

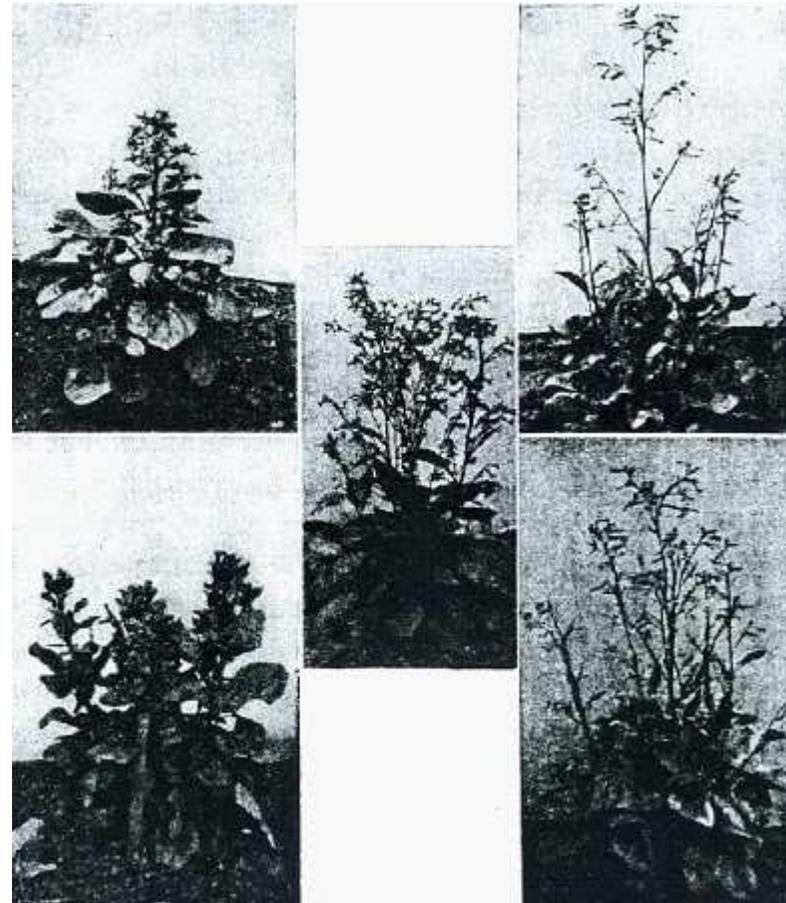
# **MIGLIORAMENTO GENETICO DELLE PIANTE**

# FASI DEL MIGLIORAMENTO GENETICO

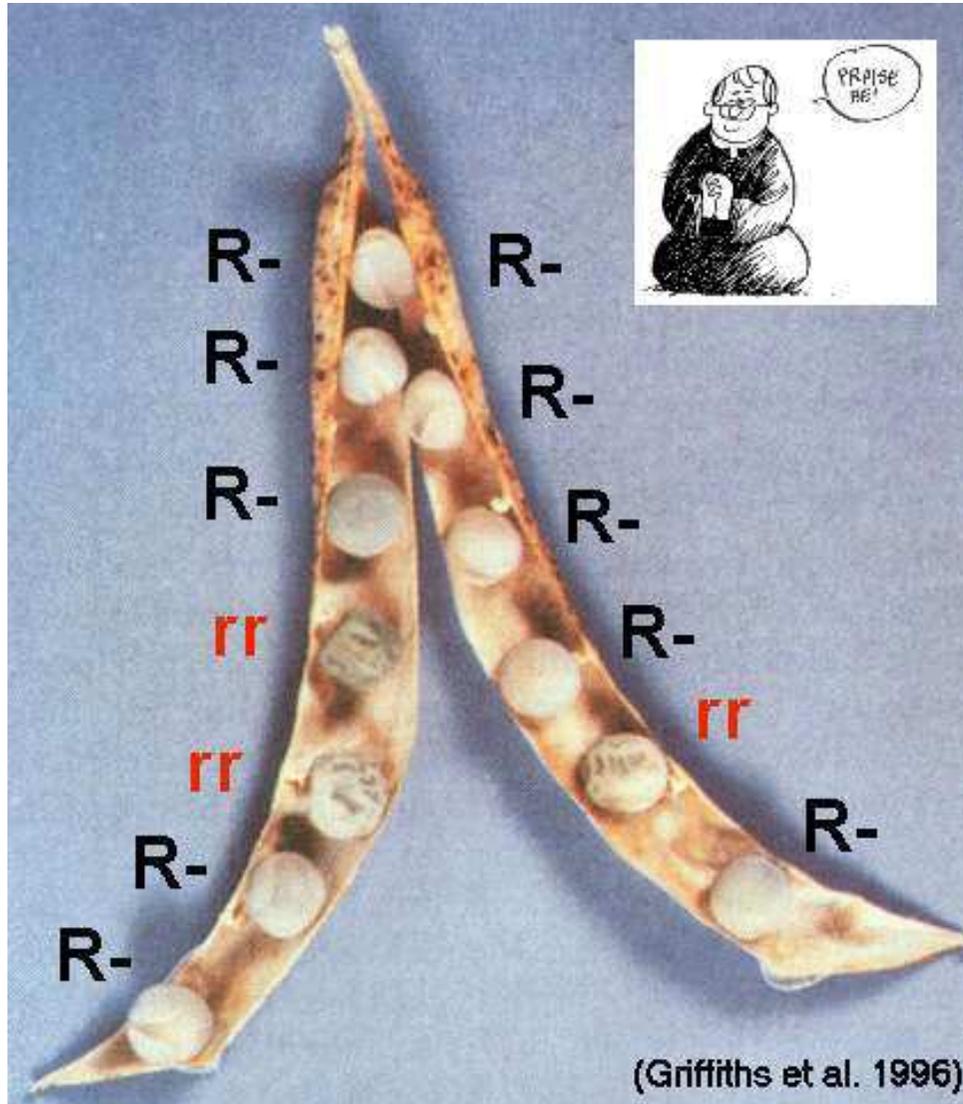
- 1) Introduzione di specie coltivabili in una regione
- 2) Selezione all'interno delle varietà locali -> omogeneità genetica (svantaggiosa sul lungo termine, es. suscettibilità a malattie)
- 3) Incroci intra- ed interspecifici per creare variabilità e selezionare nuovi genotipi

Fino al XVII-XVIII secolo, l'uomo ha semplicemente selezionato genotipi migliori basandosi sul fenotipo, sfruttando la variabilità genetica esistente

In seguito, ha iniziato a combinare in modo controllato tale variabilità per ottenere piante con specifici tratti migliorati: incroci intra- ed interspecifici



# Mendel: leggi dell'ereditabilità



# METODI D'INCROCIO

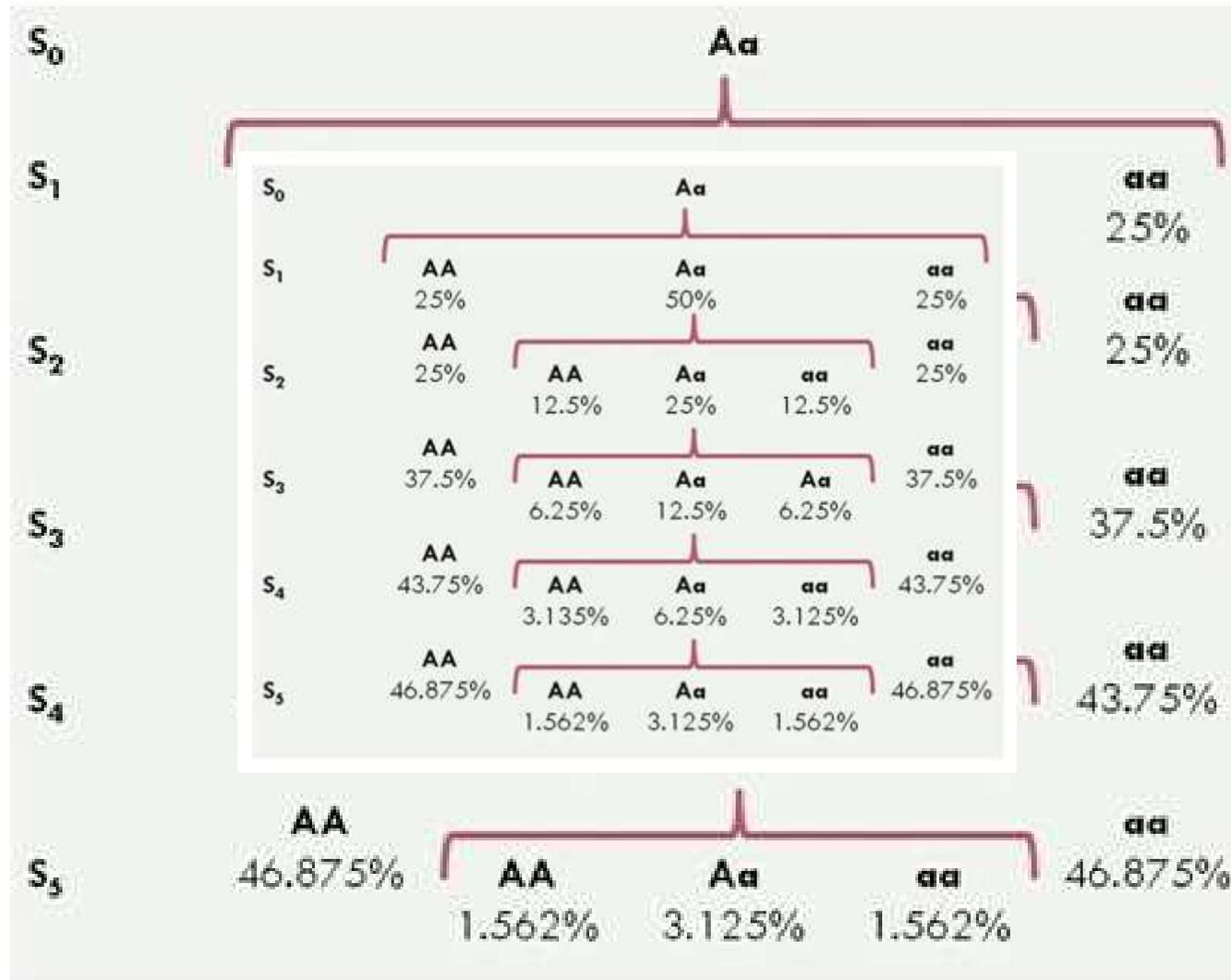
Dipende dal metodo d'impollinazione e riproduzione della specie:

1) **AUTOGAMIA**: auto-impollinazione -> alto grado di **omozigosità**

- Necessario demasculare i fiori ed impollinare a mano per effettuare incroci artificiali



## Aumento dell'omozigosità in popolazioni autogame



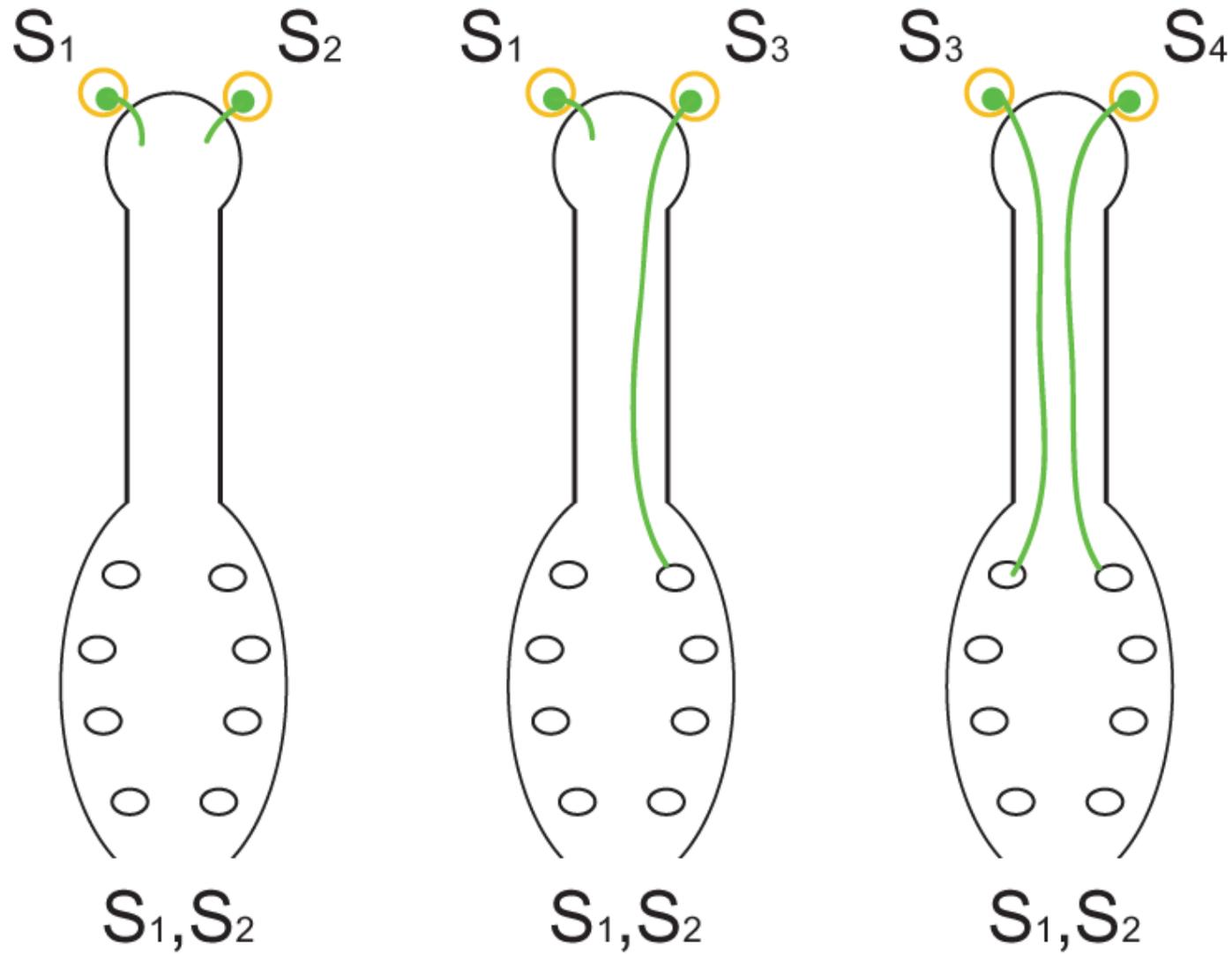
# METODI D'INCROCIO

Dipende dal metodo d'impollinazione e riproduzione della specie:

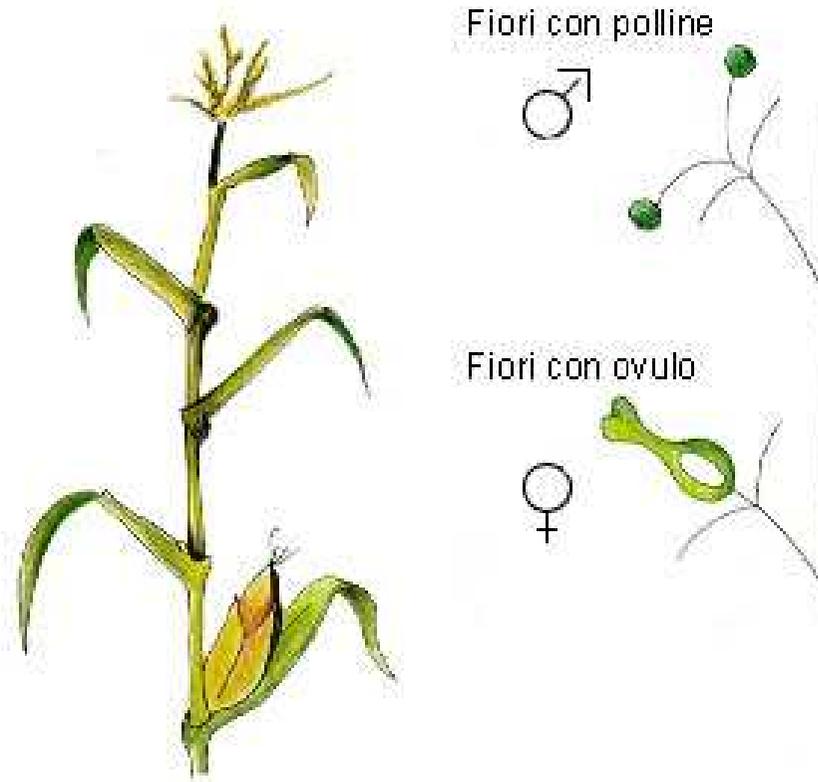
1) **ALLOGAMIA**: impollinazione incrociata -> alto grado di **eterozigosità**

