249	249
	255	251	255
VVMD27	185	181	181
	189	179	189



Bowers et al., 1999 - Science 285:1562-65.

Vantaggi

- Sono marcatori codominanti, molto abbondanti nei genomi eucariotici e spesso distribuiti su più cromosomi.
- Se il genoma è diploide consentono di fare analisi di parentela.
- Sono poco costosi e si possono analizzare in batteria usando per esempio primer marcati.

Svantaggi

Se si vuole un'ampia copertura del genoma è necessario mettere insieme più microsatelliti. Dato che prevedono amplificazione di una regione ripetuta la polimerasi potrebbe inserire errori. Se si stima solo la dimensione non si possono escludere mutazioni come sostituzioni NON rilevate!

DNA BARCODING

PAUL HEBERT ebbe l'idea di individuare una regione di DNA universale da utilizzare come marcatore univoco di ogni taxa!. Nei metazoi fu scelta la *cox1*

THE ROYAL SOCIETY

FirstCite®
e-publishing

Received 29 July 2002
Accepted 30 September 2002
Published online

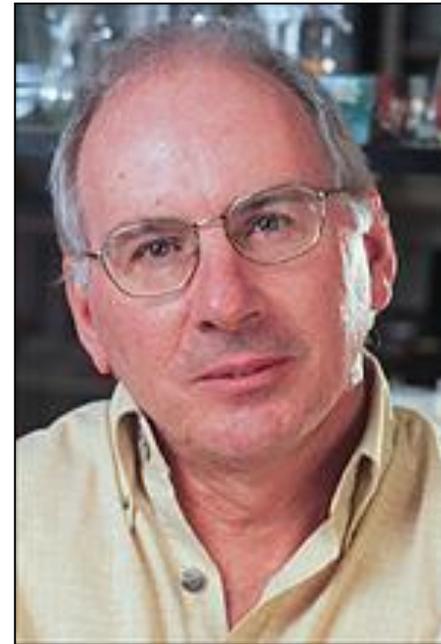
Biological identifications through DNA barcodes

Paul D. N. Hebert*, Alina Cywinska, Shelley L. Ball
and Jeremy R. deWaard

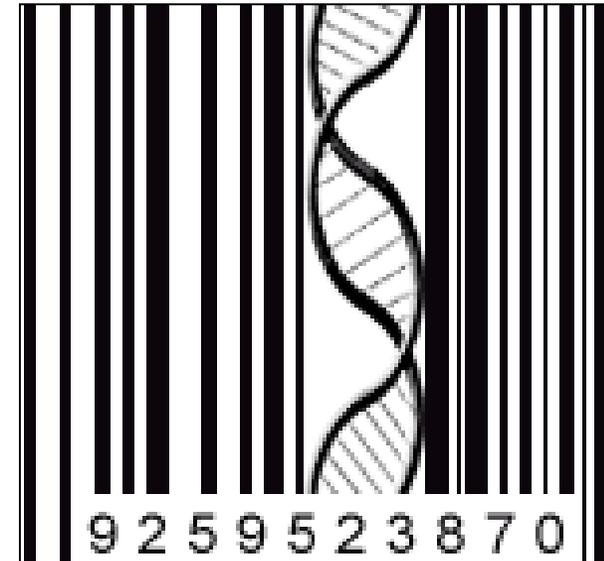
Department of Zoology, University of Guelph, Guelph, Ontario N1G 2W1, Canada

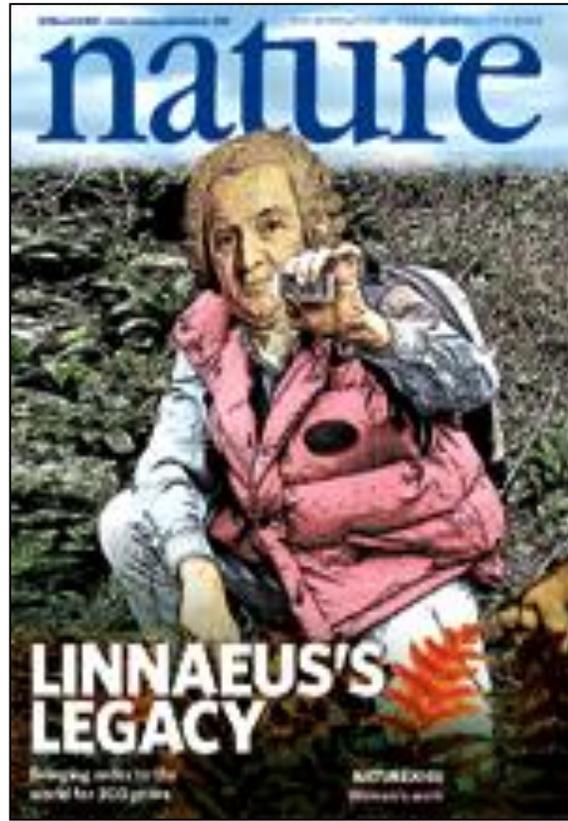
Although much biological research depends upon species diagnoses, taxonomic expertise is collapsing. We are convinced that the sole prospect for a sustainable identification capability lies in the construction of systems that employ DNA sequences as taxon 'barcodes'. We establish that the mitochondrial gene cytochrome *c* oxidase I (COI) can serve as the core of a global bioidentification system for animals. First, we demonstrate that COI profiles, derived from the low-density sampling of higher taxonomic categories, ordinarily assign newly analysed taxa to the appropriate phylum or order. Second, we demonstrate that species-level assignments can be obtained by creating comprehensive COI profiles. A model COI profile, based upon the analysis of a single individual from each of 200 closely allied species of lepidopterans, was 100% successful in correctly identifying subsequent specimens. When fully developed, a COI identification system will provide a reliable, cost-effective and accessible solution to the current problem of species identification. Its assembly will also generate important new insights into the diversification of life and the rules of molecular evolution.

Keywords: molecular taxonomy; mitochondrial DNA; animals; insects; sequence diversity; evolution

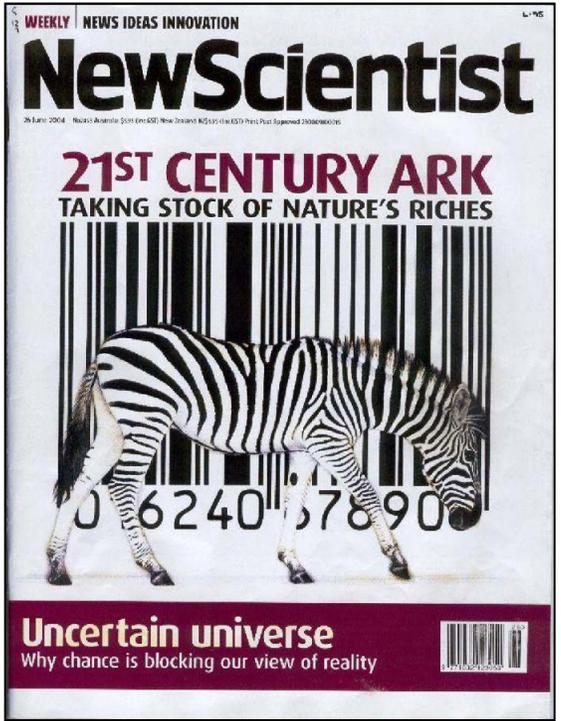
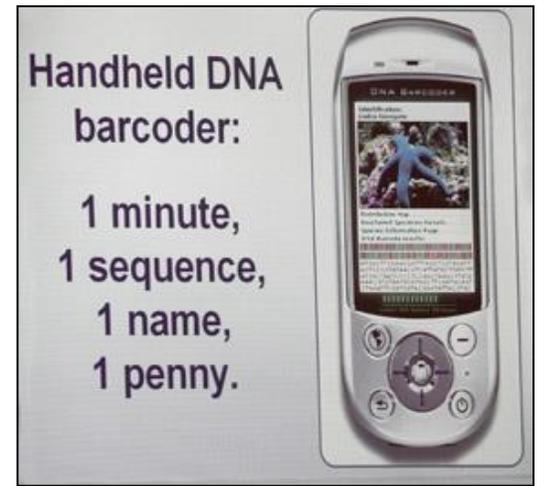


Paul D.N.
Hebert





il DNA *barcoder*



Nature 446, 231, 15 March 2007

il *tricorder*

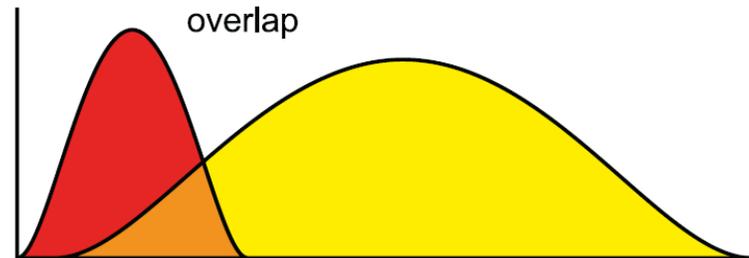
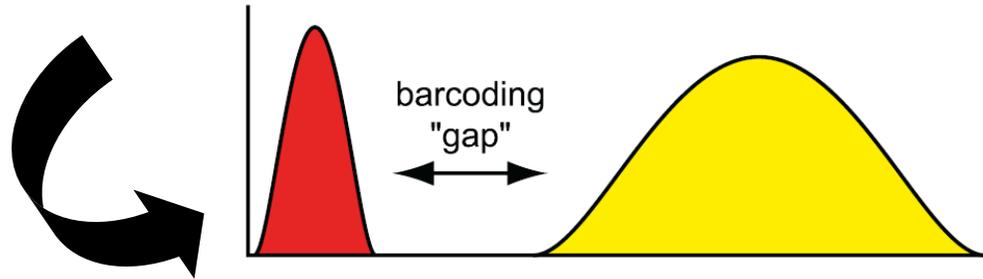


DNA BARCODING

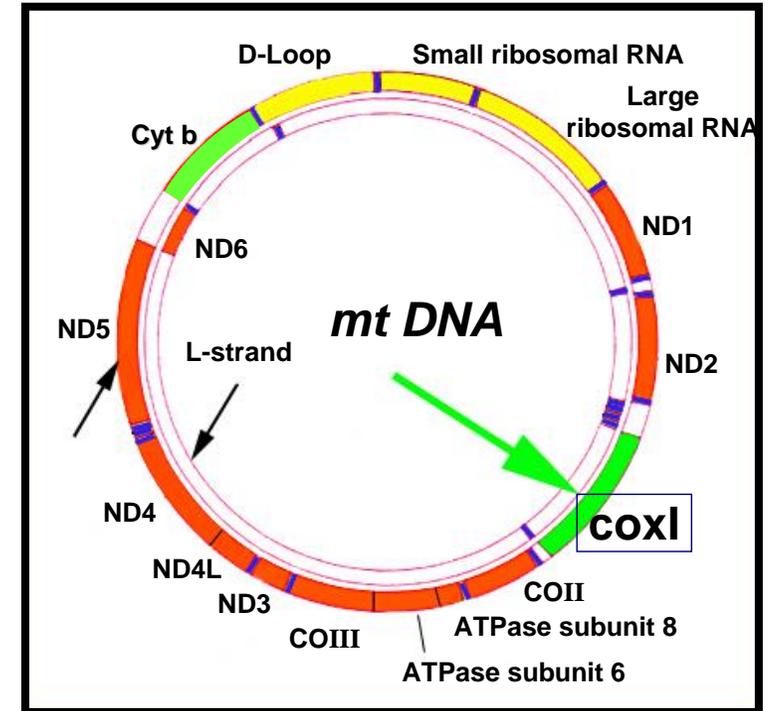
Idealmente un marcatore universal dovrebbe avere le seguenti caratteristiche:

- Sequenza di DNA polimorfica
- Regioni fiancheggianti conservate
- Facilmente amplificabile
- Dimensioni idonee per il sequenziamento

- Bassa variabilità intraspecifica
- Alta diversità interspecifica

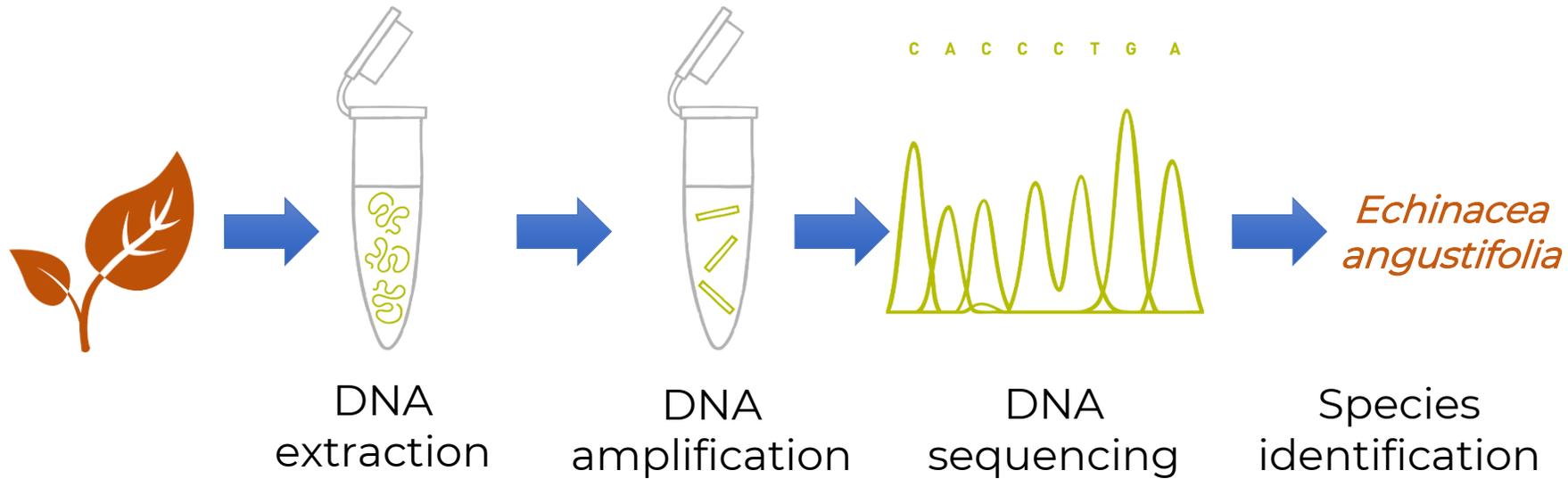


From Meyer and Paulay, PLoS Biology, 2005



Cytochrome c Oxidase subunit 1

Come eseguire un'analisi DNA barcoding?



La parte di amplificazione e sequenziamento è semplice e automatico. Una volta ricavata la sequenza di DNA è tuttavia necessario eseguire un'analisi bioinformatica volta a confrontare la sequenza ottenuta con una banca dati capace di restituire il nome del taxa.

Una delle possibilità è sfruttare banche dati pubbliche come genbank in cui sono già presenti numerose sequenze barcode associate a taxa precedentemente classificati.

The screenshot shows the NCBI Nucleotide database search results for the query "echinacea rbcl". The search results are displayed in a table with columns for Species, Summary, and Filters. The top result is for *Echinacea pallida* ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, with a 549 bp linear DNA sequence. The second result is for *Echinacea purpurea* partial rbcl gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, specimen voucher FEM_DBE_020, with a 148 bp linear DNA sequence. The search results are filtered by taxon, showing top organisms like *Echinacea purpurea* (16), *Echinacea pallida* (8), *Echinacea angustifolia* (7), *Echinacea laevigata* (3), and *Echinacea speciosa* (2).

