



## Introduzione

|  |    |
|--|----|
| 1.1. Agente eziologico della pasteurellosi ittica.....                             | 6  |
| 1.1.1 Cenni storici .....  | 7  |
| 1.2. La pasteurellosi ittica.....  | 8  |
| 1.3. Miglioramento del prodotto nell'allevamento di <i>Sparus aurata</i> , L. .... | 11 |
| 1.3.1. Miglioramento genetico .....  | 11 |
| Selezione basata sul fenotipo .....  | 11 |
| Selezione Assistita da Marcatori.....  | 12 |
| 1.3.2. Miglioramento genetico per <i>S. aurata</i> .....                           | 14 |
| 1.4. Marcatori genetici molecolari .....   | 15 |
| 1.4.1. Microsatelliti .....  | 16 |
| Cosa sono? .....   | 16 |
| Perché sceglierli? .....   | 18 |
| 1.5. Mappe Genomiche .....   | 19 |
| 1.5.1. Mappe fisiche.....  | 19 |
| 1.5.2. Mappe di associazione o <i>linkage</i> .....                                | 20 |
| 1.6. Orata come modello sperimentale.....  | 21 |
| Perché scegliere l'orata come modello sperimentale? .....                          | 22 |
| 1.6. Il progetto europeo AQUAFIRST .....   | 23 |

## Scopo del lavoro

### Materiali e metodi

|   |    |
|---|----|
| 3.1 Modello sperimentale .....  | 28 |
| 3.2 Mappe di associazione o <i>linkage</i> .....                                  | 29 |
| 3.2.1. Animale sperimentale .....   | 29 |
| 3.2.2. Estrazione di DNA.....   | 30 |
| 3.2.3. Costruzione di una libreria genomica arricchita in sequenze ripetute ..... | 30 |
| 3.2.6. Ricerche di similarità .....   | 35 |
| 3.2.7. Mappa di <i>linkage</i> di seconda generazione .....                       | 35 |
| 3.3. Studio di una popolazione trattata con patogeno .....                        | 36 |
| 3.3.1 Infezione sperimentale: <i>challenge</i> .....                              | 36 |

|   |    |
|---|----|
| 3.3.2. Archiviazione campioni in piastre da 96 .....  | 37 |
| 3.3.3. Estrazione di DNA .....  | 38 |
| a. Protocollo per singolo campione .....  | 39 |
| b. Protocollo per l'estrazione da 96 campioni con pompa a vuoto.....  | 40 |
| 3.3.4. Diagnosi di morte per pasteurellosi .....  | 41 |
| 3.4. Attribuzione di paternità .....  | 42 |
| 3.4.1. Selezione del set di <i>loci</i> microsatelliti N01 .....  | 42 |
| 3.4.2. Amplificazione del set di <i>loci</i> microsatelliti N01 .....   | 42 |
| 3.5. Preparazione ad un'analisi QTL: analisi attraverso <i>loci</i> microsatelliti.....   | 45 |
| 3.6. Corsa elettroforetica di frammenti .....   | 46 |
| 3.7. Valutazione del polimorfismo dei marcatori microsatelliti ( <i>Genotyper</i> ).....  | 47 |
| 3.8. Programmi per l'assegnazione di paternità.....   | 50 |
| 3.8.a. PAPA .....   | 50 |
| 3.8.b. CERVUS .....   | 50 |
| 3.9. Programmi per il calcolo dell'ereditabilità dei caratteri .....  | 51 |
| <b>Risultati</b>  |    |
| 4.1. Mappe di <i>linkage</i> .....  | 55 |
| 4.1.1. Mappa genetica di <i>linkage</i> di prima generazione del pesce teleosteo ermafrodita<br><i>Sparus aurata</i> (Franch <i>et al.</i> , 2006)..... | 55 |
| Marcatori microsatelliti specifici per l'orata .....  | 55 |
| Mappa di associazione o <i>linkage</i> .....  | 56 |
| Confronto fra Mappa di <i>linkage</i> e Mappa RH.....   | 57 |
| Confronto fra Mappa di <i>linkage</i> di orata e genoma di <i>Tetradon nigroviridis</i> .....   | 57 |
| 4.1.2. Mappa genetica di <i>linkage</i> di seconda generazione del pesce teleosteo ermafrodita<br><i>Sparus aurata</i> . .....                          | 58 |
| 4.2. Infezione sperimentale e raccolta dei campioni.....  | 62 |
| 4.2.1 <i>Challenge</i> 1, 2, 3 e 4.....   | 62 |
| 4.2.2 Estrazione del DNA da avannotti e riproduttori.....   | 67 |
| 4.3. Analisi di parentela.....  | 68 |
| 4.3.1. Selezione del set di <i>loci</i> microsatelliti N01 .....  | 68 |

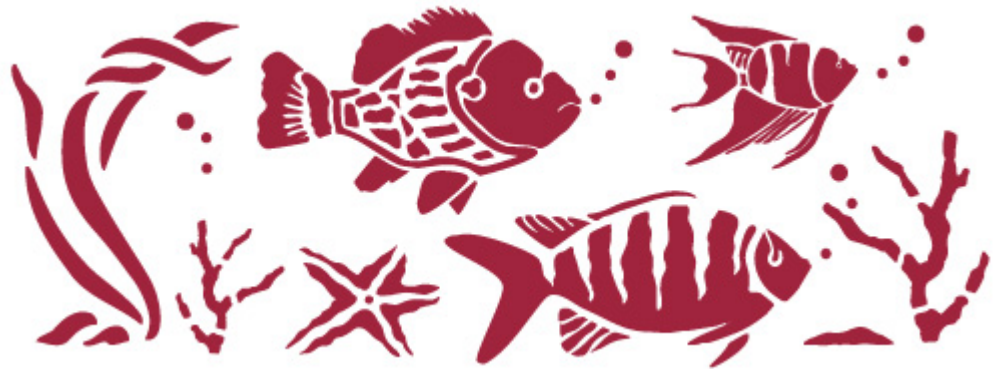
|  |    |
|--|----|
| Nome.....  | 69 |
| 4.3.2 Risultati dell'attribuzione di parentela.....  | 70 |
| 4.3.3. Ereditabilità dei caratteri: resistenza al patogeno e dimensione dell'avannotto ..... | 73 |
| 4.4. Elaborazione dei dati sperimentale per future analisi QTL .....                         | 74 |
| 4.4.1 Scelta delle famiglie per l'analisi QTL.....   | 74 |
| 4.4.2. Scelta dei <i>loci</i> per l'analisi QTL .....  | 76 |

## **Discussione e conclusioni**

## **Bibliografia**

## **Appendici**

# 1. Introduzione



La pasteurellosi ittica è una patologia infettiva che colpisce diverse specie di teleostei che vivono in acqua di mare temperata (Romalde 2002, Toranzo *et al.*, 2005). Il patogeno responsabile, il batterio *Photobacterium damsela* sottospecie *piscicida*, provoca pesanti perdite in allevamenti di specie ittiche in Giappone e nell'area Mediterranea., specialmente negli anni passati. Nell'orata (*Sparus aurata*) soprattutto gli stadi di larva e di avannotto sono suscettibili all'infezione (Noya *et al.*, 1995). La pasteurellosi ittica rappresenta un reale problema sanitario per l'acquacoltura dell'orata, in quanto la mortalità può raggiungere il 90-100% dei pesci infettati, con gravi perdite economiche per gli allevatori. L'immuno-profilassi potrebbe essere efficace per proteggere dalle infezioni di Phdp. La vaccinazione di stadi giovanili di orata, presenta però diversi limiti (Par.1.2).

Una strategia alternativa per prevenire l'insorgere della pasteurellosi è rappresentata dalla **selezione di pesci geneticamente resistenti alla patologia**. Per *S. aurata* sono già in atto programmi per la selezione di fenotipi legati alla crescita o a caratteristiche legate alla produzione (qualità della carne, contenuto in grassi). Queste caratteristiche hanno ereditabilità alta o media e sono semplici da misurare. La resistenza all'infezione (resistenza al patogeno) ha una bassa ereditabilità e risulta difficile da stimare. La selezione assistita da marcatori sembra essere la migliore strategia per ottenere la selezione di famiglie con fenotipo resistente al patogeno Phdp. I marcatori genetici ipervariabili microsatelliti sono largamente utilizzati in programmi di MAS.

### **1.1. Agente eziologico della pasteurellosi ittica**

L'agente responsabile della pasteurellosi ittica viene attualmente classificato come *Photobacterium damsela* sottospecie *piscicida* (Gauthier *et al.*, 1995) al quale ci riferiremo con l'abbreviazione *Phdp*. La classificazione attuale dell'agente eziologico ha portato a rinominare la patologia come photobacteriosis (Magarinos *et al.*, 2000). *Phdp* è un batterio Gram-negativo, alofilo, corto e robusto (0.5-1.3 x 0.7-4.0µm), non-mobile, asporigeno.

La sua crescita viene inibita da concentrazioni di sale superiori al 5 %. La temperatura di crescita ottimale è tra 22,5°C e 30°C, nonostante cresca anche tra 15°C e 32,5°C (Magarinos *et al.*, 1992).

### 1.1.1 Cenni storici

Il primo episodio della malattia viene registrato nel 1964 da Snieszko e collaboratori in una popolazione di pesce persico spigola americano (*Morone americanus*) e di persico spigola (*Morone saxatilis*) colpiti da una epizoozia nella baia di Chesapeake in USA (Snieszko *et al.*, 1964). Sulla base di alcune reazioni biochimiche, delle proprietà fisiologiche e di una netta colorazione bipolare del ceppo isolato, il batterio responsabile di tale esordio è stato inizialmente classificato nel genere *Pasteurella* spp.. Anni dopo alcuni campioni isolati da Snieszko vengono sottoposti ad ulteriori indagini da Janssen & Surgalla (1968) che confermano l'appartenenza del batterio al genere *Pasteurella* spp. e lo identificano come specie *Pasteurella piscicida*. Successivamente altri fenomeni epidemici si verificano negli Stati Uniti, coinvolgendo nuove specie ittiche, tra cui il cefalo (*Mugil cephalus*, Lewis *et al.*, 1970) e il persico spigola (*M. saxatilis*, Hawke *et al.*, 1987). Nel 1968 la patologia viene descritta per la prima volta in Giappone e nel 1969 viene considerata responsabile di gravi morie in allevamenti di ricciola (*Seriola quinqueradiata*) (Kubota *et al.*, 1970). A partire dagli anni novanta, eventi di pasteurellosi ittica vengono registrati anche in Europa. Nel 1990 si verifica la prima epizoozia causata da *P. piscicida* nell'orata in Spagna (Toranzo *et al.*, 1991) e nello stesso periodo la patologia appare anche in Italia (Ceschia *et al.*, 1991) danneggiando soprattutto gli allevamenti di branzini (*Dicentrarchus labrax*) e orate. Manifestazioni di altre epidemie sono state registrate anche in Grecia (Bakopoulos *et al.*, 1995), Portogallo (Baptista *et al.*, 1996), Turchia (Candan *et al.*, 1996), Malta (Bakopoulos *et al.*, 1997) e Israele (Noga, 1996).

Oltre alla diffusione mondiale di questa infezione, sono numerose le specie ittiche coinvolte in casi di pasteurellosi. La sensibilità dell'ospite è variabile (dose letale del 50%,  $DL_{50}$ , normalmente compresa tra  $10^3$  e  $10^6$  cellule batteriche) (Kusuda *et al.*, 1987; Magarinos *et al.*, 1992).

## 1.2. La pasteurellosi ittica

La patologia ha una certa **rilevanza economica** soprattutto in specie marine allevate nel bacino mediterraneo, come il branzino e l'orata, e in Giappone, nelle popolazioni di ricciola. Altri casi di infezione da pasteurella o da microrganismi Pasteurella-simili sono stati descritti per specie quali: cobia (*Rachycentron canadum*, Liu *et al.*, 2003) in Taiwan; snakehead (*Channa maculata*, Lacepede 1802) in Giappo., 1976) e Gran Bretagna (Jones *et al.*, 1999); siluro (*Silurus glanis*) e carpa comune (*Cyprinus carpio*) in Ungheria (Farkas *et al.*, ne; trota comune (*Salmo trutta*) e salmone atlantico (*Salmo salar*) in Norvegia (Hastein *et al.* 1981).

La pasteurellosi ittica determina gravi epizootie soprattutto nelle stagioni calde, quando la **temperatura dell'acqua** raggiunge i 22-25°C (Frerichs *et al.*, 1989; Hawke *et al.*, 1987), o quando la **salinità** si riduce al di sotto del 25-30‰ in seguito a lunghi periodi di pioggia (Fouz *et al.*, 2000). Forme gravi della malattia si descrivono con temperature dell'acqua molto elevata o in condizioni di qualità dell'acqua scadenti (Fryer *et al.*, 1984). In particolare, maggiori manifestazioni della patologia si osservano quando vi è elevata densità di popolazione, bassa concentrazione di ossigeno disciolto nell'acqua, elevato grado di inquinamento e la concomitante presenza di patogeni opportunisti.

Per quanto riguarda la **diffusione ambientale** dell'agente eziologico, è stato dimostrato la capacità di Phdp di entrare in uno stato quiescente nell'ambiente marino: in coltura il patogeno sotto tale forma è in grado di riattivarsi rapidamente in seguito ad un arricchimento nutritivo del mezzo, mantenendo le medesime caratteristiche biochimiche, fisiologiche e sierologiche (Magarinos *et al.*, 1994). Tale proprietà riveste un ruolo significativo nella comparsa di epidemie di pasteurellosi in popolazioni ittiche apparentemente mai venute a contatto con il patogeno (Ohnishi *et al.*, 1982; Magarinos *et al.*, 1994).

L'ambiente acquatico è uno dei **mezzi di trasmissione** di Phdp, come confermano studi condotti da Hawke (1994) e Magarinos e collaboratori (1995), i quali hanno provocato l'insorgenza sperimentale della patologia per immersione in ibridi di persico-spigola, in orata e nel rombo chiodato (*Schophthalmus maximus*). La **via di trasmissione** più probabile del patogeno sembra essere da pesce a pesce, attraverso le branchie (Kawahara *et al.*, 1989). Inoltre, è ritenuto possibile anche il contagio per via orale attraverso l'alimento (Tung *et al.*, 1985; Kawahara *et al.*, 1987). Phdp è in grado di resistere all'azione battericida del muco



presente nella cute del pesce e di aderire ad esso, ciò ha portato a ipotizzare che il microrganismo patogeno utilizzi come porta d'ingresso la cute intatta dell'ospite (Magarinos *et al.*, 1995; Fouz *et al.*, 2000). Immediatamente dopo l'invasione nell'ospite, il microrganismo tende a proliferare principalmente in organi interni quali reni, ciechi pilorici, fegato, milza e cuore (Tung *et al.*, 1985, Hawke *et al.*, 1987; Noya *et al.*, 1995).

La pasteurellosi ittica può essere considerata essenzialmente una **patologia** setticemica. Può manifestarsi in forma acuta e cronica (Toranzo *et al.*, 1991). L'infezione colpisce soprattutto soggetti molto giovani, più sensibili alla patologia, registrando valori di mortalità molto elevata (80-90%, Hawke *et al.*, 1987). Nella forma acuta i pesci presentano nuoto atassico, letargia, non reagiscono alla presenza dell'uomo e manifestano evidenti segni di anoressia. Il corpo appare iperpigmentato e compaiono emorragie diffuse alla base delle pinne e sul corpo (Toranzo *et al.*, 1991). A livello dei visceri, prevalentemente fegato, milza e rene, si possono evidenziare lesioni necrotizzanti multifocali di entità variabile ed emorragie. Anche le branchie possono essere sede dell'infezione e causare insufficienza respiratoria (Noya *et al.*, 1995). La forma cronica colpisce più frequentemente soggetti adulti dove la mortalità scende circa al 30% (Tung *et al.*, 1985). Si possono osservare caratteristici noduli biancastri, di diametro normalmente compreso tra 0,5 e 3,5 mm, localizzati in reni e milza e, con dimensioni minori, anche a livello epatico. (Kubota *et al.*, 1970; Kubota *et al.*, 1972). I segni della forma cronica della malattia non sono uguali in tutte le specie infettate, inoltre dipendono dal fatto che la patologia sia insorta naturalmente o sia stata indotta in via sperimentale, e dal fatto che l'ospite sia stato sottoposto o meno ad un trattamento antibiotico specifico (Magarinos *et al.*, 1996).

Le specie maggiormente colpite sono: il branzino (*Dicentrarchus labrax*) e l'orata (*Sparus aurata*). Per il branzino i casi più gravi si rilevano in soggetti tra 1 e 60 g di peso corporeo, con mortalità molto elevata tra i 5 e 40 g, rappresentando un grosso problema soprattutto nei periodi estivi negli allevamenti per ingrasso. Per quanto riguarda l'orata invece, lo stadio di avannotto (peso corporeo inferiore ai 6g) è il più suscettibile alla patologia.

Dal punto di vista **terapeutico**, fin dal primo isolamento della malattia in Giappone sono stati effettuati molteplici tentativi di eliminare il patogeno con il trattamento chemioterapico. La somministrazione di farmaci protratta oltre un certo periodo di tempo porta comunque allo sviluppo di fenomeni di farmaco-resistenza, rappresentando, quindi, una soluzione non in grado di eliminare il problema (Aoki *et al.*, 1988).

Un altro approccio per combattere la patologia è di tipo **preventivo** (Kusuda *et al.*, 1987, Hmaguchi *et al.*, 1989). L'impiego di adeguate tecniche di allevamento, idonee condizioni igienico-sanitarie e ridotti livelli di stress, sembrano avere un importante ruolo nella prevenzione della pasteurellosi. In molte occasioni, però, non sono state riscontrate correlazioni dirette tra la qualità dell'acqua o la densità di stoccaggio e la mortalità indotta dalla patologia (Toranzo *et al.*, 1991).

Un'altra strategia di tipo preventivo è l'**immunoprofilassi**. Molti autori, investigando sulla risposta immunitaria dei pesci nei confronti di *P. damsela* piscicida, riportano la possibilità di usare la vaccinazione come arma nella lotta contro la pasteurellosi (Hamaguchi & Kusuda, 1988). Di fatto, i risultati di campagne di vaccinazione di popolazioni di orata durante i primi stadi di sviluppo provano che l'immunoprofilassi è efficace nel prevenire l'infezione (Magarinos *et al.*, 1994d; Magarinos *et al.*, 1999; Hanif *et al.*, 2005 ). In commercio sono disponibili diversi tipi di vaccini (<http://www.bionor.no/aqua.html>; <http://www.avl.co.uk>) la cui efficacia è stata ampiamente indagata in rapporto alla natura del composto e alla modalità di somministrazione (Magarinos *et al.*, 1994d). Purtroppo, la vaccinazione rappresenta un costo aggiuntivo nell'allevamento di specie ittiche e fornisce soltanto una protezione temporanea dovuta alla bassa competenza immunologica degli avannotti. Inoltre, risultati non completamente soddisfacenti rendono la vaccinazione per la pasteurellosi ittica oggetto di continui studi (Bakopoulos *et al.*, 2003a e b).

Una strategia alternativa per la prevenzione da pasteurellosi in larve e avannotti di orata è la **selezione dei pesci geneticamente resistenti alla patologia**. La selezione di pesci resistenti ha due vantaggi rispetto all'immunoprofilassi:

pesci resistenti hanno probabilità bassa o nulla di sviluppare la malattia;

la presenza di una uniforme e limitata proporzione di pesci resistenti riduce l'opportunità di trasmissione della patologia, diminuendo il rischio di infezione per gli individui suscettibili al batterio (non resistenti).

### **1.3. Miglioramento del prodotto nell'allevamento di *Sparus aurata*, L.**

L'orata è una delle specie di pesci di maggiore importanza dal punto di vista economico, negli ultimi anni l'allevamento di questo sparide si è molto sviluppato. Una delle principali responsabilità degli allevatori è quella di garantire una corretta alimentazione della popolazione allevata, in modo da permettere ai pesci delle ottime prestazioni, accompagnate da un'elevata resistenza agli stress e alle malattie. Ad esempio se l'alimentazione è eccessiva si riscontra una minore efficienza nell'utilizzo dell'alimento somministrato, un eccessivo deposito di lipidi e quindi un decremento della qualità del prodotto. Inoltre per garantire prodotto controllato, gli avannotti devono essere corredati di certificazione di qualità, in modo da assicurarne l'elevata sopravvivenza e limitate anomalie morfologiche, legate al fenotipo (Poli, 2003). Questo è uno dei tanti obiettivi a cui puntano le riforme relative all'acquacoltura, per offrire ai consumatori un prodotto garantito.

I riproduttori vengono selezionati sulla base di caratteristiche fenotipiche che assicurino la produzione di migliori avannotti. Da ciò deriva l'interesse sempre maggiore dimostrato dagli operatori dell'acquacoltura verso le nuove tendenze della ricerca scientifica, volte allo sviluppo di tecniche che consentano di isolare quei geni responsabili delle caratteristiche d'importanza commerciale, determinando la produzione di individui migliori.

Oltre alla selezione di riproduttori, per aumentare l'efficienza dello sforzo riproduttivo ed ottenere del prezioso novellame è necessario applicare la riproduzione artificiale.

#### **1.3.1. Miglioramento genetico**

##### **Selezione basata sul fenotipo**

La selezione degli individui di una determinata specie sulla base delle caratteristiche fenotipiche, è stata una strategia di allevamento molto praticata nel tempo poiché ha permesso di ottenere notevoli benefici nel settore economico.

La maggior parte di queste selezioni sono state fatte isolando uno specifico fenotipo, ignorando la struttura genetica dei caratteri selezionati (Dekkers J.C.M. *et al.*, 2002).

Tuttavia, i programmi di selezione basati sul fenotipo hanno conseguenze sia positive sia negative. Infatti, sebbene siano stati ottenuti alcuni miglioramenti significativi nella produttività, sono state selezionate anche delle caratteristiche indesiderate.

### **Selezione Assistita da Marcatori**

La selezione basata sul fenotipo presenta molte limitazioni: infatti i caratteri stimati possono essere a bassa ereditarietà, osservabili in un solo sesso, richiedere il sacrificio dell'animale, risentire dell'interazione genotipo-ambiente e manifestarsi tardivamente, anche dopo il periodo riproduttivo. Vi sono alcuni caratteri, come la resistenza a patogeni, che possono essere studiati mediante una selezione basata o unicamente sul genotipo oppure su una correlazione di quest'ultimo con il fenotipo. Solo di recente (Andersson., 2001) infatti è stata valutata l'importanza della genetica molecolare per comprendere la natura genetica dei caratteri quantitativi (\*1), identificando specifiche regioni di geni o cromosomi che influenzano tali caratteristiche (Dekkers *et al.*, 2002).

Esistono differenti tipi di marcatori molecolari per evidenziare varianti geniche, e attuare una selezione assistita da marcatori o MAS (*Marker Assisted Selection*) in una popolazione. La MAS è una tecnica di selezione diretta che si basa sull'associazione fra un carattere ed un marcator. Questa tecnica oltre a rendere la selezione indipendente dall'interazione fenotipo-ambiente, permette di selezionare ad uno stadio di sviluppo molto precoce, poiché non è necessario attendere l'espressione fenotipica del carattere. Ciascun marcatore può essere utilizzato in uno specifico contesto in relazione al tipo di studio sulla popolazione. Sono pertanto da considerarsi degli strumenti che facilitano l'analisi genomica e la stessa selezione (Davies *et al.*, 1999).

**\*1. Caratteri quantitativi:** nei programmi di selezione in acquacoltura (zootecnia), i caratteri quantitativi sono caratteristiche relative al peso, alla lunghezza, alla percentuale di carcassa ecc. Contrariamente ai fenotipi qualitativi, quelli quantitativi sono controllati da un ristretto numero di geni. La difficoltà nel selezionare questi caratteri dipende dal meccanismo d'azione dei geni in un numero variabile di generazioni. Infatti se la selezione è a favore di un fenotipo recessivo, si può eliminare il fenotipo dominante in una sola generazione, mentre se la selezione è a favore di un carattere dominante, sarà necessario applicare dei programmi matematici per stabilire il numero di generazioni utili ad eliminare l'allele recessivo.

Il programma di selezione per caratteri quantitativi (miglioramento genetico di un particolare carattere) prevede la selezione di specifici riproduttori al fine di variare la media della popolazione nella generazione successiva.

La capacità di identificare geneticamente famiglie di organismi allevati è un requisito fondamentale per qualsiasi programma di selezione.

Ad oggi per molte specie sono disponibili un numero molto elevato di marcatori molecolari ovvero di sequenze di DNA che possono essere associate a caratteri specifici come la resistenza ad una patologia. Un importante obiettivo, realizzato per molte specie e in corso d'opera per altre, consiste nel costruire una **mappa del genoma** di specie ittiche di importanza commerciale in acquacoltura, individuando molti marcatori molecolari, per poi usarli nella creazione di mappe di associazione o *linkage* e per **l'analisi di QTL** (*Quantitative Trait Loci*, \*2). La tecnica di mappaggio dei QTL può essere intesa come il punto d'incontro tra la genetica dei tratti quantitativi e poligenici con la genetica dei tratti discreti e molecolari. L'obiettivo è quello di associare un tratto quantitativo ad uno o più marcatori genetici e, se è nota la posizione del marcatore sulla mappa genetica, si può individuare il tratto quantitativo sul genoma. In questo modo, ad esempio, è possibile trovare il marcatore associato alla resistenza ad una certa patologia o ad una crescita maggiore.

Tuttavia per avere una buona probabilità di riuscita in un'analisi di QTL è necessario avere un numero molto elevato di marcatori molecolari polimorfici, uno o più tratti fenotipici misurabili e caratterizzati da una elevata ereditarietà e una popolazione segregante, ovvero una prole dove i geni che nei genitori controllano il tratto quantitativo interessato segregano nei figli. Quindi il materiale ideale su cui svolgere l'analisi sarebbe una popolazione con un elevato grado di polimorfismo e soprattutto un'alta variabilità nei geni che controllano il tratto qualitativo. Su individui della popolazione segregante, identici per fenotipo, è eseguita sia un'analisi genetica dei marcatori molecolari sia la misurazione dei tratti quantitativi.

\*2. *QTL*: quantitative trait locus, regione di DNA associata ad un particolare tratto quantitativo. Il QTL è strettamente associato ad un gene che determina il carattere fenotipico in questione.

### 1.3.2. Miglioramento genetico per *S. aurata*

In questi ultimi anni sono stati fatti considerevoli progressi tecnologici nelle analisi delle risorse genetiche di variazione fenotipica e nella selezione nell'ambito dei programmi di allevamento delle specie ittiche di interesse economico.

Nei paesi che si affacciano al Mar Mediterraneo, solo di recente si è affermata la pratica intensiva di acquacoltura per le specie eurialine, come la spigola e l'orata. Inizialmente, gli animali inseriti negli allevamenti erano selvatici e il novellame veniva periodicamente rinnovato. Le caratteristiche della produzione dell'acquacoltura nel Mediterraneo, la recente messa a punto dell'allevamento intensivo e la taglia relativamente piccola dei riproduttori, evidenziano come questi debbano ancora risentire dei benefici ottenuti dalle tecnologie (GENEAQUAS, 2003).

Attualmente, sono in corso programmi per la costruzione di mappe genomiche per le principali specie allevate (la trota, il salmone, il pesce gatto, la tilapia, l'orata e la spigola). I teleostei non sono un gruppo omogeneo e le principali specie allevate sono filogeneticamente diverse, essendosi evolute separatamente in più di centinaia di milioni di anni. Questo significa che non è possibile trasferire le mappe genomiche create per una specie ad un'altra. Per ognuna di queste specie sarà richiesto un programma di mappaggio indipendente, con la possibilità di effettuare confronti fra mappe, ad esempio comparando mappe di specie di interesse per l'acquacoltura con mappe di specie modello.

Programmi di miglioramento genetico sono stati applicati principalmente su specie ittiche come i Salmonidi, che appartengono ad un gruppo di più di 25.000 specie di cui solo alcune sono utilizzate in acquacoltura (Crosetti *et al.*, 2001).

A partire dagli anni '90, sono stati intrapresi alcuni programmi di selezione genetica (individuale e familiare) sulle orate di allevamento, volti ad ottenere un miglioramento nei caratteri quantitativi come il tasso di crescita o ad incrementare la presenza di alcune caratteristiche altamente desiderabili dagli allevatori, come la resistenza allo stress o alle patologie.

L'identificazione di numerosi marcatori genetici molecolari per queste specie, sia di tipo allozimico che di sequenze di DNA mitocondriale e nucleare, ha aperto la strada a numerose

applicazioni nel campo dell'acquacoltura. Attualmente sono infatti in corso programmi di ricerca che prevedono l'utilizzo di tali marcatori, soprattutto di microsatelliti, per monitorare la diversità genetica nelle popolazioni di allevamento, per valutare il successo di un ripopolamento attivo in ambiente lagunare, per identificare la parentela in un programma di selezione genetica, per identificare QTL associati alla resistenza ad un patogeno (Alarcón J.A. *et al.*, 2004: studio sul confronto della diversità genetica di popolazioni di *S. aurata* selvatiche e allevate, Sud-Atlantico e Mediterraneo, mediante allozimi, microsatelliti e DNA mitocondriale). Anche per *D. labrax* sono stati condotti studi analoghi, creando una mappa di linkage, ottenuta con 28 marcatori microsatelliti (Chistiakov *et al.*, 2004) e altri 11 isolati precedentemente (Tsigenopoulos C.S. *et al.*, 2003). È stato possibile rivelare un notevole grado di polimorfismo, raramente osservato in una specie ittica.

