

Progetto POLORISO - Ricerca, sperimentazione, tecnologie innovative, sostenibilità ambientale ed alta formazione per il potenziamento della filiera risicola nazionale

MIPAAF – DM 5337 del 05-12-2011

**Relazione di sintesi della attività del primo anno di progetto
(periodo indicativo: gennaio – dicembre 2012)**

UO:.....PARCO TECNOLOGICO PADANO.....

SINTESI DELLE ATTIVITA' - ANNO 1

Responsabile di UO: Piffanelli Pietro

Partecipanti:

UO	responsabile	collaboratori	Posizione*
UO9 PTP	Pietro Piffanelli		Dirigente di ricerca
		Abbruscato Pamela	Ricercatore a contratto
		Barbara Menin	Collaboratore a progetto

*Ricercatore di ruolo; collaboratore a progetto; assegnista di ricerca; dottorando; altro

Sintesi dei risultati del primo anno di attività:

WP3. Genetica, genomica ed innovazione varietale, Attività 3.10 (PTP): Dalle Banche del Seme delle U.O. CRA-RIS di Vercelli e dell'ENR di Castel d'Agogna, una collezione di 300 varietà italiane ed europee sono state scelte e messe in campo per la moltiplicazione delle linee necessarie agli scopi del progetto POLORISO. In stretta collaborazione con la U.O. CRA-RIS, sono state create 300 linee pure, ovvero totalmente omozigoti, mediante metodo per discendenza da singolo seme (Single Seed Descent SSD). Tale metodologia prevede di adottare le necessarie precauzioni (l'incapucciamento, ecc.) per evitare contaminazioni da pianta a pianta nel periodo pre/post-fioritura. Conseguentemente, partendo da singolo individuo che si auto-feconda nella generazione successiva si otterranno individui omozigoti. Dopo la raccolta, gli stocks di semi delle linee SSD sono stati imbustati e schedati.

Da 3 piante appartenenti a ciascuna delle 300 linee SSD, è stato purificato, quantificato e normalizzato il DNA. I campioni ottenuti sono stati quindi analizzati con un set di 24 marcatori SSR precedentemente validati ed in grado di discriminare le diverse varietà. L'analisi fingerprinting ha permesso di verificare la purezza degli stocks, confermare l'identità varietale mediante il software RICLASS e approfondire la diversità genetica della collezione in esame. RICLASS (**R**ice genotype **CL**ASSsification **S**ystem) consente l'identificazione automatica di una data varietà di riso per confronto del suo profilo di fingerprinting con un database contenente circa 400 accessioni di riso. Gli stock di DNA sono conservati nel biorepository presso il PTP e disponibili per ulteriori analisi fenotipiche e molecolari.

La collezione è costituita da accessioni locali, rappresentanti la diversità genetica del germoplasma di riso coltivato in Italia, e da un gruppo di varietà straniere provenienti dalle aree temperate adattate alle condizioni pedo-climatiche dell'Italia. Un gruppo di 50 varietà rappresentanti la diversità di *Oryza sativa* su scala globale sono state incluse per meglio definire la struttura di popolazione della collezione: queste includevano varietà appartenenti alle sottospecie *indica*, *aus*, *basmati*, *japonica* tropicali e temperati. La maggior parte delle accessioni della collezione sono risultate appartenere al sottogruppo dei *japonica* tropicali e temperati. L'analisi filogenetica mediante Neighbor-Joining ha evidenziato la separazione delle accessioni nelle sottopopolazioni indicate in accordo con i dati riportati in letteratura e i pedigree delle varietà.