II Database barcode of life



RESEARCH PROGRAM DETAILS

PROGRAM 1
BARCODE 500K
Cost: \$125 million
Timeline: 2010-2015
Status: Complete in August 2015
Goals:

- Deliver DNA barcode coverage for 0.5 million species.
- Develop the informatics platform and analytical protocols required for the development of the DNA barcode reference library.
- Establish a core facility to provide sequencing and informatics support.

PROGRAM 2
BIOSCAN
Cost: \$180 million
Timeline: 2019-2026
Status: Launched June 2019
Goals:

- Deliver DNA barcode coverage for 2 million species.
- Activate biomonitoring for one or more ecoregions in each participating nation & codify species interactions for these sites.
- Develop informatics support for high-throughput sequencing.
- Promote **applications** of DNA barcoding.

PROGRAM 3
PLANETARY BIODIVERSITY MISSION
Cost: \$500 million
Timeline: 2026-2045
Status: Activation in January 2026
Goals:

- Complete the census of all multicellular species.
- Establish a global biosurveillance program.
- Construct a 'library of life' by preserving DNA extracts from all species.

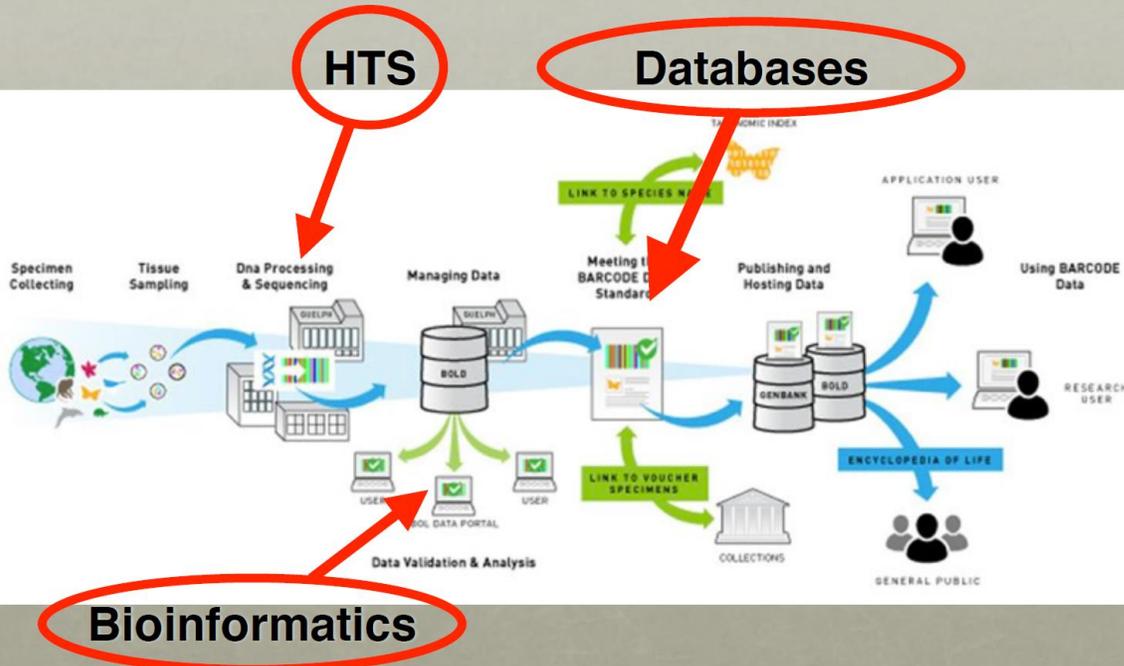
KEY OUTCOMES
 Learn more about how iBOL programs have made an impact, provided resources, and communicated ideas.

IMPACT	RESOURCES	COMMUNICATION
DNA BARCODING APPLICATIONS THAT ADDRESS SOCIETAL CHALLENGES	SPECIMEN COLLECTION AND DIGITIZATION ACROSS NATURAL HISTORY COLLECTIONS	BIENNIAL CONFERENCE SERIES WITH GLOBAL REPRESENTATION
TRANSFORM BIODIVERSITY SCIENCE BY GROWING RESEARCH OUTPUT	INFORMATICS PLATFORMS FOR ANALYSIS AND SECURE DATA SHARING	QUARTERLY ONLINE NEWSLETTER WITH DIVERSE CONTRIBUTORS AND LARGE READERSHIP
SUPPORT DATA-DRIVEN POLICY CHANGE AND CAPACITY BUILDING	SEQUENCING FACILITY FOR THE GENERATION OF HIGH-QUALITY BARCODES	SPECIAL ISSUE PUBLICATIONS SURROUNDING CONFERENCE AND WORKSHOP MEETINGS

L'innovazione DNA BARCODING

La prima novità dell'approccio DNA barcoding risiede nella automazione. Il processo infatti è lineare ed è possibile ripeterlo in modo automatico e sequenziale. Centri di ricerca e gruppi di scienziati e di tassonomi possono lavorare in modo congiunto applicando procedure standard. Le informazioni sono facilmente scambiabili

It is a system well-suited to automation



Una seconda innovazione riguarda la capacità di mettere a sistema 3 tecnologie nel momento giusto!

MOLECOLARIZZAZIONE: E' un sistema di identificazione che sfrutta le conoscenze sul DNA ed in questi anni la genomica fornisce notevoli informazioni

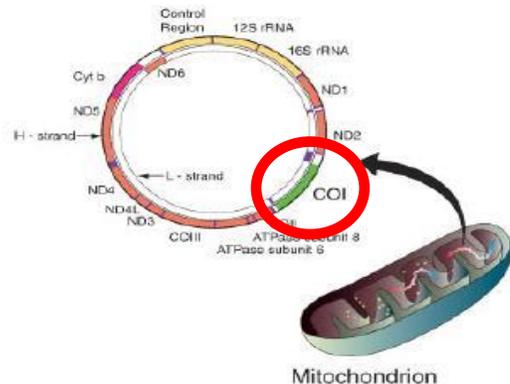
COMPUTERIZZAZIONE: La potenza di calcolo informatico, lo spazio dati e le interfacce di accesso sono semplici e abbordabili anche da piccoli centri.

STANDARDIZZAZIONE: vi è una chiara esigenza di standardizzare gli approcci di analisi e la possibilità di avere un solo marcatore universale rappresentava un grande traguardo

DNA BARCODING PER IL MONDO VEGETALE

Nonostante la COX1 sia presente anche nel DNA mitocondriale delle piante questo marcatore non viene utilizzato in quanto il genoma mitocondriale nelle piante ricombina facilmente rendendo difficile l'amplificazione di determinati siti-geni. A ciò si aggiunge che i livelli di mutazione di *cox1* per molte famiglie vegetali sono molto bassi pertanto questo marcatore è poco discriminante

Cytochrome Oxidase 1



EVOLUZIONE LENTA - COMPLESSA DEI GENI MITOCONDRIALI.

Wolfe et al., 1987 PNAS, 84: 9054.

Mower et al., 2007 BMC Evol. Biol 7: 135.



**NON APPLICABILE
ALLE PIANTE**

I tassonomi vegetali si confrontano sulla possibilità di individuare un marcatore universale anche per le piante. Non è semplice trovare un frammento di DNA con le stesse caratteristiche della cox1!



TAXONOMY

Wanted: A Barcode for Plants

Quick-and-easy DNA identification of animals is under way, but plants are proving harder to pigeonhole

ELIZABETH PENNISI 12 OCTOBER 2007 VOL 318 SCIENCE

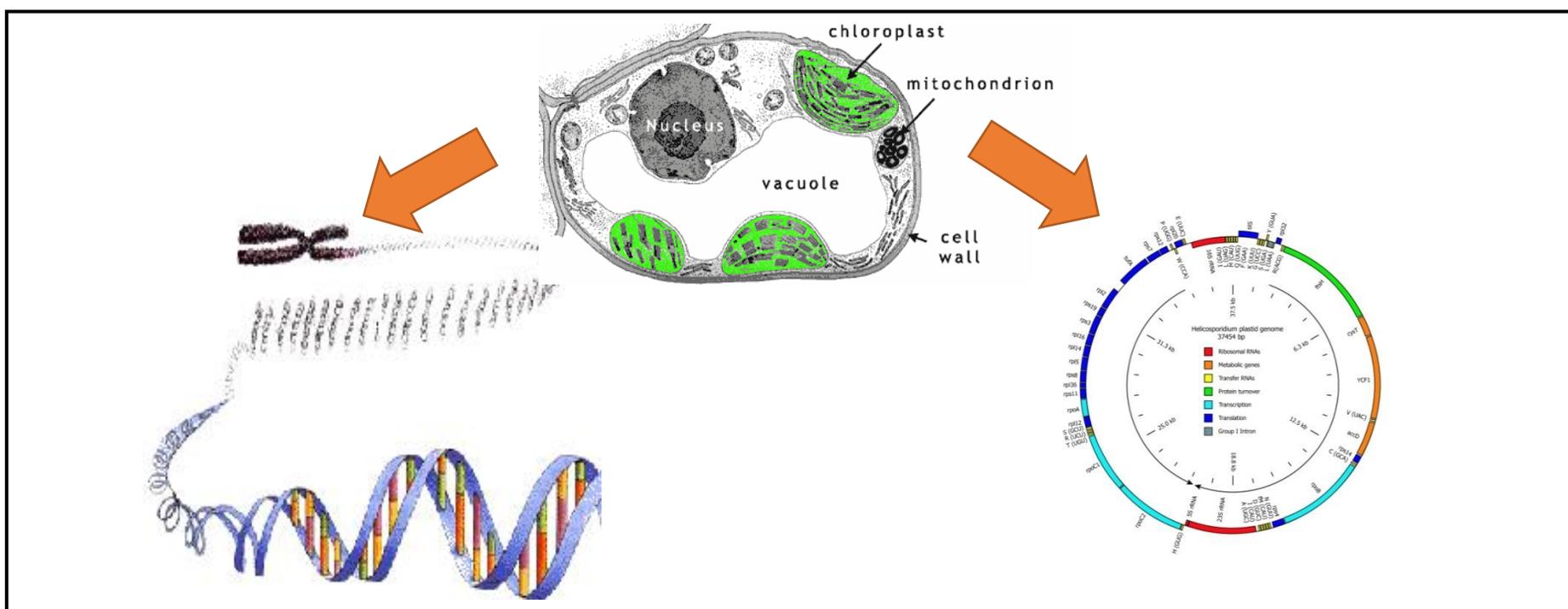
Sono stati eseguite valutazioni con molti marcatori a diverso grado tassonomico.

In pochi anni sono stati pubblicati lavori su intere flore territoriali, su gruppi tassonomici più o meno critici e su tipologie di DNA variabili.

Si ricorda che il DNA barcoding non necessariamente riconosce una specie! La specie è infatti un concetto artificiale e a seconda che sia una morfospécie o un genotipo si possono avere livelli di identificazione molecolare piuttosto differenti!

Sono stati eseguite valutazioni con molti marcatori a diverso grado tassonomico.

In pochi anni sono stati pubblicati lavori su intere flore territoriali, su gruppi tassonomici più o meno critici e su tipologie di DNA variabili.



NUCLEAR DNA BARCODING

ITS > 40.000 SEQUENCES GIÀ DISPONIBILI.

PROBLEMI: BASSA VARIABILITÀ – PRESENZA DI PARALOGHI E STRUTTURE SECONDARIE.
- NECESSITA' DI NUOVI MARKERS !

PLASTIDIAL DNA BARCODING

- 8 O PIÙ GENI ESPRESSI: matK, rpoB, rbcL, ECC.

(Ford et al., 2009 Bot J Linn Soc. 159:1-11)

- REGIONI SPAZIATRICI (Es. trnH-psbA).

PERCHÉ IL GENOMA PLASTIDIALE ?

- Presente in elevato numero di copie
- Ben conosciuto
- Non è ricombinante
- Genoma strutturalmente stabile

Le moderne tecnologie di sequenziamento consentono anche di sequenziare interamente genomi plastidiali in poche ore e per molte specie sono già disponibili. Questo ha consentito di eseguire delle stime sulla variabilità dei diversi marcatori tra taxa filogeneticamente più o meno lontani

Posizione di alcuni marcatori candidati come “DNA barcode”

rbcl

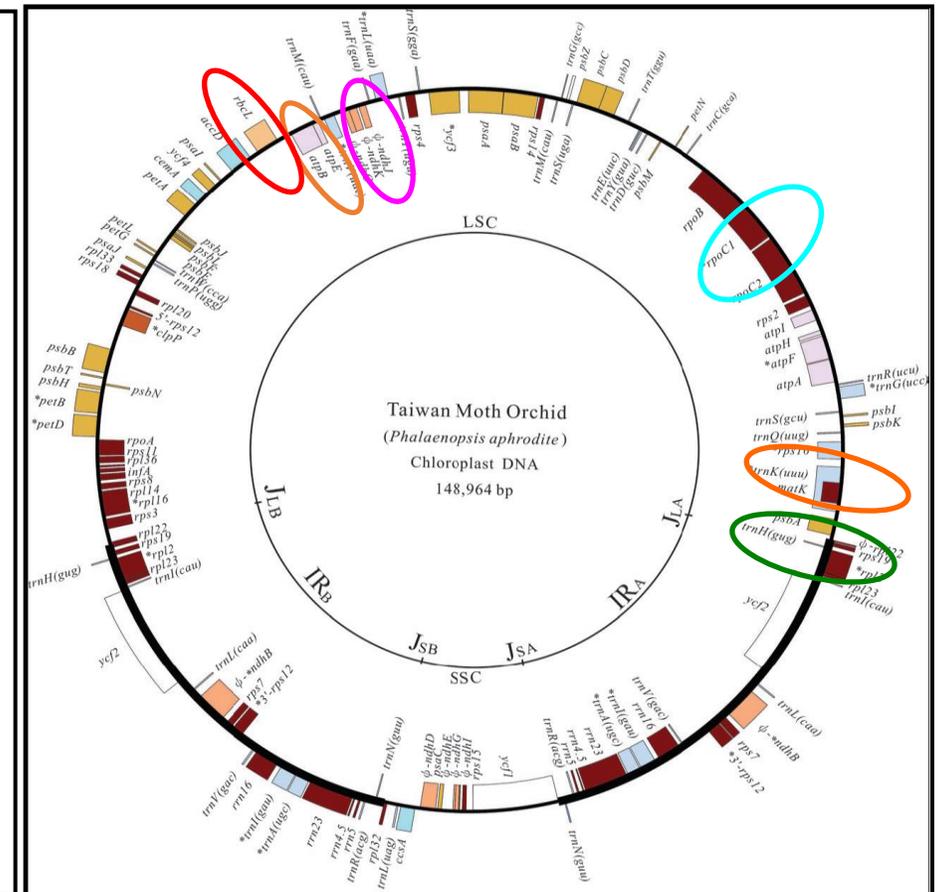
atpB

rpoC1

ndhJ

trnH-psbA

matK



A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcL* Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region

W. John Kress*, David L. Erickson

Department of Botany, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington, D. C., United States of America

Background. A useful DNA barcode requires sufficient sequence variation to distinguish between species and ease of application across a broad range of taxa. Discovery of a DNA barcode for land plants has been limited by intrinsically lower rates of sequence evolution in plant genomes than that observed in animals. This low rate has complicated the trade-off in finding a locus that is universal and readily sequenced and has sufficiently high sequence divergence at the species-level. **Methodology/Principal Findings.** Here, a global plant DNA barcode system is evaluated by comparing universal application and degree of sequence divergence for nine putative barcode loci, including coding and non-coding regions, singly and in pairs across a phylogenetically diverse set of 48 genera (two species per genus). No single locus could discriminate among species in a pair in more than 79% of genera, whereas discrimination increased to nearly 88% when the non-coding *trnH-psbA* spacer was paired with one of three coding loci, including *rbcL*. *In silico* trials were conducted in which DNA sequences from GenBank were used to further evaluate the discriminatory power of a subset of these loci. These trials supported the earlier observation that *trnH-psbA* coupled with *rbcL* can correctly identify and discriminate among related species. **Conclusions/Significance.** A combination of the non-coding *trnH-psbA* spacer region and a portion of the coding *rbcL* gene is recommended as a two-locus global land plant barcode that provides the necessary universality and species discrimination.

