

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)

MARIA EUGENIA CACERES¹ – PATRIZIA VACCINO²
MARILENA CECCARELLI¹ – VANIA SARRI¹ – ENZA POLIZZI¹
CIRO DE PACE³ – PIER GIORGIO CIONINI¹

Introgressione criptica di DNA parentale in linee di frumento derivate da ibridazione intergenerica fra *Triticum aestivum* e *Dasypyrum villosum* *

Summary – Cytogenetic and DNA molecular analyses have been carried out in three wheat inbred lines (CS×V58, CS×V59 and CS×V60), derived from *Triticum aestivum* cv. ‘Chinese Spring’ (CS) × *Dasypyrum villosum* (*Dv*) intergeneric hybridization, which showed several *Dv*-specific phenotypic characters. All lines were found to share with CS the number (2n=42) and structure of the chromosomes and chromatin from *Dv* was apparently not added to their complement. However, Feulgen/DNA cytophotometry showed that there was more nuclear DNA in the lines than in the parental wheat (by 1.85%, 2.76% and 1.26% in CS×V58, CVS×V59 and CS×V60, respectively). AFLP analysis of genomic DNA from the lines, CS and *Dv* detected a total of 120 polymorphic bands, 7 of which (5.8%) were present in both the lines and *Dv* but absent in CS. PCR amplification using specific primers revealed, in the genome of the lines, *Dv* alleles and not CS alleles at two loci (*Vrn-A1* and *Vrn-B3*). These results indicate cryptic introgression of *Dv* DNA sequences into the genome of the lines. Some implications of this finding are briefly discussed.

Key words: Cytogenetics, cryptic chromatin, *Vrn* genes, earliness, *Triticeae*, GISH.

Abbreviazioni: AFLP, amplified fragment length polymorphism; CS, *Triticum aestivum* L. cv. ‘Chinese Spring’; DAPI, 4,6-diammidino-2-fenilindolo; *Dv*, *Dasypyrum villosum* (L.) Candargy; GISH, genomic *in situ* hybridization; PCR, polymerase chain reaction.

¹ Dipartimento di Biologia Cellulare e Ambientale, Sezione di Biologia Cellulare e Molecolare, Università di Perugia, Via Elce di Sotto, 06123 Perugia, +39 075 585 5703; fax: +39 075 585 5759; e-mail: cionini@unipg.it

² CRA, Unità di Ricerca per la Selezione dei Cereali e la Valorizzazione delle Varietà Vegetali (SCV), Via Forlani 3, 26866 S. Angelo Lodigiano.

³ 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

L'ibridazione, sia interspecifica che intergenerica, ha avuto un ruolo importante nell'evoluzione delle specie vegetali e la capacità dei poliploidi che ne sono derivati di andare incontro a rapide modificazioni del genoma spiega il loro maggiore successo evolutivo rispetto alle specie diploidi [8]. Tuttavia, molte domande circa il comportamento dei genomi parentali e le loro interazioni negli ibridi, le mutazioni genetiche ed epigenetiche che hanno luogo nel loro DNA, i meccanismi molecolari che vi sono implicati e la struttura dei genomi ibridi che ne risulta attendono ancora risposte complete [cfr. 13].

Gli ibridi intergenerici di frumento sono materiali interessanti per studiare l'evoluzione dei genomi ibridi, poiché questi incroci sono ottenibili con relativa facilità ed il loro studio è di interesse anche applicativo in considerazione del valore agronomico che essi possono avere. Fra questi ibridi, quelli in cui *Dasypyrum villosum* (*Dv*) è l'altra specie parentale, sono particolarmente interessanti, poiché *Dv* è un donatore di geni che migliorano alcune caratteristiche agronomicamente importanti dei frumenti coltivati [5, 10].