#### **1.4. Marcatori genetici molecolari**

I principali strumenti utilizzati per studiare la variazione genetica all'interno delle popolazioni o tra popolazioni sono i **marcatori genetici**. Un marcatore genetico è una qualsiasi caratteristica morfologica, biochimica o molecolare che venga ereditata attraverso le generazioni, in modo da poter essere monitorata nel tempo. I marcatori genetici vengono utilizzati in un gran numero di applicazioni nello studio dell'ecologia e dell'evoluzione (modalità di accoppiamento, struttura di popolazione e flusso genico, fitness, etc.). Infatti, i numerosi marcatori molecolari (RAPD, RFLP, AFLP, minisatelliti e microsatelliti) e biochimici (allozimi) disponibili al giorno d'oggi differiscono nel tipo e nel grado di variabilità che individuano, nella facilità di impiego e, per ultimo, ma non per questo meno importante, nei costi di sviluppo e applicazione (Ouborg *et al.*, 1999). Fanno eccezione le analisi condotte con marcatori allozimatici che oggi vengono impiegate sempre meno, in quanto gli allozimi (enzimi codificati da differenti alleli di un singolo *locus*, con diversa mobilità elettroforetica dovuta alle alterazioni nella carica ionica complessiva della proteina) possono ritenersi come indicatori indiretti della variabilità genetica. Essi non sono in grado di rivelare alterazioni a livello del DNA che non comportino alterazioni della carica ionica complessiva della proteina e quindi della mobilità in campo elettrico.

Tra le numerose caratteristiche che differenziano un marcatore molecolare dall'altro è opportuno evidenziarne tre in particolare: dominanza/codominanza; criterio di ereditarietà; ricombinazione.

I marcatori dominanti (es. RAPD, AFLP) sono quelli in cui un allele è dominante sull'altro ed il profilo dell'eterozigote è essenzialmente indistinguibile da quello dell'omozigote dominante, per questo motivo consentono di classificare solo due fenotipi, dominante o recessivo.

I marcatori codominanti (RFLP, allozimi, microsatelliti) invece, sono quelli il cui profilo omozigote può essere distinto dai profili degli eterozigoti permettendo una facile stima delle frequenze alleliche in una popolazione.

Il grado di variazione che un marcatore deve avere per essere utilizzabile dipende dalla domanda specifica alla quale si vuole rispondere ed anche dal tipo di popolazioni e di organismi che si intende studiare.

In questo studio si è deciso di condurre un'analisi di parentela allo scopo di fornire gli strumenti da utilizzare in una futura ricerca di QTL i a livello nucleare utilizzando i **marcatori microsatelliti**.

#### **1.4.1. Microsatelliti**

Il DNA nucleare degli animali è un genoma diploide che viene trasmesso seguendo una segregazione mendeliana ed è quindi soggetto a ricombinazione. Le sue regioni più polimorfiche, i *loci* microsatelliti, studiati inizialmente in relazione a malattie genetiche, risultano più informative negli studi di struttura e dinamica di popolazione.

##### **Cosa sono?**

I microsatelliti sono conosciuti anche come SSRs (Simple Sequences Repeats) o come STRs (Short Tandem Repeats) o ancora come SSLPs (Simple Sequences Length Polymorphism). Sono essenzialmente sequenze genomiche contenenti un modulo di 2-5 nucleotidi ripetuto per decine di volte, fino ad una lunghezza massima della successione di 200 bp (Rassmann *et al.*, 1991).



I microsatelliti sono distribuiti nel genoma di tutti gli eucarioti, con grande prevalenza nelle regioni non codificanti e presentano un alto grado di polimorfismo di lunghezza dovuto a differenze nel numero di ripetizioni del modulo interno. Si ritiene inoltre che siano neutrali, ovvero non soggetti a selezione. Sembra però esistere una sorta di selezione a livello dimensionale del numero di unità ripetute, infatti è interessante notare che la lunghezza delle sequenze microsatellite presenta un limite massimo non superabile, determinato probabilmente da un meccanismo selettivo che impedirebbe la formazione di alleli eccessivamente lunghi i quali destabilizzerebbero l'appaiamento meiotico tra individui eterozigoti, aumentando il numero di crossing-over aberranti (Samadi *et al.*, 1998)

In base alla loro composizione, i microsatelliti si distinguono in perfetti (vedi Fig 3.1), composti ed interrotti (Jarne *et al.*, 1996). I microsatelliti perfetti sono quelli costituiti esclusivamente da un solo tipo di modulo ripetuto, quelli composti sono costituiti da due o più tipi di moduli ripetuti, mentre quelli interrotti contengono tra un modulo ripetuto e l'altro una o più basi che interrompono la continuità. Un esempio delle tre diverse tipologie è mostrato in figura in 3.1.



**Figura 3.1.** Rappresentazione schematica di un *locus* microsatellite. In tabella: diverse tipologie di microsatelliti

### **Perché sceglierli?**

La semplicità di mappaggio e l'alto grado di polimorfismo rendono i microsatelliti marcatori molecolari di grande interesse per molti studi di tipo genetico.

I microsatelliti sono marcatori nucleari ipervariabili: sono stati identificati fino a 50 alleli per singolo *locus*, l'eterozigosità media è del 50% e per alcuni *loci* raggiunge picchi del 100%.

Il grado elevato di variabilità dipende da un tasso di mutazione molto alto, fino a  $1 \times 10^{-2}$  eventi mutazionali per generazione (Amos *et al.*, 1996), con un valore di retromutazione altrettanto consistente che può permettere il ritorno all'allele di partenza in poche generazioni. L'alto tasso di mutazione è stato imputato ad errori della *DNA polimerasi* la quale può andare incontro ad eventi di slittamento durante la replicazione, scivolando indietro e replicando una seconda copia dello stesso dinucleotide oppure saltando oltre uno o più dinucleotidi e determinando la perdita di uno o più moduli (Schlötterer C. *et al.*, 1992). Un altro fattore che determina l'alto tasso di mutazione, forse ancora più della DNA polimerasi (se si considera che esiste un sistema di correzione che opera in vivo e che riduce gli errori di duplicazione), è stato riconosciuto nei meccanismi di ricombinazione tra alleli di diversa lunghezza che, durante l'appaiamento meiotico dei cromosomi omologhi, danno crossing over diseguale generando nuovi alleli. Nonostante il fatto che il meccanismo di evoluzione dei microsatelliti sia ancora poco chiaro, essi sono stati ampiamente utilizzati in diversi campi (Litt M. *et al.*, 1989; Tautz D., 1989; Weer J.L. *et al.*, 1989) per la loro alta variabilità che li rende dei potenti marcatori genetici. L'elevato polimorfismo fa' di questi marcatori nucleari un potente mezzo di indagine nelle analisi di variabilità intraspecifica su scala microgeografica, inoltre, poichè le regioni fiancheggianti i repeats tendono al contrario ad essere assai più conservate, i microsatelliti possono venire impiegati per studiare il differenziamento genetico anche tra specie filogeneticamente vicine (Goldstein *et al.*, 1995).

## 1.5. Mappe Genomiche

Le mappe genomiche permettono di avere maggiori informazioni relative al genoma di individui di una determinata specie presa in esame, descrivendo l'ordine di *locus* genetici o di marcatori e la distanza compresa tra loro su ciascun cromosoma. Vi sono due modi per mappare il genoma, utilizzando o le mappe fisiche oppure quelle genetiche o di linkage, a seconda dei metodi usati per costruirle e dell'unità di misura adoperata per valutare la distanza tra i due marcatori. Lo scopo di realizzare delle mappe è perciò quello di conoscere l'organizzazione dei geni sui cromosomi: inoltre le mappe sono utili per l'isolamento e la clonazione di geni d'interesse.

### 1.5.1. Mappe fisiche

Una mappa fisica si basa sull'utilizzo di tecniche di biologia molecolare per esaminare direttamente i frammenti di DNA e quindi per costruire delle mappe che mostrino la posizione di sequenze caratteristiche che contengano determinati geni. E' una mappa costituita da marcatori o regioni fisicamente identificabili di DNA ed è costruita senza l'analisi della ricombinazione genica. Descrive l'ordine e la distanza tra due marcatori misurata in numero di nucleotidi. Prima si localizza un marcatore su uno dei cromosomi e poi questo viene ordinato su di una mappa fisica. Le mappe fisiche presentano diverse risoluzioni in base alla tecnica che si utilizza. Un esempio di localizzazione di un marcatore su uno specifico cromosoma è dato dalla tecnica di ibridazione delle cellule somatiche utilizzata nell'uomo. E' stata costruita una mappa fisica a **bassa risoluzione**, che ha permesso di produrre una mappa cromosomica umana in cui ciascun cromosoma è caratterizzato da un bandeggiamento particolare, osservabile al microscopio dopo colorazione. Un altro tipo di mappa fisica è quello a **risoluzione medio-alta**, che permette di rendere fluorescenti i singoli cromosomi eucariotici in metafase nella posizione corrispondente a geni o a sequenze di DNA specifiche, attraverso sonde e DNA specifiche marcate con fluorocromi (FISH, fluorescence in situ hybridization).

Il terzo tipo di mappa fisica ha un'**alta risoluzione** di migliaia di STS (sequence-tagged site), che definiscono porzioni univoche sul genoma. Gli STS sono corti segmenti di DNA, lunghi circa 60-1000 bp, che rappresentano dei punti di riferimento da cui partire per l'esplorazione del genoma e del sequenziamento. Uno specifico STS è evidenziato con la tecnica di reazione a catena della polimerasi (PCR) e ciò che rende unico ciascun STS, è la sequenza della coppia di primer usati nella PCR (Russel P. J., 1994).

### **1.5.2. Mappe di associazione o *linkage***

Le mappe genetiche di associazione illustrano le distanze tra i vari geni, la loro posizione e quella di altre sequenze caratteristiche sul genoma: le distanze sono determinate in base alla frequenza con cui due marcatori localizzati sulla stesso cromosoma (sintenici) sono ereditati insieme. Gli alleli di *loci* molto vicini sul cromosoma hanno una probabilità maggiore di essere ereditati insieme rispetto a quelli presenti su *loci* distanti. Un'unità di mappa genetica o cM rappresenta la distanza tra due geni per i quali un prodotto della meiosi su cento è ricombinante. L'interferenza e i crossing-over multipli possono rendere la relazione tra frequenza di ricombinazione e distanza di mappa genetica non lineare. La mappa di *linkage* quindi definisce la distanza tra marcatori e la loro posizione sul genoma, determinando la frequenza con cui due marcatori associati (e quindi localizzati sullo stesso cromosoma) sono ereditati insieme.

Le mappe che usano come marcatori i geni sono mappe a bassa densità, pertanto non sempre informative. Nella costruzione di una mappa di linkage si utilizzano preferibilmente sequenze di DNA definite come marcatori genetici molecolari. Affinché un marcatore possa essere usato per costruire mappe genomiche, esso deve essere polimorfico.

L'utilizzo dei microsatelliti come marcatori nella costruzione della mappa di linkage è dovuto al loro alto grado di polimorfismo e alla facilità di isolamento.

Per *S. aurata* esiste una prima mappa di ibrido per radiazione (mappa RH) costituita da 440 marcatori, adatti per un'analisi di linkage e per studi comparativi di mappatura.

In seguito 74 microsatelliti e 428 marcatori genici sono stati aggiunti alla mappa, aumentandone la densità, in modo da facilitare le analisi comparative e permettere una

mappatura di QTL ed una selezione assistita da marcatori molecolari (Sarropoulou *et al.*, 2006).

## 1.6. Orata come modello sperimentale

L'orata *Sparus aurata* è un teleosteo marino della famiglia Sparidae (orata comune, ordine Perciformi, classe Teleostei, famiglia degli Sparidi,).

La famiglia Sparidae comprende più di 100 specie, divise in due vasti cladi (gruppi A e B), in accordo con i più recenti dati molecolari (Orrel *et al.*, 2004). Gli Sparidi sono ampiamente diffusi in acque temperate e tropicali, con un massimo di diversità di specie nelle regioni del Nord-Est Atlantico e del Mediterraneo e rappresentano un elemento chiave nell'ecosistema costiero marino. Molte delle specie della famiglia degli sparidi rivestono un ruolo di rilievo nell'ambito dell'economia della pesca e dell'acquacoltura, visto l'elevato valore commerciale conferito da qualità alimentari riconosciute a livello mondiale. In particolare, il ruolo di grande importanza ricoperto dall'orata nell'acquacoltura marina ha motivato un crescente numero di studi scientifici relativi a vari ambiti tra i quali l'immunologia, l'endocrinologia, la morfologia ossea, la fisiologia muscolare e la genetica molecolare.

Tra le specie di interesse commerciale, l'orata è un eccellente candidato per diventare organismo modello di specie tra i pesci marini. L'interesse crescente è documentato dal considerevole aumento del numero di pubblicazioni ad essa relative. Il corredo di strumenti genomici disponibili per *Sparus aurata* è in costante evoluzione: è stato progettato un cDNA microarray di prima generazione (Sarropoulou *et al.*, 2005); sono state definite una mappa di ibridi di radiazione (RH) preliminare (Senger *et al.*, 2006), sviluppata e portata a più di 1000 marcatori, ed una mappa RH di seconda generazione (Sarropoulou *et al.*, 2007); è stato recentemente completato un progetto di sequenziamento su media scala di EST (Expressed Sequenced Tag); alla fine del 2006 è stato completato un oligo-array costituito da più di 10000 trascritti unici (Bargelloni, comunicazione personale). Inoltre, nel corso di questo progetto di dottorato, è stata sviluppata una mappa di associazione o linkage (mappa LG) di prima generazione, basata su 204 marcatori microsatelliti (Franch *et al.*, 2006). I gruppi di associazione sono stati verificati mediante il confronto con mappe genetiche di ibridi di radiazione sviluppate su vasto numero di individui. Tale mappa di associazione fornisce una robusta struttura comparativa per l'analisi dei caratteri ereditabili in *S. aurata* e rappresenta un

passo avanti nell'identificazione di quei *loci* genetici coinvolti nella determinazione di caratteristiche di importanza commerciale e nella determinazione del tempo individuale di inversione del sesso. Sempre nel corso di questo progetto, è stata sviluppata una mappa di linkage di seconda generazione, aumentando il numero di *loci* analizzati (326 in totale) e perciò incrementando la densità della mappa stessa (2007).

### **Perché scegliere l'orata come modello sperimentale?**

- Il genoma di *S. aurata* è di piccole dimensioni, circa  $1.06 \times 10^9$  bp per cellule apoidi (circa 1.1 pg). Questo aspetto è importante per la generazione di una mappa di linkage densa (ricca di marcatori con posizione nota) necessaria per un'efficace ed economica mappatura dei QTL (\*1).
- Gli introni nei geni sono relativamente piccoli, ciò facilita gli studi relativi alla struttura dei geni. Inoltre, l'orata non presenta complessità proprie di altre specie quali la tetraploidia dei Salmonidi, che complica inevitabilmente gli studi di mappatura del genoma.
- E' stata osservata un'elevata variabilità per i *loci* microsatelliti, dovuta alla effettiva dimensione ampia della popolazione. Inoltre, in orata è possibile ottenere apolidi e doppi-aploid (mitogynogenesi); ciò permette di ottenere pannelli di *loci* efficienti e a basso costo per la costruzione di mappe di linkage.
- L'orata è una specie "filogeneticamente attraente" poiché essa appartiene all'ordine dei Perciformi, che include un largo numero di specie derivate da una radiazione esplosiva (circa 60 milioni di anni fa). In tal senso l'orata potrebbe rappresentare un organismo modello per tutte quelle specie, di interesse commerciale, che appartengono a questo importante gruppo tassonomico e contribuire significativamente a sviluppare gli obiettivi del settore dell'allevamento ittico.
- Le metodologie di coltura per la riproduzione e per l'allevamento di orata sono ben definite e si ha una buona conoscenza di base della sua biologia e della sua fisiologia riproduttiva. Essa ha una fecondità estremamente alta e delle generazioni relativamente brevi (1.5-3 anni, in dipendenza dal sesso), fattore rilevante nel programma di selezione (BRIDGE-MAP, 2001). L'orata ha un peculiare sistema di determinazione del sesso, caratteristica condivisa con numerose specie di interesse

commerciale (la maggior parte tra gli Sparidi, ma anche altri gruppi). E' infatti una specie ermafrodita sequenziale, proterandrica. Il controllo del sistema riproduttivo in acquacoltura è estremamente importante, perciò la comprensione del meccanismo di determinazione del sesso è oggetto di continui studi.

## **1.6. Il progetto europeo AQUAFIRST**

L'AQUAFIRST è un progetto europeo per il miglioramento genetici di specie ittiche di interesse commerciale. Si propone di sviluppare programmi di selezione assistita da marcatori combinando approcci di genomica strutturale e funzionale. Tra gli obiettivi in particolare vi è quello di caratterizzare geni con espressione associata alla resistenza alle patologie ed allo stress, in *Sparus aurata* (orata comune), *Dicentrarchus labrax* (branzino), *Ostrea edulis* (ostrica) e *Oncorhynchus mykiss* (trota iridea).

I principali obiettivi del progetto sono:

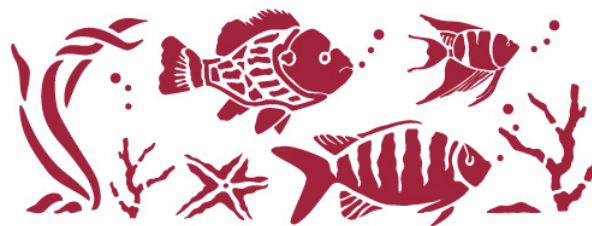
trovare le associazioni genetiche in risposta alla resistenza a stress e patogeni

selezionare geni e marcatori microsatelliti candidati all'analisi di segregazione in determinate famiglie (analisi dei QTL)

fare la mappatura di questi geni nelle mappe fisica e di linkage.







## 2. Scopo del lavoro

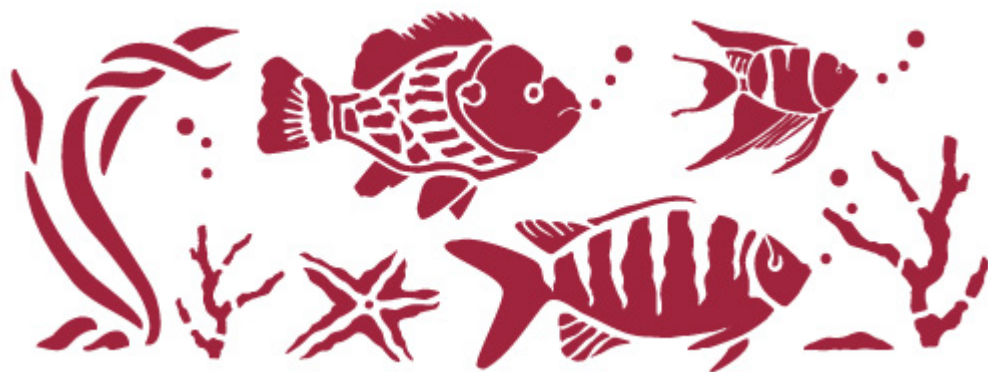
Il batterio Gram-negativo *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Phdp Vibrionaceae) è l'agente causale della pasteurellosi nei pesci. La pasteurellosi è una setticemia batterica, patologia fra le più dannose per l'acquacoltura conseguentemente all'ampia gamma di ospiti che può infettare, alla massiva mortalità, alla distribuzione geografica ubiquitaria e alla mancanza di un vaccino efficace. Negli anni passati la pasteurellosi ha causato epizootie in gran parte degli allevamenti intensivi di orata (*Sparus aurata*) con tassi di mortalità altissimi, fino al 90%, soprattutto negli stadi larvali e di avannotto.

L'obiettivo del programma di ricerca è quello di mettere a punto, in *Sparus aurata*, strumenti genomici necessari all'identificazione di *loci* genetici coinvolti nella determinazione della resistenza alla pasteurellosi ittica, nella crescita degli animali o *loci* in stretta associazione con quelli che determinano queste caratteristiche. Attraverso l'utilizzo di questi strumenti sarà possibile condurre in futuro programmi di selezione assistita da marcatori e sviluppare analisi QTL.

Il progetto di ricerca prevede innanzitutto la caratterizzazione di *loci* microsatelliti specifici per l'orata e il loro posizionamento nella mappa di associazione o linkage. Il progetto prevede anche l'ottimizzazione di un esperimento di infezione controllata (challenge) di una popolazione di avannotti di orata con un ceppo altamente virulento di *Photobacterium* (Phdp). Attraverso l'analisi di parentela e la definizione della struttura delle famiglie saranno valutate le ereditabilità della resistenza alla pasteurellosi e del carattere crescita. A tale scopo saranno utilizzati marcatori selezionati dal pannello di mappa.



### 3. Materiali e metodi



La parte sperimentale del progetto di ricerca è suddivisa essenzialmente in due parti. La prima parte comprende tutte le fasi di necessarie alla caratterizzazione di *loci* microsatelliti specifici per l'orata per la costruzione di una mappa di associazione o *linkage*. In questo modo si ottiene un pannello di marcatori polimorfici da utilizzare nella seconda parte del lavoro. La seconda parte del lavoro prevede l'ottimizzazione di un esperimento di infezione controllata (*challenge*) di una popolazione di avannotti di orata con un ceppo altamente virulento di *Photobacterium damsela* sottospecie *piscicida* (*Phdp*). Il monitoraggio della mortalità, la misura della lunghezza dei pesci deceduti e l'analisi dei *loci* microsatelliti per l'attribuzione di parentela e la definizione della struttura delle famiglie forniranno gli strumenti per lo studio dell'ereditabilità della resistenza alla pasteurellosi e del carattere crescita. La preparazione dei dati ottenuti, inoltre, costituisce la fase preliminare di una futura analisi QTL.

### **3.1 Modello sperimentale**

L'animale sperimentale utilizzato in questo lavoro è *Sparus aurata* (orata comune, ordine Perciformi, classe Teleostei, famiglia degli Sparidi). In questo lavoro sono state condotte analisi su orate allo stadio larvale, allo stadio di avannotto e orate allo stadio adulto. La fase larvale comprende pesci dai 3-4 giorni ai 50 giorni di età, la fase di avannotto pesci dai 50 giorni fino ai quattro mesi di età, mentre si considera adulto un individuo dopo i quattro mesi di vita (Alessio *et al.*, 1975).

Nei paragrafi che seguono saranno specificati per ciascuna fase del progetto: gli individui utilizzati, la loro provenienza e le modalità di campionamento.

## 3.2 Mappe di associazione o *linkage*

### 3.2.1. Animale sperimentale

La mappa è stata costruita a partire da una singola coppia di riproduttori di 3 anni, il maschio M1 (contributo in sperma) e la femmina F1 e 50 individui della prole (da 101 a 150), prelevati allo stadio larvale (a 3 giorni dalla schiusa). Entrambi i riproduttori provengono dallo Hellenic Center for Marine Research (HCMR, Creta, Grecia).

Il parco riproduttori da quale provengono M1 e F1 è per la maggior parte composto da animali selvatici catturati. La riproduzione dell'orata avviene attraverso il mass spawning, dove diverse femmine rilasciano le uova nello stesso momento e diversi maschi contribuiscono contemporaneamente con il loro sperma alla fecondazione. Per produrre il pannello di mappa da una singola coppia di genitori, sono stati prelevati dal parco riproduttori 5 maschi e 4 femmine sessualmente maturi (età 3 anni circa). Dalle 2 femmine in ovulazione sono state estratte le uova e trasferite in contenitori puliti, dove sono state miscelate con lo sperma di un maschio (M1), per ottenere 2 famiglie F1 full sib (\*1), di cui soltanto una è stata utilizzata per la costruzione della mappa. Le uova sono state quindi trasferite in incubatori. La fecondazione è avvenuta dopo 4 ore (inizio della divisione cellulare). Due giorni dopo, prima della schiusa, le uova sono state trasferite in vasche da 500 litri con il ricircolo dell'acqua marina, per l'allevamento delle larve (metodo Moretti *et al.*, 1999) fino al raggiungimento dei 3 giorni di età. A questo stadio 200 animali sono stati sacrificati usando un eccesso di anestetico (phenoxietanolo) e conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Per un campione di 50 individui scelti casualmente è stato estratto il DNA genomico (per ulteriori dettagli, APPENDICE A).

(\*1): **Famiglie full sib**: gli individui che appartengono ad una famiglia *full sib* condividono entrambi i genitori  
**Famiglie half sib**: sono costituite da individui con un solo genitore in comune

### 3.2.2. Estrazione di DNA

Il DNA genomico è stato estratto per i due riproduttori a partire da campioni di sangue intero e per 50 figli a partire da campioni di tessuto prelevato dalla pinna caudale. Per le estrazioni è stato usato il kit *DNeasy Tissue mini kit* (Qiagen, Valencia, CA) seguendo i protocolli per tessuto e sangue intero indicati dal produttore. Durante l'estrazione, ciascun campione è stato trattato con l'enzima RNasi A 10 µg/ml (Promega, 2 µl aggiunti dopo il passaggio di lisi del tessuto, 1 minuto di incubazione a temperatura ambiente). Il DNA è stato eluito con 50µl di tampone AE (incluso nel kit) preriscaldato a 70 °C. Per verificare la bontà dell'estratto una piccola aliquota della preparazione è stata analizzata mediante elettroforesi su gel d'agarosio (1%) in tampone salino TAE.

### 3.2.3. Costruzione di una libreria genomica arricchita in sequenze ripetute

Per la mappa di *linkage* di prima generazione (Franch *et al.*, 2006) sono state costruite 5 diverse librerie genomiche. Seguendo il protocollo FIASCO (Zane *et al.*, 2002) sono state preparate 3 di queste librerie. Altre due librerie arricchite in microsatelliti sono state preparate come descritto da Tsigenopoulos *et al.* (2003). Brevemente si descrivono le fasi previste dal protocollo FIASCO (Fig 3.1), mentre per i dettagli relativi alle altre 2 librerie si veda l'APPENDICE A. La costruzione di una libreria genomica arricchita di microsatelliti consta di una prima fase di frammentazione del DNA genomico, tramite una reazione di restrizione con gli enzima *MseI* per due librerie mentre per la terza è stato usato *TaqI* (*digestione*, Tab. A.1). A questa segue una fase di legazione (Tab. A.2), nella quale i frammenti, ottenuti mediante *digestione*, sono legati alle estremità all'adattatore *adMseI* e *adTaqI* rispettivamente. Grazie a questo passaggio è possibile procedere con la successiva fase di amplificazione mediante PCR (*prearricchimento*, Tab. A.3), nella quale si amplificano i frammenti di DNA genomico con un pool di primer con sequenza uguale all'adattatore e ultima base al 3'variabile (G, C, T o A). La reazione di amplificazione è condotta in fase lineare: in tal modo frammenti di DNA genomico di lunghezza diversa vengono amplificati senza alterarne eccessivamente la frequenza nella miscela. L'amplificato, purificato su colonnina e denaturato a 98°C è ibridizzato con una sonda oligonucleotidica biotinilata all'estremità 5' (*ibridazione*, Tab. A.4) Per due librerie (una digerita con *MseI* e una con *TaqI*) la sonda è (AC)<sub>17</sub> per la terza la sequenza nucleotidica è (GATA)<sub>8</sub>. La sonda si lega ai frammenti che contengono la sequenza complementare ripetuta *n* volte. In questo modo

vengono isolate quelle sequenze portanti delle ripetizioni di basi che rappresentano i nostri marcatori microsatelliti. Dopo lavaggi a bassa ed alta stringenza (FASE 5, SCHEDA A), il DNA arricchito in unità ripetute è eluito e nuovamente amplificato con i primer adattatori (*postarricchimento*, Tab. A1). Un aliquota dell'amplificato è clonata in un vettore plasmidico pGEM-T Easy, utilizzando *pGEM-T Vector System II* (Promega, Madison, WI).

Le colonie contenenti l'inserito (selezione bianco-blu per il riconoscimento delle colonie ricombinanti Sambrook *et al.*, 1989), sono state amplificate utilizzando primer universali M13rev e T7 che si appaiano alla sequenza del vettore ai lati del sito d'inserzione.

La reazione di amplificazione viene allestita aggiungendo a circa 50 ng della sospensione batterica denaturata i reagenti elencati in Tabella 3.1. ottenendo un volume finale di 10 $\mu$ l. La reazione è condotta secondo il profilo termico indicato nella stessa tabella, il termociclatore è *Primus 96 plus* (MWG AD BIOTECH).

Per ottenere la sequenza nucleotidica degli inserti clonati, 1 o 2  $\mu$ l dell'amplificato, senza ulteriori purificazioni, sono stati mandati al centro di sequenziamento *BMR Genomics* (Padova).

