

# DALLA SEQUENZA DEL GENOMA ALLE NEW BREEDING TECHINQUES (NBT): CASI STUDIO IN *PRUNUS*

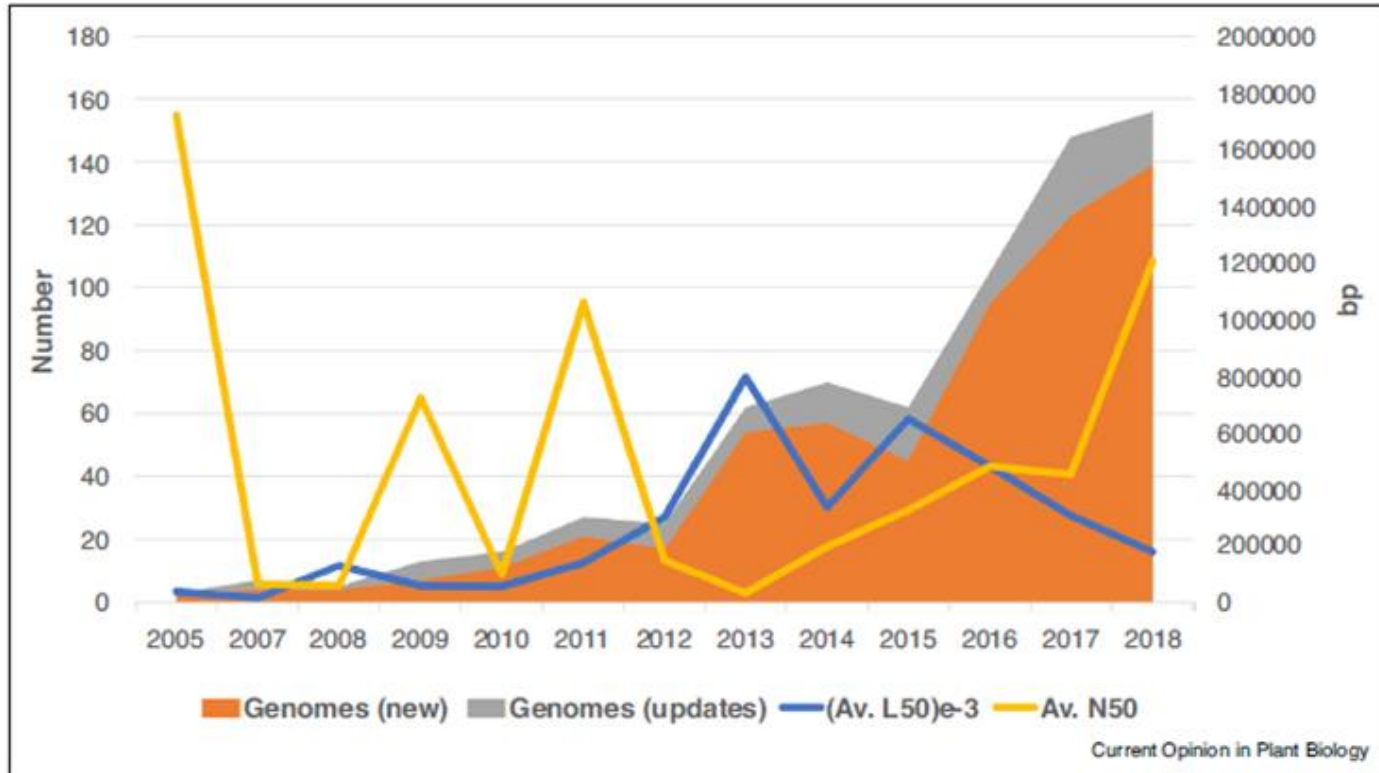


**Elisa Vendramin**

[elisa.vendramin@crea.gov.it](mailto:elisa.vendramin@crea.gov.it)

CREA- Centro di Ricerca di Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura

Il **GENOMA** è l'insieme del materiale genetico di un individuo e comprende sia i geni, parte codificante, sia le porzioni non codificanti.



Attualmente sono 328 i genomi di piante sequenziati  
 Il sequenziamento del genoma è un processo **dinamico**.

Il comparto frutticolo fattura circa **4 miliardi** di Euro all'anno che rappresentano il **7-8%** del fatturato del comparto agricolo.

- **Drupacee (*Prunus*)**
  - Pesco (1.4 milioni di tonnellate, 3° produttore al mondo)
  - Albicocco (240 mila tonnellate, 1° produttore in Europa)
  - Ciliegio (100 mila tonnellate, 1° produttore in Europa)
- **Pomacee**
  - Melo (2.5 milioni di tonnellate, 7° mondiale)
  - Pero (700 mila tonnellate, 4° al mondo)

## Sequenced Genotype

- Double haploid Lovell (PLov2-2N 2n=2x 16)
- Homozygosity verified with ~ 300 SSRs
- Estimated Genome size 256 Mb

## Sequencing methods:

- Whole Genome Shotgun (WGS) Sanger chemistry
- Libraries ~ 3, 8, 40, 70 Kb

## Genome Coverage

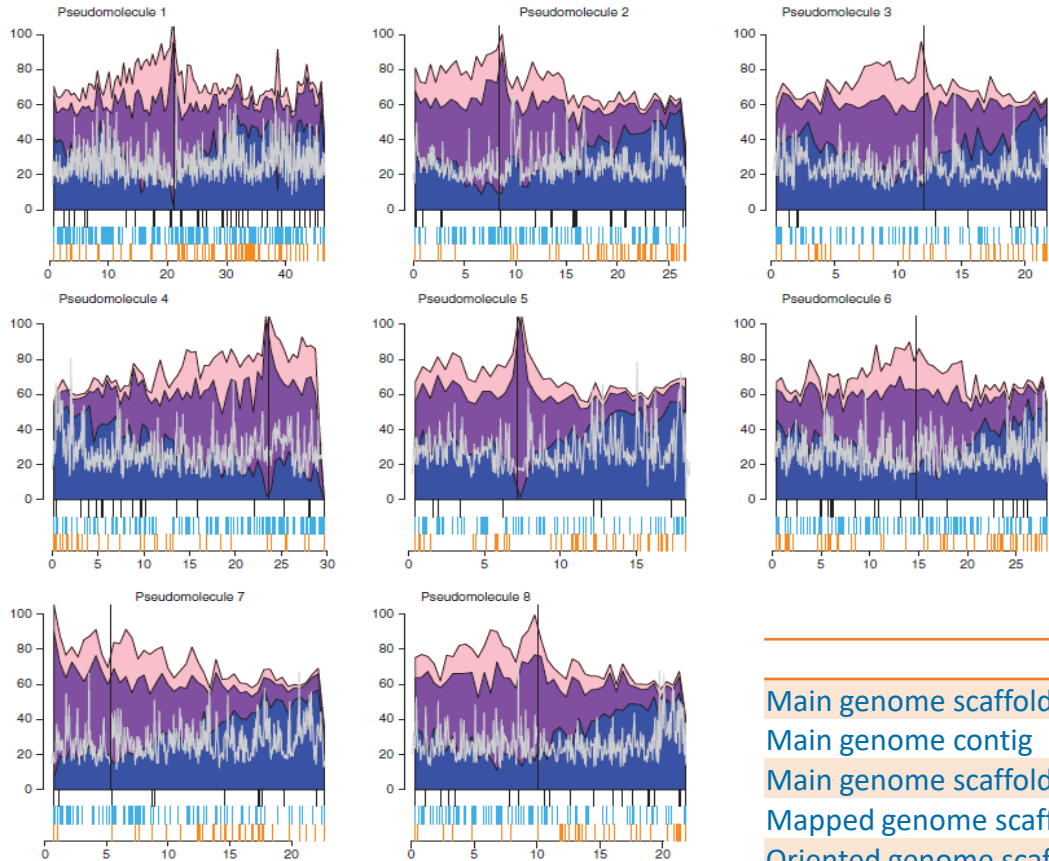
- 8.47X ~ 3,729,679 sequences

nature  
genetics  
OPEN



The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution

**Più di 700 citazioni**



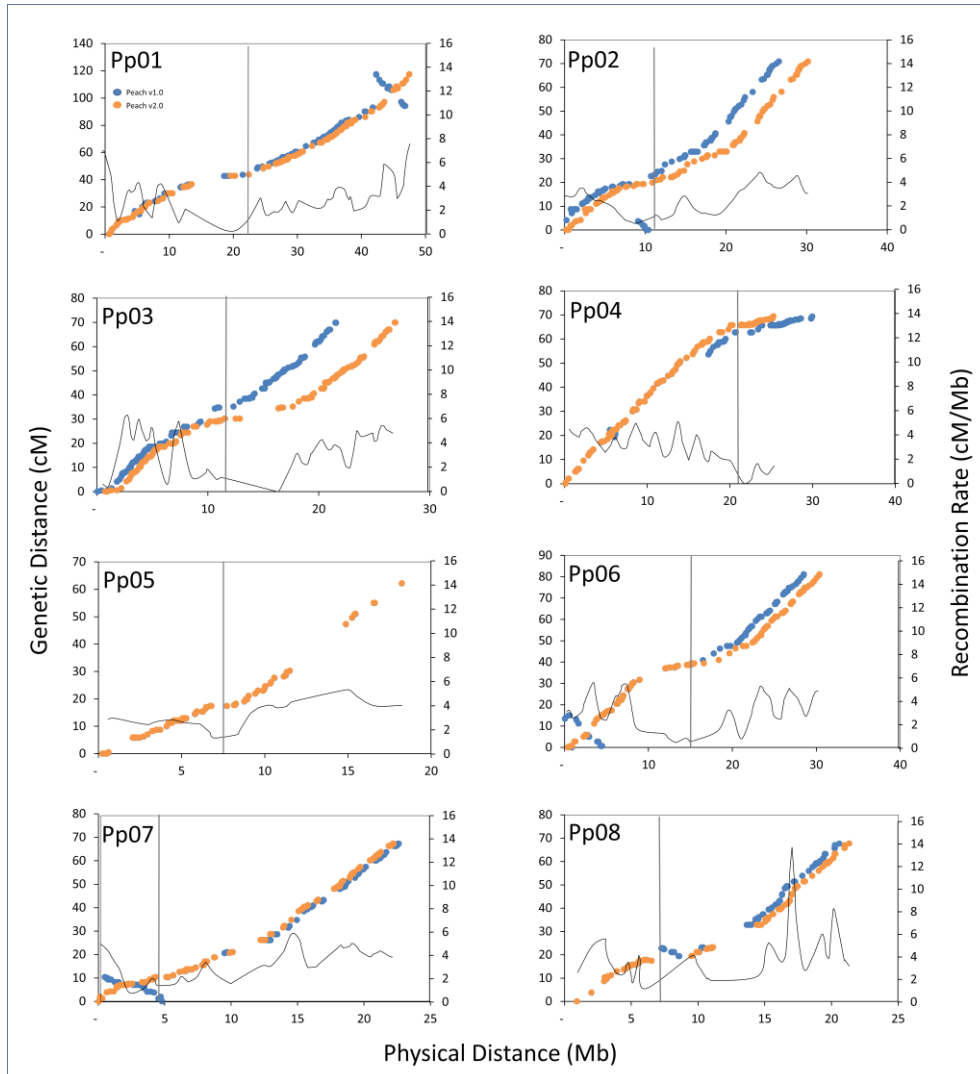
Rappresentazione grafica degli otto cromosomi di pesco (pseudomolecole) in cui sono riportati, per finestre di 500 Kb, gli elementi trasponibili (Viola e Rosa), i geni (Blue).

