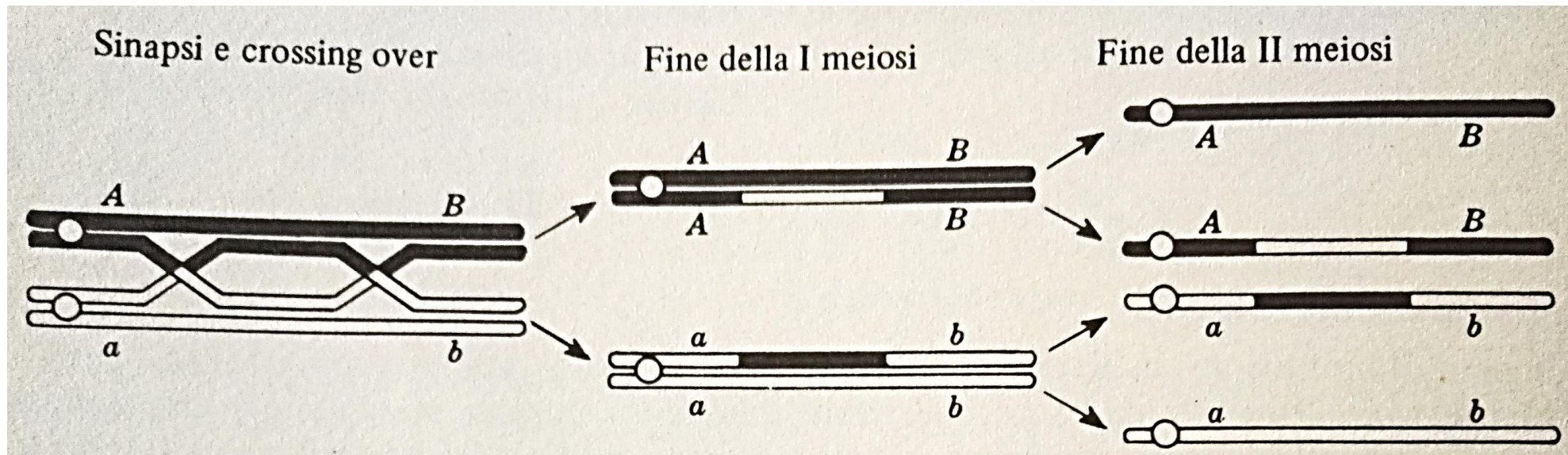


I limiti della ricombinazione.

Se due loci genici sono così lontani fra loro sul cromosoma che la probabilità che si formi un chiasma fra loro è del 100%, allora il 50% dei gameti sarà di tipo parentale (cioè non avrà subito crossing-over) e il 50% di tipo ricombinante (che avrà subito crossing-over). Quando questi individui diibridi vengono reincrociati col doppio recessivo, ci si aspetta che producano una progenie nel rapporto di 1 : 1 : 1 : 1 come ci si aspetterebbe da geni su cromosomi diversi. La ricombinazione fra due geni associati non può superare il 50% anche quando fra di loro si producono crossing-over multipli.

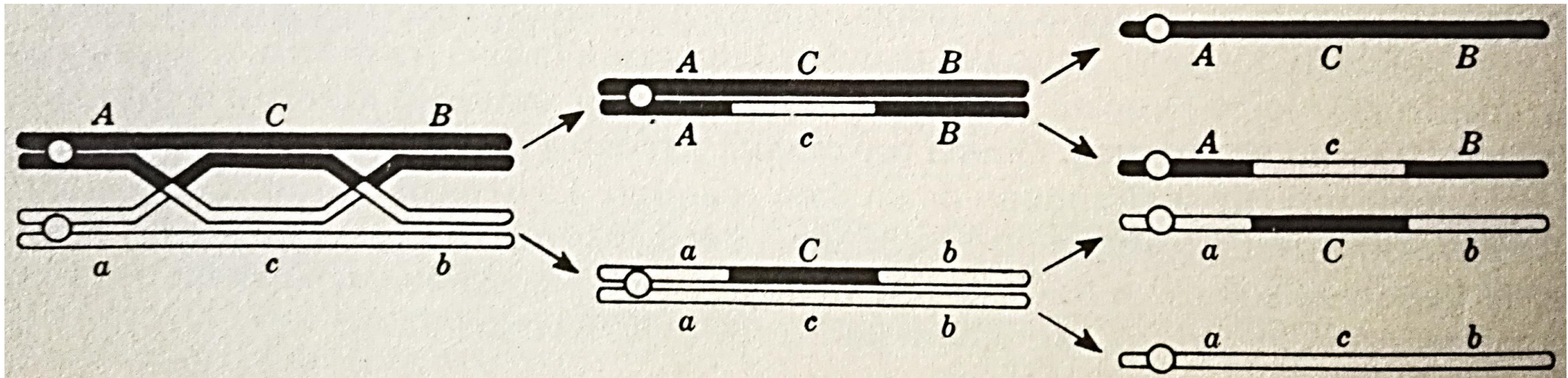
Crossing-over multipli.

Quando crossing-over doppi tra due filamenti si verificano nello spazio fra due marcatori genetici, i prodotti, identificati attraverso i fenotipi della progenie, sono solo di tipo parentale. Pertanto non siamo in grado di distinguere fra la progenie prodotta da un doppio crossing-over a due filamenti e la progenie prodotta in totale assenza di crossing-over. Poiché un doppio crossing-over fra due geni rimane nascosto, ogni volta che si verifica le distanze sulla mappa risulteranno sottostimate. I doppi crossing-over sono più frequenti fra geni distanti, e per questo motivo le mappe genetiche basate su distanze brevi risultano di solito più precise rispetto a quelle basate su lunghe distanze.