Linee di frumento derivate da ibridazione intergenerica fra *Triticum aestivum* cv. 'Chinese Spring' (CS) e *Dv* e mantenute per autofecondazione hanno mostrato alcuni caratteri fenotipici che le diversificano da CS, quali la precocità della fioritura, la migliore resistenza a fattori ambientali, la presenza di reste, la migliore resa di granella per spiga, la resistenza all'oidio, un più alto contenuto proteico nei semi, dai quali si ottiene una farina con un elevato valore di indice di sedimentazione in SDS [1, 4, 15]. Questi caratteri, che sono tipici di *Dv*, non possono che derivare dalla espressione di suoi geni e/o da interazioni tra i due genomi parentali e suggeriscono quindi che almeno porzioni di ambedue siano presenti nelle linee. Al fine di chiarire la struttura genomica di questi ibridi, sono state condotte analisi citogenetiche e molecolari i cui risultati, che indicano introgressione criptica di DNA di *Dv* nel loro genoma, sono di seguito riportati e brevemente discussi.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Materiale vegetale

Il materiale sperimentale è stato ottenuto da semi (cariossidi) delle specie o linee sotto elencate.

A) *Triticum aestivum* L. cv. 'Chinese Spring'.

B) *Dasypyrum villosum* (L.) Candargy; sin. *Haynaldia villosa* (L.) Schur.

C) Tre linee di frumento (CS × V58, CV × V59 e CS × V60) ottenute da ibridazione intergenerica fra CS e *Dv* seguita da una generazione di reincrocio con CS, tre generazioni ottenute per autofecondazione, cinque generazioni di discendenza da singola spiga e quattro generazioni di incremento di seme (linee S₁₂).

Le cariossidi sono state fatte geminare su carta bibula in piastre Petri e le plantule sono state immediatamente usate come materiale sperimentale o fatte crescere in serra.

2.2. Citofotometria del DNA

Apici di radici seminali fissate in alcool etilico-acido acetico 3:1 (v/v) sono stati schiacciati sotto un vetrino coprioggetto in una goccia di acido acetico 45% dopo trattamento con una soluzione acquosa di pectinasi (Sigma) per 1 ora a 37°C. I coprioggetti sono stati rimossi con il metodo del ghiaccio secco ed i preparati sono stati simultaneamente colorati al Feulgen dopo idrolisi in HCl 1 N a 60°C per 8 minuti. Dopo la colorazione, i vetrini sono stati sottoposti a tre lavaggi di 10 minuti ciascuno in acqua solforosa prima della disidratazione ed il montaggio in DPX (BDH). Gli assorbimenti Feulgen/DNA di singoli nuclei cellulari sono stati quindi misurati, alla lunghezza d'onda di 550 nm, utilizzando un microdensitometro integratore Barr e Stroud tipo GN5.

2.3. Estrazione e marcatura del DNA

Il DNA genomico è stato estratto da foglie e puificato come indicato da Delaporta *et al.* [3]. Dopo essere stato meccanicamente ridotto in frammenti di 2-10 kb, è stato marcato con digossigenina-11-dUTP o biotina-16-dUTP con il metodo della 'nick translation'.

2.4. Amplificazione del DNA mediante PCR

L'amplificazione mediante PCR è stata condotta, secondo il metodo descritto da Zhang *et al.* [19], in 20 µL di tampone PCR 1× contenente 1,5 µmol di MgCl₂, 200 µmol di ciascun dNTP, 2 µmol di ciascun innesco, 1 unità di *Taq* polimerasi (Invitrogen) e 25 ng di DNA genomico, utilizzando un termociclatore 9600 (Applied Biosystems). È stato applicato il seguente profilo di amplificazione: 5 minuti a 95°C, 35 cicli di 45 secondi a 95°C, 30 secondi a 50°C (per *Vrn-A1*) o 63°C (per *Vrn-B3*), 1 minuto a 72°C ed una estensione finale a 72°C per 5 minuti.

I prodotti della amplificazione sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio 2% (80 V per 4-5 ore), colorati con bromuro di etidio e visualizzati sotto luce ultravioletta. Le dimensioni dei prodotti di amplificazione sono state determinate usando scale di 50 o 100 coppie di basi (Fermentas).

