

Rendiconto OLEA – I Anno

Unità di Ricerca: Università degli Studi di Bari – Dipartimento di Biologia e Chimica Agro-Forestale ed Ambientale (DiBCA) sezione di Genetica (UO1); Sezione di Patologia Vegetale (ex Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata (UO2).

Responsabile: Prof. Antonio Blanco

WorkPackages:

- **WP3. GENOMICA FUNZIONALE**
- **WP4. RISORSE GENETICHE E BREEDING**
- **WP8. RESISTENZA AGLI STRESS ED ABIOTICI**

Obiettivi della ricerca

(Max 2.000 caratteri spazi inclusi)

Gli obiettivi delle attività proposte dalla UO rientrano nei summenzionati WPs. Di seguito si specificano gli obiettivi specifici all'interno di ciascun WP.

WP3 - Identificazione e caratterizzazione di varianti alleliche naturali (spontanee) di geni utili mediante ECO-TILLING.

L'EcoTILLING è un adattamento della tecnologia molecolare del TILLING per l'identificazione di polimorfismi in popolazioni naturali. Poiché per molte specie non è possibile applicare la mutagenesi chimica, l'EcoTILLING facilita la scoperta di varianti naturali in un gene d'interesse e permette una loro possibile interpretazione a livello funzionale, mediante l'analisi rapida di numerosi campioni.

WP4 - Genotyping del germoplasma coltivato e selvatico con marcatori sequence-based.

L'identificazione varietale su base molecolare rappresenta un'applicazione pratica dell'utilizzo dei marcatori molecolari, in particolare dei marcatori SSR, SNP e marcatori sequence-based, per la risoluzione di un problema, quale quello della corrispondenza ed identificazione varietale. L'identificazione del materiale vegetale rappresenta il punto di partenza dell'intera filiera che si conclude con il prodotto finito olio. L'olivo rappresenta una coltura simbolo della Regione Puglia che può contare su un patrimonio varietale in gran parte non ancora caratterizzato con approcci molecolari e morfologici.

WP8 - Studio dell'interazione pianta/patogeno-virus e del ruolo di ripetute (retroelementi)

La recente scoperta che gli elementi trasponibili rappresentino la principale componente di diversi genomi eucariotici ne ha rinnovato l'interesse e richiamato ulteriori studi. L'obiettivo specifico delle attività proposte è la caratterizzazione a livello molecolare dei meccanismi di interazione tra pianta e virus, nonché i meccanismi di regolazione genica operati da sequenze retrotransposoniche. Gli approcci sperimentali fanno riferimento al sequenziamento della frazione dei piccoli RNA interferenti (siRNA) da tessuti di olivo prelevati da piante con diverso stato sanitario e comportamento vegetativo.

Attività svolte

(Max 15.000 caratteri spazi inclusi)

WP3 - Identificazione e caratterizzazione di varianti alleliche naturali (spontanee) di geni utili mediante ECO-TILLING (UO 1)

In questi mesi l'attività di ricerca è stata finalizzata allo studio del gene *fad7* in olivo e alla ricostruzione del suo modello genico a partire da sequenza EST. Tale gene codifica una $\omega 3$ acido grasso desaturasi, responsabile della sintesi di acidi 16:3 e 18:3. L'enzima codificato è inoltre coinvolto in risposte di adattamento e tolleranza agli stress da freddo, alterando la consistenza delle membrane cellulari di diverse specie oleaginose. Un iniziale e accurato studio in database quali NCBI, Oleadb ed EMBL, ha permesso di identificare la sequenza ortologa del gene *fad7* in *Arabidopsis*, mais e soia. In particolare, le sequenze cds corrispondenti a due isoforme di questo enzima in soia hanno portato all'identificazione di due sequenze EST in olivo con elevata omologia di sequenza e corrispondenti rispettivamente ad un'isoforma plastidiale e ad una citosolica legata al reticolo endoplasmatico. Analisi bioinformatiche e diversi multi-allineamenti hanno confermato l'elevata omologia di sequenza delle due EST con le isoforme dell'enzima FAD7 ed hanno permesso di ipotizzare la sua struttura genica. Otto coppie di primer sono così state disegnate in modo da ottenere piccoli frammenti parzialmente sovrapponibili tra loro e specifici per l'isoforma plastidiale, che sono stati successivamente sequenziati e allineati con l'originale sequenza EST al fine di ottenere una sequenza contig dell'intero gene. Le analisi molecolari condotte sul DNA estratto dalla cv. Leccino hanno confermato la presenza di 8 esoni nel gene e l'identificazione di domini funzionali maggiormente conservati in cui eventuali mutazioni avrebbero un'elevata probabilità di provocare effetti deleteri per funzionalità e struttura della proteina (Figura 1). L'intero gene ricostruito ha una lunghezza di 2639 bp.