La riga verticale indica la putativa posizione dei centromeri.

I trattini sono relativi ai miRNA (nero), ai ncRNA (celeste) e ai tRNA (arancione)

Peach v1.0	
Main genome scaffold	202
Main genome contig	2,730
Main genome scaffold sequence	227.3 Mb
Mapped genome scaffold sequence	218.4 Mb (96%)
Oriented genome scaffold sequence	194.6 Mb (85.6%)
Main genome contig sequence	224.6 Mb
Protein-coding genes	27,852
Protein-coding transcripts	28,689
Alternative transcripts	837
Repetitive sequences	84.41 Mb (37.14%)





- 11 nuovi scaffold mappati (7.2Mb) sulla versione v2.0, 5 scaffold maggiori (4.9 Mb) correttamente orientati → 225.7 Mb (**99.2%**) sequenza mappata
- 12 scaffolds orientate in modo random nella v1.0 (23.6 Mb) sono stati orientati in v2.0 → 223.3 Mb (**98.2%**)
- 9 regioni misassemblate (10.4 Mb) individuate e correttamente posizionate all'interno dell'assembly v2.0

	Peach v2.0	Peach v1.0
Main genome scaffold	191	202
Main genome contig	2,525	2,730
Main genome scaffold sequence	227.4 Mb	227.3 Mb
Mapped genome scaffold sequence	225.7 Mb (99.2%)	218.4 Mb (96%)
Oriented genome scaffold sequence	223.3 Mb (98.2%)	194.6 Mb (85.6%)
Main genome contig sequence	224.6 Mb	224.6 Mb
Protein-coding genes	26,873	27,852
Protein-coding transcripts	47,089	28,689
Alternative transcripts	20,216	837
Repetitive sequences	79.38 Mb (35.34%)	84.41 Mb (37.14%)

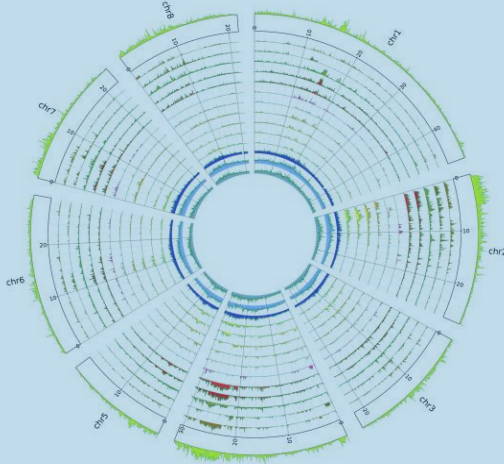
SNP detection, SNP Array, Genotype by Sequence



Verde et al. PLoS ONE 2012  
Verde et al. Nat Genet 2013



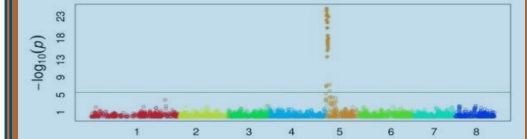
NGS, Genetic diversity  
characterization, domestication



Verde et al Nature Genetics 2013;  
Micheletti et PLoS ONE al 2015



GWAS, Genome Selection,  
Linkage and QTL analyses, MAB



Micheletti et al. 2015 PLoS ONE  
Biscarini et al BMC Genomics 2017  
Hernandez et al. BMC Genomics 2017



Candidate gene ; MAB



Falchi et al 2013 Plant Journal  
Pirona et al 2013 BMC Plant Bio  
Vendramin et al 2014 PLoS One



nature  
genetics  
OPEN

International  
Peach  
Genome  
Initiative

The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and adaptation

**Più di 1000 citazioni**

BMC Genomics

RESEARCH ARTICLE Open Access

The Peach v2.0 release: high-resolution linkage mapping and deep resequencing improve chromosome-scale assembly and contiguity

Ignacio Ibarra<sup>1</sup>, Jenny deJong<sup>2</sup>, Luca Dondini<sup>3</sup>, Sabina Micali<sup>3</sup>, Giulio Pignataro<sup>4</sup>, Chai Wendramin<sup>5</sup>, Roberta Piro<sup>6</sup>, Valeria Asanina<sup>7</sup>, Laura Galda<sup>8</sup>, Laura Rossini<sup>9</sup>, Daniele Bosis<sup>10</sup>, Michela Trogno<sup>11</sup>, Shenggang Zhu<sup>12</sup>, Jane Cartwood<sup>13</sup>, Stefano Tartarini<sup>14</sup>, Maria Teresa Dentini<sup>15</sup> and Jeremy Schmutz<sup>16</sup>\*



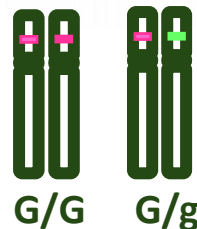


## Fenotipo

**Pesco  
(Dominante)**



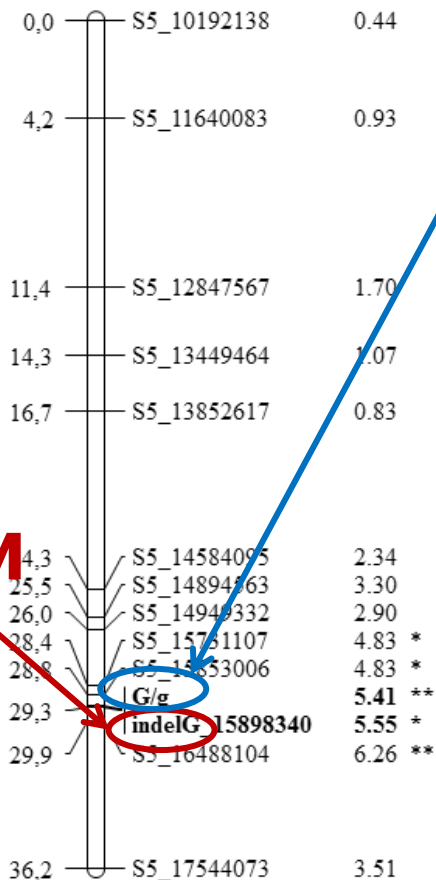
**Nettarina  
(Recessivo)**



## Genotipo

CxA-5

Marker  
skewedness  $c^2$   
value



**MM**

Il carattere pesco/nettarina è monogenico recessivo; le nettarine (pesche glabre) sono sempre omozigoti cioè hanno alleli identici, mentre le pesche (pubescenti) possono essere omozigoti o eterozigoti.

**LG 5 CxA mappa regione nell'intorno del locus G.** Mappa d'associazione ottenuta dall'analisi della popolazione Contender x Ambra F<sub>2</sub>.

A sinistra le distanze in cM; a destra io nome dei marcatori con la posizione fisica sul genoma di pesco Peach v1.0. Gli asterischi indicano la distorsione dei marcatori.

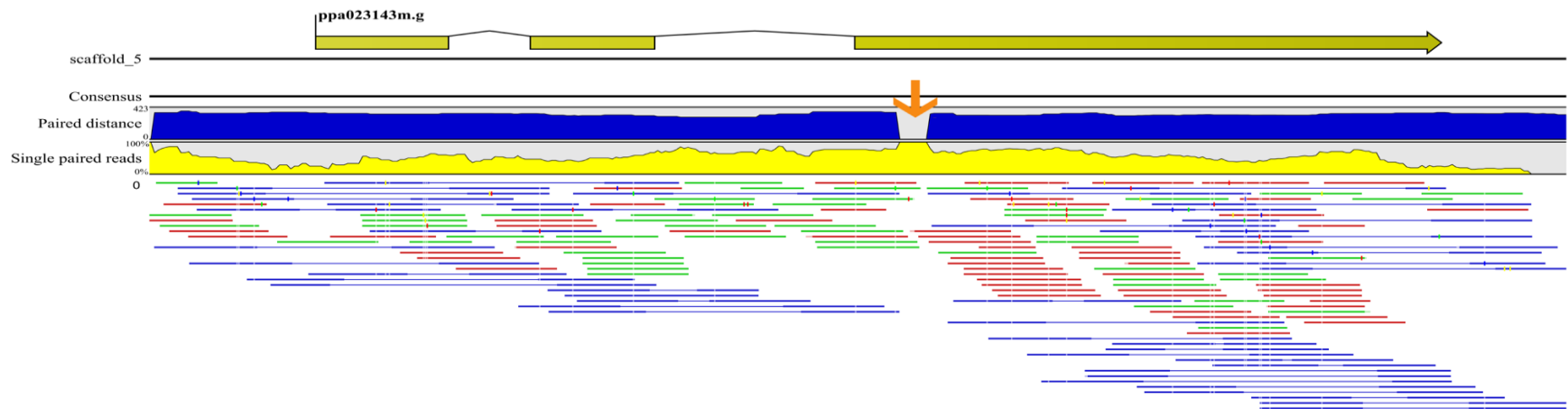
Individuazioni varianti 635 kb (291)

Varianti nelle regioni codificanti (67)

Varianti eterozigoti in F<sub>1</sub> CxA (P) (20)

Varianti omozigoti nettarina 'Quetta' (N) (2)

Delle 2 varianti omozigoti nella cv Quetta, il gene *ppa023143* (Pech v1.0) sembra essere un buon gene candidato, infatti è omologo di AtMYB25 un MYB factor di Arabidopsis è coinvolto nella formazione dei tricomi.