2.5. Analisi del DNA genomico mediante AFLP

L'analisi AFLP è stata condotta come descritto da Vos *et al.* [16]. Il DNA è stato digerito con gli enzimi di restrizione *EcoRI* e *MseI* e successivamente legato

con adattatori. L'amplificazione mediante PCR è stata condotta in due fasi successive: nella prima fase (preamplificazione selettiva) il DNA è stato amplificato usando inneschi complementari agli adattatori ed aventi un nucleotide selettivo; nello specifico, l'innesco *EcoRI* (E) + A e l'innesco *MseI* (M) + A. Nella seconda fase, i prodotti della preamplificazione sono stati amplificati usando combinazioni di inneschi con le seguenti estensioni: E-ACC→M-CCA e E-ACC→M-AAG. Solo l'innesco *EcoRI* è stato marcato con [³³P]ATP (GE Healthcare). I prodotti della amplificazione sono stati quindi separati mediante elettroforesi denaturante su gel di poliacrilammide 4,5% e visualizzati attraverso autoradiografia.

2.6. Ibridazione genomica *in situ*

Apici radicali sono stati trattati con una soluzione acquosa satura di alfa-bromonaftalina per 4 ore a temperatura ambiente e fissati in alcool etilico-acido acetico. Dopo macerazione in una soluzione di pectinasi (4%; Sigma) e cellulasi (3%; Calbiochem) in tampone citrato, con essi sono stati allestiti preparati come già riportato. L'ibridazione *in situ* è stata effettuata come descritto da Schwarzbacher *et al.* [12] con minime modificazioni. Il DNA dei nuclei e dei cromosomi è stato denaturato in un termociclatore per 6 minuti a 70°C ed i preparati sono stati incubati per tutta la notte a 37°C con 2 ng/μL di sonde di DNA marcato denaturato con il calore. Frammenti di DNA genomico non marcato sono stati aggiunti nella miscela di ibridazione (15 volte in eccesso) come DNA bloccante. I siti di ibridazione sono stati evidenziati rivelando la digossigenina o la biotina rispettivamente con antidigossigenina coniugata a fluoresceina o streptoavidina coniugata a Cy3. I preparati sono stati quindi controcolorati con DAPI in tampone McIlvaine a pH 7.0 e montati in soluzione antidecadimento (AFI; Citifluor). I nuclei in interfase ed i cromosomi metafasici sono stati osservati usando un microscopio a fluorescenza equipaggiato con un analizzatore di immagini Leica Q500MC e fotografati con pellicola Fuji 800.

3. RISULTATI

La figura 1 mostra piastre metafasiche in apici radicali di plantule appartenenti alla generazione S₁₂ delle linee in studio dopo colorazione DAPI (a) e GISH usando DNA marcato di *Dv* (b). Tutte le linee hanno presentato cromosomi del tutto simili, per numero (2n=42) e struttura, a quelli di CS. Né cromosomi appartenenti a *Dv* né loro porzioni erano osservabili nel loro complemento. Cromatina di *Dv* era invece presente nelle linee in precedenti generazioni, come è mostrato nella figura 2, in cui è osservabile un telosoma di *Dv* aggiunto al complemento cromosomico di una pianta appartenente alla generazione S₈ della linea CS × V58.

Tuttavia, i risultati della citofotometria Feulgen (Fig. 3) hanno mostrato che le dimensioni del genoma nucleare sono significativamente maggiori nelle linee che in

