



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO
DIPARTIMENTO DI DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE E FORESTALI (DAFNE)

Dottorato di Ricerca in
Biotechnologie Vegetali - XXVIII Ciclo

Effetti a livello fenotipico, citogenetico e genomico conseguenti
all'introgressione in frumento duro di segmenti cromosomici della specie
affine *Thinopyrum ponticum*
(s.s.d. AGR/07)

Tesi di dottorato di:

Dott. Maria Elena Virili

Coordinatore del corso

Prof. Stefania Masci

Tutore

Prof. Carla Ceoloni

29/06/2016

1. INTRODUZIONE	1
1.1. Il frumento ai giorni d'oggi	1
1.1.1. Coltivazione del frumento: le problematiche attuali, la produzione e le richieste di mercato 1	
1.1.2. L'ideotipo di frumento: cosa è stato fatto e su cosa si può intervenire per aumentare le produzioni in maniera sostenibile	2
1.2. Le origini del frumento e la sua variabilità genetica.....	7
1.2.1. La storia evolutiva del frumento	7
1.2.2. Specie selvatiche: nuova variabilità genetica da esplorare	10
1.3. Trasferimento cromosomico di geni utili da specie selvatiche affini al frumento: le tappe dell'ingegneri cromosomica	13
1.3.1. Nuovi strumenti di selezione e caratterizzazione di prodotti di ingegneria cromosomica	16
1.4. Il genere <i>Thinopyrum</i> e la specie <i>Thinopyrum ponticum</i>, valida risorsa per il <i>breeding</i> del frumento	19
1.4.1. <i>Th. ponticum</i> geni sul gruppo di omeologia 7.....	20
1.4.1.1. Geni di resistenza ed il gene <i>Yp</i>	21
1.4.1.2. QTL che influenzano positivamente la produttività	27
1.4.1.3. Geni per la segregazione distorta (<i>Sd</i>)	29
1.5. Ibridazione interspecifica: effetti sul <i>pattern</i> di metilazione del DNA	31
2. SCOPO DEL LAVORO	35
3. MATERIALI E METODI	37
3.1. Materiale Vegetale.....	37
3.1.1. Materiale vegetale per l'analisi dell'architettura radicale.....	37
3.1.2. Materiale Vegetale per l'analisi di metilazione del DNA	38
3.2. Metodi.....	39
3.2.1. Analisi dell'architettura del sistema radicale (RSA) attraverso micro-metodi	39
3.2.1.1. <i>Paper no-roll</i>	39
3.2.1.2. Rizotroni.....	41
3.2.1.3. <i>Paper roll</i> o <i>Cigar roll</i>	42
3.2.2. Analisi statistica dei dati	45
3.2.3. Analisi di metilazione del DNA	46
3.2.3.1. Estrazione del DNA	46
3.2.3.2. Saggio immunologico ELISA per la quantizzazione delle citosine metilate (5-mC).....	47

3.2.3.3.	Analisi MSAP (Methylation Sensitive Amplification Polymorphism).....	49
4.	RISULTATI.....	54
4.1.	Analisi del sistema dell'architettura radicale (RSA) in linee ricombinanti e di traslocazione di <i>Th. ponticum</i> in frumento duro e tenero attraverso diversi micro-metodi.....	54
4.1.1.	Dissezione funzionale-strutturale del 7AgL presente nelle NIRLs frumento duro- <i>Th. ponticum</i> per caratteristiche dell'apparato radicale	54
4.1.2.	Analisi del contributo sull'architettura radicale di due diverse accessioni del <i>Th. ponticum</i> in NILs di frumento tenero	60
4.2.	Analisi dell'architettura radicale delle linee ricombinanti e di traslocazione di frumento duro e tenero – <i>Th. ponticum</i> (NILs) in risposta ad una bassa disponibilità idrica.....	63
4.2.1.	Linee ricombinanti di frumento duro – <i>Th. ponticum</i>	64
4.2.2.	Linee di traslocazione frumento tenero – <i>Th. ponticum</i>	68
4.3.	Impatto del trasferimento di diversi segmenti 7AgL in frumento duro: analisi di metilazione del DNA nelle coppie di NIRLs (R5, R112, R23) in diversi stadi di sviluppo.....	72
4.3.1.	Variazione globale delle 5-mC fra le NIRLs di frumento duro.....	72
4.3.2.	Analisi del pattern di metilazione delle NIRLs di frumento duro con l'approccio MSAP.....	75
6.	Discussione	91
7.	Bibliografia	104