## ***SCHEDA A: Protocollo per la costruzione della libreria genomica***

**FASE 1. DIGESTIONE**, volume di reazione 25  $\mu$ l, incubazione 65°C, 1 ora

| <b>reagenti</b>  | <b>concentrazione finale</b> | <b>incubazione</b> |        |
|--|------------------------------|--------------------|--------|
| Buffer <i>One for all</i> (NewEngland Biolabs, UK)           | 1 X                          | 65°C               | 60 min |
| albumina di siero bovino (BSA)                               | 0.5 mM                       |                    |        |
| ditiotreitolo (DTT)  | 0.01 M                       |                    |        |
| DNA genomico   | ~ 200 ng                     |                    |        |
| Enzima <i>TaqI</i> o <i>MseI</i><br>(NewEngland Biolabs, UK) | 1.0 unità                    |                    |        |

**Tabella A.1.** Reagenti utilizzati nella reazione di digestione e loro concentrazioni finali.

**FASE 2. LIGAZIONE:** volume di reazione 25  $\mu$ l da aggiungere al prodotto digerito, incubazione 37°C, 3 ore

| <b>reagenti</b>                                    | <b>concentrazione finale</b> | <b>incubazione</b> |         |
|--|------------------------------|--------------------|---------|
| Buffer <i>One for all</i> (NewEngland Biolabs, UK) | 1 X                          | 37°C               | 180 min |
| albumina di siero bovino (BSA)                     | 0.5 mM                       |                    |         |
| ditiotreitolo (DTT)                                | 2.5 mM                       |                    |         |
| adattatori   | 1 $\mu$ M                    |                    |         |
| ATP  | 0.2 mM                       |                    |         |
| <i>T4 DNA ligase</i> (USB, Amersham-Pharmacia)     | 0.5 unità                    |                    |         |

**Tabella A.2.** Reagenti utilizzati nella reazione di ligazione e loro concentrazioni finali.



**FASE 3: PREARRICCHIMENTO** volume di reazione 20  $\mu$ l

| Reagente                               | concentrazione finale | profilo termico |              |
|--|-----------------------|-----------------|--------------|
| Buffer <i>One for all</i> (NewEngland) | 1 X                   | 1 ciclo         |              |
| MgCl <sub>2</sub>                      | 1.5 mM                |                 |              |
| Primer specifici per gli adattatori    | 1.5 mmoli ciascuno    |                 | 94°C, 45 sec |
| dNTP's                                 | 0.2 mM                | 18 cicli        | 53°C, 45 sec |
|  |                       |                 | 72°C, 1 min  |
| <i>Taq</i> DNA polimerase (Promega)    | 0.4 unità             | 1 ciclo         | 72°C, 7 min  |
| DNA: diluizione 1:10 di restrizione-   | 5 $\mu$ l             |                 |              |

**Tabella A.3.** Reagenti utilizzati nella reazione di amplificazione di pre-arricchimento e loro concentrazioni finali, profilo termico di reazione. Termociclatore *Primus 96 plus* (MWG AD BIOTECH).

**FASE 4: IBRIDAZIONE** alle sonde biotinilate, vol di reazione 100  $\mu$ l.

l'amplificato (kit *QiaQuick*, *Qiagen*; protocollo indicato dal produttore): eluizione in un volume finale di 50  $\mu$ l di tampone di eluizione (EB). Valutazione della qualità del purificato in gel di agarosio.

| Reagente                    | concentrazione finale | profilo termico |             |
|-----------------------------|-----------------------|-----------------|-------------|
| DNA purificato (*)          | 200-400 ng            | denaturazione   | 98°C, 2min  |
| sonda biotinilata in '5     | 50-80 pmoli           |                 |             |
| SSC                         | 6 X                   | ibridazione     | 50°C, 30min |
| sodio dodecil solfato (SDS) | 0,1%                  |                 |             |

**Tabella A.4.** Reagenti utilizzati nella reazione di ibridazione con la sonda biotinilata.

**FASE 5: SELEZIONE del DNA ibridato con le sonde:**

Al prodotto di ibridazione (circa 10 µg di DNA eterologo), ottenuto con la reazione precedente, si aggiungono per un volume finale di 450 µl.:

|                    |        |
|--------------------|--------|
| sferule magnetiche | 0.1 mg |
| TEN 100            | 66 X   |

**Purificazione con:**

3 lavaggi con 400 µl di TEN 100, quindi 2 min a temperatura ambiente.

3 lavaggi con SSC 0,2 X e SDS 0,1% preriscaldato a 40°C, quindi 2 minuti a 40°C.

Una prima eluizione è stata fatta con 50 µl di TE (pH 7,5) a 98°C per 5 min, mentre la seconda in 12 µl di NaOH 0,1 N per 5 min, a cui sono stati aggiunti 9 µl di acido acetico (0,166 M) e 30 µl di TE (pH 7,5).

**Separazione del DNA contenente il microsatellite dal complesso sonda-beads:**

1 a Denaturazione: 95°C per 5' con 50 µl di TE 10:1 a pH 8 (il sovrinatante contenente il DNA d'interesse è stato velocemente rimosso e conservato);

2 a Denaturazione: il pellet della prima denaturazione è stato incubato 5' a temperatura ambiente con 20ul di TE 10:1, 8 µl di una soluzione a pH 7 costituita da NaOH 0,15 M e acido acetico 0,166 M.

Precipitazione del DNA con etanolo 85%, risospensione in 50µl di acqua

**FASE 6. POSTARRICCHIMENTO:** *amplificazione con PCR secondo le condizioni della Tab.A.3.*

---

### 3.2.6. Ricerche di similarità

I genomi di *T. nigroviridis* (versione 7.0), *T. rubripes* (versione 4.0) e zebrafish (versione Zv6) sono disponibili in rete (APPENDICE A). Utilizzando le impostazioni predefinite sono state eseguite ricerche locali di BLAST e FASTA usando sequenze individuali dei cloni di orata ottenuti. Le regioni ripetute sono state mascherate.

Il valore  $e < 10^{-5}$  è considerato significativo solo quando la stessa sequenza di orata mostra similarità sia con il genoma di Tetraodon sia con il genoma di Fugu. Il valore  $e < 10^{-10}$  è stato considerato sempre significativo.

### 3.2.7. Mappa di *linkage* di seconda generazione

La mappa di *linkage* è un'evoluzione della mappa di Franch e collaboratori (2006), ottenuta aggiungendo nuovi marcatori microsatelliti isolati dalla libreria *TaqI* (AC)<sub>17</sub> con le modalità descritte nel paragrafo 3.2. Le sequenze genomiche della libreria *TaqI* sono state usate per disegnare i primer per l'amplificazione dei *loci* microsatelliti. Si selezionano in seguito i *loci* polimorfici su due genitori e su due figli presi in maniera casuale.

### 3.3. Studio di una popolazione trattata con patogeno

Gli individui di orata sono stati forniti dall'allevamento Valle Cà Zuliani di Monfalcone (GO), nostro collaboratore.

Le fasi sperimentali di questa fase del progetto sono:

- infezione controllata (*challenge*) con il patogeno *Photobacterium damsela* subspecie *piscicida* (*Phdp*) di una popolazione di avannotti e monitoraggio della mortalità
- costruzione di mappe di *linkage*
- estrazione ed analisi del DNA degli avannotti e dei riproduttori putativi che li hanno generati con marcatori molecolari microsatelliti, allo scopo di attribuire a ciascun individuo un profilo genotipico ed definire i rapporti di parentela.

A partire dal marzo 2005 sono state effettuate quattro infezioni sperimentali.

Sono stati campionati: 2267 avannotti per il primo *challenge* (peso medio 0,5g); 1500 per il secondo (peso medio 0,5g); 506 per il terzo (peso medio 0,5g); 3577 per il quarto (peso medio 0,5g).

Agli individui del *challenge* 4 è stato prelevato un frammento di pinna caudale e un frammento di muscolo scheletrico conservato in etanolo. Per ciascun *challenge*, da 30 animali scelti in modo casuale sono stati prelevati milza, fegato e rene cefalico.

Gli animali adulti sono in totale 256, provengono da quattro distinte vasche dell'allevamento alle Ca' Zuliani (ATLA5A, ATLA5B, CAZU1, CAZU2). Per questi individui adulti sono stati raccolti e conservati in etanolo frammenti di tessuto dalla pinna caudale.

#### 3.3.1 Infezione sperimentale: *challenge*

Sulle popolazioni di avannotti di orata sono state effettuate le quattro infezioni sperimentali (*challenge* 1, 2, 3 e 4) con il patogeno *Phdp*, ceppo 249/Ittio99, (Zappulli *et al.*, 2005). In questo paragrafo viene descritto il protocollo comune ai 4 *challenge*.

Le uova fecondate, originate dal parco riproduttori sono state trasferite in vasche dedicate, dove hanno raggiunto lo stadio di larva attraverso la metamorfosi. Gli avannotti prodotti sono stati raccolti al raggiungimento di un peso di circa 0.3-0.5g. e sono stati successivamente trasportati presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Qui sono stati equamente suddivisi in due vasche (vasca A e vasca B) da 800 litri ciascuna con il ricircolo dell'acqua marina (**salinità 35‰, temperatura controllata 19°C**).

Dopo 5-10 giorni di acclimatazione (\*2), le orate sono state infettate con il patogeno *Phdp* mediante immersione in vasche più piccole (50 litri di acqua marina), quindi sono state reintrodotte nelle vasche A e B. Il titolo di patogeno e il tempo di esposizione, pari a  $6 \times 10^6$  CFU per 1 ora per il *challenge* 1, sono stati ridotti a  $1 \times 10^6$  CFU per 30 minuti nei *challenge* successivi. La mortalità è stata monitorata due volte al dì per 20 giorni dopo il *challenge*.

**\*2: Acclimatazione:** periodo necessario affinché la popolazione in esame superi lo stress dovuto al trasporto e al trasferimento in un nuovo ambiente. Si considera concluso nel momento in cui la mortalità dovuta a tale stress scende a zero.

### 3.3.2. Archiviazione campioni in piastre da 96

Tutti gli avannotti, una volta deceduti, sono stati fotografati in griglie graduate da 96 campioni e conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Fig. 3.3). L'ordine interno di queste griglie rispecchia l'ordine interno delle piastre di campioni estratte con il protocollo 3.3.3.b. Le fotografie digitali degli individui del *Challenge* 4 sono state utilizzate per valutare le dimensioni di ciascun pesce: precisamente, è stata misurata la lunghezza del corpo capo-forca caudale (espressa in mm) utilizzando uno specifico software **tpsDig ver. 1** disponibile liberamente al sito: <http://life.bio.sunysb.edu/ee/rohlf/software.html>.

L'identificativo di ogni pesce è costituito nella seguente modalità:

#### a) per gli avannotti

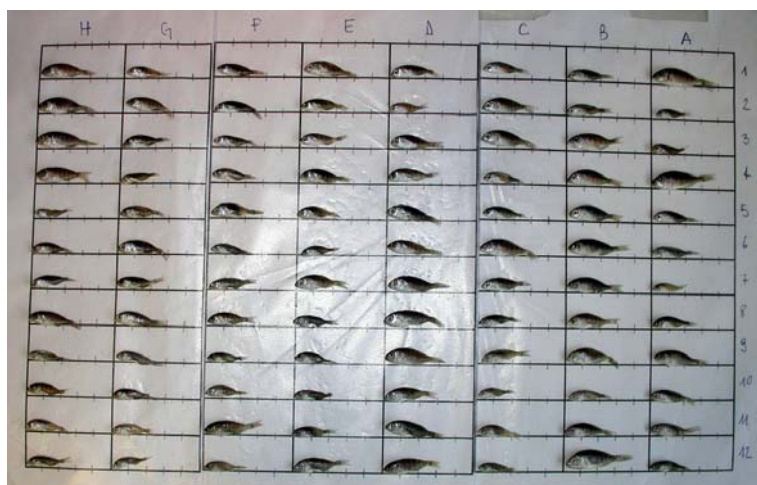
SaXXYY

Dove Sa sta per *Sparus aurata*, XX è il numero di griglia/piastra di estrazione, mentre YY corrisponde alla sua posizione nella piastra da 96 pozzetti. Ad esempio, il nome dell'avannotto in posizione G2 nella prima piastra di estrazione è Sa01G02. Questo metodo di archiviazione e nomenclatura permette di risalire univocamente alla data di morte del pesce.

**b) per i riproduttori:**

nome vasca di origine + numero identificativo del pesce  
 (2-4 caratteri) (da 1 a 256)

I riproduttori sono stati univocamente identificati mediante con il metodo del *PIT*-tag: ciascun individuo viene “etichettato” con l’introduzione di un *microchip* sottopelle .



**Figura 3.3.** Esempio di griglia usata per le fotografie e per l’archiviazione.

**3.3.3. Estrazione di DNA**

Sono state seguiti due protocolli per l’estrazione del DNA:

- a. durante la fase di ottimizzazione delle condizioni sperimentali (*challenge* 1, 2, 3) e nelle fasi immediatamente successive all’infezione sperimentale (allo scopo di ottenere template per la diagnosi molecolare di morte per pasteurellosi) si è proceduto all’estrazione processando un animale alla volta (protocollo per singolo campione)
- b. per l’assegnazione di paternità l’estrazione è stata effettuata processando 96 campioni contemporaneamente (protocollo per 96 campioni). Questo protocollo rende più uniformi le prime fasi dell’esperimento e riduce il tempo di lavoro. Con questa modalità è stato estratto il DNA genomico da 257 riproduttori e da 1735 avannotti del *challenge* 4.

#### **a. Protocollo per singolo campione**

Il DNA è stato estratto da frammenti di tessuto di pinna caudale utilizzando un collaudato kit di estrazione (*Invisorb Spin Tissue Mini Kit®*, Invitex). Si tratta di un kit su colonna ottimizzato per l'estrazione di DNA da piccole quantità di tessuto. Durante le operazioni di dissezione si è proceduto al lavaggio di tutta la strumentazione con acqua deionizzata (ddH<sub>2</sub>O) e alcool nel passaggio da un animale all'altro, per evitare le cross-contaminazioni. Il protocollo seguito corrisponde al *Protocol 1:DNA Extraction from 0.5-40 mg tissue and rodent tail* (Invitex, Vers.06.04). Per ogni individuo sono stati prelevati **5-10 mg di tessuto**. I campioni sono stati trattati con l'enzima **RNAase A** (40 µl, 10 mg/ml; incubazione 5 minuti a temperatura ambiente). Il DNA è stato eluito in 100 µl di tampone di **eluizione** pre-riscaldato a 70°C. L'estrazione è stata controllata su gel di agarosio 1% in tampone salino TAE. La quantità di DNA estratto è stimata mediante il marcatore 1Kb (*Invitrogen*). La concentrazione dei DNA estratti è stata normalizzata a 1 µg/ml mediante diluizione in ddH<sub>2</sub>O. Gli estratti sono stati conservati poi a -20 °C.

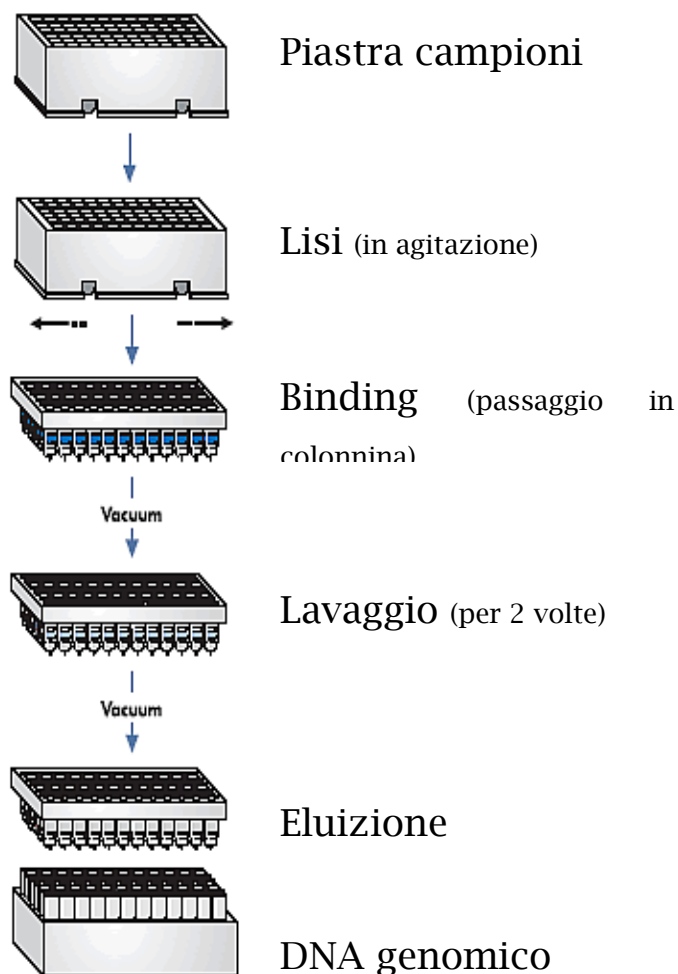
### **b. Protocollo per l'estrazione da 96 campioni con pompa a vuoto**

Nel caso dell'estrazione da 96 campioni il kit utilizzato è Invisorb® DNA Universal Clinical HTS 96 Kit (Invitex) che prevede l'estrazione di DNA genomico da 96 campioni contemporaneamente partendo da un frammento di pinna caudale (5-10mg). Come nel caso dell'estrazione singola, si procede al lavaggio degli strumenti di dissezione durante ogni operazione per evitare qualsiasi possibilità di cross-contaminazione tra individui.

La procedura di estrazione prevede un passaggio di **normalizzazione**: raccolta dei tessuti in piastre da 96 pozzetti (Deep-Well, 1,5ml, Sarstedt) con 200uL di acqua ddH<sub>2</sub>O (Fig 3.4). In seguito si aggiunge il tampone di **lisi** (280uL includendo la Proteinasi K, 20mg/ml, Invisorb) e si lascia in agitazione (**termomixer**) per circa un ora a 56°. Quando i tessuti sono completamente lisati si aggiunge il tampone di **Binding** e si trasferiscono le miscele in colonnine in piastre da 96 pozzetti. Questo passaggio di trasferimento richiede molta attenzione per evitare possibili contaminazioni. Si applica una pressione a vuoto (150mm/Hg) per 5 min e si elimina l'eluato. Si procede con 2 **lavaggi** del DNA adeso alla membrana della colonnina e successivo passaggio di **eluizione** del DNA genomico con 100uL di tampone di eluizione preriscaldato a 70 °C. Una piccola aliquota della preparazione viene analizzata mediante elettroforesi su gel d'agarosio (1%) in tampone salino TAE. La quantità di template è stimata mediante il marcatore 1Kb (Invitrogen). La concentrazione dei DNA estratti è stata normalizzata a 1 µg/ml mediante diluizione in ddH<sub>2</sub>O.

Gli estratti sono stati conservati poi a -20 °C.





**Fig 3.4.** Schema dell'estrazione del DNA genomico con kit da 96campioni. Viene utilizzata una pompa a vuoto per ottenere una pressione di 150mm/Hg o superiore. La dicitura "vaccum" indica le fasi in cui è impiegato il vuoto.

### 3.3.4. Diagnosi di morte per pasteurellosi

La diagnosi di pasteurellosi come causa di morte è stata valutata mediante esami istologici del rene cefalico, della milza e del fegato e confermata tramite analisi di PCR RFLP (Zappulli *et al.*, 2005) su tessuti interni (mix 20  $\mu$ l totali, template 5  $\mu$ l DNA 100 ng/  $\mu$ l). Il DNA utilizzato nelle amplificazioni è stato estratto con la metodica descritta al paragrafo 3.3.3.a di questo capitolo.

### **3.4. Attribuzione di paternità**

#### **3.4.1. Selezione del set di *loci* microsatelliti N01**

Per l'analisi di paternità è stato assemblato un set di 9 *loci* microsatelliti (nonetto N01, Tab. 3.4) selezionati tra più di 200 *loci* disponibili specifici per l'orata (Franch *et al.*, 2006).

Per l'amplificazione di N01 sono state inizialmente messe a punto PCR per singoli *loci*. Successivamente sono state ottimizzate PCR multiple per ottenere l'amplificazione simultanea di 2 *loci* (duplex), 3 (triplex), 4 (quadruplex), 5 (quintuplex), 9 (nonaplex). La visualizzazione dei prodotti di amplificazione viene effettuata mediante corsa elettroforetica, dove è possibile distinguere ampliconi di taglia differente (dimensione in bp). Il primer forward di ciascun *locus* è marcato con un fluoroforo (6-FAM, HEX o TAMRA). Combinando taglia dell'amplificato e fluorocromo legato al primer forward è possibile analizzare fino a nove *loci* microsatelliti contemporaneamente.

#### **3.4.2. Amplificazione del set di *loci* microsatelliti N01**

L'amplificazione del set di marcatori N01 ha richiesto l'allestimento di tre separate PCR multiple:

1. CId03, Fd78, Dd16 (PCR triplex)
2. EId05, Bd61 (PCR duplex)
3. Ad54, Bd14, Dd41, Bd86 (PCR quadruplex)

| NOME  | Unità ripetuta                           | SEQUENZA  | T <sub>M</sub> | fluorocromo | DIM. (bp) |
|-------|--|---|----------------|-------------|-----------|
| EId05 | (GT) <sub>15</sub>                       | F: TGAGCAGTCTTTGAGCTCTCC<br>R: GCCATAGAGCAGGACTGGAC   | 54             | FAM         | 159       |
| Fd78  | (GT) <sub>19</sub>                       | F: TGCTCAGAGAAAGTTCAGCAG<br>R: GACAAGGGGACAGAGGTGAG   | 54             | HEX         | 107       |
| Dd16  | (CA) <sub>15</sub>                       | F: CACATTTAGGGCACCATATCC<br>R: GGGATCTCTCTGTCTGTCTGG  | 54             | TAMRA       | 92        |
| Bd61  | (TG) <sub>13</sub>                       | F: GATTGGATGGGAGGACTGAA<br>R: CGTGTTACATGCACAAACAT    | 54             | HEX         | 155       |
| Bd86  | (CA) <sub>15</sub>                       | F: GACTCACTGGGATCAGGAAA<br>R: CGTCGGTGATCTGGAGTGTT    | 54             | TAMRA       | 173       |
| Dd41  | (GT) <sub>16</sub>                       | F: ATGGCCCTGTGTGTGTCTAGA<br>R: GCTGAAGCTCGCCTTATGAC   | 54             | TAMRA       | 206       |
| Ad54  | (TG) <sub>16</sub>                       | F: AGCCACTTAGGTGCATTCAA<br>R: TTGTACACAGTGTGCCAGAAATA | 54             | FAM         | 227       |
| Bd14  | (GT) <sub>16</sub>                       | F: TGCAGTGTCAAGGAAAACCA<br>R: GCCATTATCAATCACTAACATGC | 54             | HEX         | 237       |
| CId03 | (AC) <sub>8</sub><br>AA(AC) <sub>7</sub> | F: CGTTCATGGATGATGACTCAG<br>R: TGAGCTCATGGCTAACTGTG   | 54             | FAM         | 101       |

**Tabella 3.4.** NOME: nome della coppia di primer; **unità ripetuta**: seq. e numero di ripetizioni del modulo costituente il microsatellite; **SEQUENZA**: s. di primer forward (F) e reverse (R); **T<sub>M</sub>**: temperatura di melting; **fluorocromo** legato al primer F; **DIM (BP)**: dimensioni dell'amplificato.

La miscela di amplificazione, in un volume totale di 20 µl, è stata preparata con i reagenti elencati in tabella 3.5.(A). La reazione è stata fatta procedere secondo il profilo termico I indicato nella stessa tabella (B):

| (A)                          |                       |
|------------------------------|-----------------------|
| <i>reagente</i>              | <i>concentrazione</i> |
| Colorless GoTaq Flexi Buffer | 5X                    |
| MgCl <sub>2</sub>            | 1 mM                  |
| Primer_mix (FOR+REV)_1       | 0,3 picomoli(*)       |
| Primer_mix (FOR+REV)_2       | 0,3 picomoli(*)       |
| Primer_mix (FOR+REV)_3       | 0,3 picomoli(*)       |
| dNTP's                       | 0,07 mM each          |
| GoTaq Flexi                  | 0,8 unità/μl          |
| DNA genomico                 | 5-10 ng               |
| H <sub>2</sub> O             | fino a 20 μl          |

| (B)                    |                 |                 |
|------------------------|-----------------|-----------------|
| <i>profilo termico</i> | <i>I:54°C</i>   | <i>II: 58°C</i> |
| 1 ciclo                | 94°C per 2 min  | 94°C per 2 min  |
| 30 cicli               | 94°C per 50 sec | 94°C per 50 sec |
|                        | 54°C per 40 sec | 58°C per 40 sec |
|                        | 72°C per 40 sec | 72°C per 40 sec |
| 1 ciclo                | 72°C per 5 min  | 72°C per 5 min  |

**Tabella 3.5.** (A) Reagenti utilizzati nella reazione di amplificazione mediante PCR, esempio di PCR triplex con 3 coppie di primer fluorescenti e relative concentrazioni finali; (B) Profilo termico della reazione di amplificazione.

(\*) La quantità si riferisce alla somma dei primer FOR+REV. La primer\_mix ha concentrazione 10μM di ciascun primer.

Tutti i prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica in un gel di agarosio all'1,8%, visualizzati con Etidio Bromuro (in alternativa *SYBR Safe* 10000X in DMSO, *Invirtogen*) attraverso un transilluminatore. Le immagini fotografiche sono ottenute con *Image Master VDS*, *Fujifilm Thermal Imaging System FTI 500*.

### **3.5. Preparazione ad un'analisi QTL: analisi attraverso *loci* microsatelliti**

Sono state allestite reazioni di amplificazione per l'analisi di ulteriori *loci* microsatelliti diversi da N01. La selezione dei *loci* microsatelliti è stata effettuata a partire da 196 *loci* con posizione nota sulla mappa di *linkage* (Franch *et al.*, 2006) e/o su quella di "ibridi di radiazione", RH (Sarropoulou *et al.*, 2007)

Le amplificazioni sono state messe a punto come PCR multiple *quadruplex* e *quintuplex*, per ottenere alla fine 10 set di 9 *loci* microsatelliti da assemblare (N02-N11).

La miscela di amplificazione, con volume totale di 20  $\mu$ l, è stata preparata con i reagenti elencati in tabella 3.6.(A). La reazione è stata fatta procedere secondo il profilo termico I indicato nella tabella 3.5.(B):

| (A)                          |                       |
|------------------------------|-----------------------|
| reagente                     | concentrazione finale |
| Colorless GoTaq Flexi Buffer | 5X                    |
| MgCl <sub>2</sub>            | 1 mM                  |
| Primer_mix (FOR+REV)_1       | 0,25 picomoli (*)     |
| Primer_mix (FOR+REV)_2       | 0,25 picomoli(*)      |
| Primer_mix (FOR+REV)_3       | 0,25 picomoli(*)      |
| Primer_mix (FOR+REV)_4       | 0,25 picomoli(*)      |
| Primer_mix (FOR+REV)_5       | 0,25 picomoli(*)      |
| dNTP's                       | 0,07 mM each          |
| GoTaq Flexi                  | 0,8 unità/μl          |
| DNA genomico                 | 5-10 ng               |
| H <sub>2</sub> O             | fino a 20 μl          |

**Tabella 3.6.** (A) Reagenti utilizzati nella reazione di amplificazione mediante PCR, esempio di PCR quintuplex con 5 coppie di primer fluorescenti e relative concentrazioni finali;  
 (\*)La quantità si riferisce alla somma dei primer FOR+REV. La primer\_mix ha concentrazione 10μM di ciascun primer.

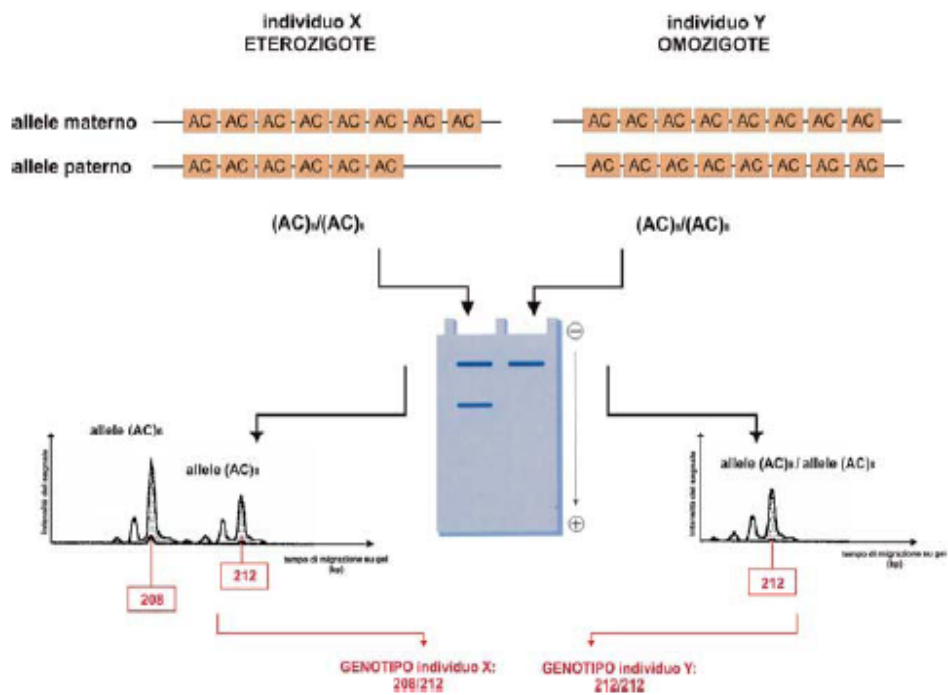
### 3.6. Corsa elettroforetica di frammenti

10 ng del prodotto di ogni amplificazione sono stati miscelati a formare un set di 9 *loci* microsatelliti diversi per lunghezza del frammento e fluorocromo, quindi liofilizzati a 65°C. Sono stati successivamente inviati al *BMR Genomics* (<http://www.bmr-genomics.it>; Padova) e fatti analizzare al sequenziatore automatico *ABI 3730xl Applied Biosystem DNA sequencer*.

