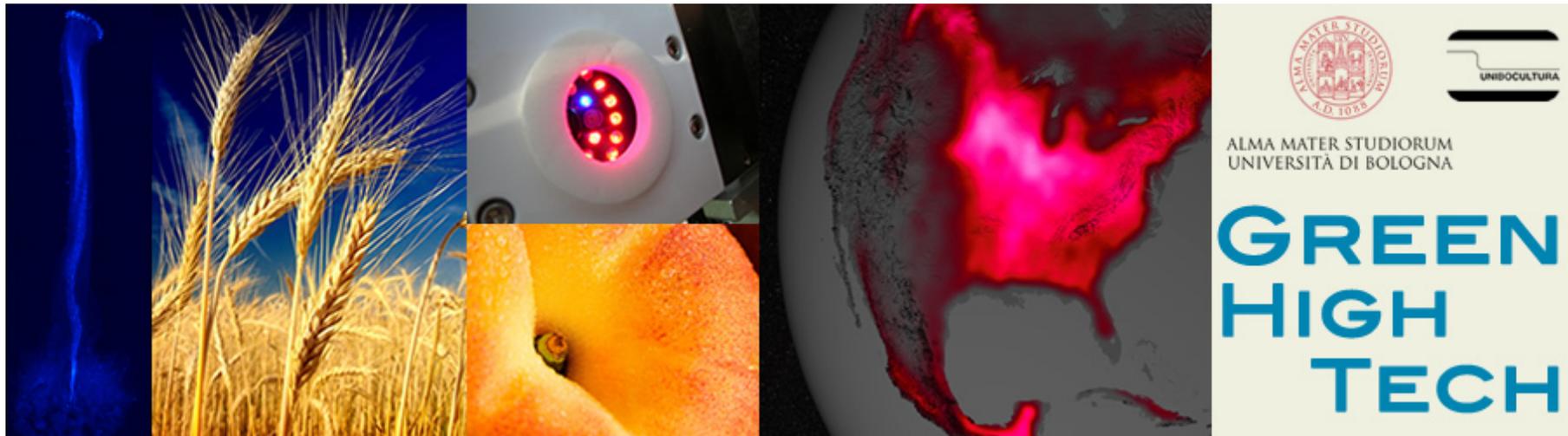


GREEN HIGH TECH: **la Scienza nell'Arte di nutrire il mondo?**

**Non si sequenzia solo il genoma umano:
ecco perché usando l'esempio del pesco**

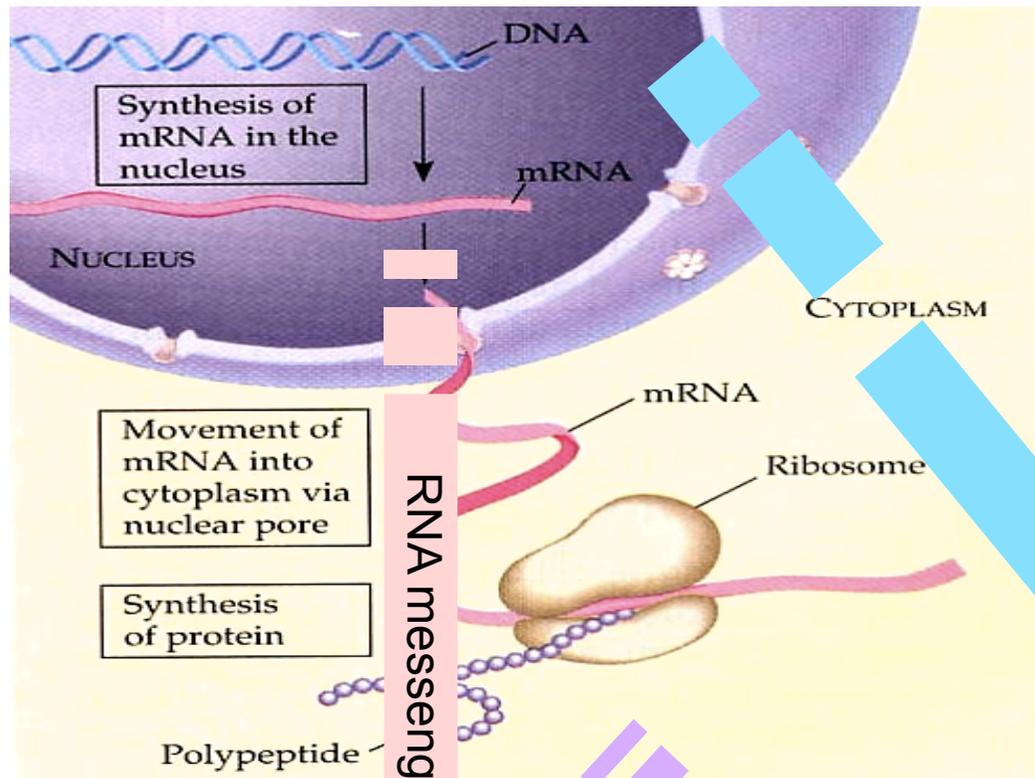
Luca Dondini - Dipartimento di Scienze Agrarie (Università di Bologna)



ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

IL PRESENTE MATERIALE È RISERVATO AL PERSONALE DELL'UNIVERSITÀ DI BOLOGNA E NON PUÒ ESSERE UTILIZZATO AI TERMINI DI LEGGE DA ALTRE PERSONE O PER FINI NON ISTITUZIONALI

Genotype



RFLP
RAPD
AFLP
SSR

SCAR
CAPS
SSCP
RGA e AFLP-RGA
HA

S-SAP
SNP

RNA messengers

Proteins

DNA Random Markers

DNA Functional Markers

Differential Display
cDNA-AFLP
Subtractive Libraries
Array

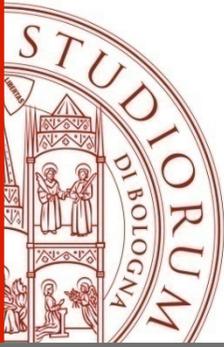
Isozymes
Mass Spectrometry
SDS-PAGE
2D-PAGE
Crystallography

TRANSCRIPTOMICS

PROTEOMICS

GENOMICS

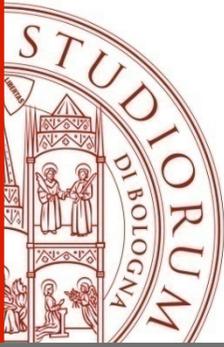
Phenotype



Cosa è un genoma?

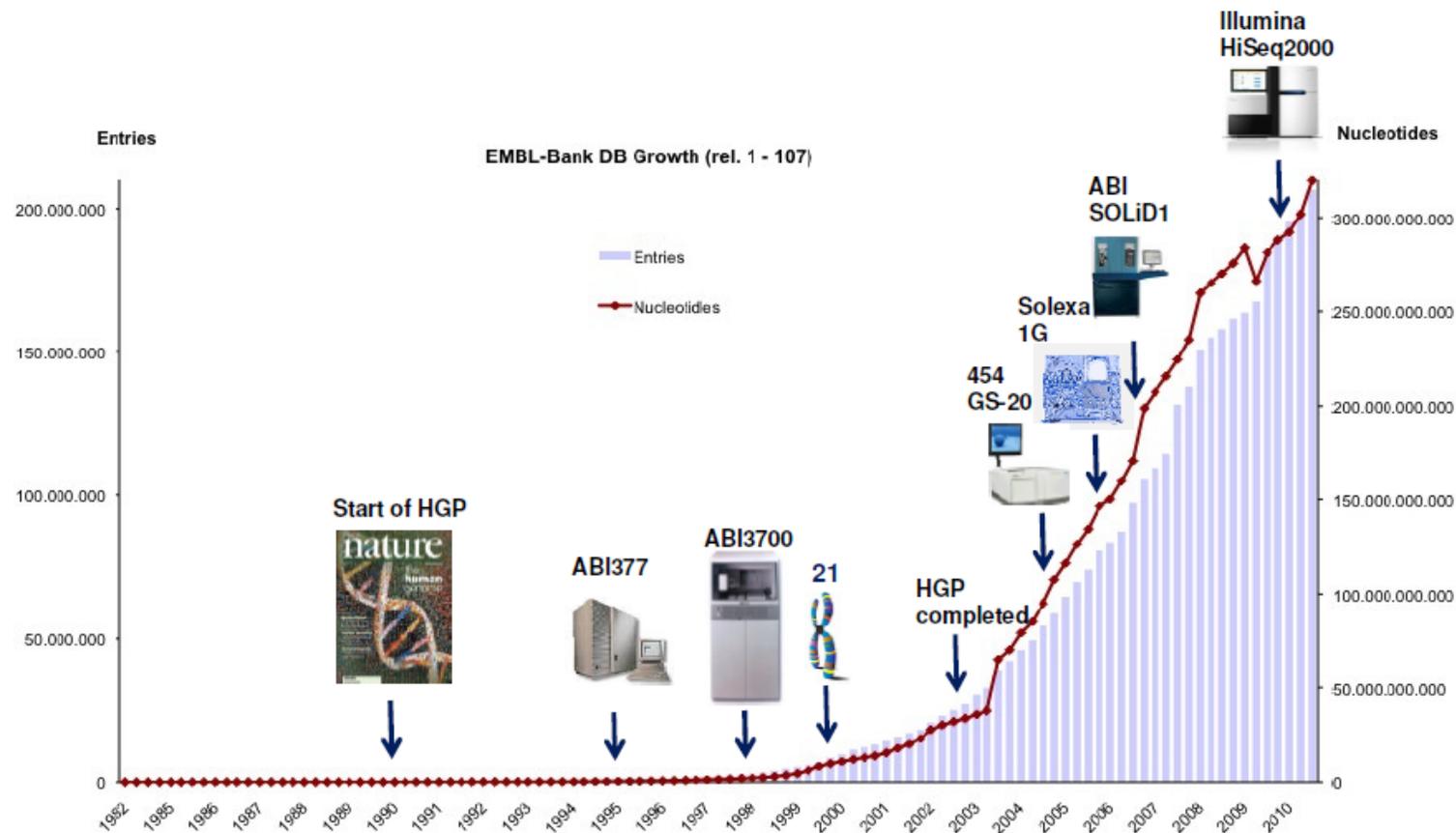


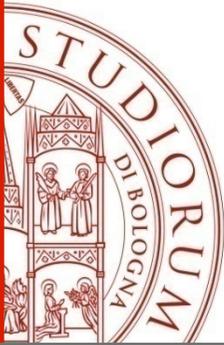
Il **genoma** rappresenta l'intera informazione genetica codificata dal DNA che caratterizza ogni organismo vivente