1. INTRODUZIONE

1.1. Il frumento ai giorni d'oggi

1.1.1. Coltivazione del frumento: le problematiche attuali, la produzione e le richieste di mercato

A fronte dei cambiamenti climatici e della crescente scarsità di acqua e di terreni coltivabili, insieme ai problemi per la sicurezza alimentare, vi è la necessità di aumentare la produzione e la resa delle colture agrarie alla base della dieta umana in tutto il mondo, quali frumento, riso e mais. Per la continua crescita demografica e l'innalzamento degli standard di vita, la domanda di questi cereali, principalmente frumento e mais (Hoisington *et al.*, 1999; Ortiz *et al.*, 2008), è in costante aumento, soprattutto nei Paesi in via di sviluppo. Entro il 2050, con una popolazione attesa raggiungere i 9 miliardi (Evans, 2009), la produzione di questi cereali dovrà essere incrementata del 60% rispetto a quanto raggiunto negli ultimi anni (Alexandratos and Bruinsma, 2012). Questo traguardo difatti rappresenta uno degli obiettivi più urgenti ed impegnativi del *breeding* (FAO, 2013; Fisher *et al.*, 2014).

Nella seconda metà del ventesimo secolo l'incremento delle rese dei tre principali cereali (frumento, riso e mais) sono stati significativi, mentre negli ultimi anni non si sono registrati aumenti superiori all'1% annuo (Fischer and Edmeades, 2010; Fischer *et al.*, 2009). Questo vale anche per la produzione delle due specie di *Triticum*, sia il frumento tenero (*Triticum aestivum* L.) che il duro (*T. durum* L.), tra le specie più coltivate al mondo, con una produzione di 699.4 milioni di tonnellate annue stimate nel 2011-2012 (FAO, 2012a,b), il primo essendo più importante a livello mondiale per superficie di coltivazione, produzione e commercio (Curtis and Halford, 2014; FAO, 2014). D'altra parte, l'importanza economica del frumento duro sta aumentando non solo nelle aree di coltivazione tradizionali, come l'Europa e le regioni del Nord Africa che circondano il bacino del Mar Mediterraneo, ma anche in Nord America (Canada e USA), Messico, Medio Oriente (soprattutto Turchia e Siria), Asia centrale (soprattutto Kazakhstan) e Australia (Le Lamer and Rousselin, 2011).

Il frumento presenta inoltre, rispetto alle principali colture annuali come mais e riso, una migliore adattabilità, dovuta soprattutto alla condizione allopoliploide, che ne ha consentito la diffusione in areali complessivamente molto più ampi e diversificati; ciò lascia prevedere l'ulteriore diffusione della sua coltivazione, soprattutto in vista dei cambiamenti climatici globali che di fatto stanno incidendo sempre più negativamente sugli agro-sistemi (Hillel and

Rosenzweig, 2012) e quindi anche sulla produzione cerealicola mondiale. Infatti, anche se il tasso assoluto di resa dei cereali negli ultimi 50 anni ha mostrato un aumento lineare, grazie alla spinta data dalla “Rivoluzione Verde” avvenuta nella seconda metà del 20° secolo, negli ultimi due decenni tale incremento sembra aver raggiunto il suo *plateau*, sia per il frumento duro che per il tenero, con una preoccupante tendenza al calo in stabilità e resa (Calderini and Slafer, 1999; De Vita *et al.*, 2010; Royo *et al.*, 2008).

La resa, l’adattabilità agli *stress* biotici ed abiotici, così come la caratterizzazione e l’ampliamento della variabilità genetica sono aspetti fondamentali su cui concentrarsi nei programmi di *breeding*, al fine di aumentare la produttività delle colture del 2%, ritenuto essere necessario per arrivare nel 2050 alle 900 milioni di tonnellate annue della richiesta alimentare prevista (Rosegrant *et al.*, 2008).

In questa ottica le sfide da affrontare e superare sono diverse, come i cambiamenti climatici, i patogeni emergenti e il restringimento della base genetica del frumento.

