

# Progetto POLORISO – Incontro di coordinamento della attività scientifica del progetto

CRA - Unità di Ricerca per la risicoltura

*Vercelli, 5 aprile 2013*



## Genetica, genomica ed innovazione varietale

### U09, Parco Tecnologico Padano

Pietro Piffanelli, Pamela Abbruscato, barbara Menin

# Obiettivi previsti dalla scheda di ricerca

31/01/2012-30/01/2014

---

LdR2.1: CREAZIONE LINEE SSD: mesi 0-6 anno 1 (Lug2012/Gen2013)

2.1.1- Preparazione stock di semi single seed descent (SSD) di 300 linee di riso per successive analisi

2.1.2 - Preparazione e validazione stock di DNA per analisi di genotipizzazione delle 300 linee SSD

LdR2.2 - ANALISI GENOTIPIZZAZIONE: mesi 7-15 anno 1/2 (Apr2013/Ott2013)

Genotipizzazione tramite GBS delle 300 linee SSD di riso e analisi di bioinformatica dei dati ottenuti

LdR2.3 - FENOTIPIZZAZIONE BLASTEST: mesi 3-12 anno 1/2 (Gen2013/Lug2013)

Fenotipizzazione di 300 linee SSD per la resistenza al brusone in condizioni

LdR2.4 - ANALISI ASSOCIAZIONE: mesi 13-24 (*attività NON prevista nell'anno 1*)

Analisi bioinformatica di associazione fenotipo-genotipo in collaborazione con la U.O. CRA con integrazione dei dati fenotipici generati dalle U.O. UNIMI/CRA

LdR2.5 - RI-SEQUENZIAMENTO GENOMI: mesi 3-6 anno 1 (Lug2012/Gen2013)

Caratterizzazione genomica delle due varietà Carnaroli, Arborio tramite ri-sequenziamento genomico in collaborazione con la U.O. CRA GPG

LdR2.6 - ANALISI GENOMI: mesi 7-21 (Ott2013/Apr2014)

Analisi bioinformatica dei dati di ri-sequenziamento/assemblaggio *de novo* dei genomi di Carnaroli e Arborio in collaborazione con la U.O. CRA GPG.

---

# Risultati raggiunti (1/2)

---

## LdR2.1: CREAZIONE LINEE SSD: mesi 0-6 anno 1 (Lug2012/**Gen2013**)

- 2.1.1- Preparazione stock di semi single seed descent (SSD) di 300 linee di riso per successive analisi
  - 2.1.2 - Preparazione e validazione stock di DNA per analisi di genotipizzazione delle 300 linee SSD
-

## 2.1.1 - Preparazione stock di semi SSD

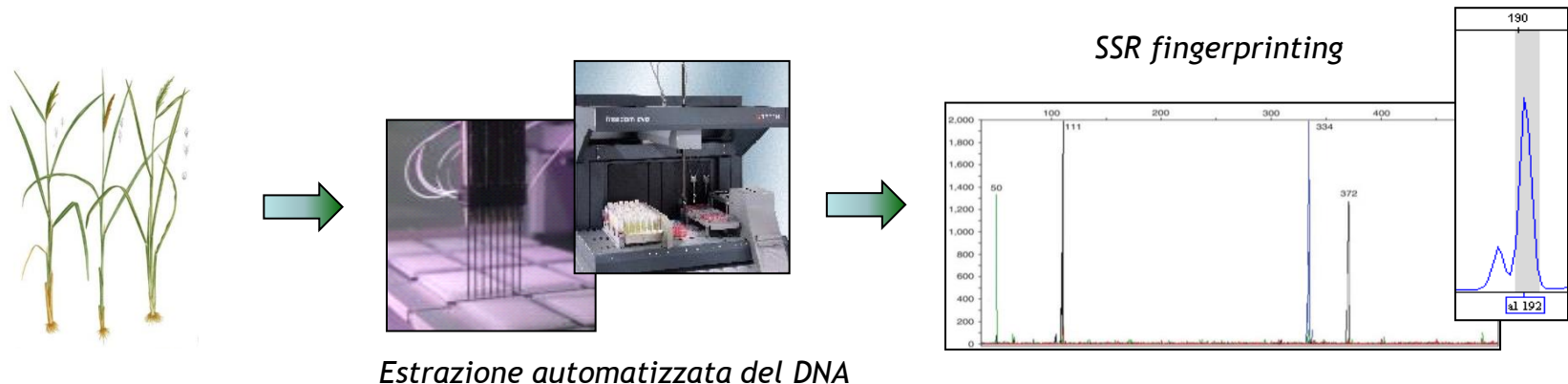
---

- ❑ 300 accessioni di riso sono state selezionate per costituire la collezione POLORISO comprendenti per la maggior parte varietà di riso temperato coltivate in Italia e in Europa, e varietà straniere entrate nei programmi di miglioramento genetico in Italia o riconosciute come varietà di riferimento a livello internazionale
  