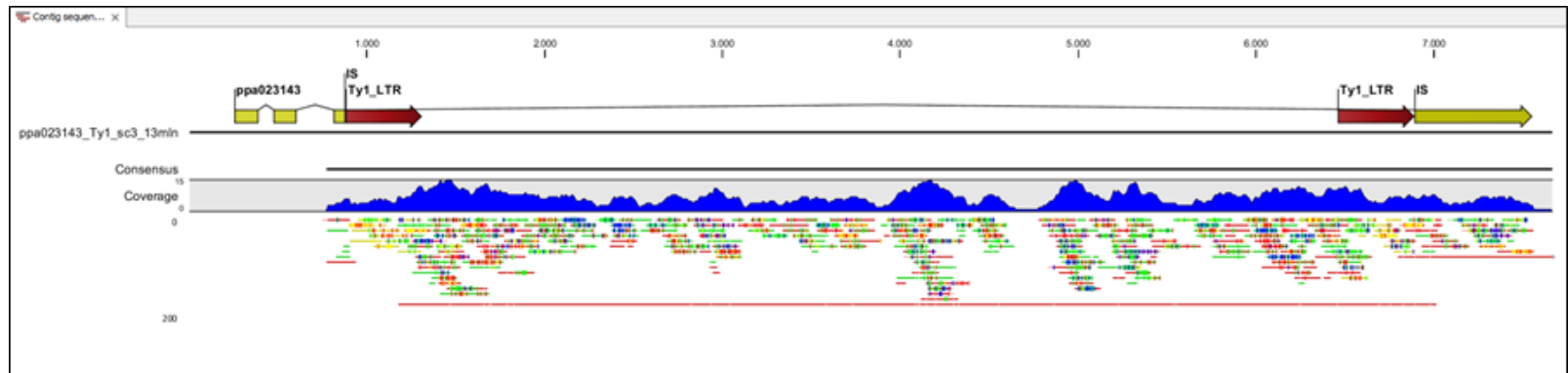
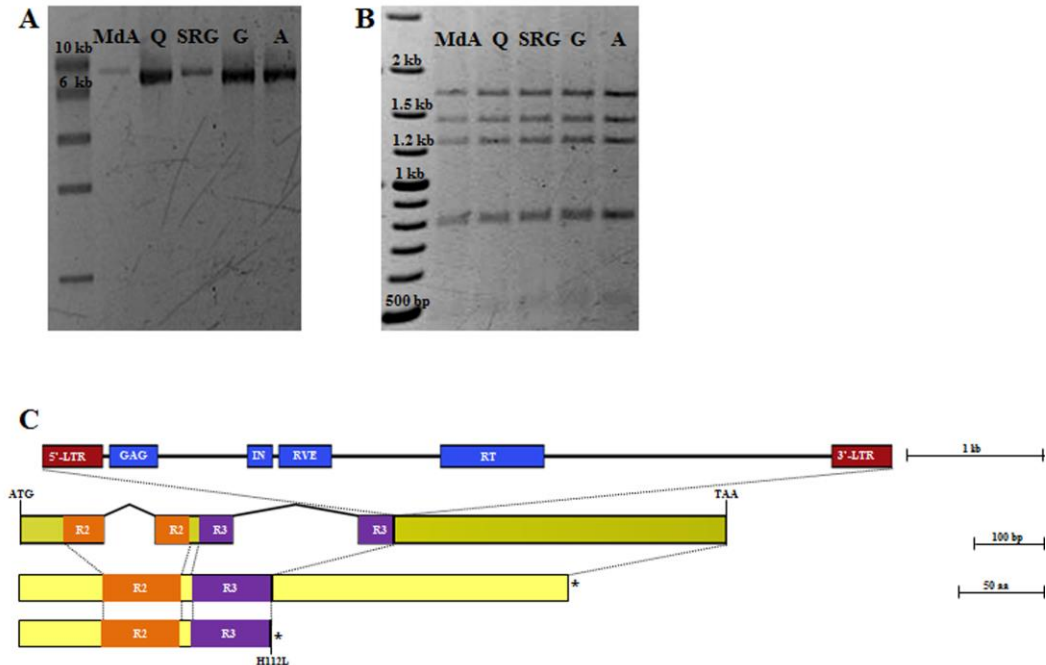


Allineamento delle reads provenienti dal risequenziamento di Quetta (g/g) su una porzione di 635 kb del cromosoma 5 del genoma di pesco Peach v1.0. La regione è stata individuata tramite la mappa di associazione C x A sul LG5 (da 15,853,006 bp a 16,488,104 bp). In alto la struttura genica (introni ed esoni) di *ppa023143m*. Al centro è riportata la distanza fra le coppie di sequenze in paired-end (blu) e le frequenze delle single reads (giallo) per il gene *ppa023143m* locus. In blu le paired reads in rosso e verde le single reads.

## Variant discovery in *PpeMYB25-like* (*ppa023143m*)

Cinque nettarine sono state analizzate per confermare la presenza del trasposone all'interno dell'esone 3 del gene *PpeMYB25-like*.

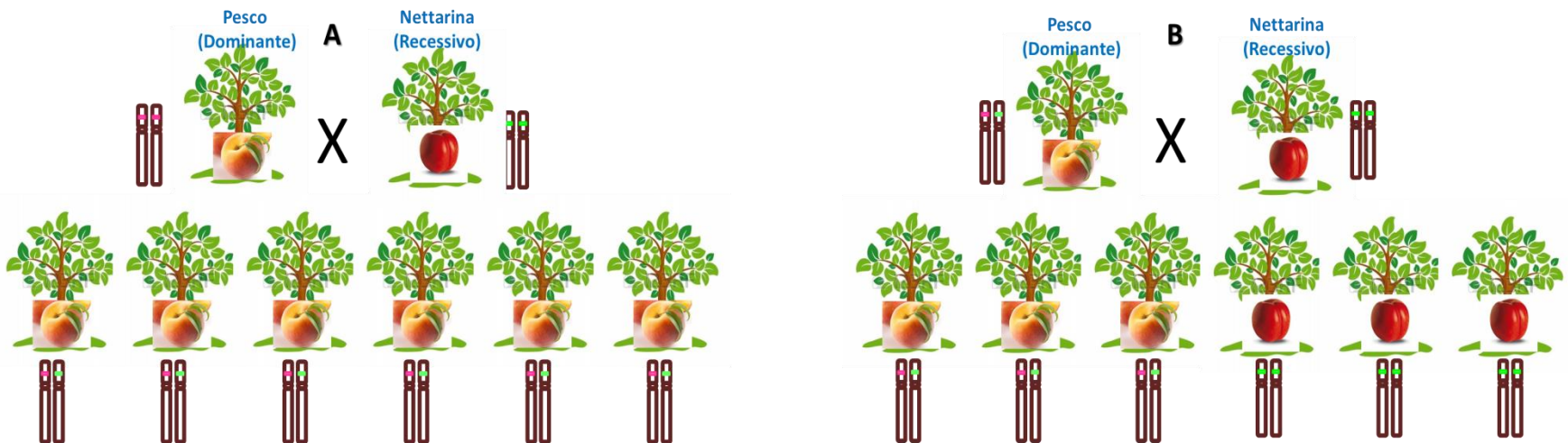
- (A) Long-range amplification evidenzia che tutte le accessioni hanno un frammento di 7 kb (rispetto all'atteso di 960 bp).
- (B) Doppia digestione dei prodotti di PCR long-range che evidenzia il medesimo pattern.
- (C) Posizione e struttura del retrotrasposone *Ty-copia* retrotransposon dedotto dall'analisi NGS dell'amplicone long-range di Quetta. L'inserzione da origine ad una proteina troncata e non funzionante.



## MAS carattere pesco/nettarina

(1) Se incrociamo una pianta di pesco con frutti glabri per una con frutti pubescenti affidandoci soltanto al fenotipo possiamo avere una delle due situazioni: (A) piante figlie tutte pesche, (B) piante figlie per metà pesche e per metà nettarine. Il fenotipo della progenie lo possiamo valutare soltanto dopo 2-3 anni dall'incrocio. Conoscendo il marcatore (**indelG**) associato al carattere siamo in grado di distinguere le pesche omozigoti (A) da quelle eterozigoti (B).

(2) Possiamo quindi, a seconda dei nostri obiettivi, analizzare i parentali prima dell'incrocio e selezionare dopo pochi mesi dall'incrocio le piante figlie (usando porzioni di tessuto fogliare) senza dover attendere i frutti.



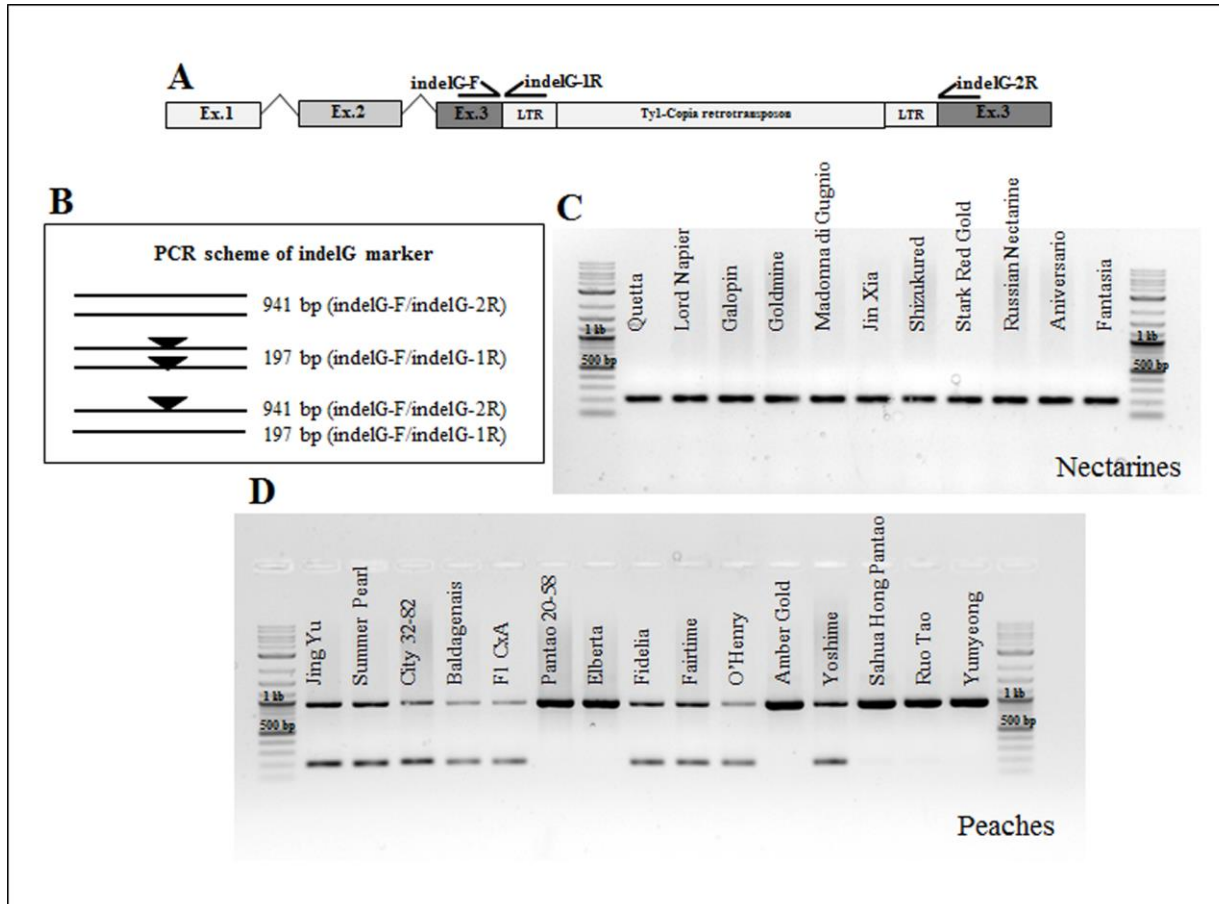
Adattata da: Vendramin et al. (2014) PLoS ONE

## Functional Marker indelG:

Un saggio con marcatori molecolari è stato sviluppato in base alla sequenza del gene *PpeMYB25* e del *Ty1-copia*. Tre primer sono stati sviluppati per discriminare le pesche dalle nettarine (A). Un panel di

nettarine (B) inclusi i putativi donatori del carattere mostrano un frammento unico di 200 bp (C).

Un set di pesche, con diverse origine e pedigree (D), mostrano un profile sia omo che eterozigote.





