



Intérêts d'approches génomiques complémentaires pour l'analyse de la diversité génétique fonctionnelle de populations naturelles de Peuplier Noir

C. Bastien¹, V. Jorge¹, V. Segura¹, C. Aluome³, V. Guérin¹, R. El Malki¹, P. PaulStephenRaj², MC. Le Paslier³, A. Berard³, A. Chauveau³, R. Bounon³, D. Brunel³, M. Villar¹, P. Faivre-Rampant²



IUFRO June 2014

¹INRA UR 0588 AGPF, Centre INRA Val de Loire, 2163 avenue de la Pomme de Pin, CS 40001 – Ardon 45075 Orléans, France

²INRA UMR 1165 URGV, 2 rue Gaston Crémieux, 91057 Evry-France

³INRA US 1279 EPGV/CEA/CNG, 2 rue Gaston Crémieux, 91057 Evry, France

Des études génétiques centrées sur *Populus nigra* L.

Diversité en populations naturelles

- Espèce majeure des ripisylves
- Une aire de distribution vaste mais des menaces localement



- Une variabilité importante pour différents traits adaptatifs



Flux de gènes et introgression

Diversité pour les besoins en sélection

P. deltoides X *P. nigra*



- Hétérosis en croisement interspécifique
- Variétés clonales

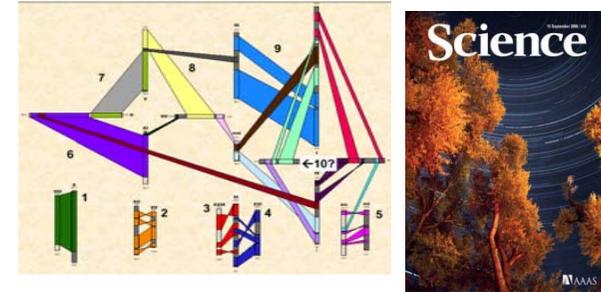
Les ressources génomiques disponibles

- Un génome de référence annoté disponible depuis 2006 pour une espèce proche *P. trichocarpa*

n= 19, taille= 480 Mb, 200kb/cM

Des duplications récentes

Un DL qui décroît très rapidement



- Reséquençages d'EST sur cultivars hybrides
- Banque BAC sur *P. trichocarpa* '101-74'

➔ Des développements de SNP à centrer sur l'espèce *P. nigra* et des génotypages pour différents objectifs