- Necessario prevenire fecondazione con polline non desiderato per effettuare incroci artificiali
- Varietà vendute come popolazioni non omogenee di piante eterozigoti

# Autoincompatibilità genetica



# Separazione fisica fiori maschili e femminili sulla stessa pianta (es. mais)



Specie bisessuale con fiore diclino

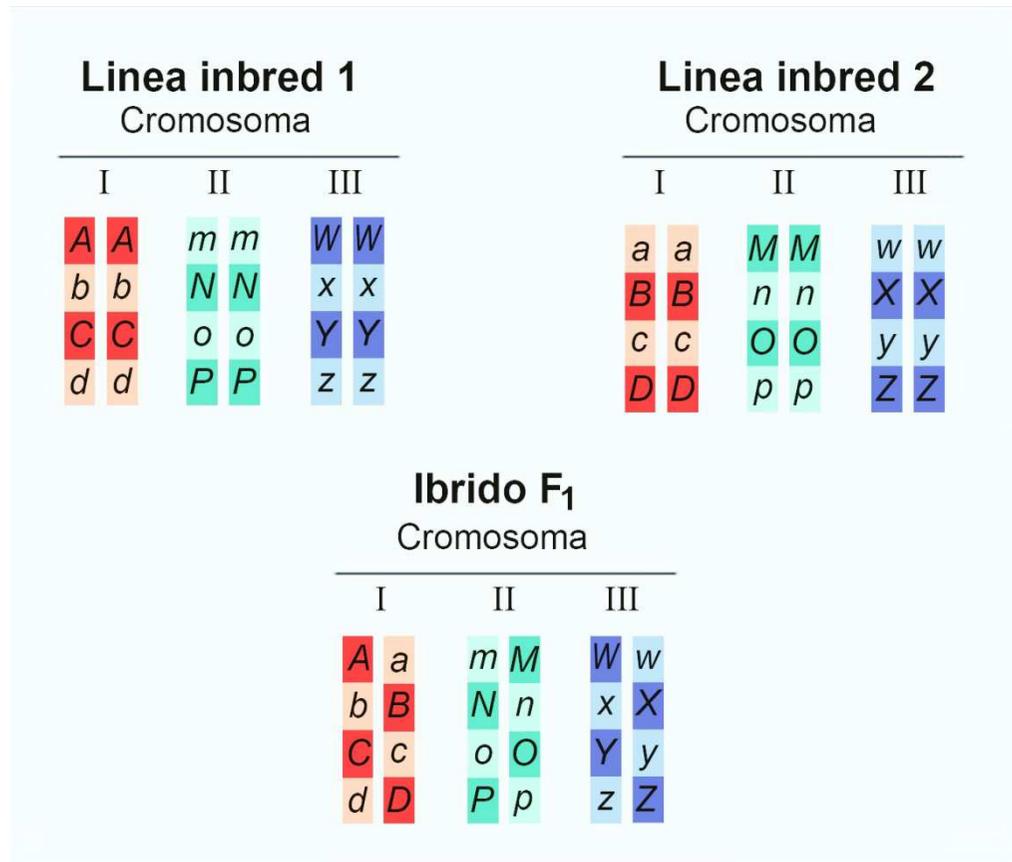
## Separazione fisica fiori maschili e femminili sul piante diverse (es. kiwi)



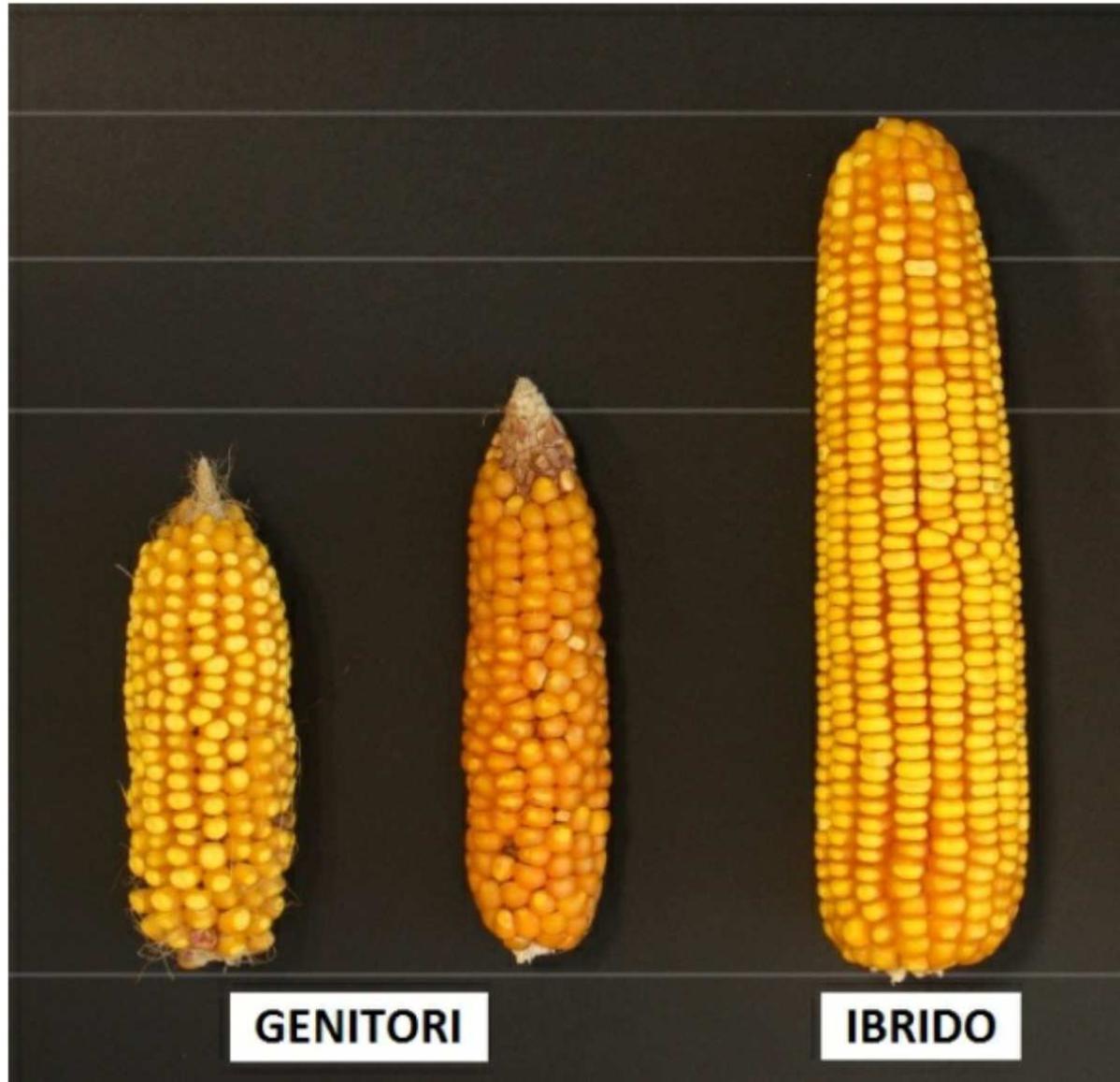
# PRODUZIONE DI IBRIDI F1

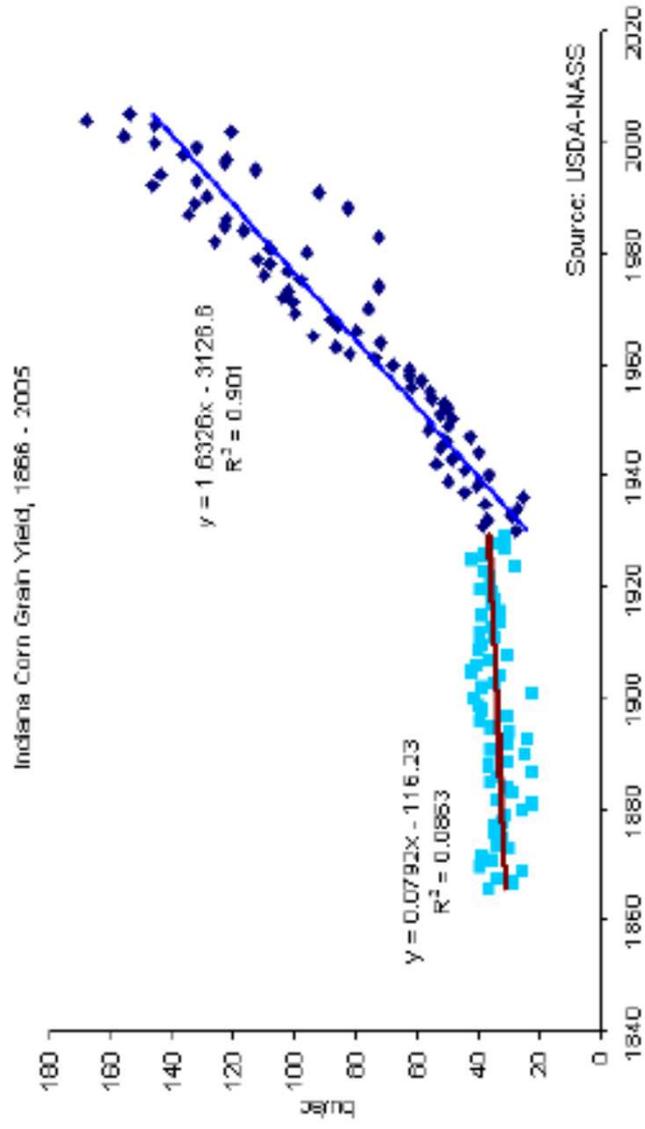
Possono essere ottenuti sia da piante autogame che allogame

- 1) Costituzione di linee INBRED (pure) per autoimpollinazione
- 2) Impollinazione incrociata tra linee inbred selezionate per ottenere ibrido F1



**ETEROSI:** gli ibridi tra due linee pure sono più vigorosi, resistenti e produttivi delle linee da cui derivano

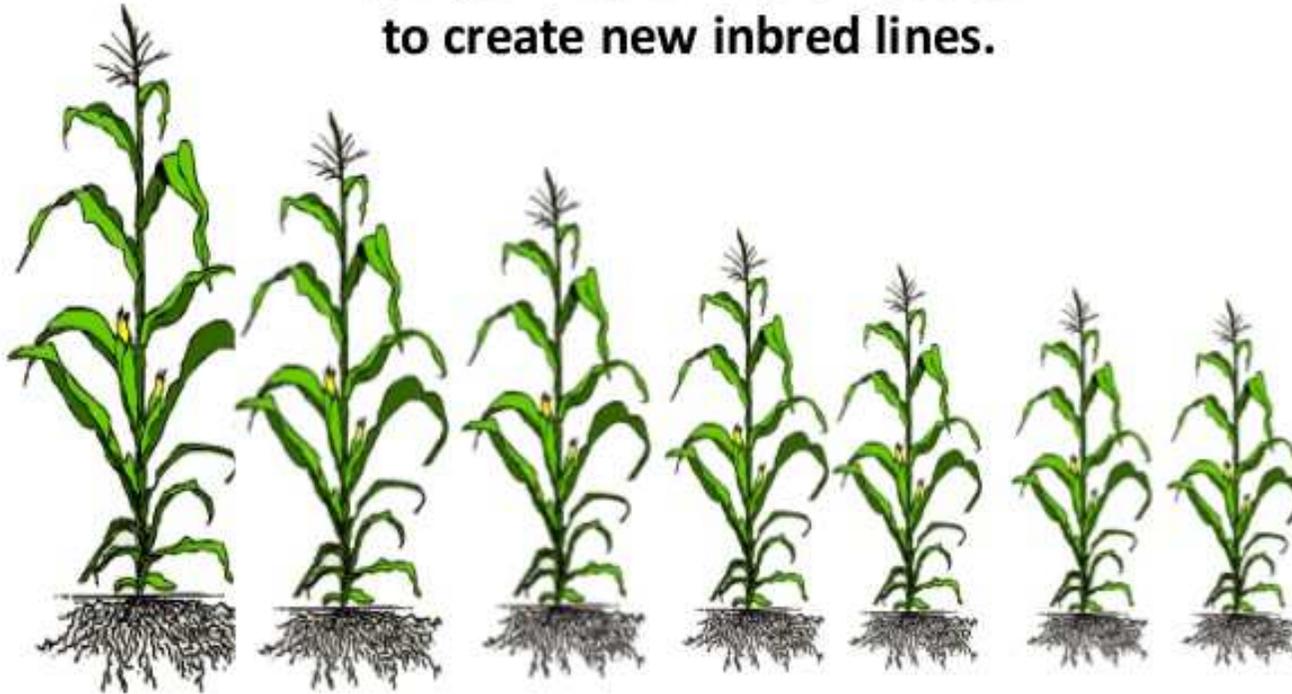




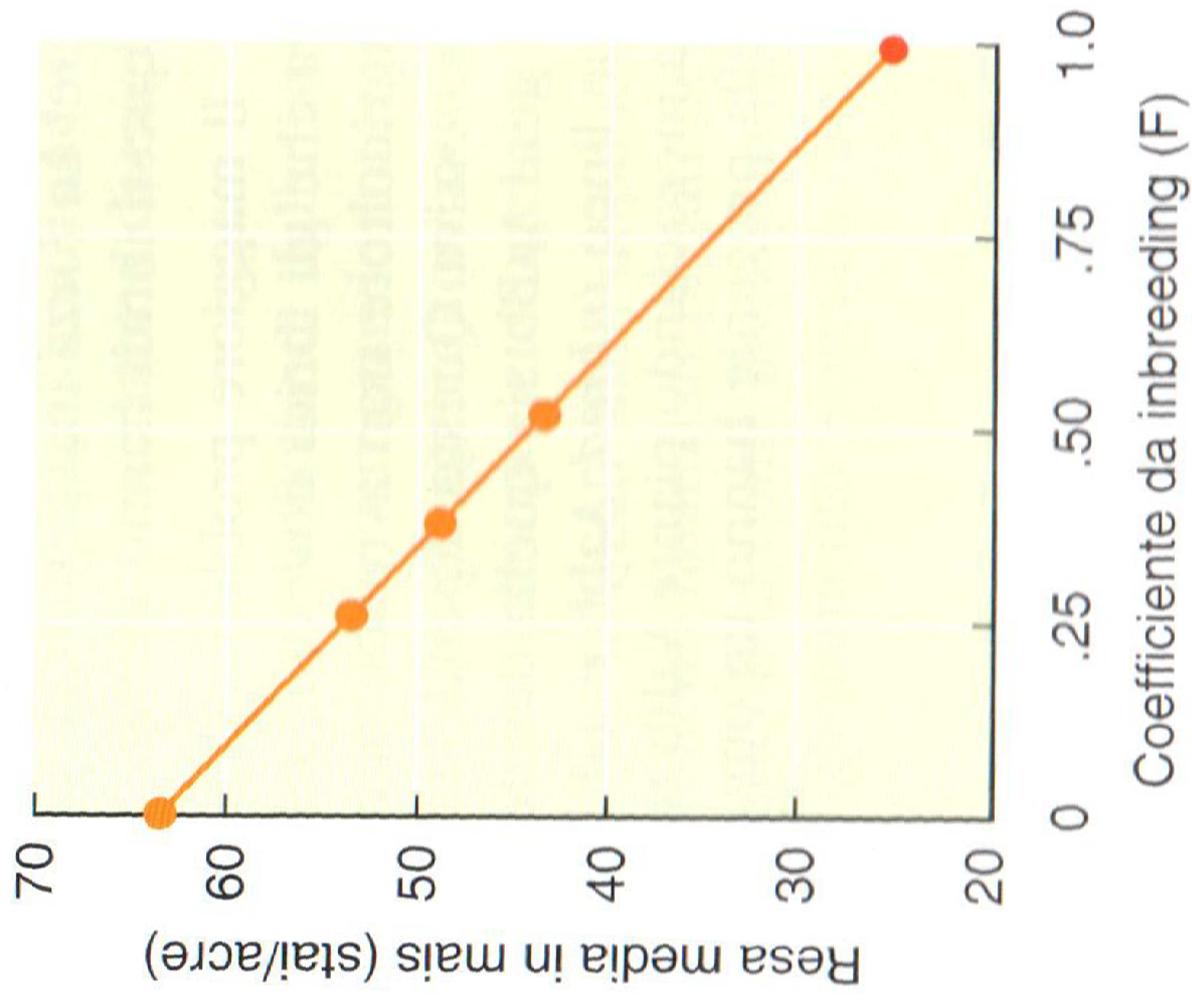
**Adoption of hybrid genetics has tripled US corn yield since 1940**