Use of DNA barcodes to identify flowering plants

W. John Kress^{*†}, Kenneth J. Wurdack^{*‡}, Elizabeth A. Zimmer^{*}, Lee A. Weigt[‡], and Daniel H. Janzen[§]

^{*}Department of Botany and [†]Laboratories of Analytical Biology, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, P.O. Box 37012, Washington, DC 20013-7012; and [‡]Department of Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104

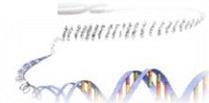
Contributed by Daniel H. Janzen, April 15, 2005

Methods for identifying species by using short orthologous DNA sequences, known as "DNA barcodes," have been proposed and initiated to facilitate biodiversity studies, identify juveniles, associate sexes, and enhance forensic analyses. The cytochrome c oxidase 1 sequence, which has been found to be widely applicable in animal barcoding, is not appropriate for most species of plants because of a much slower rate of cytochrome c oxidase 1 gene evolution in higher plants than in animals. We therefore propose the nuclear internal transcribed spacer region and the plastid *trnH-psbA* intergenic spacer as potentially usable DNA regions for applying barcoding to flowering plants. The internal transcribed spacer is the most commonly sequenced locus used in plant phylogenetic investigations at the species level and shows high levels of interspecific divergence. The *trnH-psbA* spacer, although short (~450-bp), is the most variable plastid region in angiosperms and is easily amplified across a broad range of land plants. Comparison of the total plastid genomes of tobacco and deadly nightshade enhanced with trials on widely divergent angiosperm taxa, including closely related species in seven plant families and a group of species sampled from a local flora encompassing 50 plant families (for a total of 99 species, 80 genera, and 53 families), suggest that the sequences in this pair of loci have the potential to discriminate among the largest number of plant species for barcoding purposes.

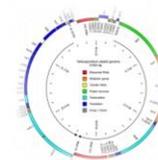


PLANT DNA BARCODING

ITS



spaziatore *trnH-psbA*



RICERCHE COMPARATIVE

Die loci potrebbero essere sufficienti o al massimo 3! E' invece difficile raggiungere il potere discriminante con un solo marcatore come per la *cox1* dei metazoi.

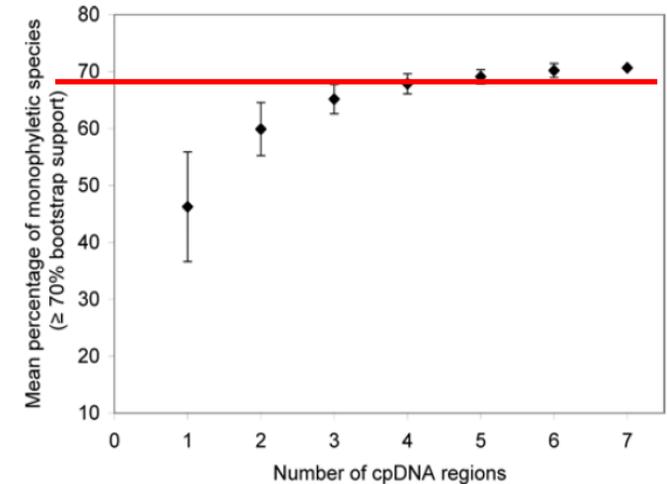
OPEN ACCESS Freely available online



Multiple Multilocus DNA Barcodes from the Plastid Genome Discriminate Plant Species Equally Well

Aron J. Fazekas^{1,3*}, Kevin S. Burgess², Prasad R. Kesanakurti¹, Sean W. Graham^{3,3}, Steven G. Newmaster¹, Brian C. Husband¹, Diana M. Percy³, Mehrdad Hajibabaei⁴, Spencer C. H. Barrett²

¹ Department of Integrative Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada, ² Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada, ³ UBC Botanical Garden and Centre for Plant Research, and Department of Botany, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada, ⁴ Biodiversity Institute of Ontario, Department of Integrative Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada

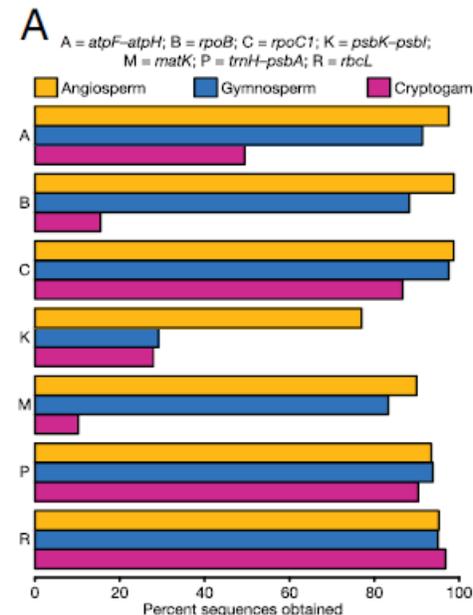


A DNA barcode for land plants

CBOL Plant Working Group¹

12794–12797 | PNAS | August 4, 2009 | vol. 106 | no. 31

907 samples: 445 angiosperme, 38 gimnosperme, 67 crittogame



Man mano che si popolano i database le conoscenze sulla variabilità dei marcatori aumentano. Incrementano anche le conoscenze legate alla stabilità delle regioni fiancheggianti, alla lunghezza dei geni o spaziatori marker e alla tipologia di polimorfismi.

LETTERS

The nature of plant species

Loren H. Rieseberg¹, Troy E. Wood¹ & Eric J. Baack¹

Nature (2006) 440, 524-527

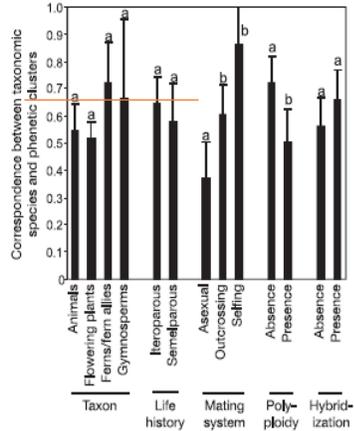
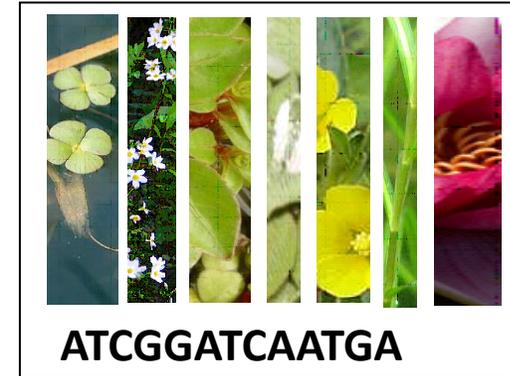


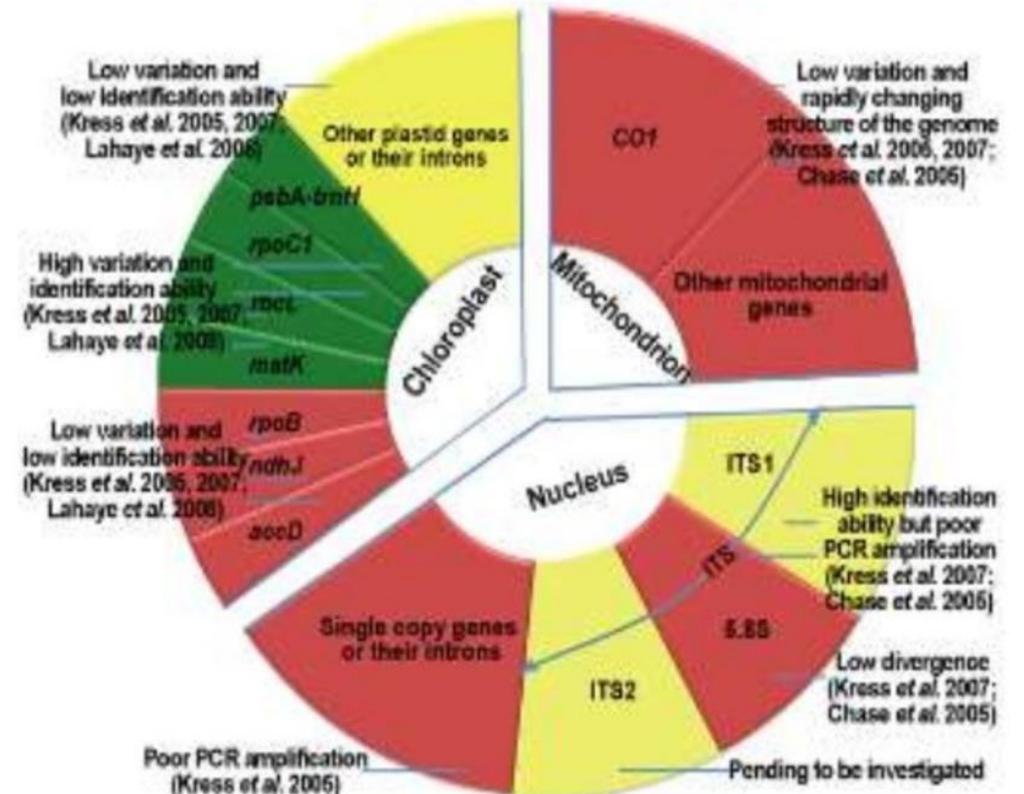
Figure 1 | Proportion of species taxa that correspond directly to phenotypic clusters compared on the basis of taxon, life history, mating system, polyploidy and contemporary hybridization. Refer also to Table 1. For each

Many botanists doubt the existence of plant species¹⁻⁵, viewing them as arbitrary constructs of the human mind, as opposed to discrete, objective entities that represent reproductively independent lineages or 'units of evolution'. However, the discreteness of plant species and their correspondence with reproductive communities have not been tested quantitatively, allowing zoologists to argue that botanists have been overly influenced by a few 'botanical horror stories', such as dandelions, blackberries and oaks^{6,7}. Here we analyse phenetic and/or crossing relationships in over 400 genera of plants and animals. We show that although discrete phenotypic clusters exist in most genera (>80%), the correspondence of taxonomic species to these clusters is poor (<60%) and no different between plants and animals. Lack of congruence is caused by polyploidy, asexual reproduction and over-differentiation by taxonomists, but not by contemporary hybridization. Nonetheless, crossability data indicate that 70% of taxonomic species and 75% of phenotypic clusters in plants correspond to reproductively independent lineages (as measured by postmating isolation), and thus represent biologically real entities. Contrary to conventional wisdom⁸, plant species are more likely than animal species to represent reproductively independent lineages.



Mettendo insieme tutte le conoscenze sulla variabilità dei diversi marcatori nelle specie comuni, nei gruppi critici e nei taxa completamente sequenziati emerge che comunque il potere discriminante 'generale' del DNA barcoding delle piante è pari a circa il 70%. È però possibile abbinare marcatori diversi a seconda dell'esigenza! Questo tuttavia rende un po' meno universale l'approccio.

OGGI SI CONSIDERA COME CORE BARCODE IL MARCAOTRE RBCL COMBINATO CON MATK A CUI SI AGGIUNGE LO SPAZIATORE TRNH-PSBA PER DISTINGUERE TAXA MOLTO AFFINI



LE NUMEROSE APPLICAZIONI

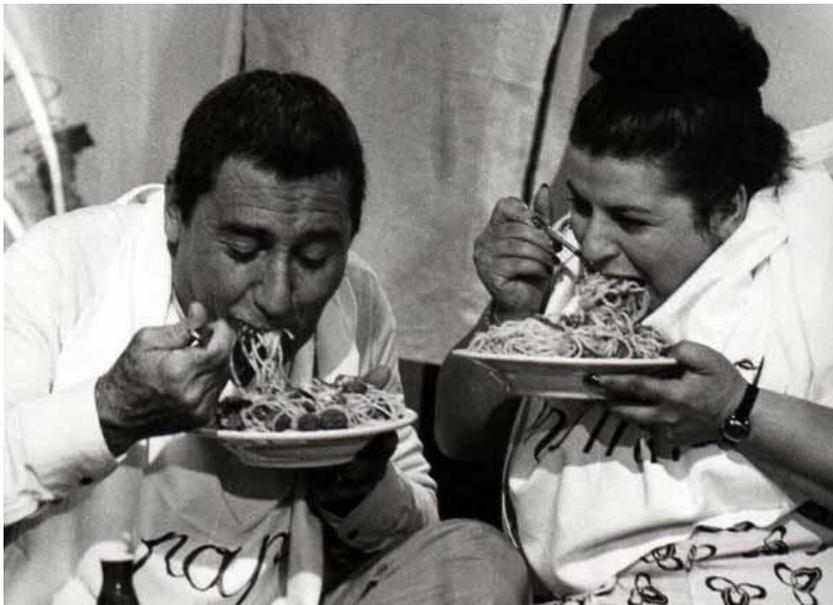
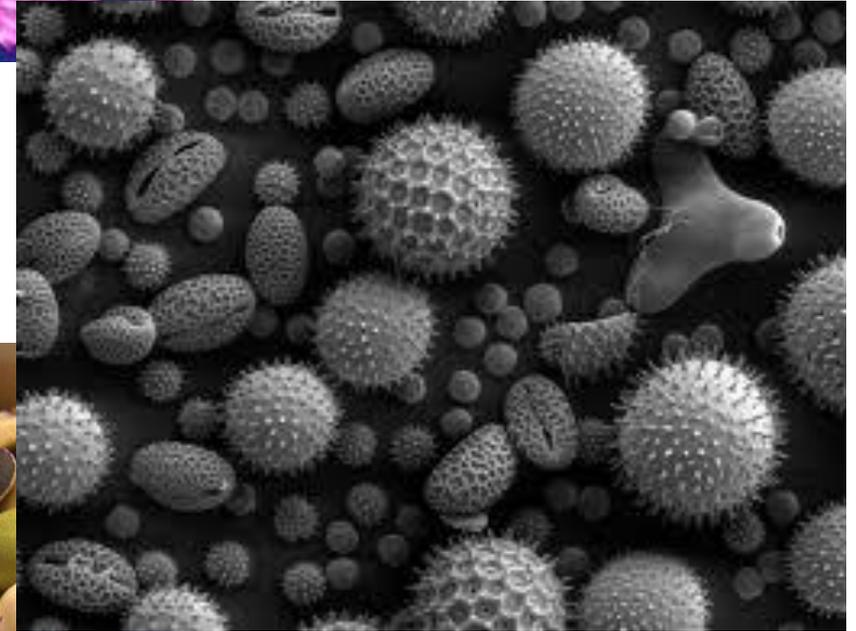
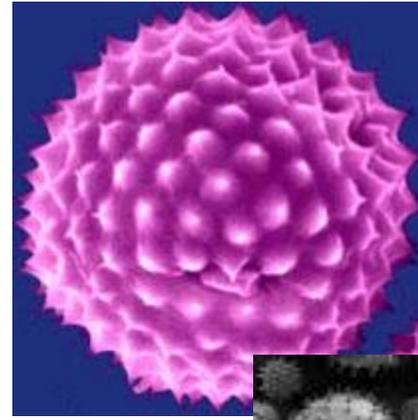
Un sistema di identificazione molecolare come il DNA barcoding può essere applicato su matrici processate e quindi permette l'identificazione di una pianta indipendentemente dalle caratteristiche morfologiche.