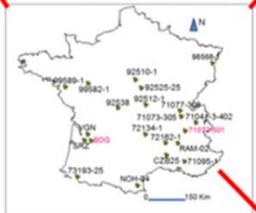
La stratégie choisie



Population d'association
1100 individus



Panel de découverte de SNP
21 individus



Plan factoriel de croisement 5x4 *P. nigra*
937 individus

	SRZ	BDG	71077-308	92510-1
VGN	33	40	40	40
CBZ25	40	39	32	39
71041-3-402		38	12	40
71072-501	40	315	40	
SSC	39	39	33	38

Pédigrée de cartographie
329 individus F1

Bien choisir les panels de diversité

- représenter la diversité génétique géographique et intra-population

1100

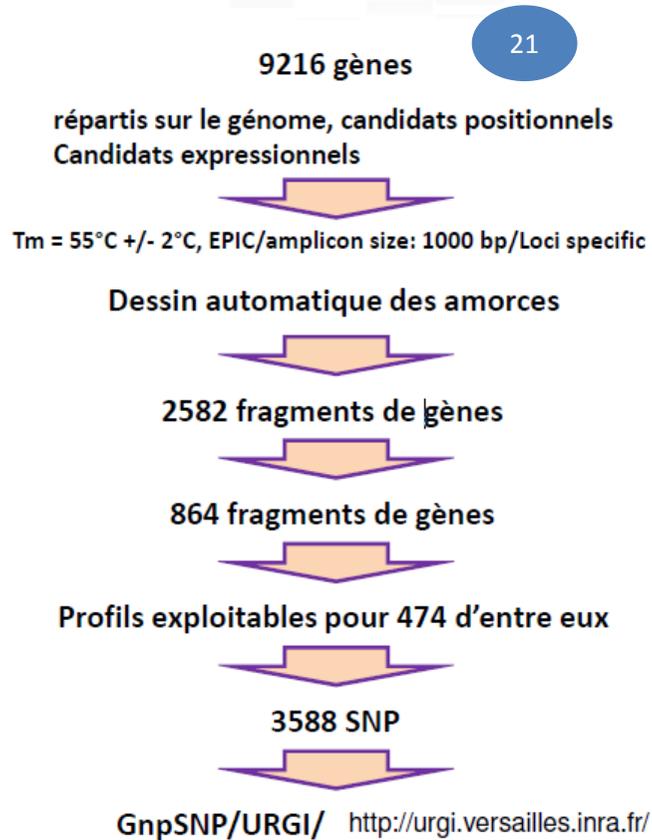
52

21

- Relier populations de cartographies génétiques ⁹, population d'association et population d'entraînement pour la sélection génomique ³⁰

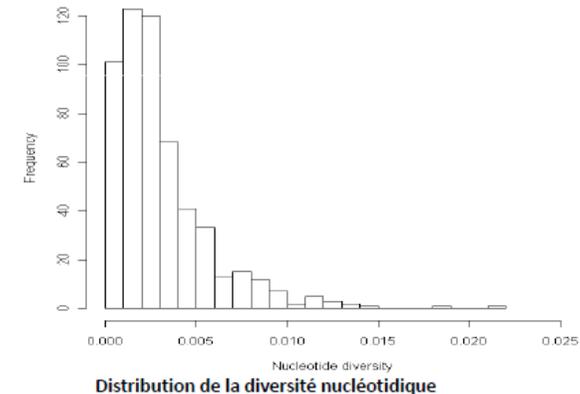
La stratégie choisie

(1) Leçons des re-séquençages SANGER



Alignement sur la séquence de référence
→ des SNP espèces spécifiques

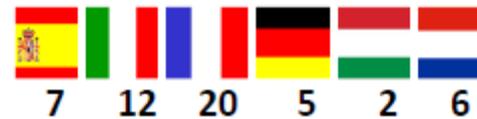
Une diversité nucléotidique moyenne de **0,0037** comparable aux autres espèces du genre *Populus*



La stratégie choisie

(2) Du re-séquençage de génomes entiers

Un panel de **52** individus



GAll analyzer ou Hiseq 2000

Illumina Paired-End sample
protocol

Taille d'inserts : 300-600 bp

Runs pour 75, 100, 110 et 114 cycles

IGA

Udine, Italy

EPGV/IG-CNG

Evry, France

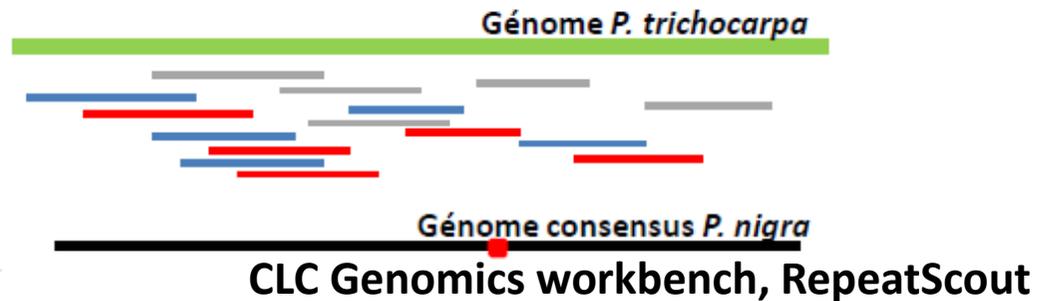
La stratégie choisie

(2) Du re-séquençage de génomes entiers (1)

4 individus *P. nigra*
Re-séquencés à couverture
élevée (>20X)