# Depressione da inbreeding

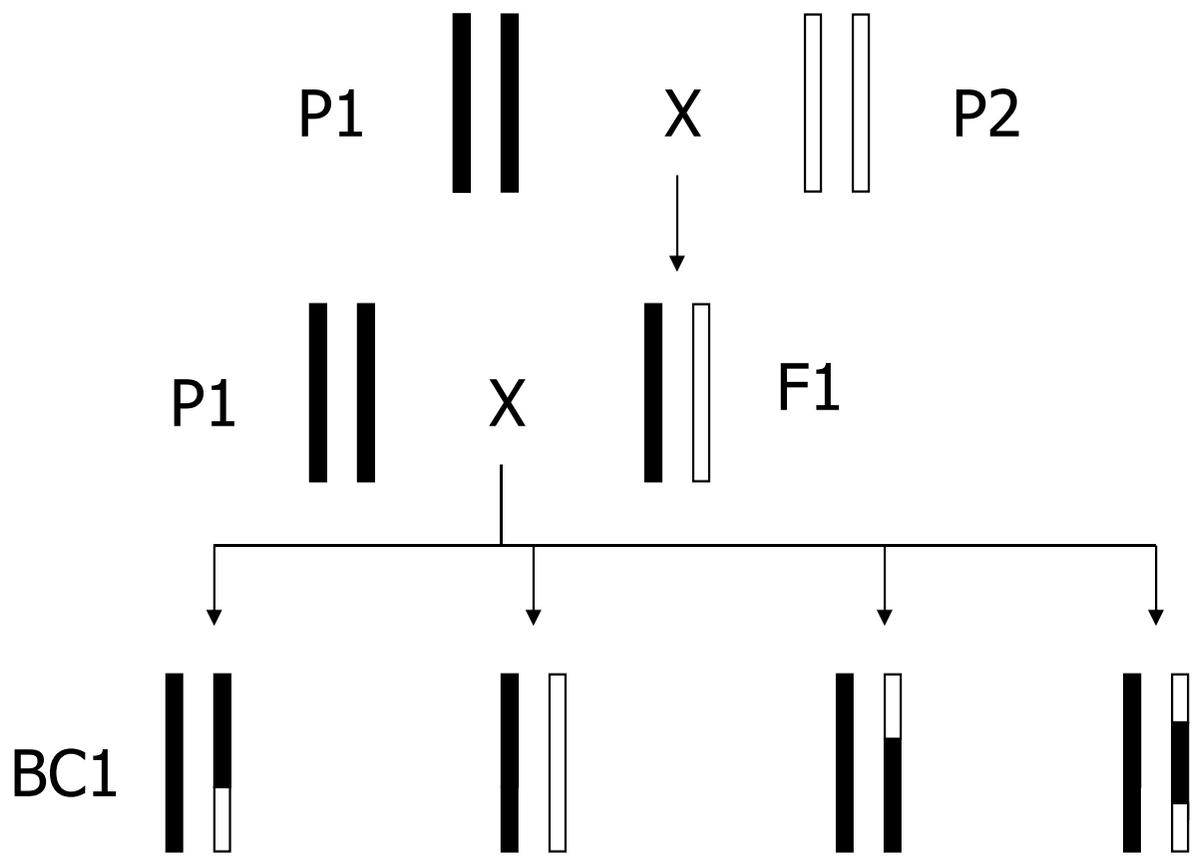
Historically 7+ generations of self-pollination were needed to create new inbred lines.



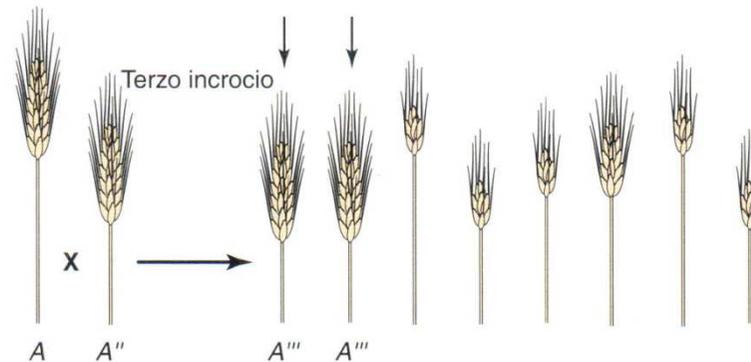
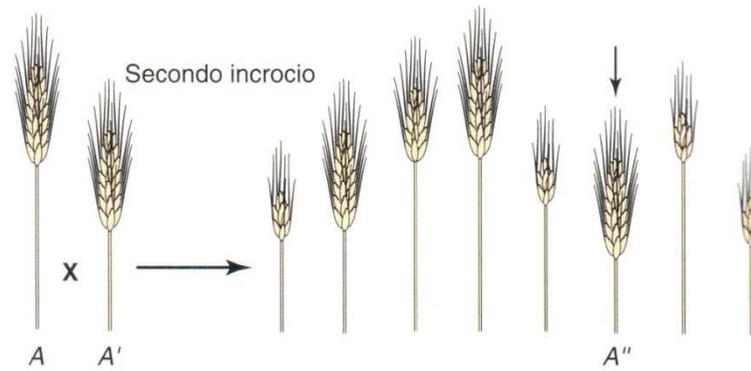
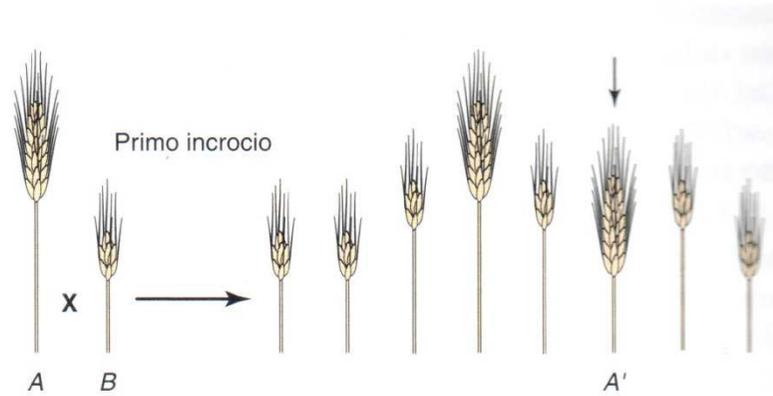
**Inbreeding depression**



# Backcross



# INTRODUZIONE DI SINGOLI CARATTERI TRAMITE BACKCROSSING



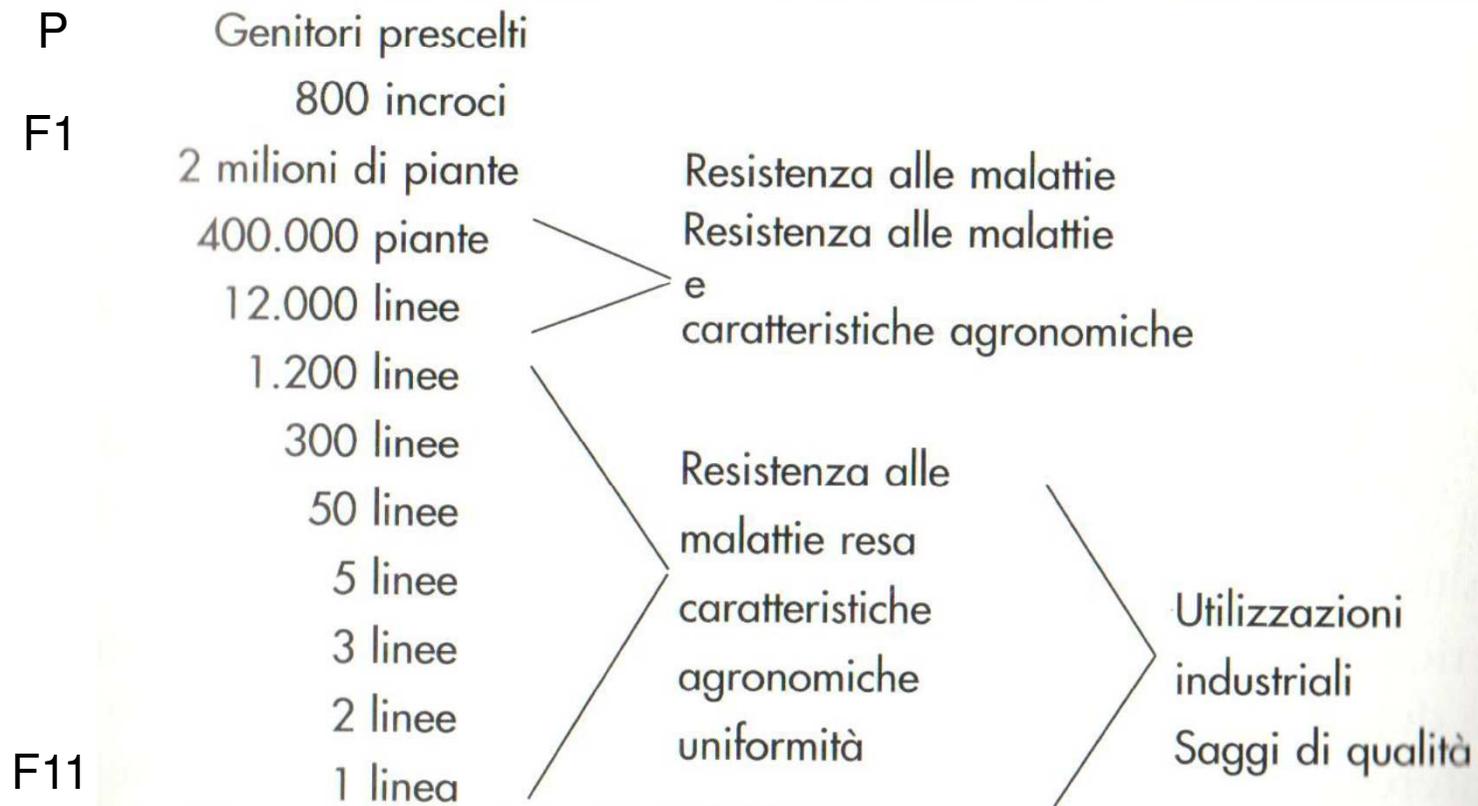
## Tabella 14.3

### Tipi di varietà rilasciate dai genetisti sulla base del metodo di impollinazione

<b>Coltura</b>	<b>Metodo naturale di impollinazione</b>	<b>Principale tipo di cultivar</b>
Riso	Autoimpollinazione	Linee pure e ibridi
Frumento	Autoimpollinazione	Linee pure
Mais	Incrocio	Ibridi
Soia	Autoimpollinazione	Linee pure
Patata	Incrocio (ma non in cultivar)	Cloni
Sorgo	Principalmente auto	Ibridi e linee pure
Orzo	Autoimpollinazione	Linee pure
Arachide	Autoimpollinazione	Linee pure
Fagiolo	Autoimpollinazione	Linee pure
Manioca	Incrocio e autoimpollinazione	Cloni
Erba medica	Incrocio	Popolazione
Girasole	Incrocio	Ibridi e popolazioni

## Programmi di miglioramento genetico convenzionale per un nuovo cereale

### Valutazione/Selezione/Saggio



# I vantaggi raggiunti dai selezionatori

---

Contadino romano: 1000 kg frumento per ettaro

In Italia 1920: 1000 kg frumento per ettaro

Adesso: 4000 kg frumento per ettaro

Pratiche agricole più efficienti e selezioni

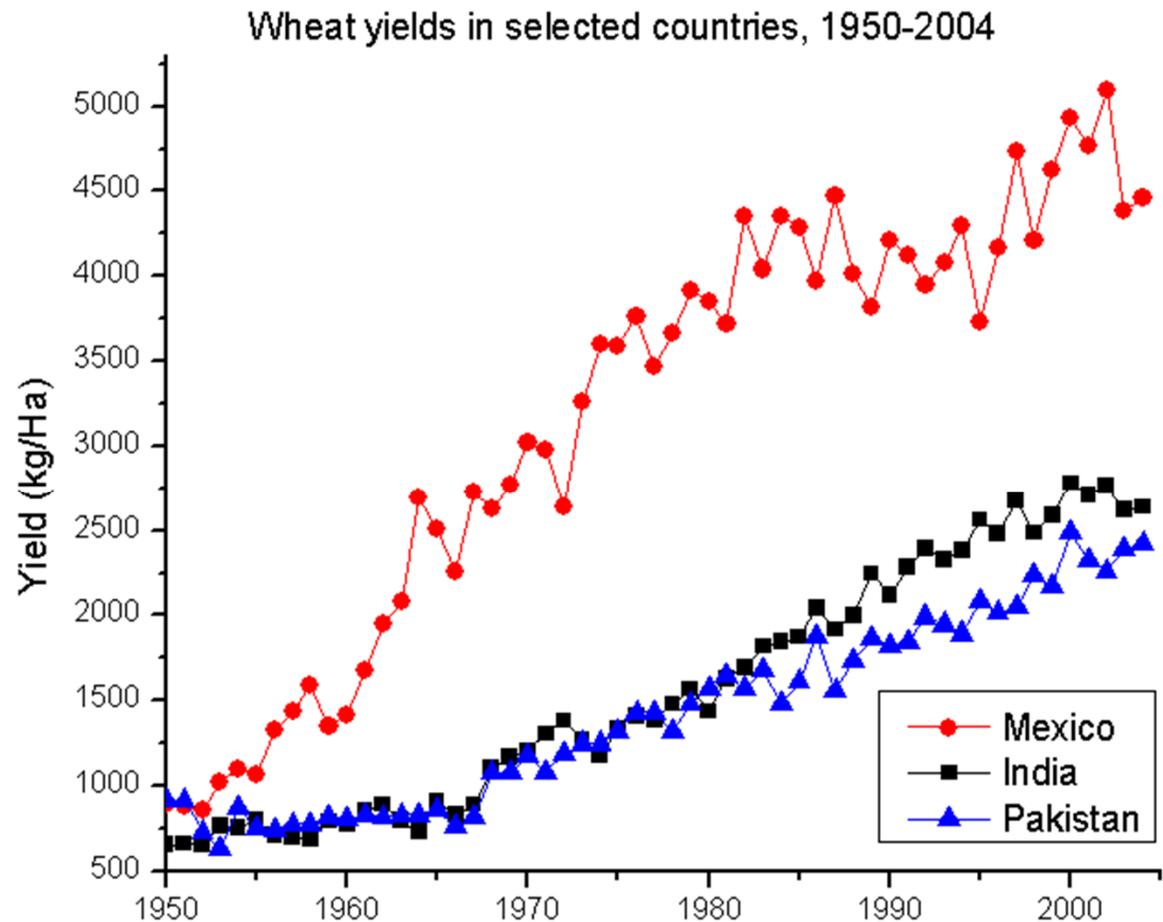
**RIVOLUZIONE VERDE**

# La Rivoluzione verde

“l'uomo che disinnescò la bomba dell'aumento della popolazione umana”