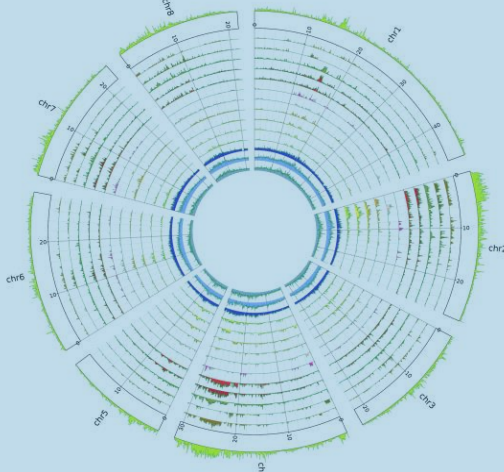
SNP detection, SNP Array, Genotype by Sequence



Verde et al. PLoS ONE 2012  
Verde et al. Nat Genet 2013



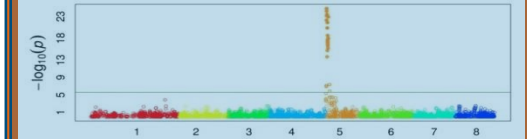
NGS, Genetic diversity  
characterization, domestication



Verde et al Nature Genetics 2013;  
Micheletti et PLoS ONE al 2015



GWAS, Genome Selection,  
Linkage and QTL analyses, MAB



Micheletti et al. 2015 PLoS ONE  
Biscarini et al BMC Genomics 2017  
Hernandez et al. BMC Genomics 2017



Candidate gene ; MAB



Falchi et al 2013 Plant Journal  
Pirona et al 2013 BMC Plant Bio  
Vendramin et al 2014 PLoS One

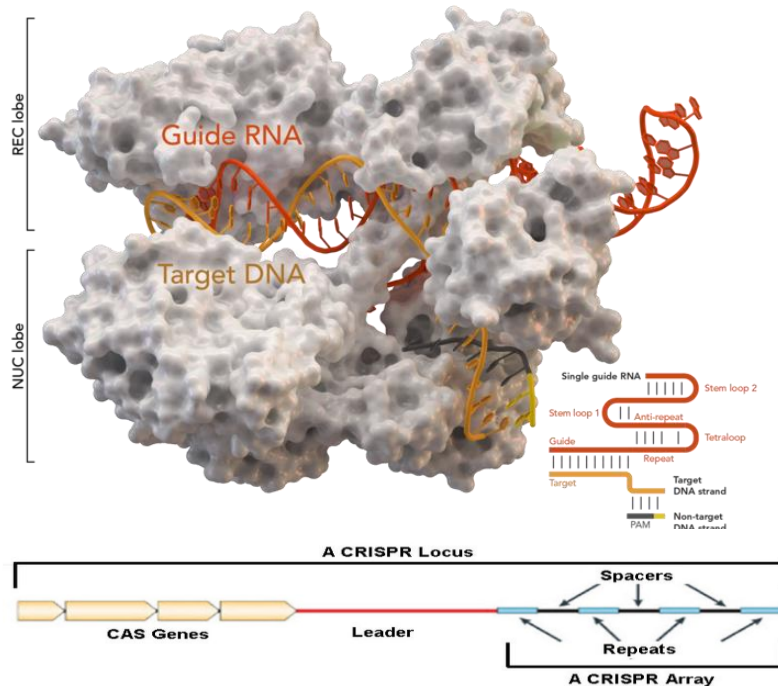
nature  
genetics  
OPEN



The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*)  
identifies unique patterns of genetic diversity,  
domestication

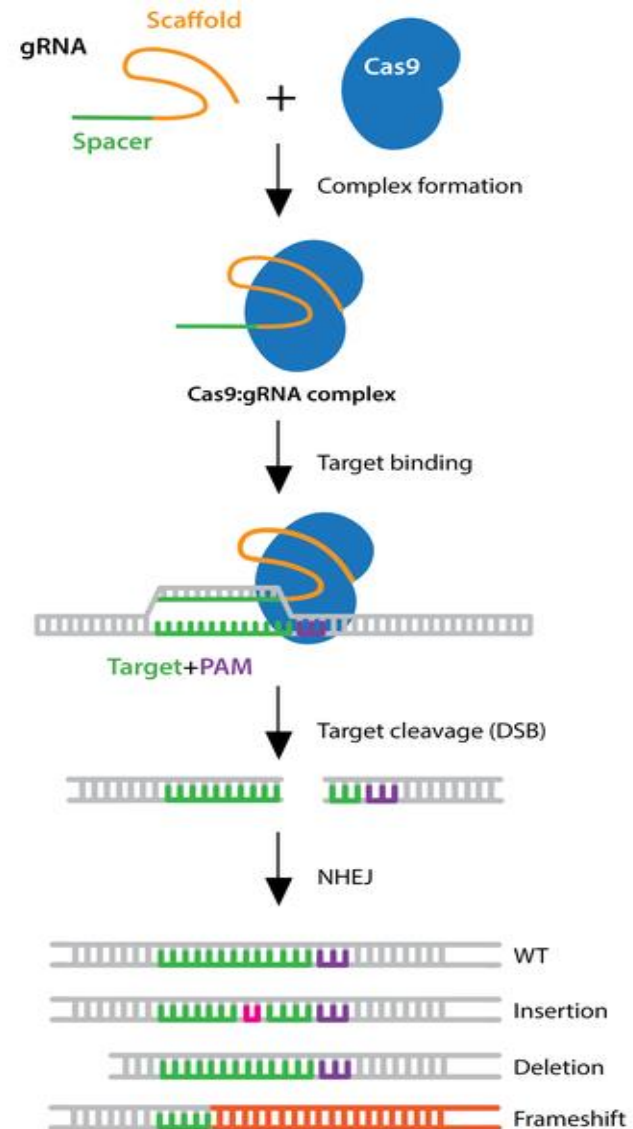
**Più di 1000 citazioni**

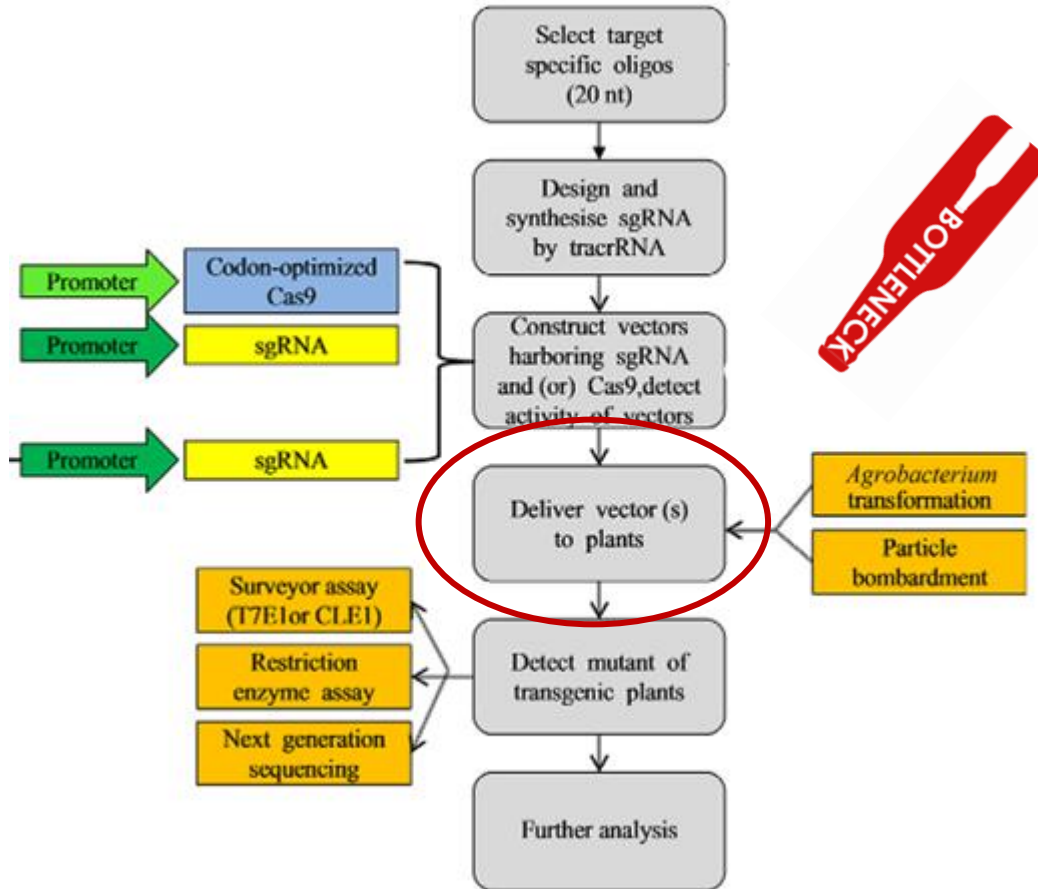




- The CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) system può essere programmato.
- Cas9 è una DNA **endonuclease** con due domini nucleasici che creano delle DBS (Double Break Strand)
- Cas9 è guidata da 2 molecole di RNA che possono essere fuse in una singola guida di RNA (sgRNA) che indirizza il taglio in un sito specifico (**programmabile**)
- E' necessario un Protospacer Adjacent Motif (NGG) situate all'estremità 3' della sequenza bersaglio di DNA
- DNA viene tagliato circa a 3 nucleotide a monte della PAM formando delle blunt-end
- A 20bp sgRNA è sufficiente per identificare un target (**specifico**)

- La nucleas CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) taglia il DNA in un punto preciso e predefinito detto sito target portando alla formazione di DSB.
- Questo taglio viene riparato da un meccanismo cellulare interno detto non-homologous end-joining (NHEJ) che porta alla formazioni di piccole inserzioni e deletzioni causando il knock-out genico





❖ In molte piante arboree la trasformazione e la rigenerazione avventizia sono difficoltose, hanno una bassa efficienza e i protocolli sono genotipo dipendente

❖ Per il genere *Prunus* la situazione è ancora più critica, in pesco non ci sono al momento protocolli di trasformazione efficienti ed affidabili. Si definisce **SPECIE RECALCITRANTE**



## Tiller Angle Control 1 (*PpeTAC1*) e il fenotipo Pillar

### OBIETTIVO:

Modificare l'architettura delle piante e dei frutti, favorendo una migliore intercettazione dell'energia luminosa e facilitando anche le operazioni colturali (potatura, raccolta).

A questo scopo uno dei geni coinvolti nel determinismo dell'architettura della pianta (*PpeTAC1* -tiller angle control 1 e ortologi) sarà editati in pesco, ciliegio e albicocco.



