

SNP array: genotipizzazione ad alta resa per il breeding assistito nelle specie arboree da frutto

Michela Troglio¹, Luca Bianco¹, Riccardo Velasco²

Fondazione Edmund Mach, Via E. Mach 1, San Michele all'Adige, 38010, TN

Centro di Ricerca in Viticoltura ed Enologia CREA, via XXVIII aprile 26, Conegliano, 31015, TV

Parole chiave: SNP array , miglioramento genetico, genotipizzazione,

La pubblicazione della sequenza di riferimento per diversi genomi di piante da frutto rappresenta il punto di partenza per lo studio della variabilità tra gli individui all'interno di una specie. Grazie alle tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (NGS) è possibile ora risequenziare qualsiasi nuovo individuo a costi molto bassi, allineare la sua sequenza con quella di riferimento ed identificare così varianti nucleotidiche e strutturali utili alla comprensione della diversità genetica per i caratteri oggetto di studio o di selezione. Questo permette di accedere alla variabilità genetica esistente in natura e sviluppare strumenti di screening veloci, riproducibili e relativamente economici per la caratterizzazione genetica di centinaia di individui e popolazioni della stessa specie. In passato, la caratterizzazione genetica delle diverse accessioni/cultivar di una specie avveniva prevalentemente con l'utilizzo dei marcatori genetici microsatelliti (dei motivi di piccole sequenze di DNA ripetute - short tandem repeats), molto informativi in quanto multiallelici, ma difficili da ottimizzare ed utilizzare su larga scala. Per le specie arboree da frutto negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi saggi per la genotipizzazione "genome wide" di polimorfismi di singolo nucleotide (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) che sfruttano la tecnologia dei microarray di DNA (BeadArray Illumina e microarray Affymetrix) che possono contenere da poche migliaia fino a oltre mezzo milione di marcatori polimorfici (Laurens et al. 2018; Marrano et al. 2018; Montanari et al. 2019; Vanderzande et al. 2020). Tali SNP array disponibili pubblicamente sono diventati il riferimento internazionale nei programmi di miglioramento genetico assistito per studi genetici di pedigree (Laucou et al. 2018; Muranty et al. 2020) e associazione (Iwata et al. 2016; Laurens et al. 2018) e per nuove applicazioni come la genomic selection, ovvero la selezione delle piante migliori basata sulla misura del loro potenziale genetico (Kumar et al. 2012; Minamikawa et al. 2018). Rispetto al passato, queste informazioni possono infatti conferire un grado di precisione maggiore al miglioramento genetico e consentire inoltre di selezionare individui di qualità superiore, **incrementando** così la **probabilità di ottenere varietà**

innovative per una agricoltura moderna e sostenibile (Iwata et al. 2016; Rasheed et al. 2017). La disponibilità di un patrimonio genetico vario ed eterogeneo e l'associazione di geni con caratteristiche morfologiche sono elementi fondamentali per soddisfare le esigenze dei programmi di breeding attuali e futuri.

La caratterizzazione della diversità genetica di vaste collezioni di germoplasma di una specie può inoltre permettere di **identificare relazioni di parentela** fin'ora sconosciute e varietà "chiave" fondatrici dei diversi pedigree (Howard et al. 2017; Crespan et al. 2020). Nell'ambito del progetto Europeo Fruitbreedomics (Laurens et al. 2018) sono state caratterizzate diverse collezioni di melo con SNP array ad alta densità (Illumina Infinium®apple20K e Affymetrix Axiom®Apple480K; Bianco et al. 2014, 2016) e questo ha permesso di verificare l'**identità genetica** delle diverse accessioni e di svelare diverse relazioni di parentela anche di antiche origini (Muranty et al. 2020).