Obtention d'une
référence *P.nigra*



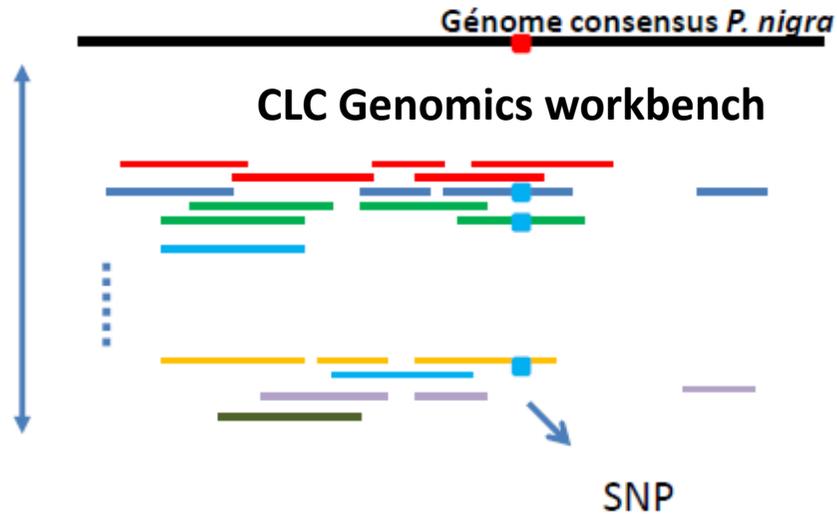
Clones	Gbp mapped	Reference covered (%)	Mean coverage (X)	Mean excluding zero coverage regions (X)
71077-308	~5.9	70	14.2	20.2
BDG	~8.4	77	19.9	25.8
BEN3	~7.1	79	16.9	21.5
POLI	~21.3	79	50.8	64.2

La stratégie choisie

(2) Du re-séquençage de génomes entiers (2)

Obtention d'une référence *P.nigra*

Alignement des séquences de 47 individus *P. nigra* re-séquencés à plus faible couverture ($2 < X < 10$)



- Maximum Coverage = 1.5 the average coverage
 - Minimum coverage = 0.1 to 0.5 the average coverage
 - MAF 35% for 20X, 15% for 2X
- (CLC Genomics workbench)



Genome Browser IGA



La stratégie choisie

(3) Des génotypages à la carte

- Détection d'introggression depuis *P. deltoides* dans les ressources naturelles *P. nigra* → 48-SNPlex Technology Applied Biosystems, EPGV-Evry, SNP Sanger, 0 SNP ds 60b flanquantes

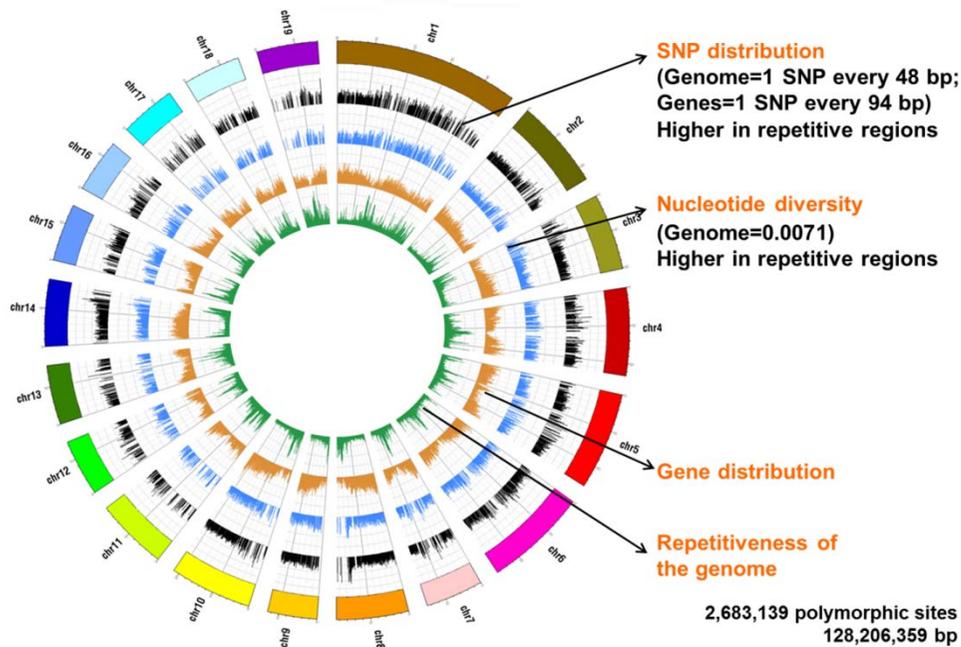
- Compléter un set de marqueurs microsatellites avec des SNP dans un pedigree de cartographie F1 → 96-SNPlex Technologie Applied Biosystems, EPGV-Evry, SNP Sanger, 0 SNP ds 60b flanquantes, unicité des loci