Crossing-over multipli.

Per reperire questi crossing-over doppi, bisogna ricorrere ad un terzo locus genico (C) Fra i marcatori esterni.



Se c'è una certa probabilità che un crossing-over si formi fra i loci A e C e un'altra (indipendente) che un altro crossing-over si formi fra i loci C e B, allora la probabilità di un crossing over doppio è il prodotto delle due probabilità indipendenti.

Se in un individuo di genotipo ACB/acb , nel 20% delle tetradi avviene un crossing-over fra i loci A e C, e, nel 10% delle tetradi, un crossing-over fra i loci C e B, allora ci si aspetta che il 2% (0.2×0.1) dei gameti sia dei tipi AcB e aCb derivati da crossing-over doppio.

LA COSTRUZIONE DI MAPPE GENETICHE

- 1. La distanza di mappa.**
- 2. L'incrocio di prova (test cross) per un diibrido.**
- 3. L'incrocio di prova per un triibrido.**

1. La distanza di mappa.

Le sedi in cui si trovano i geni sul cromosoma (loci) sono collegate in ordine lineare, analogamente alle perle di una collana. Ci sono due aspetti principali nella costruzione di una mappa genetica:

la **determinazione dell'ordine lineare** nel quale le unità genetiche sono disposte l'una rispetto all'altra (ordine genico);

la **determinazione delle distanze relative** fra le unità genetiche (distanza genica).

L'unità di distanza è un'espressione della probabilità che il crossing-over si verifichi fra i due geni presi in considerazione.

Una unità di distanza sulla mappa (centimorgan) è quindi equivalente all'1% di crossing-over.

Se il genotipo Ab/aB produce l'8% di ciascuno dei gameti AB e ab che hanno subito crossing-over, la distanza fra A e B è calcolata uguale a 16 unità di mappa.

Se la distanza di mappa fra i loci B e C è di 12 unità, allora il 12% dei gameti derivati dal genotipo BC/bc dovrebbe essere del tipo che ha subito crossing-over, cioè per il 6% Bc e per il 6% bC .

2. L'incrocio di prova (test cross) per un diibrido.

Un modo piu' facile per individuare i gameti che hanno subito il crossing-over in un diibrido e' di farlo attraverso la progenie del reincrocio col doppio recessivo (test cross o incrocio di prova). Si supponga di sottoporre a questo incrocio di prova individui diibridi in fase di accoppiamento (AC/ac) e di trovare nei fenotipi della progenie il 37% di dominanti per entrambi i loci, il 37% di recessivi per entrambi i loci, e il 13% di dominanti per il secondo locus e di recessivi per il primo e il 13% per la combinazione reciproca. Ovviamente gli ultimi due gruppi (genotipicamente Ac/ac e aC/ac) sono stati prodotti da gameti di un genitore diibrido che avevano subito il crossing-over. Così il 26% di tutti i gameti ($13 + 13$) erano del tipo che avevano subito il crossing-over e la distanza fra i loci A e C si e' potuta valutare in 26 unità di mappa.

2. L'incrocio di prova (test cross) per un diibrido.

Supponiamo di aver realizzato una serie di incroci a due punti per quattro geni: a, b, c e d, e di aver ottenuto le seguenti frequenze di ricombinazione:

Loci dei geni oggetto di reincrocio	Frequenza di ricombinazione (%)
<i>a e b</i>	50
<i>a e c</i>	50
<i>a e d</i>	50
<i>b e c</i>	20
<i>b e d</i>	10
<i>c e d</i>	28

Prendiamo in considerazione le frequenze di ricombinazione per ogni coppia di geni. La frequenza di ricombinazione fra a e b è 50% e corrisponde alla frequenza di ricombinazione attesa nell'assortimento indipendente. Di conseguenza i geni a e b possono trovarsi su cromosomi differenti oppure molto distanti fra loro sullo stesso cromosoma; li posizioneremo in differenti gruppi di linkage, sottintendendo così che possono essere localizzati oppure no sullo stesso cromosoma:

2. L'incrocio di prova (test cross) per un diibrido.

Gruppo di linkage 1



Gruppo di linkage 2



2. L'incrocio di prova (test cross) per un diibrido.

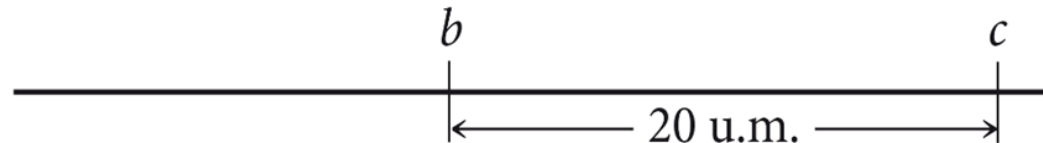
Loci dei geni oggetto di reintroscio	Frequenza di ricombinazione (%)
<i>a e b</i>	50
<i>a e c</i>	50
<i>a e d</i>	50
<i>b e c</i>	20
<i>b e d</i>	10
<i>c e d</i>	28

Anche la frequenza di ricombinazione fra *a* e *c* è 50% e indica l'appartenenza di questi geni a diversi gruppi di linkage. La frequenza di ricombinazione fra *b* e *c* è 20%, perciò questi geni sono associati e separati da 20 unità di mappa.

