



Short Term Mobility Program – 2015 (STM 2015)

Relazione finale sull'attività scientifica svolta dal **Dr. Juan Pablo Amelio Ortiz**

Responsabile **Dr. Fulvio Pupilli**

Introduzione

Il soggiorno del Dr. Ortiz presso L'IBBR-CNR, UOS di Perugia, svolto nell'ambito del Short Term Mobility Program – 2015 è iniziato il 9 Novembre 2015 ed è terminato il 20 Novembre 2015. Il lavoro svolto dal Dr. Ortiz rientra nell'ambito di una collaborazione trilaterale tra l'IBBR-CNR, il Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente – DAFNAE dell'Università di Padova e l'IICAR-CONICET di Rosario (Argentina). Il progetto di ricerca consiste nell'individuazione di possibili determinanti genetici della riproduzione apomittica mediante l'analisi di mRNA differenzialmente rappresentati nel tessuto nucellare (i.e. il tessuto dell'ovulo da cui si origina la linea germinale apomittica) di genotipi apomittici e sessuali della geminacea subtropicale *Paspalum simplex*. Per questo scopo sono state isolate cellule nucellari mediante la tecnica del Laser Assisted Microdissection, da queste sono stati isolati gli RNA messaggeri, convertiti poi in cDNA ed amplificati linearmente per PCR. Da questi amplificati sono state ottenute opportune librerie che sono state sequenziate mediante la tecnica di sequenziamento massiva (NGS) su base Illumina®. Sulla massa di dati di sequenza ottenuti si è inserito il lavoro del Dr. Ortiz ed in particolare egli ha messo a punto l'allineamento dei singoli reads Illumina (sequenze di RNA di circa 100-250 pb) sulla piattaforma trascrittomica 454 ottenuta in *Paspalum notatum* messa a disposizione per questo progetto.

Attività sperimentale

Il primo passo è consistito nell'utilizzazione, come sequenze controllo di riferimento delle informazioni di sequenza di tre BAC localizzati sul locus dell'apomissia per allineare gli RNA reads ottenuti da tre insiemi indipendenti di RNA (bulks) ottenuti ciascuno cumulando gli RNA isolati da tre piante apomittiche e simmetricamente da tre bulks formati da un ugual numero di piante sessuali. Tali BAC coprono approssimativamente un 5% della lunghezza complessiva del locus che controlla l'apomissia nella specie oggetto di studio. Tutti i dati di sequenza derivanti da ciascun BULK sono stati raggruppati in un singolo archivio in maniera tale da avere a disposizione 6 gruppi indipendenti di dati corrispondenti ai 6 bulks sequenziati (BS1, BS2, BS3, BA1, BA2 e BA3). E' stato quindi completato l'allineamento degli RNA reads sulla sequenza dei BAC. Questa procedura ha permesso di stabilire il livello di espressione dei geni presenti nei BAC e quindi sul locus dell'apomissia.

Parallelamente, è stata messa a punto l'annotazione completa degli isotigs e singletoni di entrambe le genoteche apomittiche e sessuali 454 del *P. notatum* mediante il programma Blastx. In questo

Sede/Headquarter: Via G. Amendola, 165/A - 70126 Bari (BA) ☎ + 39 080 5583400 📠 + 39 080 5587566

	Firenze	Via Madonna del Piano, 10	50019 Sesto Fiorentino (FI)	☎ + 39 055 52251	📠 + 39 055 5225729
Sedi territoriali	Napoli	Via Pietro Castellino, 111	80131 Napoli (NA)	☎ + 39 081 6132280	📠 + 39 081 6132634
Research Divisions	Palermo	Corso Calatafimi, 414	90129 Palermo (PA)	☎ + 39 091 6574578	📠 + 39 091 423424
	Perugia	Via Madonna Alta, 130	06128 Perugia (PG)	☎ + 39 075 5014811	📠 + 39 075 5014869
	Portici	Via Università, 133	80055 Portici (NA)	☎ + 39 081 2539026	📠 + 39 081 2532145

Partita Iva/Vat number: 02118311006 – Codice fiscale 80054330586



Consiglio Nazionale delle Ricerche
National Research Council

Istituto di Bioscienze e BioRisorse
Institute of Biosciences and BioResources



caso sono state usate come riferimento le sequenze di proteine depositate presso la banca dati NCBI relativa alla famiglia delle poaceae e di quelle presenti presso la banca TAIR per quanto riguarda l'*Arabidopsis thaliana*.