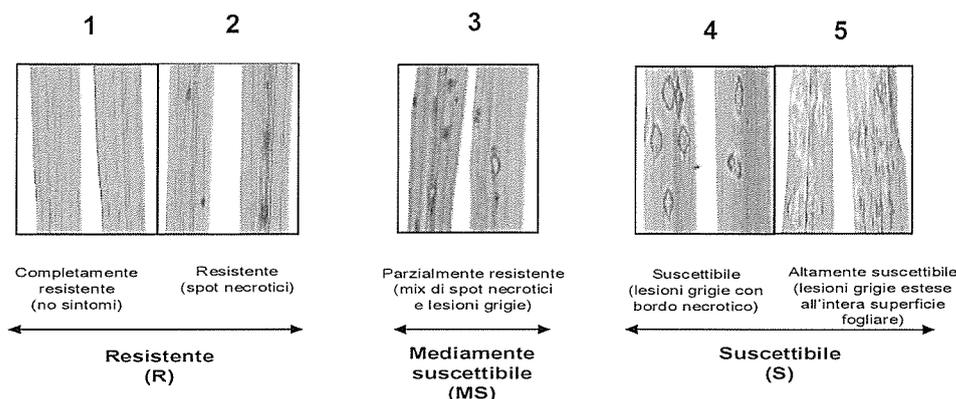
WP3. Genetica, genomica ed innovazione varietale, Attività 3.11 (PTP): I campioni di DNA validati con fingerprinting molecolare sono stati utilizzati per le analisi di genotipizzazione mediante Genotyping By Sequencing (GBS). Questa metodologia permette la genotipizzazione ad alta automazione dell'intero genoma attraverso una tecnologia altamente specializzata e a basso costo, sviluppata da Elshire et al. (2011). La tecnologia GBS si basa sul sequenziamento (NGS) di librerie di DNA genomico arricchite in sequenze codificanti mediante l'utilizzo di enzimi di restrizione metilazione-sensibili e permette il processamento simultaneo di numerosi campioni (96-plex). Il GBS è stato precedentemente applicato con successo a mais e frumento. Le librerie sono state prodotte dopo taglio con l'enzima *ApeKI*, secondo il protocollo descritto da Elshire (2011). Il sequenziamento è stato effettuato mediante ILLUMINA Genome Analyzer II.

L'analisi bioinformatica preliminare dei dati GBS è stata effettuata per un primo set di circa 160 linee SSD, identificando circa 43 000 SNP polimorfici con un call rate > 90% e un MAF > 0.05. Di questi SNPs, 26 000 risultano intergenici a fronte di 17 000 presenti negli esoni (61%), introni (23%) e regioni non tradotte 5'UTR-3'UTR (16%). La distanza media tra SNP è di 8.7 Kb ed è stata osservata una distribuzione degli SNP in prevalenza nelle regioni trascritte, confermando l'efficacia della tecnologia GBS nell'arricchire per marcatori presenti in queste regioni.

WP3. Genetica, genomica ed innovazione varietale, Attività 3.12 (PTP): Le fenotipizzazioni delle linee SSD mediante sistema BLASTEST, metodo di infezione messo a punto presso i laboratori del Gruppo Genomica Riso del PTP, è tuttora in corso. Si tratta di un sistema di screening ad alta processività, che, tramite l'infezione di piantine di riso con *Magnaporthe oryzae*, e successiva fenotipizzazione dei sintomi fogliari, consente di valutare il livello di resistenza/suscettibilità di varietà di riso al brusone (BLAST).

Le linee in esame vengono seminate in seminiere e fatte crescere in fitotrone in condizioni controllate di temperatura (27 °C di giorno e 22°C di notte) e di umidità relativa (60%). Lo schema di semina prevede la presenza di Gigante Vercelli, Volano e Maratelli, quali testimoni rispettivamente di alta resistenza, media suscettibilità e alta suscettibilità. Il saggio BLASTEST prevede l'inoculo fogliare di spore di *M. oryzae* su piantine di riso di 20 giorni cresciute in condizioni controllate di temperatura e di

umidità in un'apposita camera di crescita. Le piantine dopo l'infezione sono incubate in camera di infezione a 28°C e 99,9% di umidità, per 16 ore e poi riportate nelle condizioni precedenti. A seguito di 7 giorni di incubazione è possibile osservare sulle foglie delle piante inoculate i sintomi tipici della malattia del brusone ed effettuare il prelievo della seconda foglia sintomatica per la valutazione del livello di suscettibilità.



In base alle lesioni osservate, con riferimento ad una scala dei sintomi (figura sopra) che va da 1 (altamente resistente) a 5 (altamente suscettibile), si può discriminare in modo affidabile e riproducibile le varietà suscettibili (S) da quelle mediamente suscettibili (MS) o resistenti (R). La fenotipizzazione è prevista in tre replicati biologici con la miscela di ceppi provenienti dalla collezione *Magnaporthe oryzae* dell'Università di Pavia e del PTP (UNIPV-PTP).