  - ❑ 1 singola pianta/accessione è stata selezionata per la moltiplicazione - Le singole accessioni sono state moltiplicate in purezza presso il CRA-RIS di Vercelli, per discendenza da singola pianta
  
  - ❑ Gli stock di seme sono conservati al CRA-RIS di Vercelli e sono utilizzati per le analisi di genotipizzazione e fenotipizzazione previste nel progetto
-

## 2.1.2 - Preparazione e validazione stock di DNA

---

- ❑ Per ognuna delle 300 linee SSD, è stato estratto il DNA e quantificato
- ❑ Ogni campione di DNA è stato validato mediante fingerprinting con un set di 24 SSR messi a punto per verificare l'identità varietale delle diverse accessioni di riso
- ❑ I campioni di DNA validati sono stati quindi utilizzati per le analisi di genotipizzazione mediante GBS
- ❑ Gli stock di DNA sono conservati presso il PTP e disponibili per ulteriori analisi



## Risultati raggiunti (2/2)

---

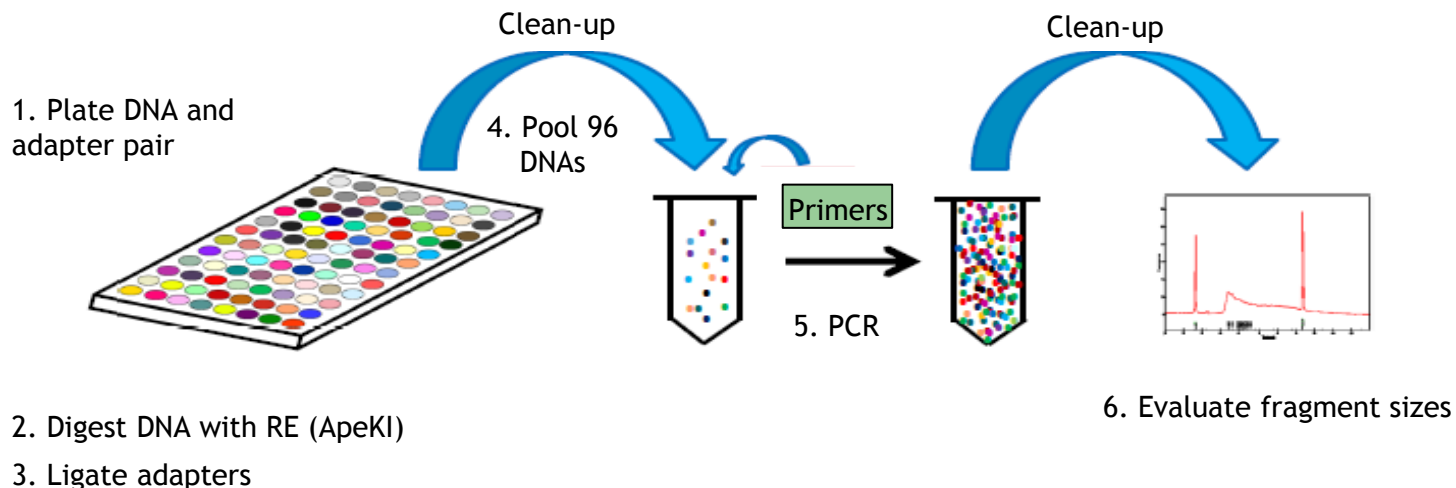
LdR2.2 - ANALISI GENOTIPIZZAZIONE: mesi 7-15 anno 1/2  
(Apr2013/**Ott2013**)

Genotipizzazione tramite GBS delle 300 linee SSD di riso e analisi di bioinformatica dei dati ottenuti