Norman Borlaug  
breeding wheat for Mexico  
Nobel Peace Prize 1970



Source: FAO

# La rivoluzione verde

Agricoltura ad alta resa con elevato input di sostanze chimiche

---

NPK

**Alta resa:** migliore assorbimento dei nutrienti, maggior biomassa

**Rapida maturazione:** nel riso dalla semina alla raccolta in 125 giorni contro i 210 previsti (in Asia due cicli)

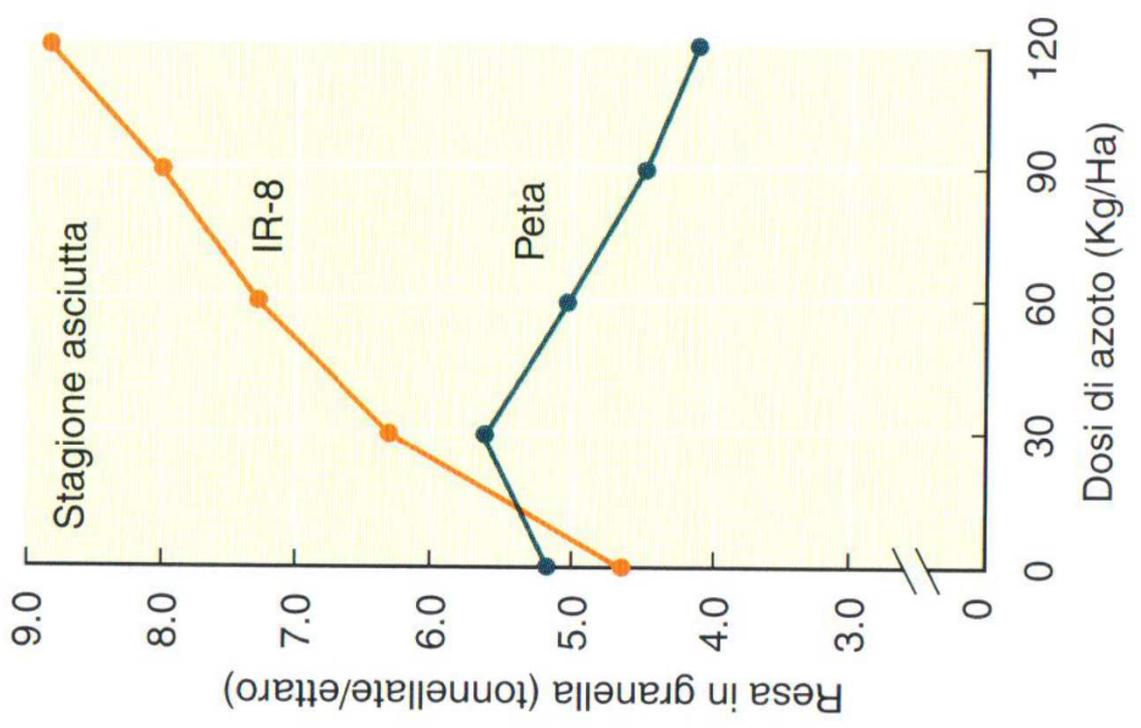
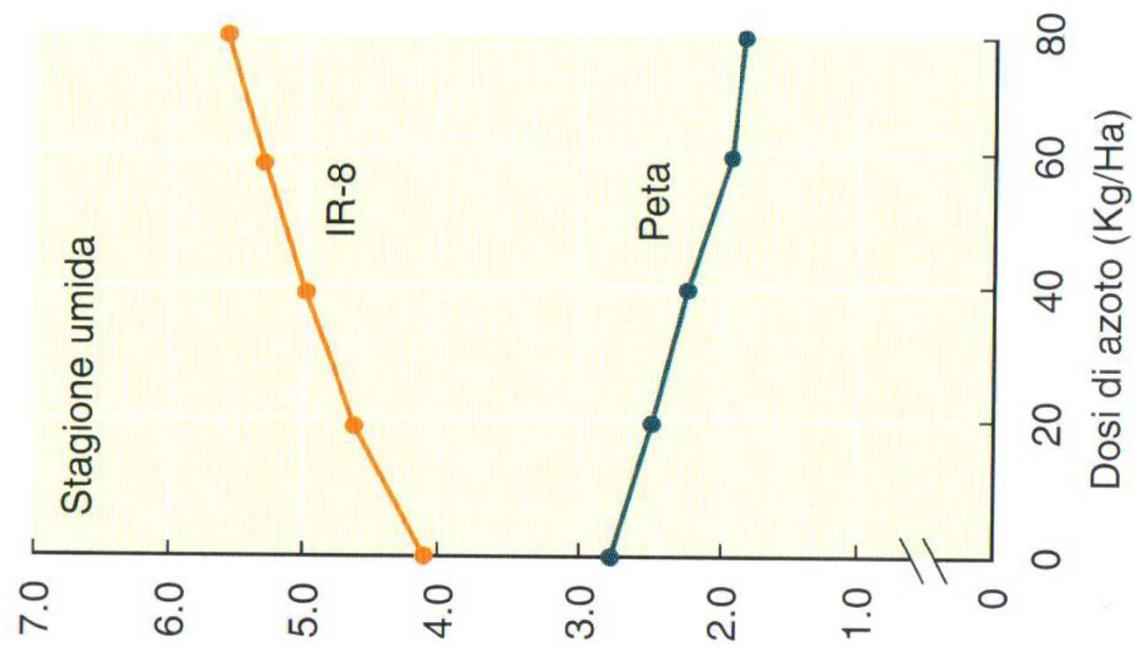
**Habitus di crescita:** semi-nano (90 cm contro i 120 del frumento)

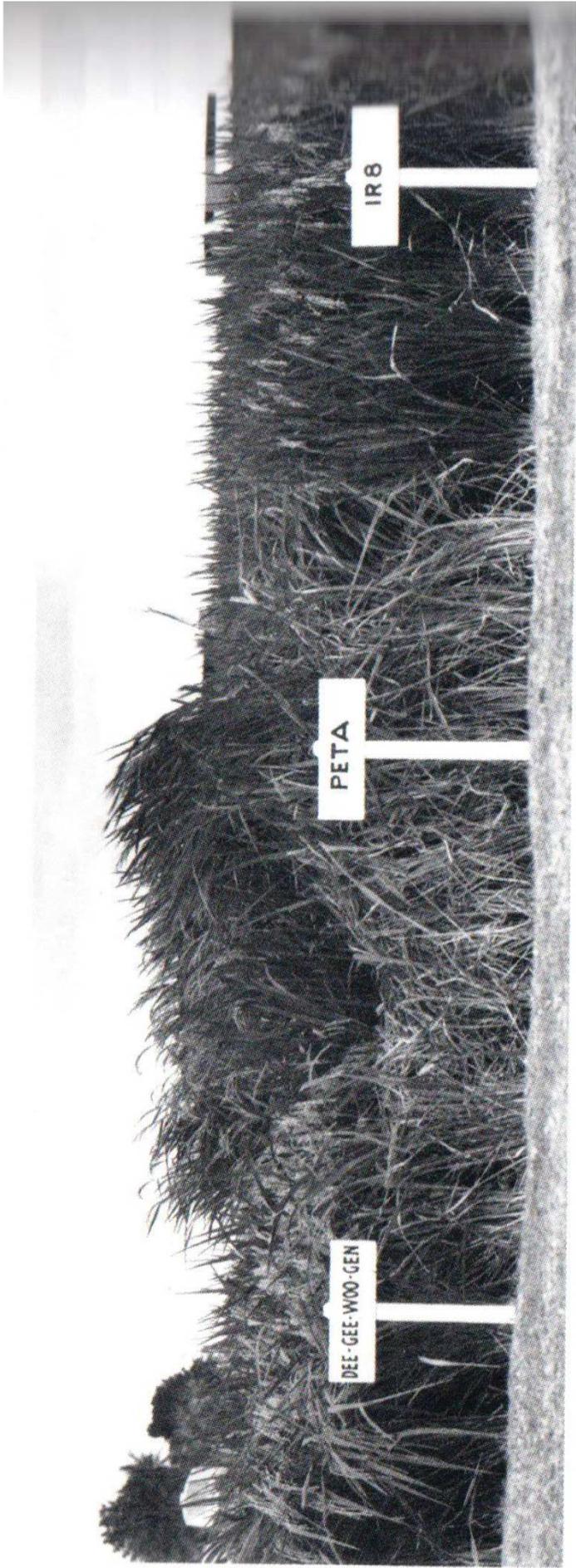
Giappone, Filippine, USA

**Riso: varietà Japonica e Indica**



(a)





# La rivoluzione verde si basa sulle tecniche del miglioramento genetico

---

Alta resa

Rapida maturazione

Habitus di crescita semi-nano

Resistenza alle malattie

Adattabilità alle condizioni locali

Applicazione di fertilizzanti inorganici

erbicidi e fitofarmaci

Tecnologia di irrigazione, macchine....

Le conseguenze....

## Tabella 14.5

**I risultati della  
rivoluzione verde: rese  
(t/ha) di frumento e  
riso in India e in Cina**

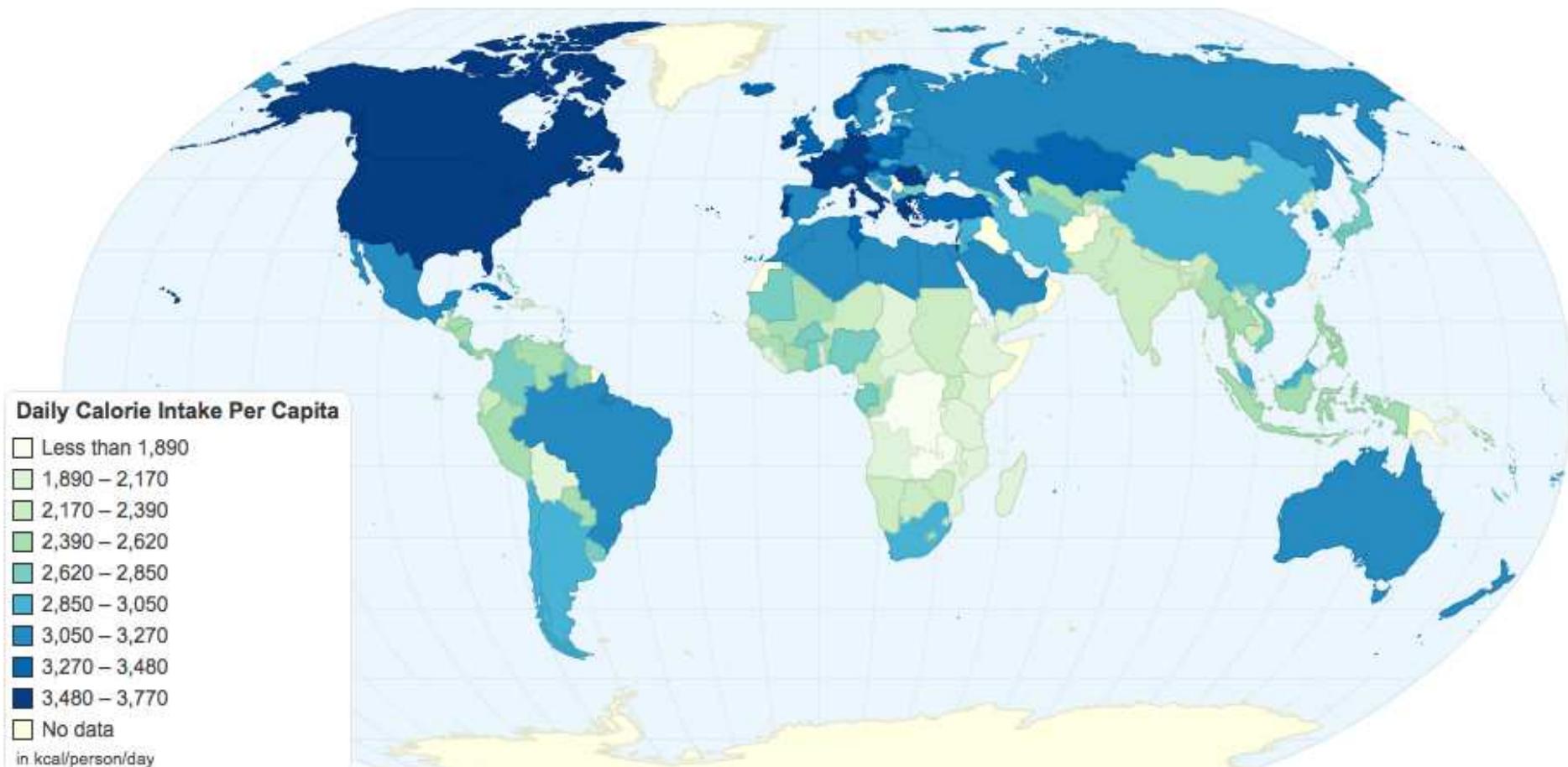
<b>Paese</b>	<b>Coltura</b>	<b>1963</b>	<b>1983</b>
India	Frumento	0.9	1.7
India	Riso	0.9	2.2
Cina	Frumento	1.0	2.5
Cina	Riso	2.0	4.7