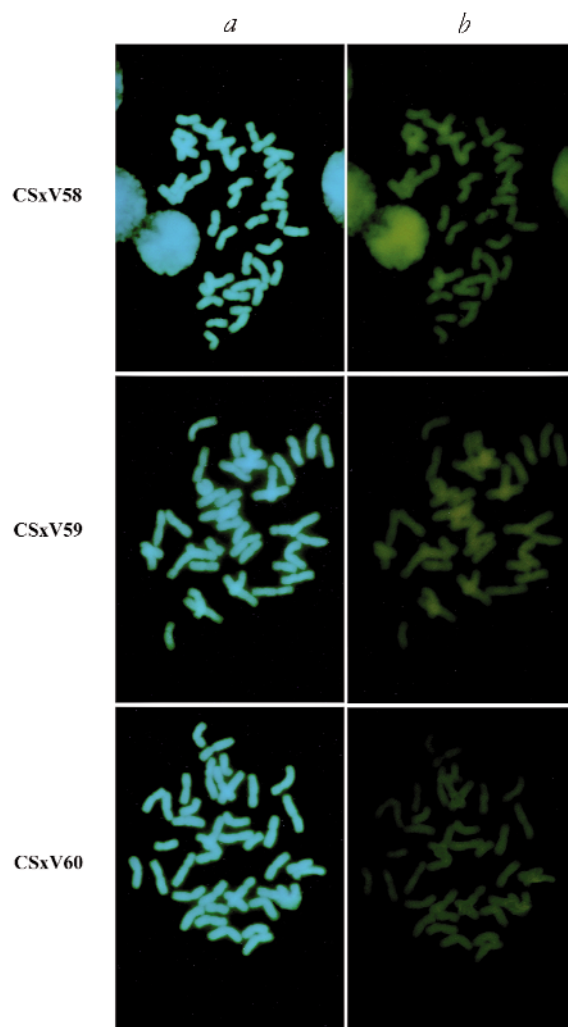


Fig. 1. Piastre metafasiche nel meristema radicale di piante appartenenti alla generazione S_{12} delle linee di frumento studiate. *a*, colorazione DAPI; *b*, GISH con DNA di *Dv* marcato. Cromatina di *Dv* non è osservabile in alcuna linea. $\times 1.600$.

CS. La quantità di DNA nei nuclei in profase (4C) delle linee è infatti maggiore, rispetto a quella trovata nelle profasi del parentale CS, dell'1,85% in CS $\times$ V58, del 2,76% in CS $\times$ V59 e dell'1,26% in CS $\times$ V60.

L'analisi AFLP del DNA nucleare delle linee, di CS e di *Dv* (Fig. 4) ha mostrato un totale di 120 bande polimorfiche, 27 delle quali (22,5%) erano osservabili soltanto in DV e 7 (5,8%) erano presenti sia nelle linee che in *Dv*, ma assenti

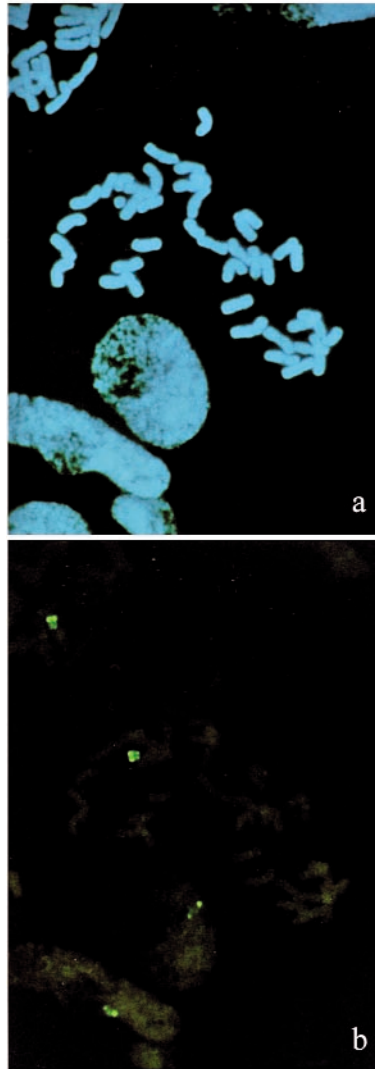


Fig. 2. Piastre metafasiche e nuclei interfasicici nel meristema radicale di una pianta appartenente alla generazione S_8 della linea $CS \times V58$. *a*, colorazione DAPI; *b*, GISH con DNA marcato di *Dv*. Un telosoma di *Dv* è presente nel complemento cromosomico. $\times 1.600$.

in CS. Di queste ultime, due erano presenti sia in $CS \times V59$ che in $CS \times V60$, una era comune a $CS \times V58$ e $CS \times V59$, una è stata osservata solo in $CS \times V58$ ed un'altra solo in $CS \times V59$. Riarrangiamenti nei genomi delle linee erano indicati anche dalla presenza di 10 frammenti di DNA non rilevabili né in CS né in *Dv*.