Il sequenziamento dei genomi

Dalla tecnologia Sanger alle tecniche NGS





La NGS di terza generazione

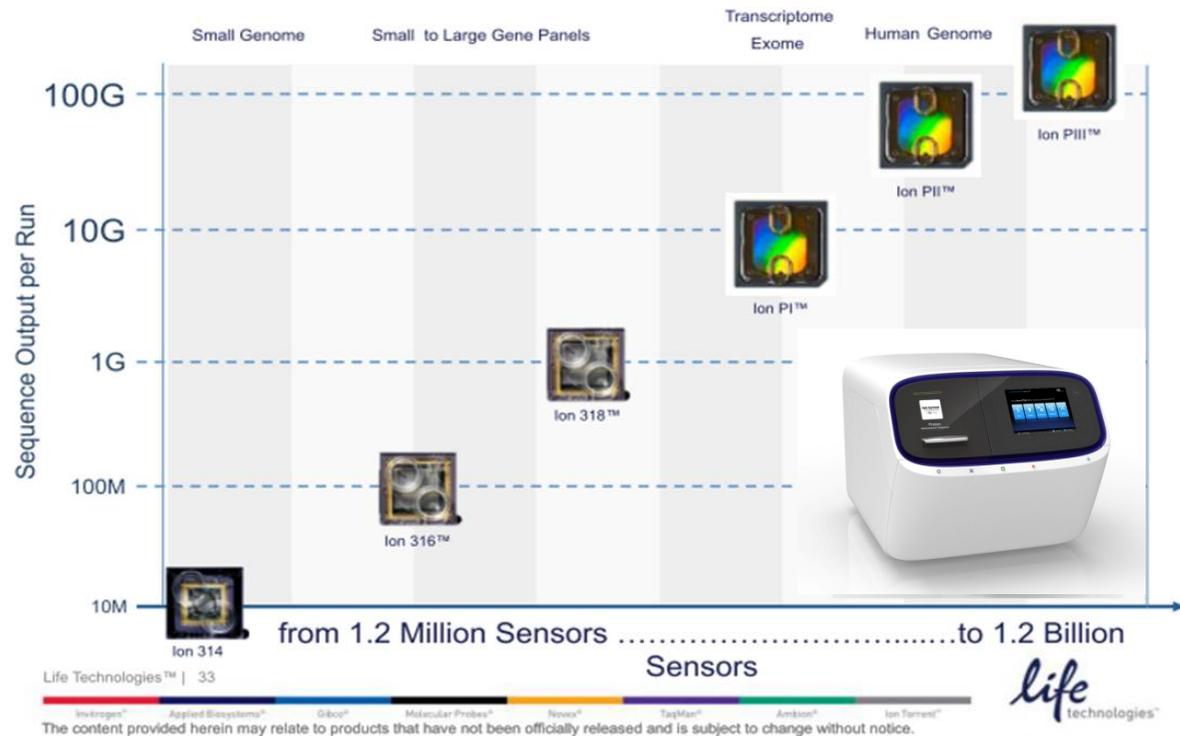
Diminuire tempi e costi di sequenziamento misurando il pH di una soluzione

L'esempio della tecnologia "Ion Torrent"



Il chip da 100Gb permette di sequenziare il genoma dell'uomo con una copertura 30X in sole tre ore

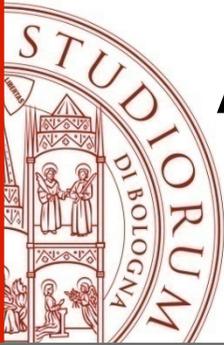
Unprecedented Scalability 10,000-Fold From Ion 314™ to Ion P111™ Chip



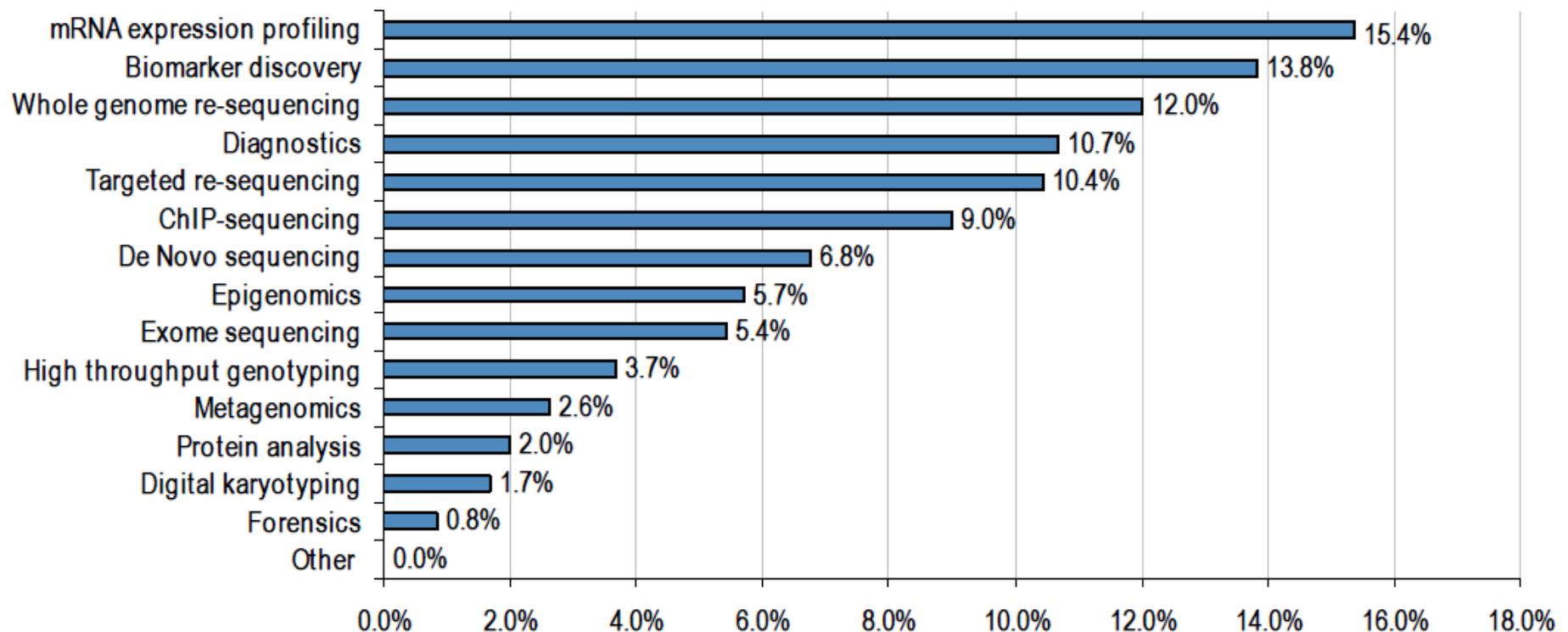
Life Technologies™ | 33

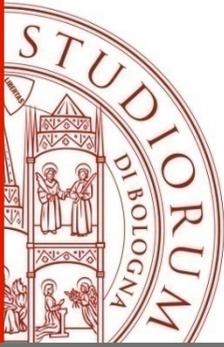
Invitrogen™ Applied Biosystems™ Qiagen™ Molecular Probes™ Novus™ Takara™ Ambion™ Ion Torrent™
The content provided herein may relate to products that have not been officially released and is subject to change without notice.





Applicazioni delle tecniche NGS

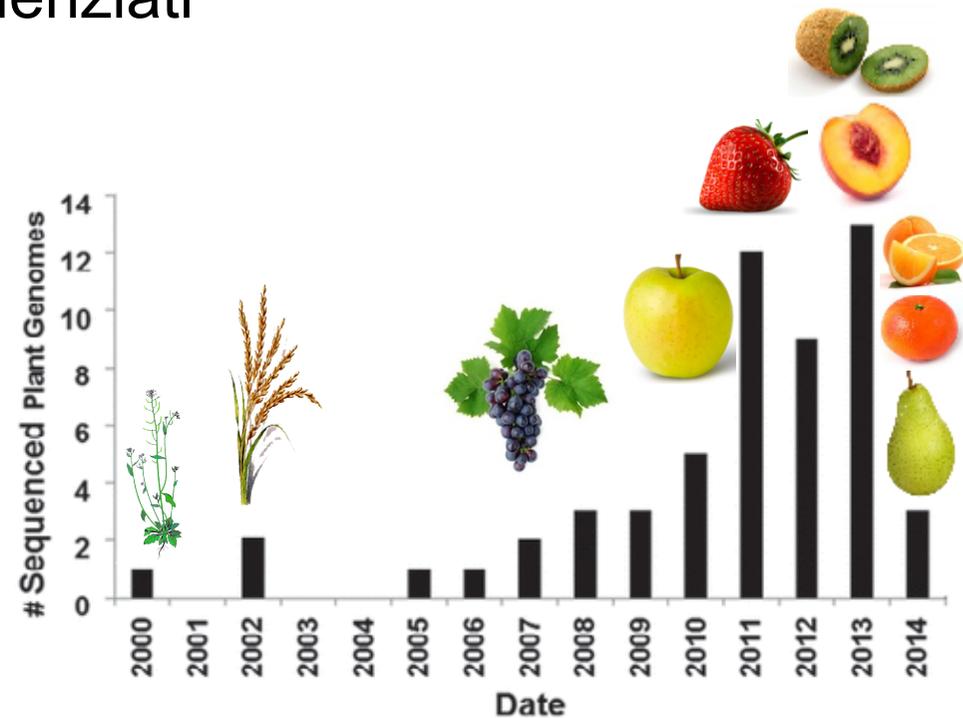
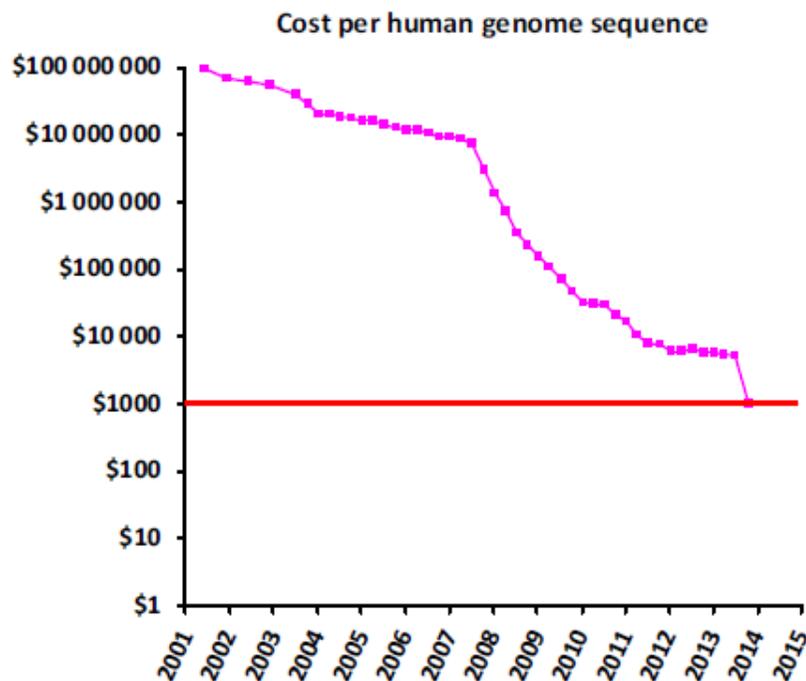




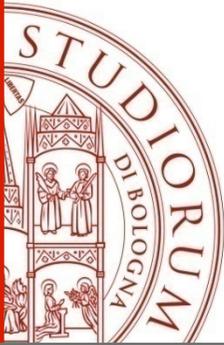
NGS e l'era dei genomi verde

L'abbattimento dei costi e l'inizio dell'era genomica

Nel 2013 è stata superata la soglia dei 50 genomi vegetali sequenziati

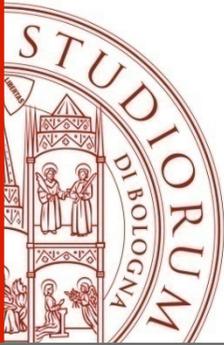


GAPPER N.E., ET AL Horticulture Research, DOI: 10.1038/hortres.2014.34



Assemblare un genoma non è semplice





Perché sequenziare un genoma?