### **3.7. Valutazione del polimorfismo dei marcatori microsatelliti (*Genotyper*)**

Le dimensioni degli alleli di tutti i *loci* considerati in questo lavoro sono state valutate analizzando i cromatogrammi inviati dal *BMR Genomics*. L'analisi è stata condotta con il programma *Genotyper* versione 3.7 (*Applied Biosystem*). Il programma permette di esaminare i profili dei microsatelliti per ogni marcatore fluoroforo. Ciascun profilo viene individuato partendo dal presupposto che l'amplificato relativo ad un *locus* può essere visualizzato in un grafico avente per ascissa il tempo di migrazione su gel e per ordinata l'intensità del prodotto amplificato.

Per ogni campione è stato possibile separare i frammenti amplificati per fluoroforo e dimensionare gli alleli di ogni *locus* microsatellite. A ciascun fluoroforo è associato un differente colore nella visualizzazione: FAM blu, HEX verde, TAMRA nero. Il dimensionamento dei singoli alleli avviene per confronto con uno *standard* interno (GS 400 Hd ROX): per ogni capillare, unitamente agli amplificati da analizzare, viene caricato uno standard di peso molecolare noto, formato da un insieme di frammenti di dimensione conosciuta (compresa tra 50 e 500 bp) marcati con il fluoroforo ROX. L'analisi dell'intensità di ogni picco allelico e la dimensione in paia di basi dell'amplificato ha permesso di ricavare il genotipo per ogni individuo.



**Figura 3.5.** Dimensionamento dei picchi allelici



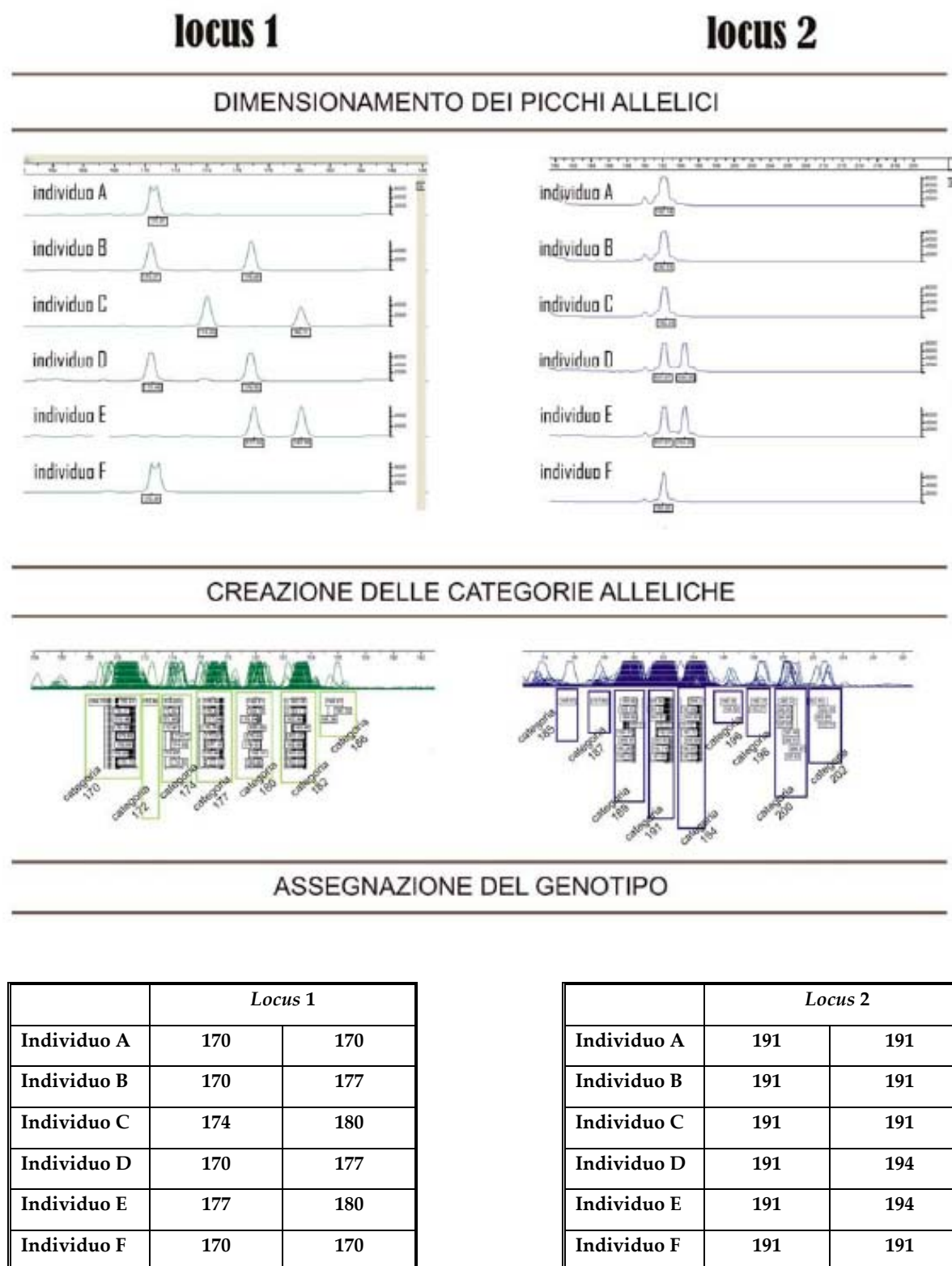


Figura 3.6. Analisi con *Genotyper* di ciascun locus microsatellite per ciascun individuo.

### 3.8. Programmi per l'assegnazione di paternità

I dati genotipici riguardanti la popolazione sperimentale e i potenziali genitori sono stati analizzati con due diversi programmi per l'attribuzione di parentela:

- a) **PAPA** versione 2.0 (Duchesne *et al.*, 2002)
- b) **CERVUS** versione 3.0 (Kalinowski *et al.*, 2007)

#### 3.8.a. PAPA

Disponibile al sito: [http://www2.bio.ulaval.ca/louisbernatchez/downloads\\_fr.htm](http://www2.bio.ulaval.ca/louisbernatchez/downloads_fr.htm), è un programma per l'assegnazione di paternità che include un simulatore in grado di valutare statisticamente l'accuratezza del metodo di assegnazione. Il metodo di assegnazione è basato sulla probabilità di una coppia di riproduttori di riprodurre il genotipo *multilocus* trovato nel figlio analizzato. Questa probabilità è definita *breeding likelihood*. La procedura di assegnazione tiene conto di possibili errori nel valutare la trasmissione allelica dovuti a errori nel genotyping o a mutazioni. E' possibile inoltre effettuare delle simulazioni prima di utilizzare i dati reali relativi ai riproduttori allo scopo di stabilire il numero minimo di *loci* necessario all'attribuzione di parentela. Per eseguire il programma con i dati reali (riproduttori-figli) è necessario, come input, indicare il numero di *loci* utilizzati per l'assegnazione. Per l'attribuzione di paternità, in questo lavoro, sono stati considerati 7 *loci* più tutte le combinazioni di 6 *loci* ottenute eliminando di volta in volta uno dei 7 *loci* iniziali

#### 3.8.b. CERVUS

Disponibile al sito: [http://www.fieldgenetics.com/pages/aboutCervus\\_Overview.jsp](http://www.fieldgenetics.com/pages/aboutCervus_Overview.jsp). Cervus effettua un'analisi di parentela basato sul metodo della *maximun likelihood*. Nell'attribuzione di parentela CERVUS testa la confidenza di ogni discendenza usando i risultati di un'analisi simulata, prendendo in considerazione eventuali errori nell'assegnazione. Una falsa esclusione di un genitore dall'attribuzione può essere dovuta alla contaminazione, alla scomparsa di alleli, alle *stutter band* dei microsatelliti, ad alleli nulli o a errore umano. I parametri utilizzati per l'implementazione del programma in questo caso sono i seguenti: simulazione di analisi di discendenza; sessi sconosciuti; numero di discendenti 10000; numero di genitori candidati 2; proporzione di genitori candidati campionati 1; numero di coppie di genitori 1; proporzione di *loci* tipizzati 0,9570089; proporzione di *loci* mal tipizzati

0,01; tasso di errore nel calcolo delle probabilità 0,01; minimo numero di *loci* tipizzati 4; confidenza determinata usando LOD; *relaxed confidence level* 80%; *strict confidence level* 95%.

### **3.9. Programmi per il calcolo dell'ereditabilità dei caratteri**

Il calcolo dell'**ereditabilità dei caratteri** resistenza al patogeno e lunghezza del corpo dell'avannotto sono stati inviati presso il Roslin Institute (Division of Genetics and Genomics, Roslin, UK) e rielaborati.

I dati grezzi comprendono:

identità dell'avannotto

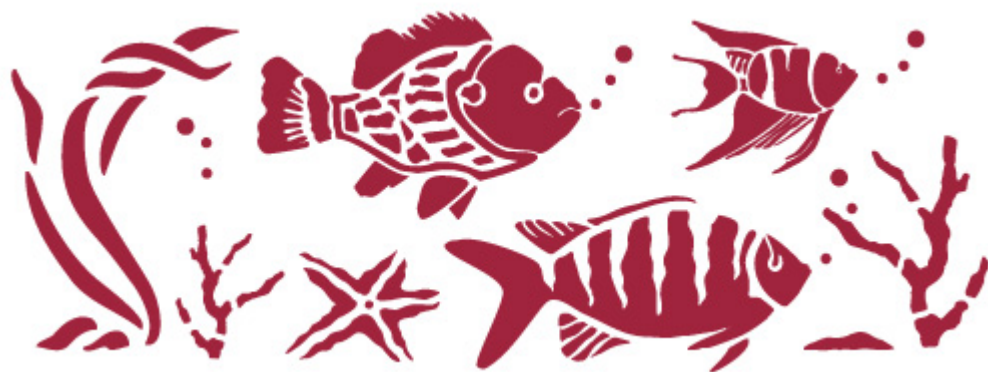
identità dei 2 genitori

lunghezza capo-forca caudale espressa in millimetri

giorno della morte dopo il challenge.



## 4. Risultati



L'obiettivo del programma di ricerca è quello di mettere a punto, per *Sparus aurata*, strumenti genomici necessari all'identificazione di *loci* genetici coinvolti nella determinazione della resistenza alla *pasteurellosi* ittica, nella crescita degli animali o *loci* in stretta associazione con quelli che determinano queste caratteristiche.

Si riassumono di seguito le fasi dello studio:

- 1- Costruzione per *S. aurata* di una mappa di *linkage* di prima generazione e costruzione di una mappa di seconda generazione (numero di *loci* maggiore) allo scopo di rendere disponibile per le successive analisi un pannello di marcatori microsatelliti con posizione nota.
- 2- Infezione sperimentale di una popolazione di avannotti (circa 3000-4000 individui) con un ceppo altamente virulento di *Photobacterium damsela* sottospecie *piscicida* (*Phdp*). Monitoraggio della mortalità, misurazione della lunghezza e archiviazione degli individui deceduti per le successive analisi.
- 3- Analisi di paternità sulla popolazione sperimentale: selezione di *loci* microsatelliti posizionati sulla mappa di *linkage*, analisi dei *loci* sulla popolazione sperimentale e sui riproduttori.
- 4- Calcolo dei coefficienti di ereditabilità per i caratteri "resistenza alla pasteurellosi", definito come tempo di sopravvivenza dal giorno dell'infezione, e "dimensione dell'avannotto" sulla popolazione sperimentale.
- 5- Ricostruzione della struttura delle famiglie all'interno della popolazione sperimentale
- 6- Analisi di 5 famiglie da 100 individui ciascuna per un eventuale analisi **QTL** (**Quantitative Trait Loci**) con la quale valutare le possibili associazioni *loci* genetici crescita e tempo di sopravvivenza.

## 4.1. Mappe di *linkage*

Molte specie marine allevate possiedono delle peculiari caratteristiche (modalità di riproduzione, tempo di generazione e origine del parco riproduttori) che rendono estremamente utile l'utilizzo di marcatori molecolari nei programmi di selezione. Per *S. aurata* la riproduzione avviene attraverso il *mass spawning*, dove diverse femmine rilasciano le uova nello stesso momento e diversi maschi contribuiscono contemporaneamente con il loro sperma alla fecondazione. E' perciò impossibile selezionare a posteriori la progenie di una singola coppia di riproduttori senza l'aiuto di strumenti di genetica molecolare.

La costruzione di mappe di *linkage* è il primo passo verso la selezione assistita da marcatori. In una mappa di *linkage* i marcatori molecolari vengono ordinati in gruppi di associazione o *linkage* (LG, che dovrebbero corrispondere ai cromosomi) valutandone la frequenza di ricombinazione. La distanza fra i due marcatori è direttamente proporzionale alla frequenza di ricombinazione. Una mappa di *linkage* è uno strumento molto utile per l'analisi QTL e per la selezione di quei caratteri con bassa ereditabilità come la resistenza al patogeno.

### 4.1.1. Mappa genetica di *linkage* di prima generazione del pesce teleosteo ermafrodita *Sparus aurata* (Franch *et al.*, 2006)

Una mappa genetica di *linkage* di prima generazione è stata costruita utilizzando un pannello di 204 *loci* microsatelliti specifici per *S. aurata*. La mappa è stata costruita a partire da una singola coppia di riproduttori, il maschio M1 (contributo in sperma) e la femmina F1 e 50 individui della prole (Par. 3.2.1, Materiali e metodi).

#### Marcatori microsatelliti specifici per l'*orata*

Dei 204 *loci* del pannello di mappa, 171 sono stati ottenuti dalla costruzione di 5 diverse librerie genomiche arricchite in unità ripetute (Par 3.2, Materiali e metodi) Un totale di 1199 cloni sono stati sequenziati con successo. Di questi 593 contengono una regione ripetuta con un numero di basi maggiore di 18 e regioni fiancheggianti sufficientemente lunghe per il disegno di primer. Il limite di 18 bp è stato scelto dopo una analisi preliminare fatta su 50 *loci* candidati. Questa analisi ha mostrato che i *loci* microsatelliti con una regione

ripetuta inferiore ai 9 dinucleotidi sono monomorfici, mentre il 70% dei *loci* con una regione ripetuta più lunga è polimorfico. I 204 marcatori polimorfici sono stati distinti per taglia dell'amplificato e fluorocromo associato al primer *forward*, quindi sono stati organizzati in gruppi di 9 *loci* analizzabili nella stessa corsa elettroforetica.

Il polimorfismo di 48 *loci* selezionati in modo casuale, è stato valutato per un vasto numero di individui. mediante l'analisi dei cromatogrammi forniti dal *BMR Genomics*, usando il programma *Genotyper*. L'eterozigosità media osservata è pari a 0.69, il numero medio di alleli è di 11.2.

Un campione di 15 *loci* microsatelliti è stato testato su altre 6 specie di sparidi marini per verificare che siano amplificabili in specie diverse da *Sparus aurata*. La percentuale di amplificazione è stata molto alta, 13 *loci* su 15 cross-amplificano in almeno una delle 6 specie analizzate (vedi Tab. 1, APPENDICE A). Questo indica che una buona proporzione dei marcatori sviluppati per l'orata possono essere usati nelle analisi genetiche in altre specie.

### **Mappa di associazione o linkage**

Per 198 *loci* su 204 è stato individuato un valore di *linkage* significativo. Soltanto 6 *loci* non sono stati associati ad alcun gruppo. In totale sono stati caratterizzati 26 gruppi di *linkage* con un numero di marcatori per gruppo che varia da 2 (LG22) a 17 (LG3). (Fig. 1, APPENDICE A). La lunghezza media della mappa di *linkage* è 1241.9 cM. I gruppi di *linkage* di dimensioni maggiori sono LG3 (127.4 cM) e LG17 (129.5 cM). In totale 154 marcatori sono geneticamente distinti, ovvero non occupano la stessa posizione nella mappa, la distanza fra marcatori geneticamente distinti varia da 0.4 a 64.6 cM.

| Distanza fra marcatori<br>microsatelliti | Percentuale del numero di<br><i>loci</i> |
|--|--|
| <5cM                                     | 48%                                      |
| >5cM; <10cM                              | 23%                                      |
| >10cM; <20cM                             | 17%                                      |
| >20cM                                    | 12%                                      |

**Tabella 4.1.** Distanze fra marcatori microsatelliti nella mappa di *linkage* e relative percentuali di presenza.



E' stata osservata una differenza fra mappa di *linkage* del maschio M1 e della femmina F1 (misurano 1170.5 e 1451.5 cM rispettivamente), con un rapporto maschi:femmina di 1:1.24. Differenze in lunghezza fra mappe di maschio e femmina sono state osservate specialmente in alcuni gruppi di *linkage* (LG3, LG6, LG7, LG9, LG12, LG20, LG25).

### **Confronto fra Mappa di *linkage* e Mappa RH**

La mappa di *linkage* è stata confrontata con una mappa di ibridi di radiazione o mappa RH (Senger *et al.* 2006). La mappa RH è basata su un pannello di 440 marcatori che includono 121 *loci* microsatelliti già posizionati nella mappa di *linkage* (Franch *et al.*, 2006, APPENDICE A). I gruppi RH individuati sono 28.

Il confronto tra le due mappe rivela una buona concordanza, infatti tutti i marcatori localizzati in un singolo LG si trovano in un singolo gruppo RH (Tab.2, APPENDICE A). Soltanto due marcatori, Ad75 in LG9 e CId31 in LG23, sono posizionati in un gruppo RH diverso rispetto ai marcatori dei LG di appartenenza. Entrambi sono localizzati su RH25. Per 13 gruppi di *linkage* (LG1, LG4, LG5, LG10, LG13, LG16, LG17, LG18, LG20, LG21, LG22, LG25, LG26) lo stesso ordine dei marcatori si ritrova anche nel gruppo RH corrispondente. Per 6 gruppi di *linkage* (LG2, LG6, LG11, LG14, LG19, LG23) un singolo marcatore si trova in una posizione diversa rispetto a quanto osservato nel gruppo RH corrispondente. Per i restanti 7 gruppi di *linkage* più di un *locus* ha una posizione non congrua tra le due mappe.

### **Confronto fra Mappa di *linkage* di orata e genoma di *Tetraodon nigroviridis***

Ricerche di similarità di sequenza confrontando i *loci* specifici per *S. aurata* con il genoma di *Tetraodon nigroviridis* (pesce palla) rivelano una percentuale relativamente alta di regioni conservate evolutivamente (ECR) tra le due specie. Il 30% (62/204) dei marcatori microsatelliti di orata mostra una similarità significativa con le sequenze di *Tetraodon* (Par 3.. Materiali e metodi; APPENDICE A). Il 93% di questi marcatori (58/62) mostra una similarità significativa anche con il genoma di *Takifugu rubripes* (fugu). La percentuale di ECR decresce notevolmente (9%, 18/204) confrontando le sequenze genomiche di orata con *Brachydanio rerio* (zebrafish). Utilizzando il programma di allineamento FASTA si osserva che la taglia media delle regioni allineate è di 182 bp (da 68 fino a 410 bp), con una identità di sequenza che varia dal 60% a più del 90%. Il 41% delle ECR è localizzato in regioni trascritte

(generalmente nelle regioni 3'UTR e 5'UTR di geni noti) del genoma di Tetraodon, il 27% è localizzato negli introni, mentre il 32% sembra non essere associata ad alcun gene predetto o conosciuto. Come precedentemente detto il 41% delle sequenze hanno una localizzazione cromosomica nota nel genoma di Tetraodon, perciò da questo confronto emergono regioni di sintenia tra il genoma di Tetraodon e la mappa di *linkage* dell'orata (Tabella 3, APPENDICE A).

#### **4.1.2. Mappa genetica di *linkage* di seconda generazione del pesce teleosteo ermafrodita *Sparus aurata*.**

La mappa genetica di *linkage* di seconda generazione è stata costruita ampliando il pannello di marcatori utilizzati nella precedente mappa LG con 22 nuovi *loci* specifici per *S. aurata* (Par 3.2 Materiali e metodi). La mappa è stata costruita a partire dalla singola coppia di riproduttori, M1 X F1, e dai 50 individui della prole nello stesso modo della prima mappa.

I nuovi *loci* sono stati ottenuti dalla libreria *TaqI* (Par. 3.2, Materiali e metodi). Sono state analizzate le sequenze relative a 50 cloni, di queste 5 sono state scartate perché avevano non rispettavano i criteri descritti a paragrafo 4.1.1 (necessaria una lunghezza maggiore di 18 bp per la regione costituita da unità ripetute e regioni fiancheggianti sufficientemente lunghe per il disegno di primer). Il polimorfismo dei *loci* è stato analizzato sui 2 genitori M1 e F1 e su due individui della prole (Par 3.2.1, Materiali e metodi). Dall'analisi con *Genotyper* risultano polimorfici 22 *loci* su 50. I dati ottenuti per i nuovi *loci* per la famiglia M1F1 sono stati uniti a quelli della mappa di prima generazione, e a 100 nuovi marcatori analizzati dal gruppo diretto dal Dott. Giorgos Kotoulas, Hellenic Centre for Marine Research, Creta. Da un'analisi preliminare condotta con il programma CriMap, sono stati evidenziati 26 gruppi di *linkage*. In Tabella 4.2 è stata indicata la corrispondenza tra i gruppi di *linkage* delle due mappe rispettivamente di prima e seconda generazione.

| LG1 | LG2 | LG3 | LG4       | LG5 | LG6 | LG7 | LG8 | LG9 | LG10 |
|-----|-----|-----|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| LG1 | LG2 | LG3 | LG4+12+13 | LG5 | LG6 | LG7 | LG8 | LG9 | LG10 |
| 313 | 209 | 51  | 98        | 1   | 168 | 82  | 2   | 124 | 187  |
| 296 | 213 | 322 | 69        | 4   | 206 | 77  | 105 | 61  | 288  |
| 298 | 264 | 16  | 259       | 67  | 241 | 15  | 66  | 172 | 297  |
| 109 | 9   | 48  | 151       | 291 | 11  | 25  | 91  | 118 | 299  |
| 13  | 20  | 38  | 3         | 258 | 203 | 75  | 103 | 325 | 121  |
| 40  | 0   | 112 | 83        | 195 | 229 | 87  | 134 | 47  | 60   |
| 92  | 45  | 279 | 295       | 188 | 56  | 100 | 177 | 63  | 319  |
| 273 | 280 | 46  | 55        | 110 | 263 | 115 | 184 | 318 | 274  |
| 174 | 85  | 72  | 65        | 137 | 120 | 155 | 186 | 101 | 320  |
| 108 | 80  | 125 | 27        | 31  | 284 | 244 | 277 | 138 | 198  |
| 70  |     | 43  | 266       | 165 |     | 275 | 234 | 197 | 52   |
|     | *   | 166 | 143       |     | *   | 216 | 260 | 49  |      |
| *   | 33  | 179 | 283       | *   |     | 218 | 281 | 107 | *    |
| 158 |     | 285 | 162       |     |     | 272 | 96  |     |      |
|     |     | 192 | 14        |     |     | 293 | *   | *   |      |
|     |     | 201 | 129       |     |     | 309 |     |     |      |
|     |     | 248 | 252       |     |     | 182 |     |     |      |
|     |     | 183 | 236       |     |     | 286 |     |     |      |
|     |     | 167 | 311       |     |     | *   |     |     |      |
|     |     | 88  | 210       |     |     |     |     |     |      |
|     |     |     | 44        |     |     |     |     |     |      |
|     |     | *   | 10        |     |     |     |     |     |      |
|     |     | 50  | 290       |     |     |     |     |     |      |
|     |     |     | 323       |     |     |     |     |     |      |
|     |     |     | 276       |     |     |     |     |     |      |
|     |     |     | 36        |     |     |     |     |     |      |
|     |     |     | 117       |     |     |     |     |     |      |
|     |     |     | 57        |     |     |     |     |     |      |
|     |     |     | 12        |     |     |     |     |     |      |
|     |     |     | 145       |     |     |     |     |     |      |
|     |     |     | 152       |     |     |     |     |     |      |
|     |     |     | 251       |     |     |     |     |     |      |
|     |     |     | 140       |     |     |     |     |     |      |
|     |     |     | 269       |     |     |     |     |     |      |

**Tabella 4.2.A** LG1-LG10 Corrispondenza tra i gruppi di *linkage* delle due mappe rispettivamente di **prima** e **seconda** generazione. Per ogni gruppo di *Linkage* LG sono indicati in colonna i *loci* in associazione. I marcatori sono indicati con un numero progressivo. La corrispondenza fra numero e nome del *locus* si trova in APPENDICE B.

| LG11    | LG12 | LG13 | LG14 | LG15 | LG16     | LG26 | LG17 | LG18 | LG19 |
|---------|------|------|------|------|----------|------|------|------|------|
| LG11+21 | LG14 | LG15 | LG16 | LG17 | ?LG18+19 | LG20 | LG22 | LG23 | LG24 |
| 278     | 54   | 53   | 122  | 160  | 94       | 89   | 5    | 68   | 22   |
| 97      | 74   | 239  | 150  | 196  | 301      | 324  | 39   | 116  | 99   |
| 312     | 141  | 303  | 30   | 18   | 185      | 34   | *    | 8    | 32   |
| 95      | 126  | 104  | 163  | 156  | 111      | 249  |      | 123  | 64   |
| 161     | 133  | 294  |      | 28   | 268      | 102  |      | 144  | 78   |
| 317     | 119  | 265  | *    | 86   | 289      | 282  |      | 191  | 175  |
| 42      | 180  | 114  |      | 232  | 21       | 173  |      | 189  | 181  |
| 127     | 225  | 7    |      | 257  | 135      | 262  |      | 199  | 261  |
| 171     | 267  | 245  |      | 255  | 136      |      |      | 237  | 292  |
| 17      | 287  | 157  |      | 24   | 147      |      |      | 243  | *    |
| 242     | *    | 139  |      | 250  | 37       |      |      | 270  |      |
| 253     |      | *    |      | 321  | 35       |      |      | 223  |      |
| 254     |      |      |      | 90   | 154      |      |      | 300  |      |
| 202     |      |      |      | 247  | 256      |      |      | 326  |      |
| 106     |      |      |      | 316  | 235      |      |      | 315  |      |
| 113     |      |      |      | 227  | 84       |      |      | 302  |      |
| 71      |      |      |      | 131  | 6        |      |      | *    |      |
| 41      |      |      |      | 149  | 306      |      |      |      |      |
| 153     |      |      |      |      | 76       |      |      |      |      |
| 159     |      |      |      |      | 58       |      |      |      |      |
| 190     |      |      |      | *    | 93       |      |      |      |      |
| 142     |      |      |      | 230  | 176      |      |      |      |      |
| 226     |      |      |      |      | 305      |      |      |      |      |
| 170     |      |      |      |      | 29       |      |      |      |      |
| 178     |      |      |      |      |          |      |      |      |      |
| 200     |      |      |      |      | *        |      |      |      |      |
| *       |      |      |      |      | 26       |      |      |      |      |
|         |      |      |      |      | 240      |      |      |      |      |

**Tabella 4.2.B** LG11-LG19 Corrispondenza tra i gruppi di *linkage* delle due mappe rispettivamente di **prima** e **seconda** generazione. Per ogni gruppo di *Linkage* LG sono indicati in colonna i *loci* in associazione. I marcatori sono indicati con un numero progressivo La corrispondenza fra numero e nome del *locus* si trova in APPENDICE B

| LG20 | LG21 | LG22 | LG23 | LG24 | LG25 | Unassigned |
|------|------|------|------|------|------|------------|
| LG25 | LG26 |      |      |      |      |            |
| 271  | 59   | 205  | 208  | 308  | 228  | 62         |
| 238  | 130  | 219  | 214  | 215  | 314  | 128        |
| 23   | 19   | *    | 224  | 222  |      | 146        |
| 73   | 193  |      | *    |      | *    | 148        |
| 79   | *    |      |      | *    |      | 164        |
| 233  |      |      |      |      |      | 204        |
| 81   |      |      |      |      |      | 207        |
| 132  |      |      |      |      |      | 211        |
| 169  |      |      |      |      |      | 212        |
| 194  |      |      |      |      |      | 217        |
|      |      |      |      |      |      | 221        |
| *    |      |      |      |      |      | 231        |
|      |      |      |      |      |      | 246        |
|      |      |      |      |      |      | 304        |
|      |      |      |      |      |      | 307        |
|      |      |      |      |      |      | 310        |
|      |      |      |      |      |      | *          |

**Tabella 4.2.C** LG20-LG26 Corrispondenza tra i gruppi di *linkage* delle due mappe rispettivamente di **prima** e **seconda** generazione. Per ogni gruppo di *Linkage* LG sono indicati in colonna i *loci* in associazione. I marcatori sono indicati con un numero progressivo La corrispondenza fra numero e nome del *locus* si trova in APPENDICE B. **17** marcatori non sono stati assegnati.