L'amplificazione di sequenze di DNA mediante PCR usando inneschi specifici

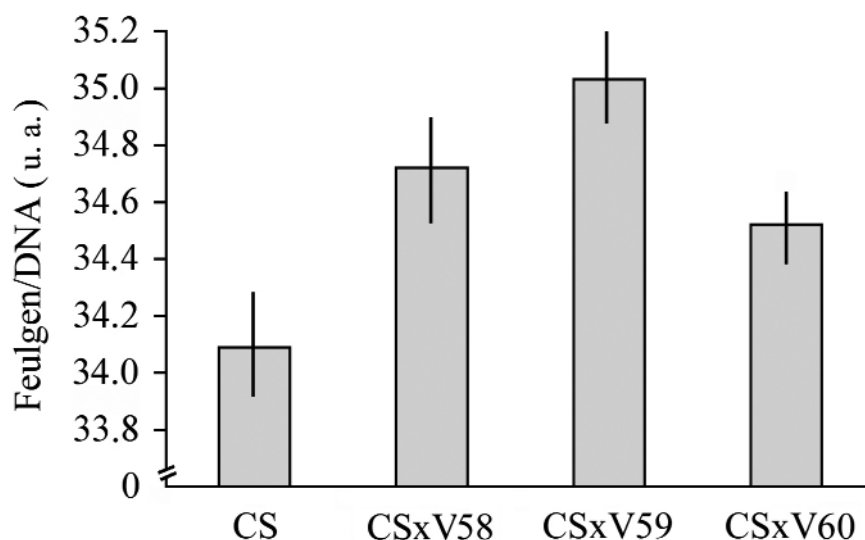


Fig. 3. Assorbimento Feulgen di profasi iniziali (4C) nei meristemi radicali di plantule di CS e delle linee di frumento studiate. Sono state analizzate cinque plantule per ciascun genotipo e venti profasi per plantula. Limiti fiduciali per $P \leq 0.01$.

per le sequenze geniche *Vrn-A1* e *Vrn-B3*, due loci coinvolti nel controllo della fioritura [18, 19], ha mostrato che alleli comuni alle linee e a *Dv* erano invece assenti in CS (Fig. 5).

4. DISCUSSIONE

Mentre le osservazioni citogenetiche non mostrano la presenza di cromatina di *Dv* nel complemento cromosomico delle linee di frumento studiate (Fig. 1), i risultati delle analisi citofotometriche e molecolari indicano chiaramente introgressione di DNA di *Dv* nel loro genoma, ciò che può spiegare la comparsa in esse dei caratteri fenotipici annotati nell'Introduzione. Una prima indicazione in questo senso può essere la maggiore quantità di DNA nelle linee rispetto a CS (Fig. 3), sebbene risultati presenti nella letteratura mostrino che l'eliminazione di sequenze di DNA dal genoma del frumento è una delle più frequenti risposte alla ibridazione intergenerica [8, 13]. L'aumento delle dimensioni dei genomi potrebbe in realtà essere dovuto anche ad amplificazione di sequenze di DNA ripetute, non codificanti, fenomeno che si sa costituire una frequente risposta delle piante a situazioni di stress, una delle quali può essere costituita dalla ibridazione [2]. I risultati delle analisi AFLP del DNA nucleare (Fig. 4) mostrano però chiaramente che nei genomi delle linee sono introgresse sequenze di DNA di *Dv*, ed alla medesima conclusione si giunge considerando la presenza in quei genomi di alleli non di CS

(Fig. 5). Anche l'analisi della composizione delle proteine di riserva nella linea CS×V60 ha mostrato che i loci *Gli-B1*, *Gli-B2* e *Glu-B3*, che codificano rispettivamente per gliadine omega e alfa e per glutenine a basso peso molecolare, sono rimpiazzati in questa linea dai corrispondenti loci di *Dv*, *Gli-V1*, *Gli-V2* e *Glu-V3* [15].