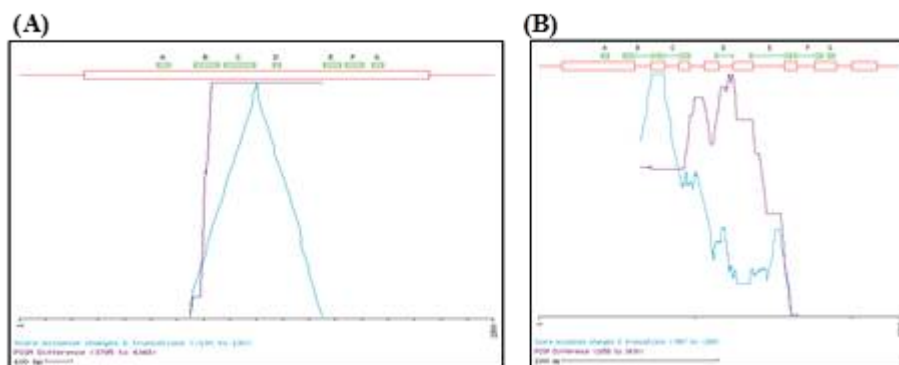


Figura 1. Predizione del modello genico mediante software CODDLE a partire da sequenza EST del gene *fad7* (A), usate per disegnare diverse coppie di primer parzialmente sovrapponibili, e della sequenza genomica (B) ottenuta mediante sequenziamento dei singoli prodotti di amplificazione.

Dai dati di sequenza è stato possibile stimare il livello di eterozigosi del gene presente in Leccino che è risultato pari a circa 1 base eterozigote ogni 110 bp.

Nello stesso tempo è stato selezionato un set di otto cultivar di olivo composto da: Coratina, Leccino, Frantoio, S. Agostino, Ascolana tenera, Oliastro, Toscanina e Pasola. Dai dati di letteratura, le cultivar selezionate mostrano un diverso contenuto in acido linolenico (18:3) e una diversa tolleranza alle basse temperature. Si è proceduto con l'estrazione del DNA genomico e con

l'amplificazione di due frammenti del gene *fad7*, differenti per il livello di conservazione. Attraverso questa analisi è stato possibile ottenere una stima della sua conservazione strutturale analizzando 4 frammenti di cui 2 molto conservati e due più variabili. I frammenti conservati non hanno mostrato alcuna variazione nella sequenza nucleotidica, al contrario nei frammenti meno conservati si sono rilevate otto variazioni SNP, che non comportano un cambiamento strutturale della sequenza amminoacidica.

Parallelamente in collaborazione con la U.O. CRA-Rende è stata allestita una collezione di 96 cultivar di olivo rappresentative della gran parte della variabilità genetica esistente in tale specie sulla base di analisi molecolari precedentemente effettuate.

La collezione è stata analizzata mediante sequenziamento diretto. L'analisi ha consentito di evidenziare solo tre varianti alleliche presenti nella collezione confermando l'alto livello di conservazione di questo gene.