---

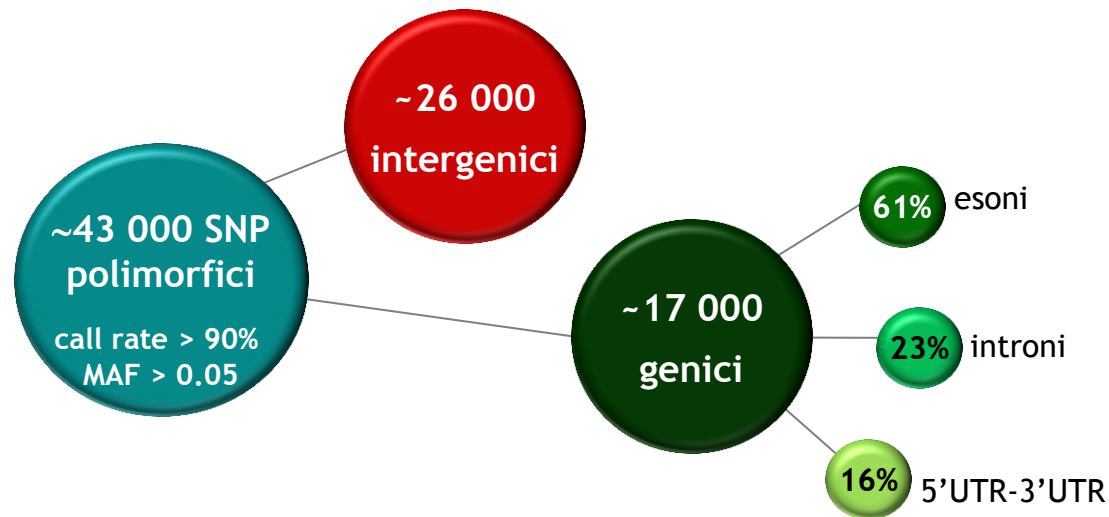
# Genotipizzazione delle 300 linee SSD

- ❑ Le 300 linee SSD sono state genotipizzate mediante tecnologia GENOTYPING-BY-SEQUENCING (GBS)
- ❑ 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)

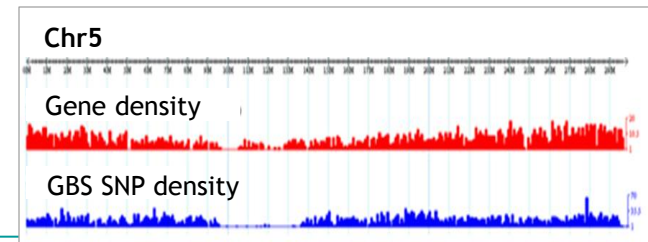


# Genotipizzazione delle 300 linee SSD

- Un'analisi bioinformatica preliminare dei dati GBS è stata effettuata per un primo set di ~160 linee SSD



- Distanza media tra SNP: 8.7 Kb
- Distribuzione degli SNP in prevalenza nelle regioni trascritte