L'insieme dei risultati ottenuti può essere ragionevolmente spiegato solo ammettendo la presenza, nel genoma delle linee, di sequenze di DNA di *Dv* relativamente corte intersperse fra le sequenze di CS. La fluorescenza che segnala l'ibridazione *in situ* di sequenze di DNA intersperse con altre sequenze è per regola osservabile solo se le sonde usate superano la lunghezza di 3.000 coppie di basi [11] ed è atteso che le sequenze debbano essere ancora più lunghe perché l'ibrida-

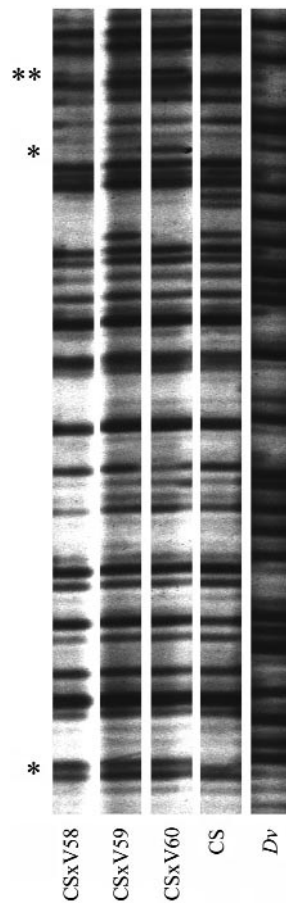


Fig. 4. Porzione di un gel che mostra i risultati dell'analisi AFLP del DNA genomico delle linee di frumento studiate, di CS e di *Dv*. Gli asterischi indicano bande nelle linee che sono condivise solo con *Dv* e il doppio asterisco indica una banda che non compare né in CS né in *Dv*.

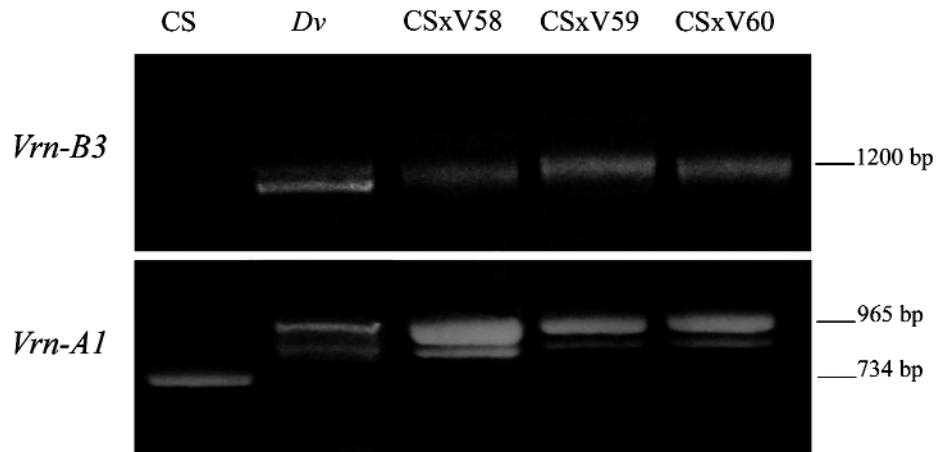


Fig. 5. Amplificazione mediante PCR delle sequenze di DNA ai loci *Vrn-A1* e *Vrn-B3* nel genoma delle linee di frumento studiate ed in quello di CS e *Dv*.

