

ACCADEMIA NAZIONALE DELLE SCIENZE
detta dei XL

SCRITTI E DOCUMENTI
XLIV

**Trasferimento di geni
dalla specie selvatica *D. villosum* al frumento
per aumentarne l'adattamento ai sistemi agrari sostenibili**

*Risultati ottenuti dalla collaborazione scientifica
tra Università italiane e l'Università della California*

**Transferring genes
from the wild species *D. villosum* to wheat
for increasing adaptation to sustainable agricultural systems**

*Results from the research collaboration between
Italian Universities and the University of California*

a cura di
CIRO DE PACE



ROMA 2011

© Copyright 2011

ACCADEMIA NAZIONALE DELLE SCIENZE DETTA DEI XL
ROMA

ISSN 03-91-4666

ACCADEMIA NAZIONALE DELLE SCIENZE DETTA DEI XL
00161 Roma - Via L. Spallanzani, 7



Convegno per la presentazione dei risultati del progetto:

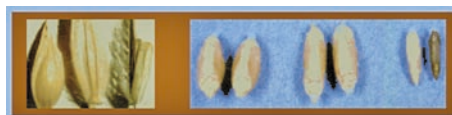
Workshop for the presentation and disussion of the results obtained from the MiPAAF Project:

FRUMIGEN*

Ottimizzazione, diversificazione ed incremento della produttività del frumento tenero: costituzione di anfiploidi e linee derivate da ibridazione intergenerica

Triticum sp. x Dasypyrum villosum

Diversification and optimization of bread wheat productivity through the synthesis of amphiploids and introgression inbred lines from Triticum sp. x Dasypyrum villosum intergeneric hybridization.



La biodiversità del *Dasypyrum villosum* per il miglioramento genetico del frumento e per la tutela dell'ambiente rurale

Role of Dasypyrum villosum in bread wheat genetic improvement and rural landscape ecology



Roma, 8 maggio 2009

**Biblioteca dell'Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL,
Via L. Spallanzani 1/A
Rome, May 8th 2009
*Library of the National Academy of Sciences 'of the Forty'
Via L. Spallanzani 1/A***

* Programma triennale svolto grazie al contributo finanziario da parte del MiPAAF (DM 292/7303/05 del 12/10/2005), ultimato il 30/06/2009, dopo proroga concessa con DM 13533/7303/08 del 21/10/2008.

Research carried-out thanks to the financial contribution of MiPAAF (Italian Ministry for Agricultural Environmental and Forestry Policy (Decree 292/7303/05 issued October 12, 2005)

PATRIZIA VACCINO¹ – TANIA COPPA¹
MARIA CORBELLINI¹ – CIRO DE PACE²

**Aspetti genetico-molecolari e tecnologici
del trasferimento al frumento di geni
del *Dasypyrum villosum****

Summary – Many breeding programs rely on gene transfer from the wild and cultivated secondary gene-pool (GP-2) for trait enhancement, but so far no reports on transfer of bread-making quality-related genes from the wild GP-2 of wheat have been released. In this paper, we used small- and large-scale tests to analyze wheat introgression lines (ILs) derived from *Triticum aestivum* cv “Chinese Spring” (CS) × *Dasypyrum villosum* (L.) Candargy (*Dv*) hybridization. We aimed at ascertaining the efficacy of prolamin subunits encoded by *Dv* genes for the improvement of wheat end-use grain quality. Biochemical and genetic evidences from backcrossing those lines to CS, and the qualitative results obtained from the lines grown for two years at two localities demonstrated that the ascertained positive effects of the *Dv* genes on wheat-flour end-use quality correlate weakly with the size of the introgressed *Dv* chromatin that contained those genes or the protein content of the flour. *Dv* chromatin including genes at the *Glu-V1* locus, coding for high molecular weight glutenins in *Dv*, significantly improves wheat bread-making quality, and chromatin from the short arm of 6V chromosome improves also protein and micronutrient (Fe and Zn) content.

Parole chiave: qualità panificatoria, frumento tenero, gliadine, glutenine, linee di introgressione.

¹ CRA, Unità di Ricerca per la Selezione dei Cereali e la Valorizzazione delle varietà vegetali (SCV), Via Forlani 3, 26866 S. Angelo Lodigiano; +39 0371 211 261; fax: +39 0371 210 372; e-mail: patrizia.vaccino@entecra.it

² Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica, Università degli Studi della Tuscia, Via S. Camillo de Lellis, 01100 Viterbo.

* Paper presented at the Workshop organized for the discussion of the results obtained from the MiPAAF Project: FRUMIGEN, Diversification and optimization of bread wheat productivity through the synthesis of amphiploids and introgression inbred breeding lines from *Triticum* sp. × *Dasypyrum villosum* intergeneric hybridization. Friday May 8th 2009, Library of the National Academy of Sciences “of the Forty”, Scuderie Vecchie di Villa Torlonia, Via L. Spallanzani 1/A, Rome, Italy.

1. INTRODUZIONE

Il miglioramento genetico del frumento, negli ultimi cento anni, ha portato a significativi incrementi di produzione e qualità, mediante la costituzione di nuove varietà con maggiore capacità e stabilità produttiva, resistenza alle malattie e alle condizioni ambientali avverse e con granella qualitativamente più pregiata. Ulteriori miglioramenti sono conseguibili ricorrendo alla variabilità genetica presente in specie affini [9, 16]. Varie sono state le procedure adottate [10], le specie selvatiche del gene-pool secondario (GP-2) di *Triticum* utilizzate per il trasferimento di geni ai frumenti coltivati [25], e le caratteristiche migliorate, con progressi significativi soprattutto nel trasferimento di geni di resistenza a patogeni e parassiti [11]. Proprio in quest'ottica ha preso avvio dal primo gennaio 2006, finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, la ricerca dal titolo "Ottimizzazione, diversificazione e incremento della produttività colturale del frumento tenero mediante la costituzione di nuovi anfiploidi e linee derivate da ibridazione intergenerica" nell'ambito del Progetto FRUMIGEN.

L'obiettivo generale perseguito è quello della preparazione e caratterizzazione di nuove linee omozigoti derivanti da ibridazione interspecifica tra frumento esaploide e specie del GP-2 di *Triticum*, tra le quali *T. kicharae*, *T. timopheevii*, e *Dasypyrum villosum* Candargy (*Dv*), mediante le metodiche tradizionali di incrocio, al fine di identificare quelle idonee a diventare future varietà coltivate in virtù dei geni utili introgressi dalla specie selvatica. *Dv* è una specie selvatica ruderale, adattata in habitat contigui a quelli dei campi coltivati, come i bordi di sentieri, strade, ed aree seminaturali; è una specie diploide, con genoma VV, e possiede geni che, quando trasferiti in specie esaploidi e tetraploidi di *Triticum*, determinano l'espressione di resistenza a patogeni fungini [13, 26], tolleranza a stress idrico e salino (G.-Yuan Zhong and C.O. Qualset, dati non pubblicati), e da metalli pesanti [3], e aumentano la complessità biochimica del metabolismo cellulare [6]. Per tali caratteristiche *Dv* è stato utilizzato in incroci con varie specie del genere *Triticum* [8, 12, 31]. Il genoma di *Dv* è omeologo con quello dei frumenti coltivati [19, 24, 32]. In particolare, sul cromosoma 1V di *Dv* sono localizzati i loci *Glu-V1*, omeologo al *Glu-1*, codificante per glutenine ad alto peso molecolare (HMW), *Gli-V1*, omeologo a *Gli-1*, codificante per omega- e gamma-gliadine, e *Glu-V3*, omeologo a *Glu-3*, codificante per glutenine a basso peso molecolare. Sul braccio corto del cromosoma 6V è poi localizzato il locus *Gli-V2*, omeologo a *Gli-2*, e sul braccio lungo del cromosoma 4V il locus *Gli-V3*, entrambi codificanti per gliadine di tipo alfa [2, 7, 18, 24, 32].