I benefici attesi dal sequenziamento del genoma umano

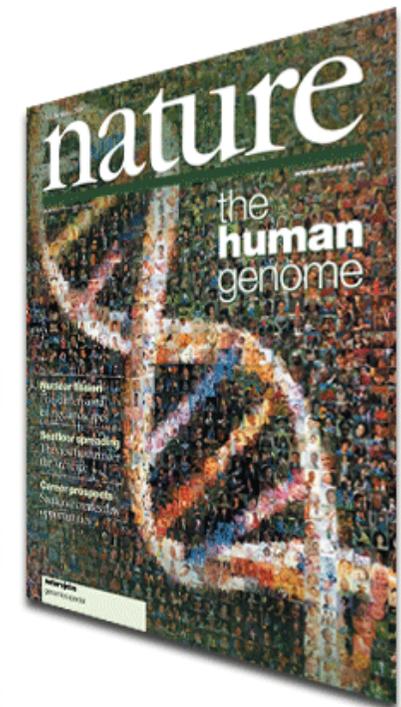
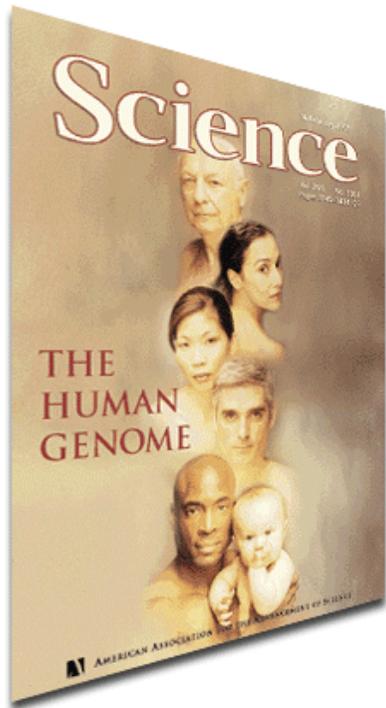
Pratica medica:

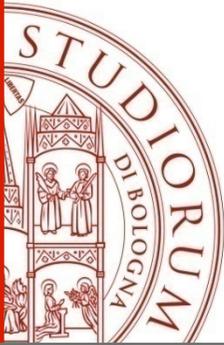
- conoscere le basi genetiche per molte malattie
- sviluppare test genetici per la diagnosi precoce
- ridurre l'incidenza di mutazioni ereditarie

Ricerca di base: studiare le basi molecolari di molti aspetti della fisiologia umana

Evoluzione umana: studio delle migrazioni sulla base di patrimonio genetico femminile

DNA forense: identificazione di potenziali sospetti in una scena del crimine





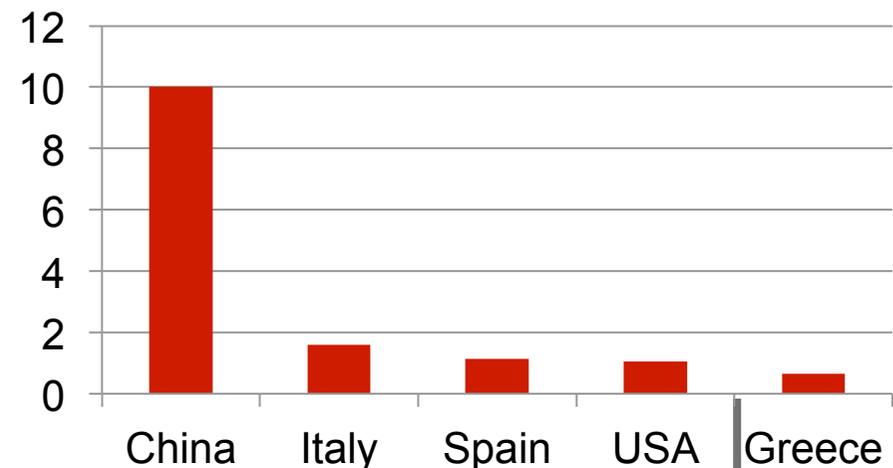
Perché il pesce è importante?

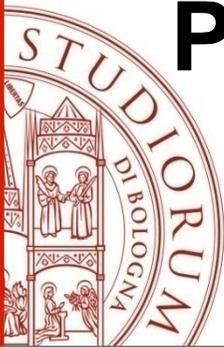
2012	Superficie (Ha)	Produzione (t)
Mondo	1.499.872	21.083.151
Europa	235.087	3.394.641
Italia	71,012	1.331.621

FAOSTAT | © FAO Statistics Division 2014 | 12 October 2014

Italia:
Circa 30% della superficie e il 39%
della produzione Europea

Produzione (MT)





Perché il miglioramento genetico del pesco è importante?

Resistenze

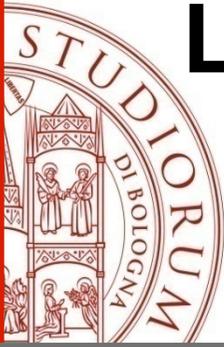


Qualità frutto

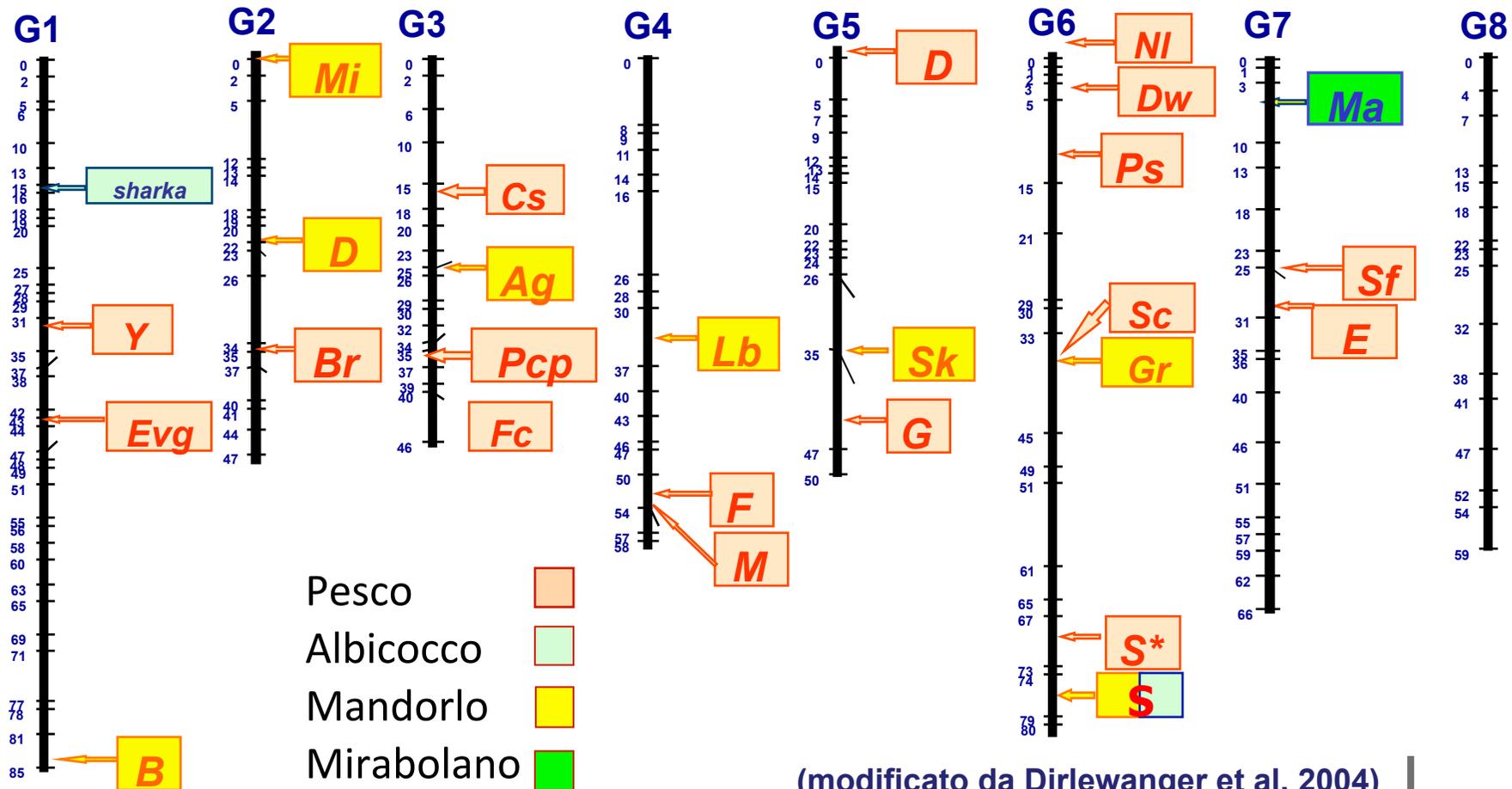


Architettura

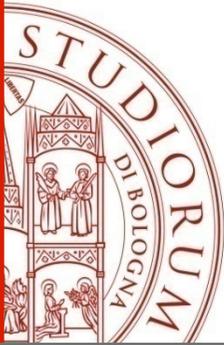




La posizione di molti geni è nota da tempo non solo nel pesco



(modificato da Dirlewanger et al. 2004)



Le sequenze di geni espressi

prima che il genoma fosse disponibile

www.itb.cnr.it/estree/statistics.php

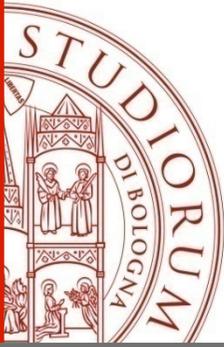


STATISTICS ON SEQUENCES

- Home Page
- Drupomics project
- Library details
- Processing, Assembly & Annotation Protocol
- **Statistics on Sequences**
- Statistics on GO annotations
- Repeats
- Sequence report
- Contig report
- SNPs
- ESTree Mapping Project
- Text Search
- Blast Search
- Links
- References
- Download
- DB contents and help

	Total Peach sequences
<i>Total nr of successful sequences</i>	75404
<i>Average Base Count after trimming</i>	585.56
<i>Number of singletons</i>	20682
<i>Number of contigs</i>	7709
<i>Number of putative unigenes</i>	28391

I consorzi di sequenziamento di EST di pesco avevano fornito circa 75K sequenze (anni 2000-2008) e identificato 28K geni



Perché sequenziare il pesco?