Standard (*BrBr*)



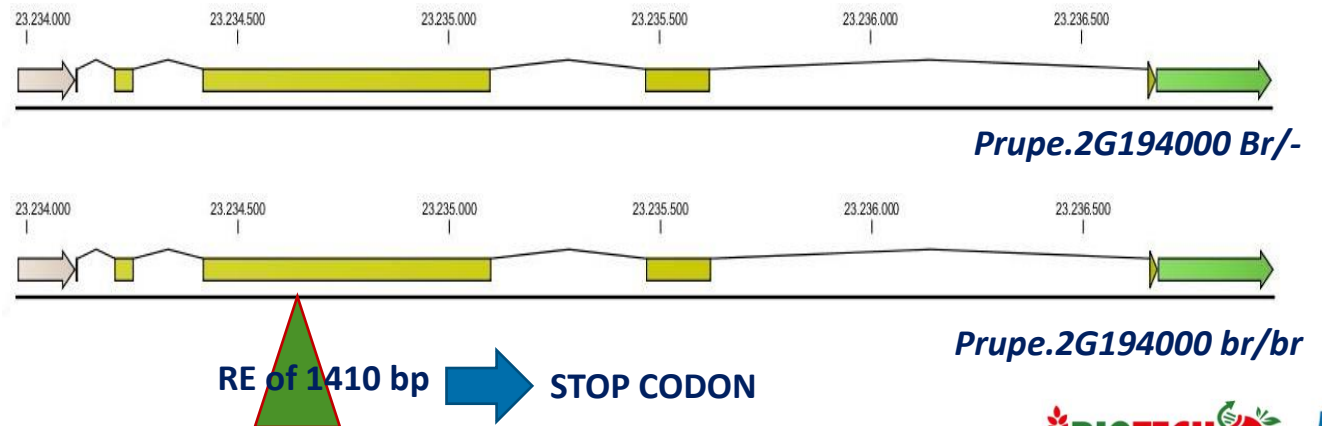
Upright (*Br/br*)



Pillar (*brbr*)

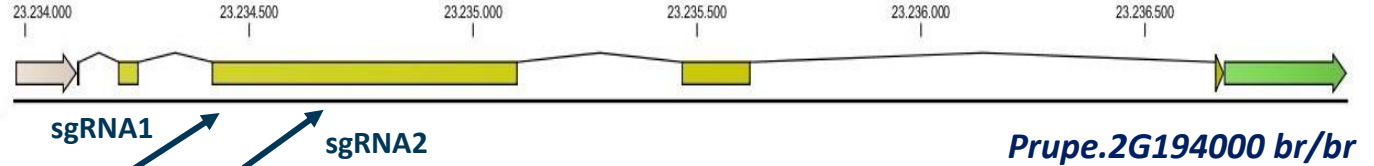
*PpeTAC1* appartiene alla famiglia dei geni IGT, così chiamati per la presenza del motivo conservato (G $\phi$ L(A/T)IGT) presente nel dominio II di tutte le sequenze identificate, che mantengono conservata la loro funzione nelle mono e dicotiledoni.

L'inserzione di un RE nel secondo esone causa la formazione di un codone di stop che porta alla formazione di una proteina tronca e quindi non funzionante. Le piante pillar non esprimono il gene *PpeTAC1*





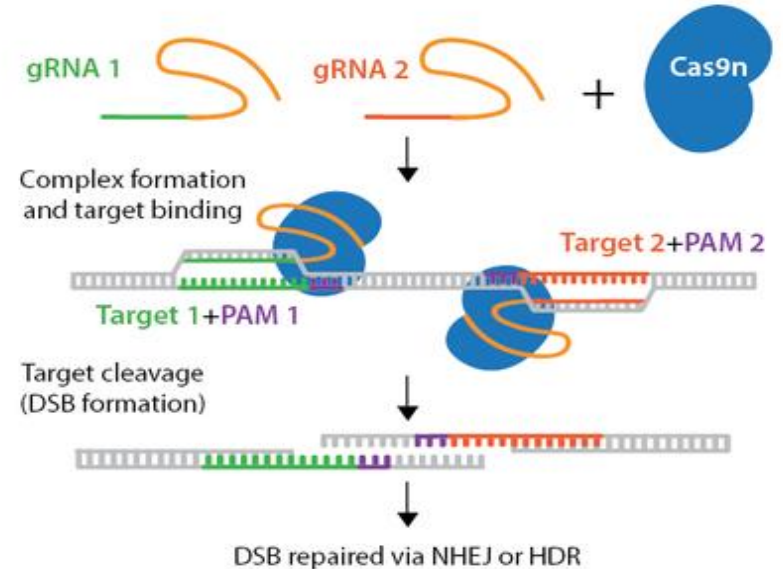
# Tiller Angle Control 1 (*PpeTAC1*) e il fenotipo Pillar



>Prupe.2G194000 - Pp02:23233979..23236950 forward

```

CCTCCTTTTAGTGTCTTCAACATCCATGATCATCCCTTTCAGTTCAGTGTTCCTTCACTGGGGCTAGCTTTTGCTA
CTCCTCATTGCCTTCTACTTGTACCACCAAGTCTTGTGAAATTCGCAATTCACAAAATATGAAAGTTAGAACC
ATGCACATTATATTAGGGTTTATTTTTTCAAAATGATTGTAGTCACTAAATGATCTTATTTTCAATTCACACATA
GATCTTCAACATGGGTTCATAAAGAGCTTTCATCAAAGGGTCTGCAAGTCTTATTTTCTGAACTCTCTCTTTCAT
ATACCAAATATAAAATTTTACCTTTTAAATTTGAGATTATTTGATTATTTTATCCAAGTTGAATGTACAAAATA
TTGTACACCTTTTTTATTCATGAATTTCTTAAATTTATTTTATTGGTTTCCCTCAGATCGGTTTGTCTGGGAATG
FGAAAAGAGTGAACATGGAAACCAATGACAAGGATCACAAGCATTTCTCAAAACAGTTGGCCTTGTAAATGTGGA
TGGGCTTGATGGTTGGAGGGATGGCATTTTAACTATAGGCACCTTTGGTTTCGACCCCTAAAACCCCTCACCAC
CAAAACGAATATTTCTGTGGAGAGCGAAGAGACGATCAGGAAAGCCATGGATTTTCACACACTGGTAATGATG
ATGATGATGATGATGATGAACATATGATCATAGTGTGAAGATGAAGAACGAAACCTTTAATGTTTACAACAT
TGAACACAGCTTTGAGGATATGATCAAAATTTGATGCCATGTTTCAGAAACAGCTGATGTGATCCTGACCCTT
GATGGTTCCTCTTACTCCAAATGGAGGGGTCAGTGAAAACAGTACTAAACCTGATCAGAGTGCCTAATGATCAGA
CCAAGAAATGAAGAGGTCAGAGAATTACACTGCTGACTTGTTCACAGGTGATGTTCTCTGATGTTGGTCAACTGAA
GCTTGCATCTGGCAAGGTCACGCCAGAAAATGGAGAAAATAAATGAATGCCAGAAACAGGAGTGGCCTAGCATTTGCC
AAGAAACTCATCCCTCGCGTCAAGATGATTCAGTCCAATCAAAAATATGCAACGAGTGAGTAGTTAAATGCCTTT
ATTTTCTATCTTTTATGATCCCCAAGTCACCTTCTTCCATAAGCATATCATATCGGAAACATGTTACGTTATCAAA
CTAGCAACATAGAACACTCCGAATTCATATTTGCTGAAATGGGGTCAAATTTACAGTATCATATGTGATTAG
AGTTGATATCACGTTGATGCACATTTCTTTTCCCTAGTCAATTTAGGAAGGGCGGCACCTTATTAGCTAGTAATTT
AGTAACGGTACATTTTGTAGTTTATAGCGAGGTATAAATTAAGTCTGGAGAGATCATATCACTGTCTATGGCTTGT
TTTCATAGTTCACTGAATGATACCTAATCTAATGTCTATGTTGATGAGGAGGATGTTGAAGAGGAAGATCCAT
CCAGCTGAGCTTGAAGTCAAGATTCACAAAATCAGATGGCCAGAAAGCAGCCAGTGGGTGAGAGCTCATCTCCAAT
TCGAAAATGATGCTTATGAATCGGTTTCTTTGCTTCCAATTCAAAGGTACATACCACCTCTCTATCATTCAAAGACAG
CATATGTTTCCACACTAATAAAATCCAGCATTAACTAAAACGTTAAGATGTATACCTTTTTTGTGGGTTAAAT
TTTATGTTTTAACCTTTCATCTTATAATTTGACGTTAACGAGACAGAACATTTGAAAAGAGAAGGAATAATGGATAA
    
```



## Peptide sequence *PpeTAC1*

```

# 5'3' Frame 1Met K I F N W V H K R L H Q R V V K D G F A G N V K K S E
L E T N D K D T Q A F L K Q V G L V N V D G L D G W R D G I L T I G T F
G F D P L K P S T H Q N E Y F V L E S E D D D Q E S H G F S H S G N D D
D D D D D E H Y D H S V E D E E L N P L Met F T T F E H S F E D I G S N
F D A I V Q K P A D V I L T V D G V P L T P F E G S S E I S T K P D Q S
A N D Q S K N K K G Q R I T L A D L F Q A D V P D V G Q L K L D S G K V
Q P E Met E K K Met N A R T R S G L A F A K K L I P R V K D D S S P I K
N Met Q R L Met R R Met L K R K I H P A E L E V K I H K S D G Q K Q P S
A V E L I S N V E N D A Y E S V S L L P I Q G A P C V H Stop
    
```

## Peptide sequence *PpeTAC1* edited

```

Met K I F N W V H K R L H Q R V A L A D L F Q A D V P D V G Q L K L D S G
K V Q P E Met E K K Met N A R T R S G L A F A K K L I P R V K D D S S P I
K N Met Q R L Met R R Met L K R K I H P A E L E V K I H K S D G Q K Q P S
A V E L I S N V E N D A Y E S V S L L P I Q G A P C V H Stop
    
```

Silenziamento del gene *PpeTAC1* attraverso un costrutto che contenga due gRNA che portino alla formazione di NHEJ e quindi alla delezione di un frammento (circa 500 nt) con conseguente ottenimento di una proteina trunca e non funzionante

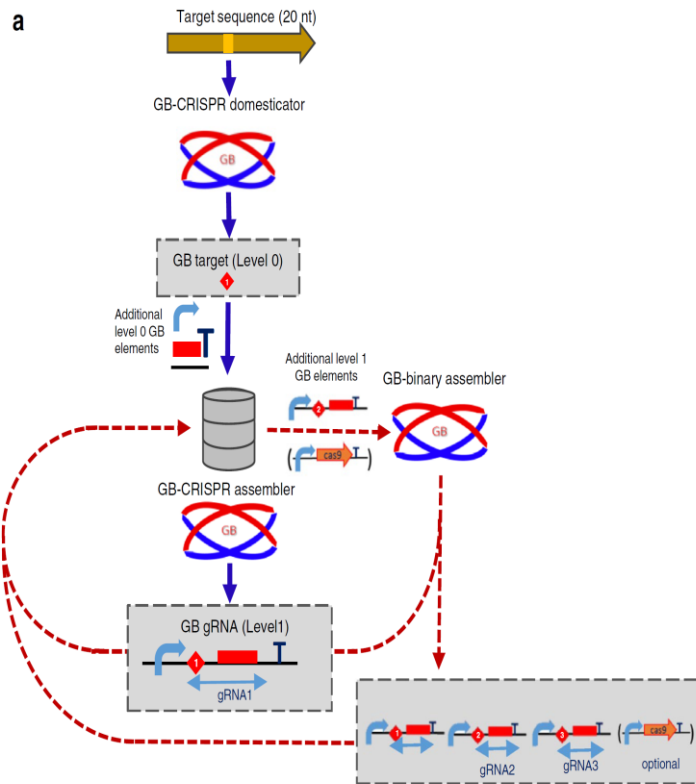
## Disegno sgRNA e Individuazione putativi off-target Lovell



