



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo
Fondo Europeo di Sviluppo Regionale



Un approccio trascrittomico su un genoma di riferimento eterozigote svela l'attitudine degli agrumi per gli usi in IV Gamma

Angelo Ciacciulli, Ricercatore CREA-OFA

"POFACS - CONSERVABILITÀ, QUALITÀ E SICUREZZA DEI PRODOTTI ORTOFRUTTICOLI AD ALTO CONTENUTO DI SERVIZIO"

Task 1.6: Identificazione di geni per la selezione di mandarino-simili e arance Tarocco idonee per la IV gamma

Angelo Ciacciulli (CREA OFA)



Identificare e studiare i principali geni e mutazioni potenzialmente causative dei caratteri che contribuiscono a spiegare la migliore attitudine alla destinazione in IV gamma di cloni di arancio Tarocco e di ibridi di mandarino-simili.

Campionamento 2021 - 2022

- Varietà di **ARANCIO TAROCCO** suddivise in precoci (dicembre, gennaio), medie (marzo), tardive (maggio).
- Varietà di **IBRIDI di MANDARINO** precoci (novembre, dicembre).
- Varietà di ARANCIO TAROCCO suddivise tra cloni di importanza commerciale e appartenenti alla collezione di germoplasma.
- Analisi pomologiche, qualitative, e reologiche

Analisi 2022 - 2023

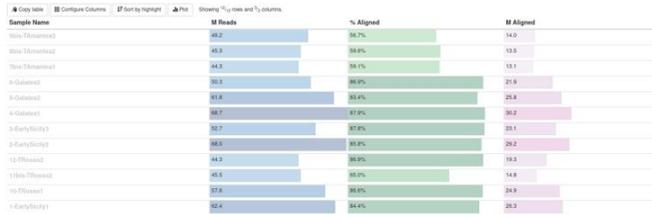
- Scelta della Migliore e Peggior varietà di ARANCIO e IBRIDO, e sequenziamento RNA da succo.

Campioni per RNASeq

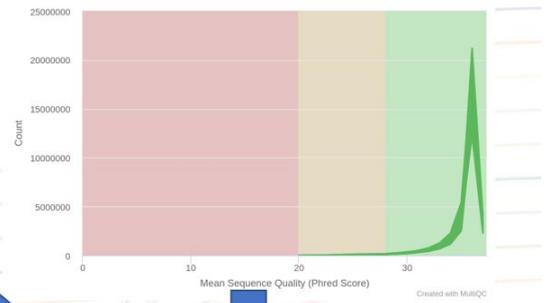
STAR

	Aranci	Ibridi
Adatte (IV gamma)	<u>Tarocco Amantea</u>	<u>Early Sicily</u>
Non adatte (IV gamma)	Tarocco Rosso VCR	Galatea