Allo stesso modo, gli RNA reads sono stati confrontati con la base trascrittomico Roche 454 corrispondente allo sviluppo fiorale di un genotipo apomittico (Q4117) e sessuale (C4-4x) del *Paspalum notatum* ed ottenuta dalla Dottoressa Silvina Pessino del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agrarias di Rosario, Argentina. Come supporto informatico è stato utilizzato il programma CLC Genomic Workbench 7 (Quiagen) in ambiente Windows 7 caricato in un PC equipaggiato con un hard disk di 1 Tb e 32 Gb di RAM.

Inizialmente è stata usata come riferimento la piattaforma 454 corrispondente al trascrittoma apomittico. Alla fine dell'analisi di allineamento sono stati individuati alcuni reads che corrispondono a geni differenzialmente espressi tra i bulks apomittici e sessuali del *Paspalum simplex*. Le sequenze corrispondenti sono state quindi associate all'annotazione funzionale più probabile. Alcune di esse mostrano interessanti omologie con geni implicati nel differenziamento cellulare. Al momento della scadenza del soggiorno era stata analizzata circa la metà dei dati a disposizione. L'analisi funzionale verrà completata dal Dr. Ortiz al suo ritorno in sede.

Nell'immediato futuro si procederà a realizzare la stessa analisi utilizzando come referenza il trascrittoma base 454 del genotipo sessuale. Questo perchè potrebbero essere espressi geni specifici della sessualità non presenti sul trascrittoma apomittico e viceversa. Si stima che il lavoro possa essere portato a termine nel giro di due mesi.

Conclusioni

Attraverso il soggiorno del Dr. Ortiz, finanziato dal programma STM 2015, è stata messa a punto la procedura che permetterà di estrarre informazioni che riguardano geni differenzialmente espressi nelle cellule deputate allo sviluppo apomittico in *P. simplex*. La disponibilità delle informazioni di sequenza derivanti dalla piattaforma 454 messa a disposizione dal Dr. Ortiz sono state determinanti in questo senso poichè i singoli RNA reads derivanti dal sequenziamento Illumina (100-250 pb), non raggiungevano la lunghezza minima necessaria per attribuire loro omologie significative. Mediante il loro allineamento sulla piattaforma 454, in cui singoli reads erano stati assemblati in isotigs e singletoni di lunghezza intorno al migliaio di basi, è stato quindi possibile individuare alcune interessanti omologie con geni la cui funzione sembrerebbe accordarsi con lo sviluppo apomittico.

Perugia 20 Novembre 2015

Dr. Fulvio Pupilli

Sede/Headquarter: Via G. Amendola, 165/A - 70126 Bari (BA) ☎ + 39 080 5583400 📠 + 39 080 5587566

Firenze	Via Madonna del Piano, 10	50019 Sesto Fiorentino (FI)	☎ + 39 055 52251	📠 + 39 055 5225729	
Sedi territoriali	Napoli	Via Pietro Castellino, 111	80131 Napoli (NA)	☎ + 39 081 6132280	📠 + 39 081 6132634
Research Divisions	Palermo	Corso Calatafimi, 414	90129 Palermo (PA)	☎ + 39 091 6574578	📠 + 39 091 423424
	Perugia	Via Madonna Alta, 130	06128 Perugia (PG)	☎ + 39 075 5014811	📠 + 39 075 5014869
	Portici	Via Università, 133	80055 Portici (NA)	☎ + 39 081 2539026	📠 + 39 081 2532145

Partita Iva/Vat number: 02118311006 – Codice fiscale 80054330586