L'effetto sulla qualità del frumento di geni trasferiti da *Dv* è stato per la prima volta valutato da De Pace *et al.* [7], che hanno dimostrato un significativo aumento del volume di sedimentazione in SDS in linee di frumento con un cromosoma chimerico costituito dal braccio corto e da una parte del lungo (comprendente il locus *Glu-V1*) dell'1V e dalla restante parte del braccio lungo proveniente dal cromo-

soma 1B. Ad oggi non sono noti casi di miglioramento della qualità panificatoria utilizzando specie selvatiche del GP-2 di *Triticum* esaploidi.

Nel presente lavoro linee di frumento derivanti dalla cv Chinese Spring, con quantità diversa di cromatina introgressa da *Dv*, sono state valutate in prove replicate in ambienti diversi per gli aspetti genetici e tecnologici, correlando in particolare l'effetto dei loci codificanti per le prolamine di *Dv* con la qualità panificatoria.

2. MATERIALI e METODI

2.1. *Materiali*

Sono state valutate sei linee di introgressione (IL) ottenute da ibridazione intergenerica fra la cv Chinese Spring (CS) di *T. aestivum* e un ecotipo laziale di *Dv*, seguita da una generazione di reincrocio con CS (BC_1F_1), due generazioni di autofecondazione (BC_1F_2 to BC_1F_3), cinque generazioni di discendenza da singola spiga (da S_4 a S_8) e quattro generazioni di incremento di seme (linee S_{12}). Le linee S_{12} riferibili a piante S_4 diverse (ad esempio $04.CS \times V63$ e $14.CS \times V63$) sono state identificate come gruppo S4D di linee IL. Le linee S_{12} derivate dalla stessa pianta S_4 sono considerate 'sorelle' entro ciascun gruppo S4D, e sono state indicate linee S4S. La IL CS 1B-1V è l'unico membro del suo gruppo S4D e non ha linee S4S. CS è stata scelta come controllo ed è stata considerata come un ulteriore gruppo S4D composto da 1 sola linea S4S. I dettagli sulla nomenclatura e la configurazione cromosomica delle linee sono riportati nella tab. 1.

Nelle campagne agrarie 2005/2006 e 2006/2007 le IL sono state allevate in due ambienti: i campi sperimentali del CRA-SCV, S. Angelo Lodigiano, Lodi (SAL), e l'Azienda Didattico Sperimentale dell'Università degli Studi della Tuscia (Viterbo) (VT). Le parcelle vennero disposte in uno schema di campo a blocchi randomizzati (ogni blocco era costituito da sei file di lunghezza di 1.50 m) con due repliche. Ciascuna delle combinazioni tra linee S4D, S4S, località, anno e replica, verrà indicato come trattamento.

Sono state analizzate anche tre progenie $BC_2F_{3,2}$ derivate da cariossidi BC_2F_2 ottenute dalle seguenti BC_2F_1 : $CS \times (CS \times V63)$, $CS \times 09.CS\ 1B-1V$, e $CS \times (CS \times V58)$, quest'ultima in sostituzione della $BC_2F_1\ CS \times CS \times V60$ non disponibile. La IL $CS \times V58$ presenta lo stesso numero cromosomico, la stessa precocità di spigatura, e lo stesso pattern gliadinico e di introgressione criptica di $CS \times V60$ [5].

2.2. *Analisi delle proteine di riserva*

Campioni di 30 mg di sfarinato sono stati incubati con 100 μ L di etanolo 70% per 1h a temperatura ambiente. Dopo centrifugazione a 12,000 rpm per 5 min, il surnatante, contenente la frazione gliadinica, è stato miscelato con ugual volume di una soluzione contenente 60% (w/v) glicerolo, 0,005% (w/v) pironina G, e frazio-

TAB. 1 – Lista dei genotipi analizzati. La configurazione cromosomica è in accordo con Raupp *et al.* [30] (<http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/nomenclature.html>).

Genotipi	Numero cromosomi	Configurazione cromosomica	Referenze e commenti
04.CS × V63: linea di addizione disomica 6V#4 CS- <i>Dv</i>	44	21" + 1" 6V#4	Minelli <i>et al.</i> [23]
14.CS × V63	44		Linea sorella di 04.CS × V63
33.CS × V32: linea di sostituzione disomica 6V#4 CS- <i>Dv</i>	42	20" + 1" 6V#4 (6B CS)	Minelli <i>et al.</i> [23]
34.CS × V32	42	»	Linea sorella di 33.CS × V32
16.CS × V60	42	21"	Caceres <i>et al.</i> [4]
21.CS × V60	42	»	Linea sorella di 16.CS × V60
09.CS 1B-1V: linea con scambio intercalare 1B-1V#4 CS- <i>Dv</i> con rottura non-centromerica	42	20" + 1" E 1BL-1V#1L•1V#1S	De Pace <i>et al.</i> [7] Minelli <i>et al.</i> [23]
CS: Chinese Spring	42	21"	

nato mediante elettroforesi in gel di acrilamide in tampone acido (Acid-PAGE; pH 3.1) [28]. Il pellet, contenente la frazione gluteninica, è stato risospeso in 750 µL di tampone di estrazione (57 mM Tris HCl, pH 6,8, 2% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), 8,5% glicerolo, 0,008% (w/v) pironina G, 5% 2-mercaptoetanolo) e incubato per 1,5 h a temperatura ambiente e successivamente per 30 min a 80°C. Dopo centrifugazione a 12.000 rpm per 15 min, le subunità gluteniniche sono state frazionate mediante SDS-PAGE 12,5% [27].

L'analisi comparativa dei profili elettroforetici delle IL e di CS ha consentito l'identificazione dei blocchi prolamminici codificati ai loci *Gli-1*, *Gli-2*, *Glu-1* e *Glu-3* di CS, come riportato da Metakovsky [22] e Singh *et al.* [33]. I frammenti non assegnati a CS sono stati attribuiti ai putativi omeoloci di *Dv* introgressi nelle IL. Per assegnare ogni frammento a uno specifico blocco, sono state analizzate per ciascuna BC₂, le cariossidi BC₂F_{3,2} prelevate da 5-6 diverse piante BC₂F₂.

2.3. Analisi qualitative

Minitest. Questi si basano su quantitativi ridotti di granella. Dalle cariossidi ottenute da ogni trattamento è stato prelevato un campione di 30g e prima di sot-

toporlo a macinazione in mulinetto Cyclotec (Tecator) equipaggiato con griglia da 1-mm, è stato valutato il peso delle 1000 cariossidi (TKW). Sullo sfarinato integrale sono stati determinati i seguenti parametri: contenuto proteico (PC; metodo AACC 39-10) [1], volume di sedimentazione in SDS (SSV) [29], volume di sedimentazione specifico, SSSV, calcolato come rapporto tra SSV e PC. Tutte le analisi sono state effettuate in doppio per ciascuna ripetizione di ogni località.

Macrotest. Dopo aver riunito la granella delle due repliche di ogni linea valutata nel 2007 per ciascuna località, è stato prelevato un campione di circa 800 g di granella che è stato macinato mediante mulino sperimentale Bona 4RB (Bona). La farina ottenuta è stata sottoposta ad analisi farinografica (ICC 115-D) [14] e a test di panificazione (AACC 10-10B) [1].

2.4. *Analisi statistica*

I risultati delle analisi qualitative sono stati analizzati mediante ANOVA, considerando il genotipo, la località, la stagione di crescita e le loro interazioni come effetti fissi. Le differenze tra repliche entro località e stagione di crescita sono state considerate come componenti della varianza residua, comprese le interazioni a tre vie quando non significative [34]. La fonte di variazione dovuta ai genotipi ha una struttura complessa, dovuta alla suddivisione delle IL in S4D and S4S. Poiché tale struttura non era bilanciata, la fonte di variazione dovuta ai genotipi è stata suddivisa in “tra linee S4D” e “tra linee S4S entro S4D” e analizzata mediante ANOVA e GLM (Generalized Linear Model) [17]. L’assenza di significatività per la varianza tra linee S4S per i caratteri qualitativi semplici ha suggerito di usare solo una di ciascuna linea sorella per le analisi tecnologiche più complesse (farinografo e test di panificazione).