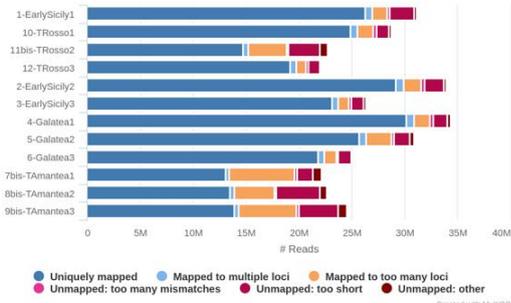
General Statistics



FastQC: Per Sequence Quality Scores

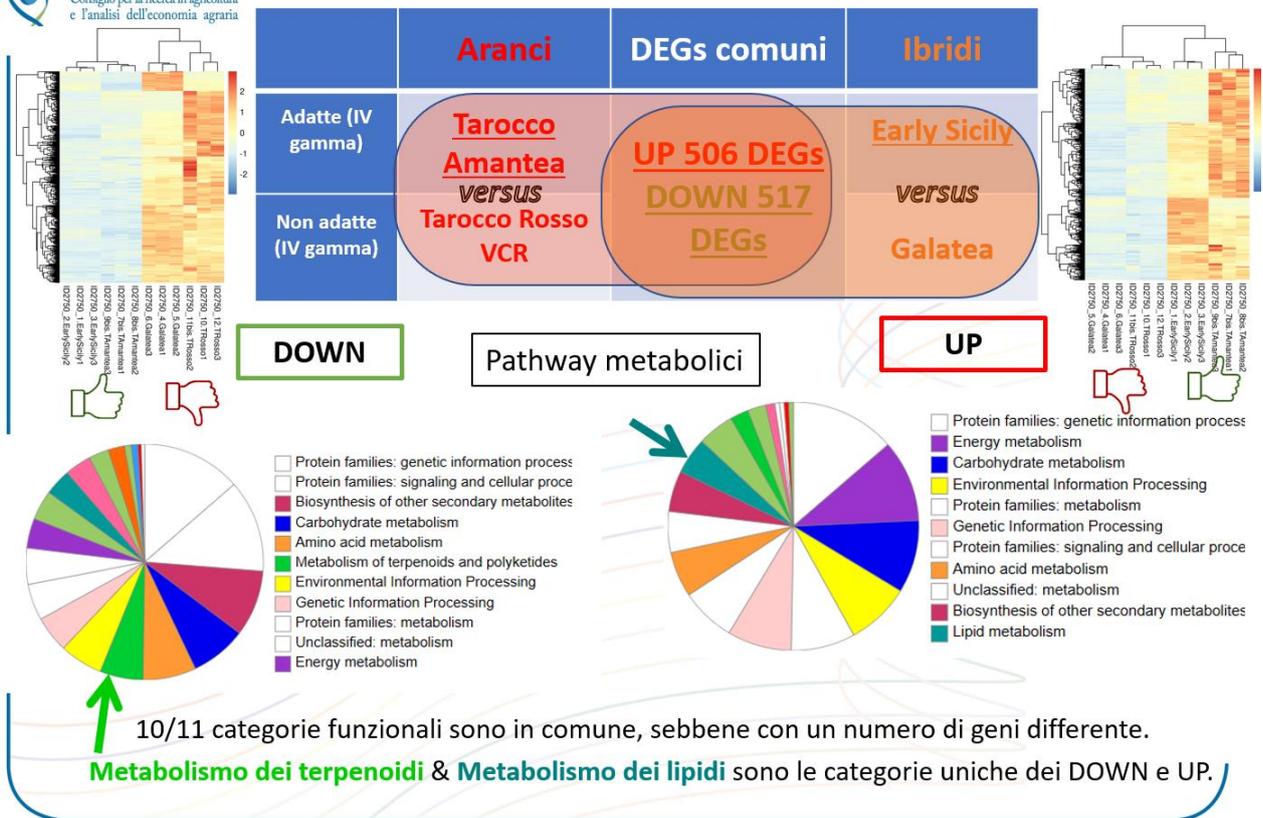


STAR: Alignment Scores

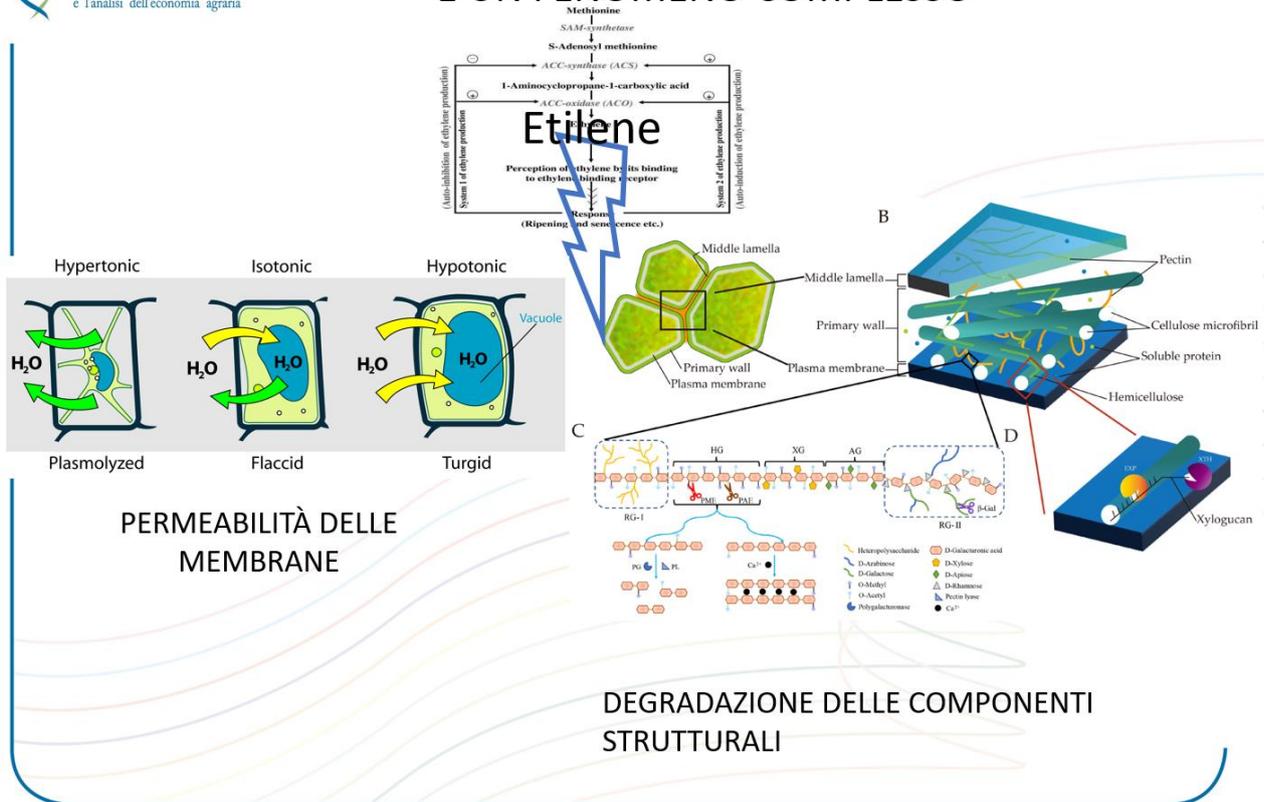


Dai controlli di qualità i campioni risultano soddisfacenti

RNASeq differenziale su assembly DVS_A



IL RAMMOLLIMENTO DEL FRUTTO È UN FENOMENO COMPLESSO

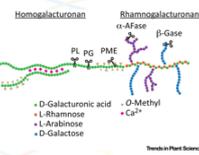




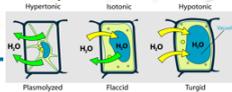
Varietà	switched-off (Median count: 0-9)	Medium (Median count: 10-39)	switched-on (Mediana count >40)	switched-OFF & switched-ON	condivisi
Tarocco Amantea	134	101	282	70	21
Tarocco Rosso VCR	8	59	450		
Early Sicily	156	99	262	50	
Galatea	29	90	398		



Tra i geni sottoespressi in Tarocco Amantea (ulteriormente selezionati perché il livello di espressione viene anche valutato in funzione del numero di *count*) troviamo il gene della **poligalatturonidasi**, enzima che degrada le pectine (principali componenti delle pareti cellulari) contribuendo ad un maggior *softening*. Il Tarocco Amantea è stato selezionato per la sua maggiore resistenza al taglio.