Per le infezioni delle linee SSD si è proceduto alla selezione di isolati di brusone appartenenti ai principali gruppi che rappresentano la biodiversità della collezione di *Magnaporthe oryzae* UNIPV-PTP, descritta tramite fingerprinting molecolare con microsatelliti (progetti BIOGESTECA e RISINNOVA). Tra i 35 ceppi scelti, ne sono stati selezionati uno per ciascun gruppo principale da utilizzare in miscela per l'infezione POLORISO, tra quelli che hanno dimostrato una maggior capacità di sporulazione in modo tale da garantire omogeneità di inoculo tra isolati e reperibilità tra repliche. Al momento delle semine, erano disponibili semi sufficienti per ciascuna delle 3 repliche biologiche solo per 288 linee SSD. Di conseguenza non sono state esaminate le linee mancanti, perché il numero di piante non sarebbe stato significativo per la loro successiva analisi statistica.

Solo una replica è stata ad oggi conclusa, mentre le altre due sono in corso. Di conseguenza, i risultati descritti di seguito sono da considerarsi preliminari perché riguardano solo una replica biologica, mentre sarà possibile effettuare la valutazione della resistenza/suscettibilità di ciascuna linea solo dopo aver ultimato le 3 repliche biologiche e analizzato i dati nel loro complesso con opportuni test statistici. Un primo dato di rilievo è che il 4% (11 su 288) delle varietà in esame presentano un tasso di germinabilità inferiore o uguale al 50%. I risultati della prima fenotipizzazione hanno permesso di osservare che circa il 60% delle linee fenotipizzate ha una sintomatologia omogenea (imputabile ad una sola classe), mentre il restante 40% presenta fenotipo eterogeneo da confermare con le successive repliche biologiche. Delle linee a netto fenotipo, il 36% (102 su 288) si è dimostrato suscettibile (classe 4 e 5), mentre il 20% delle linee (57) risultava resistente (classi 1 e 2). Il 4% delle linee (12 su 288) mostravano fenotipo mediamente suscettibile (classe 3).

WP3. Genetica, genomica ed innovazione varietale, Attività 3.14 (PTP): Le varietà Carnaroli e Arborio sono state risequenziate mediante tecnologia NGS a partire da stock di DNA ad alta qualità. Gli stock di DNA sono stati previamente analizzati con fingerprinting molecolare (24 SSR) al fine di

confermarne l'identità varietale. Il DNA genomico è stato frammentato per la preparazione di librerie Pair-End secondo il protocollo standard dell'ILLUMINA.

Come risultato del risequenziamento si è ottenuto un dataset per un totale di circa 115 milioni di reads per il genoma di Carnaroli, con lunghezza media di 129 bp e qualità media 30 (scala phred33). Le reads sono state poi filtrate in modo da rimuovere le basi con scarsa qualità ed eliminare contaminanti, basandosi sul database Univec e sulle sequenze di *E. coli*. Le sequenze sono state ulteriormente filtrate per rimuovere le reads più corte di 80 bp, in modo da ottenere 105 milioni di reads con lunghezza media di 119bp e migliorando lo score medio della qualità. Le sequenze sono state poi allineate con il genoma di riferimento di *Oryza sativa* ssp. *japonica* cv. Nipponbare per mezzo del programma di allineamento BFAST. Gli allineamenti sono stati quindi filtrati per rimuovere i mismatch più lunghi di 4 bp (INDEL inclusi) ed in modo che le due estremità paired non fossero più distanti di 360bp, ottenendo in fase finale un coverage medio di 26x. Il software SAMtools è stato quindi utilizzato per ottenere una sequenza consenso in quelle regioni dove il coverage degli allineamenti fosse compreso tra valori di 10 e 100x. Escludendo le regioni in cui non è stato possibile attribuire in modo univoco una base, si stima di avere un copertura di circa l'80% del genoma di riferimento.

WP3. Genetica, genomica ed innovazione varietale, Attività 3.15 (PTP): Gli allineamenti utilizzati per definire la sequenza consenso sono stati utilizzati anche per condurre un'analisi di SNP detection attraverso i software SAMtools/BCFtools. Il dataset degli SNP così ottenuto è stato poi filtrato in modo da mantenere SNP con AF1=1 e una read depth di 4. Si sono poi valutati e studiati l'utilizzo di strumenti informatici per la predizione genica come Augustus e SNAP. Sono state inoltre recuperate dai principali database le sequenze di EST, proteine e cDNA necessarie per l'annotazione funzionale e il training dei predittori genici. Sono state recuperate dalle librerie di sequenze ripetute tipiche del riso, in modo da poter permettere il mascheramento delle regioni genomiche a bassa complessità. In questo modo sarà possibile ridurre la complessità genomica ed aumentare l'affidabilità nelle successive fasi di annotazione funzionale.