Servono piccole quantità di tessuto pertanto si presta bene anche come approccio diagnostico in biologia forense.



Pollini, semi, frammenti di foglie possono essere identificati semplicemente estraendo il DNA e sequenziando le regioni DNA barcode. Il DNA barcode si usa anche per analizzare le diete di animali partendo da resti fecali oppure da aspirati gastrici. Ovviamente è fondamentale disporre di una banca dati di riferimento in cui sono annotate le specie ricercate con i loro barcode. Il livello di affidabilità della banca dati, la percentuale di popolamento e anche la presenza di più campioni dello stesso taxa che permettono di confermare l'identità rende più robusto l'approccio.



ESEMPI EMBLEMATICI

Identificazione materie prime: Confermare la specie di appartenenza di una materia prima. Lo stesso approccio permette anche di individuare contaminanti accidentali o intenzionali.



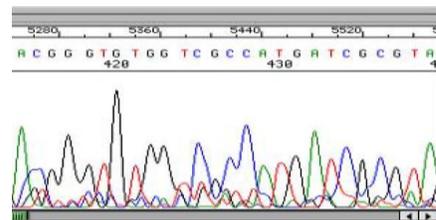
Cinnamomum verum J. Presl.



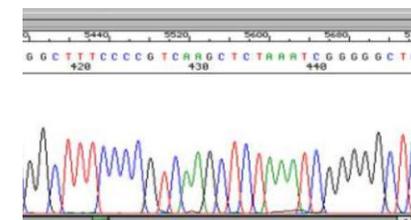
Cinnamomum cassia (L.) J. Presl.



Zafferano (*Crocus sativus* L.)



Contaminata



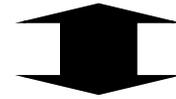
Pura

Il progetto ERBA MATTA





**TRATTAMENTO
FARMACOLOGICO
SECONDO
PROTOCOLLO**



DIAGNOSI

**ISTITUTO DI
MEDICINA LEGALE**

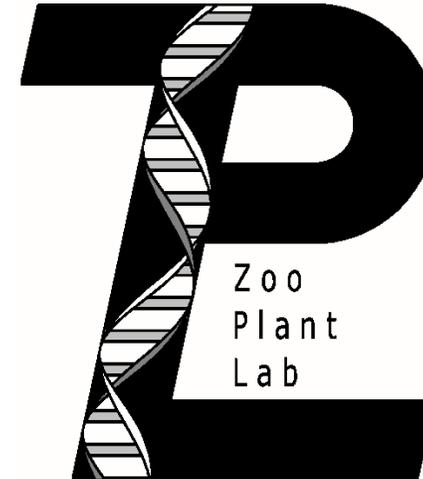


**ANALISI
TOSSICOLOGICHE
PROFILI CHIMICI**



museo di storia naturale

**ANALISI DI FRAMMENTI;
FITOGEOGRAFIA, ECC**



**MESSA A PUNTO DI
DNA BARCODING**

GRUPPO I

Piante ornamentali e spontanee contenenti differenti
sostanze tossiche

Nandina domestica Thunb.
Ilex aquifolium L.
Aucuba japonica Thunb.
Arum italicum Mill.
Arum maculatum L.
Convallaria majalis L.
Euphorbia pulcherrima Willd. ex
Klotzsch
Spathiphyllum wallisii Regel
Sansevieria trifasciata Prain
Anthurium andreaeanum Linden
...



GRUPPO II

Specie congeneriche con differente grado di tossicità

Aconitum lycoctonum L.

Aconitum napellus L.

Aconitum degenii Gayer subsp. *paniculatum*
(Arcang.) Mucher

Aconitum anthora L.

Gruppo IIa



Gruppo IIb

Sambucus ebulus L.

Sambucus racemosa L.

Sambucus nigra L.



GRUPPO III

Piante congeneriche con specie commestibili e specie velenose

Gruppo IIIa

Prunus laurocerasus L. TOX
Prunus armeniaca L. (albicocco)
Prunus avium L. (ciliegio)
Prunus persica (L.) Batsch (pesca)
Prunus cerasus L. (amarena)
Prunus domestica L. (susino)



Gruppo IIIb

Solanum dulcamara L. TOX
Solanum nigrum L. TOX
Solanum lycopersicum L. (pomodoro)
Solanum tuberosum L. (patata)



Confronto marcatori

-  Successo di amplificazione
-  Successo di sequenziamento
-  Lunghezza delle sequenze
-  Successo di allineamento
-  Lunghezza dell'allineamento
-  % di divergenza

	Group	tmH-pshA	Mat K	RpoB	Sqg1	At103
 Amplification success	I	34/37	36/37	36/37	17/37	29/37
	IIa	4/4	4/4	4/4	2/4	2/4
	IIb	3/3	3/3	3/3	1/3	3/3
	IIIa	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	IIIb	6/6	6/6	6/6	6/6	5/6
	 Sequencing success	I	33/37	35/37	33/37	17/37
IIa		4/4	4/4	4/4	2/4	2/4
IIb		3/3	3/3	3/3	1/3	3/3
IIIa		5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
IIIb		6/6	6/6	6/6	6/6	5/6
 Sequence length		I	210-472	788-850	416-479	237-262
	IIa	218-238	781-791	477	237	302-364
	IIb	423-454	771-788	417	-	305-478
	IIIa	470-486	837-846	471	262	326-351
	IIIb	358-364	850	474	255	482
	 Alignment success	I	NA	35/37	33/37	16/37
IIa		4/4	4/4	3/4	2/4	2/4
IIb		3/3	3/3	3/3	1/3	3/3
IIIa		5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
IIIb		6/6	6/6	6/6	6/6	5/6
 Alignment length		I	NC	825	423	237
	IIa	240	787	477	237	300
	IIb	454	767	417	-	166
	IIIa	501	846	471	262	230
	IIIb	380	850	474	255	482
	 % of divergence	I	NC	22.8	11.8	19.7
IIa		6.3	1.4	0.2	1.3	2.2
IIb		7.6	0.2	0.2	-	17.5
IIIa		6.3	1.4	1.5	3.3	9.9
IIIb		6.7	1.1	4.9	7.5	2.3

Risultati analisi dei marcatori utilizzati

rpoB

bassi valore di divergenza tra taxa

mat K

Hanno mostrato un'apprezzabile variabilità genetica anche tra congenerici

trnH-psbA

Marcatori Nucleari

Sqd1: non universale (17/35)

At103: buona amplificazione; variabilità modesta

Int J Legal Med (2010) 124:595–603
DOI 10.1007/s00414-010-0447-3

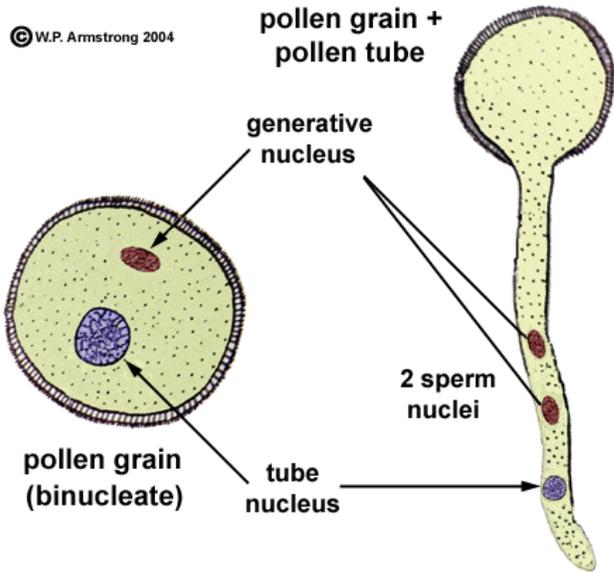
ORIGINAL ARTICLE

Identification of poisonous plants by DNA barcoding approach

Ilaria Bruni • Fabrizio De Mattia • Andrea Galimberti •
Gabriele Galasso • Enrico Banfi • Maurizio Casiraghi •
Massimo Labra

	Group	trnH-psbA	Mat K	RpoB
Amplification success	I	34/37	36/37	36/37
	IIa	4/4	4/4	4/4
	IIb	3/3	3/3	3/3
	IIIa	5/5	5/5	5/5
	IIIb	6/6	6/6	6/6
Sequencing success	I	33/37	35/37	33/37
	IIa	4/4	4/4	4/4
	IIb	3/3	3/3	3/3
	IIIa	5/5	5/5	5/5
	IIIb	6/6	6/6	6/6
Sequence length	I	210–472	788–850	416–479
	IIa	218–238	781–791	477
	IIb	423–454	771–788	417
	IIIa	470–486	837–846	471
	IIIb	358–364	850	474
Alignment success	I	NA	35/37	33/37
	IIa	4/4	4/4	3/4
	IIb	3/3	3/3	3/3
	IIIa	5/5	5/5	5/5
	IIIb	6/6	6/6	6/6
Alignment length	I	NC	825	423
	IIa	240	787	477
	IIb	454	767	417
	IIIa	501	846	471
	IIIb	380	850	474
% of divergence	I	NC	22.8	11.8
	IIa	0.3	1.4	0.2
	IIb	7.6	0.2	0.2
	IIIa	6.3	1.4	1.5
	IIIb	6.7	1.1	4.9

IL POLLINE COME MARCATORE ?



Il polline è il gametofito maschile delle piante. Per sua natura è piccolo e volatile ma contiene molta informazione genetica. E' possibile campionare il polline sulla superficie di oggetti, o in un campo fiorito sino a prodotti che lo contengono intenzionalmente o accidentalmente come il miele

Spesso si trova miscelato con altri pollini soprattutto se non si fa un prelievo diretto da antere fiorali. In questo caso è quindi necessario usare approcci di sequenziamento NGS che permettano di distinguere sequenze diverse della regione amplificata e di assegnarle alle diverse specie



IL POLLINE COME MARCATORE ?

Il polline può essere un elemento di tracciabilità?

Conoscendo la flora di una determinata area e predisponendo una banca dati DNA barcode delle specie presenti è possibile tracciare la produzione del miele e più in generale dei prodotti dell'apicoltura



PARCO REGIONALE GRIGNA SETTENTRIONALE



Lo studio ha previsto il posizionamento di arnie modificate nel Parco della Grigna. Queste arnie consentivano di raccogliere gli agglomerati pollinici realizzati dalle api operaie e di studiarne la composizione. Il polline agglomerato è stato raccolto in temi diversi nelle diverse aree di posizionamento. I campioni sono stati sottoposti ad estrazione e amplificazione del DNA e quindi all'analisi delle sequenze DNA barcode. Per avere un confronto sono state anche eseguite analisi polliniche al microscopio. I dati hanno permesso di comprendere diversi aspetti ecosistemici:



E' stato possibile fare un'analisi delle specie maggiormente bottinate dalle api in diversi tempi lungo l'intera stagione di produzione. Questi dati sono rilevanti anche per interventi di ripristino e rafforzamento ecologico.

Interessante: OLTRE A SPECIE GENERALISTE E' STATO POSSIBILE OSSERVARE CHE LE API BOTTINANO PIANTE ENDEMICHE DEL PARCO...

Questo suggerisce che l'apicoltura supporta l'impollinazione di specie locali, endemiche e rare.





UNA CURIOSITA': SE C'È DISTURBO ANTROPICO IL POLLINE LO RILEVA. NELLO STUDIO E' STATO RILEVATO POLLINE DI PELARGONI SOPRATTUTTO NELLE ARNIE COLLOCATE NEI PRESSI DEI CENTRI ABITATI COME ESINO LARIO.

A DNA Barcoding Approach to Characterize Pollen Collected by Honeybees

Andrea Galimberti¹*, Fabrizio De Mattia¹*, Ilaria Bruni¹, Daniela Scaccabarozzi², Anna Sandionigi¹, Michela Barbuto¹, Maurizio Casiraghi¹, Massimo Labra^{1*}

¹ Università degli Studi di Milano-Bicocca, ZooPlantLab, Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Milano, Italy, ² Parco Regionale della Grigna Settentrionale, Barzio, Italy

Abstract

In the present study, we investigated DNA barcoding effectiveness to characterize honeybee pollen pellets, a food supplement largely used for human nutrition due to its therapeutic properties. We collected pollen pellets using modified beehives placed in three zones within an alpine protected area (Grigna Settentrionale Regional Park, Italy). A DNA barcoding reference database, including *rbcl* and *trnH-psbA* sequences from 693 plant species (104 sequenced in this study) was assembled. The database was used to identify pollen collected from the hives. Fifty-two plant species were identified at the molecular level. Results suggested *rbcl* alone could not distinguish among congeneric plants; however, *psbA-trnH* identified most of the pollen samples at the species level. Substantial variability in pollen composition was observed between the highest elevation locality (Alpe Moconodeno), characterized by arid grasslands and a rocky substrate, and the other two sites (Cornisella and Ortanella) at lower altitudes. Pollen from Ortanella and Cornisella showed the presence of typical deciduous forest species; however in samples collected at Ortanella, pollen of the invasive *Lonicera japonica*, and the ornamental *Pelargonium x hortorum* were observed. Our results indicated pollen composition was largely influenced by floristic local biodiversity, plant phenology, and the presence of alien flowering species. Therefore, pollen molecular characterization based on DNA barcoding might serve useful to beekeepers in obtaining honeybee products with specific nutritional or therapeutic characteristics desired by food market demands.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



Analytical Methods

A DNA barcoding approach to identify plant species in multiflower honey

I. Bruni^a, A. Galimberti^a, L. Caridi^a, D. Scaccabarozzi^b, F. De Mattia^a, M. Casiraghi^a, M. Labra^{a,*}

^a Università degli Studi di Milano-Bicocca, ZooPlantLab, Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Piazza della Scienza 2, 20126 Milano, Italy

^b Parco Regionale della Grigna Settentrionale, Via Fornace Merlo 2, 23816 Barzio, Italy



ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 August 2013
Received in revised form 25 May 2014
Accepted 13 August 2014
Available online 23 August 2014

Keywords:

Food traceability
Honey
Molecular markers
Pollen identification
rbcl

ABSTRACT

The purpose of this study was to test the ability of DNA barcoding to identify the plant origins of processed honey. Four multifloral honeys produced at different sites in a floristically rich area in the northern Italian Alps were examined by using the *rbcl* and *trnH-psbA* plastid regions as barcode markers. An extensive reference database of barcode sequences was generated for the local flora to determine the taxonomic composition of honey. Thirty-nine plant species were identified in the four honey samples, each of which originated from a mix of common plants belonging to *Castanea*, *Quercus*, *Fagus* and several herbaceous taxa. Interestingly, at least one endemic plant was found in all four honey samples, providing a clear signature for the geographic identity of these products. DNA of the toxic plant *Atropa belladonna* was detected in one sample, illustrating the usefulness of DNA barcoding for evaluating the safety of honey.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.