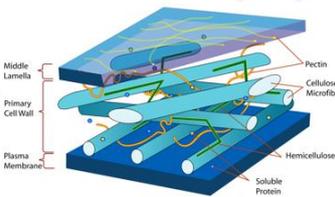
Tra i geni condivisi si colloca la **Beta-amirina sintasi** coinvolta nella sintesi di lupeolo, alfa e beta-amirina, tra i più importanti terpenoidi presenti nella cuticola carnosa del frutto; quest'ultima svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento della qualità nella shelf-life post-raccolta, principalmente evitando il rammollimento dei frutti causato dalla perdita di acqua.





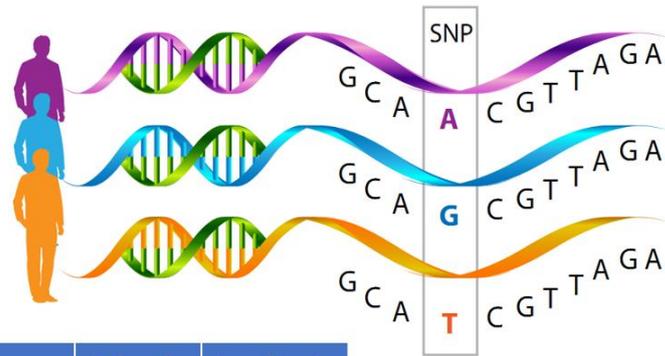
Varietà	switched-off (Median count: 0-9)	Medium (Median count: 10-39)	switched-on (Median count: >40)	switched-ON & switched-OFF	condivisi
Tarocco Amantea	0	28	478	15	4
Tarocco Rosso VCR	42	93	371		
Early Sicily	7	50	449	23	
Galatea	69	124	313		

Tra i geni sovraespressi in arancio ritroviamo **WAT1** (WALLS ARE THIN1), una proteina specifica di pianta che determina lo spessore della parete cellulare secondaria delle fibre legnose, contribuendo a spiegare la migliore separazione in spicchi e resistenza al taglio dei frutti di questa varietà.