I benefici attesi dal sequenziamento del pesco

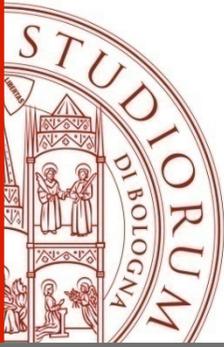
- 1) Comprendere le basi genetiche dei caratteri di interesse
- 2) Localizzare i geni e le regioni genomiche che controllano i caratteri qualitativi e quantitativi (QTL)
- 3) Sviluppo di marcatori molecolari per il miglioramento genetico attraverso l'uso della MAS (selezione assistita con marcatori)



The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution

The International Peach Genome Initiative*

NATURE GENETICS VOLUME 45 | NUMBER 5 | MAY 2013



The International Peach Genome Initiative (IPGI)

Bisogna essere in tanti

Pensato nel 2007, disponibile in rete dal 2010, pubblicato nel 2013



NC STATE UNIVERSITY



DRUPOMICS



UNIVERSIDAD
De Chile



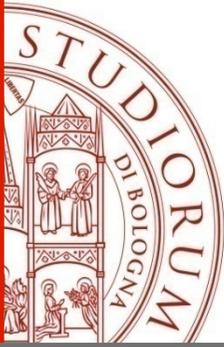
UNIVERSIDAD
ANDRES BELLO



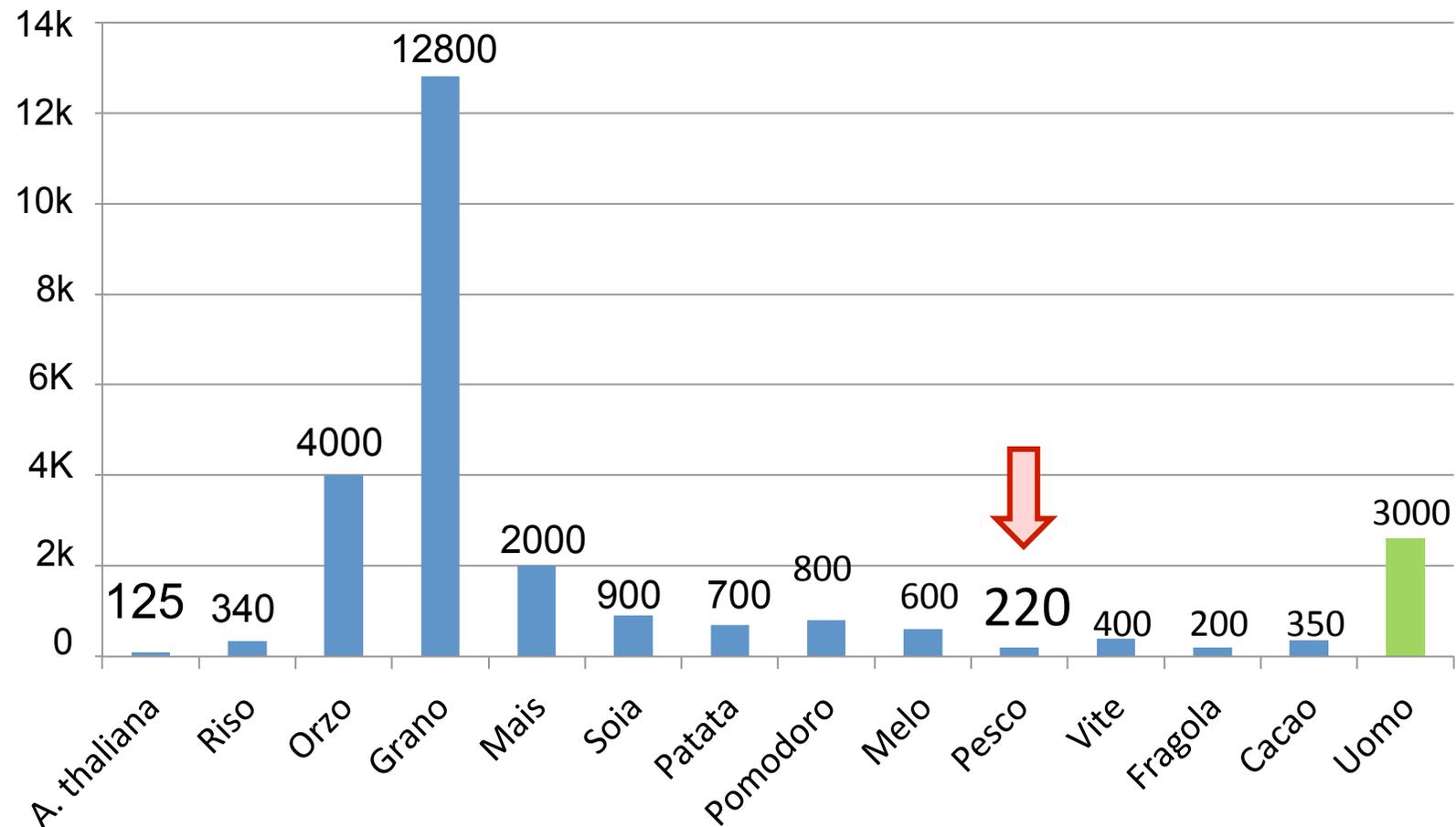
ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

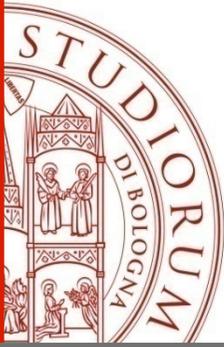
ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

IL PRESENTE MATERIALE È RISERVATO AL PERSONALE DELL'UNIVERSITÀ DI BOLOGNA E NON PUÒ ESSERE UTILIZZATO AI TERMINI DI LEGGE DA ALTRE PERSONE O PER FINI NON ISTITUZIONALI



Il piccolo genoma di una specie modello



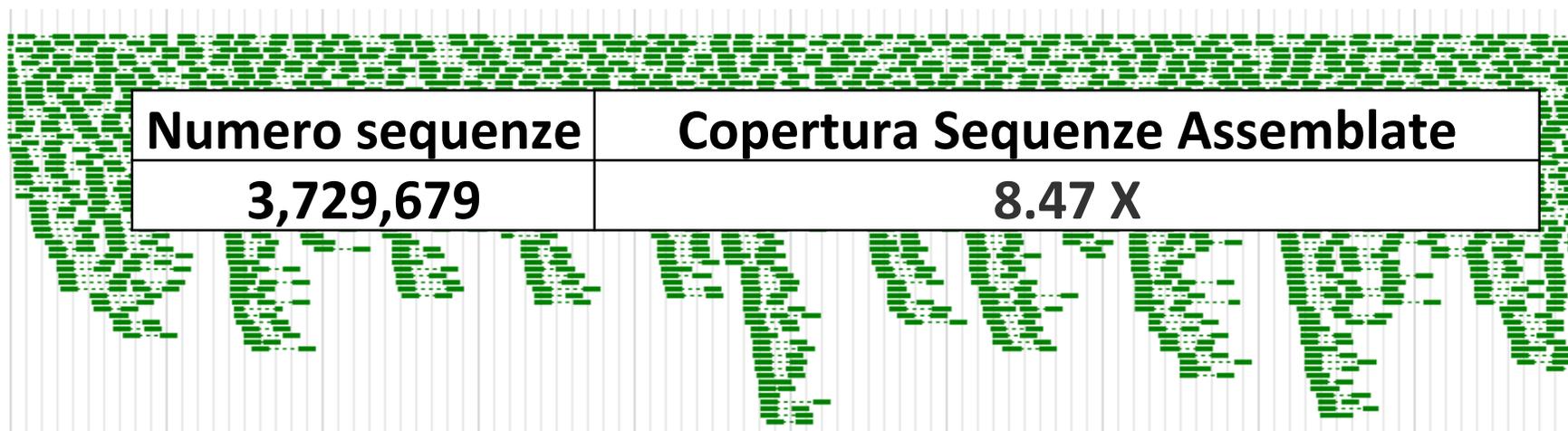


Dimensione della sequenza 224.6 Mb

27,852 geni identificati

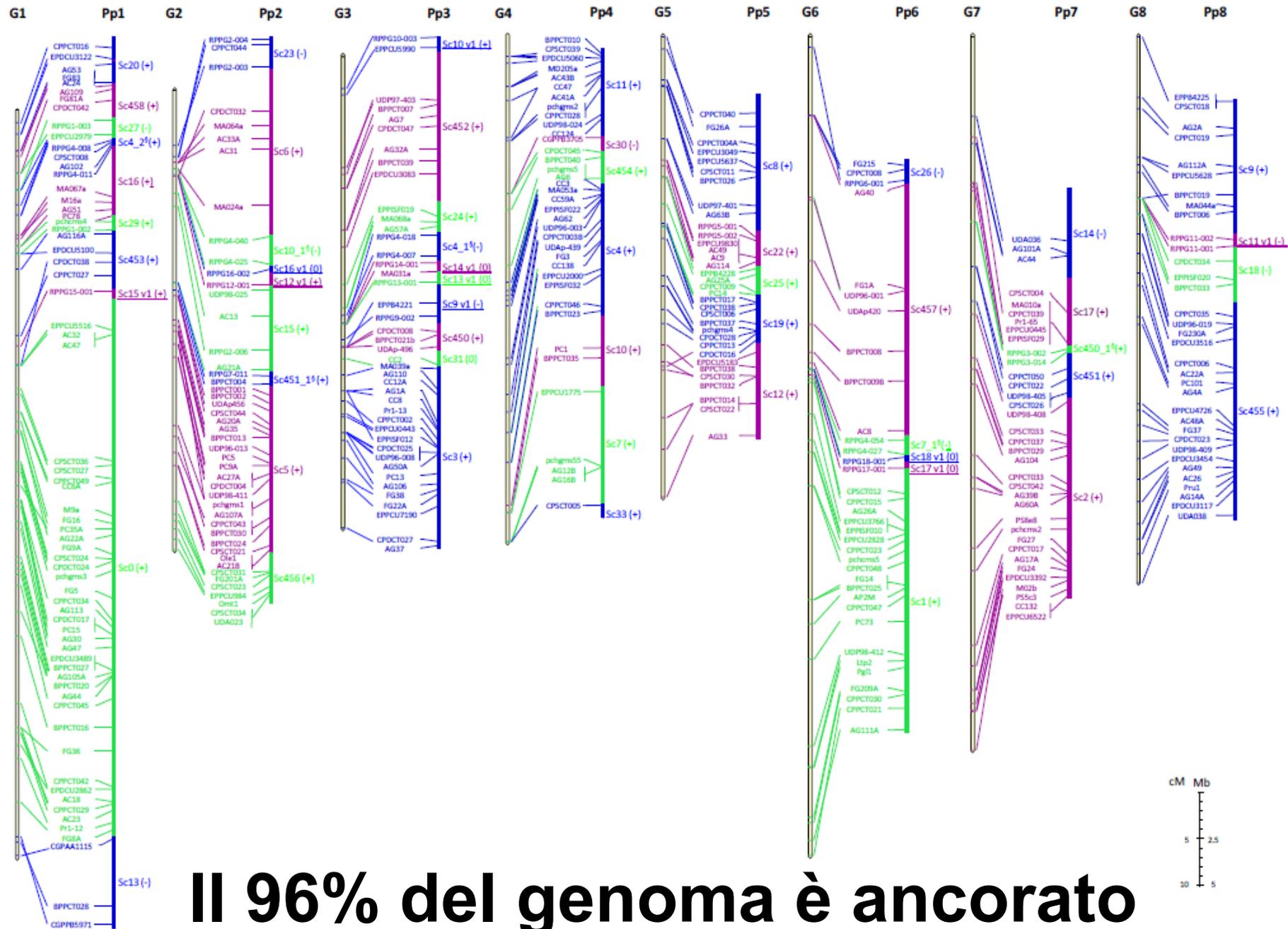
Pianta doppio aploide derivata dalla cv 'Lovell'

Sequenziamento "Sanger" del genoma: JGI (California) & IGA (Udine)

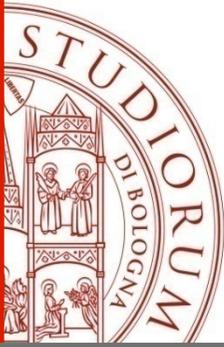


Assemblaggio delle sequenze: Software Arachne (Jaffe et al., 2003)