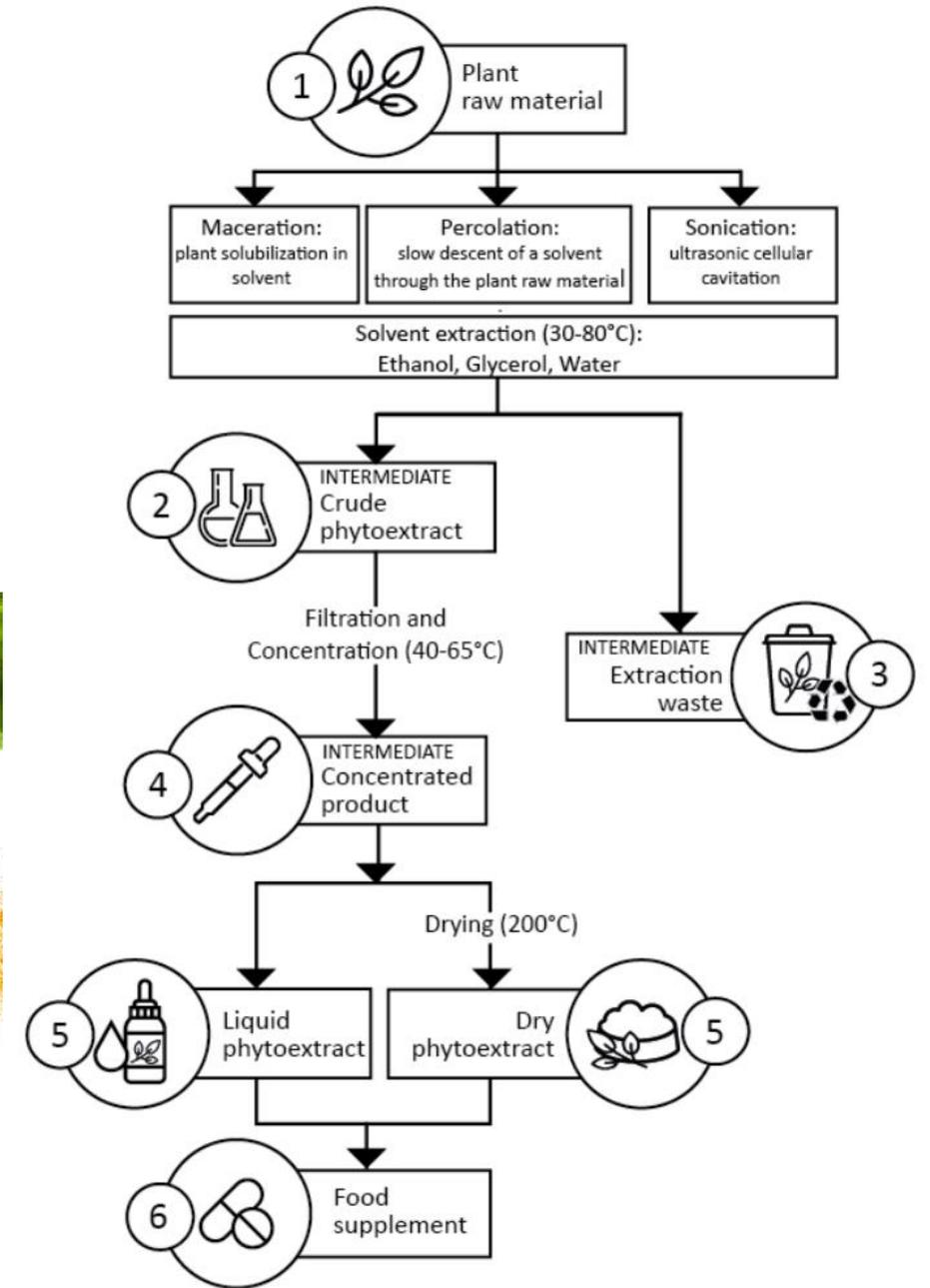
DNA barcoding e minibarcoding

¹Department of Biotechnology and Biosciences, University of Milano-Bicocca, Milano, Italy
²FEM2 Ambiente Srl, Milano, Italy

DNA barcoding to trace Medicinal and Aromatic Plants from the field to the food supplement

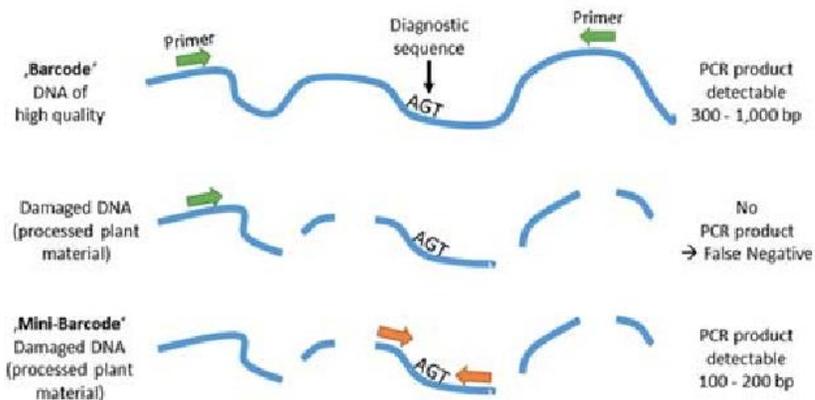
Jessica Frigerio^{1,2}, Tommaso Gorini¹, Andrea Galimberti¹, Ilaria Bruni¹,
Nicola Tommasi¹, Valerio Mezzasalma², Massimo Labra^{1*}

(Submitted: October 8, 2018; Accepted: January 3, 2019)



Il mercato richiede processi di tracciabilità che siano applicabili a tutta la filiera. Sebbene il DNA sia una molecola relativamente stabile quando viene sottoposta a trattamenti fisici e chimici può subire fenomeni di rottura e degradazione. Per questa ragione, al fine di avere dei sistemi di tracciabilità molecolari per prodotti sminuzzati, sottoposti ad alte temperature o pressioni, piuttosto che matrici sottoposti ad estrazioni con agenti chimici è necessario sviluppare un approccio di identificazione su frammenti più piccoli noto come DNA minibarcoding.

Size matters: barcode vs mini-barcode



MISSION

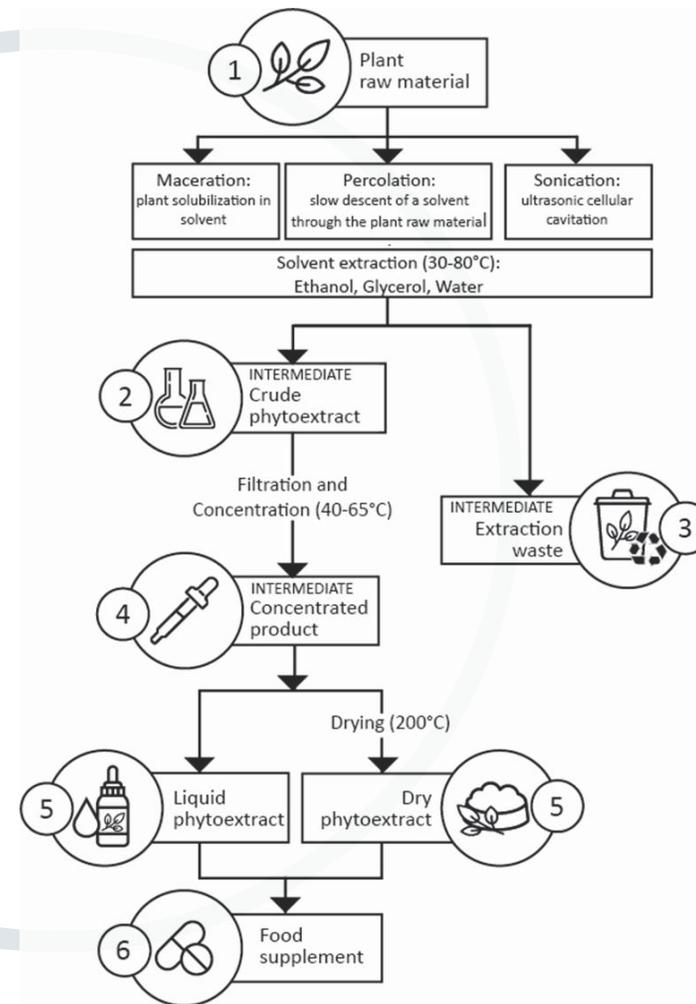
Test **DNA barcoding** and **minibarcoding** methods for species identification in highly processed products: **Phytoextracts**

SAMPLES

64 samples were collected between fresh plants, intermediate products and phytoextracts

METHODS

One DNA minibarcoding marker (*rbcl 1-B*) which totally overlap *rbcl*, and two standard DNA barcoding markers (*psbA-trnH* and ITS) were tested



RISULTATI

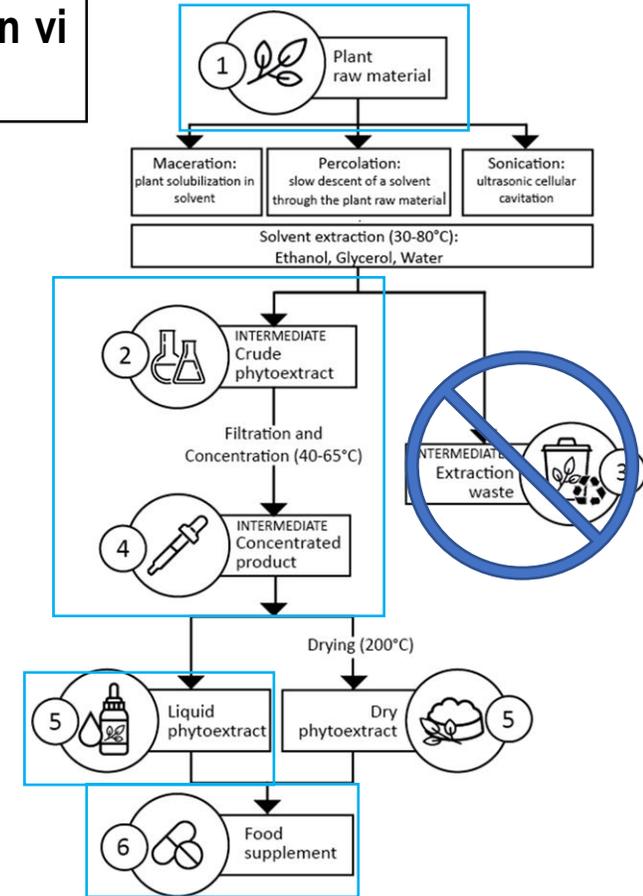
Come si può osservare le estrazioni eseguite con acqua o con bassa percentuale di etanolo permettono l'amplificazione ed il sequenziamento delle regioni DNA minibarcode

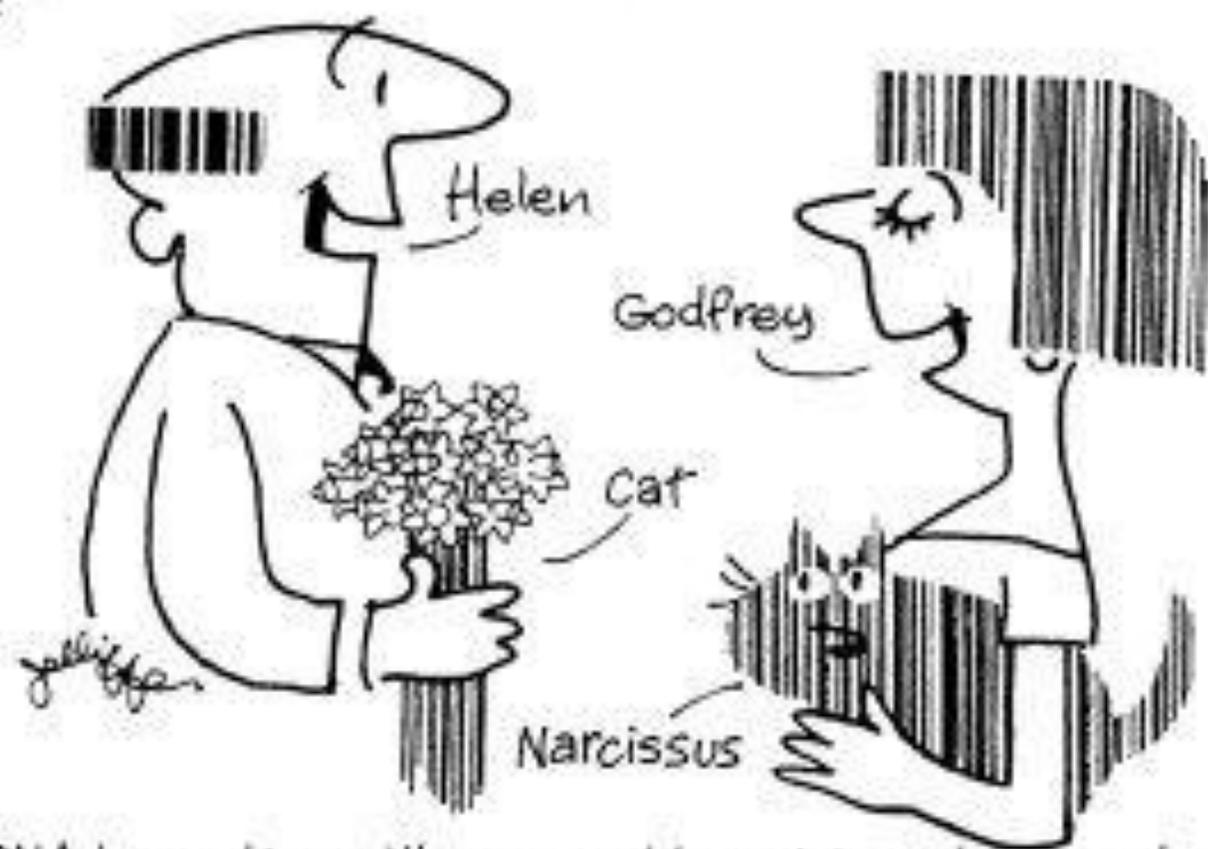
SAMPLES	Industrial processing		DNA Extraction yield		DNA BARCODING MARKERS- MINIBARCODING MARKER		
	Phytoextraction Process	Solvent	Value ng/μl	Standard Deviation	psbA - trnH	ITS	rbcl 1 - B
<i>Achillea millefolium L.</i>	Sonication	EtOH ≤ 40%	12.26	1.55			x
<i>Echinacea pallida (Nutt.) Nutt.</i>	Sonication		16.29	0.97			x
<i>Harpagophytum procumbens (Burch.) DC. ex Meisn.</i>	Sonication		12.94	1.58	x	x	x
<i>Melissa officinalis L.</i>	Percolation		44.63	1.32			x
<i>Mentha x piperita L.</i>	Sonication		12.3	0.83	x	x	x
<i>Tilia platyphyllos Scop.</i>	Sonication		9.78	1.28	x	x	x
<i>Zingiber officinale Roscoe</i>	Sonication		13.16	2.13	x	x	x
<i>Arctium lappa L.</i>	Maceration	EtOH > 40 %	1.23	0.2			
<i>Echinacea angustifolia DC.</i>	Maceration		2.83	0.5			
<i>Melissa officinalis L.</i>	Percolation		1.4	0.44			
<i>Passiflora incarnata L.</i>	Maceration		1.74	0.17			
<i>Taraxacum officinale Weber ex F.H. Wigg.</i>	Maceration		2.47	0.54			
<i>Thymus vulgaris L.</i>	Maceration		1.78	0.38			
<i>Arctostaphylos uva-ursi (L.) Spreng.</i>	Percolation		3.1	0.33			
<i>Cetraria islandica (L.) Ach.</i>	Percolation	WATER	2.27	0.94			
<i>Echinacea purpurea (L.) Moench</i>	Percolation		3.47	0.71		x	
<i>Epilobium angustifolium L.</i>	Percolation		1.88	0.63			
<i>Malva sylvestris L.</i>	Percolation		2.34	0.69			
<i>Arctostaphylos uva-ursi (L.) Spreng.</i>	Sonication		13.36	1.05			x
<i>Echinacea purpurea (L.) Moench</i>	Sonication		46.41	0.81	x	x	x
<i>Epilobium angustifolium L.</i>	Sonication		14.78	0.97			x
<i>Melissa officinalis L.</i>	Sonication		12,73	0,76	x	x	x
<i>Arctium lappa L.</i>	Maceration		2.69	0.64			
<i>Echinacea angustifolia DC.</i>	Maceration		4.73	0.85			x
<i>Melissa officinalis L.</i>	Maceration	GLYCEROL	2.55	0.76			
<i>Passiflora incarnata L.</i>	Maceration		2.09	0.6			
<i>Taraxacum officinale Weber ex F.H. Wigg.</i>	Maceration		3.12	0.3			
<i>Thymus vulgaris L.</i>	Maceration		2.71	0.8			