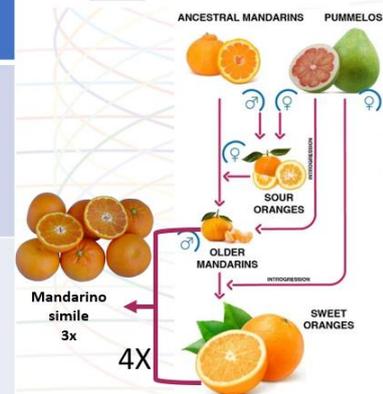


La sovraespressione del gene **giberrelin 20 ossidasi 2** supporta quanto già riportato in bibliografia, ovvero che la GA3 ritarda il *softening*.

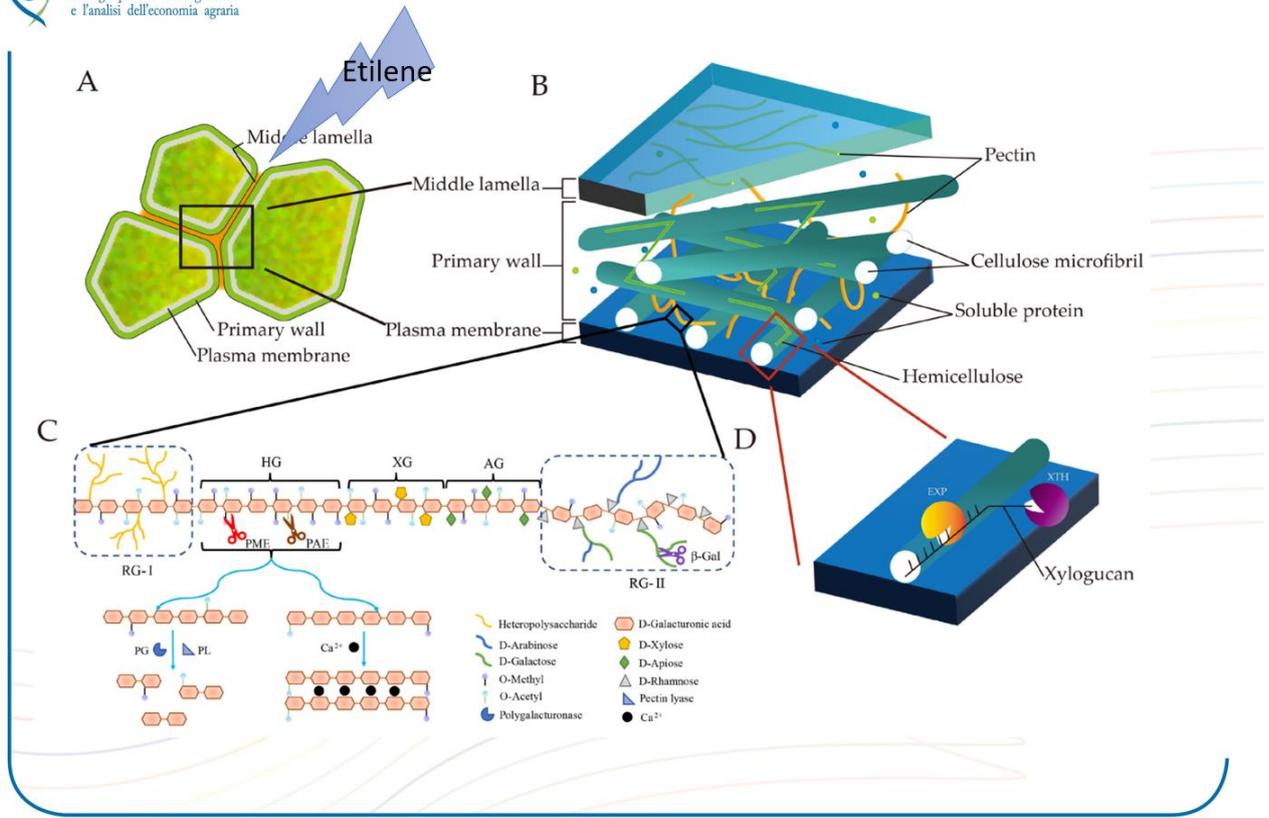
MUTAZIONI SPECIFICHE DI ADATTI E INADATTI ALLA IV-GAMMA



	Adatti	Inadatti
SNP discriminanti per attitudine con riferimento Valencia DVS_A	17	113
INDEL discriminanti per attitudine con riferimento Valencia DVS_A	1	16