## 4.2. Infezione sperimentale e raccolta dei campioni

Nel marzo 2005, in collaborazione con l'azienda "Valle Cà Zuliani", specializzata nella riproduzione artificiale di specie ittiche di interesse commerciale e l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE), sono state infettate sperimentalmente popolazioni di avannotti di orata con il patogeno *Photobacterium damsela* sottospecie *piscicida* (*Phdp*).

### 4.2.1 Challenge 1, 2, 3 e 4

La procedura di *challenge* comune ai 4 esperimenti è stata descritta nel paragrafo 3.3.1 della sezione Materiali e metodi. Di seguito sono riportate le caratteristiche specifiche dei 4 esperimenti di *challenge*.

#### 1 Challenge 1: (periodo 02/05/2005-16/05/2005)

**2267** orate (peso compreso tra **0.4g** e **0.6g**) sono state trasferite in due differenti vasche (A e B) per la sperimentazione. Nelle ore immediatamente successive al trasporto dei pesci dall'azienda al laboratorio è stata registrata una mortalità molto elevata (>**250** pesci). La mortalità è scesa a zero dopo un'acclimatazione di 7 giorni. I pesci sono stati quindi esposti al patogeno *Phdp* con titolo:  **$6 \times 10^6$  CFU** e tempo di esposizione pari a **1 ora** (inizio dell'esperimento  $t=0$ ). Al quinto giorno dopo il *challenge* è stato registrato un picco di mortalità: più dell'85% delle orate è morto. Alla fine dell'esperimento solo l'1% degli avannotti è sopravvissuto (Tab 4.3, Fig. 4.2).

#### 2 Challenge 2: (periodo 24/06/2005-12/07/2005)

**1500** orate (peso compreso tra **0.4g** e **0.6g**) sono state trasferite in due differenti vasche (A e B) per la sperimentazione. Durante il periodo di acclimatazione (7 giorni), sono morti **200** avannotti. Tutti i pesci della vasca B sono morti a causa della rottura di un filtro biologico. E' stato comunque proseguito l'esperimento infettando il resto dei pesci ( $t=0$ ), riducendo il titolo di patogeno e il tempo di esposizione e ( **$1 \times 10^6$  CFU per 30 minuti**). Si registrano due picchi di mortalità (distribuzione bimodale della mortalità) al settimo e al decimo giorno. L'andamento della mortalità è simile per le due vasche (A e B). Alla fine dell'esperimento sono sopravvissute **159** orate su un totale di 509 (**31 %**) (Tab. 4.3, Fig. 4.3).

### **3 Challenge 3:** (periodo 22/07/2005-04/08/2005)

**506** orate (peso compreso tra **0.4g** e **0.6g**) sono state trasferite in due differenti vasche (A e B) per la sperimentazione. La disponibilità di un numero limitato di pesci è dovuta alla scarsa produzione di uova, tipica in questa stagione. Dopo un'acclimatazione di 7 giorni l'esperimento è stato avviato ( $t=0$ ), infettando i pesci con titolo di patogeno e tempo di esposizione pari a  **$1 \times 10^6$  CFU** e per **30 minuti**. E' stato deciso di infettare comunque gli animali per testare la riproducibilità dei primi due *challenge*. Le condizioni sperimentali sono le stesse dell'esperimento *Challenge 2*. Si registrano due picchi di mortalità (distribuzione bimodale) al quarto e al nono giorno. L'andamento della mortalità è simile per le due vasche (A e B). Su un totale di **506** pesci campionati ne sono sopravvissuti **131 (26%)** (Tab. 4.3, Fig. 4.4).

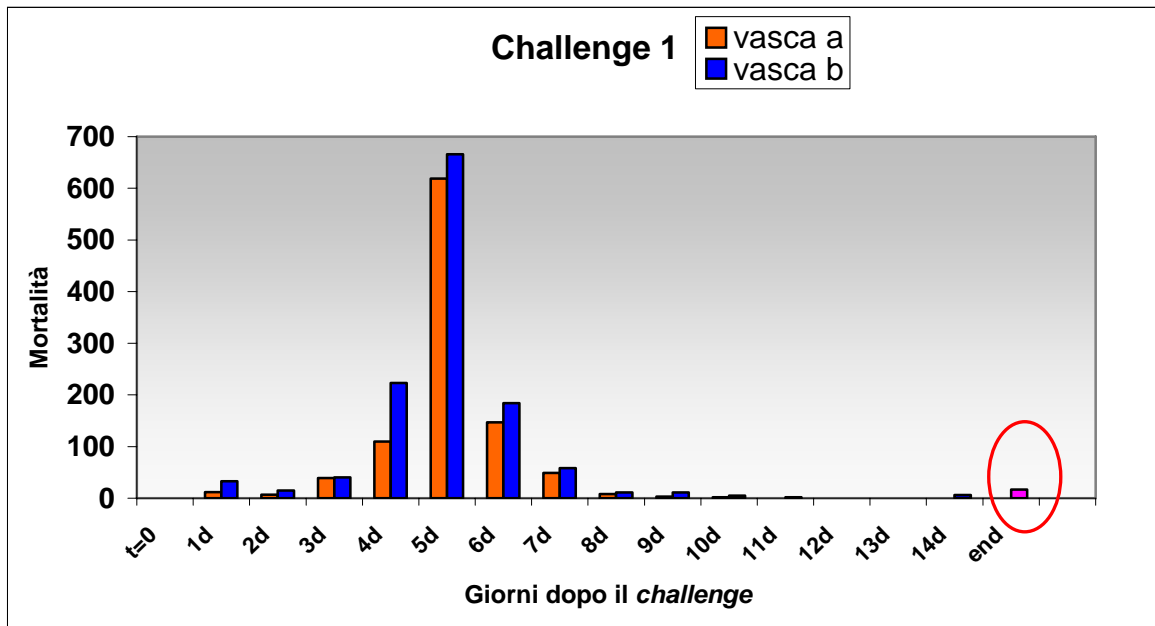
### **4 Challenge 4:** (periodo 10/02/2006-28/02/2006)

**3577** orate (peso compreso tra **0.4g** e **0.6g**) sono state trasferite in due differenti vasche (A e B) per la sperimentazione. Sono state riprodotte le condizioni dei *challenge 2* e *3*, ad eccezione del numero di individui utilizzato, assai maggiore, allo scopo di garantire per analisi QTL famiglie sufficientemente numerose. Dopo un'acclimatazione di 7 giorni l'esperimento è stato avviato ( $t=0$ ), infettando i pesci con titolo di patogeno e tempo di esposizione pari a  **$1 \times 10^6$  CFU** e per **30 minuti**. Si registrano due picchi di mortalità (distribuzione bimodale) al settimo e all'undicesimo giorno. L'andamento della mortalità è simile per le due vasche (A e B). Sono sopravvissuti **96** pesci campionati su 3577 infettati (**3%**) (Tab 4.3, Fig. 4.5).

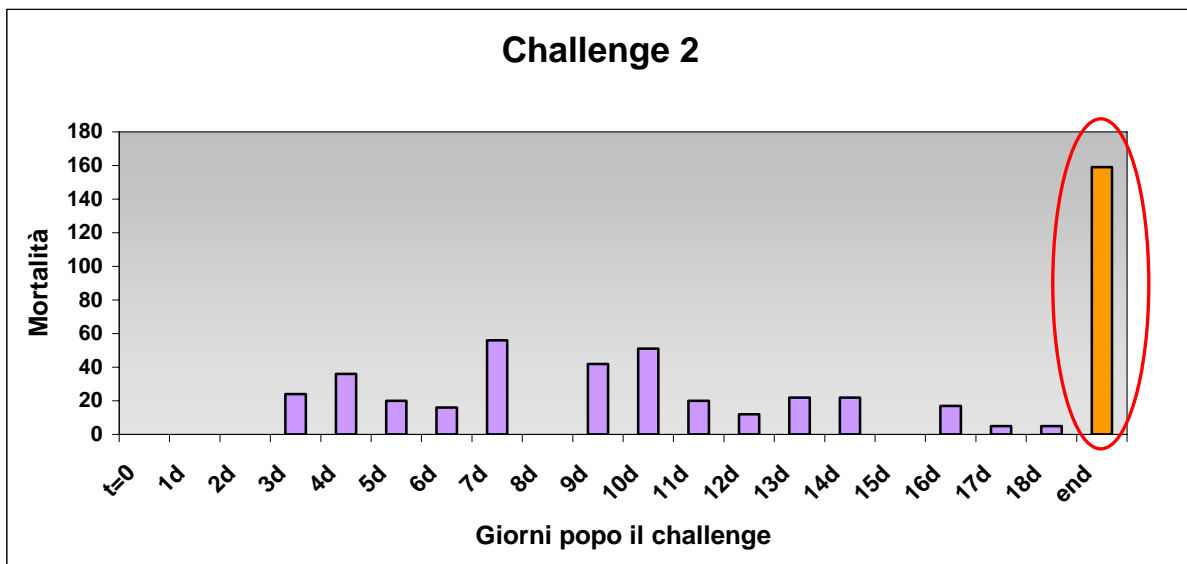
La **mortalità** è stata monitorata due volte al giorno per un massimo di 20 giorni dopo ciascuna infezione sperimentale, pescando gli animali deceduti ogni 12 ore. Gli individui sopravvissuti al giorno 21 sono stati sacrificati e conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Per il **Challenge 4** i pesci morti sono stati singolarmente fotografati e conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Gli animali raccolti sono stati catalogati riportando per ciascuno il dato di mortalità e la misura della lunghezza del corpo capo-forca caudale (vedi paragrafo 3.3.2, Materiali e metodi).

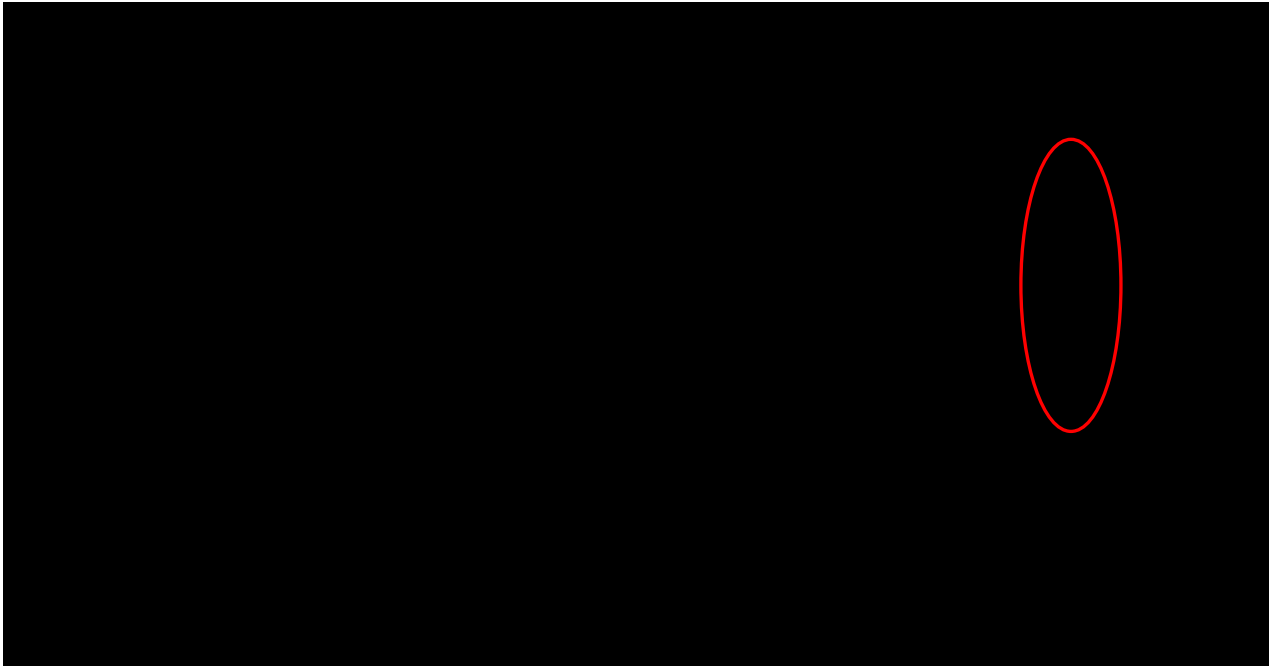


**Figura 4.2** Grafico del primo esperimento di *challenge*: In ordinata è rappresentato il numero di avannotti morti (mortalità), in ascissa i giorni dopo l'infezione sperimentale.  $t=0$  è il giorno dell'esposizione al patogeno. La mortalità segue lo stesso andamento nelle due vasche A e B, con un picco al quinto giorno. **end**: numero di sopravvissuti alla fine dell'esperimento

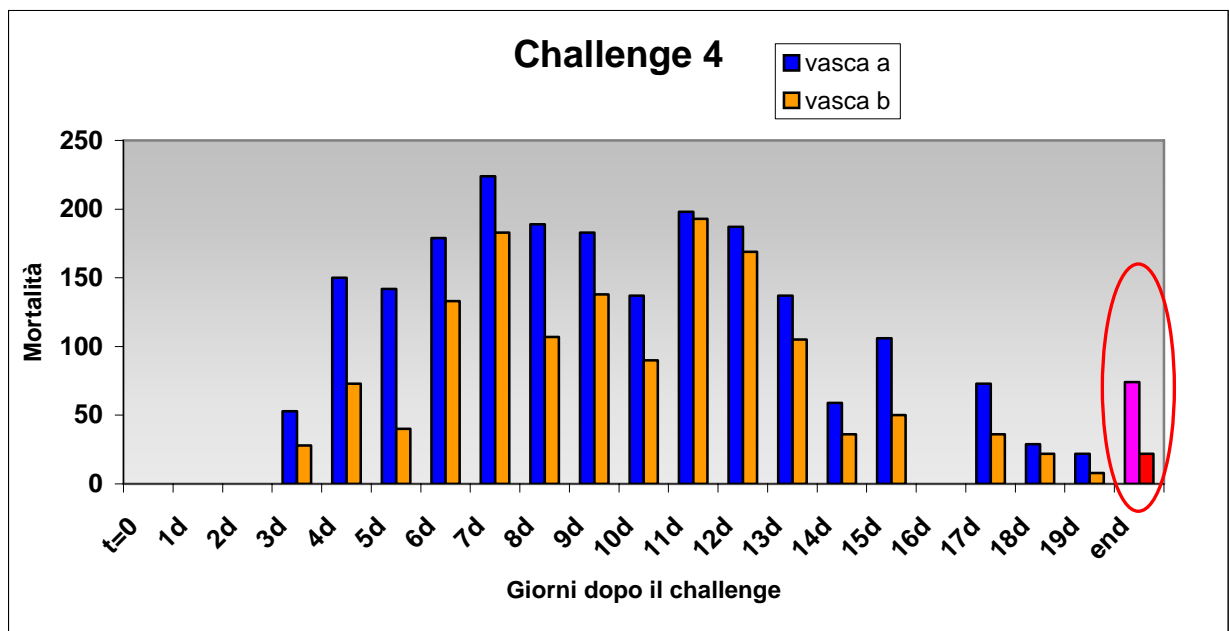


**Figura 4.3.** Grafico del secondo esperimento di *challenge*: In ordinata è rappresentato il numero di avannotti morti (mortalità), in ascissa i giorni dopo l'infezione sperimentale.  $t=0$  è il giorno dell'esposizione al patogeno. I picchi di mortalità maggiore sono al settimo e al decimo giorno dopo l'infezione. **end**: numero di sopravvissuti alla fine dell'esperimento





**Figura 4.4.** Grafico del terzo esperimento di *challenge*: In ordinata è rappresentato il numero di avannotti morti (mortalità), in ascissa i giorni dopo l'infezione sperimentale.  $t=0$  è il giorno dell'esposizione al patogeno. **end**: numero di sopravvissuti alla fine dell'esperimento.



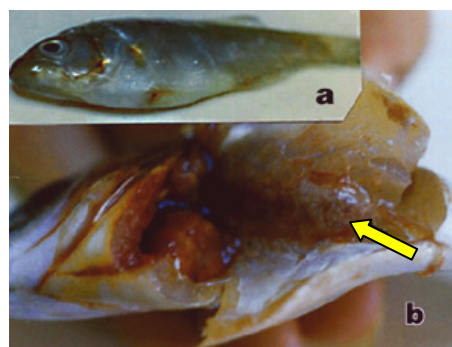
**Figura 4.5.** Grafico del quarto esperimento di *challenge*: In ordinata è rappresentato il numero di avannotti morti (mortalità), in ascissa i giorni dopo l'infezione sperimentale.  $t=0$  è il giorno dell'esposizione al patogeno. I picchi di mortalità maggiore sono al settimo e all'undicesimo giorno dopo l'infezione. **end**: numero di sopravvissuti alla fine dell'esperimento

|   | <i>Challenge 1</i>                   | <i>Challenge 2</i>             | <i>Challenge 3</i>                 | <i>Challenge 4</i>                |
|---|--------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| Numero totale di avannotti a t=0              | 2267                                 | 509                            | 506                                | 3577                              |
| Tempo di acclimatazione                       | 7 giorni                             | 7 giorni                       | 7 giorni                           | 7 giorni                          |
| Titolo patogeno <i>Phdp</i> ceppo 249/Ittio99 | 6x10 <sup>6</sup> CFU                | 1x10 <sup>6</sup> CFU          | 1x10 <sup>6</sup> CFU              | 1x10 <sup>6</sup> CFU             |
| Tempo di esposizione                          | 1 ora                                | 30 minuti                      | 30 minuti                          | 30 minuti                         |
| Picco di mortalità 1                          | 1285 orate (vasche A + B), 5° giorno | 59 orate (vascaA), 7° giorno   | 128 orate (vasche A+B), 4° giorno  | 407 orate (vasche A+B), 7°        |
| Picco di mortalità 2                          |                                      | 51 orate (vasca A), 10° giorno | 61 orate (vasche A+B), 9° giorno   | 391 orate (vasche A+B), 11°       |
| Sopravvissuti                                 | 17 orate (vasche A + B), 14°         | 159 orate (vascaA), 19° giorno | 131 orate (vasche A+B), 19° giorno | 96 orate (vasche A+B), 20° giorno |

**Tabella 4.3.** Riepilogo delle caratteristiche delle infezioni sperimentali *challenge 1, 2, 3 e 4*. t=0 rappresenta il giorno dell'infezione, i giorni sono contati a partire da t=0

Per gli individui dei quattro *challenge* la causa della mortalità è stata valutata mediante esame autoptico (Fig. 4.6) e esami istologici del rene cefalico, della milza e del fegato di 30 animali presi a caso da ogni esperimento. La conferma della diagnosi è stata fatta tramite analisi di PCR RFLP (Zappulli *et al.*, 2006) su milze di animali morti (Materiali e metodi par. 3.3.4). Tutti gli individui esaminati hanno mostrato la presenza di *P.damselae* sottospecie *piscicida*.

**Figura. 4.6..** *Sparus aurata*: lesioni macroscopiche esterne (a) e tipici noduli bianchi (tubercoli, indicati dalla freccia) nel rene cefalico causati da *P.damselae piscicida*.



#### 4.2.2 Estrazione del DNA da avannotti e riproduttori

Il progetto prevedeva il campionamento di avannotti progenie di un parco riproduttori appartenenti ad un'unica vasca (Atla5A, 53 pesci). In seguito ad un'analisi di parentela preliminare condotta su 300 avannotti della popolazione sperimentale del *Challenge 4*, solo una limitata percentuale di individui è stata correttamente assegnata ai riproduttori della vasca Atla5A (<50%). Infatti, nella popolazione sperimentale è stata rilevata la presenza di alleli non osservati in alcuno dei 53 genitori putativi (presenza in tutti i *loci* di almeno un allele estraneo). La tipizzazione del genotipo di entrambi i genitori ipotetici e della relativa progenie è stata ripetuta, scegliendo in modo casuale i campioni da sottoporre nuovamente all'analisi. I nuovi dati genotipici hanno confermato la presenza degli alleli estranei. Questo ha portato a riconsiderare il probabile parco riproduttori: l'analisi è stata quindi estesa a tutte le 4 vasche di potenziali riproduttori presenti a Valle Cà Zuliani (Atla5A **53** pesci, Atla5B **53**, CAZU1 **75**, CAZU2 **75**, **totale: 256**).

Da 1753 orate su 3577 (*Challenge 4*) è stato estratto il DNA genomico a partire da un frammento di tessuto di pinna caudale (Par. 3.3.3.b Materiali e metodi). L'estrazione è stata effettuata processando 96 campioni contemporaneamente. Questo protocollo rende più uniformi le prime fasi dell'esperimento e riduce il tempo di lavoro. Si è scelto di estrarre il DNA soltanto per i pesci appartenenti alla vasca A, perché in numero sufficiente per l'analisi QTL.

Con le stesse modalità è stato estratto il DNA genomico per i 256 riproduttori, a partire da un frammento di tessuto di pinna caudale (Par. 3.3.3.b Materiali e metodi).

### 4.3. Analisi di parentela

#### 4.3.1. Selezione del set di *loci* microsatelliti N01

Il set di **9 loci** (nonetto N01) utilizzato per l'attribuzione di paternità (Par 3.4, Materiali e metodi) è il risultato di una selezione effettuata a partire dai 198 *loci* microsatelliti caratterizzati e posizionati nella mappa di *linkage* in *S. aurata* (Franch *et al.*, 2006, costruzione una mappa di *linkage*). Per studi di assegnazione di parentela, un basso numero di *loci* può essere sufficiente per raggiungere un'alta probabilità di assegnazione corretta (Bernatchez *et al.*, 2000).

Sulla base di: **posizione lungo la mappa genetica e dimensione dell'amplificato**, dati noti per i 198 *loci* presi in esame, sono stati inizialmente selezionati 15 *loci*. Questo pannello preliminare è stato analizzato su un gruppo di 16 riproduttori appartenenti alla vasca Atla5A allo scopo di selezionare i 9 marcatori più informativi per grado di polimorfismo ed eterozigotà (Tab. 4.3).

I *loci* relativi al nonetto N01 selezionato soddisfano dunque i seguenti **parametri di selezione**:

- 1- posizione lungo la mappa genetica: i *loci* sono posizionati in diversi gruppi di *linkage* (Franch *et al.*, 2006), vengono perciò ereditati in modo indipendente l'uno dall'altro. Questo criterio garantisce la selezione di un nonetto informativo (l'informazione apportata dall'analisi di ciascun *locus* è indipendente), inoltre permette una buona copertura del genoma.
- 2- dimensione dell'amplificato (in bp): si distinguono tre categorie di *loci*, *Large* (200-300 bp), *Medium* (140-190 bp), *Small* (80-130 bp). Differenze di dimensione e di fluorocromo permettono di assemblare i prodotti dell'amplificazione relativi a ciascun *locus* in un'unica corsa elettroforetica al sequenziatore automatico *ABI 3730xl Applied Biosystem DNA sequencer* (Par. 3.6, Materiali e metodi).
- 3- grado di polimorfismo: i *loci* selezionati hanno almeno 3-4 diversi alleli (analisi su 32 riproduttori). Un *locus* con molti alleli è informativo, infatti, maggiore è il numero di alleli, maggiore è l'eterozigotà del *locus* stesso.

Il nonetto N01 è stato testato su un secondo gruppo di 16 riproduttori per la validazione dei risultati ottenuti (Par. 3.4, Materiali e metodi). L'attendibilità nell'analisi di paternità è stata verificata testando N01 su 48 avannotti (*Challenge 1*), prole dei 16 riproduttori.

| N° | Nome       | Seq. primer FOR (5'-3') | Seq. primer REV (5'-3') | LG | Dim (bp) | T° |
|----|------------|-------------------------|-------------------------|----|----------|----|
| 1  | ★ Ad-54-F  | agccacttaggtgcattcaa    | ttgtacacagtgccagaaata   | 2  | 216      | 54 |
| 2  | ★ Bd-61-H  | gattggatgggaggactgaa    | cgtgttcacatgcacaaacat   | 22 | 155      | 54 |
| 3  | ★ Bd-86-T  | gactcactggggatcaggaaa   | cgctcgtgatctggagtgtt    | 3  | 173      | 54 |
| 4  | ★ Bd-14-H  | tgcagtgtcaaggaaaacca    | gcattatcaatcactaacatgc  | 1  | 261      | 54 |
| 5  | CId-84-T   | ccgctgaaagccgtatctat    | gccttactgcattagggattaca | 18 | 163      | 54 |
| 6  | ★ CId-03-F | cgttcatggatgatgactcag   | tgagctcatggctaactgtg    | 13 | 101      | 54 |
| 7  | ★ Dd-16-T  | cacatttagggcaccatatcc   | gggaatctctctgtctgtctgg  | 25 | 92       | 54 |
| 8  | ★ Dd-41-T  | atggccctgtgtgtgtctaga   | gctgaagctgccttatgac     | 17 | 206      | 54 |
| 9  | Dd-56-F    | gttgtgctggtagtgtctgga   | agccctgacactccctcata    | 18 | 208      | 54 |
| 10 | Dd-84-H    | aacagatcggaccgaggac     | tggtgtaattatcactccggg   | 3  | 168      | 54 |
| 11 | DId-24-T   | gcttactgaccctgagaca     | ggctgaaaacgtggttttgt    | 22 | 114      | 54 |
| 12 | Ed-01-H    | ttggctatgcttgcagaatg    | tgtaacaggagggtgtcatc    | 14 | 234      | 54 |
| 13 | ★ EId-05-F | tgagcagtctttgagctctcc   | gccatagacaggactggac     | 7  | 159      | 54 |
| 14 | Fd-42-T    | ccctgggtcattatttgtga    | cactctgcctctgaccaat     | 11 | 209      | 54 |
| 15 | ★ Fd-78-H  | tgctcagagaaagttcagcag   | gacaggtatgagcacaacgg    | 20 | 103      | 54 |

**Tabella 4.3.** -15 coppie di primer selezionate. ★ indica il set di 9 *loci* microsatelliti selezionati per l'analisi di parentela. **Nome:** nome del *locus*, **Sequenza:** sequenza nucleotidica dei primer FORWARD e REVERSE, **LG:** gruppo di *linkage* di appartenenza, **Dim:** dimensione in paia di basi, **T°** temperatura di annealing delle coppie di primer.

Il DNA estratto dai 256 riproduttori del *challenge* 4 e dai 1753 avannotti della vasca A (metodica descritta al Par 3.4b Materiali e metodi) è stato utilizzato per amplificare il primo gruppo di 9 *loci* microsatelliti (nonetto N01) specifico per l'orata. Sono state allestite reazioni di amplificazione multipla (Par. 3.4, Materiali e metodi) per tutti gli individui in esame. Tutti i pesci sono stati genotipizzati per i 9 *loci* microsatelliti (Par. 3.6 e 3.7, Materiali e metodi). Da queste analisi sono stati ottenuti dati completi per **253** riproduttori e **1738** avannotti, per ciascuno dei quali è stato delineato un profilo genotipico specifico (*genotyping*).

I dati relativi a due dei 9 marcatori (Bd86\_T, Bd61\_H) sono stati scartati perché davano risultati incompleti o inconsistenti per l'analisi di parentela.

#### **4.3.2 Risultati dell'attribuzione di parentela**

I valori allelici (Par 3.7, Materiali e metodi) ottenuti per 253 riproduttori e 1738 avannotti sono stati rielaborati (*binning*) per renderli adatti all'uso dei programmi bioinformatici utilizzati per l'attribuzione di paternità. Il sesso dei riproduttori e dei figli è sconosciuto.

Si è proceduto con l'implementazione dei due software: PAPA versione 2.0 (Duchesne *et al.*, 2002) e CERVUS versione 3.0 (Kalinowski *et al.*, 2007).

**PAPA** (Par. 3.8.a, Materiali e metodi) basato sul **metodo dell'esclusione**, ha fornito un'attribuzione di paternità-maternità non ambigua per **1261** individui. Per l'analisi sono stati utilizzati 7 *loci* più tutte le combinazioni di 6 *loci*. Sono di seguito riportati i risultati.