zione possa essere rivelata dalla GISH. L'introggressione di DNA di *Dv* nel genoma delle linee non è perciò direttamente osservabile e rimane quindi criptica. Cromosomi o cromatina di *Dv* erano inizialmente presenti nelle linee, come mostra la figura 2, e la ricombinazione fra genomi a livello del DNA allora avvenuta può essere pensata come responsabile delle variazioni osservate nel loro genoma. Introggressioni spontanee fra i genomi omeologhi di specie delle *Triticeae* sono state osservate da Weissmann *et al.* [17] ed il ruolo di questo meccanismo nel produrre variazioni nel DNA nucleare è stato postulato anche sulla base di risultati ottenuti studiando altri ibridi interspecifici ed intergenerici sperimentali, anche se alcune evidenze non sembrano supportare questa conclusione [cfr. 8]. È stato anche suggerito che cromosomi o geni gametocidi [6] possano avere un ruolo nei riarrangiamenti cromosomici negli ibridi di frumento, inducendo traslocazioni fra i genomi parentali che possono produrre introggressione nel genoma del frumento di minute sequenze di DNA aliene con minime perdite di cromatina [7]. Evidentemente, sequenze di DNA di *Dv* che non sono andate incontro a riarrangiamenti di questo tipo sono state progressivamente eliminate dal genoma delle linee, che in questo modo sono divenute stabili. Riarrangiamenti nel genoma di ibridi di frumento dovuti a introggressione criptica di DNA parentale non sono limitati alle linee studiate. Un altro caso può essere la cultivar di grano 'Roma', ottenuta da Strampelli [14] anch'essa attraverso incroci con *Dv*. Questa varietà mostra infatti alcuni caratteri fenotipici di *Dv*, quali la buona resistenza alle basse temperature, all'allettamento ed alle ruggini, senza che cromatina di *Dv* sia visibile nel suo complemento cromosomico (nostra osservazione non pubblicata).

Si può infine osservare che l'introggressione criptica di sequenze di *Dv* nel genoma dei suoi ibridi con il frumento suggerisce che è necessaria cautela nell'as-

segnare geni per specifici caratteri a determinati cromosomi di *Dv* attraverso la comparazione dei risultati di analisi citogenetiche con il fenotipo [9], poiché la presenza nel loro complemento cromosomico di visibile cromatina di *Dv* non significa necessariamente che determinati caratteri del fenotipo siano sicuramente o interamente dovuti alla espressione di geni portati da quella cromatina. Per converso, l'assenza di visibile cromatina di *Dv* negli ibridi non significa che modificazioni osservate nel fenotipo debbano essere necessariamente attribuite ad eventi mutazionali diversi dalla introgressione nei loro genomi di sequenze di DNA di *Dv*. Queste cautele dovrebbero essere estese ad ogni altro ibrido se introgressione criptica di DNA parentale non è stata esclusa.

Riassunto – Su tre linee di frumento (CS × V58, CS × V59 e CS × V60) derivate da ibridazione intergenerica fra *Triticum aestivum* cv. 'Chinese Spring' (CS) e *Dasyphyrum villosum* (*Dv*) e mantenute per autofecondazione, che mostravano alcuni caratteri fenotipici propri di *Dv*, sono state condotte analisi citogenetiche e molecolari al fine di chiarire la struttura dei loro genomi. Tutte le linee hanno mostrato di condividere con CS il numero ($2n=42$) e la struttura dei cromosomi, senza che cromatina di *Dv* fosse visibile nel loro complemento. Tuttavia, i risultati della citofotometria del DNA hanno rivelato che la dimensione dei loro genomi è significativamente maggiore di quella del genoma di CS (1,85%, 2,76% e 1,26% di DNA in più rispettivamente per CS × V58, CS × V59 e CS × V60). L'analisi delle linee, di CS e di *Dv* mediante marcatori AFLP ha evidenziato un totale di 120 bande polimorfiche, sette delle quali (5,8%) erano presenti nelle linee e in *Dv* ma assenti in CS. Amplificazioni di DNA genomico usando inneschi specifici per i due loci *Vrn-A1* e *Vrn-B3* hanno rivelato, nel genoma di tutte le linee, la presenza di alleli propri di *Dv* anziché di CS. L'insieme dei risultati indica introgressione criptica di DNA di *Dv* nel genoma delle linee. Alcune implicazioni di quanto osservato sono brevemente discusse.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Caceres M.E., P. Vaccino, M. Corbellini, P.G. Cionini, V. Sarri, E. Polizzi, D. Vittori, C. De Pace, 2008. Flowering earliness in wheat inbred breeding lines derived from *T. aestivum* 'Chinese Spring' × *Dasyphyrum villosum* hybridization is not related to allelic variation at the vernalization loci VRN-A1, VRN-B1 and VRN-D1. In: *Modern variety breeding for present and future needs*, (J. Prohens, M.L. Badenes, ed.), Editoria Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, Spain, 329-334.
- [2] Ceccarelli M., V. Sarri, P.G. Cionini, 2008. Repetitive DNA and plant evolution. In: *Plant genome. Biodiversity and evolution*, (A.K. Sharma, A. Sharma, ed.), vol 1, part E, Science Publishers, Enfield, Jersey, Plymouth, 1-14.
- [3] Dellaporta S.L., J. Wood, J.B. Hicks, 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reports*, 1: 19-21.
- [4] De Pace C., D. Snidaro, M. Ciaffi, D. Vittori, A. Ciofo, A. Cenci, O.A. Tanzarella, C.O. Qualset, G.T. Scarascia Mugnozza, 2001. Introgression of *Dasyphyrum villosum* chromatin into common wheat improves grain protein quality. *Euphytica*, 117: 67-75.