WP4 - Genotyping del germoplasma coltivato e selvatico con marcatori sequence-based (UO1)

Dal punto di vista molecolare le cultivar pugliesi sono state caratterizzate con un set di 16 marcatori molecolari SSR (Simple Sequence Repeats). Questi marcatori basati sulla reazione PCR sono altamente polimorfici, codominanti e molto informativi. I 16 marcatori SSR sono stati analizzati su 31 cultivar di olivo pugliesi. Tutti i marcatori hanno fornito dei profili chiari e non ambigui e grazie alla loro natura co-dominante hanno consentito di rilevare un ampio numero di alleli per locus. In questo studio è stato possibile delucidare differenti casi di sinonimia riportati in letteratura, ed un putativo caso di omonimia (Coratina e Coratina simile). Inoltre le cultivar Frantoiana, Zafarana, Silletta, Donna Giuletta e Colmona, semi sconosciute e prive di catalogazioni, sono state discriminate con il numero minimo di 6 marcatori SSR. I dati ottenuti hanno consentito di elaborare un dendrogramma di similarità genetica mediante analisi cluster UPGMA. Le varietà Coratina e Coratina simile si sono rivelate essere due cultivar distinte, mentre le cultivar pugliesi Frantoiana, Zafarana, Silletta, Donna Giuletta e Colmona risultano essere differenti dalle altre varietà esaminate escludendo casi di sinonimia. Inoltre le analisi molecolari hanno consentito di identificare un set di nuovi alleli rilevati nel germoplasma pugliese che può risultare un utile strumento di indagine molecolare sull'identità del materiale vegetale di olivo pugliese. L'isolamento, il clonaggio e il sequenziamento di questi frammenti ha confermato la presenza di nuovi alleli non ancora riportati in letteratura.

Relativamente all'attività di breeding, questa U.O. ha sviluppato nei primi nove mesi del progetto una popolazione segregante ottenuta mediante coltura in vitro di embrioni derivati dall'incrocio Leccino x Frantoio (90 piante). Attualmente la suddetta popolazione è in fase di ulteriore ampliamento mediante un nuovo incrocio effettuato sulle medesime piante nel mese di maggio 2011.

WP8 - Studio dell'interazione pianta/patogeno-virus e del ruolo di ripetute (retroelementi)

L'attività svolta dal gruppo di ricerca dell'UO2 è stata focalizzata sulla preparazione delle repliche biologiche su cui procedere con gli esperimenti di sequenziamento massivo per la caratterizzazione dei microRNA (miRNA) e del trascrittoma. In particolare, sono state individuate e propagate (in numero di 3 per cultivar) piante di Leccino, Frantoio e Coratina infette dal virus dell'ingiallimento fogliare dell'olivo e relative repliche biologiche non infette. Per standardizzare il protocollo di sintesi delle librerie di piccoli RNA (siRNA) ed mRNA (per l'analisi del trascrittoma) è stata avviata e completata la sintesi ed il sequenziamento di due librerie di siRNA, ottenute da piante con e senza infezione da OLYaV (virus associato all'ingiallimento fogliare dell'olivo).

Il sequenziamento effettuato su piattaforma Illumina, ha prodotto un output di circa 5.000.000 di short reads per ciascuna libreria, processate attraverso le pipeline bioinformatiche genericamente utilizzate per (i) la rimozione degli adapter; l'eliminazione delle short reads relative a rRNA e tRNA; la determinazione delle frequenze per ciascuna dimensione (da 21 a 24nt); l'assemblaggio delle sequenze in contig (Velvet); l'analisi delle omologie rispetto a sequenze di miRNA già

descritte e conservate in altre specie vegetali; l'analisi dell'omologia verso sequenze virali note (utilizzando BLAST e SOAP). L'attività del I anno è stata conclusa con la positiva validazione, mediante real-time RT-PCR dei dati di sequenziamento massivo.

Risultati ottenuti

(Max 6.000 caratteri spazi inclusi)

WP3 - Identificazione e caratterizzazione di varianti alleliche naturali (spontanee) di geni utili mediante ECO-TILLING (UO1)

Le analisi effettuate hanno permesso di:

- ottenere la sequenza genomica dell'isoforma plastidiale del gene *fad7* e di ricostruirne il modello genico, identificando le regioni particolarmente adatte ad analisi funzionali;
- mettere a confronto l'applicabilità della metodica EcoTILLING sul genoma dell'olivo paragonata al sequenziamento diretto;
- identificare polimorfismi tra le cultivar analizzate;
- stimare il livello di eterozigosi del gene.

WP4 - Genotyping del germoplasma coltivato e selvatico con marcatori sequence-based (UO1)

Risultati ottenuti: Ottenimento di una banca dati molecolare relativa a varietà di olivo pugliesi con particolare attenzione alle varietà minori non caratterizzate e a rischio di erosione genetica. Sviluppo di materiale breeding di olivo mediante costituzione di una popolazione segregante F1.