**492** (27% del totale genotipizzato) assegnazione non affidabile

**1261** (73%) assegnati a due riproduttori della stessa vasca

**825** (48% di 1261) assegnati ai riproduttori della vasca Atla5A

**125** (7% di 1261) assegnati ai riproduttori della vasca Atla5B

**89** (5% di 1261) assegnati ai riproduttori della vasca Cazu1

**222** (13% di 1261) assegnati ai riproduttori della vasca Cazu2

**CERVUS** (Par 3.8.b, Materiali e metodi), basato sul **metodo della *maximun likelihood***, ha assegnato **1486** individui ai rispettivi genitori. Per l'analisi sono stati utilizzati un numero minimo di 6 *loci*.

*177: assegnazione non possibile: i genitori attribuiti appartengono a vasche differenti e 75: assegnazione non possibile per dati mancanti (in totale 15% dei pesci genotipizzati)*

**1486** (85%) assegnati a due riproduttori della stessa vasca

**927** (53%) assegnati ai riproduttori della vasca Atla5A

**152** (9%) assegnati ai riproduttori della vasca Atla5B

**135** (7.5%) assegnati ai riproduttori della vasca Cazu1

**272** (15.5%) assegnati ai riproduttori della vasca Cazu2

Sebbene i risultati dell'assegnazione di parentela ottenuti con i due programmi siano in accordo, l'approccio basato sul **metodo dell'esclusione** è più conservativo, dal momento che non ammette errori di genotyping. Pertanto, le successive analisi sono basate sul risultato fornito dal programma PAPA.

I riproduttori appartenenti alle quattro differenti vasche hanno contribuito in proporzione diversa alla generazione degli individui della popolazione: rispettivamente per il 65.42% degli assegnati ATLA5A (825 pesci), 17.61% CAZU2 (222 pesci), 9.91% ATLA5B (125 pesci) e infine 7.06% CAZU1 (89 pesci). All'interno di ciascuna vasca è stato osservato un contributo preponderante di pochi riproduttori. In Tabella 4.6 sono elencati i riproduttori e il numero di figli ad essi associato. ■■

| <b>ATLA5A</b>       |                 | <b>ATLA5B</b>       |                 | <b>CAZU1</b>        |                 | <b>CAZU2</b>        |                 |
|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| <b>Riproduttore</b> | <b>N° Figli</b> | <b>Riproduttore</b> | <b>N° Figli</b> | <b>Riproduttore</b> | <b>N° Figli</b> | <b>Riproduttore</b> | <b>N° Figli</b> |
| AT155               | 1               | AT5B11              | 1               | cz1203              | 1               | CZ2103              | 1               |
| AT173               | 1               | AT5B48              | 1               | cz1208              | 1               | CZ2116              | 1               |
| AT182               | 2               | AT5B49              | 1               | cz1242              | 1               | CZ2120              | 1               |
| AT184               | 5               | AT5B50              | 1               | cz1258              | 1               | CZ2129              | 1               |
| AT144               | 7               | AT5B12              | 2               | cz1200              | 2               | CZ2131              | 1               |
| AT145               | 7               | AT5B23              | 2               | cz1229              | 2               | CZ266               | 1               |
| AT162               | 8               | AT5B24              | 2               | cz1230              | 2               | CZ267               | 1               |
| AT158               | 10              | AT5B28              | 3               | cz1237              | 2               | CZ285               | 1               |
| AT167               | 12              | AT5B32              | 3               | cz1239              | 2               | CZ295               | 1               |
| AT135               | 17              | AT5B39              | 4               | cz1246              | 2               | CZ2100              | 2               |
| AT138               | 17              | AT5B19              | 5               | cz1251              | 2               | CZ271               | 2               |
| AT166               | 17              | AT5B36              | 5               | cz1252              | 2               | CZ276               | 2               |
| AT181               | 23              | AT5B38              | 5               | cz1186              | 3               | CZ278               | 2               |
| AT136               | 24              | AT5B18              | 6               | cz1205              | 3               | CZ284               | 2               |
| AT152               | 25              | AT5B34              | 6               | cz1210              | 3               | CZ2106              | 3               |
| AT157               | 27              | AT5B06              | 7               | cz1253              | 3               | CZ275               | 3               |
| AT168               | 35              | AT5B30              | 7               | cz1259              | 4               | CZ2114              | 4               |
| AT165               | 36              | AT5B37              | 8               | cz1189              | 5               | CZ2102              | 5               |
| AT137               | 37              | AT5B31              | 11              | cz1194              | 5               | CZ2104              | 5               |
| AT159               | 38              | AT5B10              | 12              | cz1233              | 5               | CZ257               | 5               |
| AT180               | 38              | AT5B27              | 14              | cz1235              | 5               | CZ2123              | 9               |
| AT153               | 49              | AT5B26              | 15              | cz1195              | 6               | CZ265               | 9               |
| AT169               | 49              | AT5B02              | 18              | cz1256              | 6               | CZ299               | 10              |
| AT174               | 53              | AT5B42              | 18              | cz1207              | 7               | CZ272               | 11              |
| AT160               | 75              | AT5B33              | 27              | cz1215              | 7               | CZ277               | 12              |
| AT170               | 85              | AT5B09              | 66              | cz1218              | 7               | CZ289               | 13              |
| AT178               | 118             |                     |                 | cz1193              | 8               | CZ269               | 14              |
| AT172               | 177             |                     |                 | cz1257              | 9               | CZ263               | 15              |
| AT147               | 324             |                     |                 | cz1190              | 10              | CZ262               | 16              |
| AT151               | 333             |                     |                 | cz1214              | 10              | CZ296               | 17              |
|                     |                 |                     |                 | cz1185              | 14              | CZ264               | 20              |
|                     |                 |                     |                 | cz1234              | 18              | CZ270               | 20              |
|                     |                 |                     |                 | cz1223              | 20              | CZ2112              | 23              |
|                     |                 |                     |                 |                     |                 | CZ286               | 23              |
|                     |                 |                     |                 |                     |                 | CZ2130              | 24              |
|                     |                 |                     |                 |                     |                 | CZ279               | 24              |
|                     |                 |                     |                 |                     |                 | CZ2124              | 27              |
|                     |                 |                     |                 |                     |                 | CZ258               | 27              |
|                     |                 |                     |                 |                     |                 | CZ268               | 35              |
|                     |                 |                     |                 |                     |                 | CZ260               | 51              |

**Tabella 4.6.** Attribuzione di paternità, suddivisa per le 4 vasche di riproduttori. Per ciascun riproduttore il numero di figli è riportato sulla colonna di sinistra.



I dati grezzi relativi ai 1261 pesci (*challenge* 4) assegnati ai rispettivi 2 genitori (risultati di PAPA versione 2.0) sono stati inviati presso il Roslin Institute (Division of Genetics and Genomics, Roslin, UK). I dati grezzi comprendono:

- identità dell'avannotto
- identità dei 2 genitori
- lunghezza alla forca espressa in millimetri
- giorno della morte dopo il *challenge*.

Questi dati sono stati rielaborati per il calcolo dell'**ereditabilità dei caratteri** resistenza al patogeno e dimensione dell'avannotto e per la **definizione delle famiglie** necessaria per l'analisi **QTL**.

#### **4.3.3. Ereditabilità dei caratteri: resistenza al patogeno e dimensione dell'avannotto**

Sono state calcolate l'ereditabilità del carattere "**tempo di sopravvivenza successivo all'infezione**" (resistenza al patogeno), "**percentuale di sopravvivenza**" a 5, 10, 12 giorni dall'infezione e quella del carattere morfologico "**lunghezza alla forca espressa in mm**" (dimensione dell'avannotto). Il tempo di sopravvivenza ha una ereditabilità estremamente bassa (0.0132) con un errore standard molto elevato ( $\pm 0.0319$ ). La percentuale di animali sopravvissuti per famiglia invece ha una discreta ereditabilità se misurata a 5 giorni dall'infezione (0.4395) sebbene associate ad un elevato errore standard ( $\pm 0.1896$ ), per poi diminuire a 10 giorni ( $0.1307 \pm 0.1366$ ) e annullarsi a 12 giorni ( $0 \pm 0$ ). Per quanto riguarda la taglia degli avannotti l'ereditabilità varia tra  $0.3458 \pm 0.0733$  e  $0.3790 \pm 0.0759$ , a seconda del modello utilizzato.

## 4.4. Elaborazione dei dati sperimentale per future analisi QTL

### 4.4.1 Scelta delle famiglie per l'analisi QTL

L'analisi dei dati effettuata presso Roslin Institute ha permesso di definire le famiglie all'interno della popolazione sperimentale. Con il programma PAPA sono stati assegnati 1261 pesci a 245 coppie di riproduttori (famiglie *full sib*, \*1). Queste famiglie *full sib* sono composte da un numero di figli variabile da 1 a 151. Come già affermato (par.4.3.2, Tab 4.6) i riproduttori appartenenti alla vasca Atla5A hanno contribuito in proporzione maggiore alla generazione degli individui della popolazione di avannotti in esame (*challenge* 4). L'analisi del Roslin ha permesso di individuare, tra questi, i riproduttori capostipiti di famiglie *full sib* e *half sib* (\*2). Sono state individuate le 5 famiglie più numerose, che comprendono in totale 559 avannotti, progenie di 16 riproduttori (vasca Atla5A), il resto dei riproduttori (53-16=37) non ha contribuito alla produzione delle 5 famiglie scelte. Soltanto una famiglia *full sib* è risultata sufficientemente numerosa: AT147 X AT151 (\*3) con 151 figli, mentre le famiglie AT160, AT170, AT172 e AT178 sono *half sib*. Nel caso di queste ultime, per il secondo genitore il numero di figli è variabile e dipende da quanti accoppiamenti sono avvenuti. All'interno di ciascuna famiglia *half sib*, sono stati eliminati dall'analisi i riproduttori che hanno contribuito solo con pochi figli (1 o 2). I risultati relativi alla definizione delle famiglie sono riportati in dettaglio in APPENDICE C e qui riassunti in Tab. 4.7.

(\*3) Il nome attribuito alle famiglie corrisponde al nome della coppia di riproduttori per le famiglie *full sib*, mentre per le famiglie *half sib* corrisponde al nome del capostipite.

| Capofamiglia | Secondo genitore | N° figli |
|--------------|------------------|----------|
| AT147        | AT151            | 151      |
| AT160        | AT178            | 10       |
|              | AT180            | 4        |
|              | AT174            | 1(*)     |
|              | AT147            | 59       |
|              | AT153            | 1(*)     |
| AT170        | AT174            | 28       |
|              | AT178            | 21       |
|              | AT180            | 1(*)     |
|              | AT169            | 19       |
|              | AT153            | 7        |
|              | AT159            | 6        |
|              | AT165            | 2(*)     |
|              | AT135            | 1(*)     |
| AT172        | AT180            | 26       |
|              | AT178            | 19       |
|              | AT174            | 2(*)     |
|              | AT173            | 1(*)     |
|              | AT147            | 54       |
|              | AT159            | 21       |
|              | AT153            | 16       |
|              | AT169            | 10       |
|              | AT135            | 4        |
|              | AT137            | 3        |
|              | AT165            | 21       |
| AT178        | AT5B03           | 1(*)     |
|              | AT151            | 36       |
|              | AT170            | 21       |
|              | AT172            | 19       |
|              | AT168            | 18       |
|              | AT160            | 10       |
|              | AT136            | 7        |
|              | AT138            | 2(*)     |
|              | AT158            | 2(*)     |
|              | AT145            | 1(*)     |
|              | AT152            | 1(*)     |
|              | AT137            | 1(*)     |

**1- Famiglia full sib**  
totale: 2 riproduttori,  
151 figli

**2- Famiglia half sib**  
totale: 4 riproduttori,  
73 figli

**3- Famiglia half sib**  
totale: 6 riproduttori,  
81 figli

**4- Famiglia half sib**  
totale: 10 riproduttori,  
143 figli

**5- Famiglia half sib**  
totale: 7 riproduttori,  
111 figli

(\*1): Famiglie full sib: gli individui che appartengono ad una famiglia *full sib* condividono entrambi i genitori

(\*2): Famiglie half sib: sono costituite da individui con un solo genitore in comune

**Tabella 4.7.** Famiglie più numerose. Nella prima colonna è indicato il capostipite della famiglia, nella seconda colonna il secondo riproduttore che ha contribuito alla produzione della famiglia *full sib*. Il simbolo (\*) indica i riproduttori e i relativi avannotti (figli) che non verranno usati nelle analisi successive. I valori totali riportati sulla destra tengono conto di questa sottrazione.

#### 4.4.2. Scelta dei *loci* per l'analisi QTL

Per l'analisi QTL è necessaria una scansione dettagliata del genoma di orata con almeno 90-100 marcatori microsatelliti spazati lungo il genoma in modo omogeneo. La selezione dei *loci* microsatelliti è stata effettuata a partire da 186 *loci* con posizione nota sulla mappa di *linkage* (Franch *et al.*, 2006) e/o su quella di "ibridi di radiazione", RH (Sarropoulou *et al.*, 2007). I *loci* del nonetto N01 sono esclusi da questa selezione perché già analizzati nell'analisi di paternità.

L'**eterozigosità** dei 186 *loci* è stata valutata osservandone il polimorfismo su 8 riproduttori: i 6 capofamiglia delle 5 famiglie selezionate AT147, AT151, AT160, AT170, AT172, AT178, ed altri due riproduttori, AT135 e AT180, esclusi dall'analisi QTL perché hanno generato un numero di figli troppo basso. Sono state messe a punto delle reazioni multiple di amplificazione (PCR *triplex*), ottenendo 10 gruppi di 9 *loci* ciascuno (nonetti N02-N11). Ciascun *locus* di un nonetto si distingue dagli altri per fluorocromo o dimensione, come nel caso di N01.

Da questo primo lavoro di analisi si sono ricavati 5 gruppi, ognuno specifico per una singola famiglia, comprendenti almeno 90 *loci* microsatelliti eterozigoti. In Tabella 4.8 è riportato per ciascun genitore capostipite della famiglia il numero di *loci* eterozigoti dopo le prime analisi.

| Capofamiglia | <i>loci</i><br>polimorfici | <i>loci</i><br>analizzati | Ho (%) |
|--------------|----------------------------|---------------------------|--------|
| AT147        | 93                         | 186                       | 50     |
| AT151        | 89                         | 186                       | 48     |
| AT160        | 93                         | 186                       | 50     |
| AT170        | 106                        | 186                       | 57     |
| AT172        | 89                         | 186                       | 48     |
| AT178        | 100                        | 186                       | 54     |
| AT135        | 107                        | 186                       | 58     |
| AT180        | 101                        | 186                       | 54     |

**Tabella 4.8.** Riassunto dei dati ottenuti dalla scansione del genoma di orata con *loci* microsatelliti, **Ho** rappresenta l'eterozigosità osservata.

Per validare l'eterozigosità dei 90 *loci* specifici per famiglia, sono stati analizzati preliminarmente 8 figli per ciascuna famiglia (40 pesci) mediante PCR multiple (*triplex*). I 90 *loci* sono organizzati in 10 gruppi da 9 *loci* ciascuno. Per la famiglia AT147XAT151 i nonetti caratterizzati sono 12: in totale 108 *loci*. Durante questa validazione alcuni *loci* sono stati scartati (Tab 4.9). Infatti, erano stati erroneamente considerati polimorfici a causa della presenza di picchi aspecifici e/o disturbi dovuti a un intenso rumore di fondo nella corsa elettroforetica (*Genotyper*).

| Famiglia      | N° <i>loci</i> scartati | N° nonetti (9 <i>loci</i> ) |
|---------------|-------------------------|-----------------------------|
| AT147 X AT151 | 1                       | 12                          |
| AT160         | 3                       | 10                          |
| AT170         | 0                       | 10                          |
| AT172         | 4                       | 10                          |
| AT178         | 0                       | 10                          |

**Tabella 4.9.** Riassunto dei dati ottenuti dopo scansione del genoma di orata mediante amplificazione multiple (*triplex*).

Successivamente l'analisi è stata condotta su ulteriori 8 figli di ciascuna famiglia mettendo a punto amplificazioni multiple (una PCR *quadruplex* più una PCR *quintuplex* per l'amplificazione di ciascun nonetto, par. 3.5. Materiali e metodi).

L'ottimizzazione di amplificazioni multiple ha permesso di ridurre sostanzialmente il numero totale di PCR : raggruppando i 559 individui in piastre da 96 pozzetti sarebbero state necessarie 524 reazioni (559 individui x 10 nonetti x 9 PCR singole), con la strategia *multiplex PCR* le reazioni sono state ridotte a 117 (559 individui x 10 nonetti x 2 PCR multiple, Tabella 4.10).

| Strategia                                 |  | Reazioni totali | Riduzione (%) |
|---|--|-----------------|---------------|
| PCR singole                               | 559 <i>individui</i> X 10 <i>nonetti</i> X 9 PCR | 50310           |               |
| PCR <i>triplex</i>                        | 559 <i>individui</i> X 10 <i>nonetti</i> X 3 PCR | 16770           | 67%           |
| PCR <i>quadruplex</i> + <i>quintuplex</i> | 559 <i>individui</i> X 10 <i>nonetti</i> X 2 PCR | 11180           | 78%           |

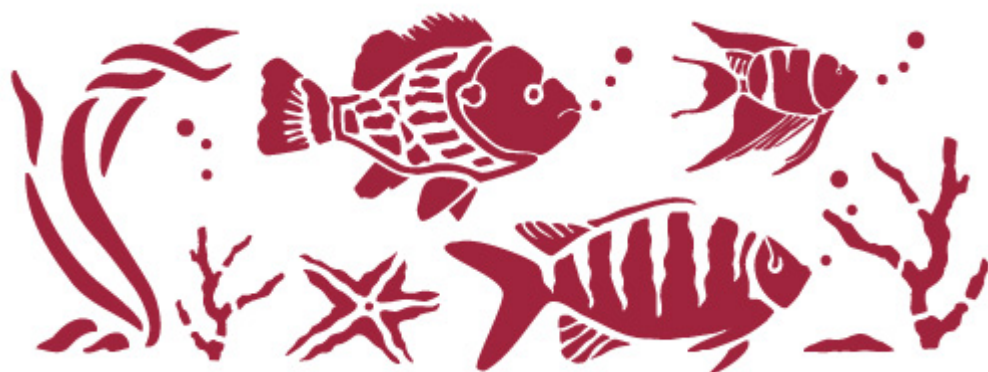
**Tabella 4.10.** Confronto fra numero di PCR singole e PCR multiple.

Quindi, sfruttando la medesima strategia, è stata completata l'analisi per i 479 figli restanti; dalle Tabelle 4.7 e 4.9, e dalle considerazioni di questo paragrafo, le analisi sono state completate come segue: 135 figli per AT147 X AT151 analizzati con 108 *loci*, 57 figli per AT160 con 90 *loci*, 65 figli per AT170 con 90 *loci*, 127 figli per AT172 con 90 *loci*, 95 figli per AT178 con 90 *loci*.

Mediante programma *Genotyper* è stata completata l'attribuzione dei profili genotipici agli individui delle 5 famiglie selezionate. Come esempio, in APPENDICE C è riportata l'attribuzione degli alleli per 108 *loci* relativa alla famiglia 147X151.

I profili genotipici di ciascun individuo sono stati spediti ai nostri collaboratori del Roslin Institute per l'analisi QTL.

## 5. Discussione e Conclusioni



Il genoma di orata sta diventando uno dei meglio caratterizzati tra le specie di teleostei, se si escludono le specie modello quali *Brachydanio rerio* (zebrafish), *Orzias latipes* (medaka), *Takifugu rubripes* (fugu), *Gasterosteus aculeatus* (spinarello) e *Tetraodon nigroviridis*. Tra i Perciformi, il più vasto ordine dei Vertebrati al quale appartiene *S. aurata*, sono comprese più di 7000 specie, ma nessuna di esse è organismo modello, sebbene le famiglie incluse abbiano importanza considerevole nell'ambito dell'economia della pesca e dell'acquacoltura e nell'ambito di studi evolutivi. Lo sviluppo e il miglioramento degli strumenti genomici per *S. aurata* potrebbe fornire un collegamento tra le specie modello e i Perciformi (Sarropoulou *et al.*, 2007; Franch *et al.* 2006: confronto tra mappe genomiche per *S. aurata* e genomi di organismi modello per i Teleostei). Diverse sono le caratteristiche che rendono interessante l'orata come specie oggetto di studio: la taglia del genoma, la posizione tassonomica, l'importanza commerciale. Per quanto riguarda la tassonomia, l'orata è una specie filogeneticamente interessante: essa appartiene all'ordine dei Perciformi, che include un largo numero di specie derivate da una radiazione avvenuta circa 60 milioni di anni fa. L'orata potrebbe rappresentare un organismo modello per tutte quelle specie, di interesse commerciale, che appartengono a questo importante gruppo tassonomico e contribuire significativamente a sviluppare gli obiettivi del settore dell'allevamento ittico.

In effetti la rilevanza dell'orata come specie di allevamento ha motivato un progetto, di cui questo lavoro di tesi è parte, che ha come obiettivo quello di identificare geni associati allo stress e alla resistenza a patologie infettive. Lo scopo consiste nel fornire basi genetiche e fisiologiche per programmi di selezione assistita da marcatori e nell'individuazione di protocolli operativi. In condizioni di allevamento intensivo, infatti, i pesci sono esposti a inevitabili condizioni di stress. Confini definiti, esposizione a patogeni, temperatura non ottimale portano ad una riduzione delle prestazioni, causando difficoltà nell'acclimatazione, crescita limitata, squilibri nella riproduzione e maggiore suscettibilità ai patogeni.

Per identificare *loci* coinvolti nella resistenza alle patologie in *S. aurata* sono stati sviluppati strumenti genomici che permettano di definire "geneticamente" le relazioni di parentela in modo da suddividere gli animali in famiglie (*full-sib* e *half-sib*) e successivamente di effettuare un'analisi genomica per individuare QTL associati al carattere di interesse (resistenza alla pasteurellosi). Per misurare questo carattere sono state inoltre messe a punto le condizioni sperimentali per riprodurre in modo artificiale e controllato questa patologia. E'



stato scelto di infettare animali allo stadio di avannotto in quanto maggiormente suscettibile all'infezione. Nonostante le notevoli difficoltà legate alla logistica dell'esperimento ed in particolare al numero molto elevato di animali su cui veniva effettuata la sperimentazione, è stato comunque possibile ottenere un buon andamento di mortalità in un campione sufficientemente ampio da produrre almeno cinque famiglie (*full-sib* o *half-sib*) da analizzare successivamente.

La mortalità dovuta a pasteurellosi ha generalmente un andamento bimodale, con due picchi piuttosto evidenti a circa metà esperimento. Nell'allestire gli esperimenti di infezione controllata si è cercato di ottenere innanzitutto una mortalità ben distribuita nel tempo, variando titolo del patogeno, tempo di esposizione e cercando di ottimizzare le condizioni ambientali. Un fattore decisivo è stata l'acclimatazione successiva al trasferimento degli avannotti dall'allevamento all'acquario sperimentale presso l'IZSVE. In secondo luogo, valutando i primi esperimenti di challenge, è stato possibile stabilire il numero di pesci da infettare per ottenere dati numericamente consistenti per le analisi di paternità e per ottenere famiglie abbastanza numerose per le future analisi QTL.

Parallelamente agli esperimenti di infezione controllata, come già menzionato, sono stati sviluppati gli strumenti genomici indispensabili per condurre un'analisi QTL. Il primo traguardo raggiunto è stata la costruzione di una mappa di associazione o linkage di prima generazione. Allo scopo sono stati isolati 204 marcatori microsatelliti. Di questi, 198 sono posizionati sulla mappa a formare 26 gruppi di linkage (LG). Il pannello di marcatori generato si è dimostrato altamente polimorfico e rappresenta un importante strumento per ulteriori studi genetici in questa specie. Sembra inoltre che l'utilità di questo strumento possa essere estesa ad altre specie: negli sparidi è stata osservata l'amplificazione cross-specifica per diversi *loci* microsatelliti (Franch *et al.* 2006, Brown *et al.* 2005). La possibilità di usare gli stessi marcatori tra differenti specie rende più rapida la costruzione della mappe di linkage per altri sparidi e permette una semplice comparazione fra mappe diverse. Poiché diverse specie di sparidi (ad esempio dentice, puntazzo, sarago, mormora, pagello) hanno una notevole importanza per la pesca e l'acquacultura, questo risultato apre interessanti prospettive per il trasferimento di informazioni "genomiche" dall'orata ad altre specie di grande rilevanza commerciale.

Per quanto riguarda la mappa di prima generazione, la sua lunghezza totale, mediata tra i due sessi, è di 1241.9 cM , valore molto simile a quello riportato per altri teleostei (Franch *et al.*, 2006). Si osserva una piccola differenza tra le dimensioni di mappa di maschio e femmina, probabilmente dovuta alla presenza di *loci* che sono informativi in uno solo dei due riproduttori. Il meccanismo di riproduzione dell'orata (*mass-spawning*) non permette di ottenere popolazioni altamente informative per la mappatura dei *loci* (popolazioni Backcross o F2), infatti, pur incrociando riproduttori selvatici, non è possibile evitare qualche grado di omozigotità. Comunque stimando il tasso di ricombinazione sesso-specifico con *loci* informativi in entrambi i genitori è confermato un tasso di ricombinazione più alto nella femmina. Il dimorfismo sessuale nella ricombinazione meiotica è un fenomeno ampiamente diffuso nelle specie di invertebrati e vertebrati. Per esempio, in diverse specie di teleostei il tasso di ricombinazione sembra essere ridotto nei maschi (Tab. 5.1)

| <i>Specie (nome comune)</i>               | <i>Tasso di ricombinazione<br/>Femmina:Maschio</i> | <i>Autore</i>                                |
|---|--|--|
| <i>Zebrafish</i>                          | 2.74:1   | <i>Singer et al., 2002</i>                   |
| <i>Rainbow trout: trota arcobaleno</i>    | 3.25:1   | <i>Sakamoto et al., 2000</i>                 |
| <i>Atlantic salmon: salmone atlantico</i> | 8.26:1 o 3.92:1                                    | <i>Moen et al.,2004 o Gilbey et al.,2004</i> |
| <i>Channel catfish: pesce gatto</i>       | 3.18:1   | <i>Waldbieser et al., 2001</i>               |
| <i>European seabass: branzino europeo</i> | 1.48:1   | <i>Chistiakov et al., 2005</i>               |
| <i>Japanese flounder: passera di mare</i> | 1:7.4  | <i>Coimbra et al., 2003</i>                  |

**Tabella 5.1:** Tassi di ricombinazione fra femmine e maschio in diverse specie di teleosteo.

Tutti le specie elencate in Tabella 5.1 hanno sessi separati e determinazione genetica del sesso. In altre specie (pesce spada e tilapia) sono state trovate differenze non significative tra la lunghezza di mappa totale maschile e quella femminile, sebbene vari il tasso di ricombinazione sesso specifico tra i gruppi di linkage e all'interno del gruppo stesso. Una situazione simile è osservata in orata. Per esempio, LG1, LG2, e LG3, nella mappa di linkage della femmina, superano di tre / quattro volte in lunghezza quella del maschio. Per LG1, LG2, e LG3 una distanza di mappa maggiore è associata ai *loci* posizionati alle estermità dei gruppi stessi, mentre la situazione opposta si evidenzia per LG15, LG16 e LG26. E' necessario un

grande numero di meiosi in più di un individuo per accertare se le similarità totali o le differenze LG-specifiche sono dovute a effetti stocastici o a profili sesso-specifici. Specie ermafrodite come l'orata rappresentano un soggetto per lo studio del ruolo dei geni nella determinazione e nel differenziamento dei sessi.

Il confronto della mappa di linkage con una mappa RH (ibridi di radiazione) di prima generazione (Seanger *et al.*, 2006) fornisce supporti indipendenti per i gruppi LG e evidenzia una buona concordanza fra gruppi RH e LG, spesso anche in relazione all'ordine dei *loci* nel gruppo. Il cariotipo di orata presenta un set aploide di 24 cromosomi. (Cataudella *et al.*, 1980; Vitturi *et al.*, 1992). Per ottenere una perfetta corrispondenza fra cromosomi e LG è necessario aumentare il numero di marcatori microsatelliti. In tal modo alcuni gruppi di linkage si fonderanno per formarne uno più grande. Il gruppo RH10 contiene sia marcatori inclusi nel gruppo LG8 che marcatori inclusi in LG22: aumentando il numero di marcatori nella mappa di linkage è probabile che LG8 e LG22 confluiscono in un unico gruppo. Questo dato evidenzia l'importanza di integrare differenti dati genomici per la costruzione di robuste mappe genomiche.

In quest'ottica, in collaborazione con i colleghi dell'Hellenic Centre for Marine Research, è stata costruita la mappa di linkage di seconda generazione, che porta a oltre 300 i marcatori microsatelliti. Sebbene la mappa ottenuta sia preliminare, l'incremento del numero di marcatori accresce la risoluzione della mappa e offre una migliore copertura del genoma. Vengono inoltre sostanzialmente confermati i gruppi di linkage individuati dalla mappa di prima generazione.