Gruppo di linkage 1



Gruppo di linkage 2

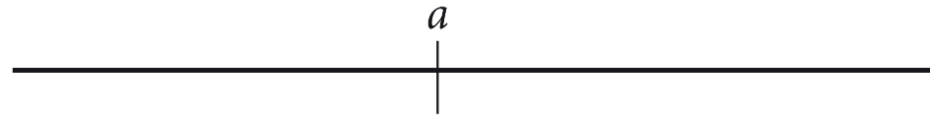


La frequenza di ricombinazione fra *a* e *d* è 50% e ancora una volta vuol dire che questi geni appartengono a differenti gruppi di linkage, mentre i geni *b* e *d* sono associati con una frequenza di ricombinazione del 10%.

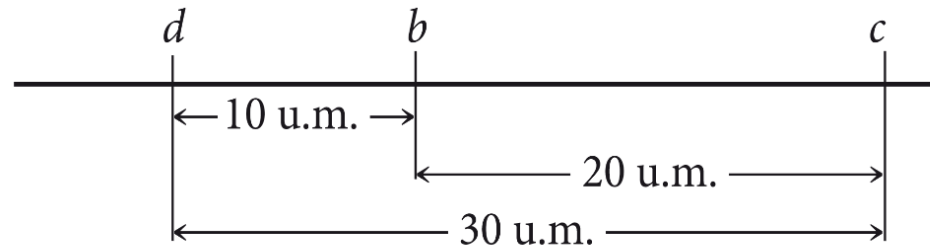
2. L'incrocio di prova (test cross) per un diibrido.

Loci dei geni oggetto di reincrocio	Frequenza di ricombinazione (%)
<i>a e b</i>	50
<i>a e c</i>	50
<i>a e d</i>	50
<i>b e c</i>	20
<i>b e d</i>	10
<i>c e d</i>	28

Gruppo di linkage 1



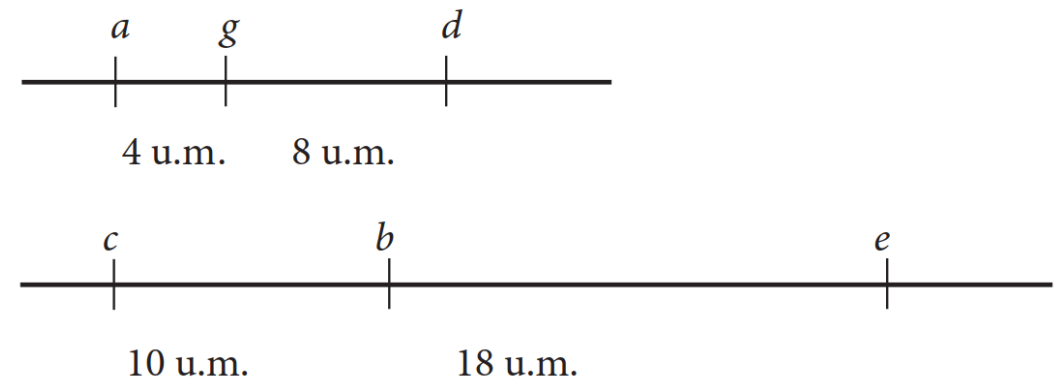
Gruppo di linkage 2



Per decidere se il gene *d* si trova a 10 u.m. a destra o a sinistra del gene *b*, dobbiamo esaminare la distanza da *c* a *d*. Se il gene *d* si trova a 10 u.m. a sinistra del gene *b*, allora la distanza fra *d* e *c* dovrebbe approssimativamente corrispondere alla somma della distanza fra *b* e *c* e fra *c* e *d*: 20 u.m. + 10 u.m. = 30 u.m. Se, d'altra parte, il gene *d* si trova a destra di *b*, allora la distanza fra *d* e *c* sarà più breve, all'incirca 20 u.m. – 10 u.m. = 10 u.m. Le distanze sommate fra loro sono solo approssimative, poiché ogni doppio crossing-over fra due geni non sarà rivelato e la distanza sulla mappa risulterà sottostimata.

Si è realizzata una serie di incroci a due punti fra sette loci (a, b, c, d, e, f, g) che hanno prodotto le seguenti frequenze di ricombinazione. Mappa i sette loci mostrando i rispettivi gruppi di linkage, l'ordine dei loci in ciascun gruppo di linkage e le distanze fra i loci di ciascun gruppo.

Loci	Percentuale di ricombinazione	Loci	Percentuale di ricombinazione
<i>a e b</i>	50	<i>c e d</i>	50
<i>a e c</i>	50	<i>c e d e</i>	26
<i>a e d</i>	12	<i>c e f</i>	50
<i>a e d e</i>	50	<i>c e g</i>	50
<i>a e f</i>	50	<i>d e d e</i>	50
<i>a e g</i>	4	<i>d e f</i>	50
<i>b e c</i>	10	<i>d e g</i>	8
<i>b e d</i>	50	<i>e e f</i>	50
<i>b e d e</i>	18	<i>e e g</i>	50
<i>b e f</i>	50	<i>f e g</i>	50
<i>b e g</i>	50		