Rimozione sequenze DNA plastidico e mitocondriale

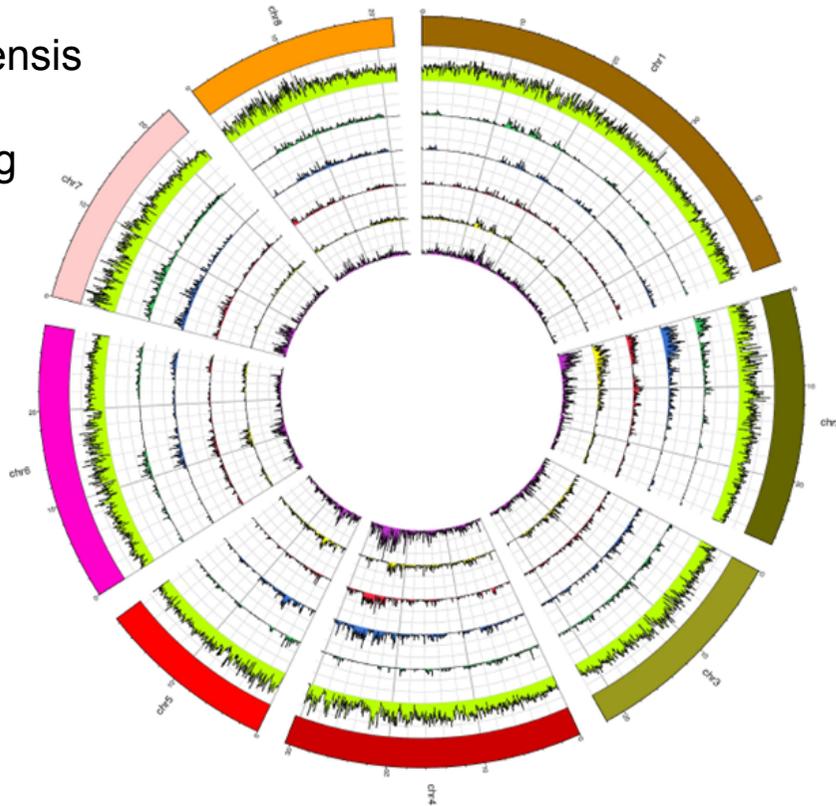


Il 96% del genoma è ancorato



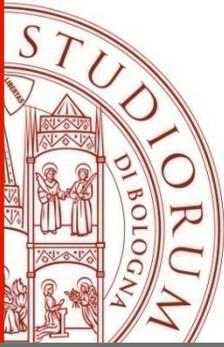
Dal genoma della specie al genoma delle varietà

- P. davidiana
- Early Gold
- F1 CxA
- P. ferganensis
- IF310828
- Yumeyong

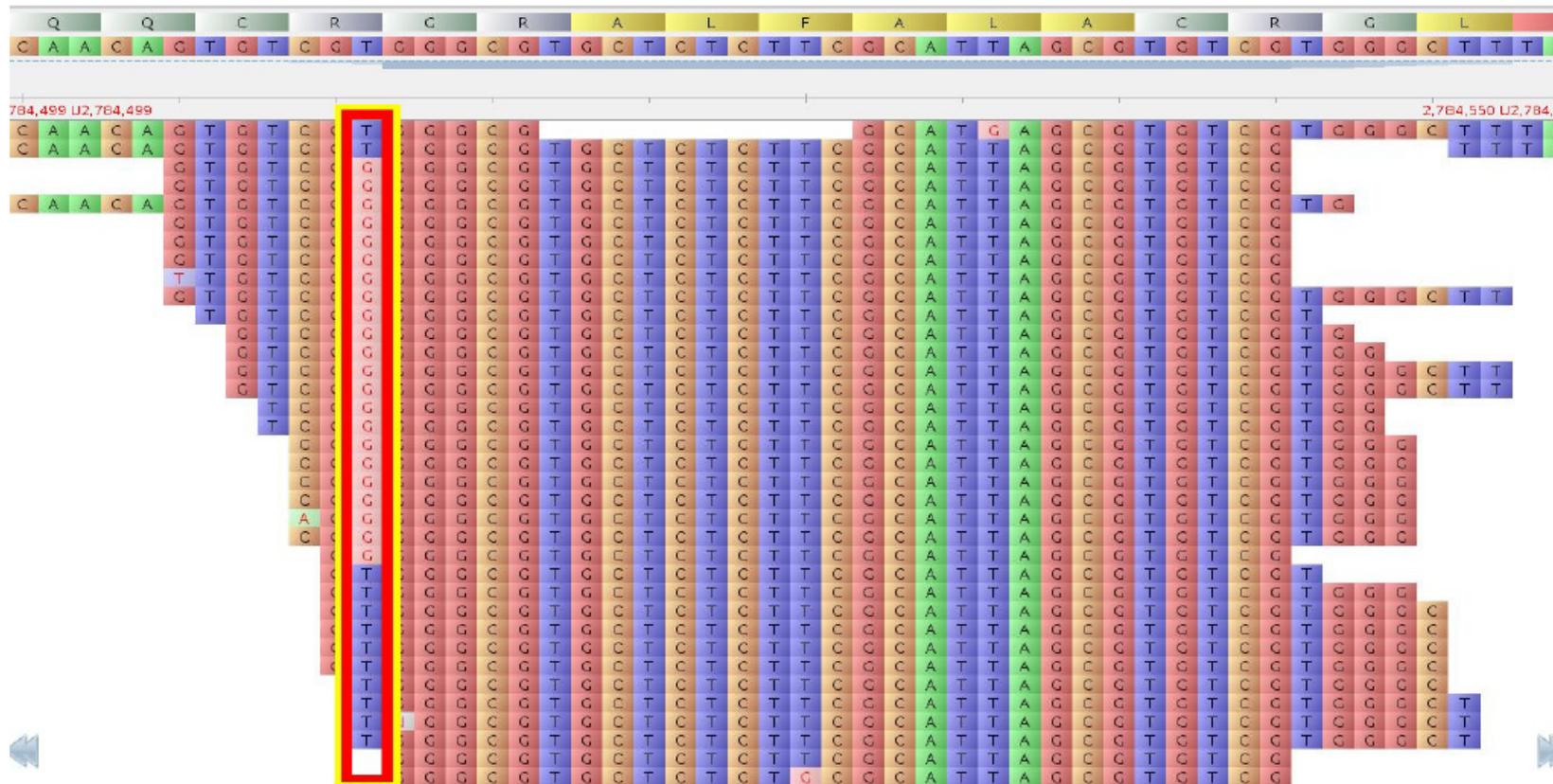


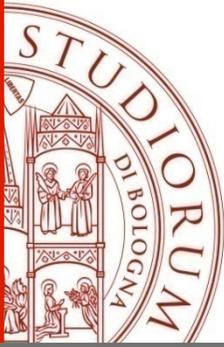
➤ La sequenza del pesco serve come riferimento per ri-sequenziare singole varietà di pregio con tecnica NGS

➤ Decine di migliaia di marcatori SNP vengono identificati nei genotipi di interesse



Identificare un marcatore SNP con tecnologia NGS è semplice



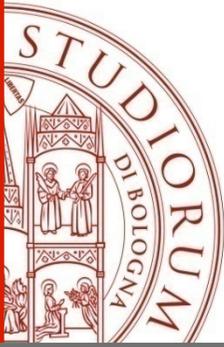


Gli SNP Chip e l'analisi di marcatori molecolari sull'intero genoma

- Le tecniche di risequenziamento dei genomi hanno permesso di identificare milioni di marcatori SNP nelle specie arboree e di sviluppare strumenti per la loro analisi massale quali ad esempio gli SNP chip



- Migliaia di marcatori ben distribuiti nel genoma possono essere analizzati simultaneamente (pesco 9000 SNP; ciliegio 6000 SNP)
- Nuove mappe genetiche per localizzare caratteri sui cromosomi possono essere costruite con un solo esperimento



Isolamento di un gene

Prima e dopo il sequenziamento del genoma

Fasi di lavoro

Costruzione di una mappa di associazione



Costruzione mappa fisica



Fine mapping della regione di interesse



Identificazione geni candidati



Identificazione del gene

Senza sequenza

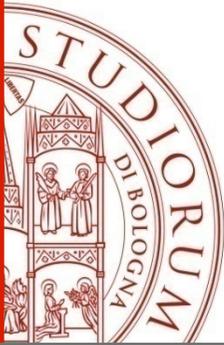
genomica

3-5 persone-anno

Con sequenza

genomica

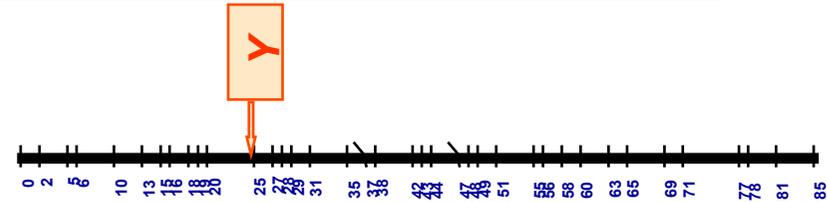
< 1 persona-5-6 mesi



Identificazione di geni sulla sequenza

<http://www.phytozome.org/peach>

Cromosoma1



Prunus persica: Mappa di 19.06 kbp da scaffold_1, posizione 25,630,445 - 25,649,500

Browser [Select Tracks](#) [Snapshots](#) [Custom Tracks](#) [Preferences](#)

Cerca

Elemento Genomico o Regione: Cerca

Scarica Decorated FASTA File

Esempi: [scaffold_1:21293001..21343000](#)

Origine dei dati:

Save Snapshot

Sfoggia/Zoom: Gira

Mostra 19.06 kbp

Panoramica

Genetic Marker

Region

Dettagli

Transcript

ppa008283m

ppa017003m

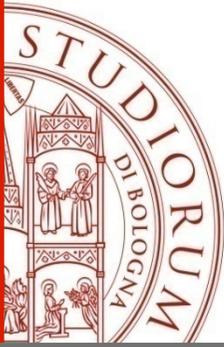
ppa006109m

ppa026613m

ppa025705m

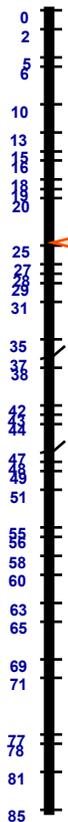
ppa025203m

ppa01211



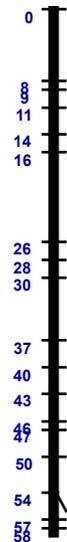
I primi geni di pesco identificati grazie alla disponibilità della sequenza del pesco

G1



Locus *Y*
pesca a polpa
bianca o gialla

G4



Locus *M*
maturazione
precoce o
tardiva

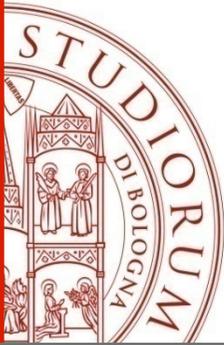
G5



Locus *G*
buccia pesca o
nettarina



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

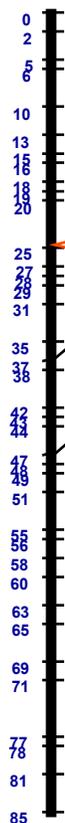


Il colore della polpa (Locus Y)

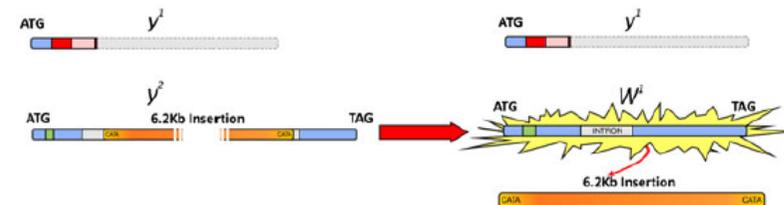
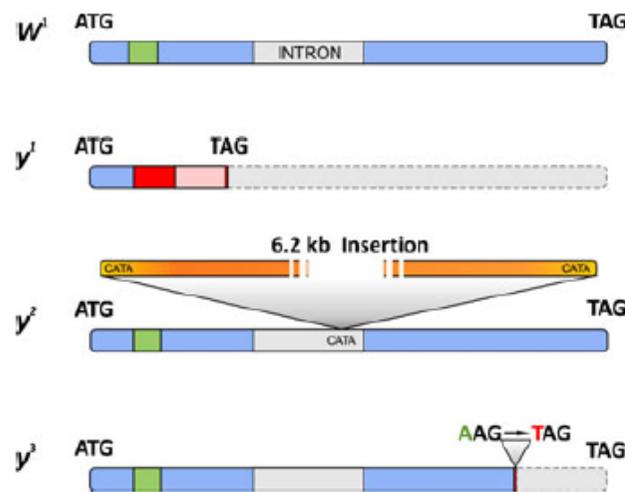
Tre mutazioni in un gene CCD4 sono responsabili del colore giallo della polpa

G1 Il gene carotenoid cleavage dioxygenase (*CCD4*) degrada i carotenoidi nelle polpa delle pesche.