- Etudier la structuration génétique de la population d'association de 1100 individus → 1000 SNP
- Conduire de la génétique d'association dans des régions candidates
- Conduire des études d'association au sein d'un plan de croisement factoriel composé de 320 individus

Illumina Infinium
iSelect HD Custom
BeadChip ,
12000 beads
10331 SNP
EPGV-Evry

Résultats

Détection de SNP par re-séquençage de 52 génomes



SNP classification	# 1	#2	#3	3 clones
Total	~ 6.5 M	~ 6.5 M	~ 7.5 M	~ 7.3 M
<i>P.nigra-P.trichocarpa</i> SNPs	5,3 M	5,1 M	6,0 M	3,9 M
<i>P.nigra-P. nigra</i> SNPs	1,2 M	1,3 M	1,5 M	3,4 M
Genomic fraction covered	72%	75%	76%	80%

17 à 19% des SNP dans les gènes
81 à 83% en dehors des gènes

Validation de SNP NBS/Sanger: 96 164 sur 4 individus

Accuracy = ~100%

Specificity= 100%

False Discovery Rate = 7.6%

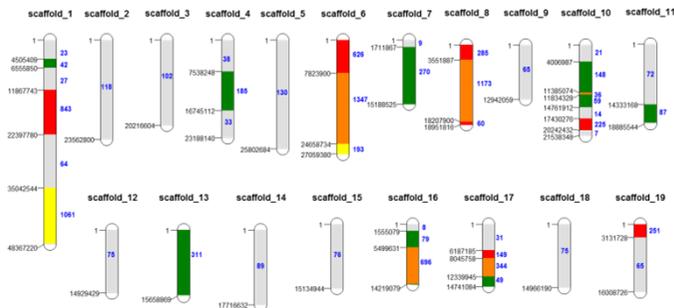
Résultats

Construction de la puce de génotypage 12K beads

Critères liés aux objectifs de génotypage

- Des régions candidates ciblées (QTL, gènes candidats) : 9169 SNP

- Une représentation homogène du génome hors régions ciblées : 1SNP/200kb – 1162 SNP



Critères techniques

- MAF ≥ 0.15 (15%) sur les 47 individus à faible couverture
- Validé sur au moins 1 des 4 individus à couverture $>20X$
- Élimination des SNP dans régions répétées ou dupliquées
- Pas de SNP/indel dans les 2 x 60 bases flanquantes
- Score Illumina $>0,8$ repetitive regions

Témoins au génotypage

51 individus reséquencés
1 témoin par plaque de 96
Témoins : 9 (parents + descendants)

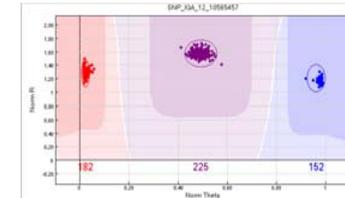
Résultats

Génotypage acquis avec la puce Illumina Infinium 12K beads

Illumina-Genome studio Software : Construction du/des cluster files

Elimination des échantillons avec un call rate < 0.95

Correction et classification du clustering - **nomenclature EPGV**



AUX1

Type	Nombre échantillons	Nombre d'individus
Interplaque	12 + 2	1
Génotypes reséquencés	75	51
Descendants	50	50
Parents	3	3
Individus	1010	1008
Individus éliminés		46
Total	1152	962

SNP commandés	10331
SNP "sur la puce"	9127 (88%)
AUX 1	7793 (85%)
AUX 2	159 (1,7%)
AUX 3	337 (3,6%)
AUX 4	453 (4,9%)
AUX 6	278 (3%)
AUX 7	101 (1,1%)
AUX 8	6 (0,06%)

Résultats

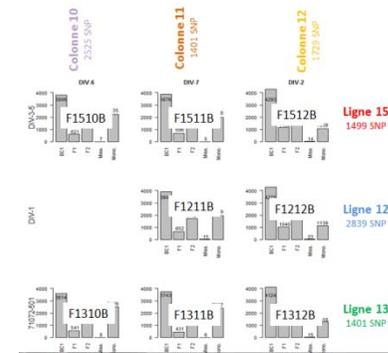
Génotypage acquis avec la puce Illumina Infinium 12K beads

Reproductibilité: témoin plaque (100%- n=12); Div-7 (>99%)

Ségrégation:

608 erreurs/ 411 877 allelic transmissions = 0,15%

Écart à une ségrégation mendélienne (1,65%)