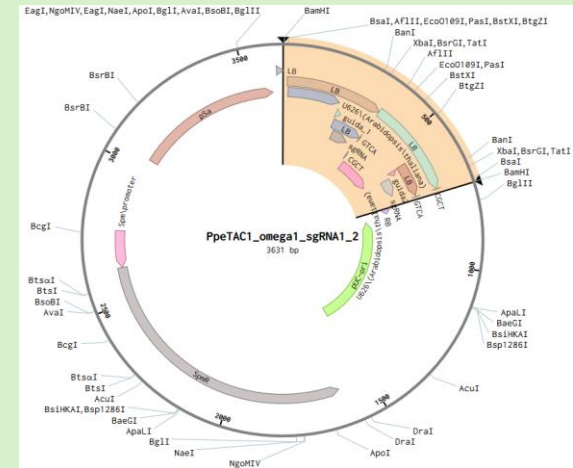
Presente il genoma del pesco V2.0

position		target sequence	sequence information				number of target sites		
start - end	+	20mer+PAM (total 23mer)	GC% of 20mer	Tm of 20mer	TTTT in 20mer	restriction sites	20mer +PAM	12mer +PAM	8mer +PAM
151 - 173	-	CCATGCACATTATATTAGGGTT [gRNA]	30.00%	63.94 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">497 [detail]</a>
231 - 253	+	TCCTCAACTGGGTTCAATAGGAGG [gRNA]	40.00%	66.61 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">389 [detail]</a>
253 - 275	+	CGTTCATCAAAGGGTCGTCAGG [gRNA]	50.00%	71.59 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">126 [detail]</a>
478 - 500	-	CCAATGACAAGGACACACAAGCA [gRNA]	45.00%	70.60 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">415 [detail]</a>
608 - 630	+	CCAAAACGAATATTTCTGTTCTGG [gRNA]	35.00%	61.08 °C	-	SspI	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">209 [detail]</a>
629 - 651	+	GGAGAGCGAAGAAGCAGTCAGG [gRNA]	55.00%	71.99 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">74 [detail]</a>
639 - 661	+	GAAGACGATCAGGAAAAGCCATGG [gRNA]	50.00%	71.50 °C	-	BtgI NcoI	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">429 [detail]</a>
656 - 678	-	CCATGGATTTTCACACAGTGGTA [gRNA]	40.00%	67.97 °C	-	BtgI NcoI	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1202 [detail]</a>
755 - 777	+	AACATTTGAACACAGCTTTGAGG [gRNA]	35.00%	63.65 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">304 [detail]</a>
813 - 835	-	CCAGCTGATGTGATCCTGACCGTT [gRNA]	55.00%	74.22 °C	-	MspA1I PvuII	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">224 [detail]</a>
827 - 849	-	CCTGACCGTTGATGGTCCCTC [gRNA]	60.00%	75.66 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">57 [detail]</a>
842 - 864	+	TGCCCTCTTACTCCATTGAGG [gRNA]	45.00%	69.67 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">881 [detail]</a>
855 - 877	-	CCATTGAGGGTCCAGTGAAT [gRNA]	45.00%	71.28 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">295 [detail]</a>
888 - 910	-	CCTGATCAGAGTGCATATGATCA [gRNA]	40.00%	66.20 °C	-	BclI	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">192 [detail]</a>
923 - 945	+	GAAAGGTCAGGAATTACACTGG [gRNA]	40.00%	65.24 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">203 [detail]</a>
956 - 978	-	CCAGGCTGATGTTCTGATGTTG [gRNA]	50.00%	70.83 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">130 [detail]</a>
1029 - 1051	+	ATGAATGCCAGAACAAGGAGTGG [gRNA]	45.00%	69.69 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">471 [detail]</a>
1076 - 1098	-	CCCTCGCTCAAAGATGATTCAA [gRNA]	40.00%	66.14 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">49 [detail]</a>
1077 - 1099	-	CCTCGCTCAAAGATGATTCAAAG [gRNA]	45.00%	66.34 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">90 [detail]</a>
1161 - 1183	-	CCCCAAGTCACCTCTCCATAA [gRNA]	40.00%	66.61 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">844 [detail]</a>
1240 - 1262	+	ATTCTAATTTGTCTGAATGGG [gRNA]	20.00%	56.07 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">246 [detail]</a>
1517 - 1539	-	CCATCCAGCTGAGCTTGAAGTCA [gRNA]	50.00%	73.05 °C	-	MspA1I PvuII	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">235 [detail]</a>
1536 - 1558	+	GTCAAGATTCAAAATCAGATGG [gRNA]	35.00%	62.80 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">615 [detail]</a>
1559 - 1581	-	CCAGAAGCAGCCAGTCGGGTAG [gRNA]	65.00%	79.99 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">397 [detail]</a>
1569 - 1591	-	CCAGTGCGGTAGAGCTCATCTC [gRNA]	55.00%	74.83 °C	-	SacI	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">31 [detail]</a>
1570 - 1592	-	CCAGTGCGGTAGAGCTCATCTCC [gRNA]	60.00%	76.25 °C	-	SacI	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">74 [detail]</a>
1620 - 1642	+	GTTTCTTGTCCAATTCAAGG [gRNA]	35.00%	63.80 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">652 [detail]</a>
1696 - 1718	+	TCCAGCATTAATACTAAAATCTGG [gRNA]	30.00%	61.95 °C	-	AseI	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">293 [detail]</a>
1854 - 1876	+	ATAAAGCTCAAATGCCATAGTGG [gRNA]	35.00%	65.10 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">169 [detail]</a>
1868 - 1890	-	CCATAGTGGAGCTAATTGTCAA [gRNA]	35.00%	65.69 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">211 [detail]</a>
1887 - 1909	+	TCAAATCTGATCCAATCATTTGG [gRNA]	30.00%	61.70 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">388 [detail]</a>
1899 - 1921	-	CCAATCATTGGCAATATCCTA [gRNA]	35.00%	66.66 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">492 [detail]</a>
1924 - 1946	-	CCATCAGCATGACCATGCATGTA [gRNA]	45.00%	70.89 °C	-	NsiI NspI	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">334 [detail]</a>
1980 - 2002	-	CCCAATAGTACTTTGATCTCCA [gRNA]	30.00%	62.51 °C	-	ScaI	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">178 [detail]</a>
2000 - 2022	-	CCAGCACTACATATTGCATGTC [gRNA]	45.00%	69.37 °C	-	NspI	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">161 [detail]</a>
2268 - 2290	+	ATGAATATGAACTACTGATTAGG [gRNA]	25.00%	59.34 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">365 [detail]</a>
2379 - 2401	+	AAGATGTGCATAGTCCGATCAGG [gRNA]	45.00%	69.21 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">140 [detail]</a>
2393 - 2415	-	CCGATCAGGTTTCGCACACAGCA [gRNA]	50.00%	73.23 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">285 [detail]</a>
2427 - 2449	-	CCAGTGTCTAGCACITTTCAATG [gRNA]	45.00%	69.36 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">275 [detail]</a>
2428 - 2450	-	CCAGTGTCTAGCACITTTCAATG [gRNA]	45.00%	69.53 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">132 [detail]</a>
2444 - 2466	+	TCCATGTAATCATTTCTGATCTGG [gRNA]	35.00%	63.42 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">94 [detail]</a>
2450 - 2472	+	TAATCATTTCGACTGTAATGG [gRNA]	30.00%	62.10 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">287 [detail]</a>
2451 - 2473	+	AATCATTTCGACTGTAATGG [gRNA]	30.00%	62.31 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">228 [detail]</a>
2571 - 2593	-	CCAACGGTTGATGTCGATCAAG [gRNA]	45.00%	68.40 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">117 [detail]</a>
2591 - 2613	+	AAGTCAAAACCATATGCTTGGG [gRNA]	30.00%	62.56 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">414 [detail]</a>
2684 - 2706	-	CCTGTGTGCACTGAATTAAGGC [gRNA]	45.00%	70.22 °C	-	NdeI ApaLI Bme1580I	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">342 [detail]</a>
2688 - 2710	+	GTGTGCACTGAATTAAGGCCTGG [gRNA]	50.00%	72.18 °C	-	ApaLI Bme1580I StuI	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">182 [detail]</a>
2699 - 2721	+	ATTAAGGCCTGGAGGTTCTCTGG [gRNA]	55.00%	76.54 °C	-	StuI	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">106 [detail]</a>
2706 - 2728	-	CCTGGAGGTTCTCTGGGAATTA [gRNA]	50.00%	73.07 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">85 [detail]</a>
2717 - 2739	-	CCTGGGAATTAAGGGTTTITTTG [gRNA]	35.00%	65.35 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">95 [detail]</a>
2811 - 2833	+	GTTGTGAACCATGTGATTTCTGG [gRNA]	40.00%	64.98 °C	-		<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">1 [detail]</a>	<a href="#">284 [detail]</a>

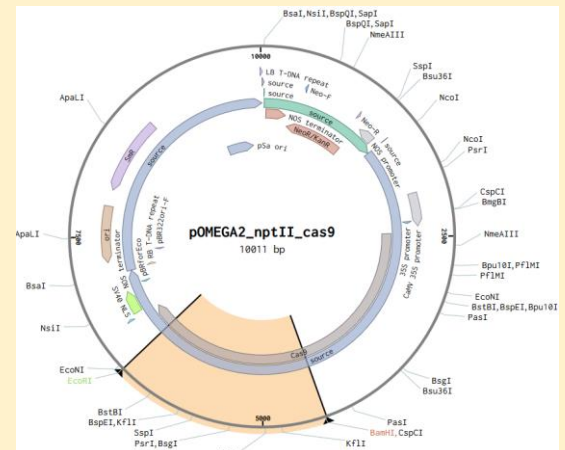
## Ottenimento del costrutto con un approccio monocistronico