1.1.2. L’ideotipo di frumento: cosa è stato fatto e su cosa si può intervenire per aumentare le produzioni in maniera sostenibile

L’importanza del frumento come coltura e gli sforzi messi in atto per il suo miglioramento hanno dato esito positivo per tutta la durata del 20° secolo. Questi si sono raggiunti durante le cosiddette “Rivoluzioni Verdi”, iniziando da quella guidata dal *breeders* italiano Nazzareno Strampelli nei primi decenni del secolo scorso (Worland, 1999), seguita da quella portata avanti dal premio Nobel Norman Borlaug e dai suoi collaboratori a partire dagli anni ’60-’70 (CIMMYT; Borlaug, 1968). Grazie a questi programmi di miglioramento sono stati raggiunti eccellenti risultati; ne è un esempio l’introggressione, da cultivar giapponesi, di geni che controllano l’altezza della pianta (*Rht1* e *Rht2*), che hanno consentito l’abbassamento della taglia di varietà coltivate in tutto il mondo, eliminando così i problemi di allettamento, anche in coincidenza di più elevate concentrazioni di concimi azotati. E’ altresì aumentata l’efficienza nell’uso dei nutrienti (rapporto *source/sink*), la capacità di accestimento ed anche un incremento considerevole dell’*harvest index* (HI = indice di raccolta, ovvero rapporto tra biomassa in granella e biomassa totale), anche in questo caso consentendo un maggior impiego di fertilizzanti e quindi un aumento delle rese. A livello globale, la resa del frumento prima della “Rivoluzione Verde” cresceva dell’1,5% annuo, mentre negli anni successivi (1966-1979), nei Paesi in via di

sviluppo (principalmente in Asia), è aumentata fino al 3,6% per anno (Dixon *et al.*, 2009). Tuttavia, anche se le prestazioni complessive di molte varietà coltivate sono notevolmente migliorate per effetto degli interventi genetici, un contributo notevole è stato quello degli aumentati *input* alle colture sotto forma di pesticidi, fertilizzanti e irrigazione. Inoltre, la selezione è stata concentrata su una gamma relativamente ristretta di caratteri, correlati alle rese e alla risposta ad elevati *input*, ciò comportando un restringimento della base genetica dei frumenti su cui continuare l'attività di miglioramento e selezione. Come detto in precedenza (vedi §1.1), l'aumento delle rese è andato diminuendo progressivamente sia in frumento duro che tenero. Le indagini condotte sul germoplasma Canadese (McCaig and Clarke, 1995), Italiano e Spagnolo (Royo *et al.*, 2008) e anche prodotto dal CIMMYT (Pfeiffer *et al.*, 1996), hanno indicato un andamento simile, confermando il raggiungimento di un *plateau* nell'incremento delle rese in questi ultimi vent'anni per entrambe le specie di frumento ed una evidente riduzione della stabilità della produzione, probabilmente associato anche ad un'instabilità del clima (Calderini and Slafer, 1999; Royo *et al.*, 2008; De Vita *et al.*, 2010).

Gli avanzamenti ottenuti fino ad oggi nell'incremento delle rese sono corrisposti ad un aumento dell'HI, sia in frumento tenero (Fisher *et al.*, 2009, 2011; Reynolds *et al.*, 2009) che duro (De Vita *et al.*, 2007). Tuttavia, in questi due ultimi decenni, a fronte di valori massimi teorici del 62%, l'HI non va oltre valori del 55% (Gaju *et al.*, 2009; Reynolds *et al.*, 2009; Foulkes *et al.*, 2011). Tale differenza è più marcata nel frumento duro che nel tenero, indicando la scarsa possibilità di un ulteriore miglioramento (Royo *et al.*, 2007). D'altra parte, è largamente riconosciuto che un'addizionale resa in granella può essere ottenuta, senza avere ripercussioni significative sull'HI, incrementando la biomassa totale e quella concentrata nel “*sink*”, ovvero a livello delle spighe e semi (Fischer *et al.*, 2009; Reynolds *et al.*, 2009; Fischer and Edmeades, 2010; Foulkes *et al.*, 2011; Bustos *et al.*, 2013; Czychyło-Mysza *et al.*, 2013; Curtis and Halford, 2014). È stato suggerito che migliorando l'efficienza di utilizzo delle risorse si può efficacemente aumentare la biomassa (Hawkesford *et al.*, 2013) e ciò potrebbe essere realizzato aumentando la superficie fotosintetizzante e/o l'efficienza di utilizzo della luce da parte della porzione vegetativa e della spiga (Zhu *et al.*, 2010; Parry *et al.*, 2011), prolungando l'attività fotosintetica delle foglie soprattutto durante il periodo di fioritura (Fischer *et al.*, 2009; Reynolds *et al.*, 2009; Fischer and Edmeades, 2010). Inoltre, ad un ulteriore incremento del potenziale di rendimento può contribuire anche un aumento della capacità di assorbimento (*sink*) durante la fase di riempimento della granella (Miralles and Slafer, 2007; Reynolds *et al.*, 2005, 2009), quando il frumento può risultare essere carente di risorse idriche e nutritive. All'incremento delle rese in granella contribuiscono sia le dimensioni del seme, probabilmente in maniera più

significativa, il numero di semi (per spiga o per m²), quest'ultimo carattere è il fattore più importante sia in frumento tenero (Reynolds *et al.*, 2009; Fischer, 2011) che nel duro (De Vita *et al.*, 2007; Pedro *et al.*, 2011). Nel complesso, quindi, vi sono diversi fattori che possono influire sulla fertilità della spiga e sulla ripartizione degli assimilati durante lo sviluppo di questa, rappresentando quindi dei *target* su cui il *breeding* può ancora concentrarsi (Reynolds *et al.*, 2009).