WP8 - Studio dell'interazione pianta/patogeno-virus e del ruolo di ripetute (retroelementi)

L'analisi bioinformatica sui dataset del sequenziamento dei siRNA ha evidenziato alcuni elementi preliminari caratterizzanti il complesso del silenziamento genico in olivo:

- (i) gli siRNA in una pianta infetta da virus sono caratterizzati dalla predominanza dei 24nt, in contraddizione con quanto accade in altre specie arboree dove la classe dei 24nt è predominante nelle piante virus-esenti mentre in quelle infette diventano predominanti i 21-22nt;
- (ii) in olivo è stata confermata la presenza di diversi miRNA omologhi a quelli descritti in altre specie. Tra questi, è stata evidenziata la predominanza assoluta del miR168, seguita dal miR172, miR166, miR164, miR396, miR403, miR858, miR159. La presenza e l'accumulo del miR168 e miR172 è stata validata con successo mediante real time RT-PCR utilizzando primer appositamente disegnati con uno stem-loop.
- (iii) La percentuale di accumulo di siRNA di origine virale in tessuti di olivo è estremamente ridotta (circa 2%) se comparata alla percentuale di siRNA virali che possono accumularsi in altre specie arboree (dove per alcune combinazioni virus-ospite può raggiungere il 25%). Aspetto molto probabilmente correlato al basso titolo della replicazione virale in olivo.
- (iv) Diverso profilo di espressione dei miRNA in relazione allo stato sanitario: come atteso l'espressione del miR168 è stato molto più elevata nella pianta infetta da virus, mentre risulta sensibilmente ridotto (1/50) nella libreria della pianta sana, ove invece il miR166 risulta predominante.
- (v) identificazione di una nuova entità virale: il sequenziamento massivo ha permesso di identificare una nuova entità virale (virus satellite) che contribuisce a chiarire l'eziologia del complesso della malattia nota come giallume fogliare dell'olivo.

I dati prodotti dal sequenziamento saranno resi disponibili e fruibili sulla piattaforma bioinformatica. L'attività di analisi bioinformatica relativa agli aspetti che riguardano la risposta dell'ospite e i geni direttamente coinvolti, verrà implementata man mano che i dati sul sequenziamento del genoma saranno resi disponibili.

Ostacoli incontrati e azioni correttive

(Max 6.000 caratteri spazi inclusi)

Durante lo svolgimento dell'attività di identificazione e caratterizzazione di varianti alleliche naturali (spontanee) di geni utili, l'approccio inizialmente scelto dell'EcoTILLING realizzato mediante analisi Licor, si è dimostrato non particolarmente adatto al genoma di olivo, a causa dell'elevata eterozigotità osservata. Per questo motivo si è optato per il sequenziamento diretto dei prodotti amplificati.

Per la costruzione delle librerie di siRNA, il protocollo di purificazione della frazione dei piccoli RNA mediante separazione in gel di UREA, non sempre ha permesso di ottenere preparazioni sufficientemente pure per la reazione di sintesi della libreria, per superare questo problema sono stati comparati una serie di kit commerciali *ad hoc*, individuando nel kit Sigma mirPremier quello che ha dato risultati riproducibili tra i vari campioni testati.

Pubblicazioni / Eventi divulgativi / Eventi formativi

Montemurro C., Sabetta W., Rusek J., Blanco A. Discovery of DNA polymorphisms in olive fad7 gene by EcoTILLING. Agri-Sibv-Siga Joint Congress, Assisi 19-22 September 2011.

Wilma Sabetta, Antonio Blanco, Samanta Zelasco, Luca Lombardo, Enzo Perri, Cinzia Montemurro 2012. Isolation of ω -3 fatty acid desaturase and natural allelic variation in olive Submitted to Phytochemistry.

Loconsole G., Roberto R., Savino V., Saponari M., 2012. Elucidation of the etiology of the olive leaf yellowing complex disease. European Journal of Plant Pathology, *submitted*.

Timbro Istituzione	Firma Responsabile Scientifico U.O.
	Prof. Antonio Blanco