Vari **strumenti informatici** sono stati sviluppati sia per facilitare l'analisi dei dati provenienti da SNP array (ASSIST, Di Guardo et al. 2015) che per integrare l'informazione in blocchi aploipici (PediHaplotyper, Voorrips et al. 2016) e per tracciare il flusso dell'informazione genetica in pedigree noti o esplorare relazioni non note (HaMoVi - unpublished).

Il risequenziamento di specie selvatiche ed il loro utilizzo per lo sviluppo di SNP array può infine permettere una riscoperta della **variabilità genetica** presente nel **germoplasma selvatico**, il che costituisce un primo passo verso l'introggressione di tratti interessanti come le resistenze a patogeni nei programmi di breeding (Montanari et al. 2019).

Bianco L, Cestaro A, Sargent DJ, et al (2014) Development and validation of a 20K SNP whole genome genotyping array for apple (*Malus × domestica* Borkh). PLoS ONE **9**: e110377

Bianco L, Cestaro A, Linsmith G, et al (2016) Development and validation of the Axiom®Apple480K SNP genotyping array. Plant Journal **86 (1)**: 62-74

Crespan M, Migliaro D, Larger S, et al (2020) Unraveling the genetic origin of 'Glera', 'Ribolla Gialla' and other autochthonous grapevine varieties from Friuli Venezia Giulia (northeastern Italy). Scientific Reports **10**: 7206

Di Guardo M, Micheletti D, Bianco L, et al (2015) ASSIST: An Automatic SNP Scoring Tool for in- and outbreeding species. Bioinformatics **31(23)**:3873-4

Howard N, Van de Weg E, Bedford D, et al (2017) Elucidation of the 'Honeycrisp' pedigree through haplotype analysis with a multi-family integrated SNP linkage map and a large apple (*Malus × domestica*) pedigree-connected SNP data set. Horticulture Research **4**: 17003

Iwata H, Minamikawa MF, Kajiya-Kanegae H, et al (2016) Genomics-assisted breeding in fruit trees. Breeding Science **66**: 100-115

Kumar S, Chagné D, Bink MC, et al (2012) Genomic selection for fruit quality traits in apple (*Malus domestica* Borkh.). PLoS ONE **7(5)**:e36674

Laucou V, Launay A, Bacilieri R, et al (2018) Extended diversity analysis of cultivated grapevine *Vitis vinifera* with 10K genome-wide SNPs. PLoS ONE **13(2)**: e0192540

Laurens F, Aranzana MJ, Arus P, et al (2018) An integrated approach for increasing breeding efficiency in apple and peach in Europe. Horticultural Research **5**:11

Marrano A, Martinez-Garcia Pedro J, Bianco B, et al (2018) A new genomic tool for walnut (*Juglans regia* L.): development and validation of the high-density Axiom™ J. regia 700K SNP genotyping array. Plant Biotechnology Journal **17(6)**: 1027-1036

Minamikawa MF, Takada N, Terakami S, et al (2018) Genome-wide association study and genomic prediction using parental and breeding populations of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). Scientific Reports **8**: 11994

Montanari S, Bianco L, Allen BJ, et al (2019) Development of a highly efficient Axiom™ 70K SNP Array for *Pyrus* and evaluation for high-density mapping and germplasm characterization. BMC Genomics **20(1)**:331

Muranty E, Denancé C, Feugey L, et al (2020) Using whole-genome SNP data to reconstruct a large multi-generation pedigree in apple germplasm. BMC Plant Biology **20**:2

Rasheed A, Hao Y, Xia X, et al (2017) Crop Breeding Chips and Genotyping Platforms: Progress, Challenges, and Perspectives. Molecular Plant **10**: 1047–1064.

Vanderzande S, Zheng P, Cai L, et al (2020) The cherry 6+9K SNP array: a cost-effective improvement to the cherry 6K SNP array for genetic studies. Scientific Reports **10**: 7613

Voorrips RE, Bink MCAM, Kruisselbrink JW, et al (2016) PediHaplotyper: software for consistent assignment of marker haplotypes in pedigrees. Molecular Breeding **36**: 119