3. RISULTATI

3.1. *Analisi elettroforetica*

3.1.1. Linea CS × V63

Nella fig. 1 viene riportato il profilo della linea CS × V63. In tale linea è evidente l’assenza delle subunità ω- e γ-gliadiniche codificate al locus *Gli-B1*, accompagnata dalla comparsa di sei bande non appartenenti a CS (2v, 4v, 5v, 7v, 11v e 13v). Lo studio della segregazione dei blocchi prolamminici nelle progenie F₃, derivate dall’incrocio CS × (CS × V63) (fig. 4A) ha consentito di assegnare i frammenti non appartenenti a CS a geni presenti al putativo locus complesso *Gli-V1* trasferito da *Dv*. Tale risultato è confermato dall’osservazione del pattern delle glutenine a basso peso molecolare (LMW, fig. 1B): le bande 2b, 4b e 5b di CS, codificate al locus *Glu-B3*, strettamente associato al *Gli-B1*, nella linea CS × V63 scompaiono, sostituite dalle bande 2v, 3v e 4v, codificate da geni putativi al locus corrispondente

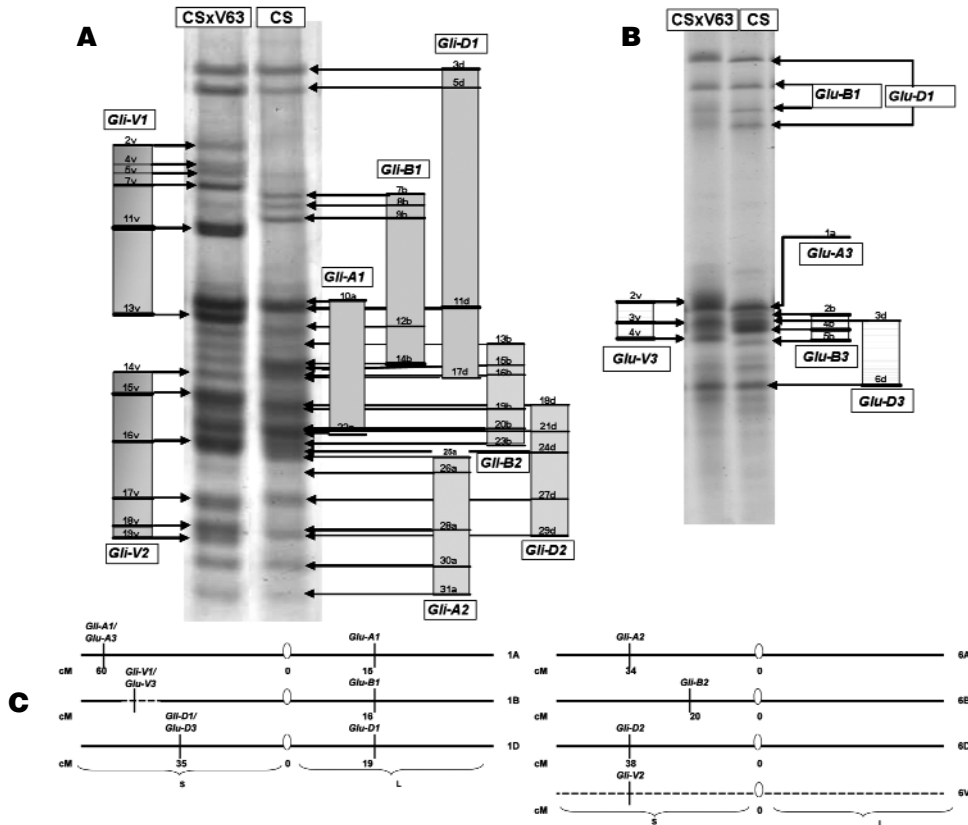


Fig. 1. Separazione mediante A-PAGE delle gliadine (A) e mediante SDS-PAGE delle glutenine (B) della linea di introgressione CS×V63 e di CS. I blocchi prolaminici codificati ai loci *Gli* e *Glu* di CS sono schematizzati alla destra di ciascun patter elettroforetico; i blocchi codificati ai loci di *D. villosum* alla sinistra. Le regioni corrispondenti alle ω -, γ -, α/β -gliadine e alle glutenine ad alto e basso peso molecolare (HMW-GS, LMW-GS) sono indicate alla sinistra. (C) Rappresentazione schematica dei loci analizzati sui cromosomi dei gruppi omeologhi 1 e 6 nella linea CS×V63. Le distanze di mappa riportate derivano da GrainGenes (<http://wheat.pw.usda.gov>).

di *Dv*, *Glu-V3*. Nella regione delle gliadine di tipo α/β , i frammenti da 14v a 19v, che segregano come blocco nella progenie F_3 da CS×(CS×V63) sono stati assegnati a geni codificati al locus *Gli-V2*, putativo omologo a *Gli-B2* sul cromosoma 6V di *Dv*. Lo schema risultante dei loci codificanti per le principali prolamine nella linea CS×V63 è riportato nella fig. 1C, dove le parti tratteggiate rappresentano le parti di cromosoma di frumento nel quale si è integrata la cromatina omeologa di *Dv*.

3.1.2. Linea CS × V32

Nella fig. 2A è riportato lo schema dei loci prolaminici nei cromosomi dei gruppi omeologici 1 e 6 di tale linea. Tale schema è compatibile con quanto osservato nel pattern gliadinico e gluteninico di tale linea (suppl. fig. S1-a in Vaccino *et al.*, [36]). La contemporanea presenza di glutenine LMW codificate al locus *Glu-B3* e di un nuovo polipeptide LMW (banda 4v) suggerisce la presenza di geni *Glu-V3* in conseguenza di un probabile doppio crossing-over ineguale 1B-1V avvenuto in stretta prossimità degli omeoloci *Gli-B1/Glu-B3* in 1B e del locus *Glu-V3* in 1V. Uno dei risultati attesi di questo evento è la formazione di un cromatidio che contiene nella porzione 1BS i loci *Gli-B1/Glu-B3/Glu-V3*; Tale cromatidio è poi diventato il cromosoma 1B di CS × V32. La presenza contemporanea dei suddetti tre loci è dimostrata dalla presenza delle ω -gliadine codificate da *Gli-B1*, delle glutenine LMW codificate da *Glu-B3*, e da una glutenina LMW (banda 4v in fig. S1-b) codificata dal putativo locus *Glu-V3*. La presenza di nuovi polipeptidi α/β gliadinici (bande 14v, 15v, 16v, 17v, 18v, e 19v in fig. S1-a) e l'assenza delle α/β -gliadine codificate dai geni nel locus *Gli-B2* (bande 13b, 15b, 16b, 19b, 20b, e 23b, fig S1-a) è compatibile anche con la presenza del locus *Gli-V2* come conseguenza della sostituzione del cromosoma 6B con il cromosoma 6V.

In questa linea si è osservata anche la presenza di ω -gliadine (bande 1d, 2d, 4d, e 6d di fig. S1-a) con mobilità simile a quelli codificati dall'allele *Gli-D1g* sul braccio corto del cromosoma 1D di "Cheyenne". Poiché viene esclusa la possibilità che tale allele fosse presente nel genoma del CS parentale usato nell'ibridazione e reincrocio dai quali è stata poi estratta la linea CS × V32, si pensa che tale allele si sia formato per una mutazione occorsa nelle prime generazioni dopo ibridazione. La forma di tale allele mutato presente in CS × V32 è stata indicata *Gli-D1g-like*. Il locus strettamente associato, *Glu-D3*, è risultato inalterato rispetto a CS. Nel gruppo omeologo 6 viene confermata l'osservazione citologica della sostituzione del cromosoma 6B con il 6V, dovuta alla scomparsa del blocco codificato al locus *Gli-B1* e alla contemporanea comparsa del blocco, già identificato nella linea CS × V63, codificato al locus *Gli-V1*.