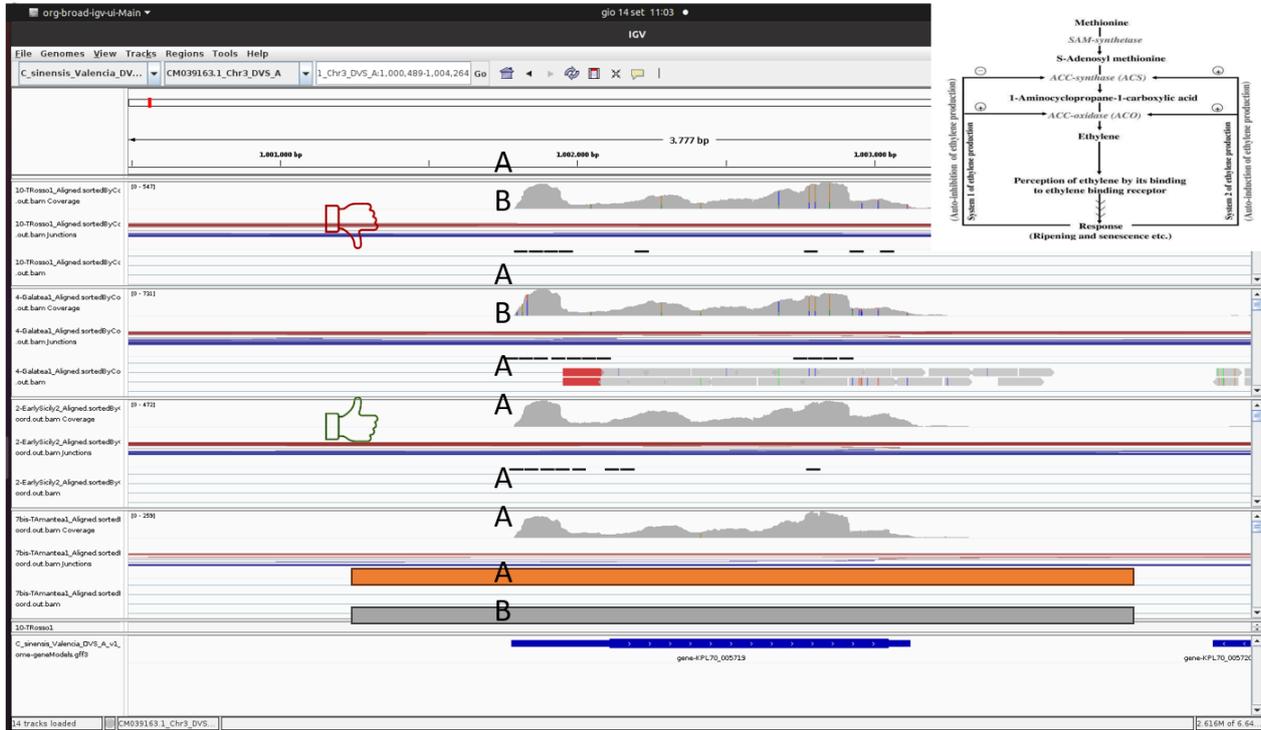


RAMMOLLIMENTO DEL FRUTTO



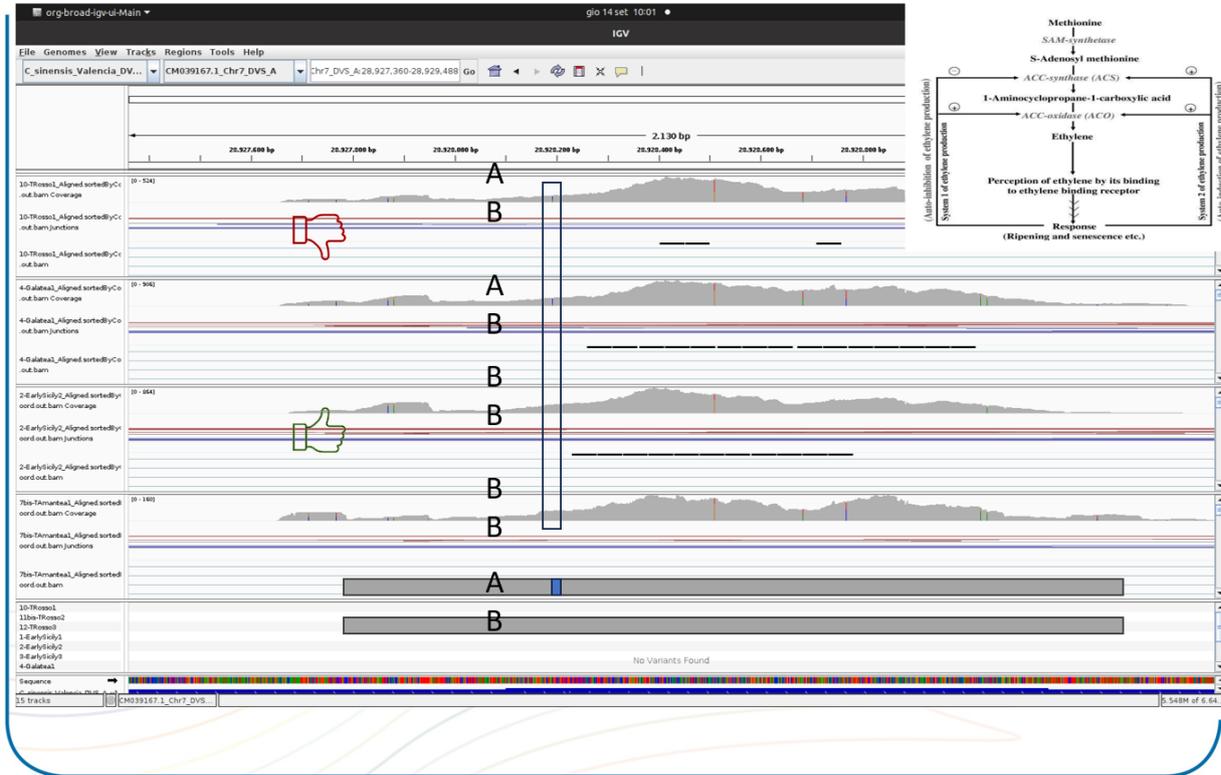
Perdita di eterozigosi o espressione allele specifica?