## Risultati raggiunti (3/2)

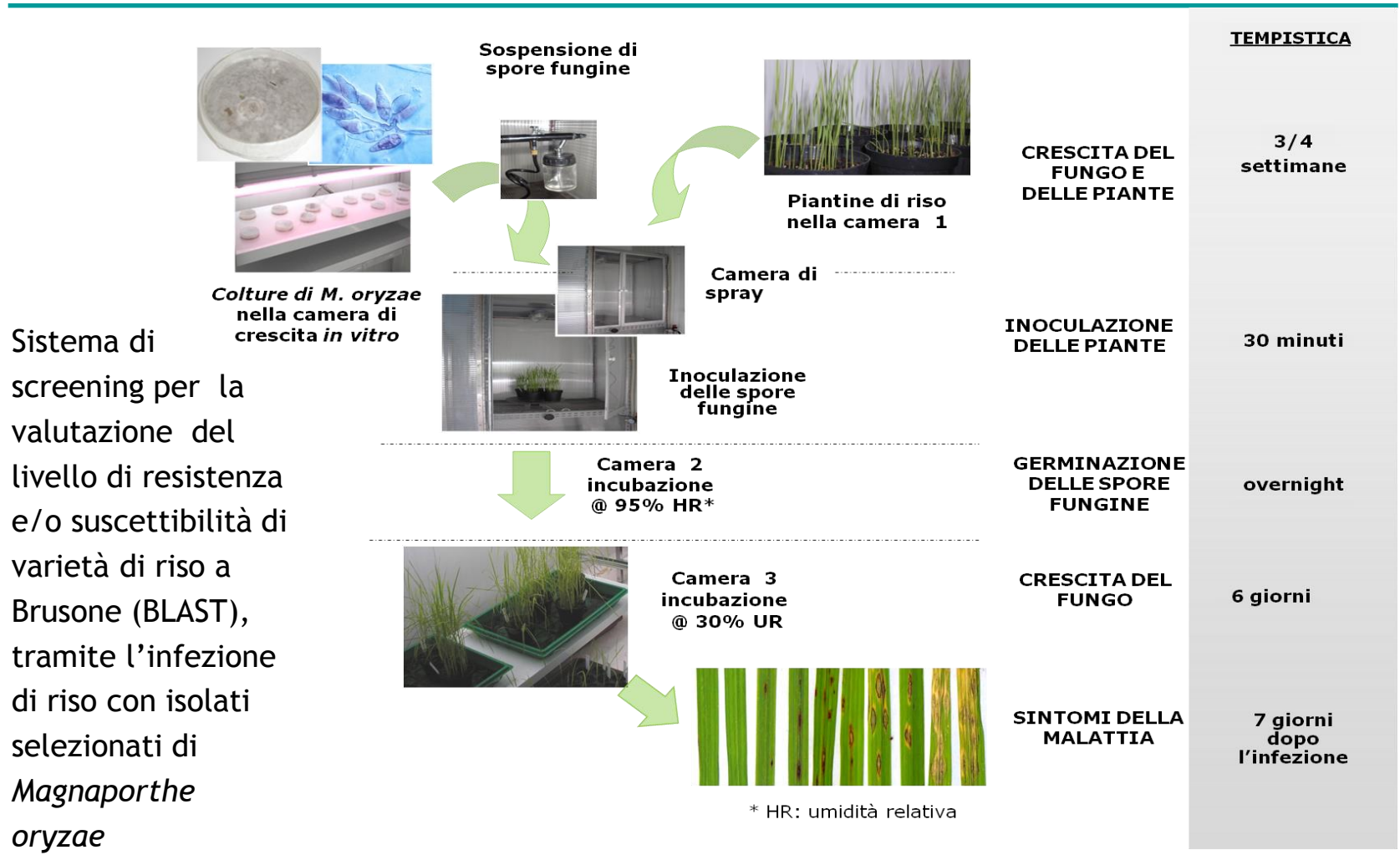
---

LdR2.3 - FENOTIPIZZAZIONE BLASTEST: mesi 3-12 anno  
1/2 (Gen2013/**Lug2013**)

Fenotipizzazione di 300 linee SSD per la resistenza al brusone in  
condizioni controllate