3.1.3. Linea CS × V60

Nella fig. 2B è rappresentato lo schema dei principali loci prolaminici analizzati nella linea CS × V60. Il pattern gliadinico e gluteninico LMW (suppl. fig. S2-a in Vaccino *et al.*, [36]) suggerisce la presenza in questa linea della sostituzione del locus *Gli-B1* con il *Gli-V1* di *Dv* sul braccio corto del cromosoma 1B. In questo caso la sostituzione si estende al locus strettamente associato *Glu-B3*, sostituito dal corrispondente *Glu-V3* di *Dv*. Anche in questo caso un doppio evento di ricombinazioni avvenuto nelle adiacenze dei loci *Gli-B1/Glu-B3* e *Gli-V1/Glu-V3* dopo appaiamento 1B-1V, spiegherebbe la sostituzione che determina il pattern prolaminico osservato. Inoltre, in questa linea, come per la linea CS × V32, si osserva

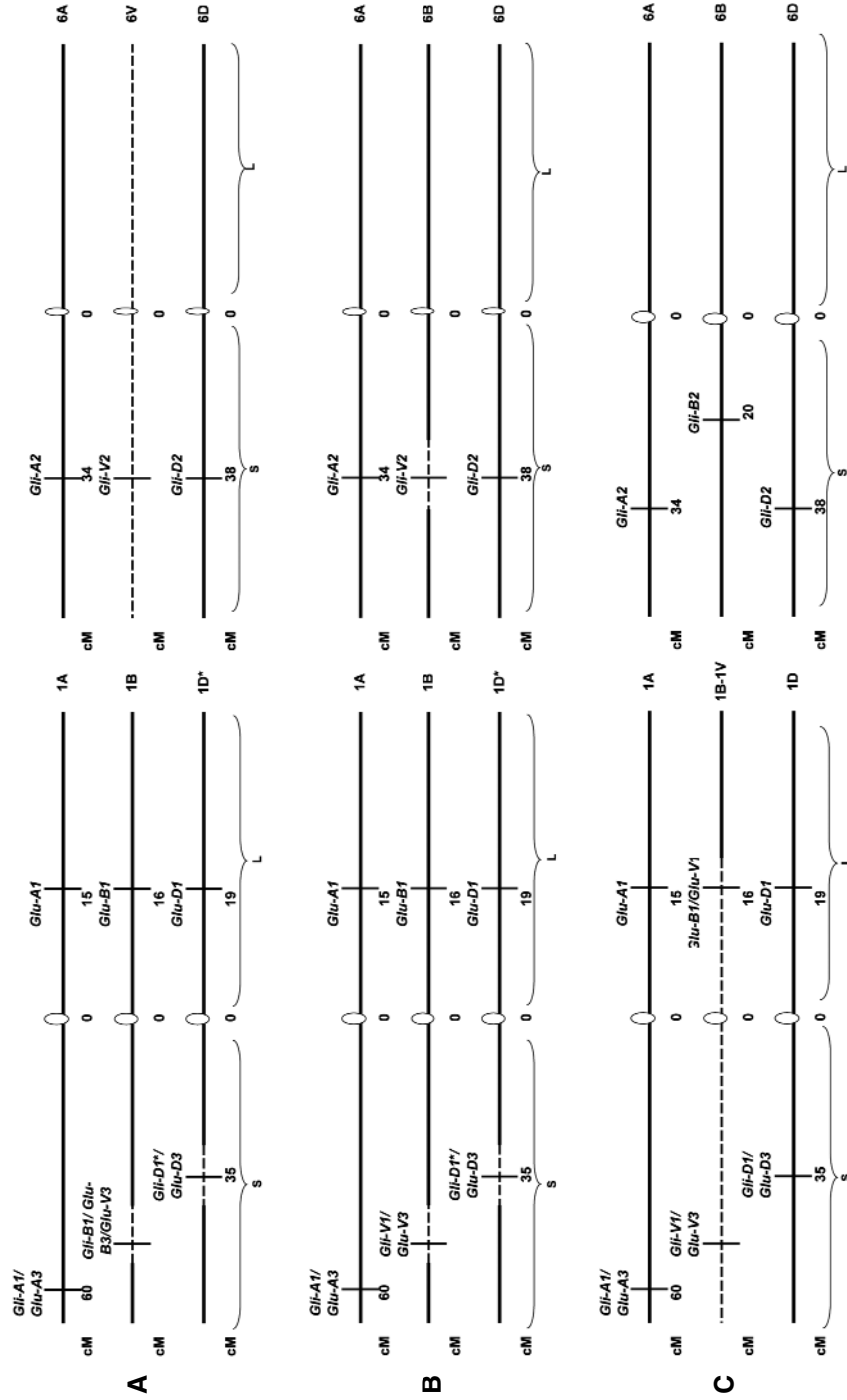


Fig. 2. Rappresentazione schematica dei loci prolaminici analizzati sui cromosomi dei gruppi omologhi 1 e 6 nella linea CS x V32 (A), CS x V60 (B) e 09.CS 1B-IV (C).

il pattern caratteristico delle ω -gliadine di “Cheyenne”, suggerendo che l’allele mutato *Gli-D1g-like* sul cromosoma 1D sia stato ereditato anche da CS $\times$ V60. Poiché le due linee fanno parte di due diverse S4D separate sin dalla generazione S4 (ved. Mat. & Met.), ciò consente di ribadire l’ipotesi che l’evento di alterazione al locus *Gli-D1* sia avvenuto subito dopo l’originale ibridazione CS $\times$ Dv. Per quanto riguarda le gliadine di tipo α/β , si osserva la sostituzione di quelle codificate dal locus *Gli-B2* con le corrispondenti codificate al locus *Gli-V2* di Dv trasferito per ricombinazione sul cromosoma 6B.

3.1.4. Linea CS 1B-1V

Le principali variazioni osservate in tale linea, rispetto a CS riguardano la presenza della banda gluteninica 1v tra le due codificate da geni al locus *Glu-B1*, la mancanza delle bande gliadiniche codificate al locus *Gli-B1* e l’assenza delle bande gluteniniche LMW codificate al locus *Glu-B3* (Suppl. fig. S3 a e b in Vaccino *et al.* [36]). Per contro, compaiono nuovi polipeptidi gliadinici e gluteninici LMW che verosimilmente sono determinati dai loci *Gli-V1/Glu-V3*. Poiché E.R. Sears (1987 com. pers.) aveva ipotizzato per tale linea la presenza di una ricombinazione 1B-1V che poi è stata confermata da analisi citologiche GISH [23], allora il pattern prolaminico osservato in tale linea è in linea con la presenza di un cromosoma ricombinante 1B-1V. In particolare, deve essersi verificato durante la profase della meiosi dell’ibrido interspecifico frumento $\times$ Dv, un crossing-over ineguale 1B-1V nelle adiacenze degli omeoloci *Glu-B1* e *Glu-V1*, rispettivamente sui bracci cromosomici 1BL e 1VL, originando dapprima un cromatidio ricombinante e poi un cromosoma ricombinante 1VS-1VL-1BL, determinando la concatenazione dei loci *Glu-B1/Glu-V1* (fig. 2C).

La comparsa di nuovi polipeptidi ω -gliadinici in 8 bande non presenti in CS e la scomparsa delle ω -gliadine di CS (suppl. fig. S3-a in Vaccino *et al.* [36]), indicano l’assenza del locus *Gli-B1* e la presenza del locus *Gli-V1*; la sostituzione *Glu-B3* da parte di *Glu-V3* la si deduce dal pattern delle glutenine LMW (fig. S3-b). Il numero e la posizione delle bande contenenti i polipeptidi codificati ai loci *Gli-V1/Glu-V3* e *Glu-V1* indicano che gli alleli a tali loci sono diversi rispetto a quelli individuati a loci omologhi nelle altre linee IL indagate. Questo è un risultato atteso poiché l’ecotipo di Dv utilizzato nell’incrocio iniziale che ha consentito la estrazione della linea CS 1B-1V è diverso da quello utilizzato per l’ottenimento delle linee CS $\times$ V63, CS $\times$ V32 e CS $\times$ V60. L’allele al locus *Glu-V1* che determina la presenza del polipeptide nella banda 1v a livello di glutenine ad alto peso molecolare, in aggiunta al pattern di CS, è stato indicato *Glu-V1a* da De Pace *et al.*, [7]. È interessante notare che, analizzando due coppie di linee isogeniche per costituzione prolaminica (ID 769 e ID772), nelle quali i membri di ciascuna coppia differivano solo per la presenza/assenza del polipeptide 1v, si sia potuto osservare come il volume di sedimentazione della linea con il polipeptide 1v sia risultato sempre maggiore di quello

della linea nella quale il frammento è assente (73 mL rispetto a 46 mL per la linea ID769, 66 mL rispetto a 56 mL per ID 772; fig. 3).