Ethylene-responsive transcription factor ERF061



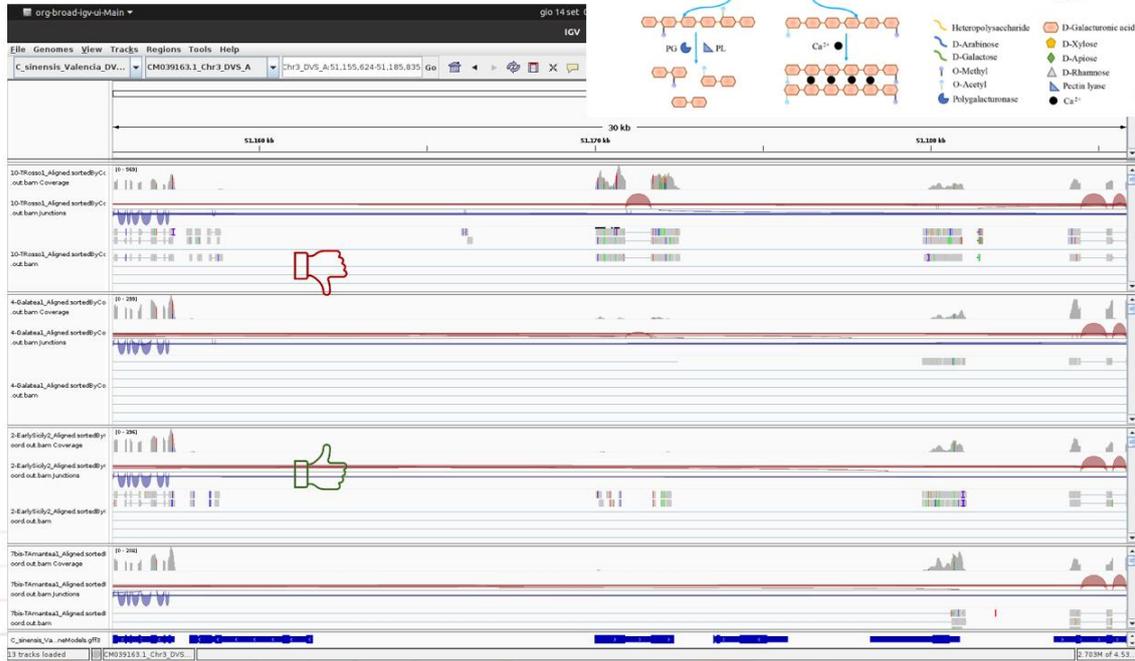
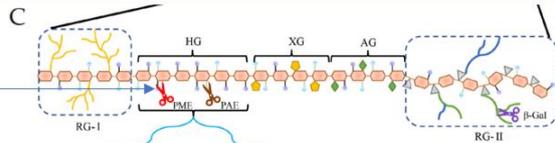
Perdita di eterozigosi?