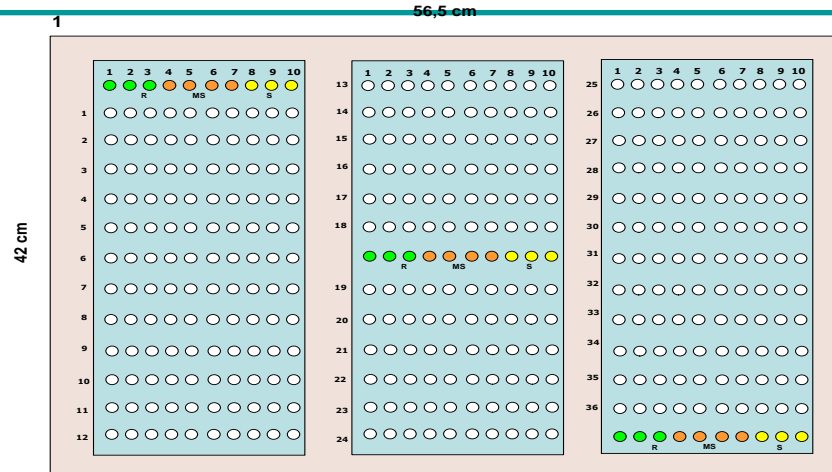
---

# Risultati raggiunti (3/2): LdR2.3 - FENOTIPIZZAZIONE BLASTEST APPROCCIO SPERIMENTALE



# Risultati raggiunti (3/2): LdR2.3 - FENOTIPIZZAZIONE BLASTEST APPROCCIO SPERIMENTALE

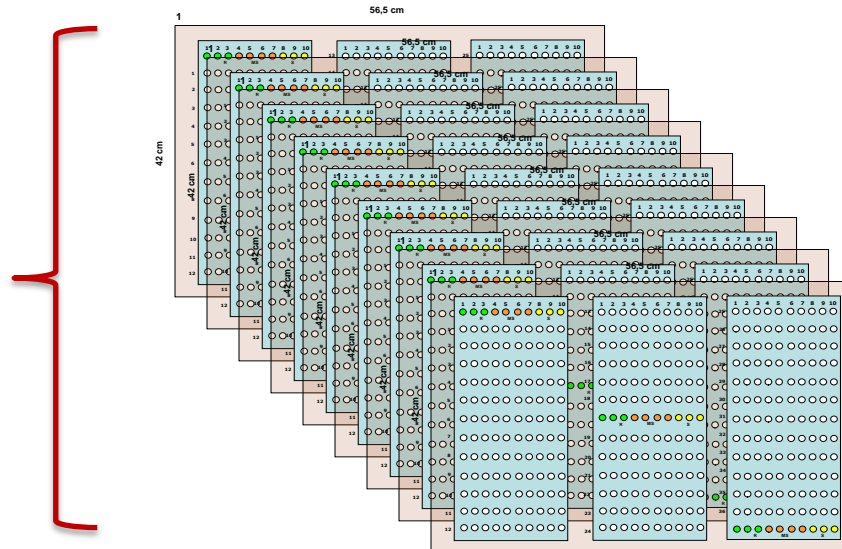
**SCHEMA di SEMINA**



**TESTIMONI**

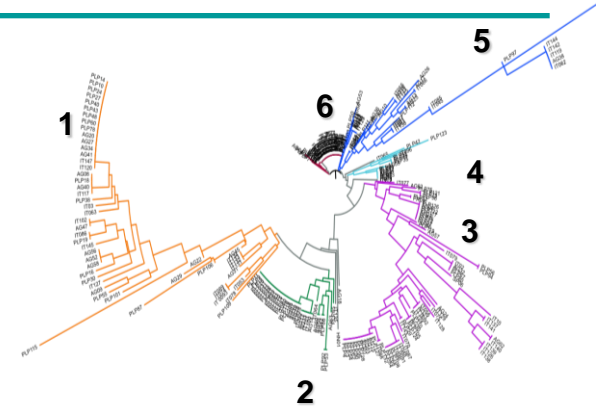
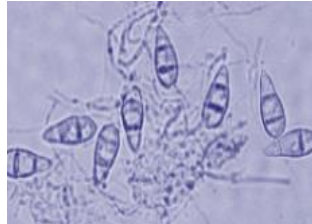
-  GIGANTE VERCELLI  
(altamente resistente)
-  VOLANO  
(Moderatamente suscettibile)
-  MARATELLI  
(altamente suscettibile)

**X 3 repliche  
BIOLOGICHE  
SCALARI**

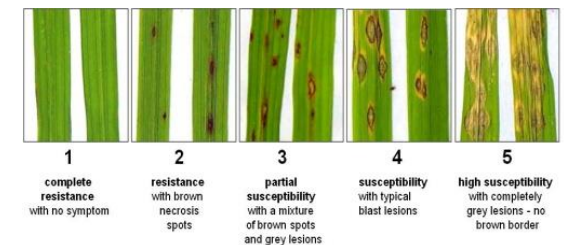


# Risultati raggiunti (3/2): LdR2.3 - FENOTIPIZZAZIONE BLASTEST RISULTATI PRELIMINARI

- 1) SELEZIONE ISOLATI rappresentativi dei principali gruppi/sottogruppi della collezione di *Magnaporthe oryzae* UNIPV-PTP, ottenuti in base a fingerprinting molecolare con SSR (progetti BIOGESTECA e RISINNOVA)
- 2) SCELTA DEGLI ISOLATI PER IL BLASTEST a seguito di test di sporulazione
- 3) BLASTEST inoculando una miscela di 6/10 ceppi di *M.oryzae* in condizioni controllate
- 4) REGISTRAZIONE e CATALOGAZIONE dei SINTOMI secondo la scala a 5 classi da Altamente resistente (1) ad Altamente suscettibile (5).

CEPPO	BASSA	MEDIA	ALTA
PLP60	Green	Blue	White
AG41	Green	Blue	White
PLP38	Green	Blue	White
AG52	Green	Blue	White
PLP106	Green	Blue	Red
AG27	Green	Blue	White
AG22	Green	Blue	Red
AG18	Green	Blue	White
PLP030	Green	Blue	White
IT102	Green	Blue	White
IT127	Green	Blue	White
IT131	Green	Blue	White
PLP019	Green	Blue	White



# Attività prevista per il 2013

---

## LdR2.3 - FENOTIPIZZAZIONE BLASTEST

**fine prevista entro Luglio 2013**

- Prima replica biologica in corso
- Prossime attività: Completamento della 2/3a replica di fenotipizzazione BLASTEST in condizioni controllate

Causa ritardo attività :

- attesa del completamento delle attività 2.1.1 di preparazione stock di semi single seed descent (SSD) delle 300 linee di riso
- tempi fisiologici di crescita delle piante per le 3 repliche biologiche eseguite separatamente