Concordance Sanger-SNP / génotypage:

96%- 99% sur 259 SNP x 10 individus

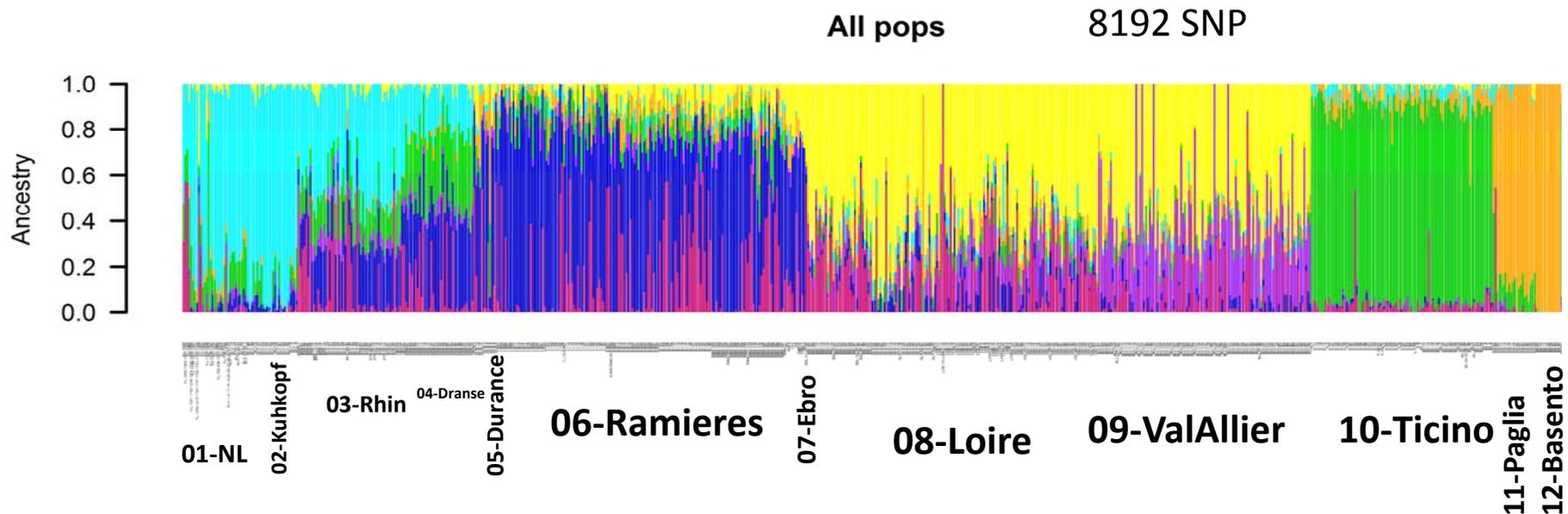
Concordance NGS-SNP / génotypage:

62% - 85% sur 7345 SNP x 16 individus

Erreurs correspondent à SNP_NGS homozygotes et SNP-génotypage hétérozygotes

Résultats

Structuration géographique de la diversité génétique au sein de la population d'association



- ✓ Une structuration moléculaire cohérente avec l'organisation géographique
- ✓ Des populations présentant un niveau d'admixture élevé surtout dans le Nord et l'Ouest
- ✓ Des stucturations proches avec 600, 2000 et 8192 SNPs

Conclusions-Perspectives (1)

1- NGS : Un moyen performant d'identifier des SNP

si une séquence de référence + $X > 10^{-12}$

Des informations à stocker dans des bases de données GniIS

2- NGS : études de variants structuraux en cours

Prédiction génomique, prédiction de l'hétérosis

3- Un assemblage *de novo* pour une référence *P.nigra*

Conclusions-Perspectives (2)

4- Puces de génotypage : des outils à construire à façon

qualité des ADN , coût puce 12K beads: 114 K€/ Point: 0.014 €

Suivi des flux de gènes

Suivi de la diversité dans les unités conservatoires

5- Génotypage haut-débit: des besoins encore plus importants

Génétique d'association avec une approche tout génome

Sélection génomique, mesures d'apparentement

Puce HD multi-espèces vs GBS ?

Puce HD multiespèces vs reséquençage à faible couverture?

Valorisation RNA-Seq transcriptome complet sur 240 génotypes