ethylene-responsive transcription factor RAP2-4

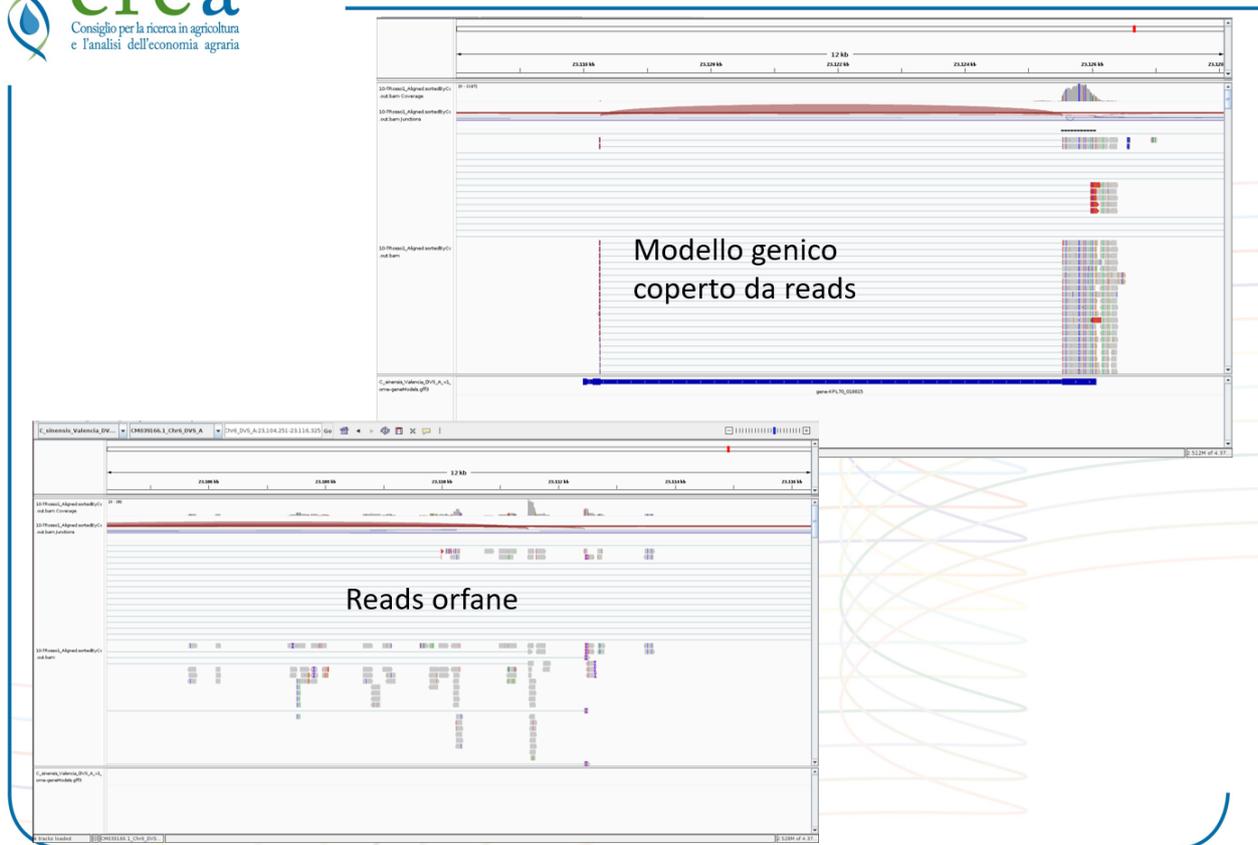


DEGs + Perdita di eterozigosi o espressione allele specifica o splicing alternativo?

putative pectinesterase



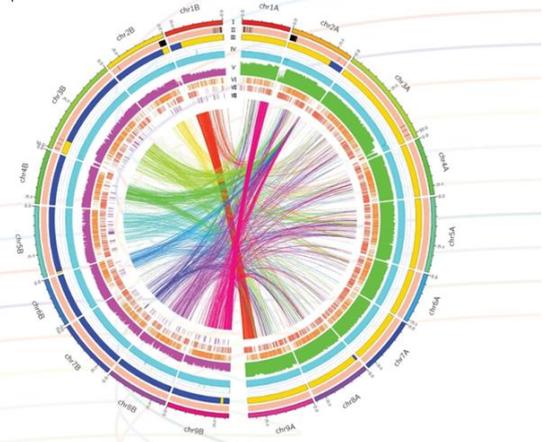
LIMITI DEL MODELLO APLOIDE



Sviluppo della pipeline per analisi trascrittomiche su genomi diploidi



Ciacchiulli A., Caruso P., Allegra M., Sciuto G., Strano M.C., Licciardello C.



