

Genomica dei Sistemi Modello Vegetali

Simone Ferrari

Simone.ferrari@uniroma1.it

Edificio di Botanica – piano terra

- <http://elearning.uniroma1.it/index.php>: **Genomica Strutturale e Funzionale – mod. Genomica vegetale 2010-11**
- <http://www.plantgenome.uga.edu/links.htm>

Obiettivi formativi

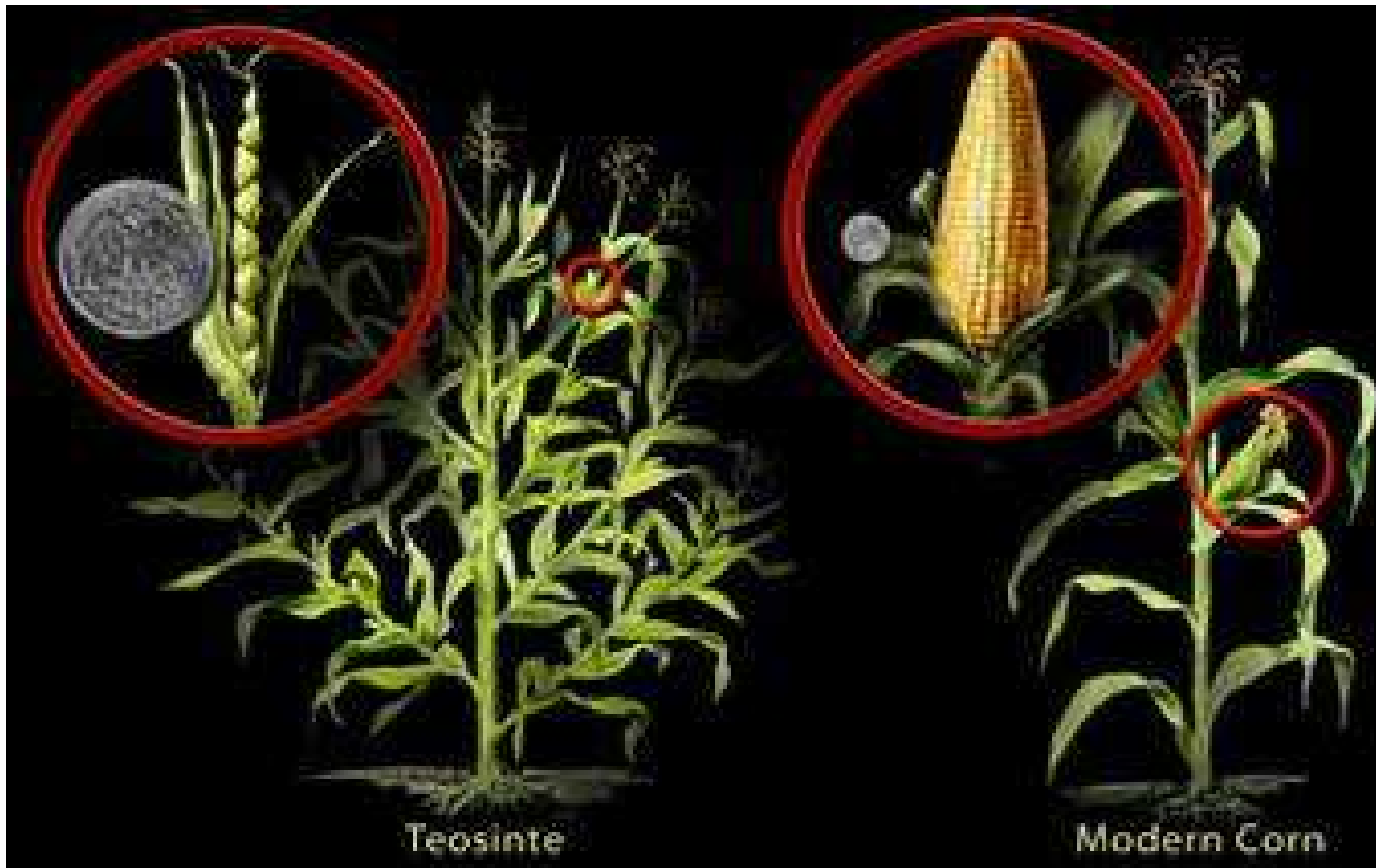
Conoscenza dei metodi avanzati di analisi dei genomi vegetali, con particolare attenzione all'analisi dell'espressione e della funzione di geni in specie modello, ed utilizzo di tali tecniche per il miglioramento di specie di interesse economico.

- Genomi vegetali – generalità, genomica comparativa delle piante.
- Genomica funzionale – metodi di genetica diretta ed inversa in piante modello, con particolare attenzione ad *Arabidopsis thaliana* e *Lotus japonicus*. Utilizzo di geni reporter in genomica funzionale. Analisi dei trascrittomi delle piante.
- Silenziamento genico trascrizionale e post-trascrizionale nelle piante. Epigenetica ed epigenomica delle piante ed analisi. MicroRNA e small interfering RNA.
- Casi studio: Utilizzo della genomica nel miglioramento di specie coltivate: sviluppo della radice, risposta ai patogeni, produzione di biocarburanti, resistenza a stress abiotici. Utilizzo della genomica nello studio dei rischi associati agli OGM. Analisi e discussione critica di lavori scientifici nel campo.

IMPORTANZA DEGLI ORGANISMI VEGETALI

- Produzione di ossigeno
- Fissazione dell'anidride carbonica
- Cibo, fibre (cotone, lino), farmaci, coloranti, energia (legna, biocarburanti)

Addomesticamento delle specie vegetali



STUDIO DEI GENOMI VEGETALI

- **Identificazione di geni importanti per caratteri agronomici (produttività, resistenza a stress, proprietà nutrizionali)**
- **Comprensione dell'evoluzione delle piante**

PIANTE MODELLO

Arabidopsis thaliana

Dicotiledone (*Brassicaceae*)

Piccolo genoma dipolide (C1 = 125 Mbp)

Trasformabile facilmente

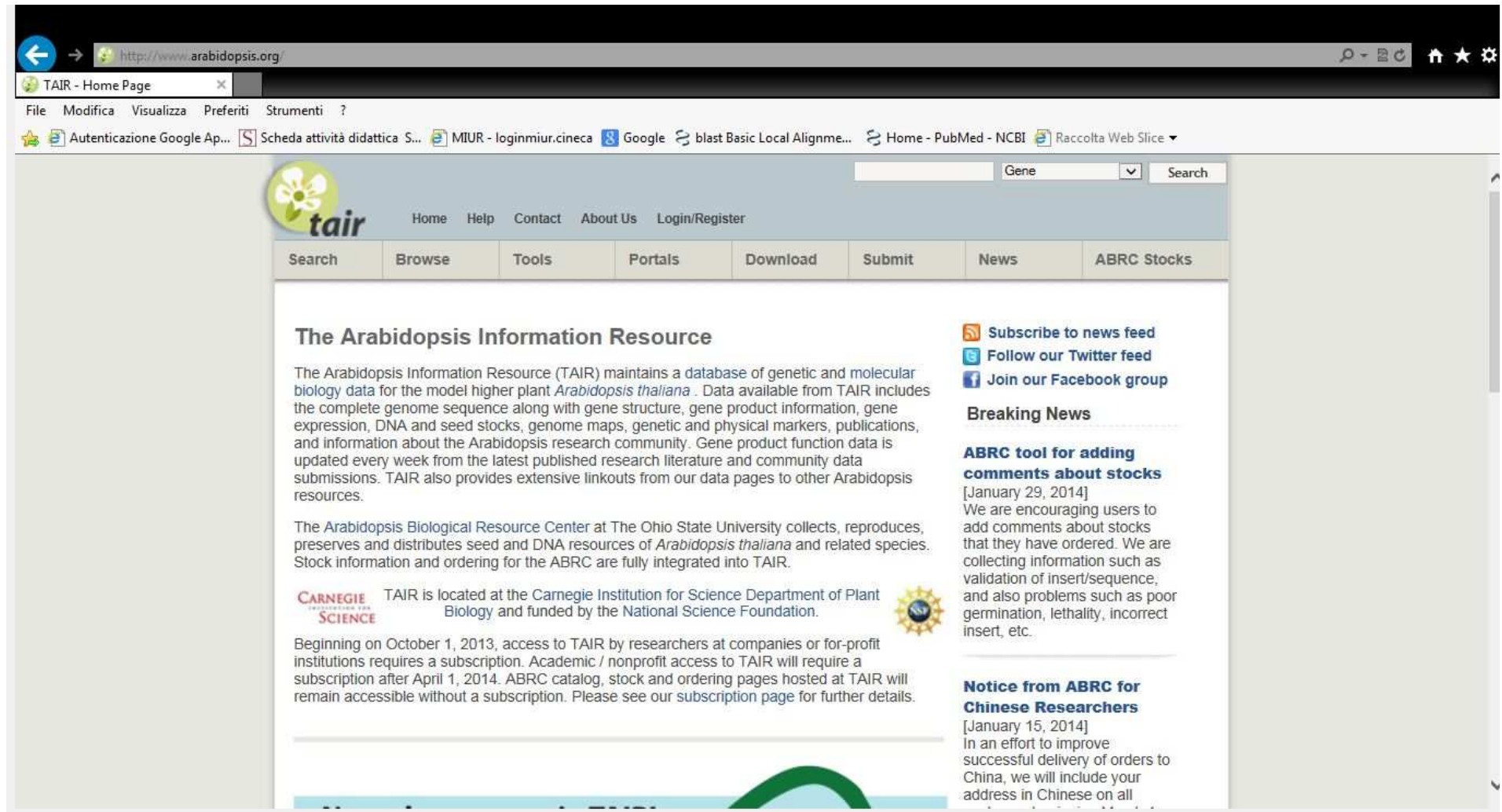
5 cromosomi

Piccole dimensioni

Ciclo vitale breve (2 mesi)



<http://www.arabidopsis.org/>



The screenshot shows a web browser window displaying the TAIR (The Arabidopsis Information Resource) homepage. The browser's address bar shows the URL <http://www.arabidopsis.org/>. The page features a navigation menu with links for Home, Help, Contact, About Us, and Login/Register. Below the navigation is a search bar with a dropdown menu set to 'Gene' and a 'Search' button. The main content area is titled 'The Arabidopsis Information Resource' and contains several paragraphs of text describing the resource. On the right side, there are social media links for RSS, Twitter, and Facebook, followed by a 'Breaking News' section with two news items. The page also includes logos for Carnegie Institution for Science and a small sun icon.

TAIR - Home Page

File Modifica Visualizza Preferiti Strumenti ?

Autenticazione Google Ap... | Scheda attività didattica S... | MIUR - loginmiur.cineca | Google | blast Basic Local Alignme... | Home - PubMed - NCBI | Raccolta Web Slice

Gene Search

Home Help Contact About Us Login/Register

Search Browse Tools Portals Download Submit News ABRC Stocks

The Arabidopsis Information Resource

The Arabidopsis Information Resource (TAIR) maintains a database of genetic and molecular biology data for the model higher plant *Arabidopsis thaliana*. Data available from TAIR includes the complete genome sequence along with gene structure, gene product information, gene expression, DNA and seed stocks, genome maps, genetic and physical markers, publications, and information about the Arabidopsis research community. Gene product function data is updated every week from the latest published research literature and community data submissions. TAIR also provides extensive linkouts from our data pages to other Arabidopsis resources.

The Arabidopsis Biological Resource Center at The Ohio State University collects, reproduces, preserves and distributes seed and DNA resources of *Arabidopsis thaliana* and related species. Stock information and ordering for the ABRC are fully integrated into TAIR.

CARNEGIE INSTITUTION FOR SCIENCE TAIR is located at the Carnegie Institution for Science Department of Plant Biology and funded by the National Science Foundation.

Beginning on October 1, 2013, access to TAIR by researchers at companies or for-profit institutions requires a subscription. Academic / nonprofit access to TAIR will require a subscription after April 1, 2014. ABRC catalog, stock and ordering pages hosted at TAIR will remain accessible without a subscription. Please see our subscription page for further details.

Subscribe to news feed

Follow our Twitter feed

Join our Facebook group

Breaking News

ABRC tool for adding comments about stocks
[January 29, 2014]
We are encouraging users to add comments about stocks that they have ordered. We are collecting information such as validation of insert/sequence, and also problems such as poor germination, lethality, incorrect insert, etc.

Notice from ABRC for Chinese Researchers
[January 15, 2014]
In an effort to improve successful delivery of orders to China, we will include your address in Chinese on all

Quali specie sequenziare?

- Impatto economico, sociale e scientifico
- Distanza filogenetica da altre specie sequenziate (-> nuove informazioni)
- Informazioni disponibili (mappe genetiche e fisiche)
- Capacità di persuasione dei ricercatori

[AtGDB](#)

Arabidopsis thaliana

[OsGDB](#)

Oryza sativa (riso)

[ZmGDB](#)

Zea mays (mais)

[HvGDB](#)

Hordeum vulgare (orzo)

[MtGDB](#)

Medicago truncatula (erba medica)

[LjGDB](#)

Lotus japonicus

[PtGDB](#)

Populus trichocarpa (pioppo)

[LeGDB](#)

Lycopersicon esculentum (pomodoro)

[GmGDB](#)

Glycine max (soia)

[BrGDB](#)

Brassica rapa (field mustard)

[TaGDB](#)

Triticum aestivum (bread wheat)

[SbGDB](#)

Sorghum bicolor (sorghum)

GENOMICA COMPARATIVA

- Analisi e confronto di genomi di specie diverse
- Fornisce informazioni sull'evoluzione delle specie e sulla funzione di geni e sequenze non codificanti
- Es.: funzione di un gene dedotta dallo studio di geni ortologhi in specie modello

GENOMICA COMPARATIVA

Cosa si analizza?