3.2. Analisi qualitativa

I valori dei principali caratteri qualitativi valutati nei minitest sono riportati nella tab. 2. I valori di TKW sono compresi fra 21.8 g per la linea 33.CS×V32 a SAL e 40.8 g per la linea 21.CS×V60 a SAL. La stagione 2005-06 ha fatto registrare un valore medio di tale parametro superiore di circa il 20% rispetto alla stagione 2006-07. Per quanto riguarda il contenuto proteico, esso varia dal 14.5 al 14.9% per le linee senza il cromosoma 6V (CS, CS×V60 and CS 1B-1V) e dal 17.2 al 18.6% per le linee con tale cromosoma (CS×V32 e CS×V63). Per questo carattere, la variazione più ampia si è registrata tra stagioni di crescita per entrambe le località, con valori superiori per circa 20% nel 2006/2007. Nei cereali è ben nota la correlazione negativa tra contenuto proteico e peso del seme, tuttavia è interes-

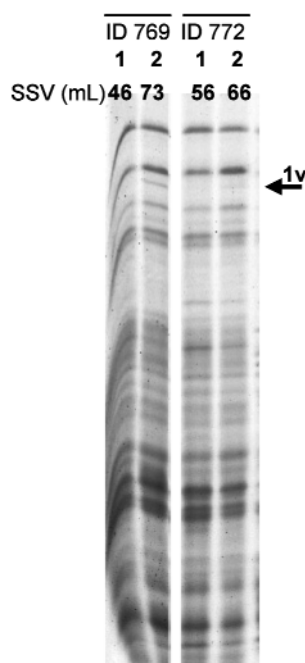


Fig. 3. Separazione mediante SDS-PAGE delle glutenine da due coppie di linee isogeniche, ID769 e ID772, derivate dall'incrocio CS×09.CS 1B-1V. Ogni coppia si differenzia per presenza/assenza del frammento 1v (freccia), codificato dal locus *Glu-V1* di *Dv*. Sopra ad ogni pattern è riportato il valore del volume di sedimentazione in SDS (SSV) ottenuto dalle farine corrispondenti.

TAB. 2 – Valori medi rilevati nei genotipi analizzati per i seguenti caratteri qualitativi: peso 1000 semi (TKW), contenuto proteico (PC), produzione per pianta (GYP), volume di sedimentazione in SDS (SSV), volume di sedimentazione specifico (SSSV). I valori riportati sono ottenuti dal raccolto delle campagne agrarie 2005-2006 e 2006-2007, in due località (S. Angelo Lodigiano, SAL, e Viterbo, VT).

Genotipo	TKW (g)		PC (% ss)		GYP (g)		SSV (mL)		SSSV (SSV/PC)						
	Località		Località		Località		Località		Località						
	SAL	VT	SAL	VT	SAL	VT	SAL	VT	SAL	VT					
04.CS×V63	26.7	26.9	26.8	18.3	18.7	18.5	3.2	1.8	2.5	46.3	48.0	47.1	2.5	2.6	2.6
14.CS×V63	24.4	26.1	25.3	18.8	18.4	18.6	2.7	1.9	2.3	45.5	58.0	51.8	2.4	3.2	2.8
33.CS×V32	21.8	24.4	23.1	16.6	17.8	17.2	2.9	2.0	2.5	67.3	59.8	63.5	4.0	3.4	3.7
34.CS×V32	24.0	30.8	27.4	17.2	17.7	17.5	2.5	2.0	2.2	70.3	70.0	70.1	4.1	4.0	4.0
16.CS×V60	35.6	33.9	34.8	14.7	14.9	14.8	4.0	3.1	3.6	62.5	53.8	58.1	4.2	3.6	3.9
21.CS×V60	40.8	36.6	38.7	14.2	15.3	14.7	4.9	3.5	4.2	55.3	58.0	56.6	3.9	3.8	3.8
09.CS 1B-1V	26.5	29.4	28.0	14.3	15.5	14.9	2.8	2.4	2.6	62.8	69.3	66.0	4.4	4.5	4.4
CS	28.4	30.6	29.5	13.9	15.1	14.5	2.9	2.4	2.6	40.5	42.3	41.4	2.9	2.8	2.9
Media	28.5	29.8	29.2	16.0	16.7	16.3	3.2	2.4	2.8	56.3	57.4	56.8	3.6	3.5	3.5
LSD †	3.3			0.8			0.6			5.8			0.3		
Campagna agraria															
2006	35.9	30.9	33.4	14.7	14.8	14.8	4.3	2.1	3.2	50.4	53.9	52.2	3.5	3.7	3.6
2007	21.2	28.8	25.0	17.3	18.5	17.9	2.2	2.7	2.4	62.1	60.9	61.5	3.6	3.3	3.5
Media	28.5	29.8		16.0	16.7		3.2	2.4		56.3	57.4		3.6	3.5	
LSD ‡	1.7			0.4			0.3			2.9			0.2		

sante notare nel nostro caso che, nonostante una differenza non significativa per produzione (GYP), le linee 34.CS×V32 e 09.CS 1B-1V hanno un peso dei semi simile, ma contenuto proteico significativamente differente (17.5 vs 14.9 %), e che le linee CS×V32 and CS×V63 abbiano un peso dei semi in media del 15% inferiore rispetto a CS ma un contenuto proteico superiore per circa il 24%. Per quanto riguarda il volume di sedimentazione, la coppia di linee sorelle CS×V63 (47.1 mL and 51.8 mL) e CS (41.4 mL) hanno fatto registrare i valori minori in entrambe le località, mentre tutte le altre linee hanno valori superiori a 58 mL.

Poiché il livello di significatività delle fonti di variazione è risultato analogo sia dopo ANOVA che GLM, in tab. 3 vengono riportati soltanto i risultati ottenuti dall'ANOVA. I fattori 'genotipo', 'stagione' e la loro interazione sono le fonti di variazione più significative. Per tutti i parametri, ad eccezione di SSSV, è risultato significativo l'effetto della stagione di crescita. Le differenze tra località sono risultate una debole fonte di variabilità, significativa solo per contenuto proteico e produzione per pianta. Inoltre, mentre la fonte di variazione dovuta alle linee di introgressione (S4D) è risultata significativa, non è significativa la fonte di variabilità entro linee sorelle (S4S).

L'interazione di primo ordine tra le fonti di variazione è risultata significativa per quasi tutti i caratteri, ma la loro varianza è almeno di nove volte superiore alla varianza residua.

I valori scaturiti dai macrotest qualitativi sono riportati nella tab. 4. Tutte le linee hanno fatto registrare buoni valori dei parametri farinografici, ad eccezione della 04.CS×V63. I valori delle linee 34.CS×V32, 09.CS 1B-1V e 16.CS×V60 sono risultati superiori a quelli di CS. La 09.CS 1B-1V è risultata la linea migliore, comparabile e anche superiore al testimone commerciale. Tutte le linee danno pane migliore di CS, tranne 04.CS×V63 a SAL. A SAL, le linee 34.CS×V32, 16.CS×V60 e 09.CS 1B-1V hanno volume del pane molto superiore a quello ottenuto da CS e comparabile o migliore dello standard (fig. 4). Le differenze sono state analizzate mediante test F (tab. 4B). Le differenze per il volume del pane non sono risultate significative; tuttavia, la varianza dei genotipi è di circa 20 volte superiore a quella delle località, e quasi tre volte superiore all'errore.

4. DISCUSSIONE

Nel presente lavoro è stata dimostrata la capacità, da parte della cromatina di *Dv* introgressa in frumento tenero, di migliorare non solo il contenuto proteico, ma anche la qualità panificatoria. Inoltre è stato dimostrato come gli effetti positivi dell'introgressione di cromatina di *Dv* in frumento tenero siano poco o affatto condizionati dalla località o dalla stagione di crescita.