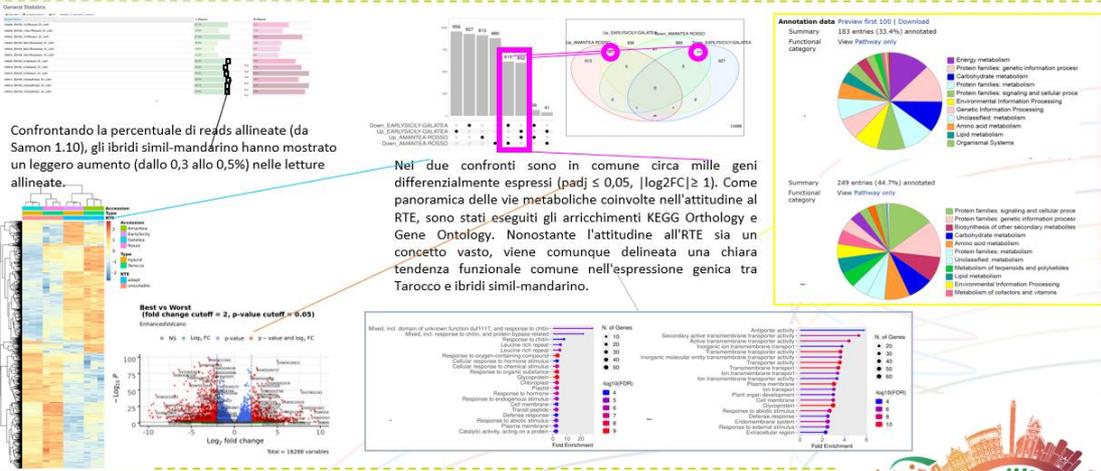
Circular representation of the heterozygous sweet orange genome (Wu et al., 2023)



66th ANNUAL CONGRESS
ITALIAN SOCIETY OF
AGRICULTURAL GENETICS

Bari, 5-8 September 2023

RISULTATI



Confrontando la percentuale di reads allineate (da Samon 1.10), gli ibridi simil-mandarino hanno mostrato un leggero aumento (dallo 0,3 allo 0,5%) nelle letture allineate.

Nei due confronti sono in comune circa mille geni differenzialmente espressi ($p_{adj} \leq 0,05$, $|\log_2FC| \geq 1$). Come panoramica delle vie metaboliche coinvolte nell'attitudine al RTE, sono stati eseguiti gli arricchimenti KEGG Orthology e Gene Ontology. Nonostante l'attitudine all'RTE sia un concetto vasto, viene comunque delineata una chiara tendenza funzionale comune nell'espressione genica tra Tarocco e ibridi simil-mandarino.

CONCLUSIONI

Sebbene preliminari, i risultati hanno dimostrato che l'uso del genoma eterozigote è applicabile agli studi di trascrittomica ed è più accurato per le accessioni altamente eterozigoti, specialmente negli ibridi interspecifici, come in questo contesto. Inoltre, lo sviluppo di nuove pipeline è essenziale per la corretta e routinario applicazione di questo approccio.



66th ANNUAL CONGRESS
ITALIAN SOCIETY OF
AGRICULTURAL GENETICS
Bari, 5-8 September 2023

Conclusioni, attività in corso e prospettive future



Analisi preliminari dei DEGs, basate sullo studio bibliografico, evidenziano un chiaro coinvolgimento di alcuni geni sulla shelf-life dei frutti di agrumi.



I dati di espressione sono stati corredati dall'identificazione di mutazioni a singolo nucleotide e InDel localizzate nei DEGs, che in parte spiegano l'effetto delle mutazioni nell'espressione dei geni differenziali.



Per una migliore e inequivocabile interpretazione dei dati, le reads derivanti dall'RNAseq sono state rimappate sul genoma diploide di arancio rilasciato recentemente (Wu et al., 2022) e distinto nei due aplotipi (mandarino e pummelo). **Stiamo sviluppando una pipeline V2 per analisi trascrittomiche su genomi diploidi.**



L'espressione dei geni DEGs andrà validata sulle varietà oggetto dell'RNAseq e su un paio di varietà aggiuntive, come controprova.



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo
Fondo Europeo di Sviluppo Regionale



GRAZIE A TUTTI PER L'ATTENZIONE!

"POFACS - CONSERVABILITÀ, QUALITÀ E SICUREZZA DEI PRODOTTI ORTOFRUTTICOLI AD ALTO CONTENUTO DI SERVIZIO"