## LdR2.4 - ANALISI ASSOCIAZIONE: mesi 13-24

- 1) Analisi di associazione dati fenotipici ottenuti tramite BLASTEST e dati di genotipizzazione (GBS) delle 300 linee SSD per l'identificazione di geni candidati associati alla resistenza/suscettibilità al brusone
  - 2) Successiva analisi e caratterizzazione dei geni candidati
-

## Risultati raggiunti (4/2)

---

### LdR2.5 - RI-SEQUENZIAMENTO GENOMI: mesi 3-6 anno 1 (Lug2012/**Gen2013**)

Caratterizzazione genomica delle due varietà Carnaroli, Arborio tramite ri sequenziamento genomico

Annotazione genica del genoma di Carnaroli (definizione di modelli genici, annotazione di EST, cDNA, SNPs, posizionamento manuale di geni di interesse)

Realizzazione di una piattaforma Gbrowse per la visualizzazione delle annotazioni sul genoma di Carnaroli, e per la visualizzazione della sintenia rispetto a Indica e Japonica

Trasferimento dei dati a CRA-GPG per integrazione con NGS su altre varietà

---

# Sintenia Carnaroli - Japonica (MSUv6)

Ricerca per posizione

## Search

### Landmark:

Chr3:16680879..16780878

Search

Reset

### Genome to Search:

Oryza sativa (Japonica)

### Data Source:

CHAIN NET alignments for Oryza sativa (Japonica-Carnaroli)



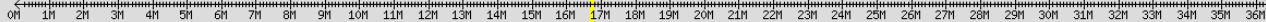
Show 100 kbp



## Overview

Reference genome: *Oryza sativa* (Japonica)

Chr3



## carnaroli\_rice

Oryza sativa (Carnaroli)

LOC\_0s03g29340 (LOC\_0s03g29340.1)

domain of unknown function domain containing protein; expressed

LOC\_0s03g29350 (LOC\_0s03g29350.1)

von Willebrand Factor type A domain containing protein; expressed

maker-Chr3-augustus-gene-0.8

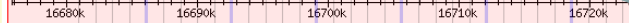
LOC\_0s03g29380 (LOC\_0s03g29380.1)

conserved hypothetical protein

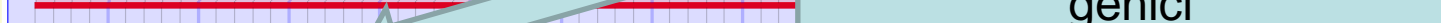
LOC\_0s03g29410 (LOC\_0s03g29410.1)

tyrosine protein kinase domain containing protein; putative; expressed

Chr3



Oryza sativa (Japonica) (reference)



Annotazione – modelli genici

## Search

### Landmark:

Chr12:10610427..10611626

Search

Reset

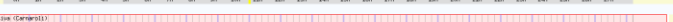
### Data Source:

CHAIN NET alignments for Oryza sativa (Japonica-Carnaroli)

## Overview

Reference genome: *Oryza sativa* (Japonica)

Chr12



## carnaroli\_rice

Oryza sativa (Carnaroli)

LOC\_0s11g29000 (LOC\_0s11g29000.1)