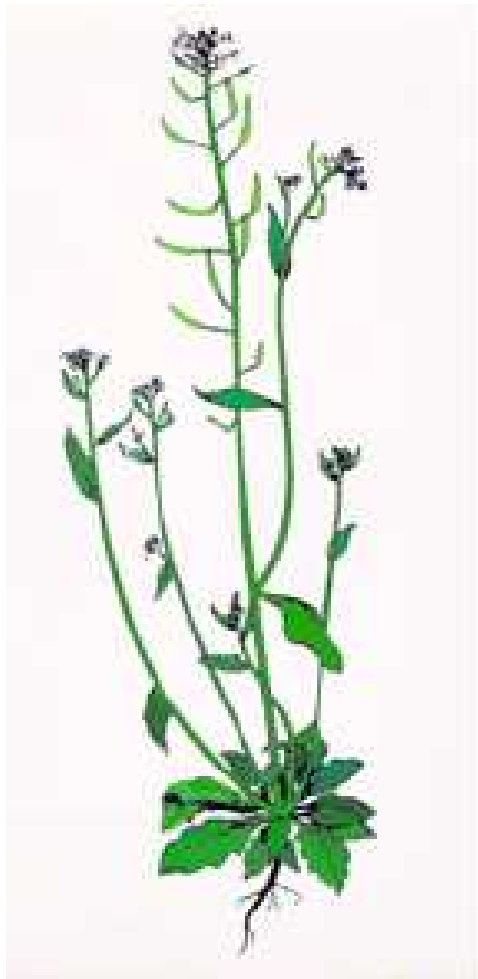
- Similarità di sequenza
- Localizzazione cromosomica dei geni
- Lunghezza e numero esoni
- Quantità di DNA non codificante
- Conservazione di regioni cromosomiche

Ostacoli al sequenziamento di specie coltivate

- **Dimensioni**
- **DNA ripetitivo**
- **Poliploidia**

Dimensioni del genoma

Arabidopsis: 125 Mb



***Fritillaria assyriaca*: 125 Gb!**



ILLUMINA GENOME ANALYZER

Permette il sequenziamento in parallelo di un numero massiccio di frammenti genomici

-> 1 milione di basi sequenziate per volta!



DNA ripetitivo

**Responsabile per gran parte della
variabilità nelle dimensioni del
genoma vegetale**

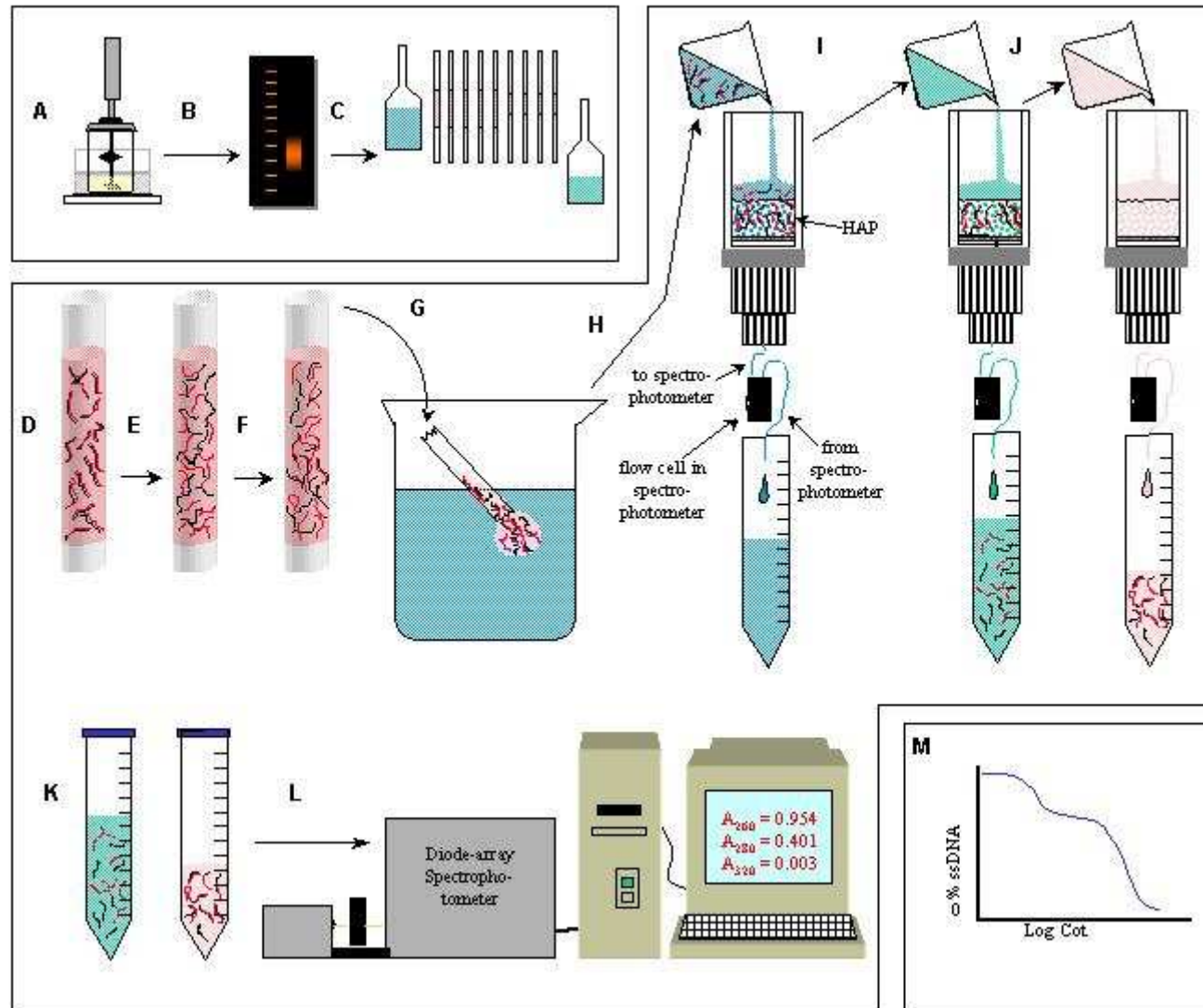
**Complica l'assemblamento delle
sequenze**

**Sequenze non-ridondanti nel genoma: da
13% (cipolla) a 77% (pomodoro)**

DNA ripetitivo

N.B.: le piante hanno più DNA ripetitivo degli animali, e copie individuali possono avere meno mutazioni per distinguerle, perchè più recenti

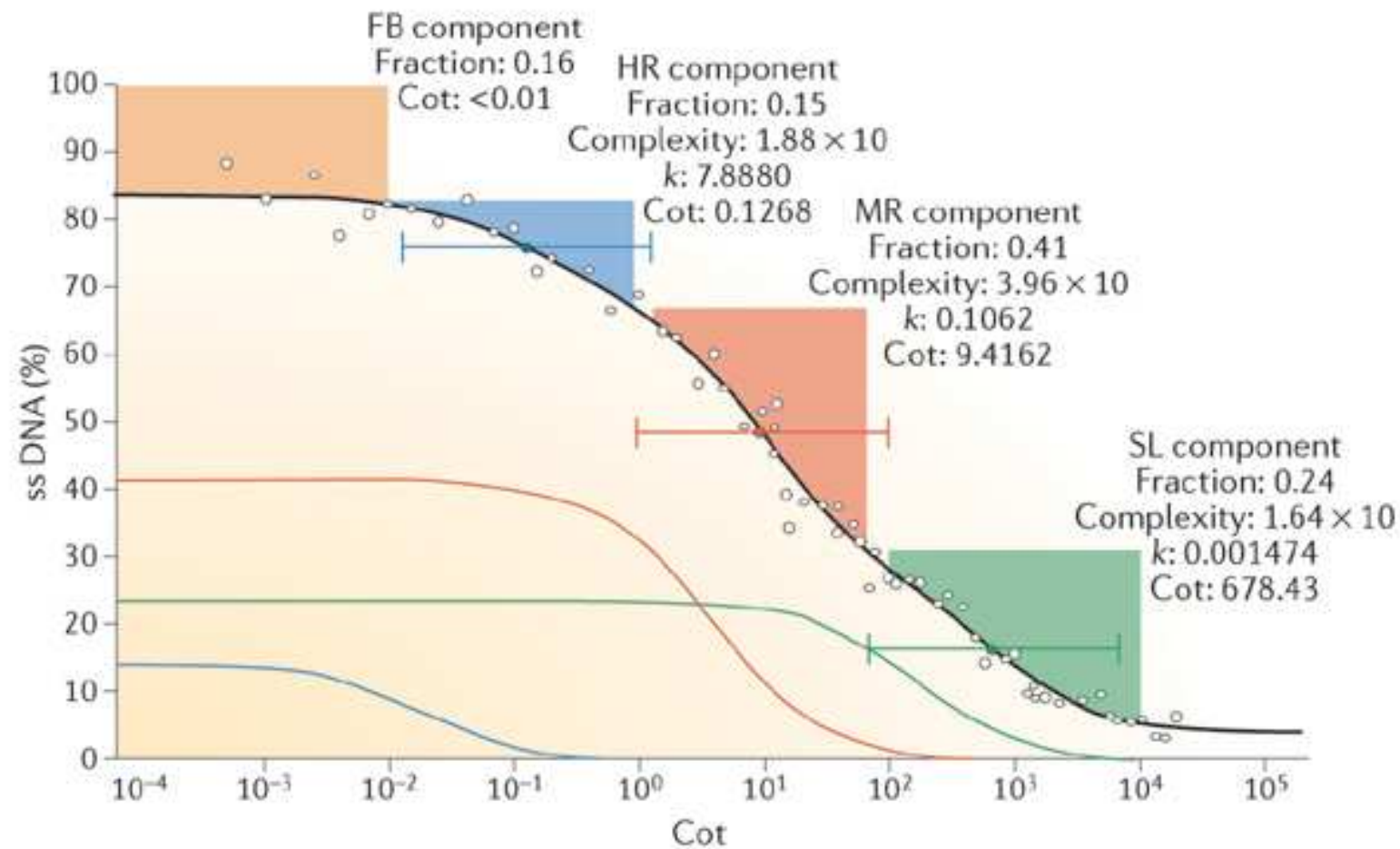
Cinetica di riassociazione



Cinetica di riassociazione

- Fornisce il valore Cot , cioè il prodotto fra la concentrazione dei nucleotidi (C_0) ed il tempo di riassociazione (normalizzato per la conc. di cationi nel tampone)
- La cromatografia su colonna di idrossiapatite (che lega il dsDNA) permette di isolare la frazione di DNA che si riassocia ad un particolare valore di Cot .
- Più il DNA è ripetitivo, più basso sarà il suo valore Cot

Cinetica di riassociazione



Clonaggio basato sul valore Cot (CBCS)

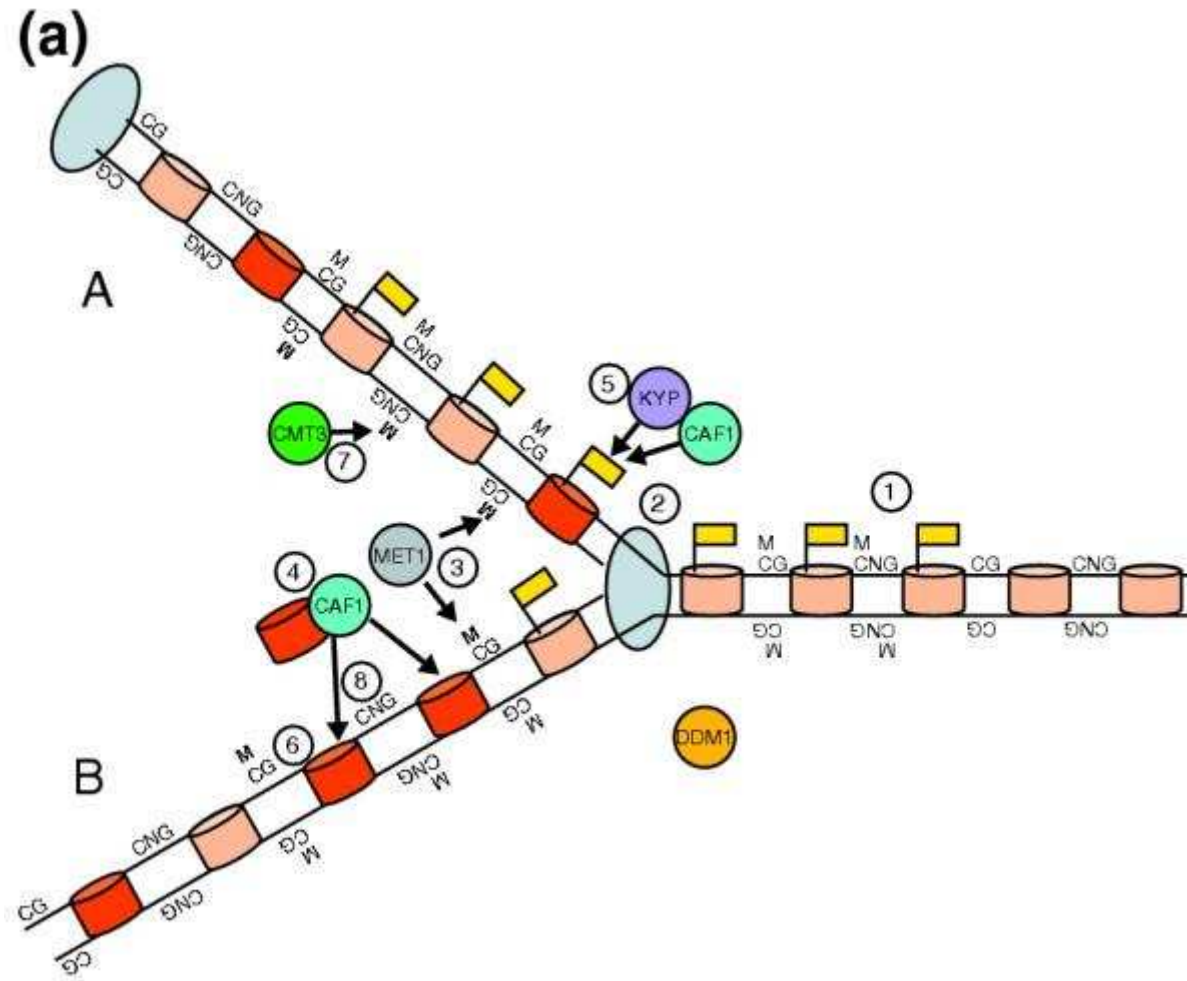
L'analisi Cot permette di isolare specificamente frazioni più o meno ripetitive