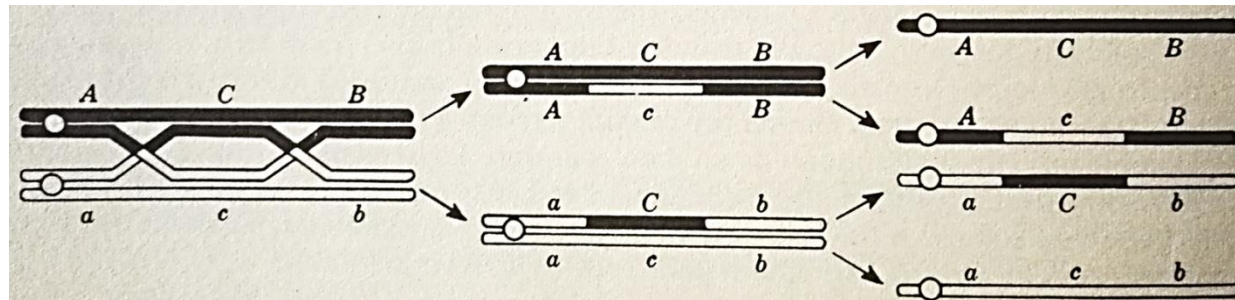


3. L' incrocio di prova per un triibrido.

I crossing-over doppi normalmente non avvengono fra geni situati a una distanza inferiore a 5 unità di mappa. Per geni piu' lontani e' consigliabile usare un terzo marcatore situato fra gli altri due, al fine di riuscire a identificare qualunque crossing-over doppio. Si supponga che, sottoponendo a un incrocio di prova (reincrocio col doppio recessivo) degli individui triibridi con genotipo ACB/acb , si trovino nella progenie i seguenti dati:

36% ABC/abc	9% Abc/abc	4% ABc/abc	1% AbC/abc
36% abc/abc	9% aBC/abc	4% abC/abc	1% aBc/abc

72% di tipo parentale	:	18% crossing-over singoli fra A e B (regione I)	:	8% crossing-over singoli fra B e C (regione II)	:	2% crossing-over doppi
-----------------------	---	---	---	---	---	------------------------



Per trovare la distanza A-B si devono contare tutti i crossing-over (tanto singoli quanto doppi) che si sono verificati nella regione I = $18\% + 2\% = 20\%$ unità di mappa fra i loci A e C.

Per trovare la distanza B-C si devono di nuovo contare tutti i crossing-over (tanto singoli quanto doppi) che si sono verificati nella regione II = $8\% + 2\% = 10\%$ o 10 unità di mappa fra i loci B e C.

La distanza A-B e' quindi di 30 unità di mappa quando i crossing-over doppi vengono riconosciuti in esperimenti di associazione in tre punti e di 26 unità di mappa quando i crossing-over doppi sono riconosciuti nell'esperimento di associazione in due punti di cui si e' parlato prima.

Senza il marcatore di mezzo (C) i crossing-over doppi appariranno come tipi parentali e quindi verrebbe sottovalutata la vera distanza di mappa (percentuale di crossing-over). In questo caso il 2% di crossing-over doppi apparirebbe con il 72% di tipi parentali, per un totale quindi del 74% di tipi parentali e del 26% di tipi ricombinanti. Quindi, in ogni caso in cui vi siano tre geni associati le cui distanze sono conosciute, la quantità totale di crossing-over riconoscibili (ricombinanti) fra i due marcatori esterni A e B quando manca il marcatore C è : percentuale di crossing-over tra A e C + percentuale di crossing-over tra B e C – (percentuale di crossing-over doppi) X 2.

Date le distanze A-C = 20, B-C = 10, A-B = 30 unità di mappa, la percentuale di crossing-over riconoscibili, risultanti dal reincrocio di un diibrido con il doppio recessivo (AB/ab x ab/ab) è uguale a

$$0,20 + 0,10 - 2(0,20)(0,10) =$$

$$0,30 - 2(0,02) = 0,30 - 0,04 =$$

$$0,26 \text{ o } 26\% (13\% Ab/ab \text{ e } 13\% aB/ab).$$

Il genitore doppio recessivo usato per l'incrocio dà prova di ab come contributo ad ognuno dei componenti la progenie. I geni restanti provengono dal genitore diibrido. Così A e B devono essere stati su un cromosoma del genitore diibrido e a e b sull'altro cromosoma cioè devono essere in fase di accoppiamento (AB/ab), perché queste sono le combinazioni apparse con maggior frequenza nella progenie.

P: Genitore diibrido x Genitore doppio recessivo (usato per l'incrocio di prova)
 Aa, Bb ab/ab