Un altro risultato interessante è dato dalla "comparabilità" della mappa di linkage con il genoma di specie modello. Infatti, la genomica comparativa è un valido strumento per il trasferimento di informazioni da genomi parzialmente o totalmente sequenziati a specie meno caratterizzate. Questo approccio è possibile usando siti ancoranti (*loci* omologhi nelle due specie). In generale i marcatori sono definiti di tipo I (codificanti) e marcatori di tipo II (microsatelliti, regioni non codificanti). Normalmente questi ultimi non sono considerato informativi per la genomica comparative. Nei Teleostei, tuttavia, questo dato sembra non essere confermato. Ad esempio, in *Cottus gobio* il 45% dei *loci* microsatelliti (77/171) mostra una similarità significativa con il genoma di *Tetraodon* (Stemshorn *et al.*, 2005).

Analogamente, per l'orata si osserva che 62/204 30% dei *loci* che contengono regioni di sequenza conservate compaiono in *Tetraodon*. In Tilapia, (usando una maggiore stringenza nelle ricerche di BLAST,  $e > 10^{-8}$ ) lo 11% dei *loci* mostrano similarità con le sequenze di *Tetraodon*. Usando la stessa stringenza 57/204 (28%) 57/204 sequenze di orata mostrano una similarità significativa con le sequenze di *Tetraodon*. L'alta similarità fra di sequenza tra le 4 specie può essere spiegata dal fatto che esse appartengono al medesimo gruppo di teleostei, Acantomorpha, originatosi di recente (80-di 100 milioni anni fa, Chen *et al.*; 2004).

Da questo studio comparativo si osserva la presenza di numerose ECR (segmenti non codificanti conservati). Le ECR sono localizzate sia in regioni non trascritte del genoma sia in prossimità di geni (promotori e introni), ma possono trovarsi anche a grandi distanze dal gene stesso. E' stato osservato che la maggior parte delle ECR identificate (72%) si trovano in regioni trascritte o in introni di *Tetraodon*. Una parte sostanziale delle ECR non è stata associata ad alcun gene probabilmente poiché il genoma di *Tetraodon* è solo parzialmente annotato. Sono state identificate 1400 ECR dal confronto uomo – fugu (Woolfe *et al.*, 2005). Queste ECR hanno taglia media pari a 199 bp, e mostrano alle estremità una frequenza elevata per i nucleotidi A - T (Walter *et al.*, 2005). Il numero di ECR identificate dal confronto fra *Tetraodon* e *S. aurata* è simile a quello riportato da altri lavori. L'elevata numerosità delle ECR associate ai microsatelliti può essere spiegata come una conseguenza di:

- 1- conservazione di sequenze fra i genomi dei teleostei;
- 2- costrizioni funzionali forti;
- 3- tassi di mutazione bassi.

Le ECR rappresentano uno strumento unico per l'ancoraggio di mappe di linkage di specie poco caratterizzate ai genomi completamente sequenziati degli organismi modello.

La mappa di linkage , quindi rappresenta uno metodo di comparazione molto importante per l'implementazione di analisi QTL in *S. aurata*. Inoltre diventa uno strumento fondamentale nella selezione assistita da marcatori per caratteri difficili da misurare e con bassa ereditabilità: come la resistenza alla pasteurellosi. Con l'analisi della mappa di linkage si è evidenziato che la capacità comparativa della mappa genomica facilita studi genomici in altre specie di sparidi così come permette confronti con genomi di specie ittiche ben caratterizzate.

La mappa di linkage ha dato inoltre la possibilità di selezionare un numero adeguato di marcatori genetici per la ricostruzione delle relazioni di parentela tra i campioni raccolti. La riproduzione dell'orata avviene attraverso mass-spawning, riproduzione di gruppo, perciò non è possibile determinare a priori il pedigree della popolazione sperimentale. È dunque necessario ricostruire a posteriori tale pedigree mediante l'analisi genetica della popolazione sperimentale e dei riproduttori da cui si è originata. A questo scopo è stato necessario selezionare un set di marcatori genetici per l'analisi di parentela per stabilire da quali riproduttori discendono gli individui infetti. Il set di marcatori è stato isolato scegliendo tra i *loci* microsatelliti posizionati nella mappa di linkage. I criteri per la selezione sono in accordo con: grado di polimorfismo, dimensione del prodotto di PCR e posizione su gruppi di linkage distinti.

Nonostante l'elevato numero di genitori possibili (>250) e le cattive condizioni di conservazione di molti campioni (morti in seguito all'infezione) è stato possibile attribuire circa il 75% di campioni ad una coppia di genitori. La definizione delle famiglie ha permesso di studiare l'ereditabilità dei caratteri fenotipici misurati nel corso dell'esperimento: la taglia corporea e il tempo di sopravvivenza all'infezione. Come atteso, l'ereditabilità della taglia è significativamente diversa da zero (0.34-0.37) e simile a quanto riportato per altre specie (ad esempio nel branzino il valore oscilla tra 0.3 e 0.6). Al contrario l'ereditabilità della resistenza è risultata assai inferiore e associata ad un errore più ampio. Se questo può essere in parte attribuito al carattere dicotomico di questa caratteristica, è tuttavia noto che l'ereditabilità della resistenza alle patologie è spesso assai limitata. Molto interessante è l'osservazione che esiste una certa ereditabilità di questo carattere quando viene misurata la sopravvivenza nei primi giorni dell'infezione, mentre non sembrano esservi differenze tra famiglie quando si analizzano le fasi più tardive. Sebbene questo possa essere parzialmente dovuto alla ridotta numerosità del campione in queste fasi, è però possibile che in condizioni di titolo elevato e in presenza di un ceppo altamente virulento tutti gli individui finiscano per contrarre la malattia e muoiano, ma che vi sia una importante differenza nel momento in cui iniziano a manifestare i sintomi e la mortalità. In ogni caso, data la limitata ereditabilità e la difficoltà di misurare il carattere, l'unica possibilità di selezionare linee resistenti è data dalla selezione assistita da marcatori.

Per questo motivo, è stato deciso di proseguire con la seconda fase del progetto che prevede una scansione del genoma di orata su cinque famiglie (totale circa 600 animali) mediante

l'uso di 90-100 *loci* microsatelliti (mappa di linkage di seconda generazione). In questo lavoro di tesi sono stati ottimizzati i marcatori genetici per questo tipo di analisi. Inoltre sono stati raccolti tutti i dati genetici per i *loci* selezionati nelle cinque famiglie. Questi dati consentiranno di condurre le analisi per l'identificazione di QTL per la taglia corporea e la resistenza alla pasteurellosi.

## 6. Bibliografia

Alarcón J.A., A. Magoulas, T. Georgakopoulos, E. Kouros, M.C. Alvarez, 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 230: 65-80.

Alessio G., Gandolfi G. Riproduzione artificiale di orata *Sparus aurata* (L.) (Osteichthyes, Sparidae). *Memorie Ist. Lomb. di Scienze e Lettere*. Milano. 1975.

Amos W., Sawcer S.J., Feakers R. W., Rubistein D.C. Microsatellites Show Directional Bias and Heterozigote Instability. *Nature genetics*. 1996 13: 390-391.

Andersson L., Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. *Nature Rev. Genet.*, 2001. 2: 130-138.

Aoki T Drug-resistance plasmids from fish pathogens *Microbiological Science* 1988. 5, 219-223

Bakopoulos V, Adams A & Richards RH Some biochemical properties and antibiotics sensitivities of *Pasteurella piscicida* isolated in Greece and comparison with strains from Japan, France and Italy” *Journal of Fish Diseases*. 1995a 18, 1-7

Bakopoulos V, Pearson M, Volpatti D, Gousmani L, Adams A, Galeotti M, e Dimitriadis GJ Investigation of media formulations promoting differential antigen expression by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and recognition by sea bass, *Dicentrarchus labrax*, (L.), immune sera *Journal of Fish Disease* 2003a 26, 1-13.

Bakopoulos V, Peric Z, Rodger H, Adams A & Richards RH. First Report of Fish Pasteurellosis from Malta 1997c *Aquatic Animal Health* 9, 26-33

Bakopoulos V, Volpatti D, Gousmani L, Galeotti M, Adams A e Dimitriadis GJ Vaccination trails of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, (L.), against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, using novel vaccine *Journal of Fish Disease* 2003b 26, 77-90.



Baptista T, Romalde JL & Toranzo AE First epizootic of pasteurellosis in Portugal affecting cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*). 1996. *Bulletin of the European Association of Fish Pathology* 1, 92-95

Batargias, C., Dermitzakis E., Magoulas A. and Zouros E. Characterization of six polymorphic microsatellite markers in the gilthead seabream, *Sparus aurata* (Linnaeus 1758). *Molecular Ecology*. 1999, 8: 897–898.

Bernatchez L., Duchesne P. Individual-based genotype analysis in studies of parentage and population assignment: how many *loci*, how many alleles? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2000 57: 1-12.

BMR GENOMICS (CRIBI). <http://www.bmr-genomics.it> UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA.

Booke H.E. The stock concept revisited: perspectives on its history in fisheries. *Fisheries Research*. 1999 43(1): 9-11.

Brown R.C., Tsalavouta M., Terzoglou V., Magoulas A. and McAndrew B. J., Additional microsatellites for *Sparus aurata* and cross-species amplification within the Sparidae family. *Molecular Ecology Notes*. 2005, 5: 605.

Candan A, Kucuker MA & Karatas S Pasteurellosis in cultured seabass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 1996, 16, 150-153

Ceschia G, Quaglio F, Giorgetti G, Bertoja G & Bovo G. Serious outbreak of pasteurellosis (*Pasteurella piscicida*) in euryhaline species along the Italian coasts” Abstracts 5th International Conference of the European Association of Fish Pathologists. p.26. 1991. Budapest, Hungary

Chistiakov D.A., B. Hellemans, C.S. Tsigenopoulos, A.S. Law, N. Bartley, D. Bertotto, A. Libertini, G. Kotoulas, C.S. Haley, F. Volckaert, 2004. Development and linkage relationship for new microsatellite marker of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Animal genetics*, 35: 53-57.

Chistiakov DA. Hellemans B. Haley CS. Law AS. Tsigenopoulos CS. A microsatellite linkage map of the European Seabass *Dicentrarchus labrax* (L). *Genetics*. 2005. 170: 1821-1826.

Coimbra M.R.M. Kobayashi K. Koretsugu S. Hasegava O. Ohara E. A genetic map of the Japanese flounder, *Paralictus olivaceus*. *Aquaculture*. 2003. 220:203-218.

Crosetti D., Sola L., Allegrucci G., Libertini A., *Genetica in acquacoltura*. In “Acquacoltura responsabile”, S. Cataudella e P. Bronzi (editori), Unimar-Uniprom, Roma. 2001. 108-121.

Dekkers J.C.M. Hospital F., The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Rev. Genet.*, 2002. 3: 22-32.

Devies N. Roderick G.K.. Determining the pathways of marine bioinvasion: genetical and statistical approaches. J. Pederson (ed.). *Marine Bioinvasions*. 1999. Plenum Press.

De-Xing Zhang, Godfrey M. Hewitt. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. Invited review. *Molecular Ecology*. 2003 12: 563-584.

Duchesne, P., Godbout, M.-H., Bernatchez, L. PAPA (Package for the Analysis of Parental Allocation): A computer program for simulated and real parental allocation. *Molecular Ecology Notes*. 2002 2, 191-194.

Farkas J. & Olah J. Occurrence of *Pasteurella* and *Streptococcus* in sheatfish (*Silurus glanis* L.) and common carp (*Cyprinus carpio* L.) In: *Proceedings of the International Seminar on Fish*. 1981.(ed. by J. Olah, K. Molnar and Z. Jeney)

Fouz B, Toranzo EA, Milan M & Amaro C Evidence that water transmits the disease caused by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* *Journal of Applied Microbiology*. 2000. 88, 531-535

Fouz B, Toranzo EA, Milan M & Amaro C. Evidence that water transmits the disease caused by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* *Journal of Applied Microbiology*. 2000. 88, 531-535

Franch, R., Louro, B., Tsalavouta, M., Chatziplis, D., Tsigenopoulos, C.S., Sarropoulou, E., Antonello, J., Magoulas, A., Mylonas, C.C., Babbucci, M., Patarnello, T., Power, D.M., Kotoulas, G., Bargelloni, L. A genetic linkage map of the hermaphrodite teleost fish *Sparus aurata* L. *Genetics*. 2006. 174, 851-861.

Frerichs GN & Roberts RJ. The bacteriology of teleosts” In: *Fish Pathology* (ed. by Roberts RJ), 1989 pp.289-319. Bailliere Tindall, London, England

Fryer JL & Rohovec JS. Principal bacterial diseases of cultured marine fish” *Helgolander Meeresunters* 1984. 37, 533-545

Garbe, J., and Da Y., *Locusmap* User Manual Version 1.1. Department of Animal Science, University of Minnesota, Minneapolis, St. Paul. 2003

Gauthier G, Lafay B, Ruimy R, Breittmayer V, Nicolas JL, Gauthier M & Christen R.. Small subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pateurella piscicida* (Snieszko *et al.*) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Nov. 1995.45(1), 139-144

Gauthier G, Lafay B, Ruimy R, Breittmayer V, Nicolas JL, Gauthier M & Christen R (1995) “Small subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pateurella piscicida* (Snieszko *et al.*) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as

*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. Nov.” *International Journal of Systematic Bacteriology* 45(1), 139-144

Genaquas, The sixth framework programme. Genome management: towards improved mediterranean aquacultura productivity and sustainability. Acronym: Genaquas. 2003

Gilbey J. Verspoor E. McLay A. Houlihan D. A microsatellite linkage map for Atlantic Salmon(*Salmon salar*). *Anim. Genet.* 2004. 35: 98-105

Goldstein D.B., Ruiz-Linares A., Cavalli-Sforza L.L., Feldman M.W. An Evaluation of genetic distances for use with Microsatellite *loci*. *Genetics.* 1995 139: 463-471.

Green, P., Falls K., and Crooks S. Documentation for CRI-MAP version 2.4. Washington University School of Medicine, St. Louis. 1990

Hamaguchi M & Kusuda R. Field testing of *Pasteurella piscicida* formalin killed bacterin against pseudotuberculosis in cultured yellowtail, *Seriola quinqueradiata*” *Bulletin of the Marine Scientific Fisheries.* 1989 11, 11-16

Hamaguchi M & Kusuda R. The effect of various cultivation periods on the efficacy of formalin killed cell vaccine of *Pasteurella piscicida* in yellowtail” *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 1988. 54, 1847

Hanif A., Bakopoulos V., Leonardos I., Dimitriadis GJ. The effect of seabream (*Sparus aurata*) broodstock and larval vaccination on the susceptibility by *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* and on the humoral immune parameter. *Fish Shellfish Immunology* 2005. 19,345-361.

Hastein T & Bullock GL. An acute septicemic disease of brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) caused by *Pasteurella*-like organism. *Journal of Fish Biology* 1976. 8, 23-26

Hawke JP, Plakas SM, Minton RV, McPhearson RM, Snider & Guarino M Fish Pasteurellosis of cultured striped bass (*Morone saxatilis*) in coastal Alabama *Aquaculture*. 1987. 65, 193-204.

Hawke JP. Pathogenesis and virulence of *Pasteurella piscicida* in hybrid striped bass (*Morone saxatilis* x *Morone chrysops*). International symposium on Aquatic Animal Health. Seattle. Washington. 1994.

Janssen WA & Surgalla MJ Morphology, physiology and serology of *Pasteurella* species pathogenic for white perch (*Roccus americanus*). *Journal of Bacteriology*. 1968 96(5), 1606-1610

Jarne P., Pagoda P.J.L. Microsatellites, from Molecules to Populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, 1996 11: 424-430.

Jones MW & Cox DI. Clinical disease in sea-farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) associated with a member of the family *Pasteurellaceae* – a case history” *Bulletin of the European Association of Fish pathologists*. 1999. 19, 75

Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C., Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*. 2007 16, 1099-1006.

Kawahara E & Kusuda R. Location of *Pasteurella piscicida* antigens in tissues of yellowtail *Seriola quinqueradiata* vaccinated by immersion. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific fisheries* 1987. 54, 1101-1105

Kawahara E, Fukuda Y & Kusuda R Serological differences among *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolates *Fish Pathology*. 1998. 33, 281-285

Kimbrell D.A, B. Beutler

Kocher T.D., Thomas W.K., Meyer A. *et al.* Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1989 86: 6196-6200.

Kubota S, Kimura M & Egusa S Studies on a bacterial tuberculoidosis of the yellowtail II. Mechanism of nodule formation *Fish Pathology*. 1972. 6(2), 69-72

Kubota S, Kimura M & Egusa S Studies on bacterial tuberculosis of the yellowtail. I Symptomatology and histopathology *Fish Pathology* 1970 4(2), 11-118

Kubota S, Kimura M & Egusa S Studies on bacterial tuberculosis of the yellowtail - I Symptomatology and histopathology. 1970 *Fish Pathology* 4(2), 11-118

Kubota S, Kimura M & Egusa S. Studies on a bacterial tuberculoidosis of the yellowtail II. Mechanism of nodule formation *Fish Pathology*. 1972 6(2), 69-72

Kusuda R & Hamaguchi M. A comparative study on efficacy of immersion and a combination of immersion and oral vaccination methods against pseudotuberculosis in yellowtail *Nippon Suisan Gakkaishi* 1987. 53, 1005-1008

Launey, S., Krieg F., Haffray P., Bruant J.-S., Vannier A. *et al.*, Twelve new microsatellite markers for gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): characterization, polymorphism and linkage. *Molecular Ecology Notes*. 2003, 3: 457–459.

Lewis DH, Crumbles LC, McConnell S & Flowers AI. *Pasteurella*-like bacteria from an epizootic in menhaden and mullet from Galveston bay. *Jouranl of Wildlife Diseases* 1970. 6, 160-163

Litt M. e J.A. Luty, A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*. 1989 44: 397-401.

Liu PC, Lin JY & Lee KK. Virulence of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in cultured coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Journal of Basic Microbiology*. 2003. 43(6): 499-507

Magarinos B, Pazos F, Santos Y, Romalde JL & Toranzo AE Response of *Pasteurella piscicida* and *Flexibacter maritimus* to skin mucus of marine fish *Diseases of Aquatic Organisms*. 1995 21, 103-108

Magarinos B, Romalde JL, Bandin I, Fouz B & Toranzo AE Phenotypic, antigenic and molecular characterization of *Pasteurella piscicida* strains isolated from fish” *Applied Environmental Microbiology* 1992 58(10), 3316-3322

Magarinos B, Romalde JL, Barja JL & Toranzo AE. Evidence of a dormant but infective state of the fish pathogen *Pasteurella piscicida* in seawater and sediment *Applied and Environmental Microbiology*. 1994. 60, 180-186

Magarinos B, Romalde JL, Barja JL Nunez S. Toranzo AE. Protection of gilthead seabream against pasteurellosis at the larval stages. *Bull. Eur. Assoc. of Fish Pathology*. 1999. 19, 159-161

Magariños B, Romalde JL, Santos Y, Casal JF, Barja JL & Toranzo AE Vaccination trials on gilthead seabream (*Sparus aurata*) against *Pasteurella piscicida* *Aquaculture* 1994d 120, 201-208

Magarinos B, Toranzo AE & Romalde JL “Phenotypic and pathobiological characteristics of *Pasteurella piscicida*” *Annual review of fish diseases*. 1996. 6, 41-64

Magarinos B, Toranzo AE, Barja JL & Romalde JL “Existence of two geographically-linked clonal lineages in the bacterial fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* evidenced by random amplified polymorphic DNA analysis” *Epidemiology. Infect.* 2000. 125, 213-219

Moen T, Hoyheim B, Munck H, Gomez-Raya L. A linkage map of Atlantic Salmonn salar) reveals an uncommonly large difference in recombination rate between the sexes. *Anim. Genet.* 2004. 35: 81-92

Moretti A., Pedini Fernandez-Criado M., Cittolin G., Guidasti R. Manual on Hatchery Production of Seabass and Gilthead Seabream. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Rome. 1999

Noga EJ *Fish Disease. Diagnosis and Treatment* Mosby-Year Book Inc, Missouri. 1996

Noya M, Magarinos B & Lamas J Intraperitoneal and dietary administration of glucan affects the non specific immune response and the resistance of gilthead seabream, *Sparus aurata*, to pasteurellosis In: *Proceedings of the 5th National Congress on Aquaculture* (ed. by Castello F, Calderer A). 1995. pp.734-739. Publ.Universidad de Barcelona, Spain

Noya M, Magarinos B, Toranzo AE & lamas J. Sequential pathology of experimental pasteurellosis in gilthead seabream, *Sparus aurata*. A light-and electron microscopic study. *Diseases of Aquatic Organisms* 1995 21, 177-186

Ohnishi K, Sugiyama T & Ueki N. *Pasteurella* infection in young black seabream *Fish Pathology*. 1982. 16, 207-210

Orrel T.M. Carpenter KE. A phylogeny of the fish family sSparidae (porgies) inferred from mithcondrial sequence data. *Molecular phylogenetic Evol.* 2004 32:425-434

Ouborg N.J., Piquot Y., Van Groenendael J.M. Population Genetics, Molecular Markers and the Study of Dispersal in Plants. *Journal of ecology*. 1999 87: 551-568.

Poli B.M. Le buone pratiche di allevamento, ovvero qualità e cambiamenti di qualità sotto controllo. *Il Pesce*, 2003 2: 51-55.



Rassman K., Schlotterer C., Tautz D. Isolation of simple sequence *loci* for use in polymerase chain reaction-based dna fingerprinting. *Electrophoresis*. 1991 12: 113-118.

Romalde J.L. Photobacterium damsela subsp. Piscicida: an integrated view of bacterial fish pathogen. *Int. Microbiol.* 2002. 5, 3-9

Rozen, S., Skaletsky H., Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Molecular Biology* 2000, 132: 365–386.

Sakamoto T. Danzmann RG. Gharbi K. Oward P. Ozaki A. *et al.*, A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex specific differences in recombination rates. *Genetics*. 2000. 155: 1331-1345

Samadi S., Erard F., Estoup A., Jarne P. The influence of mutation, selection and reproductive system on microsatellite variability: a simulation approach. *Genetic research*. 1998 71: 213-222.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY; 1989

Sarropoulou E., Franch R., Louro B., Power D.M., Bargelloni L., Magoulas A., Senger F., Tsalavouta M., Patarnello T., Galibert F., Kotoulas G., Geisler R. “A gene-based radiation hybrid map of the gilthead seabream *Sparus aurata* refines and exploits conserved synteny with *Tetraodon nigroviridens*.” *BMC Genomics*, 2007. Feb., 8:44

Schlötterer C e D. Tautz. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*. 1992 20: 211-215

Senger F., Priat C., Hitte C., Sarropoulou E., Franch R., Geisler R., Bargelloni L., Power D., Galibert F. The first radiation hybrid map of a perch-like fish: the gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.). *Genomics* 2006. 87: 793-800.

Singer A., Perlman H., Yan Y.L., Walker C. Corley-Smith G. *et al.* Sex specific recombination rates in zebrafish (*Danio rerio*). *Genetics*. 2002.160:649-657

Snieszko Sf, Bullock GL, Hollis E, & Boone JG. *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. *Journal of Bacteriology* 1964 88, 1814-1815

Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*. 1989. 17: 6463-6471

Toranzo A.E. Magarinos B. Romaldo J.L. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture system. *Aquaculture*. 2005 246,37-61.

Toranzo AE, Barreiro S, Casal JF, Figueras A, Magarinos B & Barja JL Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): first report in Spain. *Aquaculture*. 1991 99, 1-15

Toranzo AE, Barreiro S, Casal JF, Figueras A, Magarinos B & Barja JL Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): first report in Spain. *Aquaculture* 1991. 99, 1-15

Tsigenopoulos C.S, Hellemans B., Chistiakov D.A., Libertini A., Kotoulas G. *et al.* Eleven new microsatellites of the seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Molecular Ecology notes*. 2003. 3:352-354.

Tsigenopoulos C.S., B. Hellemans, A. Chistiakov, A. Libertini, G. Kotoulas, F. Volckaert, 2003. Eleven new microsatellites of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Molecular Ecology Notes*, 3: 352-354.

Tung MC, Tsai SS, Ho LF, Huang ST & Chen SC. An acute septicemic infection of *Pasteurella* organism in pond-cultured Formosa snake-head fish (*Channa maculata* Lacepede) in Taiwan. *Fish Pathology*. 1985.20, 143-148

Waldbieser G.C. Boswort B.G. Noneman D.J. Wolters WR A microsatellite based genetic linkage map for channel catfish: *Ictalurus punctatus*. *Genetics* 2001. 158: 727-734.

Weer J.L. e P.E. May. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*. 1989 44: 388-396.

Zane L., Bargelloni L., Patarnello T. Strategies for Microsatellite Isolation: a review. *Molecular ecology* . 2002 11(1): 1-16.

Zappulli V, Patarnello T, Patarnello P, Frassinetti F, Franch R, Manfrin A, Castagnaro M, Bargelloni L."Direct identification of *Photobacterium damsela* subspecies *piscicida* by PCR-RFLP analysis", *Dis. Aquat. Organ*. 2005 Jun 14;65(1):53-61.