DNA meno ripetitivo viene sequenziato

-> più facile da assemblare in contigs

-> maggiore percentuale di geni

il DNA più ricco in geni è ipometilato rispetto a quello non codificante (inclusa una parte di DNA ripetitivo)



Methylation filtration (MF)

clonaggio del DNA genomico totale in ceppi di *E. coli* che degradano il DNA metilato -> sequenziamento dei cloni e assemblaggio in contigs

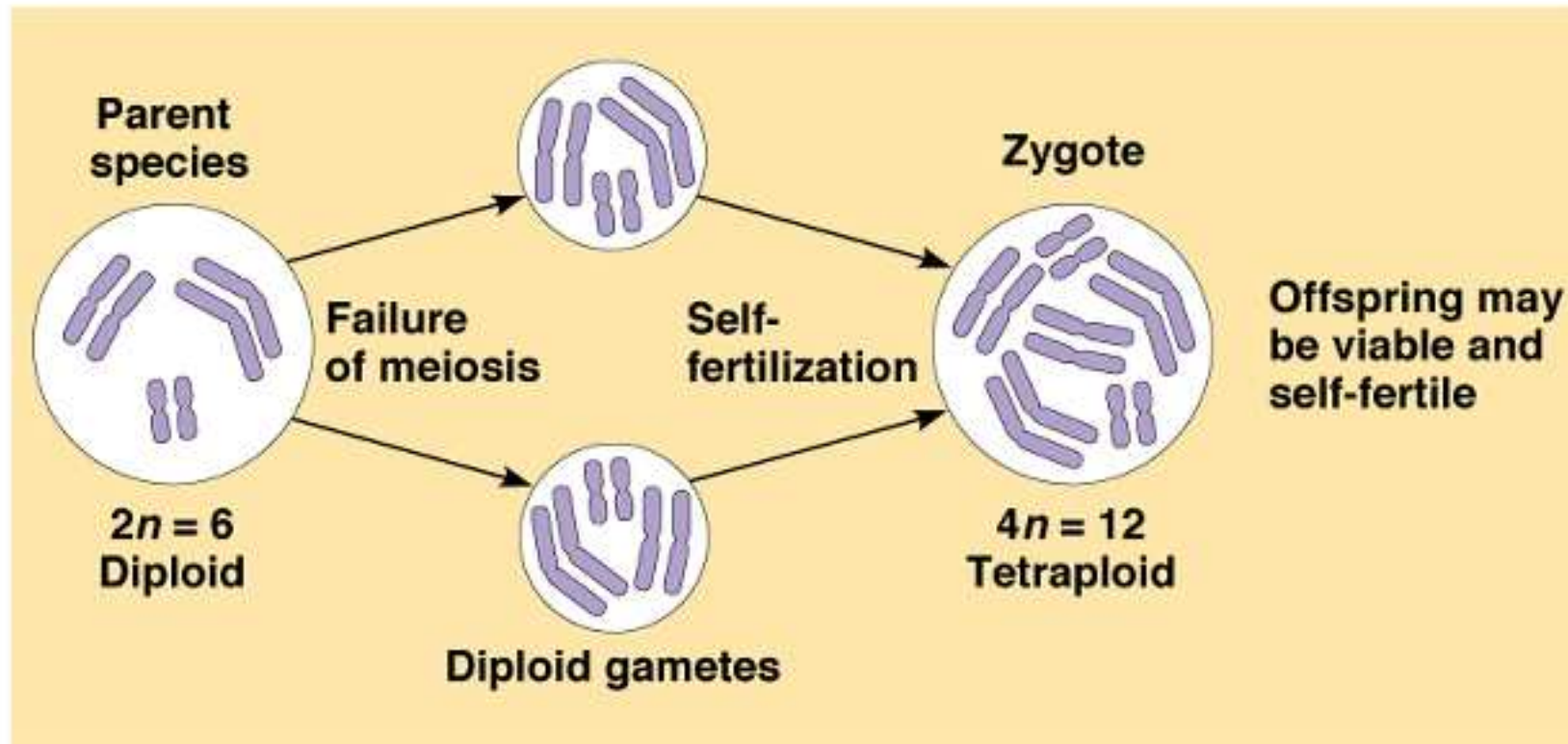
Svantaggio: non sempre il DNA codificante è ipometilato (es. metilazione indotta da stress, o in colture cellulari)

POLIPLOIDIA

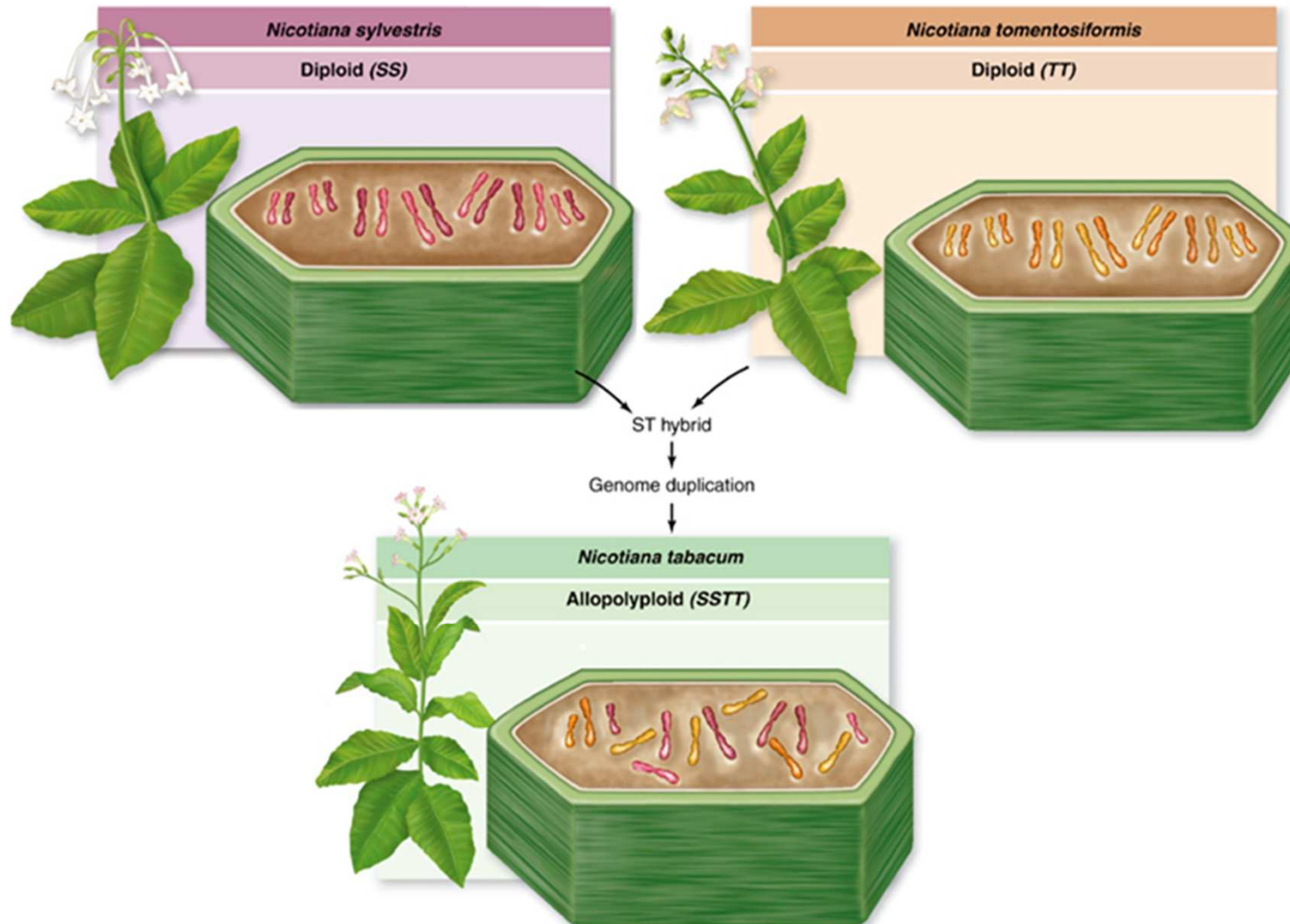
- Duplicazione del genoma in una specie (**autopoliploidia**), attraverso errore meiotico (4 copie di ogni cromosoma)
- Ibridazione di due specie diverse (**allopoliploidia**)

AUTOPOLIPLOIDIA

(es. Canna da zucchero, patata, erba medica, caffè)