SH3 domain containing protein; expressed

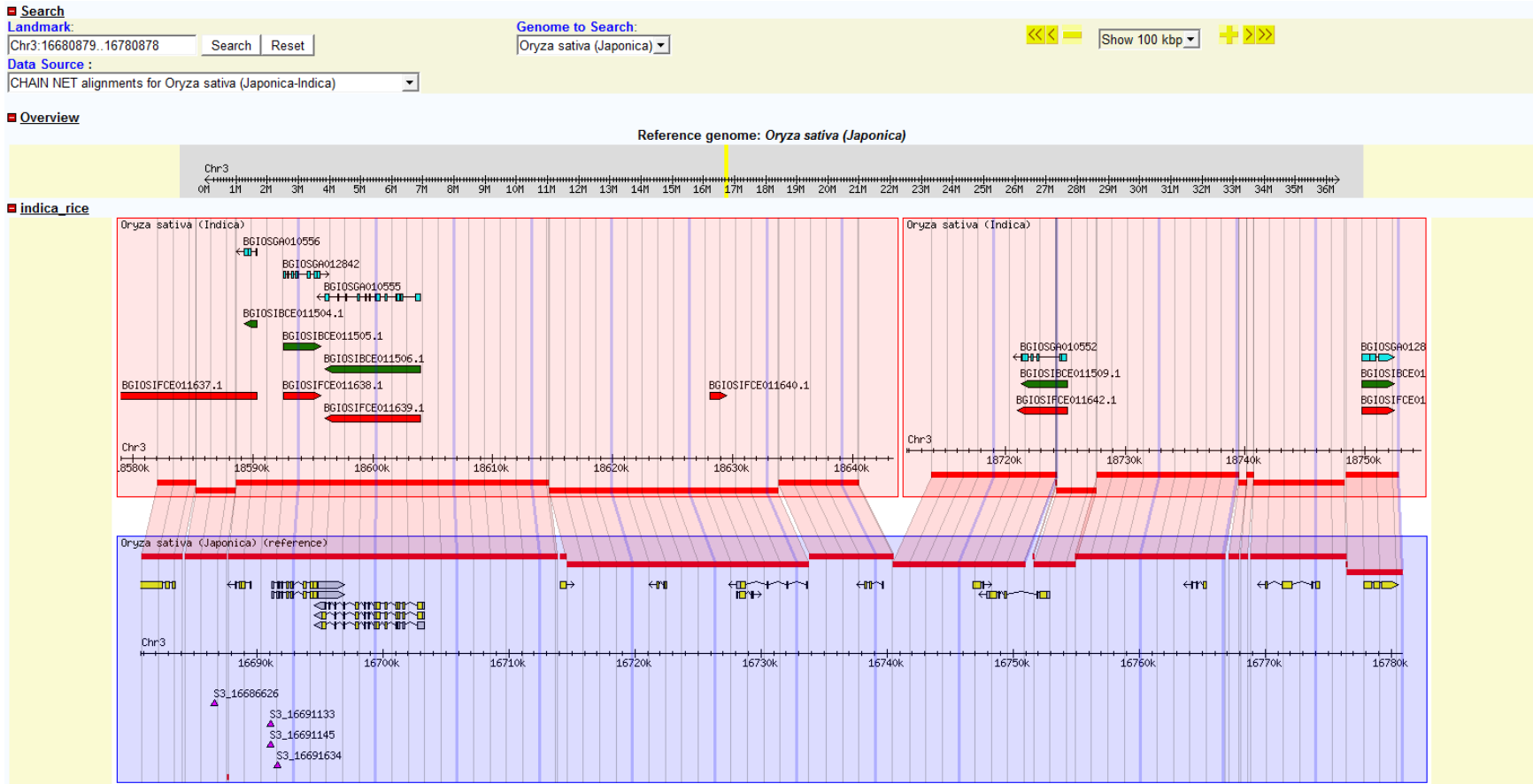
LOC\_0s11g29010 (LOC\_0s11g29010.1)