Fonte: Dati FAO

# Quante calorie al giorno?

Powered by Google

## Daily Calorie Intake Per Capita



Key ▼

Create your own interactive map

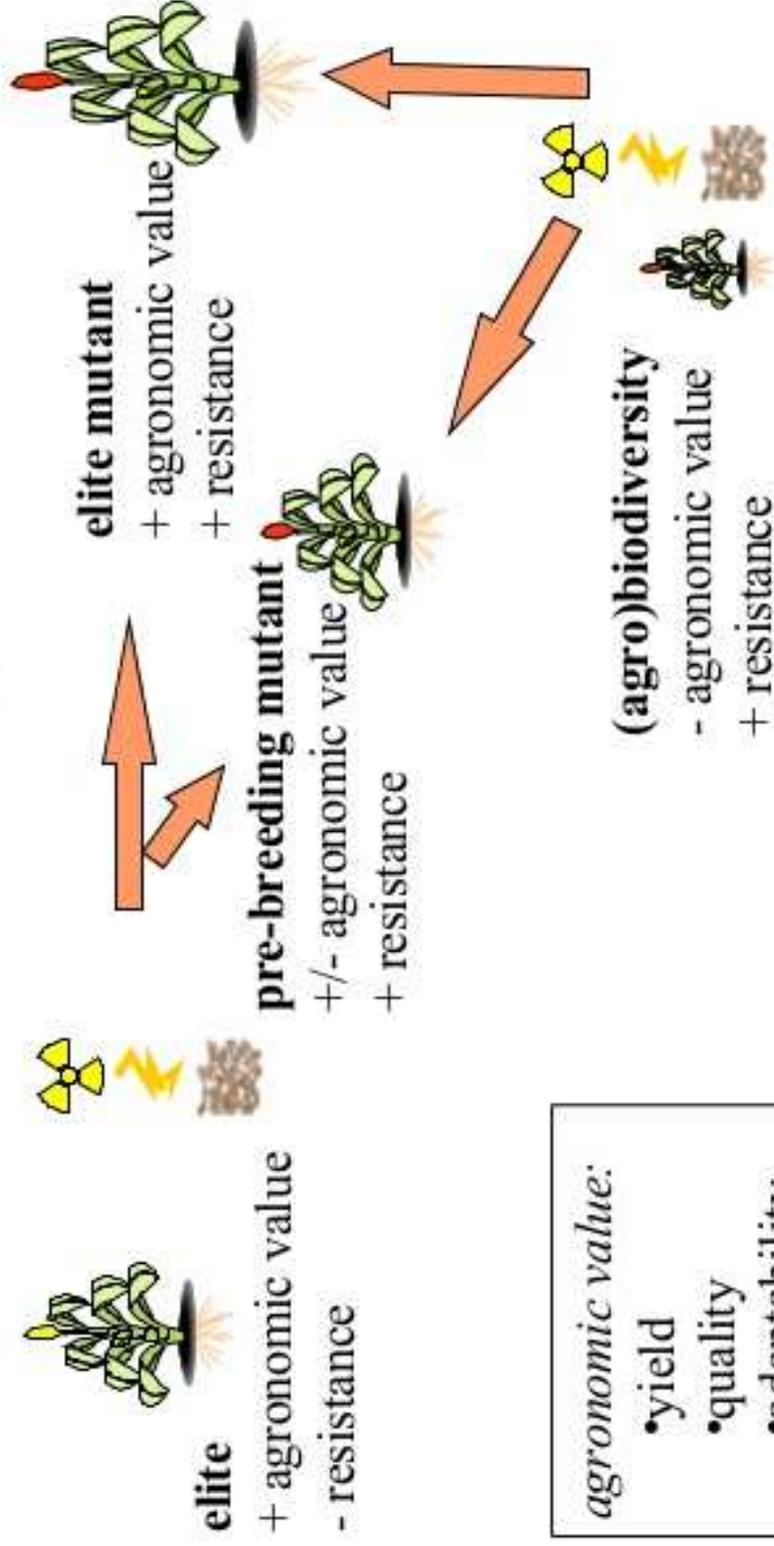


<http://chartsbin.com/view/1150>

# VARIABILITA' INDOTTA PER MUTAGENESI

- EMS, Raggi X, Raggi gamma
- Di solito su semi (-> chimere), a volte su gameti (polline) o cellule somatiche in coltura ,
- Ad oggi più di 2200 varietà utilizzate derivano da mutagenesi (posseggono spesso caratteri non presenti nella variabilità naturale)

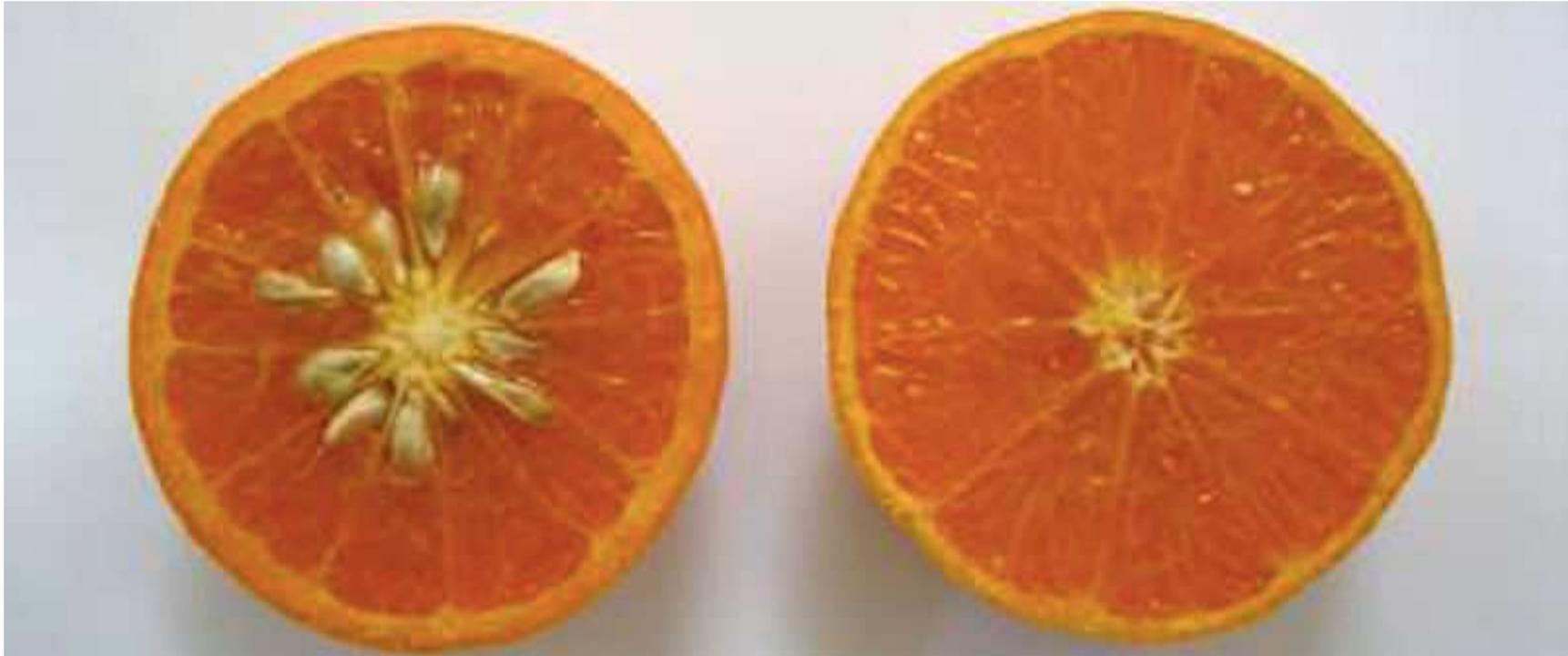
# Mutation Assisted Breeding Strategies



*agronomic value:*

- yield
- quality
- adaptability
- a.o.

# VARIABILITA' INDOTTA PER MUTAGENESI



**BEFORE & AFTER**

**Table 1.** Crops improved through induced mutation and the traits improved.

<b>Crop</b>	<b>Mutagen</b>	<b>Trait alteration</b>	
Rapeseed*	EMS	Increased oleic acid, reduced poly unsat. fats	(Auld et al., 1992)
Rapeseed	EMS	Sylfonyl-urea resistance	(Tonnamaker et al., 1992)
Rice	Gamma	Dwarf, high yield	(Chakrabarti, 1995)
Rice	Gamma	Thermosensitive, genetic, male sterility	(Maruyama et al., 1991)
Flax	EMS	cooking oil quality	(Rowland, 1991)
Sunflower	X-ray	High oleic acid, high palmitic	(Fernández-Martínez et al., 1997)
Apple	Gamma	Skin color	(Brunner and Keppl, 1991)
Pear	Gamma	Disease resistance	(Masuda et al., 1997)
Grapefruit	X-ray	Flesh color, seedlessness	(Hensz, 1991)
Pineapple	In vitro	Spineless	(Lapade, 1995)

\* Largely adapted from Ahloowalia and Maluszynski, 2001

# Grano duro cv Creso

- Proviene dall'incrocio di un frumento duro del CIMMYT con una linea mutante (Cp B144) del CNEN (ora ENEA), indotta da una irradiazione combinata di neutroni e raggi gamma nel frumento duro Cappelli, entrambi a paglia corta.
- taglia ridotta (70-80 cm) rispetto ai frumenti duri esistenti all'epoca (130-150 cm), che ha reso la cultivar molto resistente all'[allettamento](#).
- resistenza a molte razze di [ruggine](#) bruna e al [Fusarium graminearum](#)
- livelli produttivi decisamente superiori alle cultivar italiane fino ad allora coltivate, come per esempio i [grani duri antichi siciliani](#).
- anni '80 e '90: oltre il 50% della produzione di frumento duro in Italia.
- Rappresenta ancora quasi il 10% della produzione italiana di frumento duro.
- Buona parte della produzione mondiale di frumento duro è ottenuta da cultivar derivate dal Creso.

## Sviluppo del tritiale esaploide

Frumento duro  $2n = 28$  AABB  
Segale  $2n = 14$  RR

X

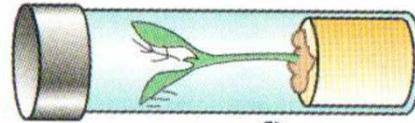


Embrione aploide (un set di cromosomi omologhi)  
 $n = 21$  ABR



Coltura dell'embrione

Piantina aploide  
 $n = 21$  ABR



Raddoppiamento dei cromosomi



Triticale esaploide  
 $2n = 42$  AABBRR

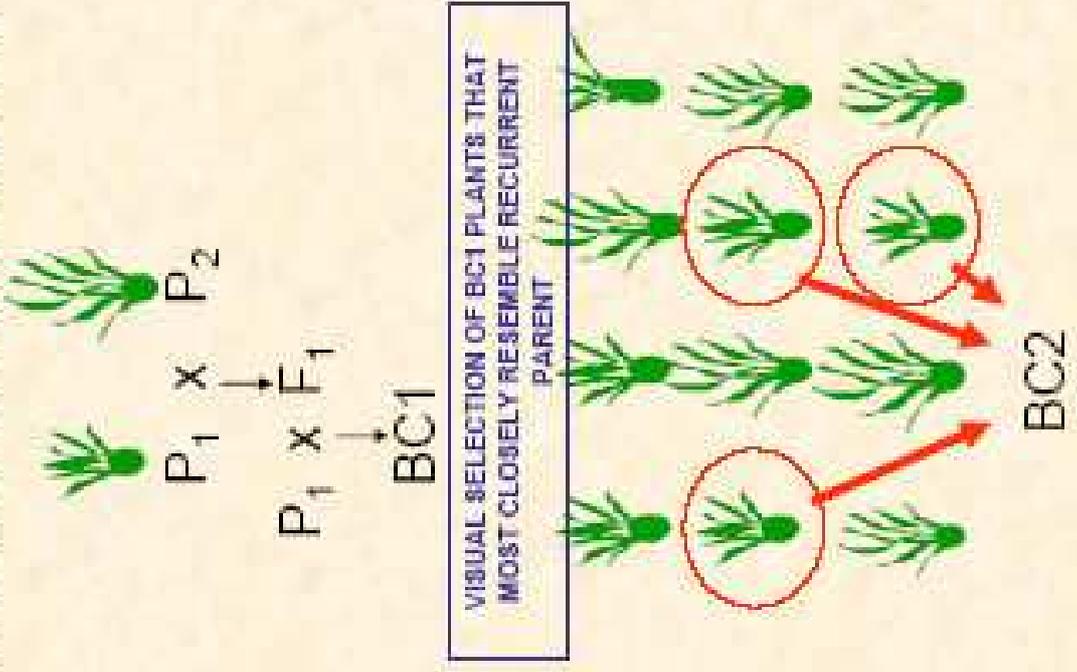
# **MARKER ASSISTED SELECTION (MAS)**

# Marker assisted selection (MAS)

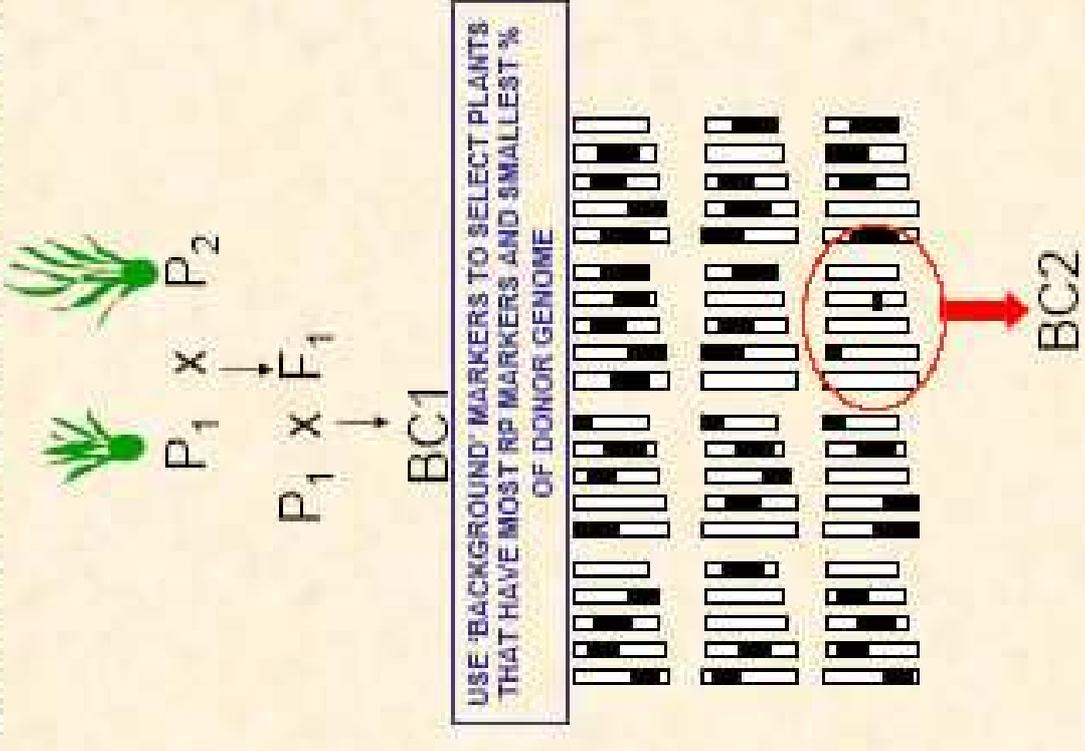
Utilizzo di marcatori di DNA strettamente legati a loci target come sostituti o per assistere lo screening fenotipico