ALLOPOLIPLOIDIA: TABACCO



ALLOPOLIPLIIDIA: FRUMENTO

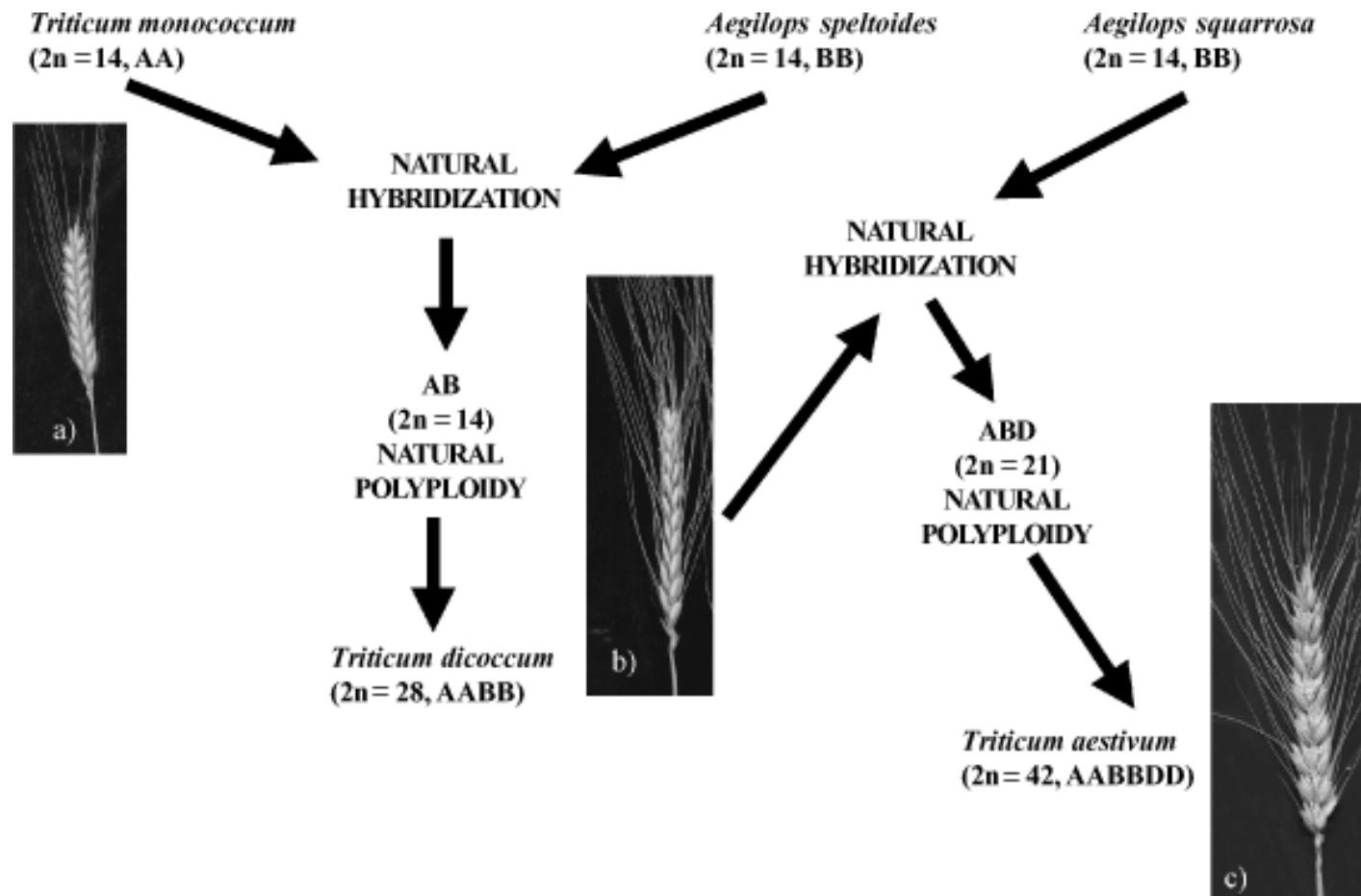
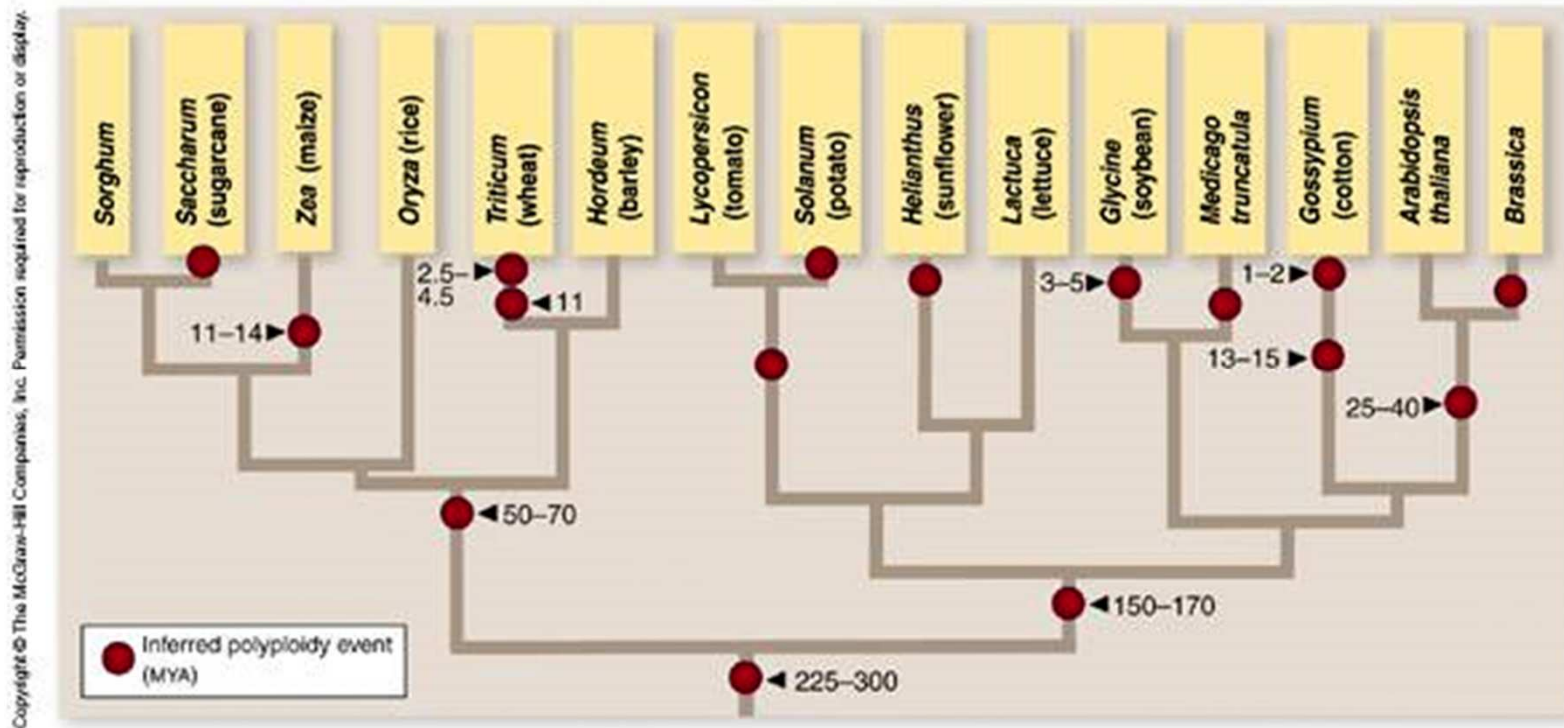


Figure 1 - Synoptic chart of cultivated wheats evolution: the diploid (2n = 14, AA) forms of *Triticum monococcum* (a) were naturally pollinated by weed species, possible *Aegilops speltoides* (2n = 14, BB?), in about 10,000 B.C. primitive farms. The subsequent genome duplication of hybrids by natural polyploidy gave rise to several wild and cultivated tetraploid species (2n = 28, AABB) like *Triticum dicoccum* (b) and *Triticum durum* (Figure 2a); again, the natural pollination of the tetraploid *T. dicoccum* (b) by another weed species, *Aegilops squarrosa* (2n = 14, DD) gave rise to the hexaploid (2n = 42, AABBDD) species (c).

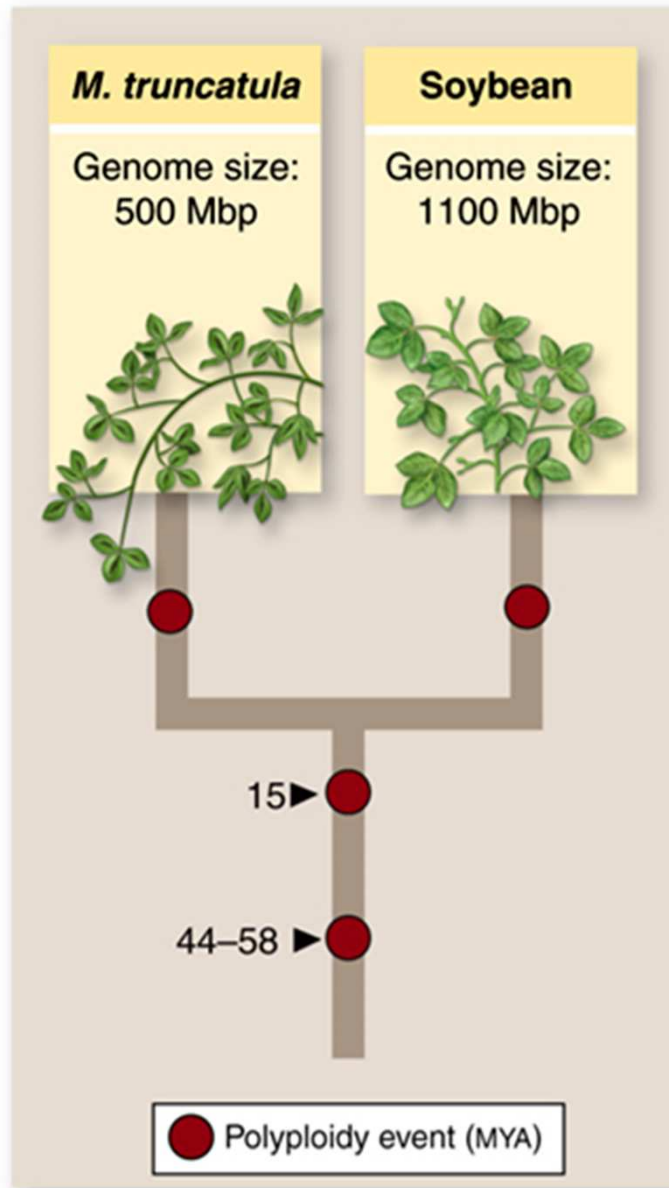
La poliploidia guida lo studio dell'evoluzione dei genomi

- **Paleopoliploidia:** confronto degli eventi di ploidizzazione
 - Divergenza di sequenze duplicate
 - Presenza o assenza di coppie di geni duplicati in seguito a ibridazione

Evoluzione dei genomi

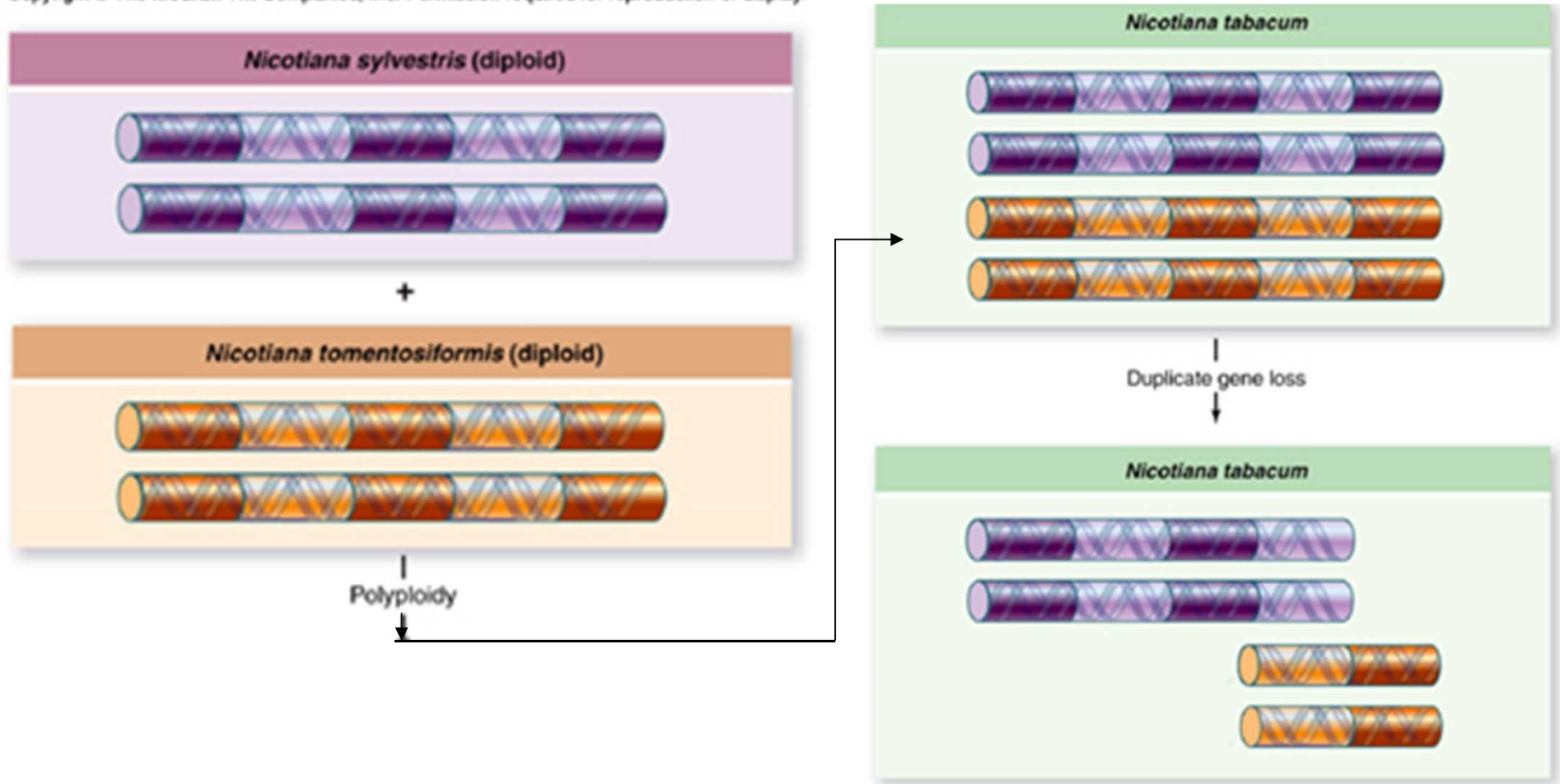


La poliploidia è diffusa nelle piante e ha avuto origini multiple durante l'evoluzione



Riduzione delle dimensioni del genoma

- Destino dei geni duplicati
 - Perdita di funzione per mutazione
 - Nuove funzioni
 - Suddivisione delle funzioni tra le due copie



Perdita di geni duplicati-> problema anche per identificare geni ortologhi in specie diverse