Il contenuto proteico delle ILs non influenza la qualità panificatoria, in accordo a quanto già osservato da Mansur *et al.* [21]. Un QTL per contenuto proteico, *Gpc-B1*, è stato mappato sul braccio cromosomico 6BS di LDN (DIC6B),

T_{AB. 3} – ANOVA multifattoriale per i seguenti caratteri qualitativi: peso 1000 semi (g; TKW), contenuto proteico (% ss; PC), produzione per pianta (g; GYP), volume di sedimentazione in SDS (mL; SSV), volume di sedimentazione specifico (SSV/PC; SSSV) registrati per i genotipi in esame, allevati per due stagioni agrarie (2005-2006 e 2006-2007) in due località (S. Angelo Lodigiano, SAL, e Viterbo, VT).

Fonte di variazione	gl	TKW			PC			GYP			SSV			SSSV		
		MS [†]	F [#]	P of F [§]	MS	F	P of F	MS	F	P of F	MS	F	P of F	MS	F	P of F
Genotipi linee S4D [¶] linee S4S #	7	210.38	19.41	**	25.35	40.18	**	3.93	12.20	**	761.03	23.14	**	3.68	31.78	**
	4	347.50	32.78	**	44.28	70.17	**	6.41	18.26	**	1264.30	38.44	**	6.28	54.24	**
	3	27.54	2.54	NS	0.12	0.18	NS	0.64	1.82	NS	90.04	2.74	NS	0.21	1.84	NS
	1	27.84	2.57	NS	7.22	11.44	**	11.70	33.36	**	19.14	0.58	NS	0.08	0.71	NS
Località	1	1133.90	104.61	**	157.19	249.07	**	8.73	24.89	**	1396.90	42.47	**	0.14	1.22	NS
Stagione	1															
Genotipo × Località	7	21.87	2.02	NS	0.73	1.16	NS	0.31	0.96	NS	95.85	2.91	*	0.39	3.36	**
Genotipo × Stagione	7	21.95	2.03	NS	2.65	4.21	**	0.55	1.69	NS	249.46	7.58	**	0.30	2.57	*
Località × Stagione	1	623.81	57.55	**	5.01	7.93	**	31.64	98.12	**	87.89	2.67	NS	0.98	8.47	**
Varianza residua	39	10.84			0.63			0.32			32.89			0.12		
Totale	63															

[¶] Variazione assegnata alle linee S4D più CS

[#] Variazione tra linee S4S entro S4D

TAB. 4 – Medie (A) e ANOVA (B) per cinque caratteri relativi alla qualità panificatoria. I genotipi sono quattro linee di introgressione e la cv Chines Spring (CS), coltivati in due località (S. Angelo Lodigiano, SAL, e Viterbo, VT), durante la campagna agraria 2006-2007.

		Farinografo di Brabender						Test di panificazione											
Genotipi		Assorbimento. (%)		Tempo di sviluppo (sec)		Stabilità (min)		Caduta (BU)		Tempo di miscel (sec)		Volume pane (cm³)							
		Mean	SE†	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE						
A	04.CS×V63	63.6	0.20	97	29.0	1.1	0.50	262.0	33.00	67.0	7.00	518	162.5						
	34.CS×V32	61.2	0.30	249	51.0	13.1	4.00	21.5	19.50	107.5	2.50	797	43.0						
	16.CS×V60	58.9	1.50	186	6.0	12.8	5.60	38.0	25.00	112.5	0.50	798	12.5						
	09.CS 1B-1V	58.1	1.15	414	54.0	14.1	2.85	18.5	18.50	144.0	4.00	785	45.0						
	CS	58.6	0.25	144	18.0	6.9	2.15	64.0	8.00	94.5	2.50	605	5.0						
	LSD*	3.2		97		7.5		36.1		17.0		122							
	Farina std. commerciale	61.5		336		14.2		39.0		180.0		835							
Località	SAL	60.5	0.94	189	49.0	6.6	1.84	101.6	48.79	104.4	14.12	687	94.0						
	VT	59.6	1.24	247	62.5	12.6	3.21	60.0	43.45	105.8	11.05	714	31.1						
LSD*		2.0		62		4.8		22.8		10.77		76.9							
Fonte di variabilità	gl	MS\$	F	P	MS	F	P	MS	F	P	MS	F	P						
Genotipi	4	10.7	7.9	*	30259.0	24.7	**	61.1	8.3	*	21172.6	125.5	**	1568.9	41.7	*	34235.0	2.3	NS
Località	1	2.1	1.6	NS	8526.0	7.0	NS	91.2	12.4	*	4326.4	25.7	**	4.9	0.1	NS	1796.0	0.1	NS
Residua	4	1.4			1227.0			7.4			168.6			37.7			14782.0		

* Differenza minima significativa al livello di probabilità 0,005

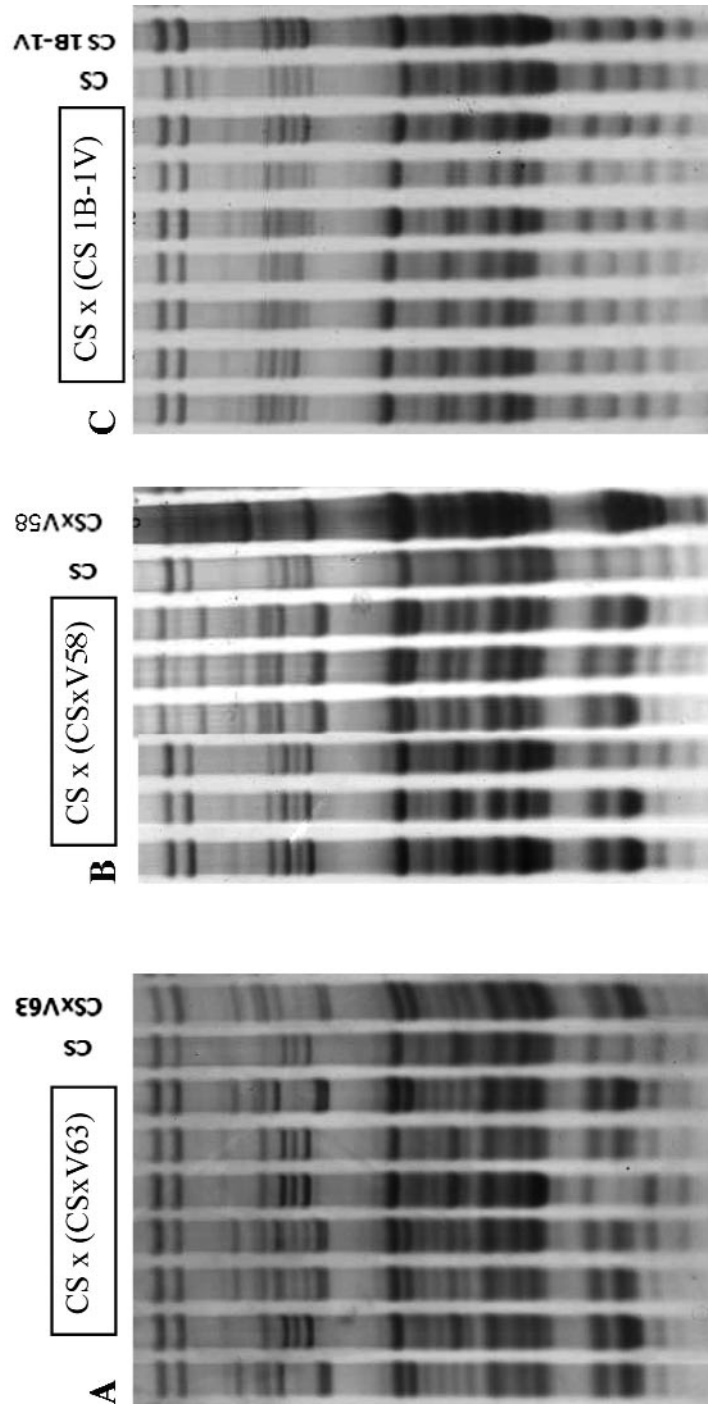


Fig. 4. Separazione mediante A-PAGE delle gliadine dalle progenie $BC_2F_{3/2}$ derivate da cariossidi BC_2F_2 ottenute dalle seguenti BC_2F_1 : $CS \times (CS \times V63)$, A; $CS \times (CS \times V58)$, B; $CS \times (09.CS 1B-1V)$, C. Per ogni progenie, sono presentati i pattern di alcune progenie e dei parentali.