**Assunto: I marcatori sono predittori affidabili del fenotipo**

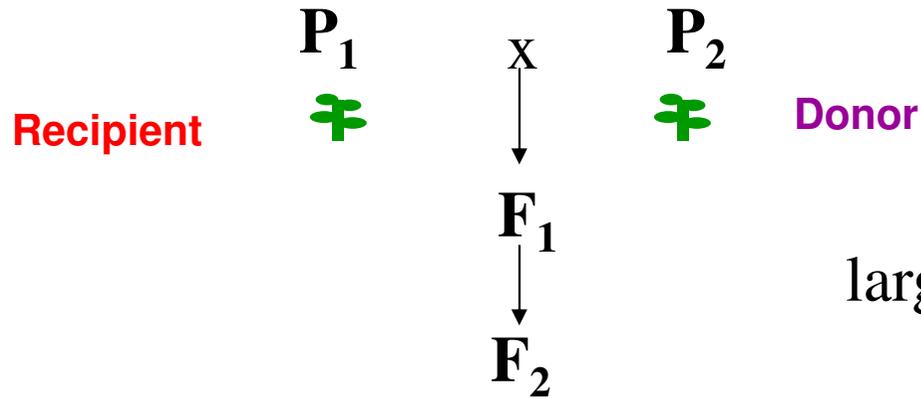
### CONVENTIONAL BACKCROSSING



### MARKER-ASSISTED BACKCROSSING



# CONVENTIONAL PLANT BREEDING



large populations consisting of thousands of plants



## PHENOTYPIC SELECTION



Salinity screening in phytotron



Bacterial blight screening

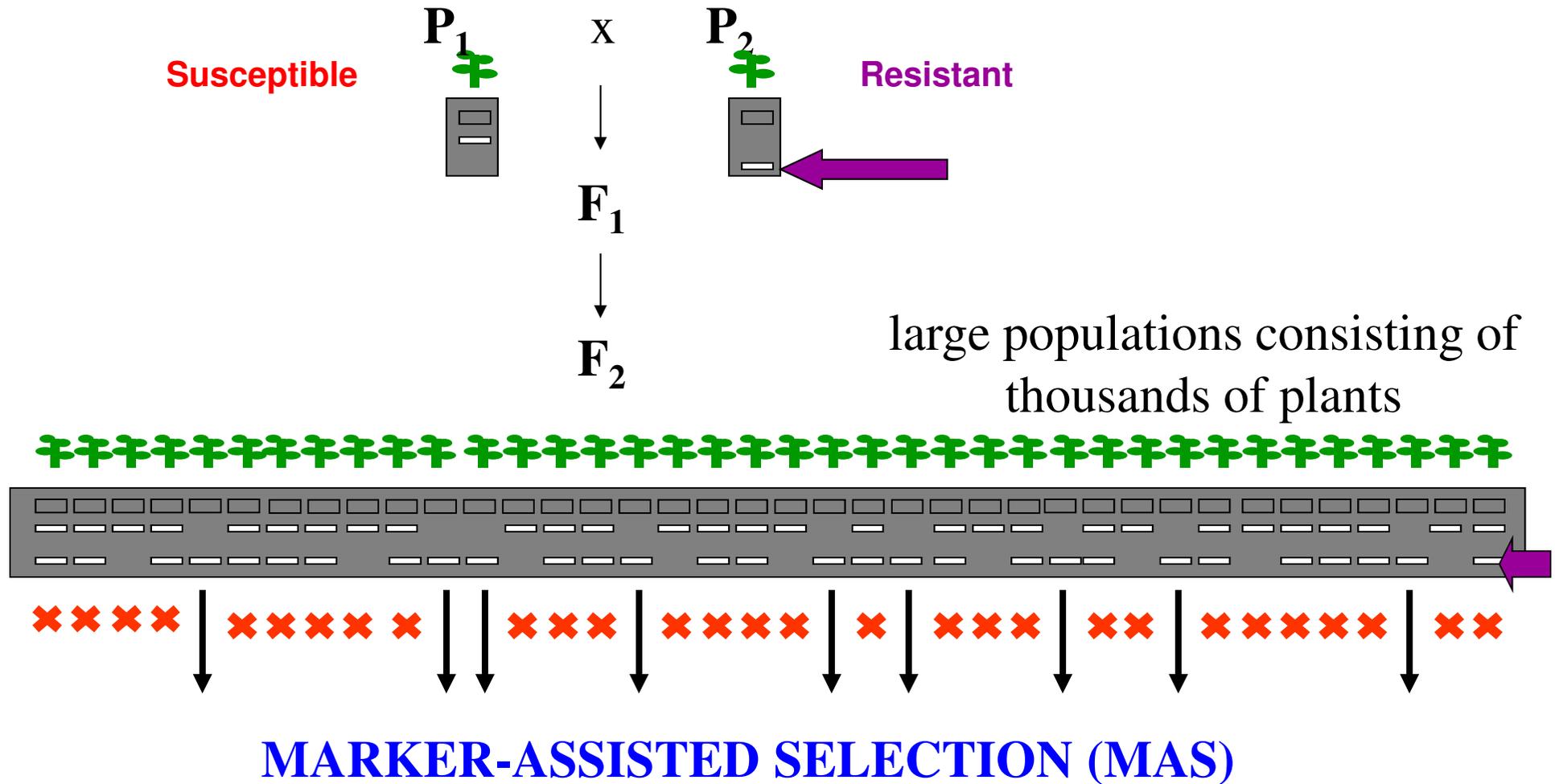


Phosphorus deficiency plot

Glasshouse trials

Field trials

# MARKER-ASSISTED BREEDING



Method whereby phenotypic selection is based on DNA markers

# Advantages of MAS

- **Simpler method compared to phenotypic screening**
  - Especially for traits with laborious screening
  - May save time and resources
- **Selection at seedling stage**
  - Important for traits such as grain quality
  - Can select before transplanting
- **Increased reliability**
  - No environmental effects
  - Can discriminate between homozygotes and heterozygotes and select single plants

# Potential benefits from MAS

- more accurate and efficient selection of specific genotypes
  - May lead to accelerated variety development
- more efficient use of resources
  - Especially field trials



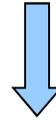
Crossing house



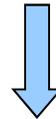
Backcross nursery

# Overview of 'marker genotyping'

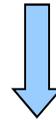
**(1) LEAF TISSUE  
SAMPLING**



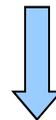
**(2) DNA EXTRACTION**



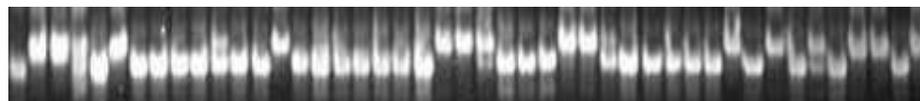
**(3) PCR**



**(4) GEL ELECTROPHORESIS**

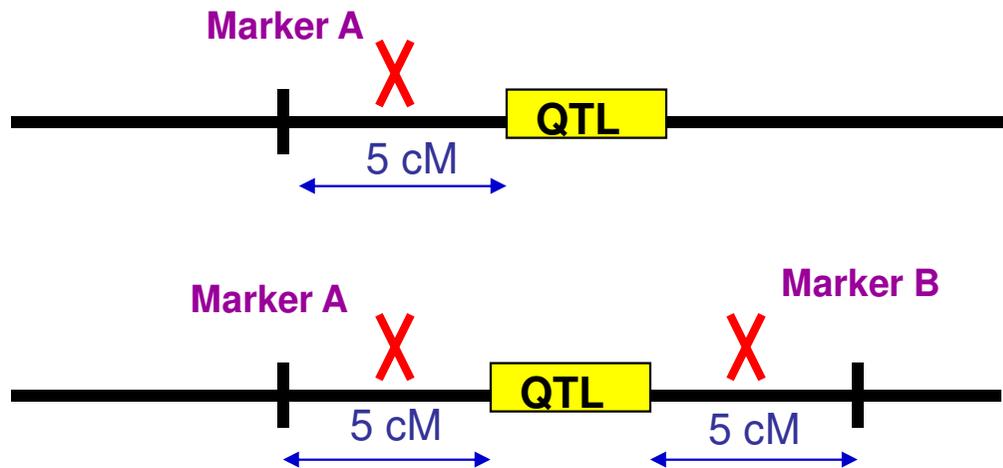


**(5) MARKER ANALYSIS**



# Markers must be tightly-linked to target loci!

- Ideally markers should be <5 cM from a gene or QTL



## RELIABILITY FOR SELECTION

Using marker A only:

$$1 - r_A = \sim 95\%$$

Using markers A and B:

$$1 - 2 r_A r_B = \sim 99.5\%$$

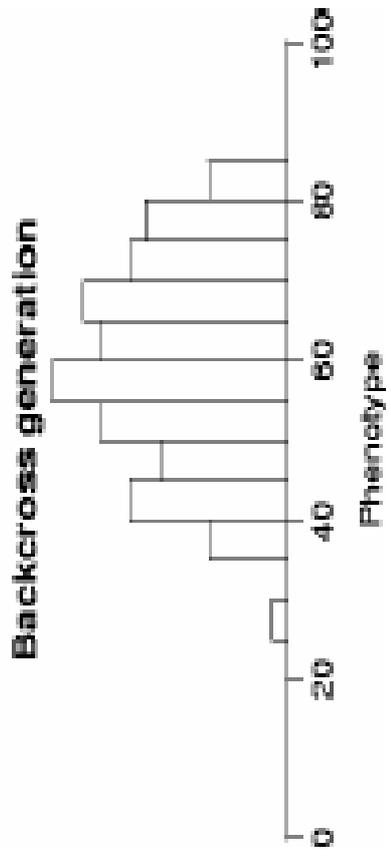
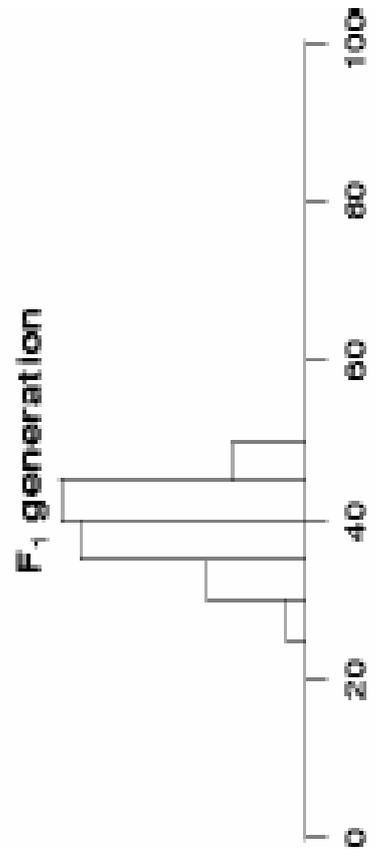
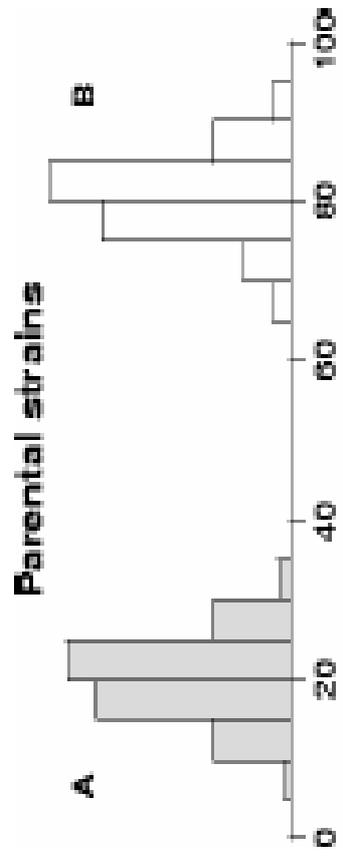
- Using a pair of flanking markers can greatly improve reliability but increases time and cost

# Markers

- What makes a good marker:
  - co-dominant (so homozygotes and heterozygotes can be distinguished)
  - many alleles at each locus (so most individuals will be heterozygous and different from each other)
  - many loci well distributed throughout the genome
  - easy to detect, especially with automated machinery
- No system is perfect

# Quantitative trait loci (QTLs)

- QTLs determine the genetic component of variation in quantitative traits.
- Quantitative traits are usually encoded by many genes (polygenes).

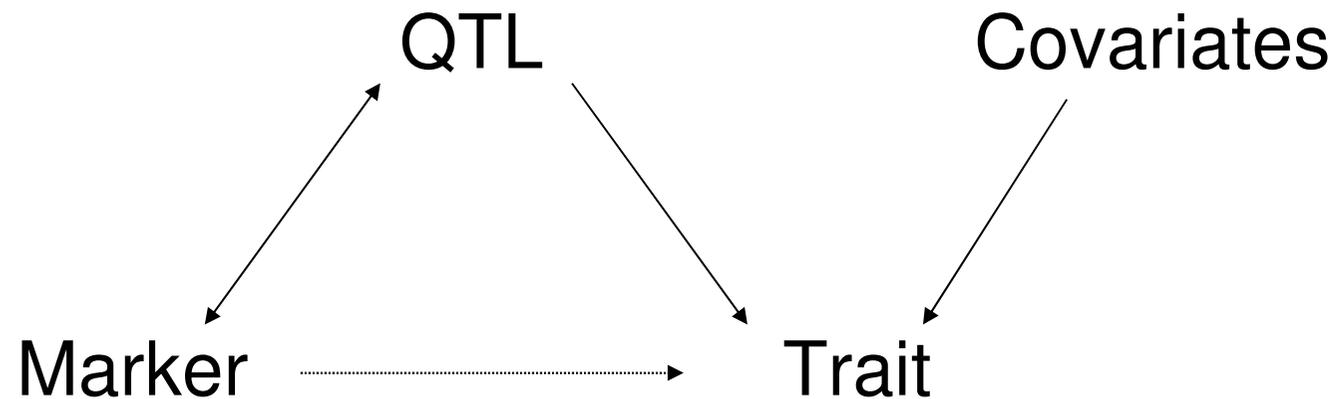


# Goals of QTL analysis

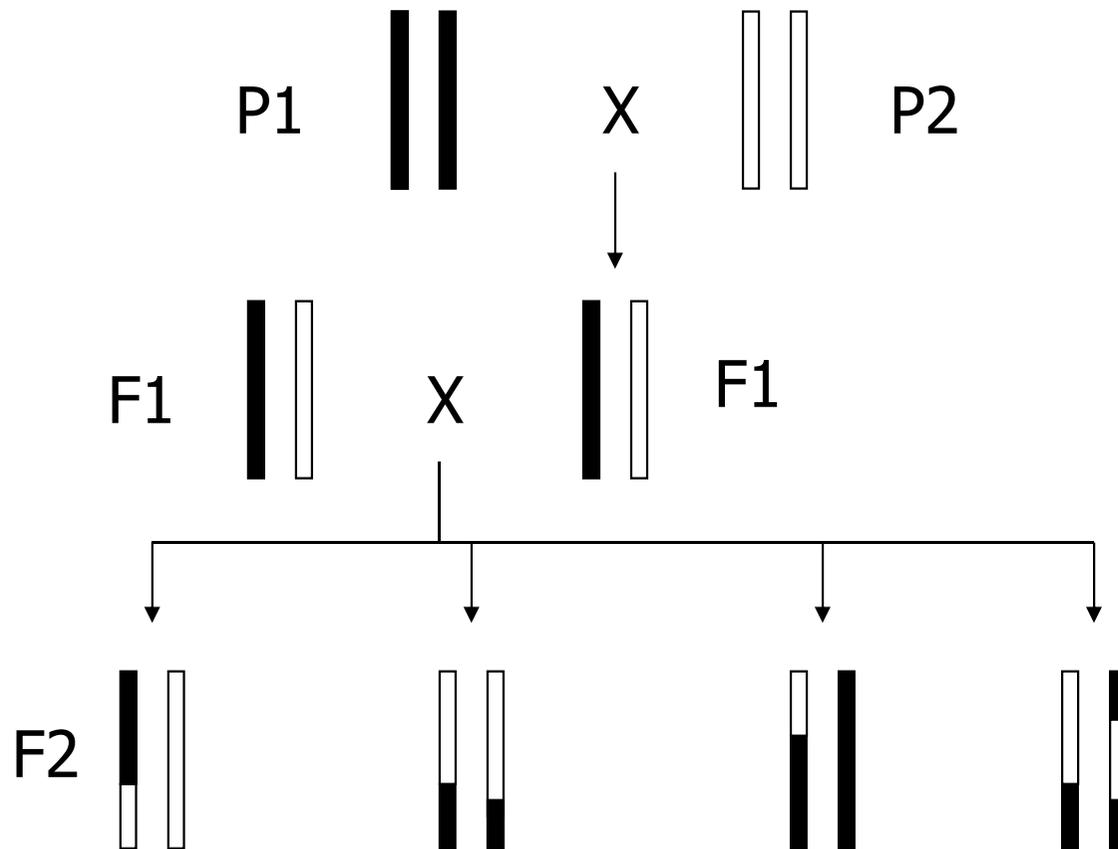
- Detect genetic effects
- QTL mapping: inference of the QTL location on chromosome

# QTL mapping in experimental crosses

Experimental crossing creates associations between genetic marker loci and traits to allow localization of QTL.



# Intercross



# Data structure for a backcross experiment

- Phenotypes:  
 $y_i$  = quantitative measurement of trait
  - Genotypes:  
 $x_{ij}$  = 0/1 coded for AA/AB at marker  $j$
  - Covariates:  
 $\mathbf{Z}_i$  = environmental factors, demographics, etc.
- where  $i = 1, \dots, n$ ;  $j = 1, \dots, M$ .