POLIPLOIDIA E SEQUENZIAMENTO DEI GENOMI

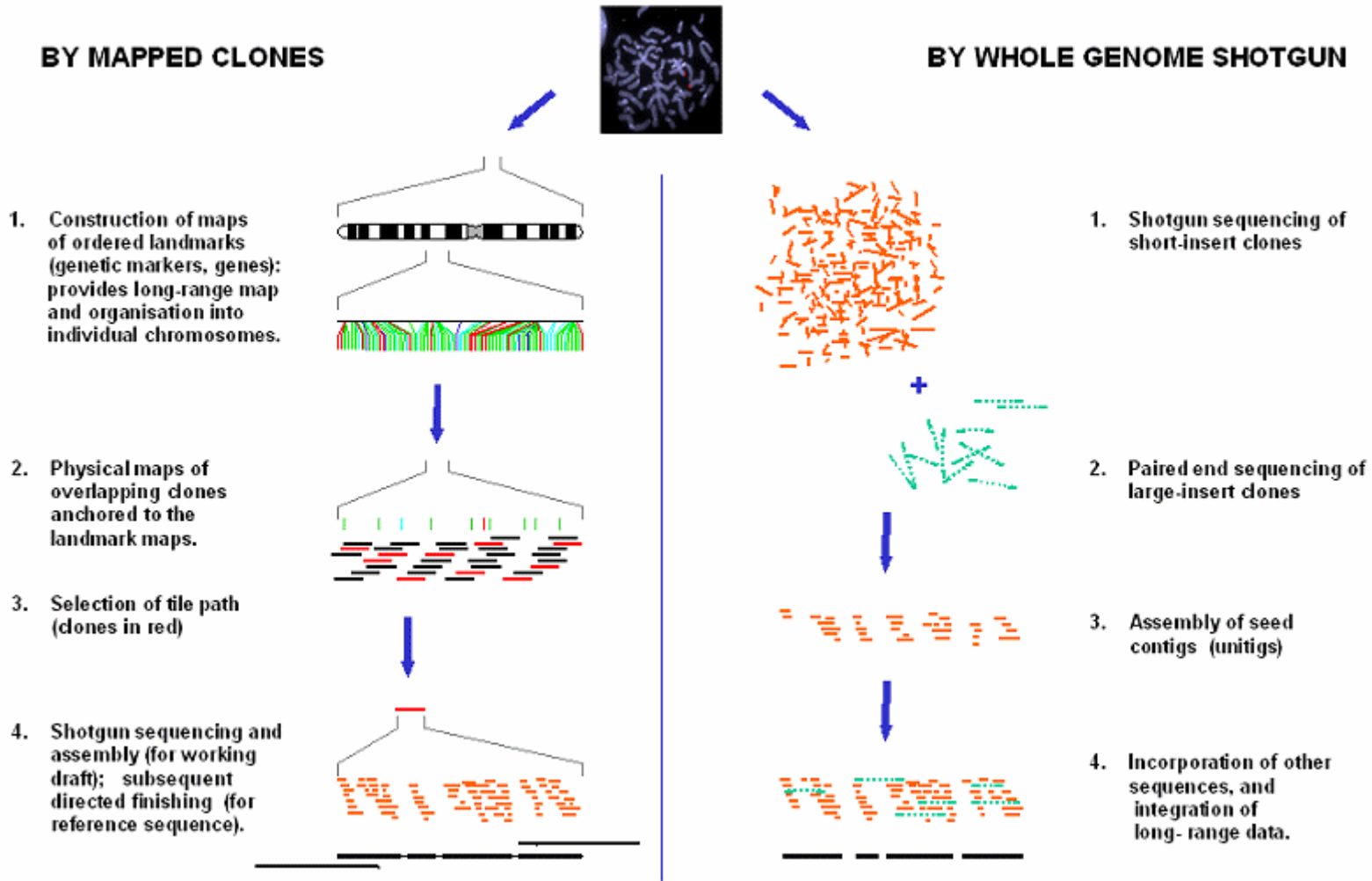
Molte specie autopoliploidi sono intolleranti all'INBREEDING, e hanno alti livelli di eterozigosità, importanti per la produttività

-> problema nell'assemblaggio dei contigs (più alleli diversi per ogni gene)

Negli alloploiploidi i cromosomi duplicati hanno subito sufficiente divergenza per non appaiarsi tra loro -> le sequenze delle coppie geniche sono distinguibili

N.B.: tutte le angiosperme sono PALEOPOLIPLOIDI, ma i geni "paleologhi" sono normalmente ben differenziati

Sequenziamento “whole-genome shotgun” o “clone-by-clone”?



“whole-genome shotgun”

Vantaggi

Rapido
Meno costoso
Utile per sequenziare regioni
refrattarie alla mappatura
fisica (es. regioni ripetitive)

Svantaggi

Assemblaggio complicato se ci
sono molte regioni ripetitive
In autoploidi, non distingue
aplotipi diversi di geni identici

“clone-by-clone”

Vantaggi

Delimita l'incertezza a intervalli
piccoli (100Kb)
Un allele alla volta -> no problema
di eterozigotità

Svantaggi

Costo dell'assemblaggio della
library e dell'ordinamento dei
contigs

PROGETTI DI SEQUENZIAMENTO DI GENOMI DI PIANTE COLTIVATE GIA' IN CORSO

Populus trichocarpa (pioppo) 500-Mb

Medicago truncatula (parente stretto dell'erba medica), 470-Mb

Sorghum bicolor (sorgo) 736-Mb

Solanum lycopersicon (pomodoro) 220 Mb DNA eucromatinico (25% del genoma di 950 Mb)

Zea mays -> methylation filtration e Cot-based

Brassica rapa (rapa) (500 Mb)

Solanum tuberosum (patata)

EST = Expressed Sequence Tags

Creatai sequenziando l'estremità 5' e/o 3' di mRNA isolati a caso e convertiti in cDNA (di solito 200–900 nt)

- > veloce e poco costoso
- > scoperta geni nuovi
- > marcatori per mappatura
- > base per futuri progetti di sequenziamento genomico
- > parziale copertura della porzione codificante del genoma

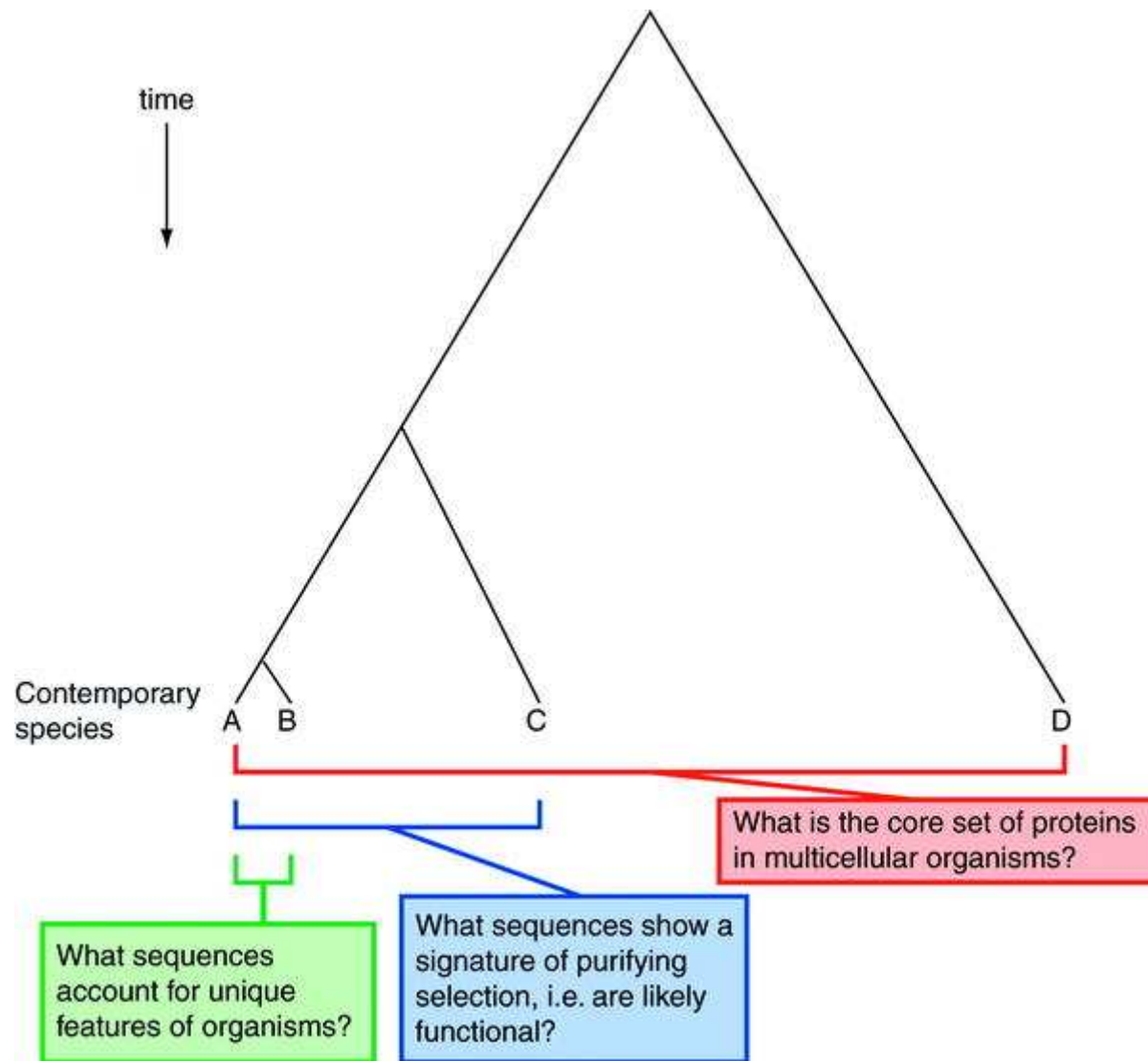
GENOMICA COMPARATIVA

- Analisi e confronto di genomi di specie diverse
- Fornisce informazioni sull'evoluzione delle specie e sulla funzione di geni e sequenze non codificanti
- Es.: funzione di un gene dedotta dallo studio di geni ortologhi in specie modello

GENOMICA COMPARATIVA

Cosa si analizza?

- Similarità di sequenza
- Localizzazione cromosomica dei geni
- Lunghezza e numero esoni
- Quantità di DNA non codificante
- Conservazione di regioni cromosomiche



Predizione della funzione di un gene a partire dalla sequenza di geni in altre specie

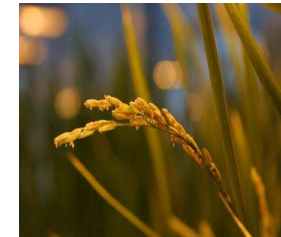
Gene con funzione ignota



Trasferimento di annotazione

Specie modello

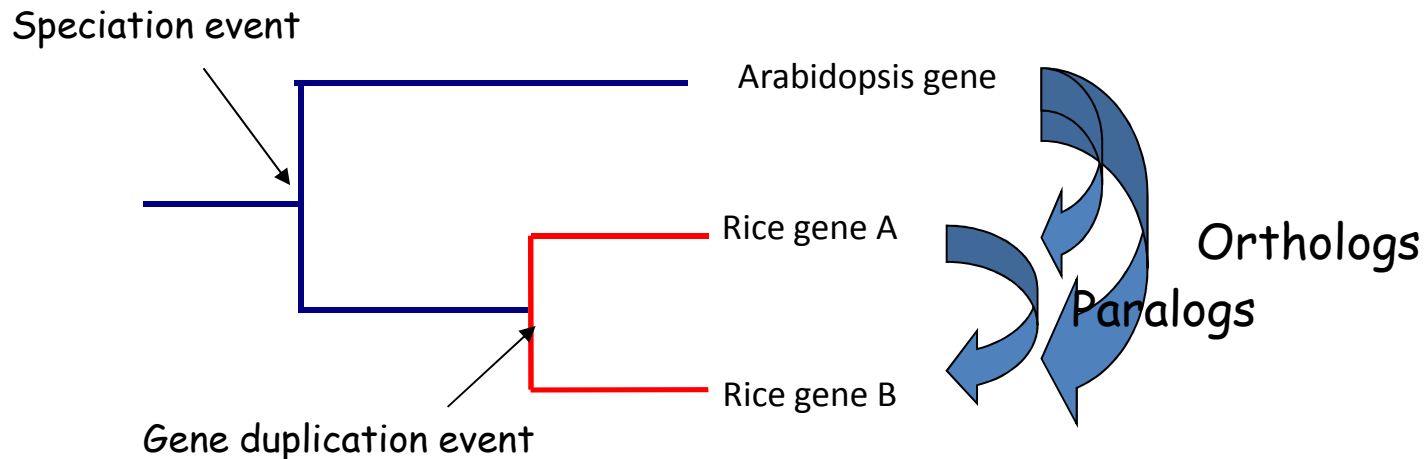
Geni omologhi



Gene con funzione X

Geni omologhi

- **Geni ortologhi** sono geni omologhi che discendono dall'ultimo ancestore comune attraverso speciazione
- Molto probabilmente codificano per proteine con funzione simile



- **Geni paraloghi** sono geni omologhi che si sono evoluti per duplicazione e possono codificare proteine con funzioni più divergenti
- **Geni inparaloghi**: geni ortologhi che hanno subito duplicazione

Come trovare in una specie un gene ortologo ad un gene noto in un'altra specie?

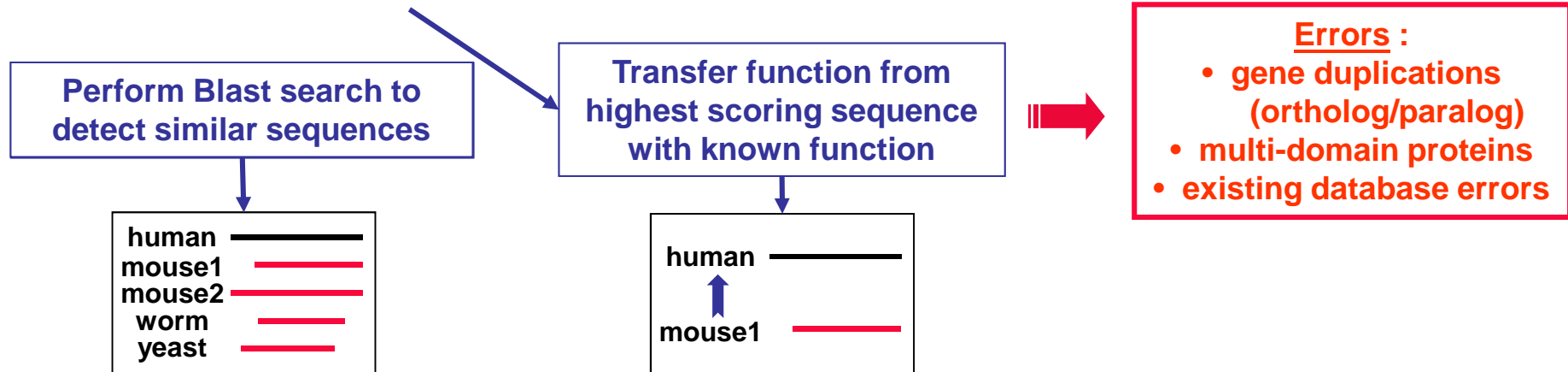
Come predire l'omologia?

Similarità e omologia non sono la stessa cosa!