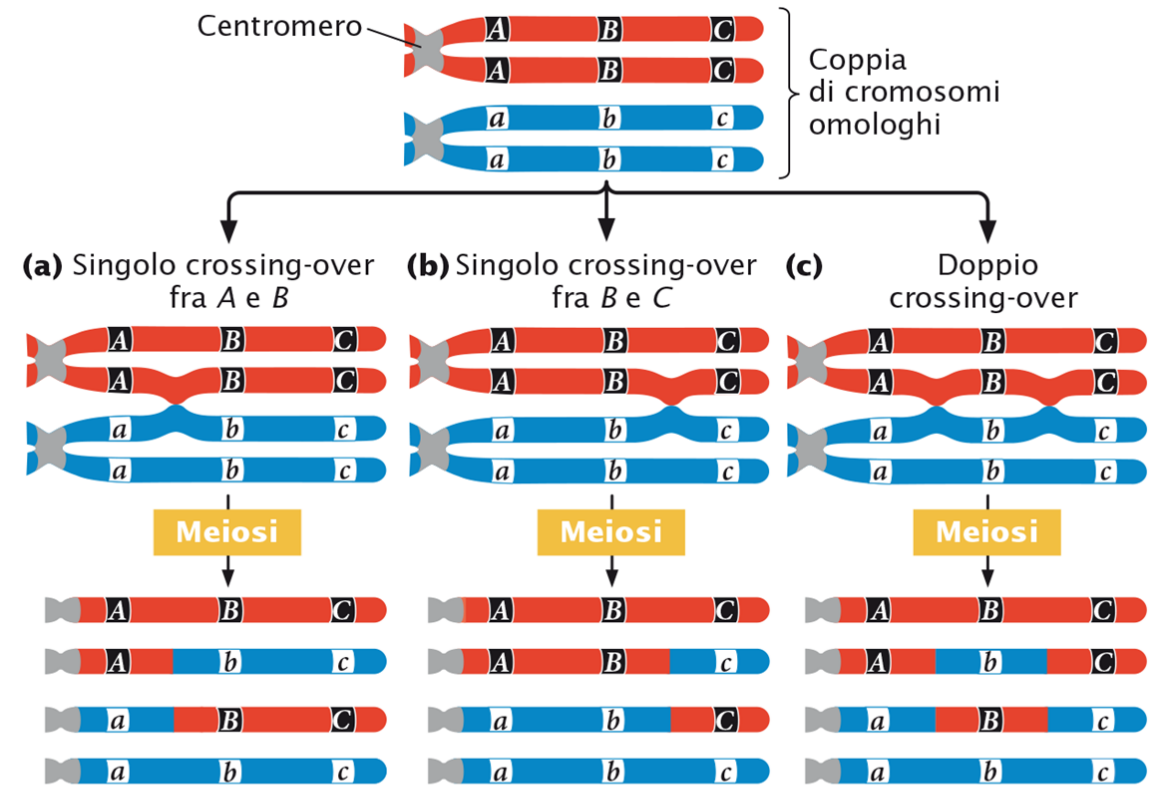
(rapporti di associazione sconosciuti)

F₁: 42% Aabb }
 42%, aaBb } Tipi Parentali 8% AaBb }
 8% aabb } Tipi Ricombinanti

Seguendo lo stesso tipo di ragionamento usato precedentemente, A e b devono essere stati su un cromosoma del genitore diibrido e a e B sull' altro, cioè dovevano essere in fase di repulsione (Ab/aB).

Rapporti di associazione che risultano da un incrocio di prova per un triibrido.

Anche se, come abbiamo visto, si possono costruire map-pe genetiche a partire da una serie di reincroci per coppie di geni, questo approccio non risulta particolarmente efficiente perché per stabilire la disposizione dei geni bisogna effettuare numerosi incroci a due punti e perché i doppi crossing-over vengono persi di vista. Una tecnica di mappatura più efficiente è rappresentata dal reincrocio in cui si considerano simultaneamente tre geni: il reincrocio a tre punti o incrocio a tre punti. Con questo approccio si può stabilire la disposizione dei tre geni in un solo esperimento e di solito si può scoprire qualche doppio crossing-over, ottenendo così distanze di mappa più accurate. Analizziamo cosa succede quando si verifica un crossing-over fra tre geni ipoteticamente associati.



Conclusion: I cromosomi ricombinanti derivanti dal doppio crossing-over presentano una variazione solo nel gene intermedio.

Rapporti di associazione che risultano da un incrocio di prova per un triibrido.

Ma quale locus sta nel mezzo? Di nuovo si possono considerare tre casi.

Caso 1. Si possono produrre i tipi meno frequenti di crossing-over doppi (2% della F, se il locus B sta nel mezzo?)

A	b	c	
			x abc/abc = ABc/abc e abC/abc
a	B	C	

Non si tratta di tipi di crossing-over doppio e quindi il locus B non sta nel mezzo.

Caso 2. Si possono produrre i tipi di crossing-over doppio se il locus C sta nel mezzo?

Ricordarsi di tenere A, b e c su un cromosoma e a, B e C sull'altro, quando si inseriscono, loci diversi nella posizione di mezzo.

A	c	b	
			x acb/acb = ACb/acb e acB/acb
a	C	B	

Non si tratta di tipi di crossing-over doppio e quindi il locus C non sta nel mezzo.

Rapporti di associazione che risultano da un incrocio di prova per un triibrido.

Caso3. Si possono produrre i tipi di crossing-over doppio se il locus A sta nel mezzo?

b	A	c	
			x bac/bac = bac/bac e BAC/bac
B	a	C	

Sono questi finalmente i tipi di crossing-over doppio. Si puo' concludere che il locus A sta nel mezzo.

Rapporti di associazione che risultano da un incrocio di prova per un triibrido.

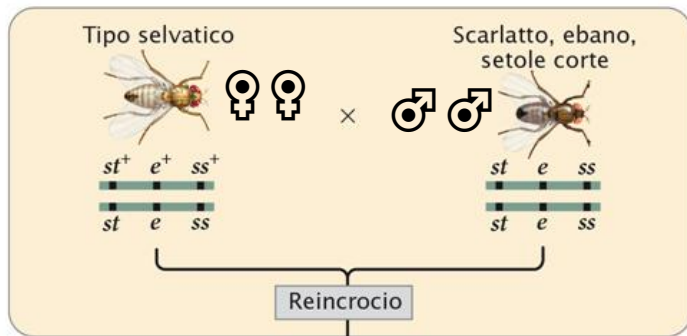
Ora che si conosce l'ordine genico e i rapporti di associazione parentale, si possono dedurre da essi i singoli crossing-over. Si definisca la distanza B-A come regione I e la distanza A-C come regione II. Crossing over singoli nella regione I:

Crossing over singoli nella regione I:

b	A	c	
			x bac/bac = baC/bac e BAc/bac
B	a	C	

Crossing over singoli nella regione II:

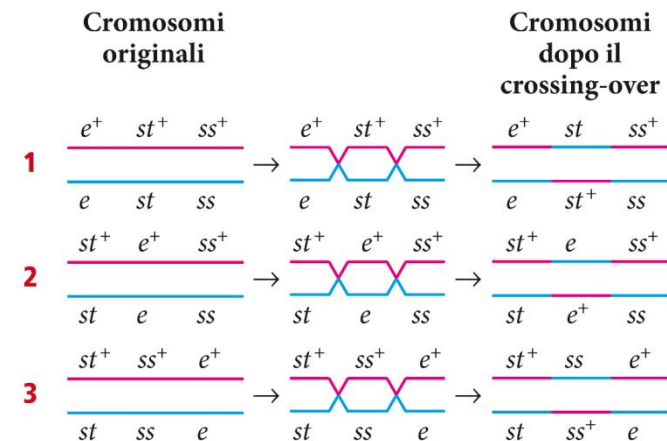
b	A	c	
			x bac/bac = bAC/bac e Bac/bac
B	a	C	

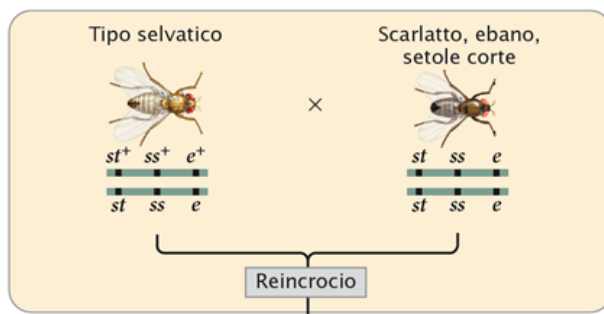


Genotipo della progenie	Fenotipo della progenie	Numerosità della progenie
$st^+ e^+ ss^+$ / $st e ss$	Tipo selvatico	283
$st e ss$ / $st e ss$	Tutti mutanti	278
$st^+ e ss$ / $st e ss$	Ebano, setole corte	50
$st e^+ ss^+$ / $st e ss$	Scarlatto	52
$st^+ e^+ ss$ / $st e ss$	Setole corte	5
$st e ss^+$ / $st e ss$	Scarlatto, ebano	3
$st^+ e ss^+$ / $st e ss$	Ebano	43
$st e^+ ss$ / $st e ss$	Scarlatto, setole corte	41
Totale 755		

Con due classi di progenie possibili per ciascuno dei tre loci avremo $2^3 = 8$ classi di fenotipi possibili. Nell'esempio le otto classi fenotipiche sono tutte presenti, ma, in taluni incroci a tre punti, una o più classi fenotipiche possono non manifestarsi se la numerosità della progenie è bassa. Ciò nonostante la mancanza di una particolare classe può fornire importanti informazioni su quale combinazione di caratteri sia meno frequente e, in ultima analisi, sull'ordine dei geni.

1) Nella mappatura dei geni la prima operazione consiste nel determinare l'ordine dei geni sul cromosoma.





Genotipo della progenie	Fenotipo della progenie	Numerosità della progenie
$st^+ \quad ss^+ \quad e^+$ $st \quad ss \quad e$	Tipo selvatico	283
$st \quad ss \quad e$ $st \quad ss \quad e$	Scarlatto, ebano, setole corte	278
$st^+ / ss \quad e$ $st \quad ss \quad e$	Setole corte, ebano	50
$st / ss^+ \quad e^+$ $st \quad ss \quad e$	Scarlatto	52
$st^+ \quad ss^+ / e$ $st \quad ss \quad e$	Ebano	43
$st \quad ss / e^+$ $st \quad ss \quad e$	Scarlatto, setole corte	41
$st^+ / ss / e^+$ $st \quad ss \quad e$	Setole corte	5
$st / ss^+ / e$ $st \quad ss \quad e$	Scarlatto, ebano	3
Totale 755		

Questo simbolo indica la posizione di un crossing-over.

I non ricombinanti vengono prodotti con maggior frequenza.

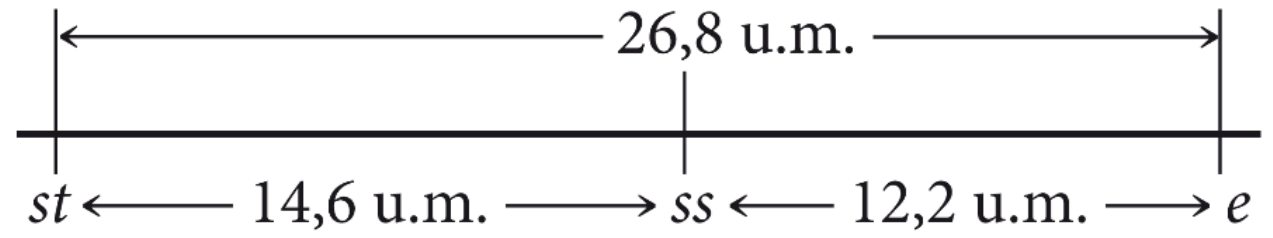
I ricombinanti da doppio crossing-over vengono prodotti con minor frequenza.