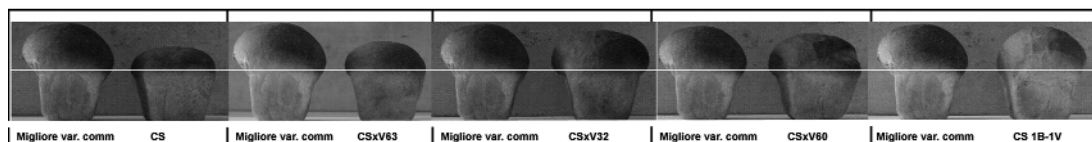


Fig. 5. Pane ottenuto da una farina standard commerciale per panificazione a confronto con quello ottenuto dalle linee CS, CS×V63, CS×V32, CS×V60 e 09.CS 1B-1V.

una linea di sostituzione della cv Langdon di frumento duro in cui il cromosoma 6B proviene dal *T. dicoccoides* [15]. Nelle nostre analisi, le due linee recanti il cromosoma 6V (CS×V32 e CS×V63) risultano avere un contenuto proteico (rispettivamente 17.5% e 18.5%) nettamente superiore a CS (14.5%), nonostante il peso dei mille semi sia comparabile con quello di CS. Ciò suggerisce la presenza, sul cromosoma 6V di *Dv*, di un putativo omeologo a *Gpc-B1*. L'ipotesi è rafforzata dal fatto che, come per le linee ricombinanti studiate da Uauy *et al.*, [35], nelle quali la presenza del locus *Gpc-B1* è stata associata ad un aumento dal 10% al 15% del contenuto in Zn e Fe, nella CS×V63 si è riscontrato un contenuto in Fe superiore del 27% e un contenuto in Zn superiore del 40% rispetto a CS (dato non pubblicato).

L'effetto più evidente sulla qualità panificatoria è stato osservato in presenza del locus *Glu-V1* nella linea 09.CS 1B-1V. Infatti, entrambe le linee 09.CS 1B-1V e CS×V63 presentano la sostituzione del locus *Gli-B1/Glu-B3* con *Gli-V1/Glu-V3*, ma la qualità panificatoria di CS×V63 è inferiore a quella di 09.CS 1B-1V poiché il locus *Glu-V1* non è presente in CS×V63 ma è contenuto nel genoma di 09.CS 1B-1V. Il locus *Glu-V1* ed i loci *Gli-V1/Glu-V3* presenti nella linea 09.CS 1B-1V sono derivati da un ecotipo di *Dv* collezionato in Italia [20] (vedi http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/GeneticStocks/AJLukaszewski_Wheat_Stocks.doc), differente da quello utilizzato per produrre la linea CS×V63; pertanto le prolamine codificate al locus *Gli-V1/Glu-V3* nella linea 09.CS 1B-1V sono diverse da quelle codificate agli stessi loci in CS×V63. Ma le differenze ai loci *Gli-V1/Glu-V3* tra le due linee non spiegano tutte le differenze in qualità panificatoria tra di esse. Un riscontro indiretto a questa ipotesi lo si ricava dal confronto dei valori di SSV tra le indicate coppie (ID 769 e ID772): le linee che conservano le prolamine codificate dai geni ai loci *Gli-V1/Glu-V3* ma che sono prive del gene *Glu-V1* che codifica per la subunità gluteninica 1v, hanno valori significativamente più bassi di SSV rispetto alle linee isogeniche che presentano la subunità gluteninica 1v.

Nelle linee analizzate è emerso che i riarrangiamenti riguardano più frequentemente i cromosomi del gruppo omeologo B; questo suggerisce un alto livello di colinearità tra il genoma B e quello di *Dv*, almeno considerando i loci prolaminici. Tale ipotesi è rafforzata dalle osservazioni di Li *et al.* [18] che hanno dimostrato una similarità stretta, per i geni codificanti le gliadine di tipo alfa, tra *Dv* ed *Aegilops speltoides*, il donatore del genoma B ai frumenti poliploidi.

Riassunto – Molti programmi di miglioramento genetico si basano sull'utilizzo di specie, selvatiche e coltivate, provenienti dal gene-pool secondario (GP-2), ma ad oggi non sono noti casi di miglioramento della qualità panificatoria in frumento utilizzando tale strategia. Nel presente lavoro, analizzando linee di introgressione derivate dall'ibridazione di *Triticum aestivum* cv “Chinese Spring” (CS) × *Dasypyrum villosum* (L.) Candargy (Dv), viene dimostrato l'effetto positivo esercitato dalle prolamine codificate da geni di Dv sulla qualità panificatoria. I dati biochimici e molecolari, in correlazione con i dati qualitativi, hanno consentito di valutare l'effetto dell'introgressione di cromatina di Dv nel background genetico di *T. aestivum*, con importanti implicazioni per il miglioramento genetico. È stato dimostrato che il contributo alla qualità panificatoria apportato dalla cromatina di Dv dipende principalmente dai geni introgressi e non dalle dimensioni della cromatina o dal contenuto proteico. È stata dimostrata la grande influenza positiva sulla qualità esercitata dal locus *Glu-V1*, codificante per le glutenine ad alto peso molecolare in Dv. È stato inoltre dedotto, dalle osservazioni sperimentali, che la cromatina del braccio corto del cromosoma 6V contiene geni che determinano un aumento del contenuto in proteine e micronutrienti, nello specifico Fe e Zn.

BIBLIOGRAFIA

- [1] AACC International, 2000, Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 10th edn., The Association: St. Paul, Minnesota.
- [2] Blanco A., P. Resta, R. Simeone, S. Parmar, P.R. Shewry, P. Sabelli, and D. Lafiandra, 1991. Chromosomal location of seed storage protein genes in the genome of *Dasypyrum villosum* (L.) Candargy. *Theor. Appl. Genet.* 82: 358-362.
- [3] Brunetti G., Soler-Rovira P., Farrag K., Senesi N., (2009). Tolerance and accumulation of heavy metals by wild plant species grown in contaminated soils in Apulia region, Southern Italy. *Plant & Soil*: 318: 285-298.
- [4] Caceres M.E., P. Vaccino, M. Corbellini, P.G. Cionini, V. Sarri, E. Polizzi, D. Vittori, and C. De Pace, 2008. Flowering earliness in wheat inbred breeding lines derived from *T. aestivum* ‘Chinese Spring’ × *Dasypyrum villosum* hybridization is not related to allelic variation at the vernalization loci VRN-A1, VRN-B1, and VRN-D1. pp. 329-334. In J. Prohens and M.L. Badenes (ed.) *Modern Variety Breeding for Present and Future Needs*. Editorial Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, Spain.
- [5] Caceres M.E., P. Vaccino, M. Ceccarelli, V. Sarri, E. Polizzi, C. De Pace e P.G. Cionini, 2011. Introgressione criptica di DNA parentale in linee di frumento derivate da ibridazione intergenerica fra *Triticum aestivum* e *Dasypyrum villosum*. In: ‘*Trasferimento di geni dalla specie selvatica D. villosum al frumento per aumentarne l'adattamento ai sistemi agrari sostenibili: Risultati ottenuti dalla collaborazione scientifica tra Università italiane e l'Università della California*’. Collana ‘Scritti e Documenti’ XLIV, pp. 201-211, Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL, Roma.
- [6] De Pace C., L. Montebove, V. Delre, C.C. Jan, C.O. Qualset, and G.T. Scarascia Mugnozza, 1988. Biochemical versatility of amphiploids derived from crossing *Dasypyrum villosum* Candargy and wheat: genetic control and phenotypical aspects. *Theor. Appl. Gen.*, 76: 513-529.
- [7] De Pace C., D. Snidaro, M. Ciaffi, D. Vittori, A. Ciofo, A. Cenci, O.A. Tanzarella, C.O. Qualset, and G.T. Scarascia Mugnozza, 2001. Introgression of *Dasypyrum villosum* chromatin into common wheat improves grain protein quality. *Euphytica* 117: 67-75.
- [8] De Pace C., P. Vaccino, P.G. Cionini, M. Pasquini, M. Bizzarri, and C.O. Qualset, 2011 *Dasypyrum*. In: Kole C. (ed.) *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*. Vol. 1: 185-292 *Wild Relatives of Cereals*. Springer, Heidelberg, Berlin, New York.