- [5] Gradzielewska A., 2006. The genus *Dasypyrum* - part 2. *Dasypyrum villosum* - a wild species used in wheat improvement. *Euphytica*, 152: 441-454.
- [6] Endo T.R., 1990. Gc chromosomes and their induction of chromosome mutations in wheat. *Japanese Journal of Genetics*, 65: 135-152.
- [7] Endo T.R., 2007. The gametocidal chromosomes as a tool for chromosome manipulation in wheat. *Chromosome Research*, 15: 67-75.
- [8] Han F.P., G. Fedak, T. Queller, B. Liu, 2003. Rapid genomic changes in interspecific and intergeneric hybrids and allopolyploids of *Triticeae*. *Genome*, 46: 716-723.
- [9] Minelli S., M. Ceccarelli, M. Mariani, C. De Pace, P.G. Cionini, 2005. Cytogenetics of *Triticum* × *Dasypyrum* hybrids and derived lines. *Cytogenetic and Genome Research*, 109: 385-392.
- [10] Qualset C.O., G.Y. Zhong, C. De Pace, P.E. McGuire, 1993. Population biology and evaluation of genetic resources of *Dasypyrum villosum*. In: *Biodiversity and wheat improvement* (A.B. Damania, ed.), John Wiley & Sons, Chichester, 227-233.
- [11] Schwarzsacher T., P. Heslop-Harrison, 2000. Practical *in situ* hybridization. BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- [12] Schwarzsacher T., A.R. Leitch, M.D. Bennett, J.S. Heslop-Harrison, 1989. *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. *Annals of Botany*, 64: 315-324.
- [13] Shaked H., K. Kashkush, H. Ozkan, M. Feldman, A.A. Levy, 2001. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. *Plant Cell*, 13: 1749-1759.
- [14] Strampelli N., 1932. Origini, sviluppi, lavori, e risultati. Istituto Nazionale di Genetica per la Cerealicoltura, Roma.
- [15] Vaccino P., R. Banfi, M. Corbellini, C. De Pace, 2010. Broadening and improving the wheat genetic diversity for end-use grain quality by introgression of chromatin from the wheat wild relative *Dasypyrum villosum*. *Crop Science*, 50: 528-540.
- [16] Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van der Lee, M. Hornes *et al.*, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research*, 23: 4407-4414.
- [17] Weissmann S., M. Feldman, J. Greseel, 2005. Sequence evidence for sporadic intergeneric DNA introgression from wheat into a wild *Aegilops* species. *Molecular Biology and Evolution*, 22: 2055-2062.
- [18] Yan L., M. Helguera, K. Kato, S. Fukuyama, J. Sherman, J. Dubcovsky, 2004. Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploid wheat. *Theoretical and Applied Research*, 109: 1677-1686.
- [19] Zhang X.K., Y.G. Xiao, Y. Zhang, X.C. Xia, J. Dubcovsky, Z.H. He, 2008. Allelic variation at the vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1* and *Vrn-B3* in Chinese wheat cultivars and their association with growth habit. *Crop Science*, 48: 458-470.

*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*