Geni simili si assomigliano sulla base di un'osservazione empirica

Geni omologhi sono geneticamente correlati (fatto storico: hanno antenato comune)

Metodo classico : annotazione funzionale basata sulla somiglianza (Blast)



Predizione dell'omologia sulla base della similarità

Es. BLAST

Vantaggi:

- Facile
- Veloce
- Direttamente sul genoma completo

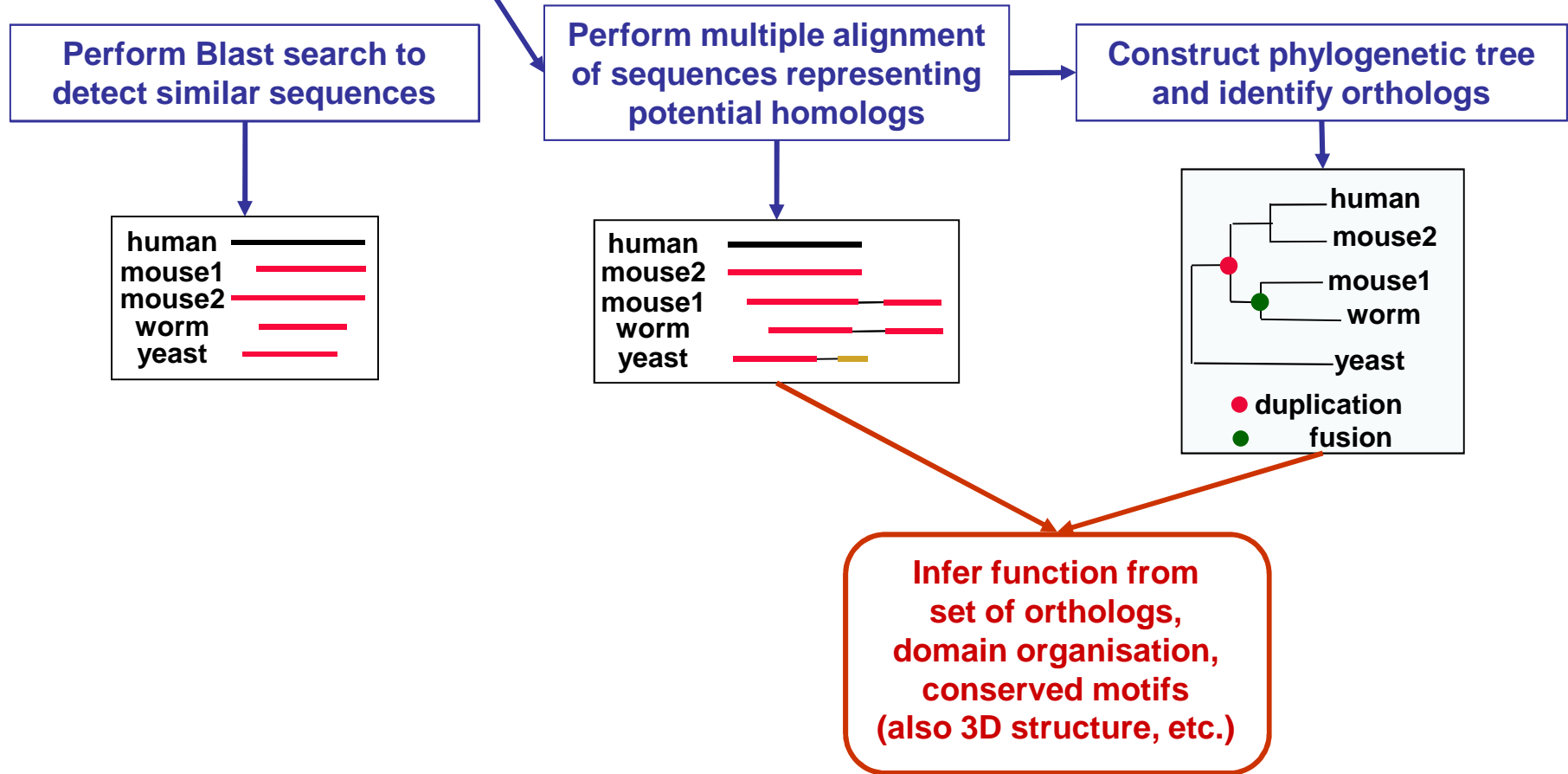
Svantaggi:

- Come stabilire la soglia di E-value per trasferire l'annotazione del gene da una specie all'altra?

Due sequenze possono presentare similarità senza essere evolutivamente correlate!

- Non identifica eventi di duplicazione genica

Phylogeny-based inference



Predizione dell'omologia sulla base della filogenesi

Vantaggi:

- Efficiente per identificare duplicazioni (paraloghi e ortologhi)

Svantaggi:

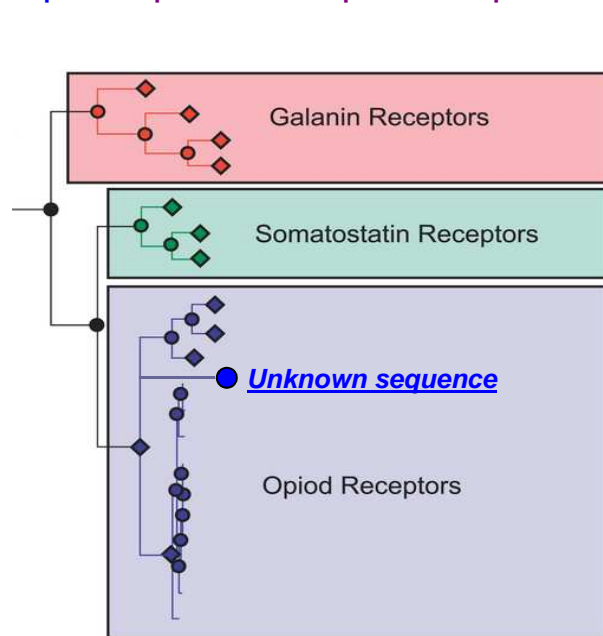
- Lento
- Richiede raggruppamento dei geni in famiglie

Metodi correnti

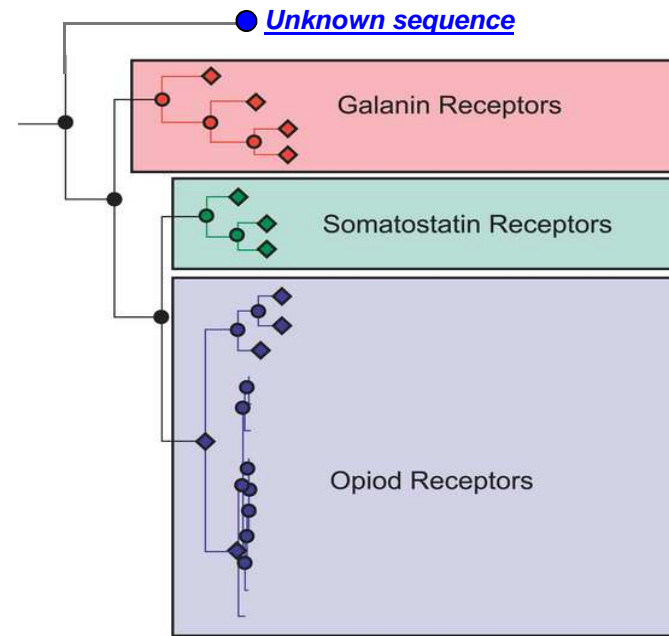
- RIO e Orthostrapper : solo per 1900 famiglie di geni vegetali (Pfam)
- GOST (usa GreenPhylDB family : 6420 famiglie geniche vegetali)

- Tree-based orthology: build a phylogenetic tree of a group of genes and compare gene tree to species tree to define speciation, duplication events
 - Resampled Inference of Orthologs (RIO) (Zmasek and Eddy, 2002)
 - Orthostrapper (Storm and Sonnhammer, 2002)
 - Levels Of Orthology From Trees (LOFT) (Van de Heijden et al, 2007)

■ Example: G protein-coupled receptors



Prediction: Opioid receptor



More general prediction: GPCR of unknown specificity

GreenPhylDB

A phylogenomic platform for plant comparative genomics



Due specie modello



- *Oryza sativa* e *Arabidopsis thaliana*
- Genoma completo
- Alta qualità dell'annotazione (TAIR release 7, TIGR release 5)
- Evidenze funzionali disponibili
- In futuro integrerà altre specie

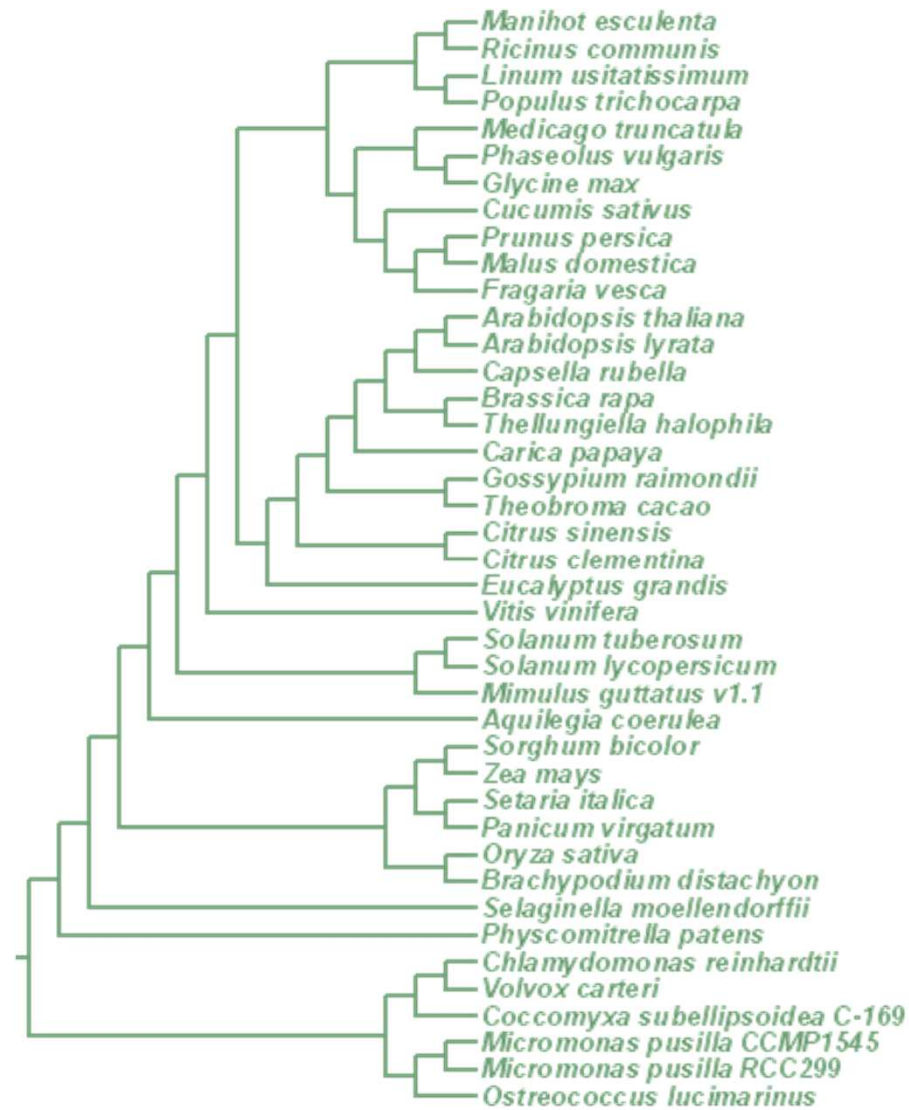
InParanoid

- <http://inparanoid.sbc.su.se>
- Database per identificare geni ortologhi e inparaloghi tra specie diverse di eucarioti (animali, piante, funghi, protisti)

<http://www.phytozome.net/>

http://genomeevolution.org/wiki/index.php/Sequenced_plant_genomes

SEQUENCED AND ANNOTATED GREEN PLANT GENOMES



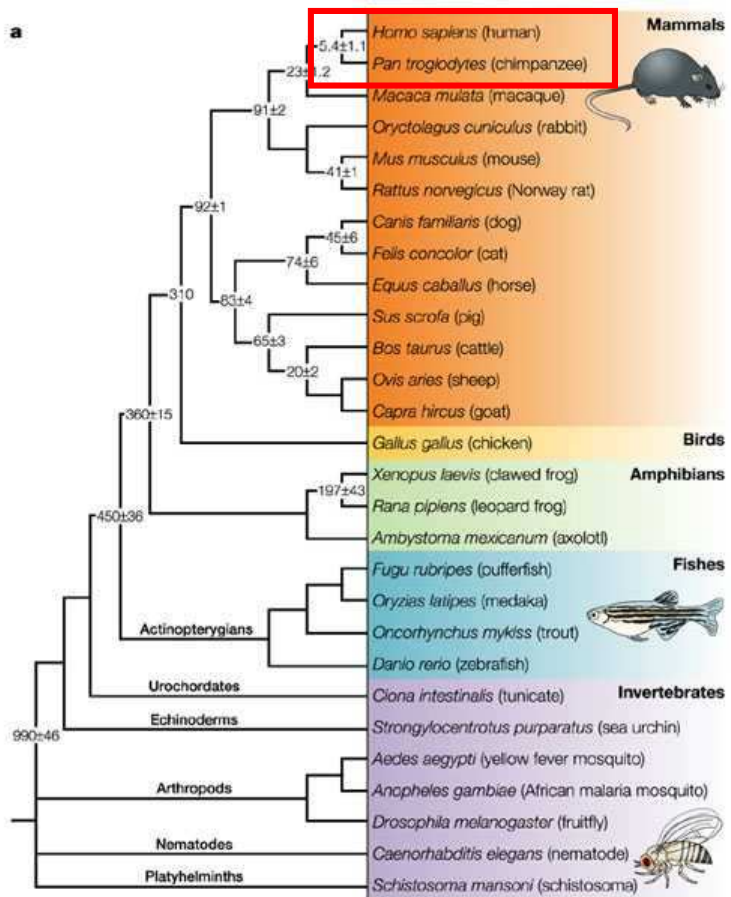
SINTENIA

- Dal greco = legati insieme
- Indica in genetica la presenza di due o più loci sullo stesso cromosoma
- Oggi il concetto è stato espanso per investigare l'**omeologia** (omologia residua tra cromosomi che in origine erano completamente omologhi)