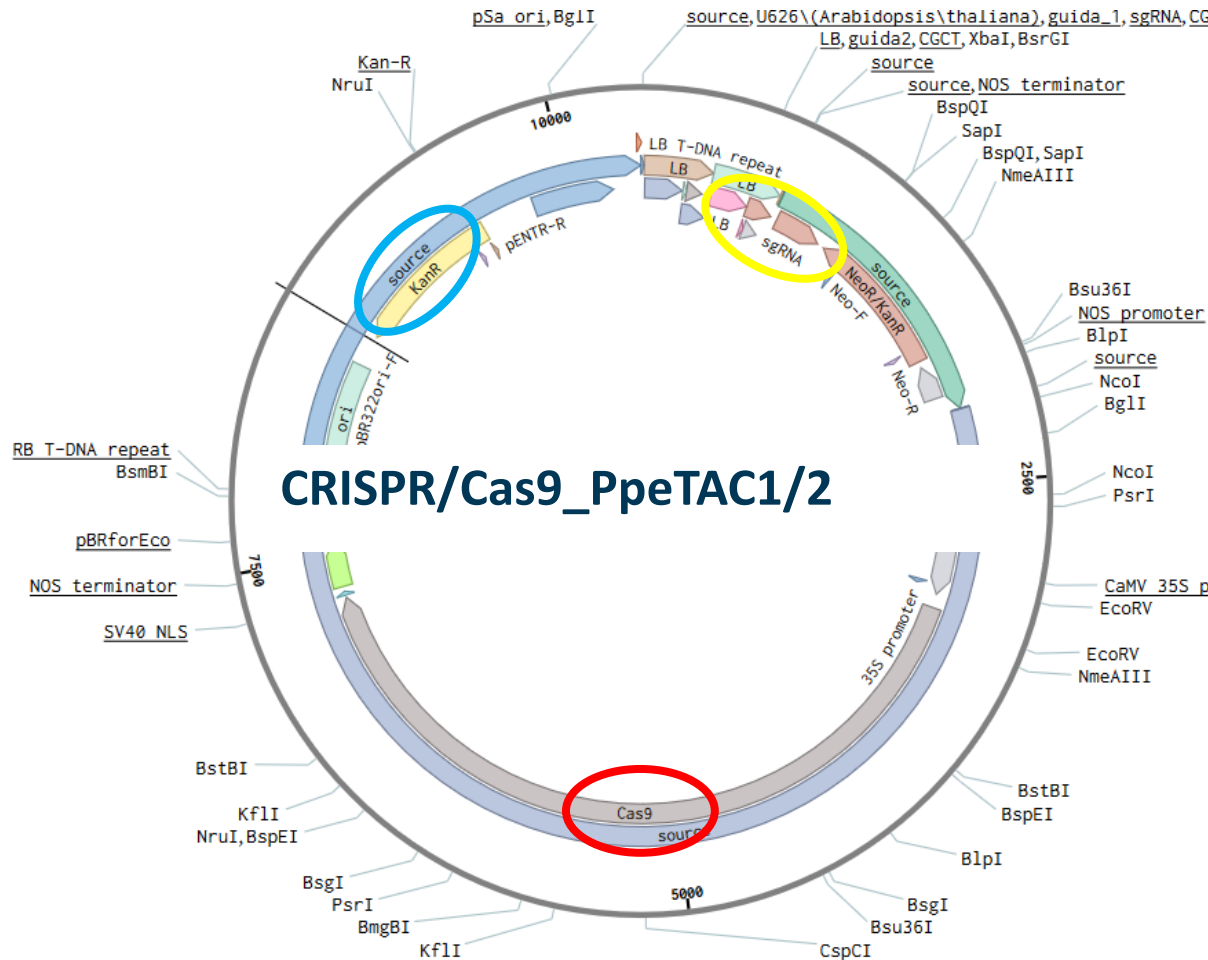

GoldenBraid 3.0



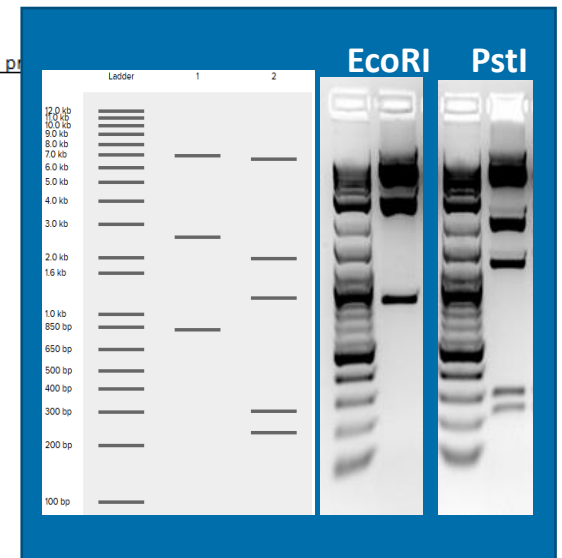
Costrutto Contenente le 2 guide

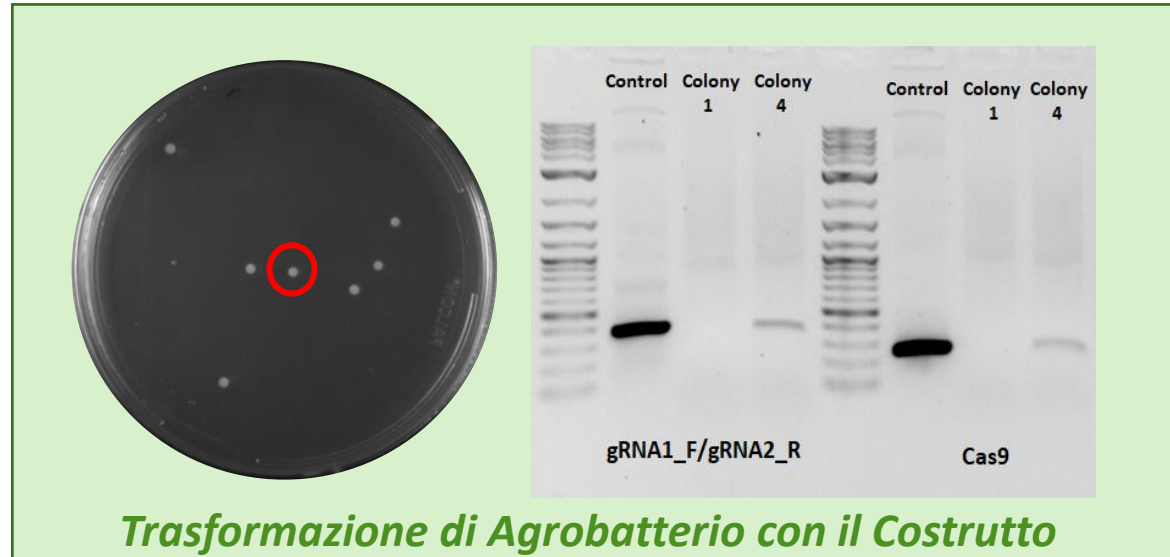


Costrutto Contenente NPTII e hCAS9



**Digestione enzimatica del  
costrutto per verificarne la  
correttezza**



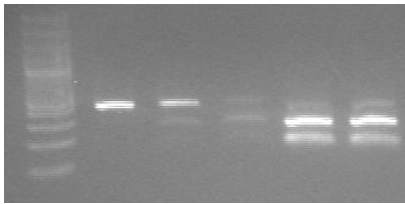


**Infezione con Agrobatterio di foglie di piante micropropagate**

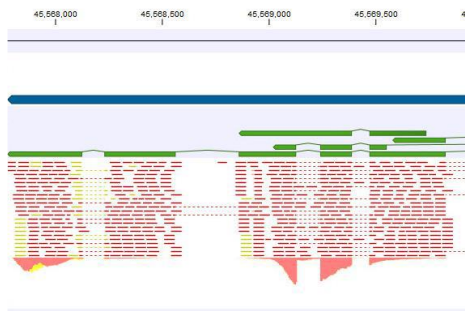


## Analisi genotipo

Analisi sito d'interesse  
(PCR, Sanger)



Analisi off-target  
(NGS)