# Modello e assunzioni

- No interferenza nel processo di ricombinazione
- Indipendenza
- Normalità

$$y_i|X \sim N(\mu_X, \sigma_X^2)$$

- Homoscedasticity (varianza costante)

$$\sigma_X^2 = \sigma^2$$

# LOD SCORE

- In genetica, acronimo di l(ogarithm) of odds score («punteggio del logaritmo della probabilità»), parametro usato per calcolare l'associazione (linkage) e determinare la probabilità di ricombinazione tra diversi marcatori genici.

# LOD SCORE

- Test statistico spesso usato per l'analisi del linkage in popolazioni animali, umane e vegetali.
- Compara le probabilità di riscontrare i valori osservati se i due loci sono effettivamente sullo stesso cromosoma rispetto alla probabilità di osservare gli stessi valori esclusivamente per caso.
- Valori positivi di LOD implicano la presenza di linkage, laddove valori negativi indicano che il linkage è meno probabile.

# LOD SCORE

Una descrizione sommaria del suo funzionamento è:

- Costruzione di un albero genealogico;
- Stimare la frequenza di ricombinazione;
- Calcolare il LOD score per ognuna delle stime;
- La stima con il LOD score massimo sarà considerata la migliore.

$$LOD = Z = \log_{10} \frac{\text{probabilità di nascita con un certo valore di linkage}}{\text{probabilità di nascita con linkage assente}} = \log_{10} \frac{(1 - \theta)^{NR} \times \theta^R}{0.5^{(NR+R)}}$$

NR = numero di prole non-ricombinante,  
 R = numero di prole ricombinante.

0.5 al denominatore -> ogni allele completamente unlinked (e.g. alleli su cromosomi distinti) ha il 50% di possibilità di ricombinare

Teta = frazione ricombinante, ed è uguale a  $R / (NR + R)$

LOD score > 3.0 è considerato prova di linkage (probabilità 1000:1 che il linkage osservato non avvenga per caso).

LOD score < -2.0 è considerato sufficiente per escludere la probabilità di linkage.

# LOD Score Mapping

- The lod score method is an example of a maximum likelihood procedure.
- The point of the maximum likelihood procedure is to estimate the value of a parameter that can't be directly observed, in this case the recombination fraction.
- The likelihood (probability) of an observed set of data (the phenotypes seen in a family, in this case) is calculated as a function of that parameter.
- The parameter value that gives the maximum likelihood is taken as the best estimate of the parameter.

# LOD curve

- Likelihood profile
- A clear peak is taken as the QTL
- 1.5-LOD support interval

# Breeders' QTL mapping 'checklist'

- LOD &  $R^2$  values will give us a good initial idea but probably more important factors include:

1. *What is the population size used for QTL mapping?*
2. *How reliable is the phenotypic data?*
  - *Heritability estimates will be useful*
  - *Level of replication*
3. *Any confirmation of QTL results?*
4. *Have effects of genetic background been tested?*
5. *Are markers polymorphic in breeders' material?*
6. *How useful are the markers for predicting phenotype? Has this been evaluated?*

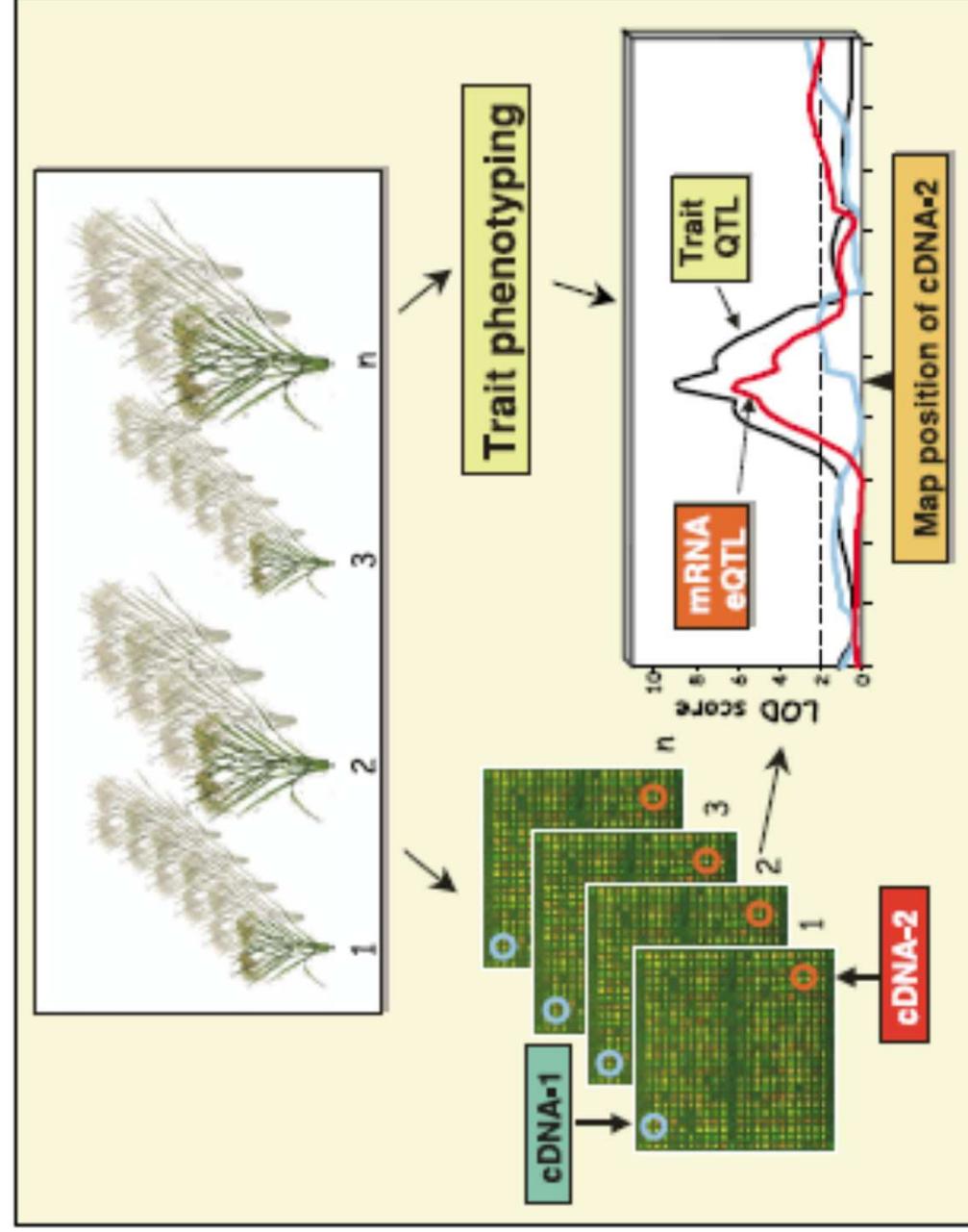


Figure 5. Expression profiling of a mapping population at the mRNA level via microarray analysis to identify expression QTLs (eQTLs) for specific cDNAs. Correspondence between an eQTL peak for a specific cDNA (e.g. cDNA-2) and a QTL peak for a trait causally linked to the function of the protein encoded by the cDNA provides circumstantial evidence supporting the role of the cDNA as a candidate gene for the target trait.

# Current status of molecular breeding

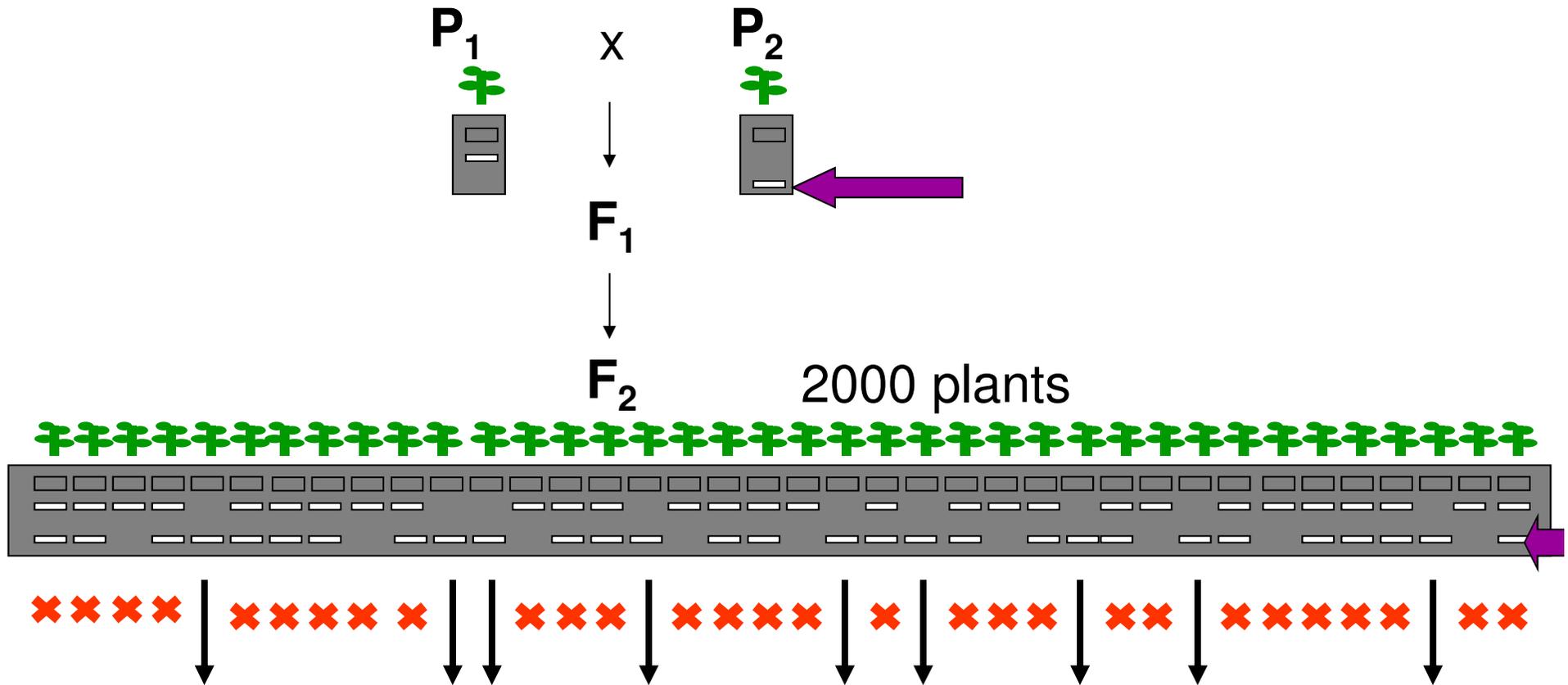
- A literature review indicates thousands of QTL mapping studies but not many *actual* reports of the application of MAS in breeding
- *Why is this the case?*



# Some possible reasons to explain the low impact of MAS in crop improvement

- Resources (equipment) not available
- Markers may *not* be cost-effective
- Accuracy of QTL mapping studies
- QTL effects may depend on genetic background or be influenced by environmental conditions
- Lack of marker polymorphism in breeding material
- Poor integration of molecular genetics and conventional breeding

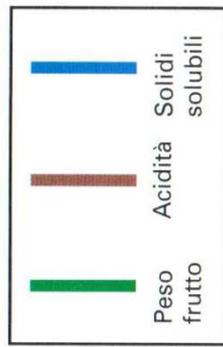
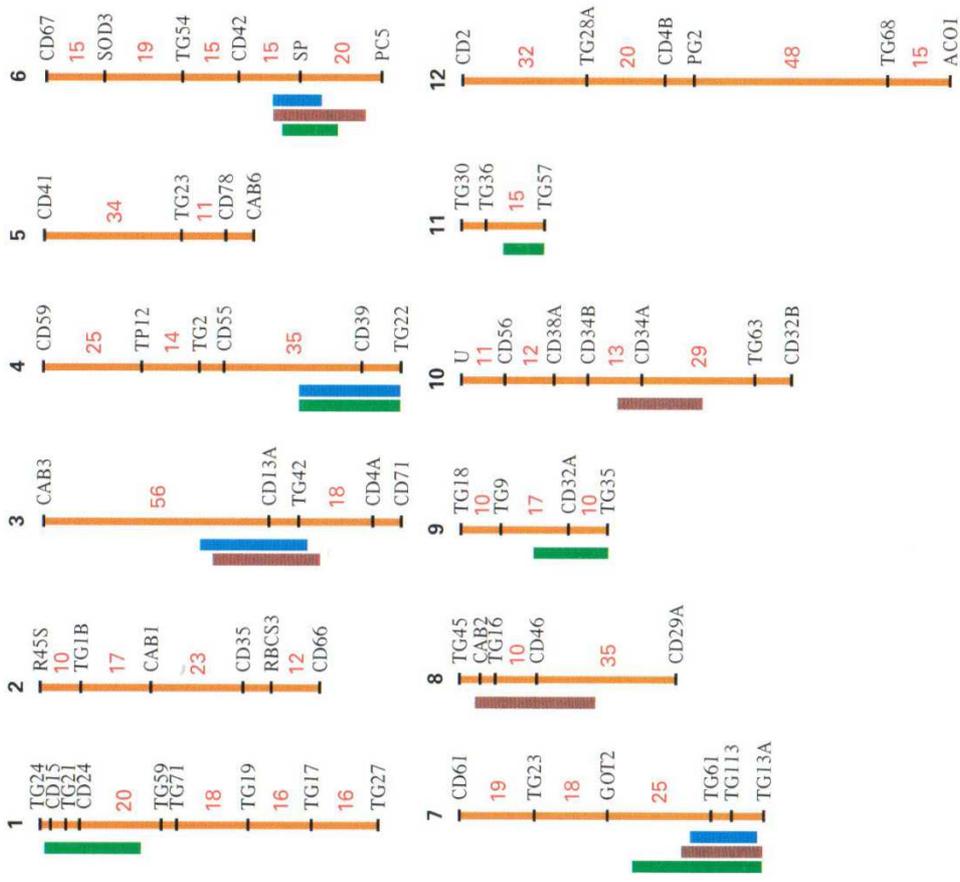
# Cost of MAS in context: Example 1: Early generation MAS



USD \$640 to screen 2000 plants with a single marker for one population

# Reliability of QTL mapping is critical to the success of MAS

- Reliable phenotypic data critical!
  - Multiple replications and environments
- Confirmation of QTL results in independent populations
- “Marker validation” must be performed
  - Testing reliability for markers to predict phenotype
  - Testing level of polymorphism of markers
- Effects of genetic background need to be determined



**ERECTA receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from *Arabidopsis* are required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina***

Francisco Llorente<sup>1</sup>, Carlos Alonso-Blanco<sup>2</sup>, Clara Sánchez-Rodríguez<sup>1</sup>, Lucía Jorda<sup>1</sup> and Antonio Molina<sup>1,\*</sup>