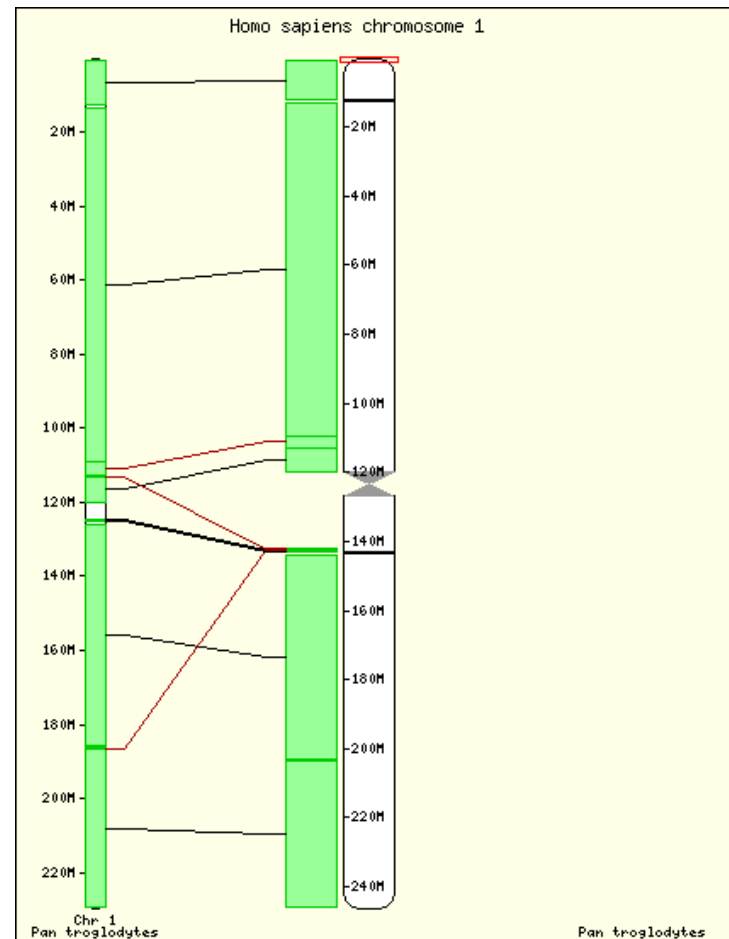
Nella maggior parte delle piante, l'evoluzione delle porzioni di genoma, piccole ma essenziali, che codificano per i geni ha proceduto con tempi relativamente lenti

-> sequenze di DNA intrageniche e organizzazione dei geni lungo i cromosomi sono riconoscibili

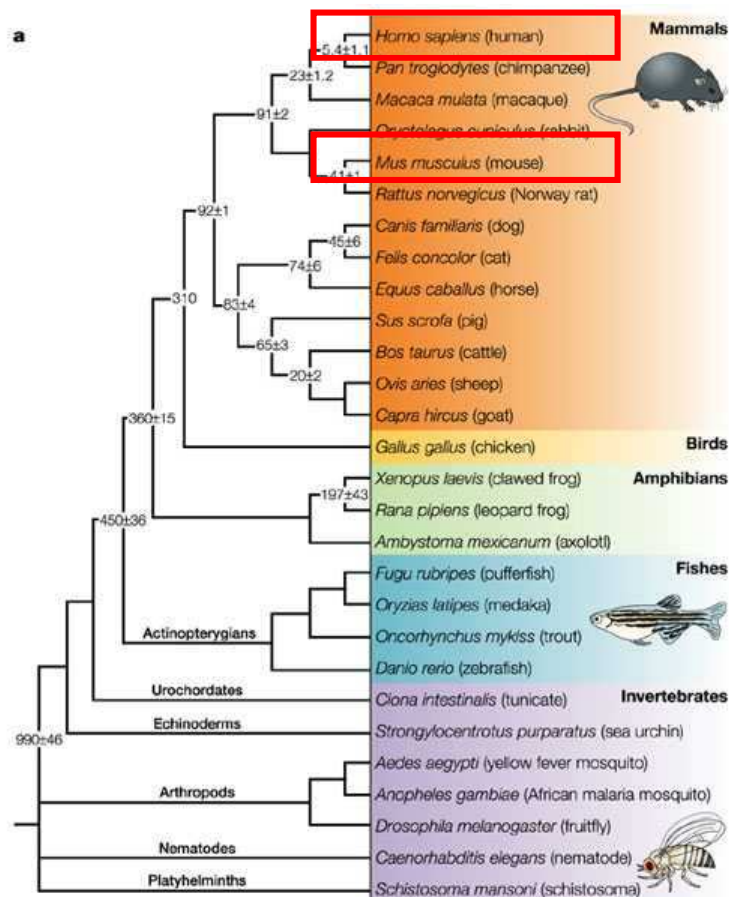
Molti fattori, come duplicazioni cromosomiche o segmentali, mobilità di sequenze di DNA (es. trasposoni), delezioni e riarrangiamenti localizzati, si sono sovrapposti a tale lenta evoluzione, causando molte deviazioni dalla co-linearità



THE ORIGIN AND EVOLUTION OF MODEL ORGANISMS
 Hedges, SB *Nature Reviews Genetics* 3, 838 -849 (2002)

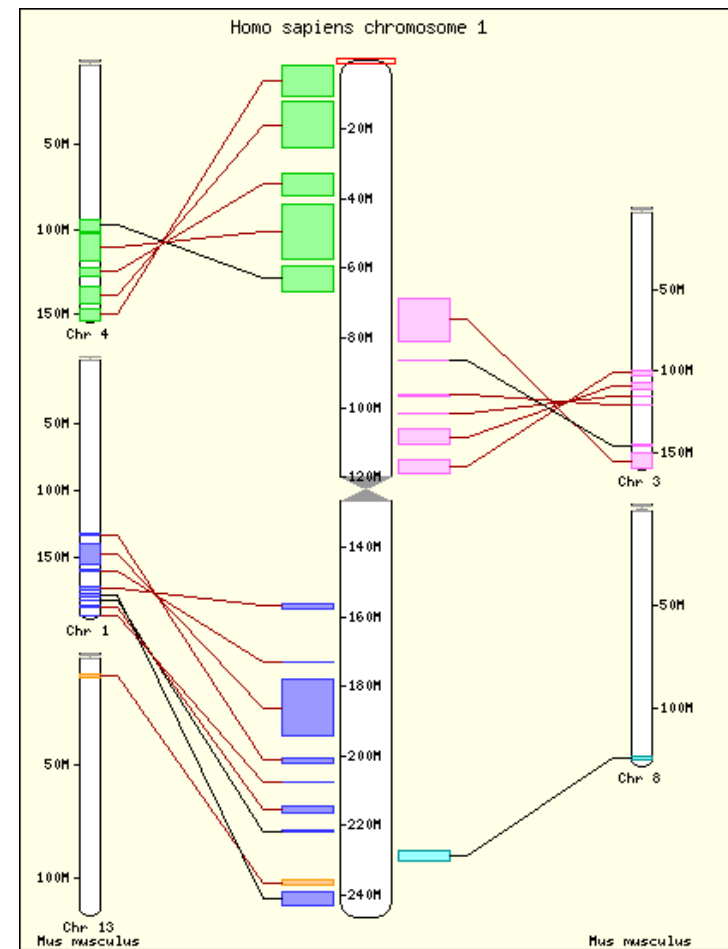


<http://www.ensembl.org/>

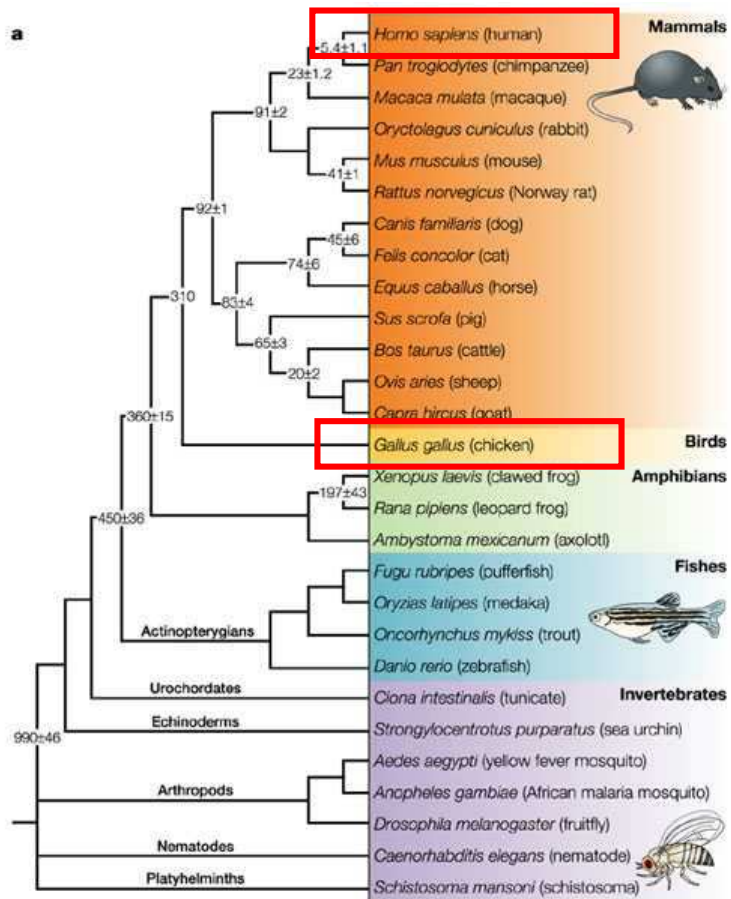


THE ORIGIN AND EVOLUTION OF MODEL ORGANISMS

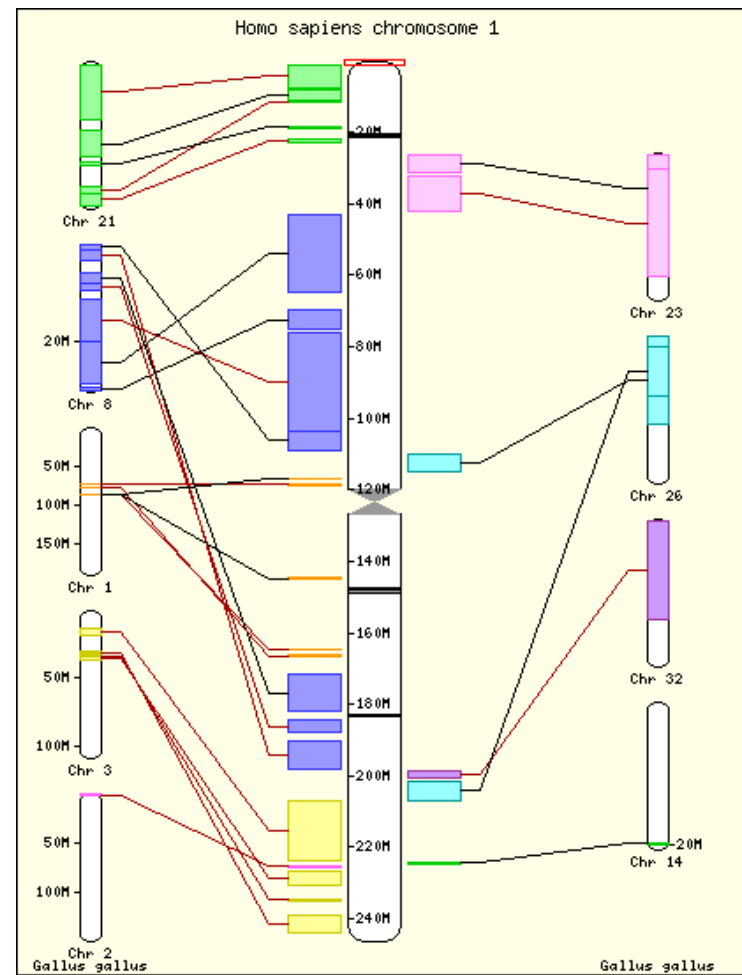
Hedges, SB *Nature Reviews Genetics* 3, 838 -849 (2002)