Zhivotovsky L.A., Feldman M.W. Microsatellite Variability and Genetic Distances. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1995 92, 11549-11552.

| Nome locus | n. | Nome locus | n.  | Nome locus | n.  | Nome locus | n.  |
|------------|----|------------|-----|------------|-----|------------|-----|
| 'Ad-05-F   | 0  | 'Bd-71-F   | 51  | 'Bld-10-T  | 101 | 'SAGT41a   | 151 |
| 'Ad-12-F   | 1  | 'Fd-81-F   | 52  | 'Dld-03-T  | 102 | 'SAGT1     | 152 |
| 'Ad-20-F   | 2  | 'Hd-10-F   | 53  | 'Eld-02-T  | 103 | 'SAGT26    | 153 |
| 'Bd-03-H   | 3  | 'Ed-01-H   | 54  | 'Cld-14-F  | 104 | 'Sai21     | 154 |
| 'Bd-06-H   | 4  | 'Fd-92-H   | 55  | 'Dld-22-F  | 105 | 'Saul47    | 155 |
| 'Bd-61-H   | 5  | 'ld-11-H   | 56  | 'Eld-36-F  | 106 | 'SAI14     | 156 |
| 'Ad-21-T   | 6  | 'Ed-31-T   | 57  | 'Cld-35-H  | 107 | 'SAI19     | 157 |
| 'Bd-48-T   | 7  | 'Gd-72-T   | 58  | 'Dld-07-H  | 108 | 'SaGT32    | 158 |
| 'Bd-68-T   | 8  | 'Hd-23-T   | 59  | 'Dld-31-H  | 109 | 'Ed84      | 159 |
| 'Ad-54-F   | 9  | 'Dld-16-F  | 60  | 'Bld-39-T  | 110 | 'Ef7b      | 160 |
| 'Ad-66-F   | 10 | 'Gd-78-F   | 61  | 'Eld-04-T  | 111 | 'Ef6       | 161 |
| 'Bd-54-F   | 11 | 'ld-27-F   | 62  | 'Cld-32-F  | 112 | 'P33       | 162 |
| 'Ad-86-H   | 12 | 'Cld-89-H  | 63  | 'Dld-12-F  | 113 | 'Gt57      | 163 |
| 'Bd-14-H   | 13 | 'Fd-90-H   | 64  | 'Eld-06-F  | 114 | 'Bt96      | 164 |
| 'Bd-29-H   | 14 | 'ld-42-H   | 65  | 'Cld-65-H  | 115 | 'SAGT31    | 165 |
| 'Bd-36-T   | 15 | 'Bld-09-T  | 66  | 'Eld-41-H  | 116 | 'SAI15     | 166 |
| 'Bd-86-T   | 16 | 'Cld-29-T  | 67  | 'Hd-70-H   | 117 | 'Ed14      | 167 |
| 'Fd-42-T   | 17 | 'Cld-31-T  | 68  | 'Dld-18-T  | 118 | 'Simbb9    | 168 |
| 'Ad-75-F   | 18 | 'Cld-03-F  | 69  | 'Eld-14-T  | 119 | 'P19       | 169 |
| 'Bd-08-F   | 19 | 'Fd-48-F   | 70  | 'Eld-39-T  | 120 | 'Fd6-10    | 170 |
| 'Gd-46-F   | 20 | 'ld-13-F   | 71  | 'Bld-15-F  | 121 | 'At34      | 171 |
| 'Bd-72-H   | 21 | 'Gd-64-H   | 72  | 'Cld-21-F  | 122 | 'Dt23      | 172 |
| 'Bd-75-H   | 22 | 'Hd-49-H   | 73  | 'Eld-38-F  | 123 | 'P3        | 173 |
| 'Dd-16-T   | 23 | 'Cld-10-T  | 74  | 'Dld-14-H  | 124 | 'Ct27      | 174 |
| 'Dd-41-T   | 24 | 'Cld-91-T  | 75  | 'Dld-19-H  | 125 | 'Saimbb20  | 175 |
| 'Bd-58-F   | 25 | 'Gd-60-T   | 76  | 'Eld-11-H  | 126 | 'Saimbb14  | 176 |
| 'Bd-77-F   | 26 | 'Bld-04-F  | 77  | 'Dld-04-T  | 127 | 'Saimbb18  | 177 |
| 'Bt-34-H   | 27 | 'Hd-45-F   | 78  | 'Eld-10-T  | 128 | 'Ed86      | 178 |
| 'Dd-10-H   | 28 | 'Hd-77-F   | 79  | 'Eld-17-T  | 129 | 'Saimbb25  | 179 |
| 'Dd-63-H   | 29 | 'Cld-24-H  | 80  | 'Dld-09-F  | 130 | 'Saimbb26  | 180 |
| 'Dd-57-T   | 30 | 'Hd-15-H   | 81  | 'Bld-36-H  | 131 | 'Saimbb13  | 181 |
| 'Dd-68-T   | 31 | 'ld-39-H   | 82  | 'Eld-08-H  | 132 | 'Saimbb23  | 182 |
| 'Dd-77-T   | 32 | 'Cld-11-T  | 83  | 'Eld-13-H  | 133 | 'Saimbb29  | 183 |
| 'Ad-10-F   | 33 | 'Cld-52-T  | 84  | 'Eld-37-T  | 134 | 'Saimbb3   | 184 |
| 'Bt-14-F   | 34 | 'Cld-71-T  | 85  | 'P60       | 135 | '2G        | 185 |
| 'Dd-56-F   | 35 | 'Cld-48-F  | 86  | 'At37      | 136 | 'C90b      | 186 |
| 'Bd-63-H   | 36 | 'Eld-05-F  | 87  | 'P96       | 137 | '48EP      | 187 |
| 'Dd-55-H   | 37 | 'Hd-25-F   | 88  | 'SAI10     | 138 | '184EP     | 188 |
| 'Dd-84-H   | 38 | 'Fd-78-H   | 89  | 'SAI12     | 139 | '172EP     | 189 |
| 'Dld-24-T  | 39 | 'Hd-28-H   | 90  | 'SaiGT41b  | 140 | 'C77b      | 190 |
| 'Fd-46-T   | 40 | 'ld-14-H   | 91  | 'P20       | 141 | 'B6b       | 191 |
| 'Hd-46-T   | 41 | 'Bld-43-T  | 92  | 'P54       | 142 | 'B13b      | 192 |
| 'Dd-91-F   | 42 | 'Cld-84-T  | 93  | 'P48       | 143 | 'G4        | 193 |
| 'Ed-02-F   | 43 | 'ld-25-T   | 94  | 'Dt93      | 144 | 'G1        | 194 |
| 'Hd-33-F   | 44 | 'Bld-18-F  | 95  | 'Gt82      | 145 | 'C67b      | 195 |
| 'Ad-07-H   | 45 | 'Hd-01-F   | 96  | 'Ct40      | 146 | 'B26b      | 196 |
| 'Ad-29-H   | 46 | 'Hd-91-F   | 97  | 'Dt47      | 147 | 'B18b      | 197 |
| 'Bd-20-H   | 47 | 'Cld-26-H  | 98  | 'Saimbb16  | 148 | 'C80b      | 198 |
| 'Cld-44-T  | 48 | 'Gd-67-H   | 99  | 'Saimbb1   | 149 | 'B76b      | 199 |
| 'Dld-30b-T | 49 | 'Hd-39-H   | 100 | 'P82       | 150 | '190EP     | 200 |

| Nome locus   | n. Nome locus    | n. Nome locus      | n.  |
|--------------|------------------|--------------------|-----|
| 'B29b        | 201 '311-KD7G06  | 251 'CL120Cng1     | 301 |
| 'B82b        | 202 '317-Sub23   | 252 'cDN03P05K21   | 302 |
| 'C94b        | 203 'G5-AF478569 | 253 'cDN13P03B17   | 303 |
| 'Did70-F     | 204 'B96b        | 254 'CL428Cng1     | 304 |
| 'Fid57-H     | 205 'cDN06P04F01 | 255 'cDN05P05B16   | 305 |
| 'Fid20-T     | 206 'A76b        | 256 'CL959Cng1     | 306 |
| 'Eid49-F     | 207 '329-KD7H12  | 257 'CDN01P01G08   | 307 |
| 'Did74-H     | 208 'SA-E32B-C12 | 258 'cDN10P06I02   | 308 |
| 'Eid45-T     | 209 'cDN02P03J11 | 259 'CL4643Cng1    | 309 |
| 'Fid28-F     | 210 'SauA25INRA  | 260 'CL848Cng1     | 310 |
| 'Did73-H     | 211 'SauANINRA   | 261 'cDN11P02G23   | 311 |
| 'Fid06-T     | 212 'SauD82INRA  | 262 'CDN12P01K14   | 312 |
| 'Did69-F     | 213 'C1          | 263 'cDN14P04O13   | 313 |
| 'Fid13-T     | 214 'C12b        | 264 'cDN01P04C20   | 314 |
| 'Fid10-F     | 215 'cskil       | 265 'CDN11P02A06   | 315 |
| 'Fid56-H     | 216 'DLZ-070     | 266 'CL4643Contig1 | 316 |
| 'Fid61-T     | 217 'C11         | 267 'CL1014Contig1 | 317 |
| 'Fid34-F     | 218 'SauG46      | 268 'CL2729Contig1 | 318 |
| 'Fid15-IIH   | 219 'SauK140     | 269 'CL2598Contig1 | 319 |
| 'Eid44-T     | 220 'SauE82      | 270 'CL2595Contig1 | 320 |
| 'Eid16-H     | 221 'G2          | 271 'CDN12P05L02   | 321 |
| 'Gd28-H      | 222 'G6          | 272 'cDN02P05J04   | 322 |
| 'Fid08-T     | 223 'G9          | 273 'cDN05P03P17   | 323 |
| 'Fid18-T     | 224 'SauE97      | 274 'CL5100Contig1 | 324 |
| 'Fid43-T     | 225 'Sau69       | 275 'CL2019Contig1 | 325 |
| 'Sau0013G07  | 226 'CL219-di    | 276 'CL2032Contig1 | 326 |
| 'cDN11-CL30  | 227 'CL2335cng1  | 277                |     |
| 'Sau0007A12  | 228 'CDN11P03K18 | 278                |     |
| '444-F02     | 229 'CL3295cng1  | 279                |     |
| '257-EP9F10c | 230 'CDN02P01C17 | 280                |     |
| 'SA-L1A-17   | 231 'cDN09P05N05 | 281                |     |
| 'cDN05P01L04 | 232 'cDN12P01M10 | 282                |     |
| 'SA-E87-T3   | 233 'Cdn05p03c12 | 283                |     |
| 'SpauPP1C    | 234 'cDN06P01M14 | 284                |     |
| '414-A11     | 235 'cDN14P01H06 | 285                |     |
| 'cDN05P01O09 | 236 'CL3420cng1  | 286                |     |
| '1843-IC21   | 237 'CL2163cng1  | 287                |     |
| 'B56b        | 238 'CL2416cng1a | 288                |     |
| 'Sau0017G05  | 239 'CL324cng1   | 289                |     |
| 'SA-E27B-B02 | 240 'cDN04P02A13 | 290                |     |
| 'cDN04P03A07 | 241 'cDN11P04B17 | 291                |     |
| 'SA-E27A-D11 | 242 'CL1330cng1  | 292                |     |
| '611-IC1A12  | 243 'CDN13P05H11 | 293                |     |
| 'Sau0009D07  | 244 'CL3102cng1  | 294                |     |
| 'cDN14-CL77  | 245 'CL1275cng1  | 295                |     |
| 'SA-L255     | 246 'CL2750Cng1  | 296                |     |
| 'SpauPK713   | 247 'cDN09P03E23 | 297                |     |
| 'cDN11P02N01 | 248 'cDN12P03I09 | 298                |     |
| 'SA-E32B-C09 | 249 'CDN12P01H03 | 299                |     |
| 'cDN05P04N23 | 250 'CL577Cng1   | 300                |     |

## AT147XAT151

|    |          |    |          |     |          |
|----|----------|----|----------|-----|----------|
| 1  | Sa01_A04 | 52 | Sa06_G11 | 103 | Sa13_H11 |
| 2  | Sa01_B04 | 53 | Sa07_A01 | 104 | Sa14_A01 |
| 3  | Sa01_C11 | 54 | Sa07_B07 | 105 | Sa14_A10 |
| 4  | Sa01_D11 | 55 | Sa07_C11 | 106 | Sa14_B08 |
| 5  | Sa01_E03 | 56 | Sa07_E05 | 107 | Sa14_C06 |
| 6  | Sa01_G07 | 57 | Sa07_F02 | 108 | Sa14_C10 |
| 7  | Sa01_H03 | 58 | Sa07_F04 | 109 | Sa14_D02 |
| 8  | Sa01_H05 | 59 | Sa07_G01 | 110 | Sa14_D05 |
| 9  | Sa02_B11 | 60 | Sa07_G07 | 111 | Sa14_D09 |
| 10 | Sa02_F05 | 61 | Sa09_A09 | 112 | Sa14_D11 |
| 11 | Sa02_H11 | 62 | Sa09_B12 | 113 | Sa14_D12 |
| 12 | Sa03_B08 | 63 | Sa09_C03 | 114 | Sa14_E02 |
| 13 | Sa03_C03 | 64 | Sa09_D01 | 115 | Sa14_E04 |
| 14 | Sa03_D12 | 65 | Sa09_F05 | 116 | Sa14_E08 |
| 15 | Sa03_F04 | 66 | Sa09_F11 | 117 | Sa14_E10 |
| 16 | Sa03_F06 | 67 | Sa09_H04 | 118 | Sa14_F04 |
| 17 | Sa03_F09 | 68 | Sa09_H12 | 119 | Sa14_H07 |
| 18 | Sa03_H04 | 69 | Sa10_B02 | 120 | Sa15_A12 |
| 19 | Sa04_A02 | 70 | Sa10_E08 | 121 | Sa15_C10 |
| 20 | Sa04_A05 | 71 | Sa10_F07 | 122 | Sa15_D06 |
| 21 | Sa04_B04 | 72 | Sa10_G07 | 123 | Sa15_E06 |
| 22 | Sa04_B08 | 73 | Sa11_A03 | 124 | Sa15_E08 |
| 23 | Sa04_B12 | 74 | Sa11_B08 | 125 | Sa15_F08 |
| 24 | Sa04_C05 | 75 | Sa11_D07 | 126 | Sa15_G03 |
| 25 | Sa04_C10 | 76 | Sa11_E06 | 127 | Sa15_H01 |
| 26 | Sa04_C11 | 77 | Sa11_F06 | 128 | Sa16_A05 |
| 27 | Sa04_D04 | 78 | Sa11_F07 | 129 | Sa16_A08 |
| 28 | Sa04_D06 | 79 | Sa11_F08 | 130 | Sa16_C05 |
| 29 | Sa04_E02 | 80 | Sa11_G03 | 131 | Sa16_D04 |
| 30 | Sa04_G10 | 81 | Sa11_H12 | 132 | Sa16_E09 |
| 31 | Sa04_H02 | 82 | Sa12_A11 | 133 | Sa16_F03 |
| 32 | Sa04_H04 | 83 | Sa12_B03 | 134 | Sa16_G04 |
| 33 | Sa05_A11 | 84 | Sa12_B04 | 135 | Sa16_H02 |
| 34 | Sa05_B05 | 85 | Sa12_B12 | 136 | Sa16_H10 |
| 35 | Sa05_C02 | 86 | Sa12_D01 | 137 | Sa17_A03 |
| 36 | Sa05_C04 | 87 | Sa12_E09 | 138 | Sa17_B01 |
| 37 | Sa05_C11 | 88 | Sa12_E10 | 139 | Sa17_B08 |
| 38 | Sa05_D03 | 89 | Sa12_G03 | 140 | Sa17_B11 |
| 39 | Sa05_D06 | 90 | Sa12_G07 | 141 | Sa17_D09 |
| 40 | Sa05_D08 | 91 | Sa12_G08 | 142 | Sa17_F04 |
| 41 | Sa05_E02 | 92 | Sa12_H08 | 143 | Sa17_F06 |
| 42 | Sa05_E08 | 93 | Sa13_A04 | 144 | Sa18_E03 |
| 43 | Sa05_G02 | 94 | Sa13_A05 | 145 | Sa18_E04 |
| 44 | Sa05_H03 | 95 | Sa13_A10 | 146 | Sa21_B07 |
| 45 | Sa06_A01 | 96 | Sa13_B04 | 147 | Sa21_D12 |
| 46 | Sa06_B08 | 97 | Sa13_D04 | 148 | Sa21_E12 |
| 47 | Sa06_B11 | 98 | Sa13_D08 | 149 | Sa21_F06 |
| 48 | Sa06_C09 | 99 | Sa13_D09 | 150 | Sa21_G06 |

|    |          |     |          |     |          |
|----|----------|-----|----------|-----|----------|
| 49 | Sa06_D09 | 100 | Sa13_D12 | 151 | Sa21_G12 |
| 50 | Sa06_F07 | 101 | Sa13_G02 |     |          |
| 51 | Sa06_G01 | 102 | Sa13_H07 |     |          |

**AT160**

|     |                 |     |                 |
|-----|-----------------|-----|-----------------|
| 152 | Sa02_A05        | 201 | Sa11_H02        |
| 153 | Sa02_A11        | 202 | Sa12_D10        |
| 154 | Sa02_D08        | 203 | Sa12_E12        |
| 155 | Sa02_D09        | 204 | Sa13_B05        |
| 156 | Sa02_D12        | 205 | Sa13_C02        |
| 157 | Sa02_G01        | 206 | Sa13_C05        |
| 158 | Sa02_G02        | 207 | Sa14_C04        |
| 159 | Sa02_H12        | 208 | Sa14_E09        |
| 160 | Sa03_A06        | 209 | Sa14_G09        |
| 161 | Sa03_B03        | 210 | Sa14_G11        |
| 162 | <b>Sa03_C07</b> | 211 | Sa14_G12        |
| 163 | Sa03_D09        | 212 | Sa15_C02        |
| 164 | Sa03_G04        | 213 | Sa15_E02        |
| 165 | <b>Sa04_D12</b> | 214 | Sa16_A02        |
| 166 | Sa04_E11        | 215 | Sa16_B04        |
| 167 | Sa05_G03        | 216 | <b>Sa16_C09</b> |
| 168 | Sa06_A09        | 217 | Sa16_F11        |
| 169 | Sa06_B01        | 218 | Sa16_H07        |
| 170 | Sa06_C06        | 219 | Sa17_A07        |
| 171 | Sa06_C10        | 220 | Sa17_G01        |
| 172 | Sa06_H03        | 221 | Sa17_H11        |
| 173 | Sa07_B11        | 222 | Sa18_F01        |
| 174 | Sa07_E03        | 223 | <b>Sa21_B05</b> |
| 175 | <b>Sa07_F11</b> | 224 | Sa21_H11        |
| 176 | <b>Sa08_C07</b> |     |                 |
| 177 | <b>Sa08_D03</b> |     |                 |
| 178 | Sa08_D10        |     |                 |
| 179 | <b>Sa08_E12</b> |     |                 |
| 180 | <b>Sa08_G11</b> |     |                 |
| 181 | Sa09_A05        |     |                 |
| 182 | <b>Sa09_C05</b> |     |                 |
| 183 | Sa09_D04        |     |                 |
| 184 | Sa09_E03        |     |                 |
| 185 | Sa09_E05        |     |                 |
| 186 | Sa09_E07        |     |                 |
| 187 | Sa09_F04        |     |                 |
| 188 | Sa09_G09        |     |                 |
| 189 | Sa10_E01        |     |                 |
| 190 | Sa10_F11        |     |                 |
| 191 | Sa10_G08        |     |                 |
| 192 | Sa10_G10        |     |                 |
| 193 | Sa10_H02        |     |                 |
| 194 | Sa11_C03        |     |                 |
| 195 | Sa11_C04        |     |                 |

|     |          |
|-----|----------|
| 196 | Sa11_C06 |
| 197 | Sa11_D02 |
| 198 | Sa11_F04 |
| 199 | Sa11_F11 |
| 200 | Sa11_G06 |

## AT170

|     |                 |     |                 |
|-----|-----------------|-----|-----------------|
| 225 | <b>Sa01_A12</b> | 276 | Sa12_E07        |
| 226 | Sa01_C01        | 277 | <b>Sa12_F05</b> |
| 227 | <b>Sa01_E08</b> | 278 | Sa13_C04        |
| 228 | Sa01_F08        | 279 | <b>Sa13_F09</b> |
| 229 | Sa01_F10        | 280 | Sa14_B06        |
| 230 | Sa01_G08        | 281 | Sa14_C08        |
| 231 | Sa01_H02        | 282 | Sa14_D04        |
| 232 | <b>Sa02_B02</b> | 283 | Sa14_D06        |
| 233 | Sa02_C03        | 284 | Sa14_G07        |
| 234 | <b>Sa02_D03</b> | 285 | <b>Sa15_A08</b> |
| 235 | Sa02_E08        | 286 | <b>Sa15_B07</b> |
| 236 | <b>Sa02_E10</b> | 287 | Sa15_B08        |
| 237 | Sa02_F10        | 288 | Sa15_B09        |
| 238 | <b>Sa03_D03</b> | 289 | <b>Sa15_D03</b> |
| 239 | <b>Sa03_D10</b> | 290 | Sa15_F11        |
| 240 | <b>Sa03_F11</b> | 291 | Sa15_H08        |
| 241 | Sa04_C04        | 292 | Sa16_A03        |
| 242 | <b>Sa04_F01</b> | 293 | <b>Sa16_B08</b> |
| 243 | Sa04_H08        | 294 | <b>Sa16_B11</b> |
| 244 | Sa05_G08        | 295 | Sa16_C03        |
| 245 | Sa06_C01        | 296 | Sa16_D11        |
| 246 | Sa06_D08        | 297 | Sa16_H04        |
| 247 | Sa06_E12        | 298 | Sa17_B07        |
| 248 | Sa06_F02        | 299 | Sa17_B12        |
| 249 | Sa06_H08        | 300 | Sa17_C07        |
| 250 | Sa07_G04        | 301 | Sa17_D07        |
| 251 | Sa08_A06        | 302 | Sa21_C07        |
| 252 | Sa08_G06        | 303 | Sa21_C12        |
| 253 | <b>Sa09_A01</b> | 304 | Sa21_E06        |
| 254 | Sa09_B05        | 305 | Sa21_H09        |
| 255 | <b>Sa09_B08</b> |     |                 |
| 256 | Sa09_D02        |     |                 |
| 257 | Sa09_E04        |     |                 |
| 258 | Sa09_E09        |     |                 |
| 259 | Sa09_E10        |     |                 |
| 260 | Sa09_G08        |     |                 |
| 261 | <b>Sa09_G11</b> |     |                 |
| 262 | Sa10_A07        |     |                 |
| 263 | Sa10_A08        |     |                 |
| 264 | <b>Sa10_B04</b> |     |                 |
| 265 | Sa10_B12        |     |                 |
| 266 | Sa10_E05        |     |                 |



|     |                 |
|-----|-----------------|
| 267 | <b>Sa10_E06</b> |
| 268 | Sa10_E09        |
| 269 | Sa10_E11        |
| 270 | Sa10_H08        |
| 271 | Sa11_A04        |
| 272 | Sa11_B09        |
| 273 | Sa11_D11        |
| 274 | Sa11_G04        |
| 275 | Sa12_A05        |

**AT172**

|     |                 |     |                 |     |                 |
|-----|-----------------|-----|-----------------|-----|-----------------|
| 306 | Sa01_B02        | 357 | <b>Sa07_B04</b> | 408 | Sa14_A09        |
| 307 | Sa01_D02        | 358 | Sa07_C03        | 409 | Sa14_A12        |
| 308 | Sa01_E09        | 359 | Sa07_C04        | 410 | Sa14_B07        |
| 309 | Sa01_E12        | 360 | Sa07_C08        | 411 | Sa14_B11        |
| 310 | Sa01_F05        | 361 | Sa07_D05        | 412 | Sa14_C03        |
| 311 | Sa02_A04        | 362 | Sa07_D06        | 413 | Sa14_C05        |
| 312 | Sa02_C01        | 363 | Sa07_D07        | 414 | Sa14_E05        |
| 313 | Sa02_D04        | 364 | Sa07_G03        | 415 | Sa14_F11        |
| 314 | Sa02_E09        | 365 | Sa07_H02        | 416 | Sa14_G03        |
| 315 | Sa02_G10        | 366 | Sa07_H06        | 417 | Sa14_H01        |
| 316 | Sa02_G12        | 367 | <b>Sa08_C03</b> | 418 | Sa14_H12        |
| 317 | Sa02_H01        | 368 | Sa09_A11        | 419 | Sa15_A02        |
| 318 | <b>Sa03_A02</b> | 369 | Sa09_D09        | 420 | Sa15_A11        |
| 319 | <b>Sa03_A08</b> | 370 | Sa09_G02        | 421 | Sa15_C06        |
| 320 | Sa03_E11        | 371 | Sa10_B07        | 422 | Sa15_E07        |
| 321 | Sa04_A11        | 372 | Sa10_D02        | 423 | Sa15_E10        |
| 322 | Sa04_A12        | 373 | Sa11_A01        | 424 | Sa15_F02        |
| 323 | Sa04_B01        | 374 | Sa11_A02        | 425 | Sa15_F06        |
| 324 | Sa04_B02        | 375 | Sa11_A07        | 426 | Sa15_G12        |
| 325 | Sa04_C12        | 376 | Sa11_B10        | 427 | Sa16_B03        |
| 326 | Sa04_E06        | 377 | Sa11_C07        | 428 | Sa16_C11        |
| 327 | <b>Sa04_F02</b> | 378 | Sa11_C09        | 429 | Sa16_F05        |
| 328 | Sa04_F09        | 379 | Sa11_C12        | 430 | Sa16_G05        |
| 329 | <b>Sa04_F11</b> | 380 | Sa11_D09        | 431 | Sa16_G06        |
| 330 | Sa05_B07        | 381 | Sa11_E04        | 432 | Sa16_G07        |
| 331 | Sa05_B11        | 382 | Sa11_F03        | 433 | Sa16_H06        |
| 332 | Sa05_C03        | 383 | Sa11_F12        | 434 | Sa16_H09        |
| 333 | Sa05_C06        | 384 | Sa11_G02        | 435 | Sa16_H12        |
| 334 | Sa05_C09        | 385 | Sa11_G12        | 436 | Sa17_B05        |
| 335 | Sa05_D12        | 386 | Sa11_H03        | 437 | Sa17_C12        |
| 336 | Sa05_E01        | 387 | Sa11_H04        | 438 | Sa17_D05        |
| 337 | Sa05_E03        | 388 | Sa12_B08        | 439 | Sa17_D12        |
| 338 | Sa05_G01        | 389 | Sa12_C03        | 440 | Sa17_F01        |
| 339 | Sa05_G04        | 390 | Sa12_C06        | 441 | Sa17_G02        |
| 340 | Sa06_C04        | 391 | Sa12_F03        | 442 | Sa17_H07        |
| 341 | Sa06_C05        | 392 | Sa12_F06        | 443 | Sa18_B01        |
| 342 | Sa06_D06        | 393 | Sa12_H03        | 444 | <b>Sa18_B05</b> |
| 343 | Sa06_E02        | 394 | Sa12_H10        | 445 | Sa18_C02        |

|     |                 |     |          |     |          |
|-----|-----------------|-----|----------|-----|----------|
| 344 | Sa06_E03        | 395 | Sa13_A01 | 446 | Sa18_D01 |
| 345 | Sa06_F01        | 396 | Sa13_A06 | 447 | Sa21_H10 |
| 346 | Sa06_F09        | 397 | Sa13_D05 | 448 | Sa21_H12 |
| 347 | Sa06_G02        | 398 | Sa13_E01 |     |          |
| 348 | <b>Sa06_G05</b> | 399 | Sa13_E10 |     |          |
| 349 | Sa06_G08        | 400 | Sa13_E11 |     |          |
| 350 | Sa06_H04        | 401 | Sa13_F02 |     |          |
| 351 | Sa06_H07        | 402 | Sa13_F07 |     |          |
| 352 | <b>Sa06_H09</b> | 403 | Sa13_G07 |     |          |
| 353 | Sa06_H11        | 404 | Sa13_H02 |     |          |
| 354 | Sa07_A03        | 405 | Sa13_H10 |     |          |
| 355 | Sa07_A05        | 406 | Sa13_H12 |     |          |
| 356 | Sa07_B02        | 407 | Sa14_A07 |     |          |

## AT178

|     |                 |     |                 |     |                 |
|-----|-----------------|-----|-----------------|-----|-----------------|
| 449 | <b>Sa01_A12</b> | 493 | <b>Sa06_G05</b> | 537 | Sa15_C09        |
| 450 | Sa01_B07        | 494 | <b>Sa06_H09</b> | 538 | Sa15_D01        |
| 451 | Sa01_C03        | 495 | <b>Sa07_B04</b> | 539 | <b>Sa15_D03</b> |
| 452 | <b>Sa01_E08</b> | 496 | <b>Sa07_F11</b> | 540 | Sa15_G10        |
| 453 | Sa01_F02        | 497 | Sa08_A09        | 541 | <b>Sa16_B08</b> |
| 454 | Sa01_G10        | 498 | <b>Sa08_C03</b> | 542 | <b>Sa16_B11</b> |
| 455 | <b>Sa02_B02</b> | 499 | <b>Sa08_C07</b> | 543 | <b>Sa16_C07</b> |
| 456 | Sa02_B09        | 500 | <b>Sa08_D03</b> | 544 | <b>Sa16_C09</b> |
| 457 | Sa02_C02        | 501 | <b>Sa08_E12</b> | 545 | Sa16_F01        |
| 458 | Sa02_C05        | 502 | Sa08_G04        | 546 | Sa16_G02        |
| 459 | Sa02_D01        | 503 | <b>Sa08_G11</b> | 547 | Sa16_H01        |
| 460 | <b>Sa02_D02</b> | 504 | Sa08_H05        | 548 | Sa17_C05        |
| 461 | <b>Sa02_D03</b> | 505 | <b>Sa09_A01</b> | 549 | <b>Sa17_E04</b> |
| 462 | Sa02_D11        | 506 | <b>Sa09_B06</b> | 550 | Sa17_E05        |
| 463 | <b>Sa02_E10</b> | 507 | <b>Sa09_B08</b> | 551 | <b>Sa17_G03</b> |
| 464 | <b>Sa03_A02</b> | 508 | Sa09_C01        | 552 | Sa17_G06        |
| 465 | <b>Sa03_A08</b> | 509 | <b>Sa09_C05</b> | 553 | Sa17_G07        |
| 466 | Sa03_B01        | 510 | Sa09_D03        | 554 | <b>Sa18_B05</b> |
| 467 | Sa03_B10        | 511 | Sa09_E08        | 555 | <b>Sa21_B05</b> |
| 468 | Sa03_C05        | 512 | Sa09_F01        | 556 | Sa21_C08        |
| 469 | <b>Sa03_C07</b> | 513 | <b>Sa09_G11</b> | 557 | Sa21_C11        |
| 470 | Sa03_D01        | 514 | Sa10_A05        | 558 | Sa21_F09        |
| 471 | <b>Sa03_D03</b> | 515 | Sa10_A11        | 559 | Sa21_H05        |
| 472 | <b>Sa03_D10</b> | 516 | <b>Sa10_B04</b> |     |                 |
| 473 | Sa03_F02        | 517 | <b>Sa10_B08</b> |     |                 |
| 474 | <b>Sa03_F11</b> | 518 | <b>Sa10_E06</b> |     |                 |
| 475 | Sa03_G01        | 519 | Sa10_F09        |     |                 |
| 476 | Sa03_G10        | 520 | <b>Sa11_C02</b> |     |                 |
| 477 | Sa03_H08        | 521 | Sa11_D04        |     |                 |
| 478 | Sa04_B03        | 522 | Sa11_D05        |     |                 |
| 479 | Sa04_B11        | 523 | <b>Sa11_E08</b> |     |                 |
| 480 | <b>Sa04_D12</b> | 524 | Sa11_E09        |     |                 |
| 481 | <b>Sa04_F01</b> | 525 | Sa12_C11        |     |                 |
| 482 | <b>Sa04_F02</b> | 526 | <b>Sa12_E02</b> |     |                 |

|     |                 |     |                 |
|-----|-----------------|-----|-----------------|
| 483 | Sa04_F05        | 527 | Sa12_E03        |
| 484 | <b>Sa04_F11</b> | 528 | <b>Sa12_F05</b> |
| 485 | Sa05_D02        | 529 | <b>Sa12_G06</b> |
| 486 | Sa05_D07        | 530 | Sa13_B02        |
| 487 | Sa05_E04        | 531 | Sa13_E09        |
| 488 | Sa05_F05        | 532 | <b>Sa13_F09</b> |
| 489 | Sa05_G11        | 533 | Sa13_F12        |
| 490 | Sa06_B07        | 534 | Sa13_G10        |
| 491 | Sa06_E07        | 535 | <b>Sa15_A08</b> |
| 492 | Sa06_E08        | 536 | <b>Sa15_B07</b> |

**APPENDICE B:** Sono elencati tutti i figli delle 5 famiglie caratterizzate per l'analisi QTL. Le 5 famiglie sono distinte per colore. In grassetto i figli in comune a più di una famiglia.