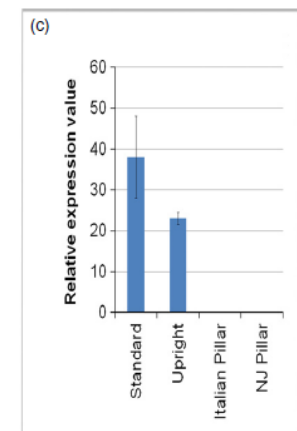
## Analisi dei trasformanti



## Analisi Fenotipo



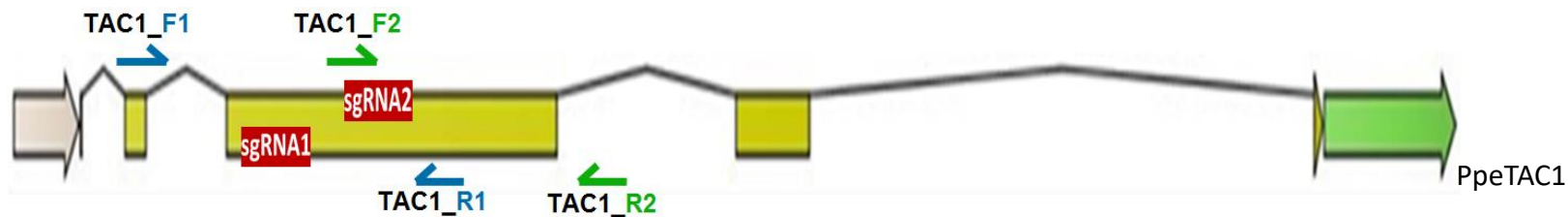
## Analisi Espressione



## Saggio distruttivo su campioni di foglia *Prunus persica* cv Indipendence

### Test In Vivo dei sgRNA

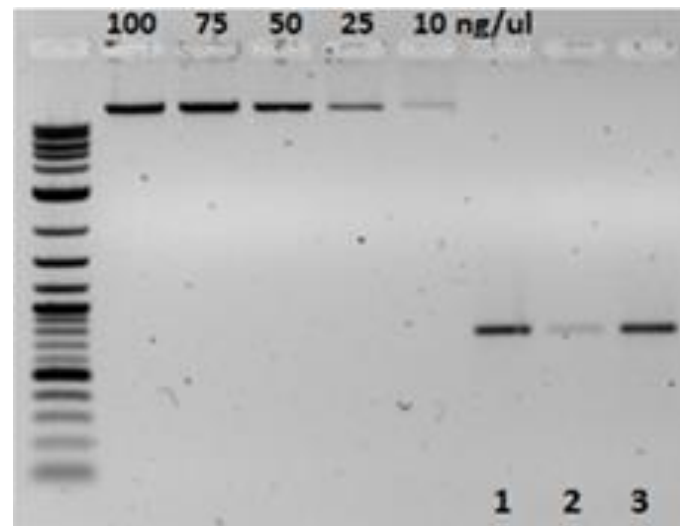
Costrutto → PpeTAC1



1. Indipendence WT **F1-R1** → amplicone 740 bp
2. Indipendence T8(22)
3. Indipendence T8(23)

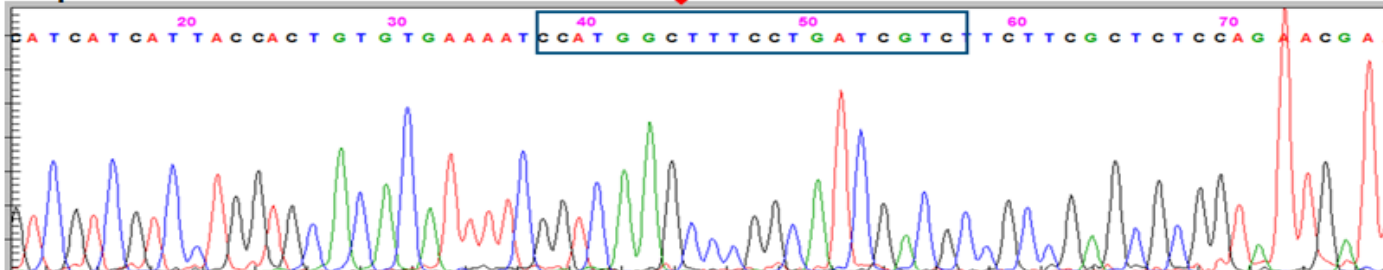


**Ampliconi comprendono siti di  
appaiamento sgRNA**



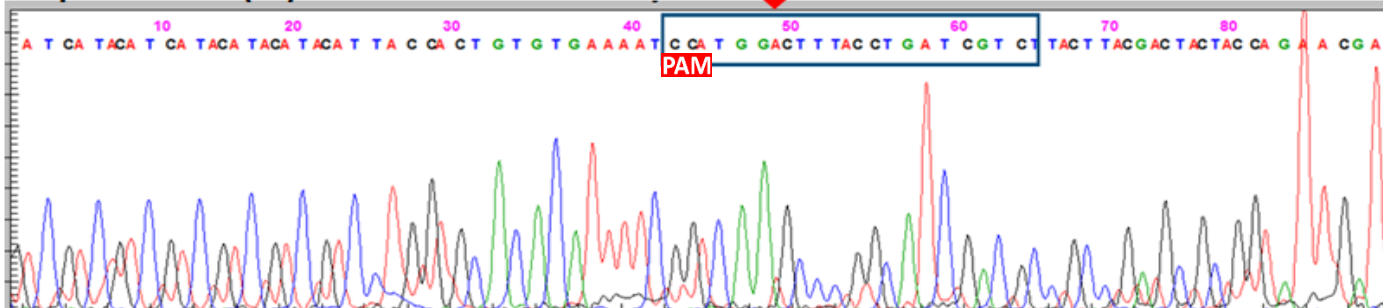
## Saggio distruttivo su campioni di foglia *Prunus persica* cv Indipendence

Indipendence WT

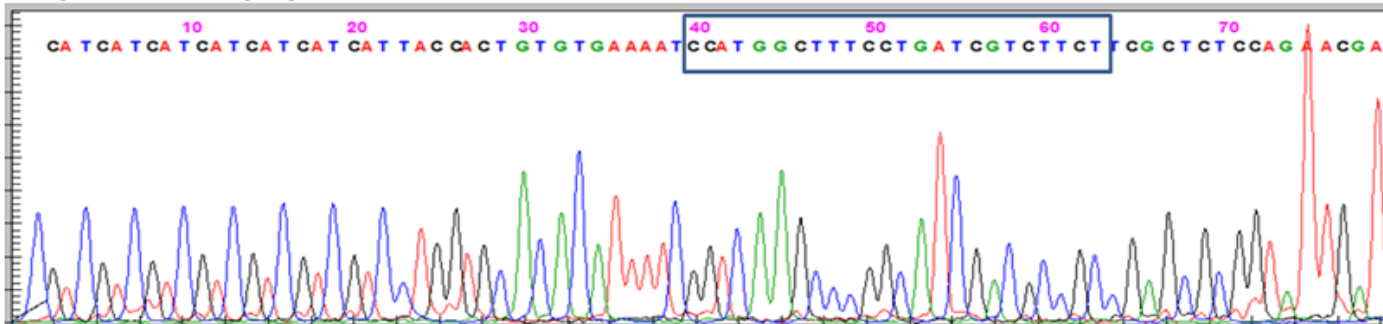


Inserzione di una Adenina

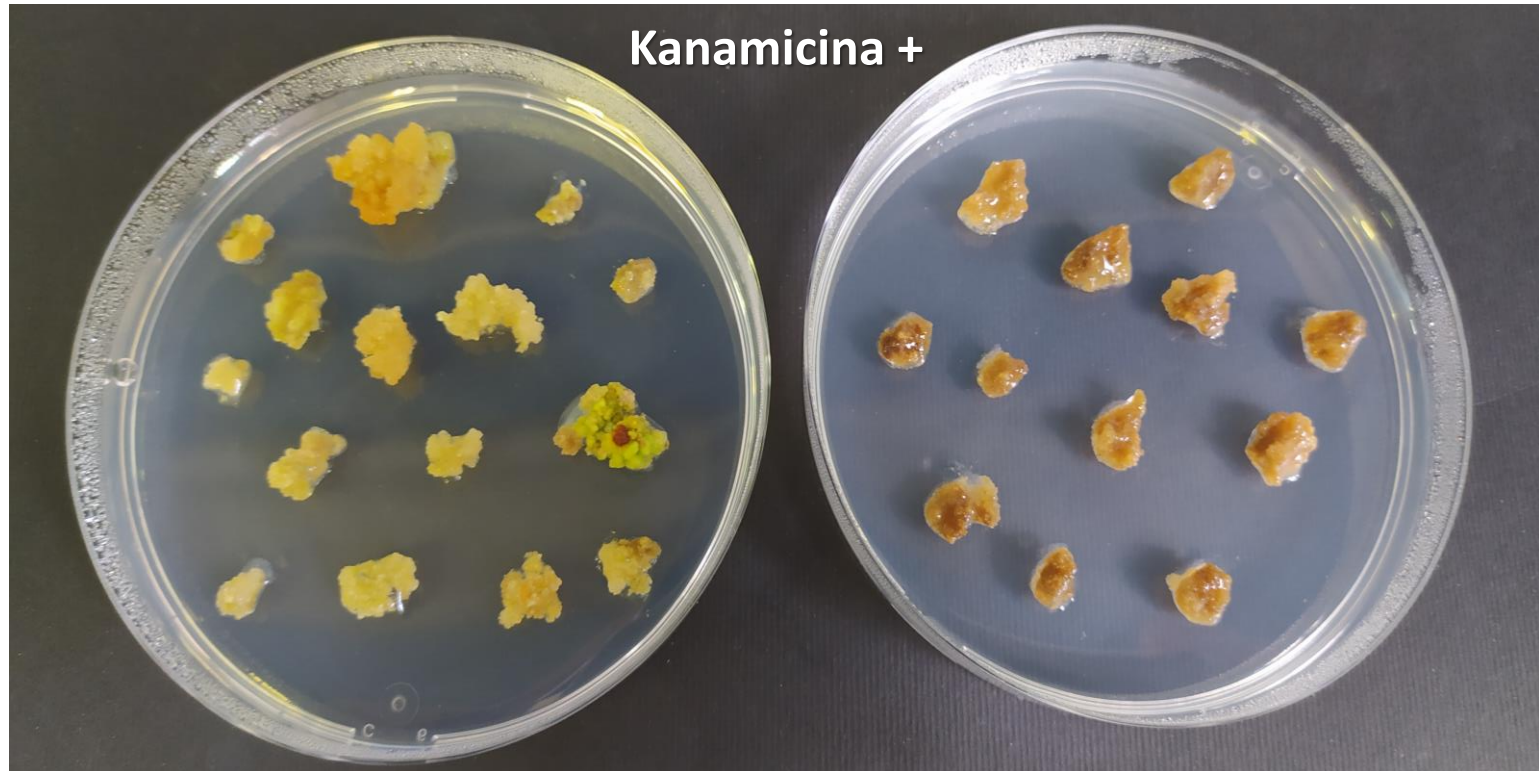
Indipendence T8(22)



Indipendence T8(23)



## Callo Iperproliferante GF677



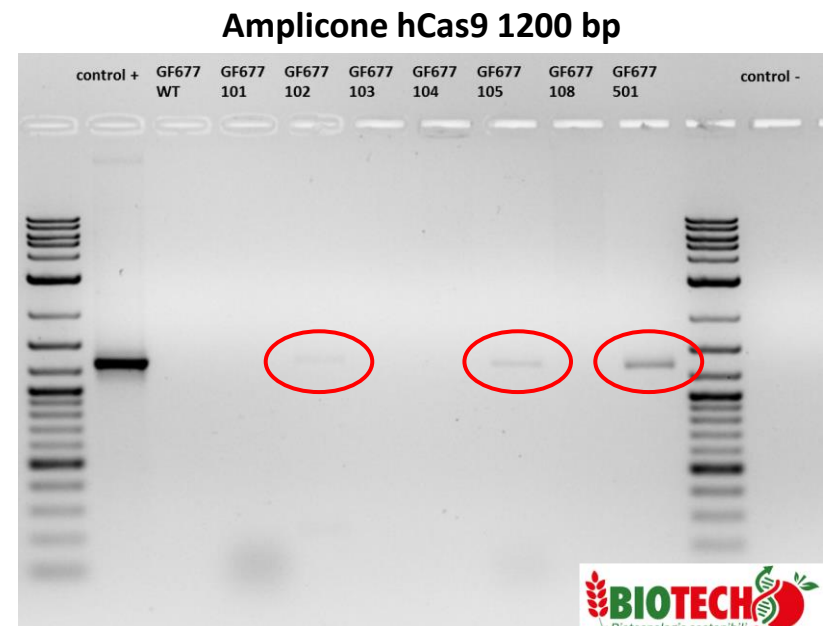
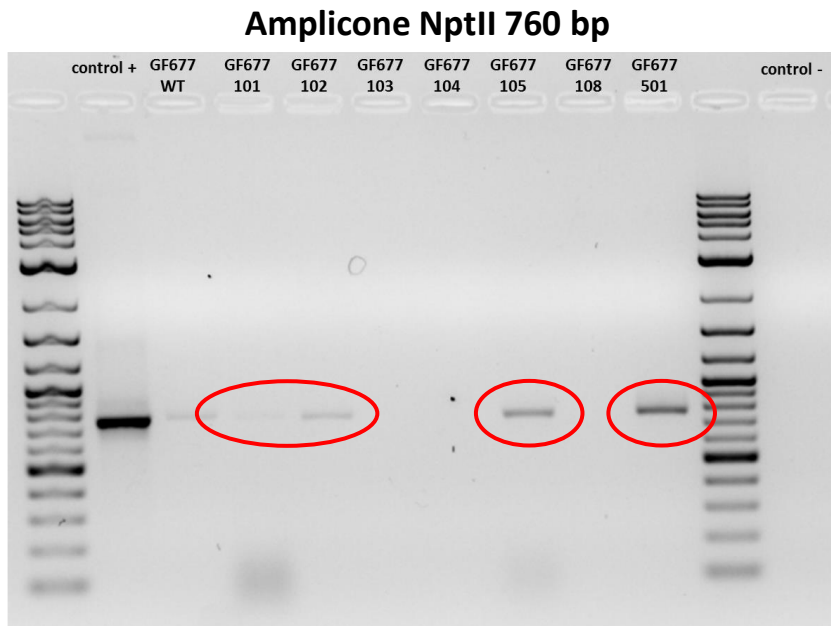
Trasformato PpeTAC1

Non Trasformato PpeTAC1



## Analisi mutanti putativi provenienti dall'infezione del callo di GF677

- Campioni da 101 a 105 → PpeTAC1
- Campioni 501 → NptII\_hCas9







**Elisa Vendramin**

[elisa.vendramin@crea.gov.it](mailto:elisa.vendramin@crea.gov.it)