
Controllo Genetico Piante/Cibi

SOCIETA' SPIN-OFF DELL'UNIVERSITA' DI SIENA

Via P.A. Mattioli, 4 SIENA

CERTIFICATO DI ANALISI

*Analisi di accertamento varietale mediante marcatori molecolari SSR
di materiale vegetale prelevato in vivaio.*

L'analisi di accertamento varietale prevede le seguenti fasi:

- Isolamento e purificazione del DNA genomico da materiale vegetale;
- Amplificazione mediante PCR qualitativo con marcatori microsatelliti;
- Individuazione ed analisi delle taglie alleliche mediante sequenziatore automatico;
- Confronto della stringa all'elica ottenuta per tutte le varietà in analisi con quelle contenute in banca dati per le varietà toscane provenienti dall'Azienda S. Paolina del CNR a Follonica (GR).

Numero di campioni totali: **13**

-3 piante di un anno (pianta intera in laboratorio)

-9 piante di due anni C1; C2.....C10 moltiplicate e cartellate in vivaio.

-1 corrispondente a foglie prelevate da diverse piante non contrassegnate.

Osservazioni:

All'analisi è risultato mancante il campione C5.

Analisi

a) Metodologia e strumentazione utilizzata.

Il DNA è stato estratto giovani foglie (0.1g).

Qualità e concentrazione del DNA estratto sono stati misurati tramite determinazione dell'assorbanza a 260nm e dei rapporti A260/A280 e A260/230 (BioPhotometer 6131 Eppendorf) e successivamente confermate mediante corsa elettroforetica in gel d'agarosio all'1,5% in 1X TAE e 5V/cm.

La quantità di DNA estratta risulta essere in media 400 ng/mL e rapporto di assorbanza circa 2.

Il DNA è stato poi amplificato studiando regioni bersaglio (loci) contenenti una sequenza microsatellitare. Da ciascuna amplificazione per ciascun bersaglio sono stati ottenuti dei valori che corrispondevano alla dimensione del DNA amplificato per quella regione.

La determinazione della taglia allelica di ogni singolo DNA amplificato è stata effettuata tramite elettroforesi con Sequenziatore automatico AlExpress2 Pharmacia con detector a fluorescenza per i primer marcati Cy5

Ogni varietà quindi ha prodotto una stringa numerica.

Tali valori sono riportati, per ciascuna varietà, all'interno della tabella, dove a ciascuno dei 12 siti di amplificazione (loci) corrisponde una coppia di numeri relativa alla dimensione delle zone amplificate sui due cromosomi presenti (i due numeri sono uguali se il frammento amplificato era presente in due copie identiche, i due numeri sono invece diversi nel caso di due copie amplificate di diversa lunghezza).

b) ANALISI DELLA DIMENSIONE DEI FRAMMENTI MICROSATELLITI (SIZING)

I dati ottenuti sono riportati, per ogni campione vegetale e per ogni zona amplificata, nella tabella seguente.

Per tutti e 13 i campioni esaminati sono risultati i seguenti valori allelici per le 12 coppie di primers utilizzate:

LOCUS MICROSATELLITARE												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
p	ud4	ud6	ud9	ud11	ud12	ud17	ud19	ud24	ud27	ud31	ga6	ga8
1	148	174	103	114	166	173	132	179	199	110	172	199
2	144	150	99	114	166	165	102	179	121	110	172	199

- c) Dal confronto dei dati ottenuti con quelli presenti in Banca dati presso Co.ge.P srl, questi valori omogenei per i 13 valori esaminati corrispondono esattamente con quelli della varietà di Olivo Quercetana a dimostrazione che si tratta per tutti i campioni esaminati della stessa varietà

In fede

Antonella Autino