RISULTATI

L'ipotesi più probabile non è tanto che il DNA sia frammentato o degradato ma che la presenza di etanolo determina la precipitazione del DNA durante il processo di estrazione e che quindi non vi sia più DNA stampo per amplificazione i PCR.

Plant species	Solvent	Steps of the industrial production process					
		1	2	3	4	5	6
<i>Achillea millefolium L.</i>	20% Ethanol	✓	✓	X	✓	✓	✓
<i>Zingiber officinale roscoe</i>	30% Ethanol	✓	✓	X	✓	✓	✓
<i>Thymus vulgaris L.</i>	60% Ethanol	✓	X	✓	X	X	-
<i>Melissa officinalis L.</i>	70% Ethanol	✓	X	✓	X	X	-
<i>Echinacea purpurea (L.) Moench</i>	Water	✓	✓	X	✓	✓	-
<i>Melissa officinalis L.</i>	Water	✓	✓	X	✓	✓	✓





DNA barcoding will soon enable quick and accurate identification of species across all forms of life.

GENETICA DI POPOLAZIONE

POPOLAZIONE: La popolazione in botanica viene definita come un insieme di individui della stessa specie (si estende anche a ibridi) che occupa un determinato spazio. Si assume che quest'insieme sia un'entità continua anche nel tempo ovvero che sia in grado di generare nuovi individui che si susseguono nelle generazioni.



POPOLAZIONE DI ABETI



POPOLAZIONE DI MIRTILLI



POPOLAZIONE DI BRIOFITE

Perché è importante studiare le popolazioni vegetali?

- La variabilità genetica della specie si può osservare all'interno di una popolazione e tra gli individui di una popolazione.
- I processi evolutivi avvengono principalmente all'interno delle popolazioni così come le dinamiche di risposta ai fattori di stress.
- Le popolazioni possono adattarsi a determinati ambienti, promuovere fenomeni di speciazioni o andare incontro a ibridazione

Variabilità genetica di popolazione

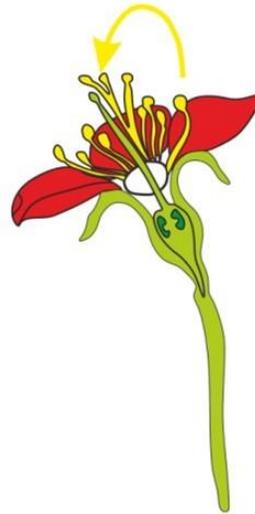
Le popolazioni evidenziano una potenziale diversità genetica. La variabilità nasce dai processi riproduttivi: un individuo può mostrare delle differenze rispetto ai genitori. Nel caso delle piante questa variabilità è anche legata al tipo di fecondazione: allogamia, autogame, propagazione vegetativa, ecc

Il sistema riproduttivo influenza quindi la struttura genetica delle popolazioni e regola potenzialmente la capacità adattativa di una specie all'ambiente esterno.

Self pollination

a) Autogamy

Pollen transfer within one flower



b) Geitonogamy

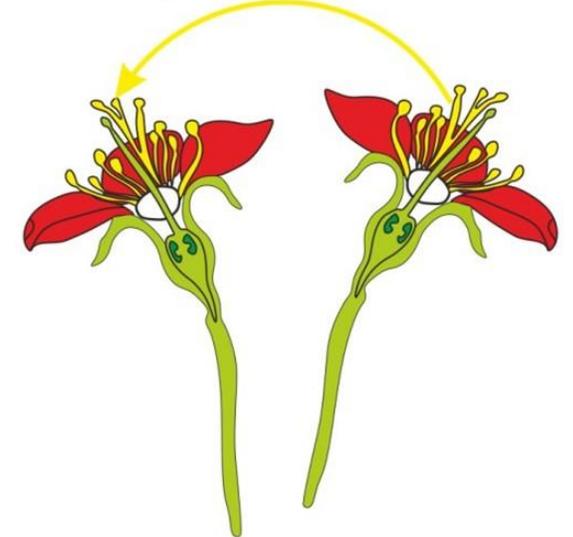
Pollen transfer between flowers of one plant individual



Cross pollination

c) Xenogamy

Pollen transfer between flowers of different plant individuals/variety



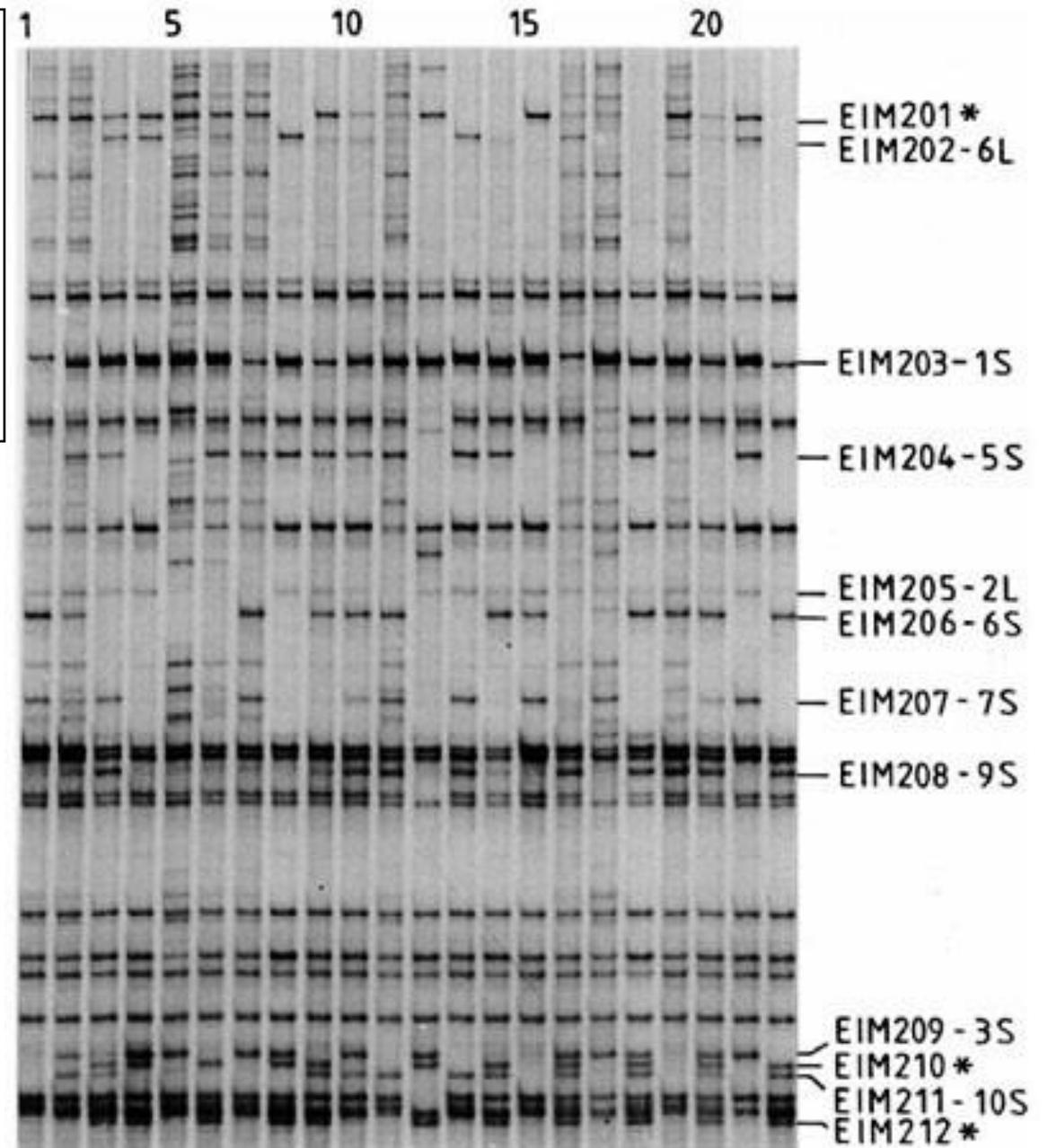
Studia la frequenza dei geni e dei genotipi in una popolazione, la variazione alleliche, la distribuzione delle frequenze e l'ereditarietà nelle generazioni successive è rilevante per diversi aspetti applicativi come: Interventi di conservazione della biodiversità, procedure di rafforzamento, selezione di nuove cultivar, ecc.

I frammenti digeriti, legati agli adattatori e amplificati di ciascun campione di DNA (individuo) possono essere separati sulla base delle dimensioni mediante una elettroforesi su gel di poliacrilamide.

Primer marcati con radioisotopi o come una molecola luminescente consentono di 'immortalare' il profilo elettroforetico. L'immagine può essere trasformata in una matrice presenza/assenza ovvero 1/0.

Sample #1	10011111110
Sample #2	01101101111
Sample #3	10101010101
Sample #4	00111100111
Sample #5	10001001101
Sample #6	01001010110
Sample #7	01001101111
Sample #8	01001100100
Sample #9	00011101111
Sample #10	10011011111

Sfruttando appositi indici è possibile quantificare la percentuale di frammenti condivisi individuo x individuo e quindi stimare dei valori di similarità/dissimilarità)

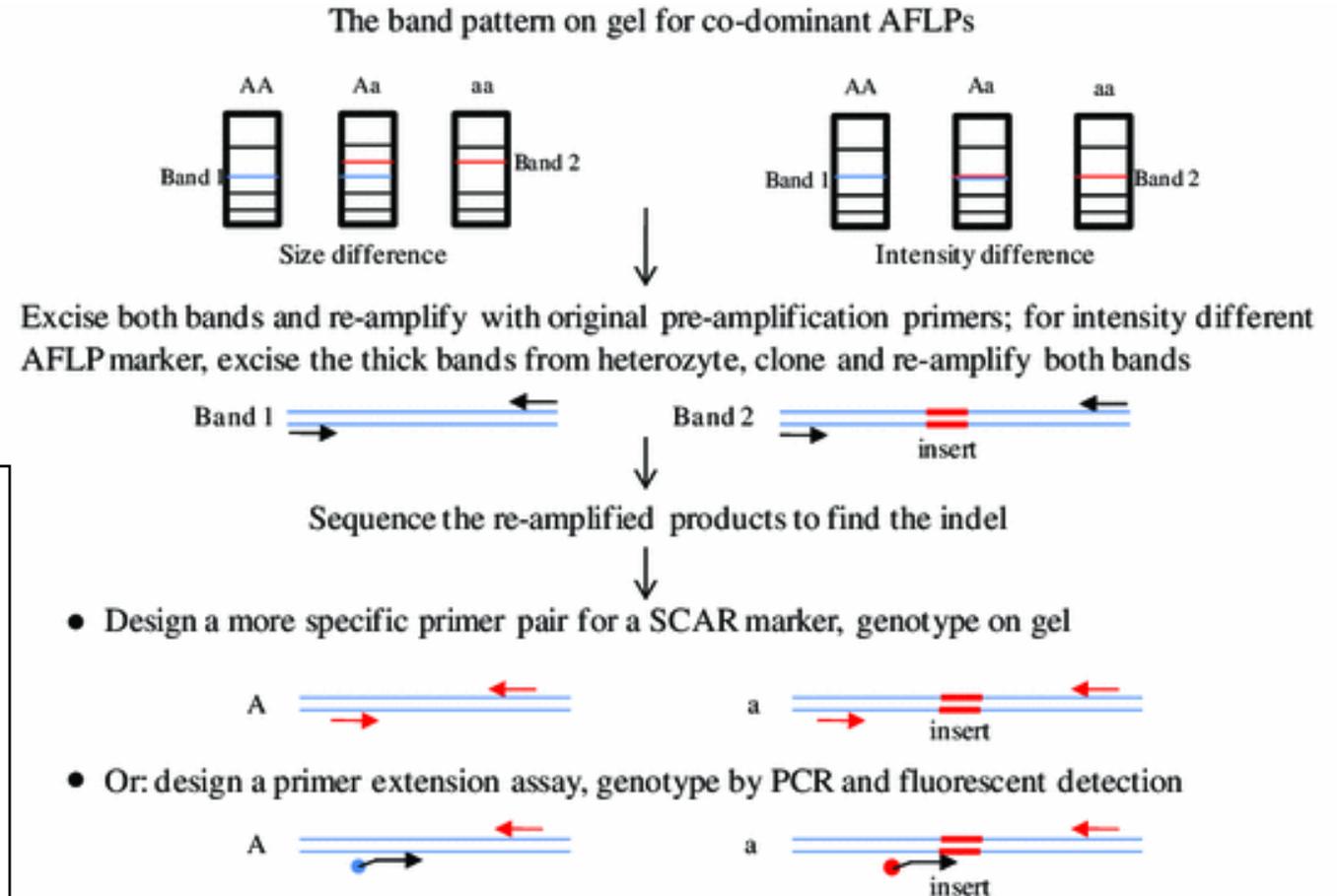


SCAR: Sequence Characterized Amplified Region

Un frammento AFLP (ma anche RAPD) potrebbe diventare un marcatore univoco di un individuo o di un gruppo di individui ovvero diventare uno SCAR. Tecnicamente è possibile selezionare un frammento univoco di un certo individuo, estrarlo dal gel, sequenziarlo e individuare primer specifici capaci di amplificare solo questa regione.