Il gene funzionale (*W*) è sempre presente nelle pesche bianche

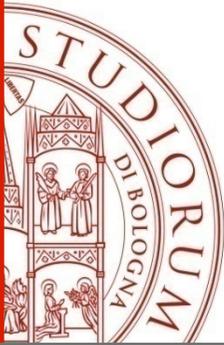


Y



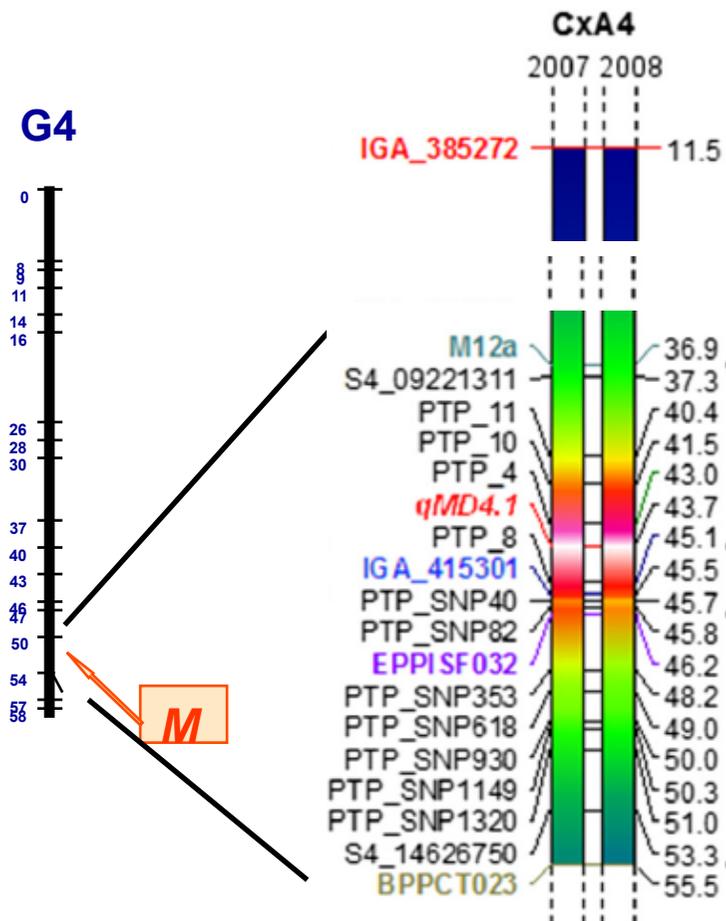
<http://www.phytozome.org/peach>

ADAMI ET AL 2013. Plant Mol Biol Report 31: 1166–1175



La maturazione delle pesche (Locus *M*)

Un gene *NAC* controlla la data di maturazione delle pesche

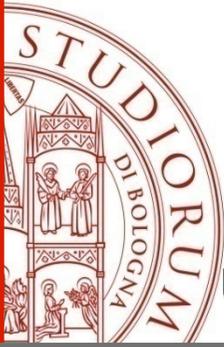


La regione del gene circoscritta a sole 220 kb (presenti solo 25 geni)

```
305 315 325 335  
ppa008301m_WT FFQNSNVMTQ NFCNPTDP~~~YGYSNRLGR SGLGFGGAEK  
ppa008301m_MUT FFQNSNVMTQ NFCNPTDPTD PYGYSNRLGR SGLGFGGAEK
```

un'inserzione di 9 bp in un gene per un fattore di trascrizione *NAC* è associata alla maturazione precoce.

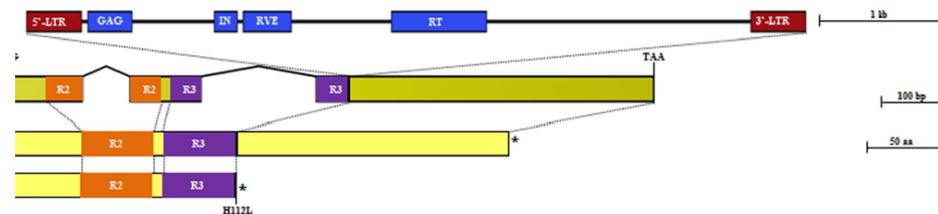
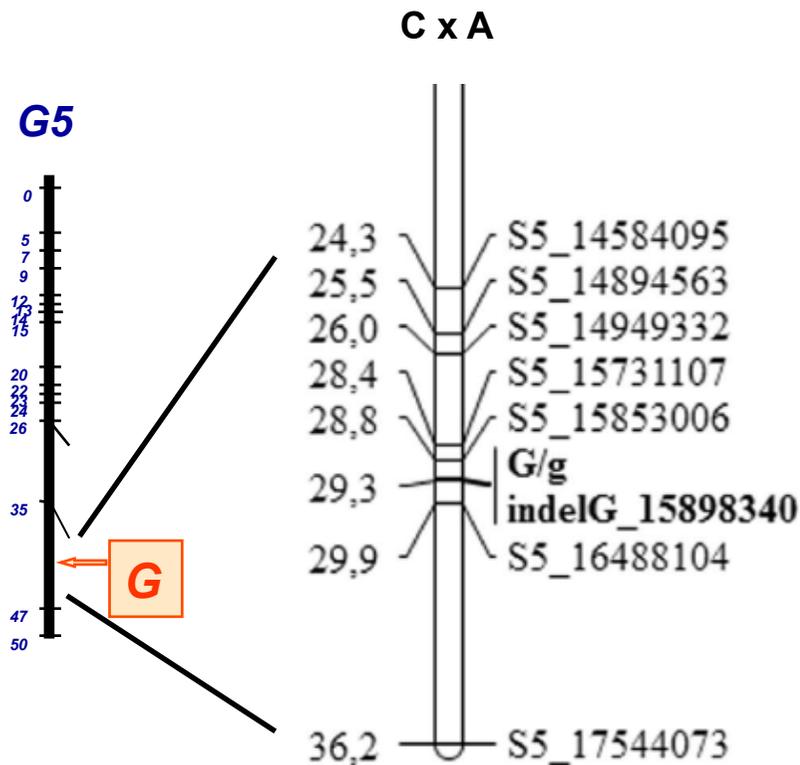
PIRONA ET AL 2013 BMC Plant Biol, 13:166.



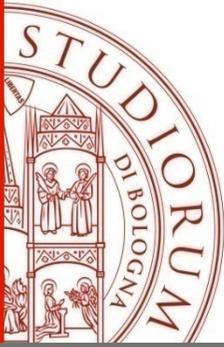
Buccia pelosa o glabra? (Locus G)

Un gene *Myb* controlla la formazione di peli sulla buccia delle pesche

La regione ridotta a 1,1 cM

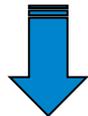
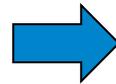


VENDRAMIN ET AL 2014 PLOS one, 9:1-13.

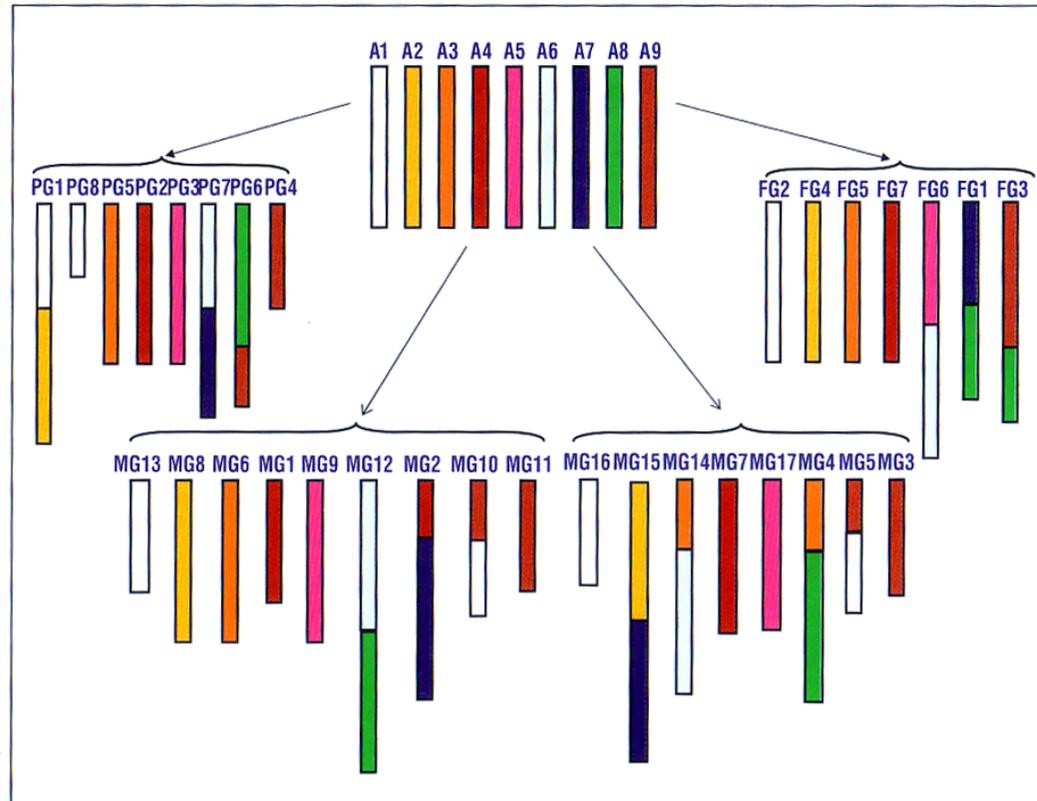


La sequenza del pesco per identificare geni in ciliegio albicocco e mandorlo?