- [9] Dwivedi S.L., H.D. Upadhyaya, H.T. Stalker, M.W. Blair, D.J. Bertioli, S. Nielsen, and R. Ortiz, 2008. Enhancing crop gene pools with beneficial traits using wild relatives. *Plant Breeding Reviews* (Jules Janick, ed.), Vol. 30: 179-230. John Wiley & Sons, Inc.
- [10] Fedak G., 1998. Procedures for transferring agronomic traits from alien species to crop plants. In A.E. Slinkard, ed. *Cytogenetics and Evolution, Proc. 9th Int. Wheat Genetics Symp.*, Saskatoon, Saskatchewan, Canada, 2-7 Aug. 1998, pp. 1-7. Saskatoon, Canada, University of Saskatchewan, University Extension Press.
- [11] Friebe B., Jiang J., Raupp W.J., McIntosh R.A. & Gill B.S., 1996. Characterization of wheat alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. *Euphytica*, 91: 59-87.
- [12] Grądziewska A., 2006a. The genus *Dasypyrum*-part 1. The taxonomy and relationships within *Dasypyrum* and with *Triticeae* species. *Euphytica* 152: 429-440.
- [13] Grądziewska A., 2006b. The genus *Dasypyrum*-part 2. *Dasypyrum villosum*-a wild species used in wheat improvement. *Euphytica* 152: 441-454.
- [14] ICC, 1992. Standard methods of the International Association for Cereal Chemistry. The Association: Vienna.
- [15] Joppa L.R., C. Du, G.E. Hart, and G.A. Hareland, 1997. Mapping gene(s) for grain protein in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) using a population of recombinant inbred chromosome lines. *Crop Sci.* 37: 1586-1589.
- [16] Hajjar R., and Hodgkin T., 2007. The use of wild relatives in crop improvement: a survey of developments over the last 20 years. *Euphytica* 156: 1-13.
- [17] Lee Y., J.A. Nelder, and Y. Pawitan., 2006. Generalized linear models with random effects. Chapman & Hall/CRC, London.
- [18] Li G.-R., C. Liu, Z.-X. Zeng, J.-Q. Jia, T. Zhang, J.-P. Zhou, Z.-L. Ren, and Z.-J. Yang., 2009. Identification of α -gliadin genes in *Dasypyrum* in relation to evolution and breeding. *Euphytica* 165: 155-163.
- [19] Liu D.J., P.D. Chen, and W.J. Raupp, 1995. Determination of homoeologous groups of *Haynaldia villosa* chromosomes. pp. 181-185. In *Proc. 8th Int. Wheat Genet. Symp.* Chinese Agricultural Sciencetech Press, Beijing, China.
- [20] Lukaszewski A.J., (1988). A comparison of several approaches in the development of disomic alien addition lines of wheat. In: Miller T.E., Koebner R.M.D. (ed.) *Proceedings of the seventh international wheat genetics symposium*, vol. 1. Institute of Plant Science Research, Cambridge, pp. 363-367.
- [21] Mansur L.M., C.O. Qualset, D.D. Kasarda, and R. Morris, 1990. Effects of 'Cheyenne' chromosomes on milling and baking quality in 'Chinese Spring' wheat in relation to glutenin and gliadin storage proteins. *Crop Sci.* 30: 593-602.
- [22] Metakovsky E.V., 1991. Gliadin allele identification in common wheat. II. Catalogue of gliadin alleles in common wheat. *J. Genet. Breed.* 45: 325-344.
- [23] Minelli S., M. Ceccarelli, M. Mariani, C. De Pace, and P.G. Cionini, 2005. Cytogenetics of *Triticum* $\times$ *Dasypyrum* hybrids and derived lines. *Cytogenet. Genome Res.* 109: 385-392.
- [24] Montebove L., C. De Pace, C.C. Jan, C.O. Qualset, and G.T. Scarascia Mugnozza, 1987. Chromosomal location of isozyme and seed storage protein genes in *Dasypyrum villosum* Candargy. *Theor. Appl. Genet.* 73: 836-845.
- [25] Mujeeb-Kazi A., Rajaram S., 2002. Transferring alien genes from related species and genera for wheat improvement. In (B.C. Curtis, S. Rajaram and H. Gómez Macpherson, eds.) *Bread Wheat: Improvement and production*. FAO Plant Production and Protection Series, 567 pp, FAO, Rome, Italy. (<http://www.fao.org/docrep/006/Y4011E/y4011e0e.htm#bm14> verified Feb. 24 2010).
- [26] Pasquini M., Bizzarri M., Nocente F., Matere A., Sereni L., Casini F., L'Aurora A., Vaccino P., Corbellini M., Coppa T., Vittori D., and C. De Pace, 2011. *Dasypyrum villosum* come

- fonte di geni di resistenza a oidio e ruggine bruna per il miglioramento dei frumenti coltivati. In: *‘Trasferimento di geni dalla specie selvatica D. villosum al frumento per aumentarne l’adattamento ai sistemi agrari sostenibili: Risultati ottenuti dalla collaborazione scientifica tra Università italiane e l’Università della California’*. Collana ‘Scritti e Documenti’ XLIV, pp. 171-188, Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL, Roma.
- [27] Pogna N.E., F. Mellini, A. Beretta, and A. Dal Belin Peruffo, 1989. The high-molecular-weight glutenin subunits of common wheat cultivars grown in Italy. *J. Genet. Breed.* 43: 17-24.
- [28] Pogna N.E., J.C. Autran, F. Mellini, D. Lafiandra, and P. Feillet, 1990. Chromosome 1B-encoded gliadins and glutenin subunits in durum wheat: genetics and relationships to gluten strength. *J. Cer. Sci.* 11: 15-34.
- [29] Preston K.R., P.R. March, and K.H. Tipples, 1982. An assessment of the SDS sedimentation test for the prediction of Canadian bread wheat quality. *Can. J. Plant Sci.* 62: 545-553.
- [30] Raupp W.J., B. Friebe, and B.S. Gill, 1996. Suggested guidelines for the nomenclature and abbreviation of the genetic stocks of wheat and its relatives. Available at: <http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/nomenclature.html> (Verified 30 Mar. 2009).
- [31] Sears E.R., 1953. Addition of the genome of *Haynaldia villosa* to *Triticum aestivum*. *Am. J. Bot.* 40: 168-174.
- [32] Shewry P.R., S. Parmar, and D.J.C. Pappin, 1987. Characterization and genetic control of the prolamins of *Haynaldia villosa*: Relationship to cultivated species of the *Triticeae* (rye, wheat, and barley). *Biochem. Genet.* 25: 309-325.
- [33] Singh N.H., K.W. Shepherd, and G.B. Cornish, 1991. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *J. Cer. Sci.* 14: 203-208.
- [34] Steel R.G.D., and J.H. Torrie, 1960. Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill Book Company, New York.
- [35] Uauy C., A. Distelfeld, T. Fahima, A. Blechl, and J. Dubcovsky, 2006. A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science* 314: 1298-1301.
- [36] Vaccino P., Banfi R., Corbellini M., De Pace C., 2010. Broadening and improving the wheat genetic diversity for end-use grain quality by introgression of chromatin from the wheat wild relative *Dasyphyrum villosum*. *Crop Science* 50: 528-540.

*Il volume è stato pubblicato grazie al contributo concesso
dalla «Fondazione Carivit», Viterbo*

*This volume has been printed thanks to the financial contribution
of the «Fondazione Carivit», Viterbo*