<http://www.ensembl.org/>



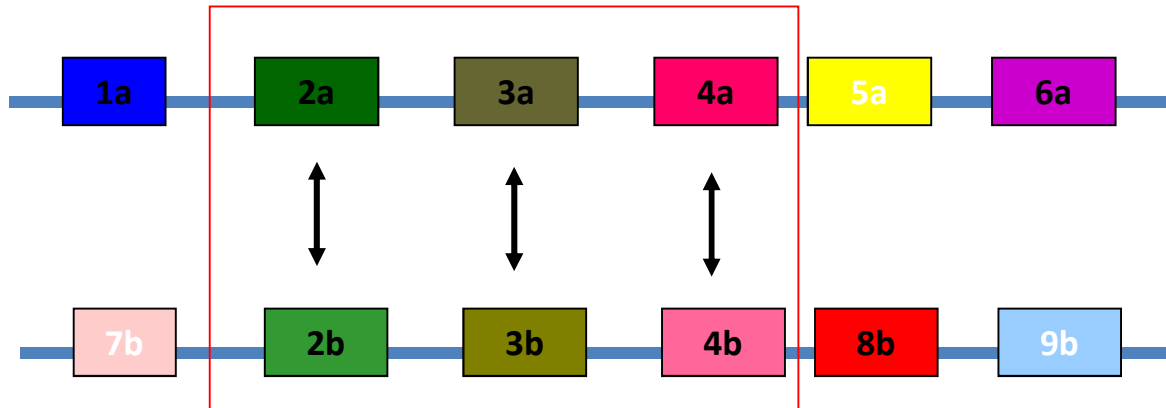
THE ORIGIN AND EVOLUTION OF MODEL ORGANISMS
 Hedges, *Nature Reviews Genetics* 3, 838 -849 (2002)



<http://www.ensembl.org/>

Blocchi di sintenia

Organismo A



Organismo B

SORGO (diploide) e CANNA DA ZUCCHERO (autopoliploide)

si sono separati circa 5 milioni di anni fa

-> alto grado di colinearità

-> potenziale uso del genoma di sorgo per identificare geni ortologhi nella canna da zucchero

C. Asnagli · F. Paulet · C. Kaye · L. Grivet · M. Deu
J.C. Glaszmann · A. D'Hont

Application of synteny across Poaceae to determine the map location of a sugarcane rust resistance gene



Ruggine (*Puccinia melanocephala*) su
canna da zucchero cv CP72-1210

Può causare perdite fino al 40% del
raccolto

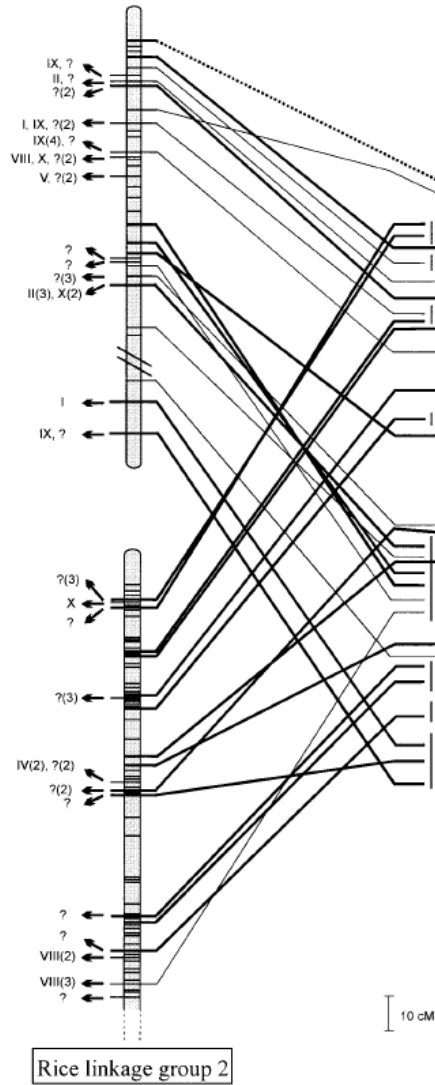
La cultivar R570 possiede un gene di
resistenza

Table 1 Distribution of the 279 markers mapped on R570 linkage groups and locus coincidence with sorghum, maize and rice homoeologous segments

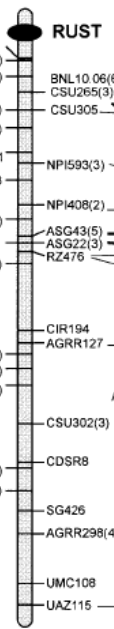
| Linkage group ^a | Number of markers/linkage group | Number of probes involved | Locus coincidence with homoeologous regions | | | |
|----------------------------|---------------------------------|---------------------------|---|-----------|-----------|-----------|
| | | | Sorghum D | Maize 4 | Maize 5 | Rice 2 |
| I | 11 | 5 | 2 | 2 | 2 | – |
| II | 12 | 6 | 2 | – | 4 | – |
| IV | 4 | 2 | – | 1 | – | 1 |
| V | 4 | 4 | 1 | – | 3 | – |
| VII | 122 | 53 | 17 | 11 | 14 | 14 |
| VIII | 10 | 7 | 1 | 3 | 1 | 2 |
| IX | 36 | 18 | 4 | 3 | 13 | – |
| X | 13 | 8 | 2 | 2 | 4 | 1 |
| XI | 5 | 2 | – | 1 | 1 | – |
| Total | 217 | | 29 | 23 | 42 | 18 |
| L | 32 | 9 | | | | |
| U | 30 | 34 | | | | |
| Total | 279 | | | | | |

^a Roman numbers indicate sugarcane linkage groups (in accordance with Grivet et al. 1996); L indicates co-segregation groups yet unassigned to any defined linkage group; U indicates markers yet unlinked. The nomenclature of sorghum linkage groups is that of Pereira et al. (1994)

Sorghum linkage group D



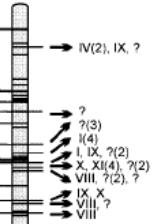
Sugarcane linkage group VII



Maize linkage group 5

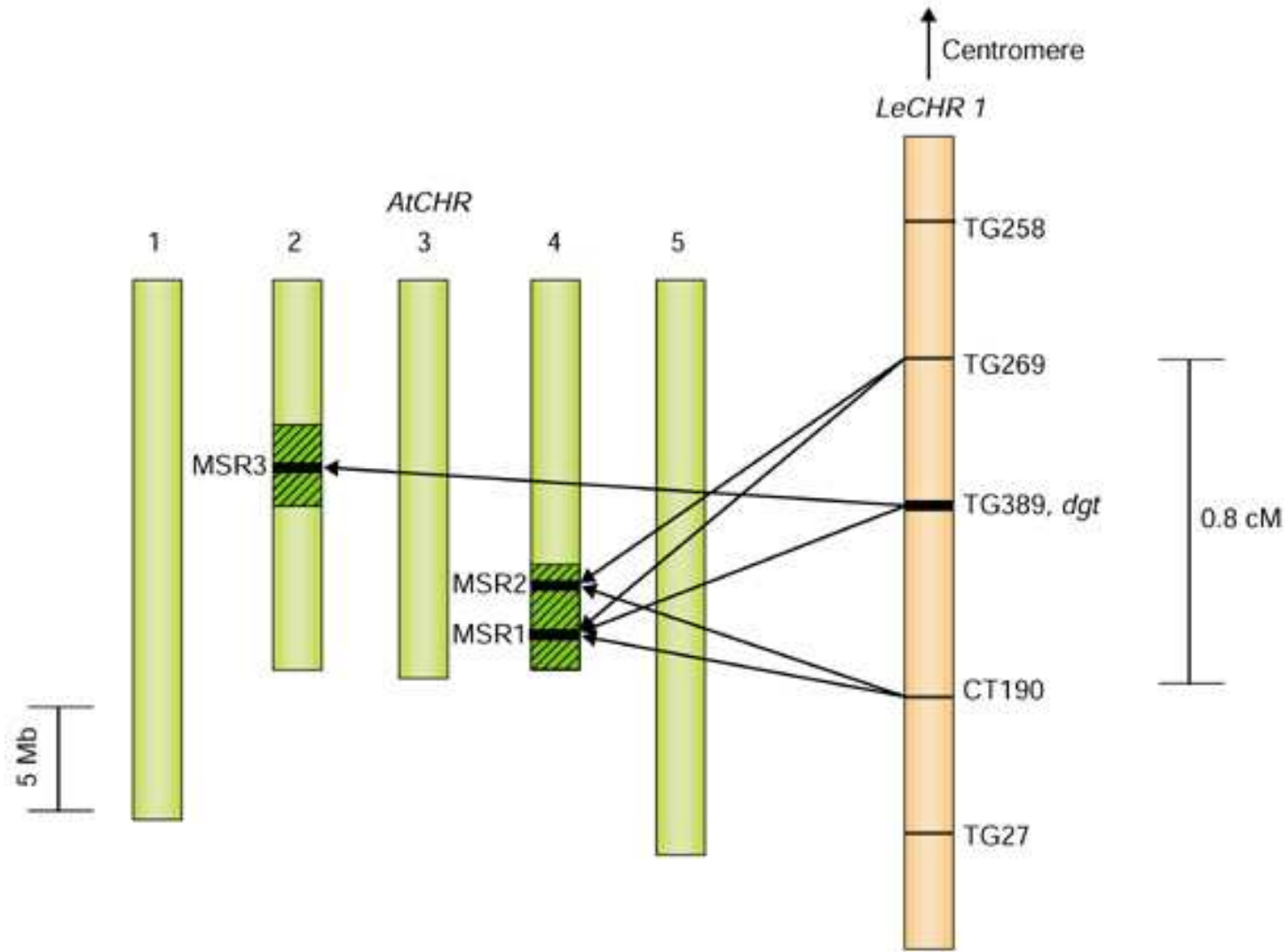


Maize linkage group 4



10 cM

Regioni microsintetiche tra arabidopsis e pomodoro

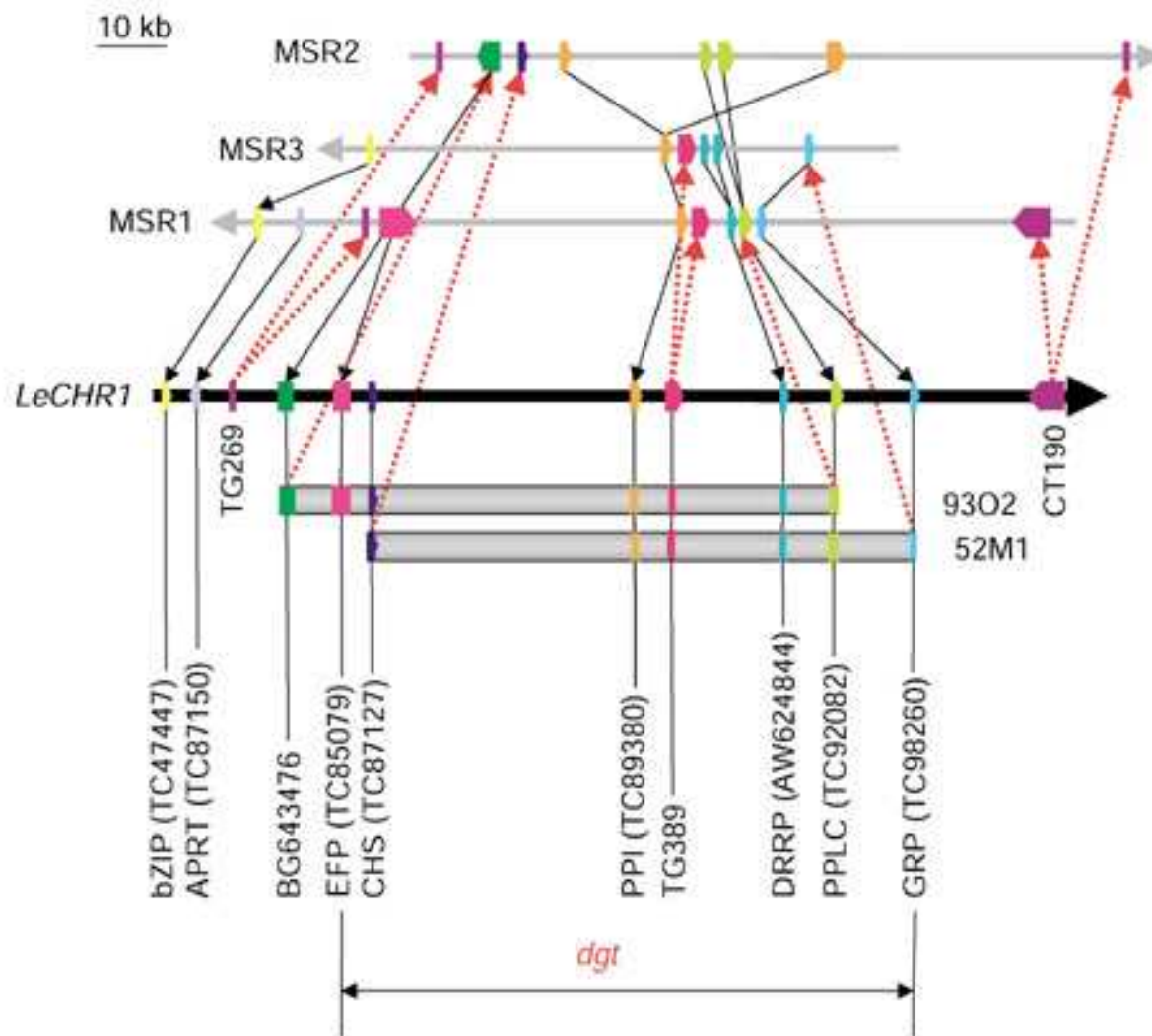


Il mutante *diageotropica* (*dgt*) di pomodoro

- Ridotta sensibilità all'auxina



Mappatura del locus *dgt* di pomodoro sulla base della microsintesi con arabidopsis



KwangChul Oh · Maria G. Ivanchenko · T. J. White
Terri L. Lomax

**The *diageotropica* gene of tomato encodes a cyclophilin:
a novel player in auxin signaling**