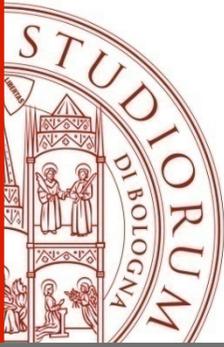
I genomi di albicocco mandorlo e ciliegio sono altamente sintenici col genoma del pesco



La sequenza del genoma del pesco può essere utilizzata per identificare geni nelle altre tre specie



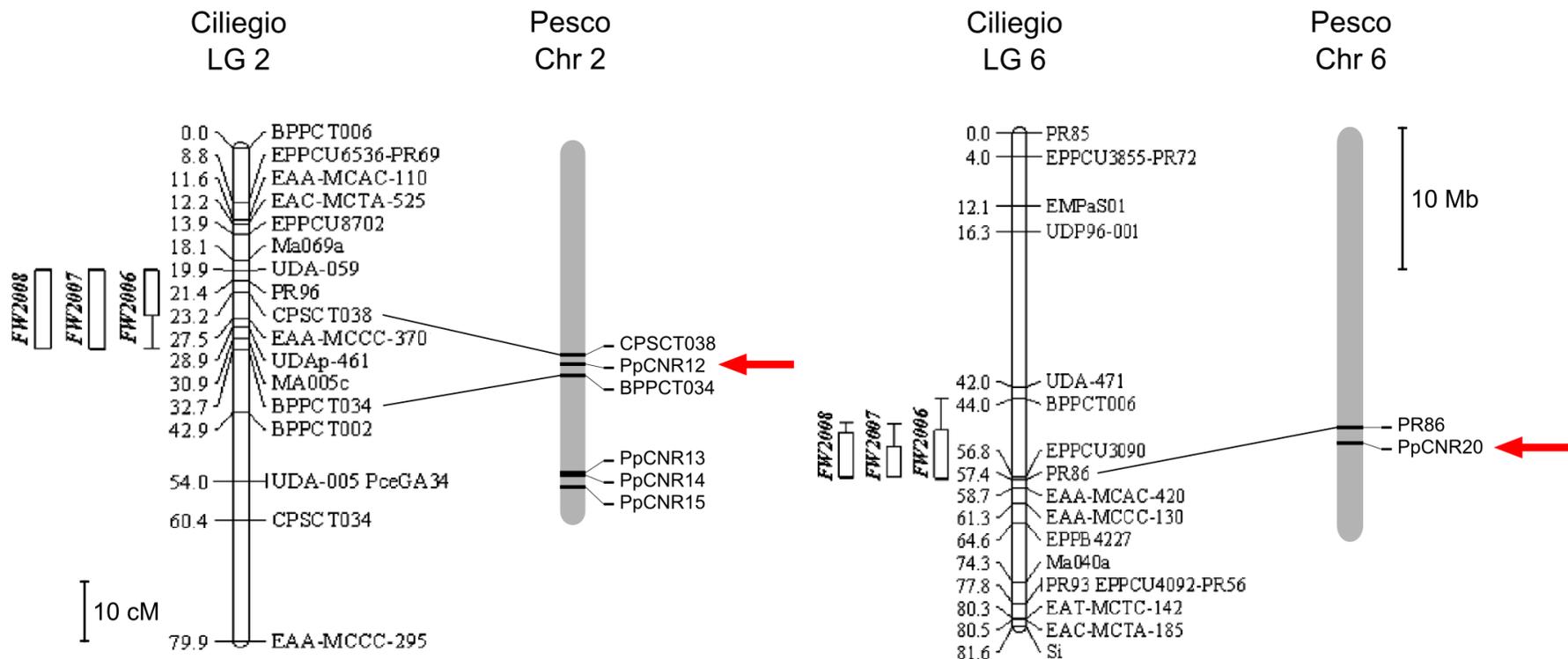
▲ Fig. 3 - Proposta evolutiva dei genomi delle Rosaceae, il comune ancestrale a 9 cromosomi confrontato con gli 8 del pesco, i 7 della fragola ed i 17 del melo (figura leggermente modificata da Illa et al. BMC Evol. Biol. 2011).



Ciliegie grandi grazie ai geni CNR

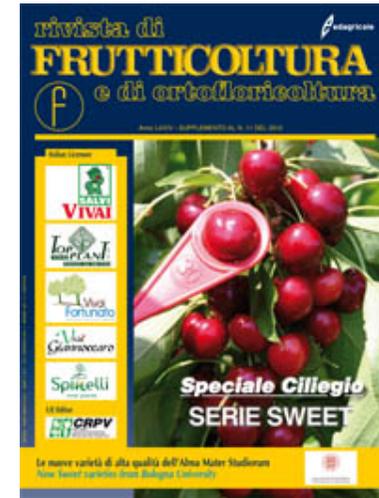
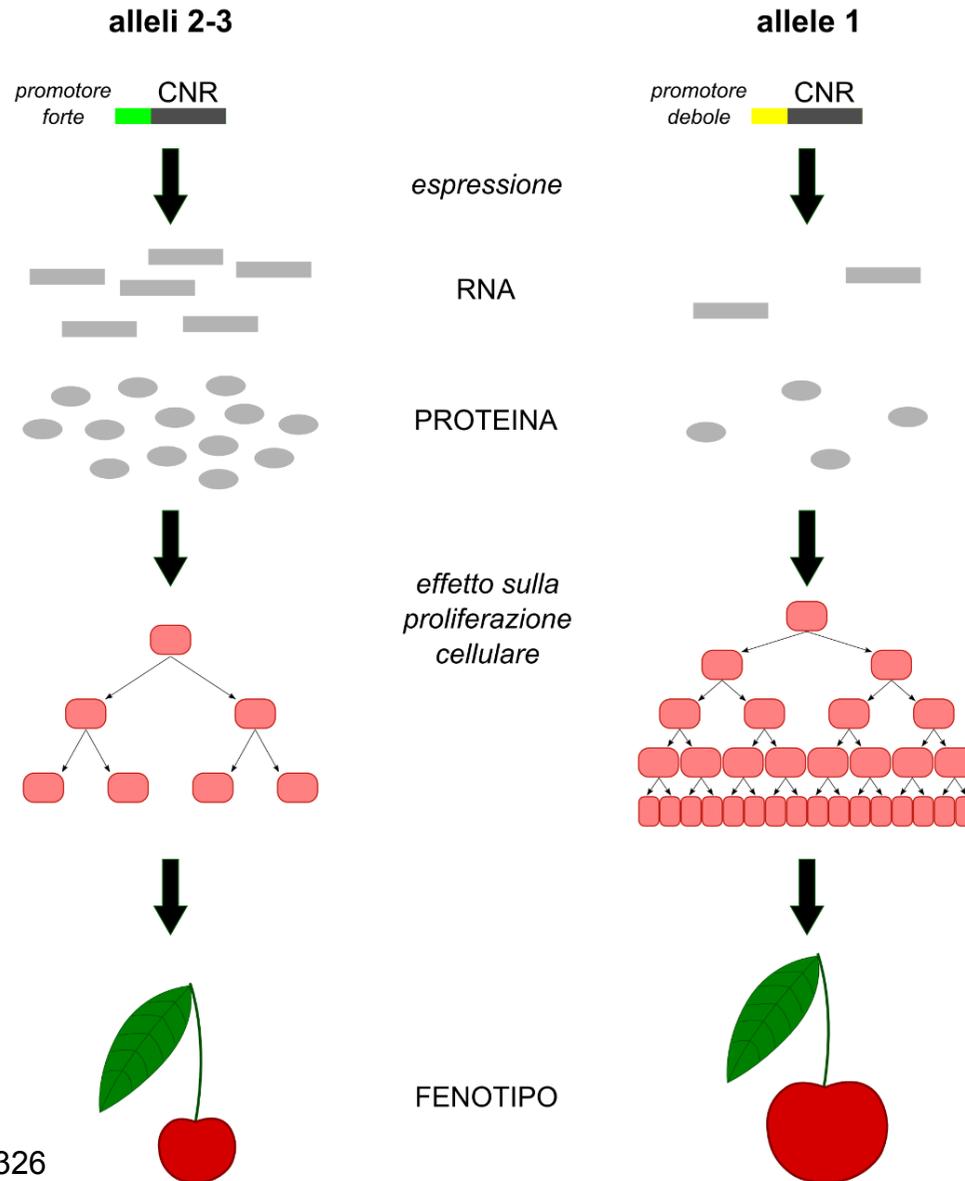
I geni CNR (cell number regulator) regolano la divisione cellulare nei frutti durante le fasi iniziali del loro sviluppo

Allineando le regioni QTL per la dimensione delle ciliegie alla sequenza del pesco si è identificata la presenza di un gene CNR sul cromosoma 2 e 6

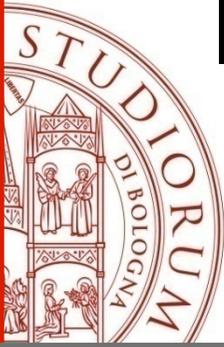




CNR → Riduzione del numero di cellule → Riduzione della dimensione del frutto



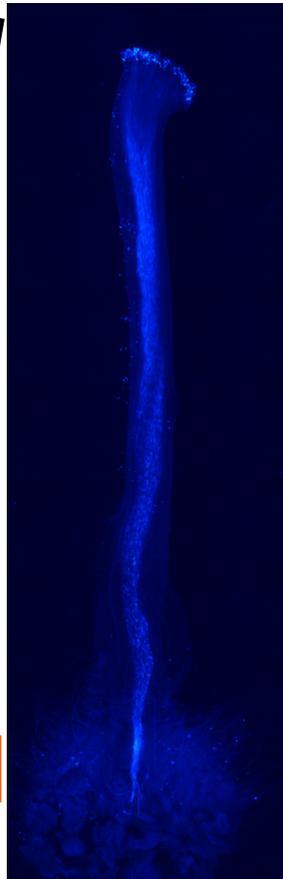
DE FRANCESCHI ET AL 2013.
Molecular Breeding, 32:311-326



I' autofertilità del pesco nelle specie del genere *Prunus*

Mutazioni nel gene ad espressione pollinica SFB produce genotipi autofertili nel genere *Prunus*