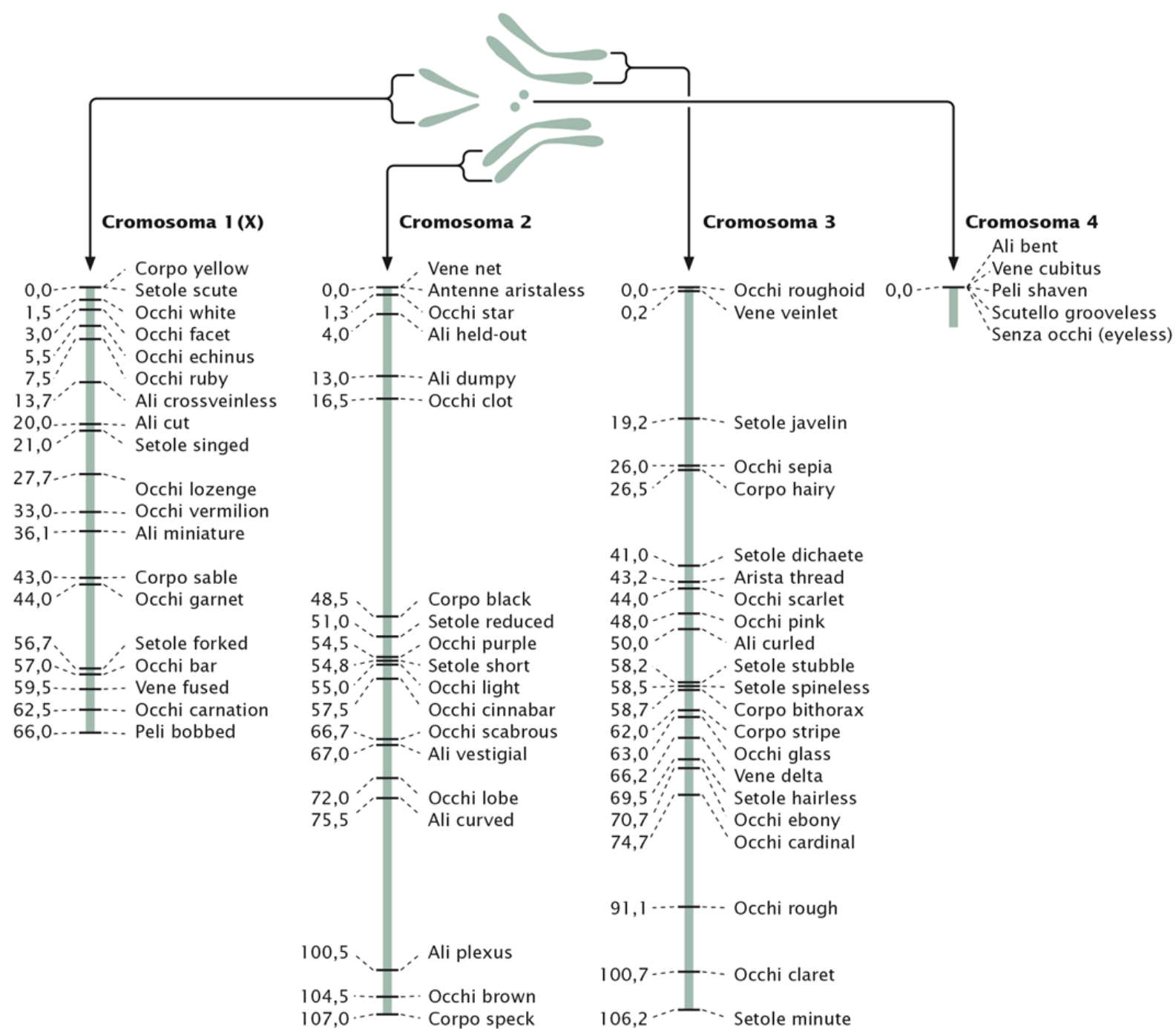
frequenza di ricombinazione $st-ss =$

$$= \frac{50 + 52 + 5 + 3}{775} \times 100\% = 14,6\%$$

frequenza di ricombinazione $ss-e =$

$$= \frac{43 + 41 + 5 + 3}{755} \times 100\% = 12,2\%$$



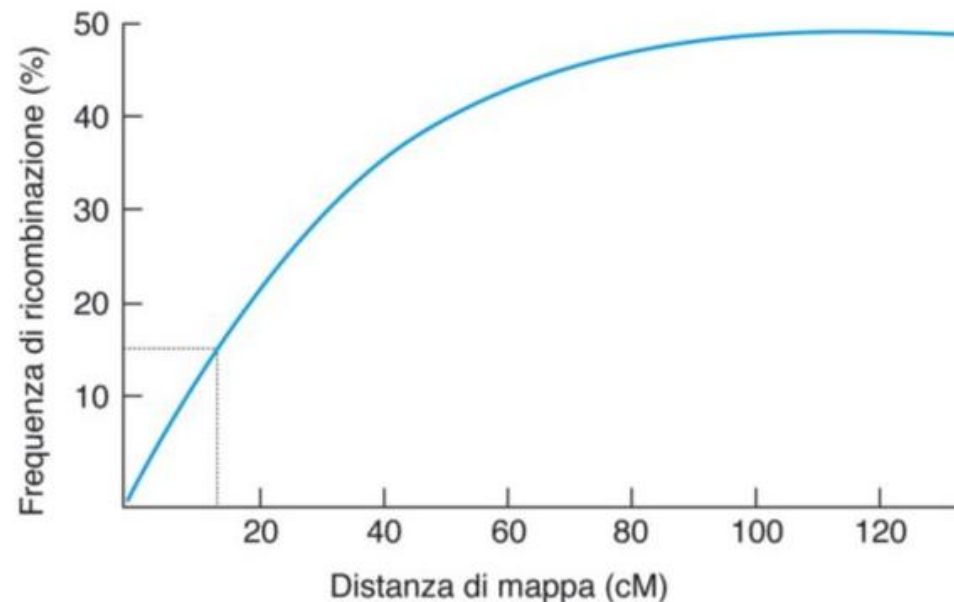


Percentuale di ricombinazione e distanza di mappa

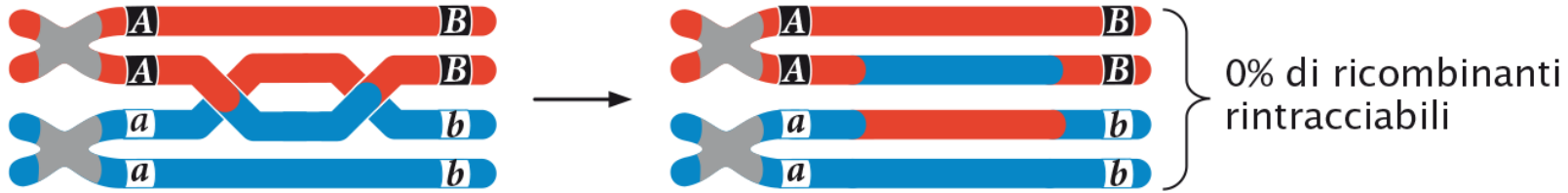
In un esperimento di associazione in due punti, piu' grande e' la distanza non marcata (cioe' senza loci che segregano) fra due geni, piu' grande e' la probabilita' di crossing-over doppi (e di altri numeri pari di crossing-over) che avvengono senza che siano riconosciuti. Quindi le stime piu' attendibili del numero totale di crossing-over si ricaveranno con geni strettamente associati.

Percentuale di ricombinazione e distanza di mappa

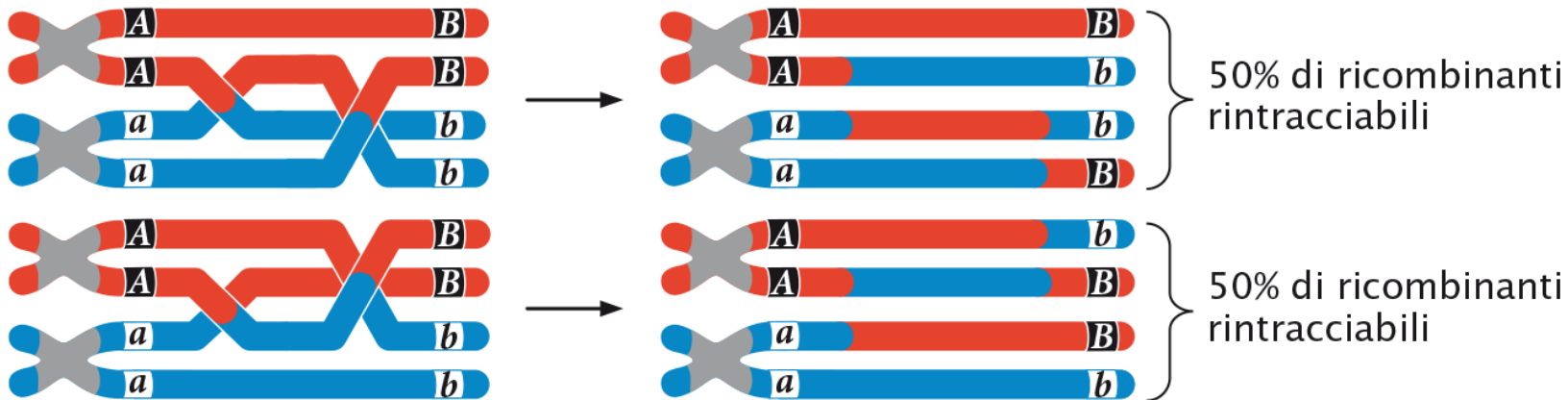