Attività di divulgazione e pubblicazioni:

Presentazione orale P.Piffanelli *et al.* "Genome-wide association studies for agronomic and quality traits in rice" all'interno di una giornata di studio dal titolo "Innovative methods in plant breeding", organizzata nell'ambito del dottorato di Produttività e biologia delle piante il 19 aprile 2013, presso l'Università degli studi di Milano.

Casella L., Tacconi G., Chen C., Spindel J., Tung Cw., Vale' G., Lupotto E., Piffanelli P., Greco R. "Genome wide association studies for root traits in a temperate rice collection" 56° SIGA annual Congress Perugia, Italy, 17-20 September 2012.

Attività di formazione:

Nell'ambito del progetto POLORISO è stata reclutata Barbara Menin (collaboratore a progetto) che è stata formata e sta acquisendo competenze specifiche nell'ambito delle attività di fenotipizzazione e genotipizzazione del germoplasma di riso.

Sintesi delle attività predisposte per il secondo anno:

WP3. Genetica, genomica ed innovazione varietale, Attività 3.10 (PTP): Gli obiettivi di questa attività sono stati raggiunti, quindi questa attività è da ritenersi conclusa e non sono previste sperimentazioni future, salvo la fornitura di semi delle 300 linee per eventuali fenotipizzazioni a partner del progetto, in collaborazione con CRA-RIS.

WP3. Genetica, genomica ed innovazione varietale, Attività 3.11 (PTP): è previsto il completamento dell'analisi bioinformatica dei dati GBS per le restanti 140 linee per l'identificazione degli SNP polimorfici e il completamento dei profili genotipici delle 300 linee SSD. Inoltre, i dati di genotipizzazione ottenuti in questa attività, saranno utilizzati per la costituzione e validazione della piattaforma bioinformatica di analisi genotipo/fenotipo prevista nell'attività 3.13 a partire dal 2° anno.

WP3. Genetica, genomica ed innovazione varietale, Attività 3.12 (PTP): nel 2° anno saranno concluse la seconda e terza replica delle fenotipizzazione BLASTEST delle linee SSD. L'analisi statistica delle tre repliche permetterà di definire con precisione il fenotipo resistente/suscettibile al brusone fogliare di ciascuna delle linee in esame. Anche questi dati fenotipici saranno inseriti nella piattaforma bioinformatica di analisi genotipo/fenotipo per gli scopi dell'attività 3.13.

WP3. Genetica, genomica ed innovazione varietale, Attività 3.14 (PTP):

Analisi simili a quelle già eseguite il genoma di Carnaroli saranno condotte con il dataset del genoma di Arborio. Nell'anno 2 si prevedono sia un'ulteriore analisi di risequenziamento NGS, al fine di aumentare il coverage attuale per i due genomi di Carnaroli e Arborio (fino a circa 70X), sia di sequenziamento Sanger mirato di loci specifici, per meglio definire regioni non risolte. Tale attività verrà svolta in stretta collaborazione con il CRA-RIS/CRA-GPG che si occuperà del risequenziamento di altri 4 genomi di riso.

WP3. Genetica, genomica ed innovazione varietale, Attività 3.15 (PTP):

A fine attività di rsequenziamento dei genomi di riso previste nell'attività WP3.14, verrà effettuata l'annotazione funzionale dei genomi in collaborazione CRA-RIS/CRA-GPG. Dopo valutazione degli strumenti più idonei alla gestione ed alla visualizzazione dell'annotazione funzionale, sarà costituita una piattaforma bioinformatica navigabile e consultabile da tutti i ricercatori del progetto (GBrowse) contenente tutti i dati generati dal sequenziamento dei 6 genomi da PTP e CRA-RIS/CRA-GPG.

Redatto in data...17 Maggio 2013

Responsabile di UO.....

 PIETRO PIFFANELLI

Firma.....