G6



S*

intactSFB

P.avium

P.mume

P.armeniaca

P.cerasus

P.persica

S^{3'}

S^{4'}

S^{5'}

S^f

S^{3'}

S^c

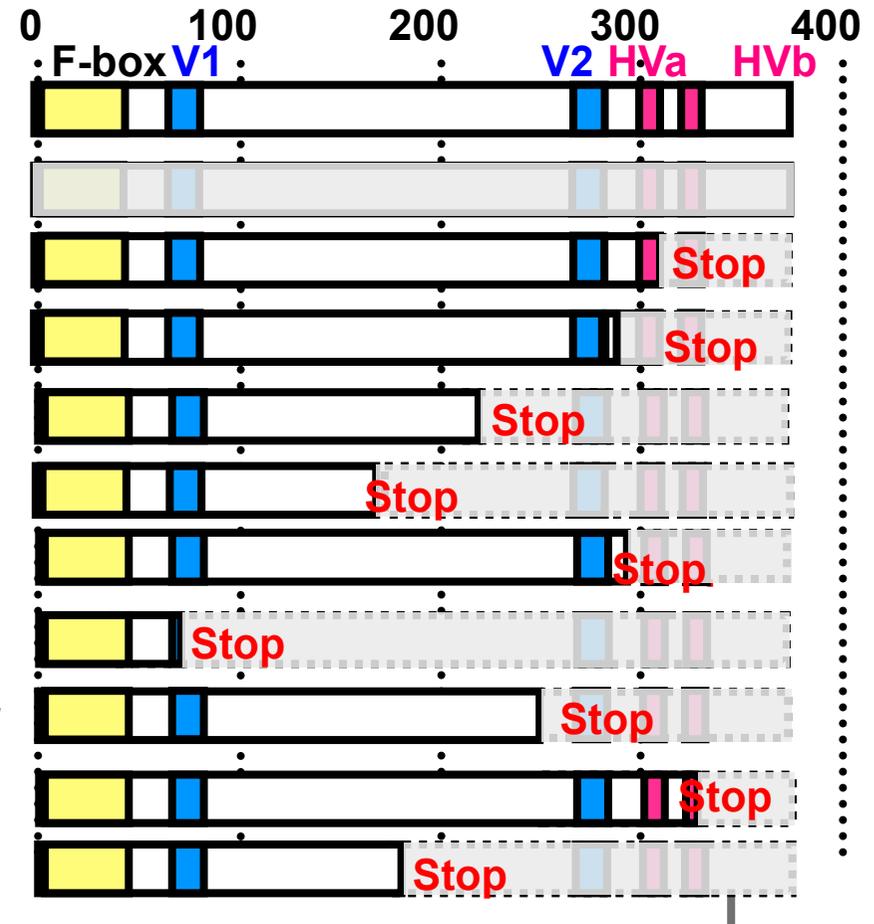
S^{1'}

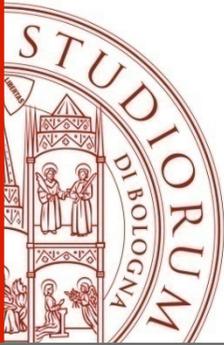
S^{13'}

S¹

S²

S^{2m}

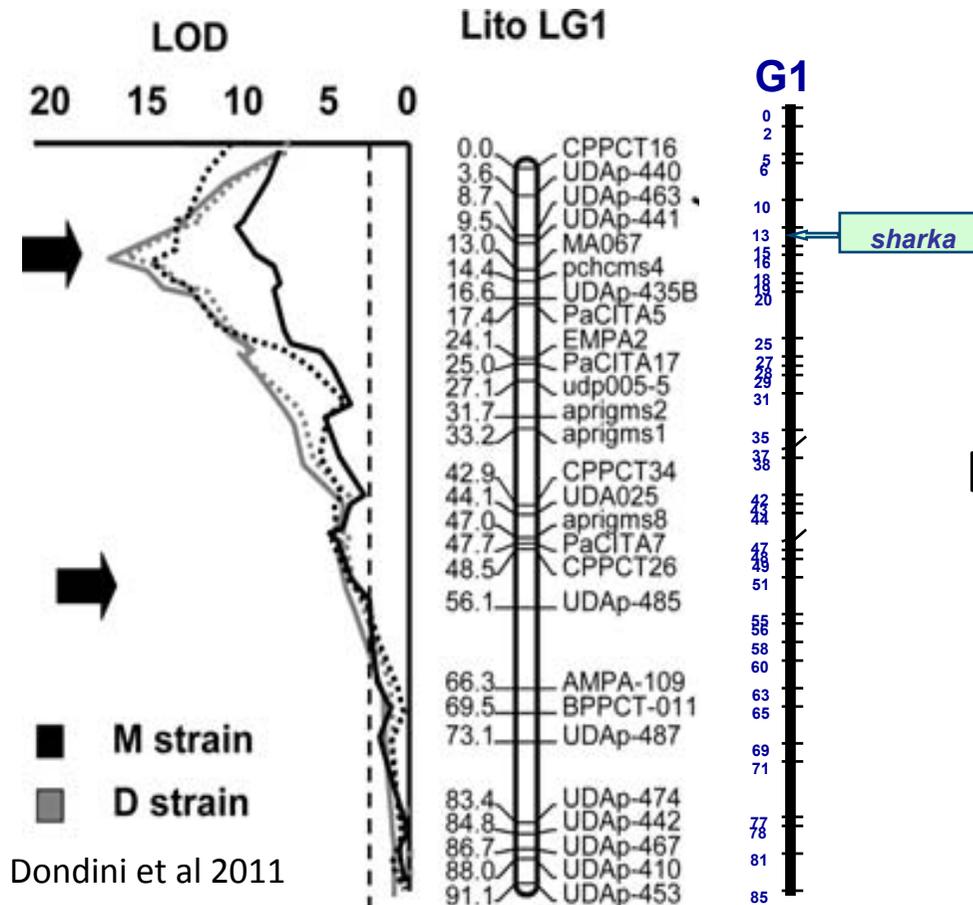




La resistenza a Sharka in albicocco

Risequenziata la cultivar resistente Lito

Allineato solo il 70% delle sequenze



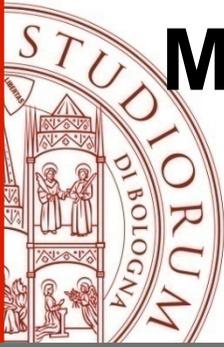
Distanza genetica 10cM



milioni di paia di basi



centinaia di geni



Marcatori molecolari e selezione assistita (MAS)

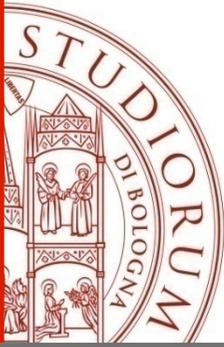


Bartolomeo Bimbi (1648-1730)

Una volta che i marcatori risultano associati a determinati caratteri, essi diventano immediatamente disponibili per la selezione assistita con marcatori molecolari (la MAS)

La MAS è in grado di accumulare, in tempi brevi, fattori genetici associati a caratteri economicamente importanti in una nuova varietà

La disponibilità di geni e dei loro promotori facilita anche il MG attraverso l'ingegneria genetica

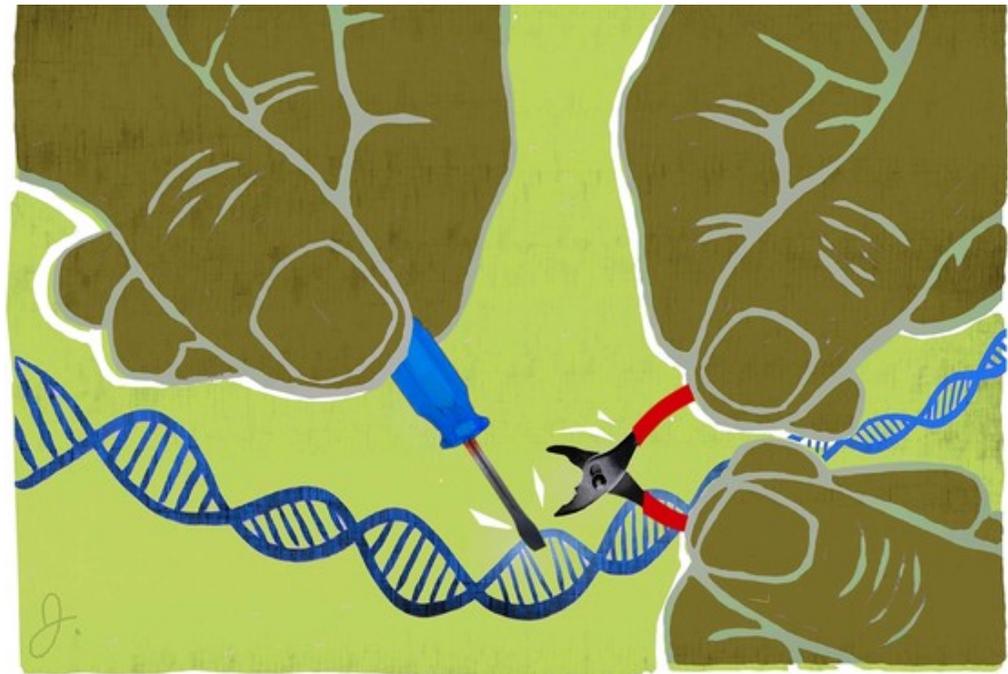
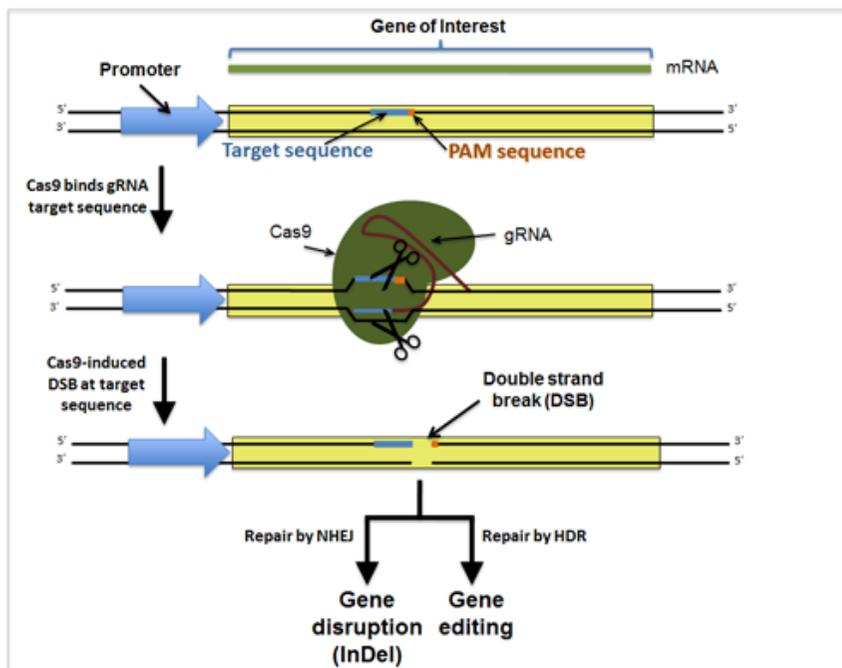


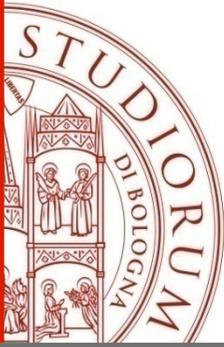
Ultima frontiera: il DNA editing

con CRISPR

clustered regularly interspaced short palindromic repeats

Gli organismi geneticamente “editati” (OGE) : si può fare "editing" sui geni di interesse di una varietà, che vengono corretti, tagliati, accorciati, “migliorati”



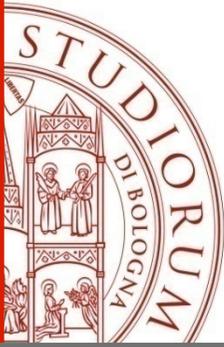


L'analisi del fenotipo come nuovo fattore limitante

- Il vero limite operativo non è più l'analisi genetica ma l'analisi dei fenotipi
- I geni responsabili dei caratteri spesso codificano per enzimi coinvolti in complesse vie metaboliche
- I prodotti dei geni della qualità (coinvolti nella biosintesi acidi organici, zuccheri, pigmenti, aromi, etc) dovrebbero essere quantificati simultaneamente



Risonanza Magnetica Nucleare



Conclusioni

- il sequenziamento del genoma non è un punto di **arrivo** ma di **partenza**: è uno **strumento di fondamentale importanza** per la comprensione delle basi genetiche e fisiologiche dei caratteri
- il ri-sequenziamento di varietà di pregio offre nuove opportunità nell'**identificazione di geni utili** e soprattutto di **varianti migliorative** da utilizzare per il miglioramento genetico
- la **disponibilità di marcatori molecolari** non è più un fattore limitante ed auspico che diventi “**routine quotidiana**” anche la loro **applicazione pratica** nella selezione assistita.