SH3 domain containing protein; expressed

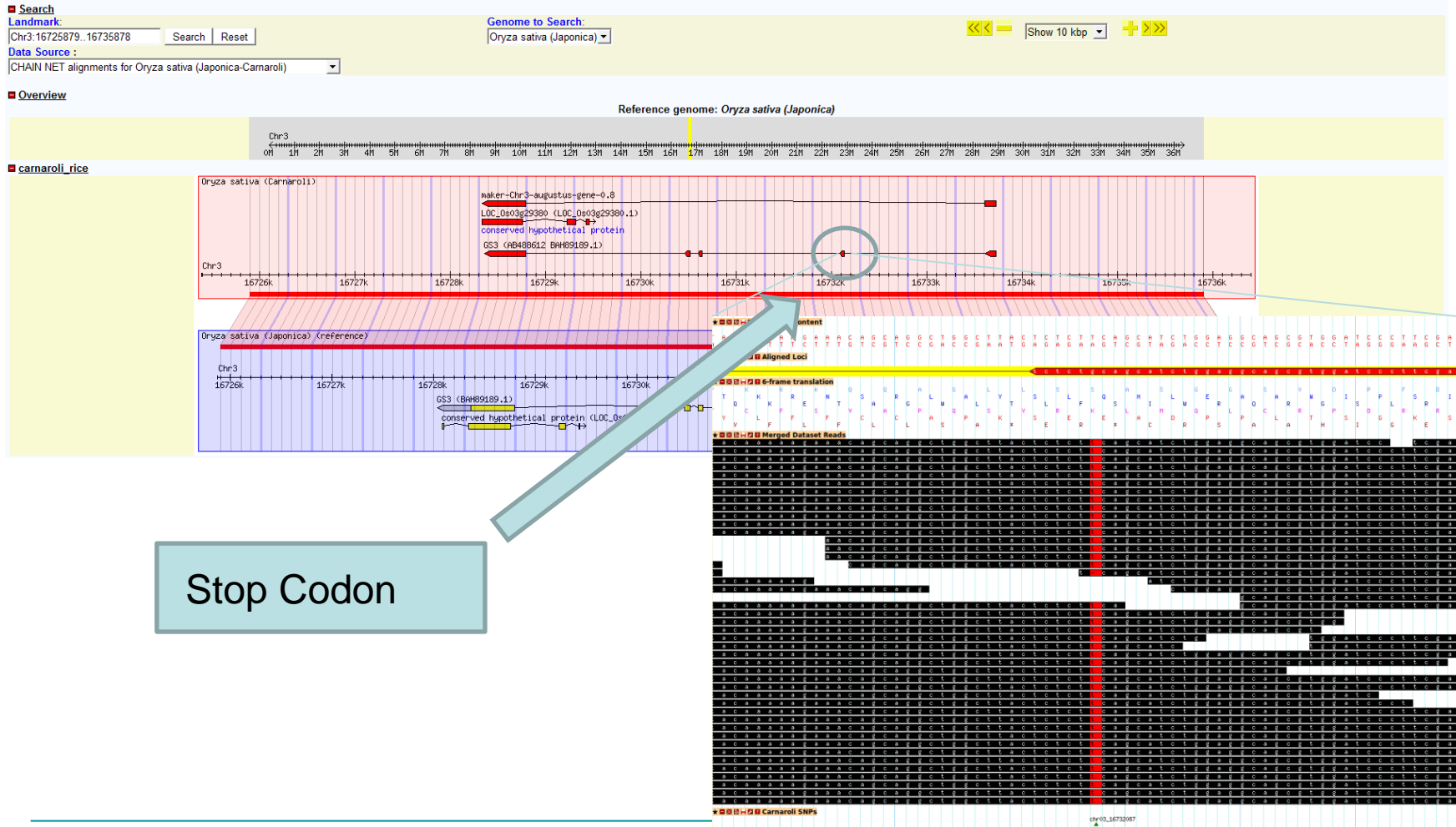
Oryza sativa (Japonica) (reference)



# Sintenia Japonica (MSUv6) - Indica (9311)



# Sintenia Japonica - Carnaroli (GS3)



# Impatto dell'attività di ricerca effettuata

---

- Creazione di risorse genetiche utilizzabili dall'intera comunità scientifica a livello nazionale
  - Sviluppo di una piattaforma bioinformatica per analisi di associazione genotipo-fenotipo
  - Contributo alla decodifica di genomi di riso “italiani”
  - Identificazione di marcatori di rilevanza per i programmi di miglioramento genetico a livello nazionale (resistenza al brusone)
  - Caratterizzazione di una collezione di 300 varietà di riso per i livelli di resistenza al brusone
-

# Attività previste per il 2013 (1/2)

---

LdR2.2 - ANALISI GENOTIPIZZAZIONE: mesi 7-15 anno 1/2 (Apr2013/**Ott2013**)

Conclusione e finalizzazione analisi di bioinformatica dei dati GBS

LdR2.3 - FENOTIPIZZAZIONE BLASTEST: mesi 3-12 anno 1/2 (Gen2013/**Lug2013**)

Completamento della 2/3a replica di fenotipizzazione BLASTEST in condizioni controllate

LdR2.4 - ANALISI ASSOCIAZIONE: mesi 13-24 (*attività NON prevista nell'anno 1*)

Analisi bioinformatica di associazione fenotipo-genotipo (dati GBS) in collaborazione con la U.O. CRA con integrazione dei dati fenotipici generati dalle U.O. UNIMI/CRA

Per i seguenti caratteri:

- resistenza al brusone PTP
- dati fenotipici da CRA-RIS
- dati fisiologici da UNIMI

LdR2.6 - ANALISI GENOMI: mesi 7-21 (Ott2013/**Apr2014**)

Completamento e finalizzazione dell'analisi bioinformatica dei dati di ri-sequenziamento/assemblaggio *de novo* dei genomi di Carnaroli e Arborio in collaborazione con la U.O. CRA-GPG

---

# Attività di divulgazione e/o didattica 2012

---

- Creato link al sito del progetto Poloriso  
[http://www.tecnoparco.org/index.php?option=com\\_content&view=article&id=64%3Aagenomica-riso&catid=47&Itemid=69&lang=en](http://www.tecnoparco.org/index.php?option=com_content&view=article&id=64%3Aagenomica-riso&catid=47&Itemid=69&lang=en)
  - Pubblicata News Kick off Meeting del progetto POLORISO
-