**The Plant Journal**

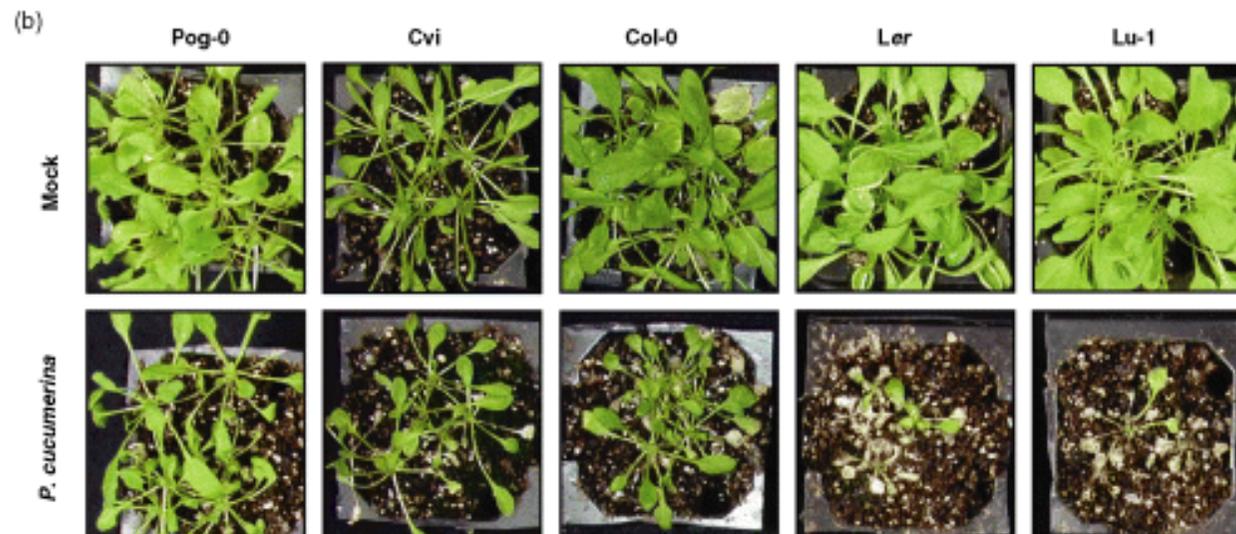
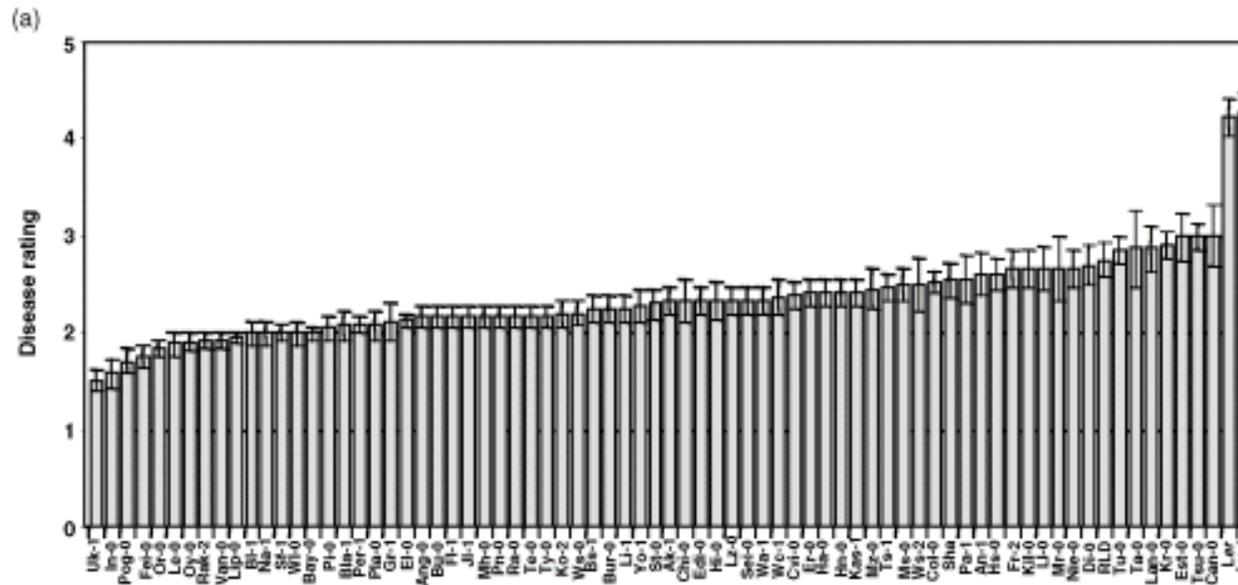
**Volume 43, Issue 2, pages 165–180, July 2005**

## ***Plectosphaerella cucumerina***

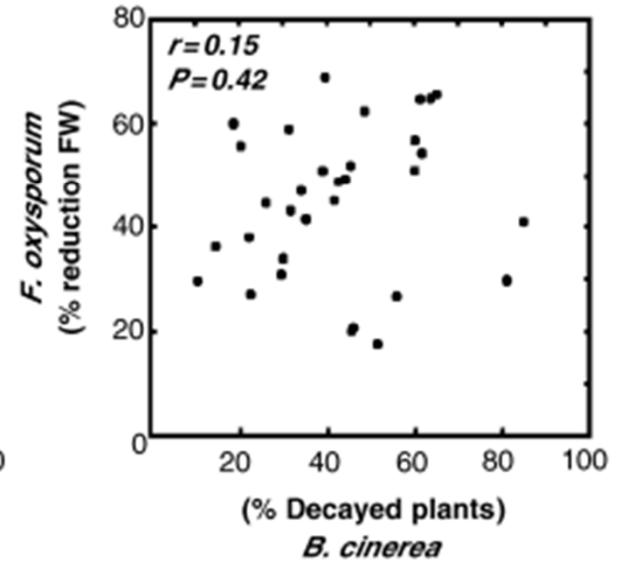
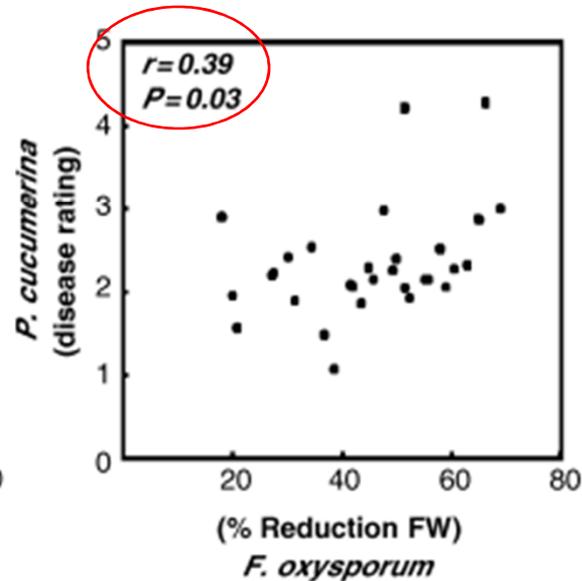
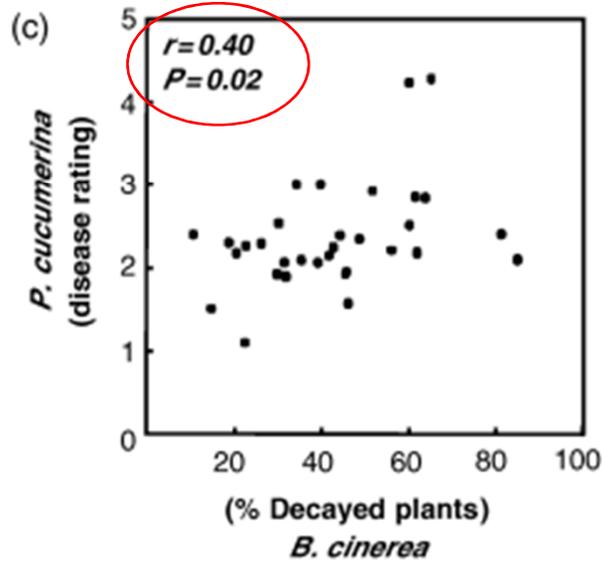
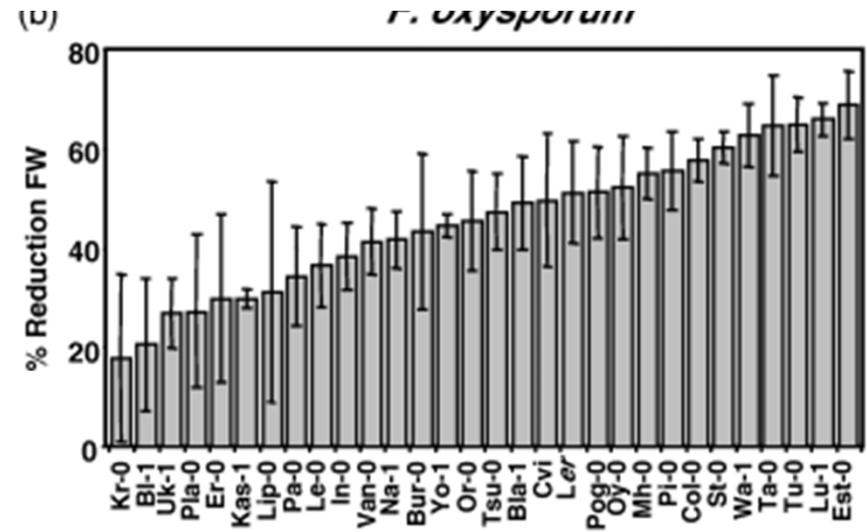
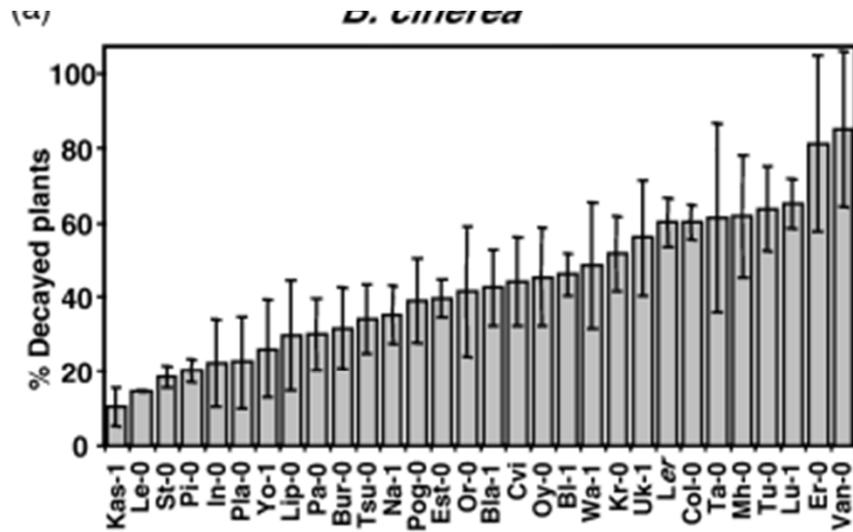
Fungo ascomicete necrotrofico che causa marciumi di frutti, foglie e del colletto in molte specie ortive



# Diversa suscettibilità a *Plectosphaerella cucumerina* in accessioni di *Arabidopsis*



# Risposta differenziale di accessioni di *Arabidopsis* ad altri funghi necrotrofi (*Botrytis cinerea* e *Fusarium oxysporum*)



## QTL likelihood maps for *Plectosphaerella cucumerina* resistance in a Ler/Cvi RIL population

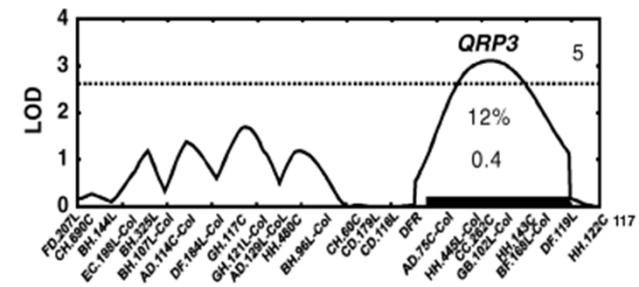
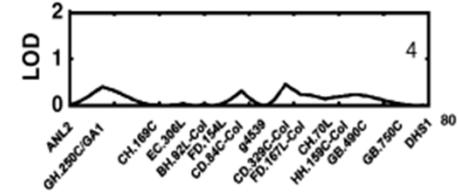
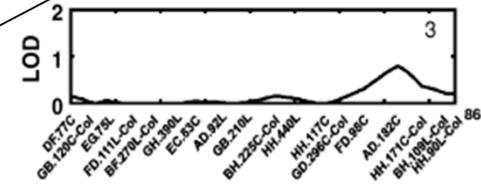
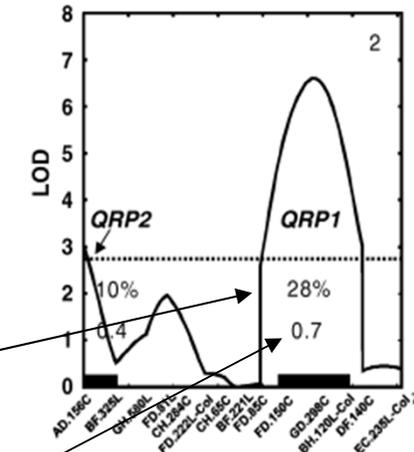
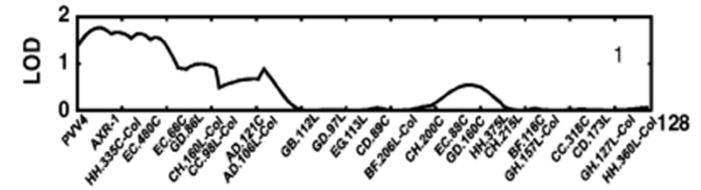
- Full quantitative trait locus analysis in a RIL population derived from the cross between the **moderately susceptible Cvi** and the **highly susceptible Ler** (Alonso-Blanco et al., 1998).
- Plants from **72 RILs Ler/Cvi**, as well as the parental accessions Ler and Cvi, were inoculated with a spore suspension of the fungus and their mean DRs were estimated.

# Tre QTL responsabili per circa 50% della variabilità fenotipica

Soglia per rilevare i QTL = 2.6 LOD

% della varianza fenotipica totale

Effetto additivo di ogni QTL (in Disease Rating): i valori positivi indicano che i genotipi La-er mostrano aumentata suscettibilità della popolazione Cvi



QRP1 (sul chr 2, vicino al gene *ERECTA*, o *ER*) è il locus con l'effetto più forte

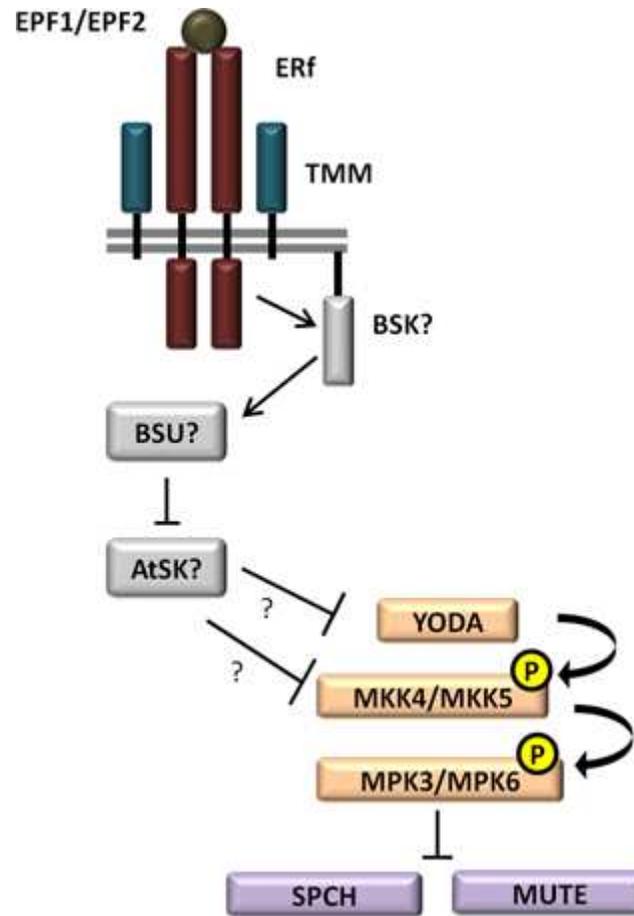
Ler porta una mutazione loss-of-function (allele *er-1*) nel gene *ER* (Torii et al., 1996).

Stesso QTL osservato anche in una popolazione RIL  
Ler/Col

**-> IPOTESI: il gene *ERECTA* è responsabile per il QTL  
QRP1**



## ERECTA: receptor-like kinase coinvolta in numerose funzioni





# Tre mutanti nel pathway di trasduzione a valle di ERECTA sono più suscettibili al fungo