Gli SCAR sono ottimi strumenti per fare una selezione di determinati individui (ad esempio i cloni o i parentali di un determinato individuo).

Gli SCAR possono anche diventare marcatori di tracciabilità di una determinata matrice o individuare un contaminante. Ad esempio se ipotizziamo che una polvere di zafferano sia stata tagliata con la curcuma con uno SCAR Curcuma specifico si potrebbe verificarne la presenza anche in tracce in vari campioni anche processati di zafferano.





PCR-based rapid diagnostic tools for the authentication of medicinal mistletoe species

Pureum Noh, Wook Jin Kim, Sungyu Yang, Goya Choi, Byeong Cheol Moon*

Herbal Medicine Resources Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, 111, Geonjoe-ro, Naju, Jeollanam-do 58245, Republic of Korea



Taxillus chinensis



Viscum coloratum

***Taxillus chinensis* e *Viscum coloratum*, sono erbe medicinali popolari nell'Asia orientale. Tuttavia, i prodotti commerciali TH e VH sono spesso adulterati con specie di vischio non autentiche correlate. In questo lavoro hanno individuato mercatori SCAR di queste specie**

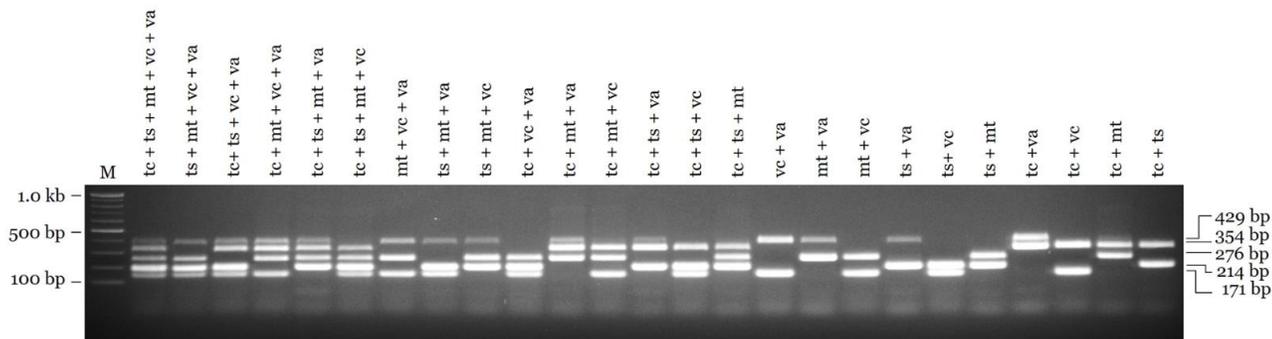


Fig. 3. Discrimination capacity of multiplex-SCAR assay. DNA from 2–5 mistletoe species was combined and used as template for the multiplex-SCAR assay. *T. chinensis* (tc); *T. sutchuenensis* (ts); *M. tricolor* (mt); *V. coloratum* (vc); *V. articulatum* (va). Specific sample details are in Table S1. Amplicon sizes are shown to the right of the gel image.

E' possibile combinare più SCAR in modo da creare un sistema di diagnostici che permette di valutare contemporaneamente la presenza delle specie di interesse e di eventuali contaminanti.

Research Article | Open Access

Volume 2016 | Article ID 7584318 | <https://doi.org/10.1155/2016/7584318>

[Show citation](#)

Use of *Moringa oleifera* Flower Pod Extract as Natural Preservative and Development of SCAR Marker for Its DNA Based Identification

Iram Gull ¹, Attia Javed,¹ Muhammad Shahbaz Aslam,¹ Roohi Mushtaq,² and Muhammad Amin Athar²

[Show more](#)



Scientia Horticulturae 191 (2015) 108–112



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Scientia Horticulturae

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scihorti



A SCAR marker for identifying susceptibility to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* in banana



Cristiane M.S. Cunha^{a,*}, Robert H. Hinz^b, Adriana Pereira^b, Fernando A. Tcacenco^b, Eliza C. Paulino^b, Marciel J. Stadnik^a

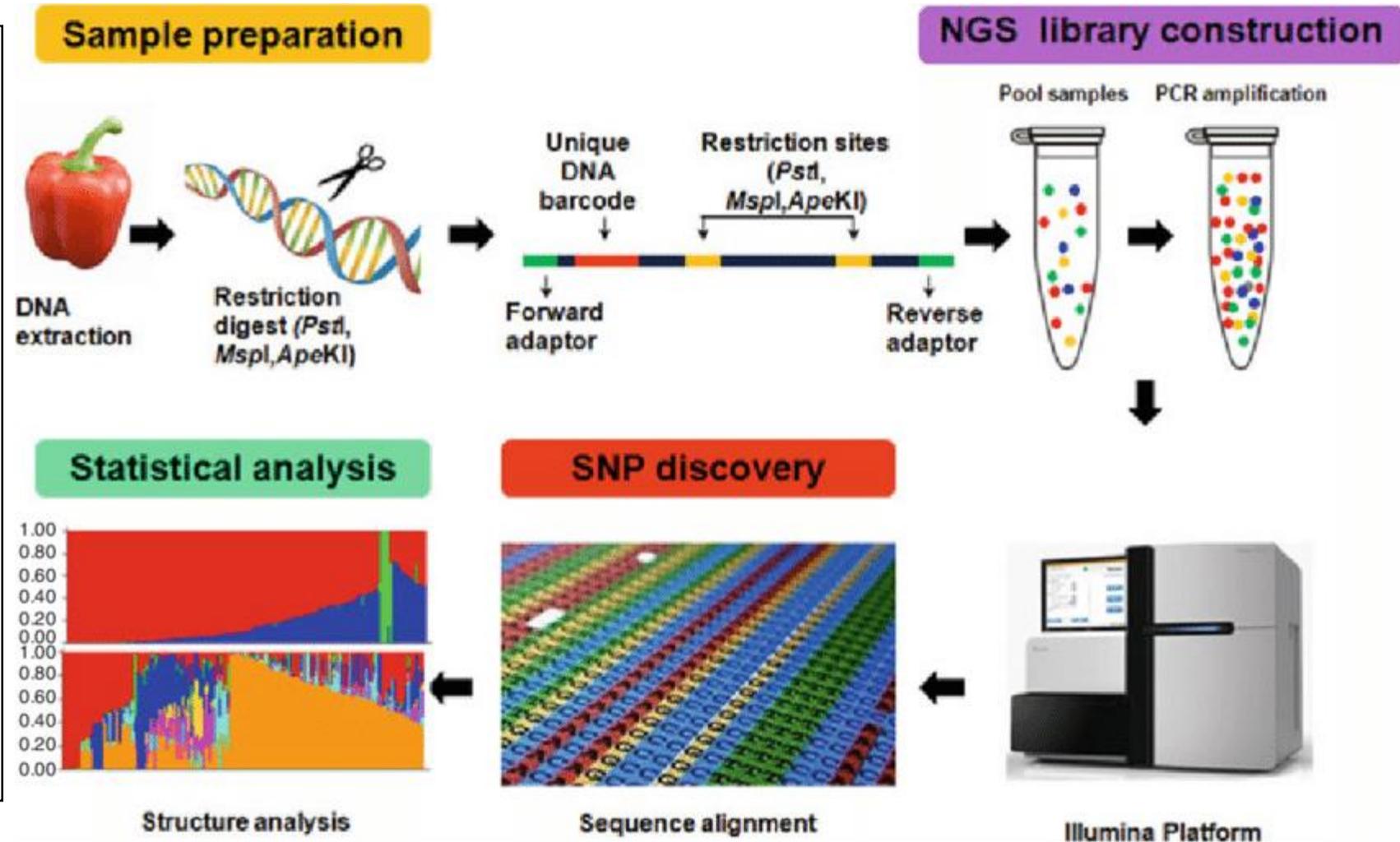
L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di sviluppare un marcatore SCAR in grado di discriminare tra genotipi resistenti e suscettibili all'infezione da *Fusarium*. Utilizzando DNA genomico da genotipi resistenti o suscettibili e primer arbitrari 78 × 10-mer, è stata selezionata una banda RAPD associata alla suscettibilità e utilizzata per generare SCAR diagnostici.

Genotyping-by-Sequencing

L'innovazione negli approcci di sequenziamento ha trasferito le procedure basate su sistemi elettroforetici agli analizzatori NGS. L'approccio del genotyping-by-sequencing (GBS) è stato ideato come uno strumento per la genetica popolazione e la caratterizzazione di singoli genotipi soprattutto per quegli organismi che non hanno ancora un genoma di riferimento annotato

Il processo prevede la selezione e amplificazione di determinate regioni del genoma scelte sulla base di siti di taglio di Enzimi di Restrizione (Tipo AFLP). La differenza rispetto ad AFLP è legata alla profondità di analisi; con questo approccio i frammenti di restrizioni vengono sequenziati pertanto evidenzia polimorfismi anche di sostituzione e non solo delezioni e inserzioni.

In particolare mediante sequenziamento NGS è possibile individuare migliaia di polimorfismi per singoli nucleotidi (single nucleotide polymorphisms, SNP) che sono molto diffusi nei genomi.



RAD-Sequencing

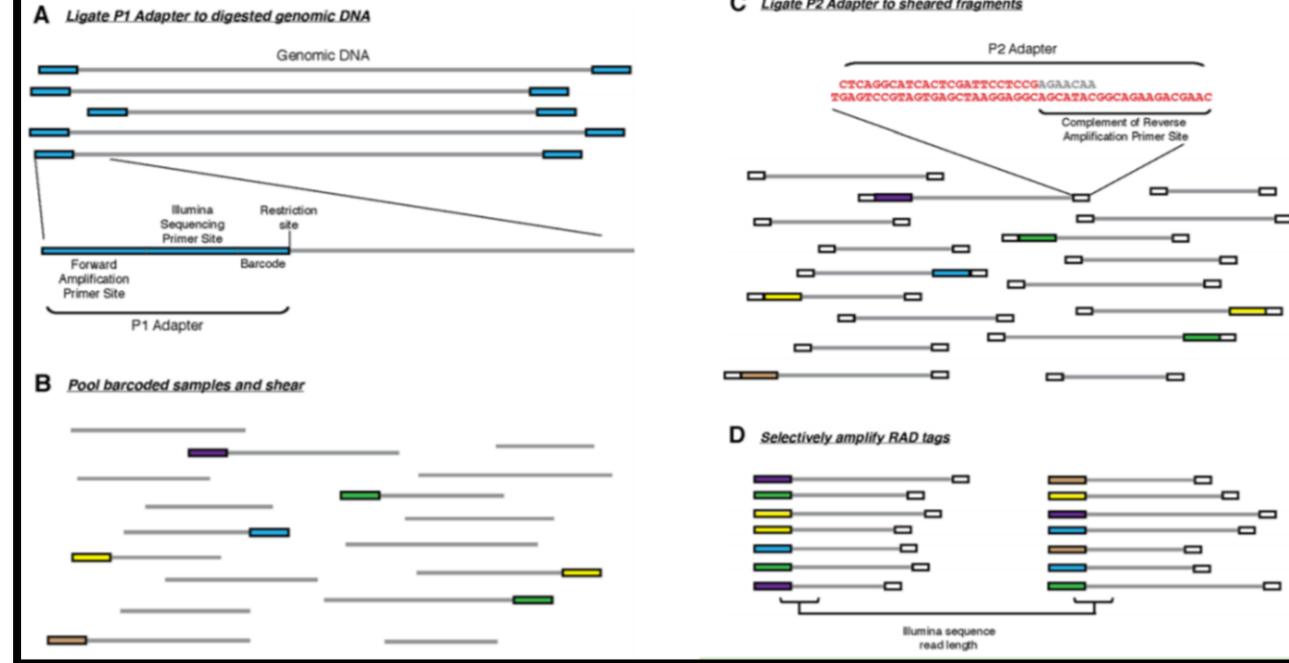
Il corrispettivo della vecchia AFLP-like è il sistema RAD-seq (Restriction-site associated DNA sequencing). Il principio è simile ad AFLP ma si usano molti primer complementari ad adattatori specifici che hanno diversi 'barcode'. E' quindi possibile analizzare frammenti con tagliati con enzimi diversi e amplificati con primer differenti nella stessa provetta!

Con questo approccio, la scelta di Enzimi di Restrizione appropriati permette di dirigere l'analisi su determinate porzioni del genoma anche se la specificità è relativa. Per esempio si può evitare il sequenziamento di regioni altamente qualora gli individui da analizzare siano abbastanza polimorfici e quindi non vi è la necessità di avere elevati livelli di polimorfismo.

Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers

Nathan A. Baird^{1,3}, Paul D. Etter^{1,3}, Tressa S. Atwood², Mark C. Currey³, Anthony L. Shiver¹, Zachary A. Lewis¹, Eric U. Selker¹, William A. Cresko³, Eric A. Johnson^{1*}

¹Institute of Molecular Biology, University of Oregon, Eugene, Oregon, United States of America, ²Floragenex, Eugene, Oregon, United States of America, ³The Center for Ecology and Evolutionary Biology, University of Oregon, Eugene, Oregon, United States of America



L'adattatore P1 include un primer per il sequenziamento Illumina, un barcode ed un primer per l'amplificazione della libreria. Solo i frammenti con P1 possono essere amplificati

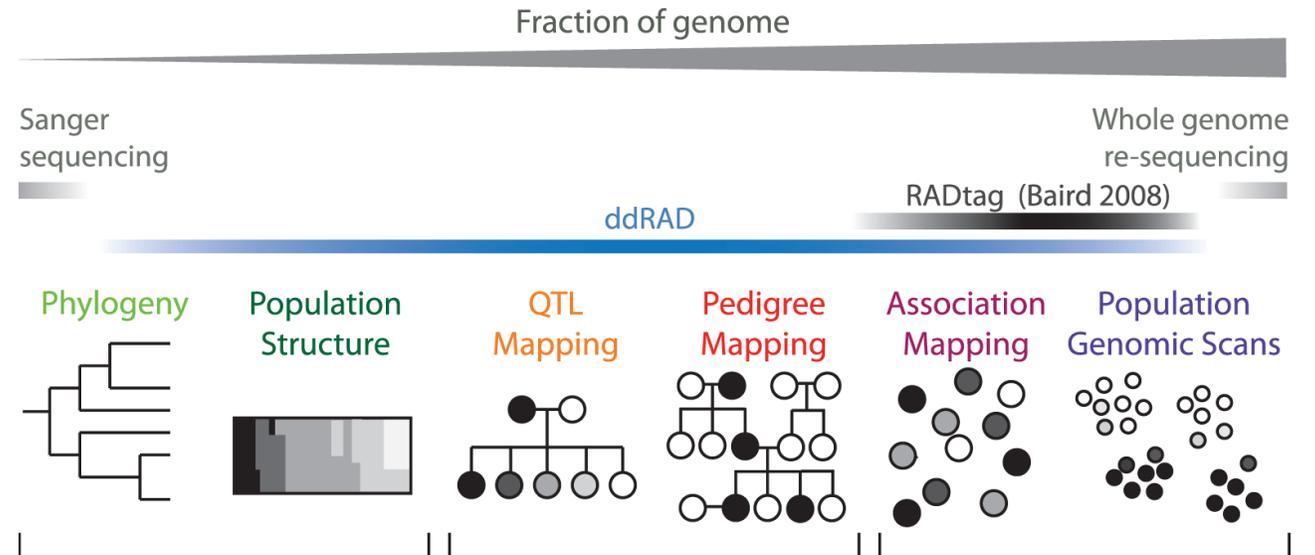
I frammenti ottenuti contengono il sito di restrizione al loro inizio e di conseguenza le reads iniziano tutte nello stesso punto

I progetti RAD-Seq in genere producono da migliaia a decine di migliaia di marcatori, diversi ordini di grandezza maggiori di quanto sia possibile ottenere con tecnologie tradizionali come microsatelliti o AFLP. L'approccio risulta quindi molto economico.