La distanza minima per i crossing-over doppi varierà fra specie diverse. In *Drosophila*, crossing-over doppi non si verificano all'interno di una distanza che varia dalle 10 alle 12 unità di mappa. All'interno di questa distanza minima la percentuale di ricombinazione è equivalente alla distanza di mappa. Oltre questa distanza minima, il rapporto tra percentuale di ricombinazione e distanza di mappa diventa non lineare. La vera distanza di mappa sarà così valutata per difetto, conoscendo la percentuale di ricombinazione; con grandi distanze le due variabili diventeranno virtualmente indipendenti l'una dall'altra.



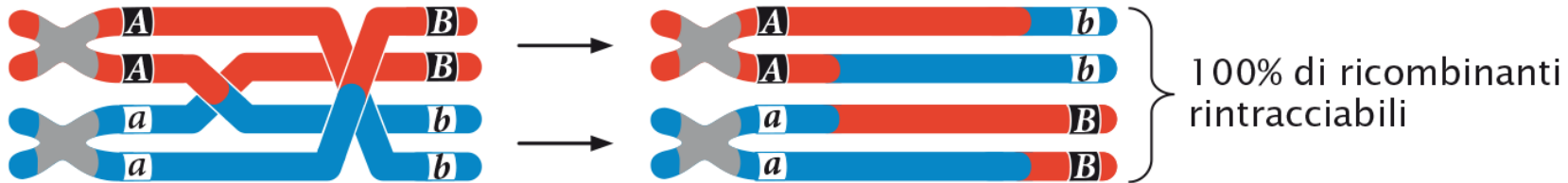
Doppio crossing-over a due filamenti



Doppio crossing-over a tre filamenti



Doppio crossing-over a quattro filamenti



Medie dei ricombinanti
rintracciabili 50%