Il sequenziamento Illumina generalmente produce frammenti brevi (<1 kb). In genere la maggior parte dei frammenti è lunga 50 -100 bp. I marcatori RAD permettono quindi di individuare molti SNP ma anche inserzioni e delezioni nelle sequenze di lettura che ovviamente possono diventare SCAR.

La disponibilità di un genoma annotato permette anche di caratterizzare il frammento, ed eventualmente collegarlo ad una possibile 'funzione'.

Tra gli svantaggi di questo approccio vi è un margine di errore abbastanza alto a causa di un elevato rumore di fondo causato da frammenti più piccoli (e non solo). Ricordiamo inoltre che i sistemi NGS prevedono un'analisi bioinformatica del dato ed è necessario quindi una conoscenza analitica non indifferente.



L'incremento delle tecnologie di sequenziamento ha permesso una notevole evoluzione dell'informazione e questo ha reso più precise le stime di diversità e similarità genetica a livello di individui.

Applicazioni RAD-Sequencing



AoB PLANTS, 2020, Vol. 12, No. 1

doi:10.1093/aobpla/plz080

Advance Access publication December 20, 2019

Studies

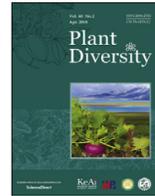
STUDIES

Genet assignment and population structure analysis in a clonal forest-floor herb, *Cardamine leucantha*, using RAD-seq

Michiaki Tsujimoto¹, Kiwako S. Araki^{1,2}, Mie N. Honjo¹, Masaki Yasugi^{1,3}, Atsushi J. Nagano^{1,4}, Satoru Akama⁵, Masaomi Hatakeyama^{6,7}, Rie Shimizu-Inatsugi⁶, Jun Sese^{5,8}, Kentaro K. Shimizu^{6,9} and Hiroshi Kudoh^{*,1}

In questo studio hanno analizzato popolazioni giapponesi di questa Brassicacea evidenziando gli individui molto simili (cloni), sia genotipi differenti provenienti da diverse popolazioni. E' stato eseguito anche un confronto con marcatori microsatelliti ed è stato dimostrato che RAD seq è molto più informativo.





Research paper

RAD-sequencing improves the genetic characterization of a threatened tree peony (*Paeonia ludlowii*) endemic to China: Implications for conservation

Yu-Juan Zhao ^{a, b, c}, Gen-Shen Yin ^d, Xun Gong ^{a, b, c, *}



In questo lavoro hanno studiato questa 'rara' Peonia gialla che vive spontaneamente sono in alcune aree della Cina sottoposte a un crescente impatto antropogenico. Hanno utilizzato RAD per individuare SNP da usare per chiarire la struttura genetica delle popolazioni relitte. Sono stati definiti i modello spaziale della variazione genetica, la struttura della popolazione e la storia demografica di *P. ludlowii*. Questo studio ha permesso di comprendere quali popolazioni proteggere e qual è lo stato delle risorse genetiche a disposizione.



Phylogenomic Relationships and Evolution of Polyploid *Salix* Species Revealed by RAD Sequencing Data

Natascha D. Wagner^{1*}, Li He² and Elvira Hörandl¹

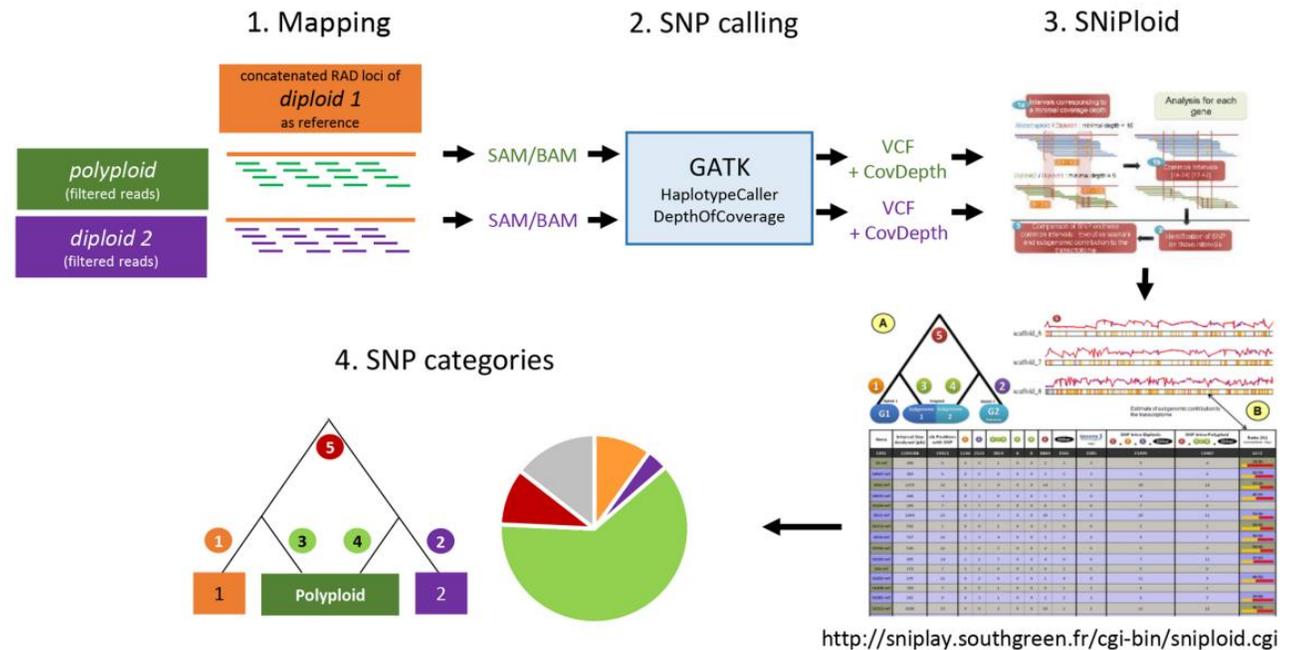


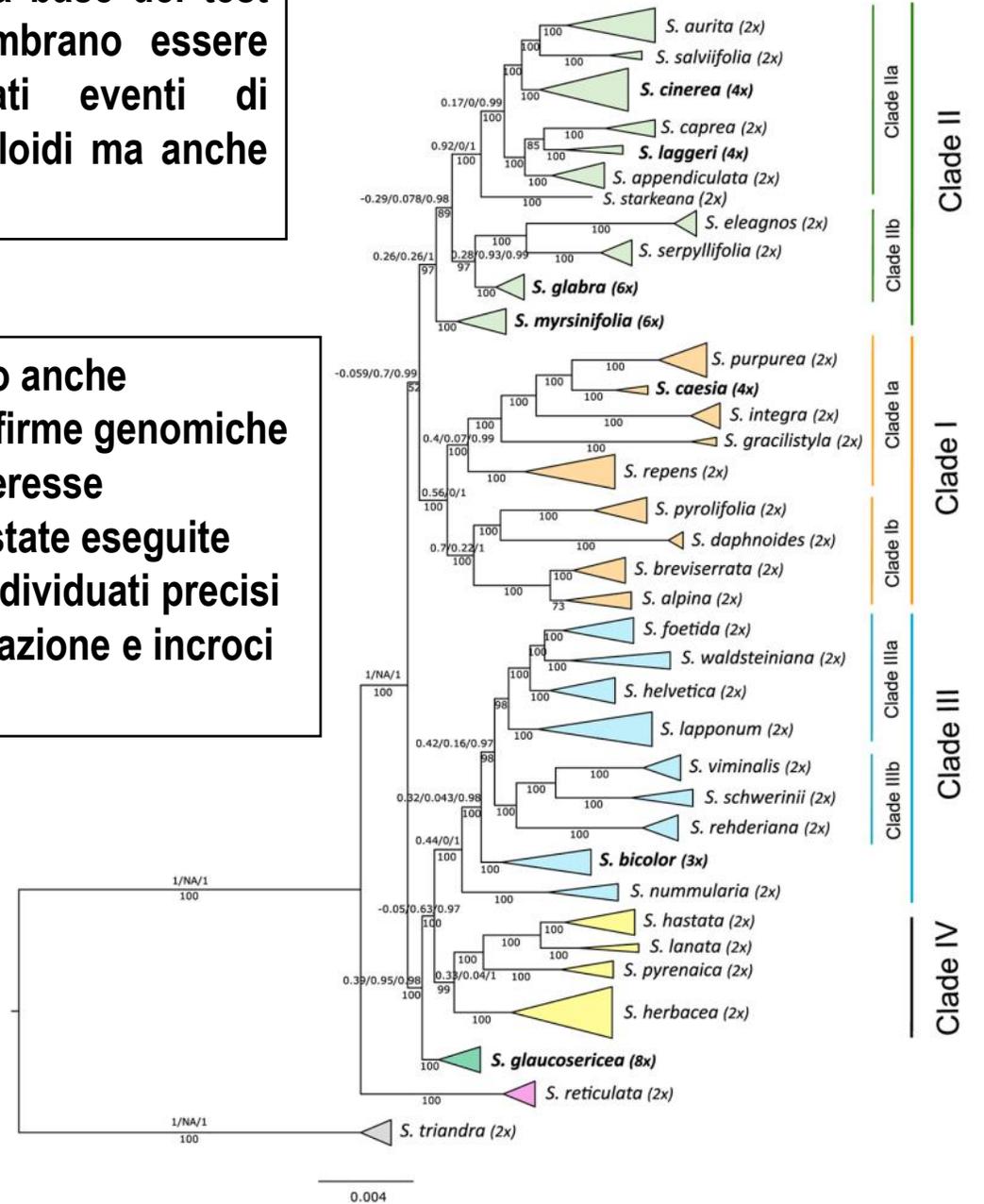
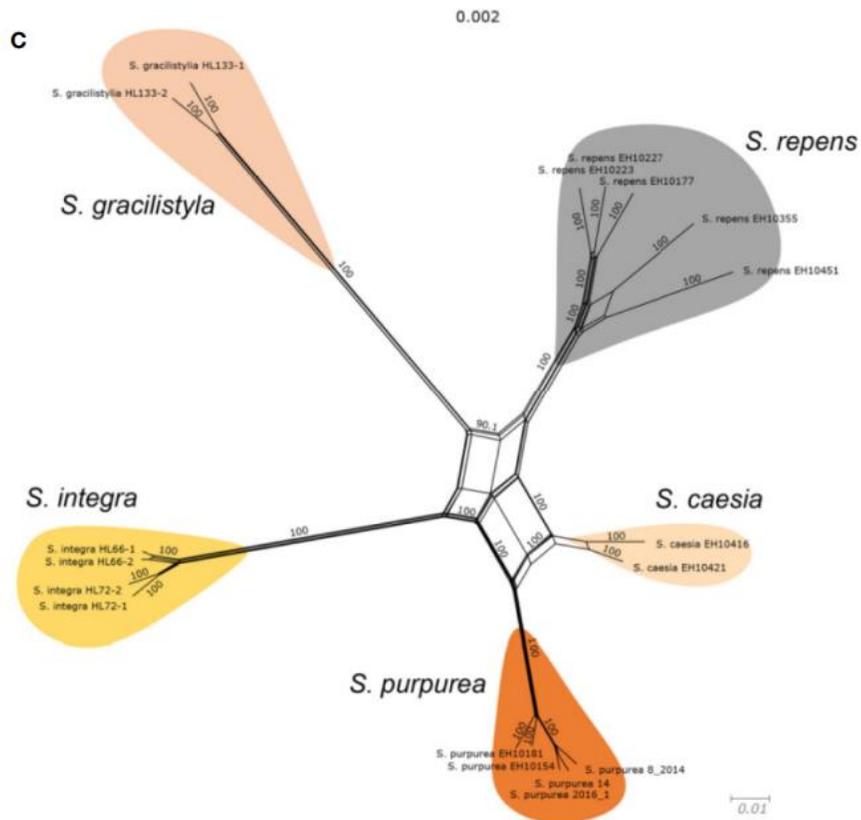
FIGURE 1 | SNIploid workflow adapted from (Peralta et al., 2013). The filtered RAD sequencing reads of the polyloid and one putative parental species (*Diploid 2*) are mapped to the concatenated RAD loci of the second putative parental species (*Diploid 1*) that act as a “pseudo-reference”. SNPs and coverage depth are determined with GATK tools “HaplotypeCaller” and “DepthOfCoverage”. The resulting “VCF” and “CovDepth” files of both samples serve as input for SNIploid. The output of SNIploid contain the assigned SNP categories 1-5 for each compared SNP. Those data are finally summarized in a pie chart that shows the proportions of the observed categories.

In questo lavoro hanno eseguito un’indagine di aretela del Salice. Si sa infatti che molti membri della famiglia e del genere sono poliploidi ma le loro origini non sono note. Sono quindi stati analizzati i putativi parentali diploidi per capire quali incroci possono essere alla base delle specie poliploidi.

In questo studio l’analisi RAD ha permesso di analizzare quasi 24.000 loci e 320.000 SNP in 35 specie di salici eurasiatici.

I dati hanno permesso di ricostruire alcune parentele e similarità. Sulla base dei test eseguiti è stato evidenziato che le specie di salice poliploide sembrano essere prevalentemente di origine allopoliploide. Sono stati individuati eventi di allopoliploidizzazione più antichi che hanno generato esaploidi e octoploidi ma anche eventi più recenti che hanno portato all'origine di tetraploidi.

Le analisi SNP hanno anche districato le diverse firme genomiche di alcuni salici di interesse commerciale. Sono state eseguite ipotesi evolutive e individuati precisi eventi di poliploidizzazione e incroci tra taxa.



Associazione genotipo-fenotipo?

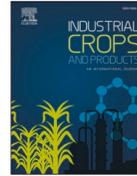
Industrial Crops & Products 178 (2022) 114669



Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops & Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop



Exploitation of next generation sequencing technologies for unraveling metabolic pathways in medicinal plants: A concise review

Mehdi Younessi-Hamzekhanlu^{a,*}, Munir Ozturk^b, Parinaz Jafarpour^c, Nasser Mahna^{c,*}

Gli approcci RAS- SEQ e i sistemi NGS in genere possono aiutare i ricercatori a identificare i geni coinvolti nelle vie biosintetiche di importanti metaboliti di interesse medicinale inclusi fenoli, terpenoidi, alcaloidi, glicosidi. Dato che vi sono diverse varianti di queste vie e diversi livelli di efficienza produttiva è possibile studiare queste differenze genetiche proprio con approcci SNP individuabili mediante sequenziamento

Questo consente di collegare caratteristiche genetiche a quantità e la qualità dei metaboliti (Fenotipo) analizzando sia DNA sia RNA. Questo permetterà di sviluppare nuove cultivar medicinali mediante incroci mirati e strategie di allevamento con elicitori.