L'aumento della temperatura globale sta causando sempre più frequenti fenomeni di carenza idrica (Prasch and Sonnewald, 2013), definibili come un *deficit* di acqua nel suolo o come un'indisponibilità all'assorbimento di questa, seppur presente (es. suoli salini) (Harb *et al.*, 2010). Una crescente e persistente aridità è stata osservata a partire dalla metà del 20° secolo (Dai, 2013) ed in concomitanza con gli altri cambiamenti climatici, sta portando allo spostamento degli areali di coltivazione tradizionali del frumento, verso zone meno aride e calde (Fischer and Edmeades, 2010; Ceoloni *et al.*, 2014a). L'incremento dello *stress* idrico, insieme ad una rapida degradazione della fertilità del terreno, stanno quindi diventando le principali fonti di *stress* abiotico a carico delle colture, incluso il frumento, riducendone sia le aree vocate alla coltivazione sia le rese.

In questo contesto, le radici, la parte “nascosta” della pianta, coinvolte in numerose funzioni, sono divenute una parte dell'architettura vegetale la cui importanza per la produttività e la resa delle colture, risulta ormai difficile da trascurare (MacMillan *et al.*, 2006). Con Architettura del Sistema Radicale (RSA = Root System Architecture) viene indicata la configurazione spaziale di un sistema radicale. Il termine sottintende un complesso di caratteri anatomico-morfologici, agronomici e di sviluppo, con implicazioni dirette sull'architettura complessiva dell'impianto, sul tasso di crescita e di resa, così come sulla resistenza a *stress* abiotici e, contestualmente, con l'assorbimento dei nutrienti ed infine sulla plasticità di sviluppo in risposta ai cambiamenti ambientali (Fitter and Stickland, 1991; Sanguineti *et al.*, 2007; Dorlodot *et al.*, 2007; Jung and McCouch, 2013; Petrarulo *et al.*, 2015).

La configurazione tridimensionale di un apparato radicale ha una rilevanza di tipo meccanico (ancoraggio fisico della pianta al suolo) e fisiologico (assorbimento di nutrienti ed acqua ed in risposta ai bioti nel suolo). Il tasso di crescita radicale così come la sua diffusione verticale e orizzontale sono in grado di influenzare la vigoria della pianta, la capacità di competere con le infestanti e di assimilare in modo efficace le risorse limitate come fosforo, azoto ed acqua, direttamente o anche attraverso rapporti simbiotici (MacMillan *et al.*, 2006; Jung and McCouch, 2013; Koebernick *et al.*, 2015). Le specifiche caratteristiche di crescita e sviluppo del sistema radicale di una pianta conferiscono anche un certo grado di plasticità durante lo sviluppo nella

gestione dei nutrienti e delle risorse idriche disponibili, nell'adattamento ai cambiamenti stagionali e/o climatici ed alla presenza di patogeni o sostanze tossiche nel suolo. Ne deriva che l'architettura dell'apparato radicale di una pianta oltre ad avere importanza per l'ancoraggio, l'acquisizione e lo sfruttamento dei nutrienti e nella plasticità di sviluppo, può avere effetti di larga portata sulla massimizzazione delle rese e nel garantirne la stabilità, in particolare in condizioni di *stress* (Dorlodot *et al.*, 2007; Hammer *et al.*, 2009; Tardieu and Tuberosa, 2010; Lynch, 2013; White *et al.*, 2013; Meister *et al.*, 2014), offrendo nuove opportunità di intervento per il *breeding*.

L'influenza dell'RSA sulle rese e su altri importanti caratteri è ampiamente dimostrata, soprattutto in condizioni di *stress*, in tutte le principali colture (Passioura, 1972; Price *et al.*, 2002; Tuberosa *et al.*, 2007); ciò ha stimolato sempre più l'attenzione verso i QTL (Quantitative Trait Loci) che controllano i numerosi caratteri espressi dalle radici. Fino ad oggi la ricerca si è concentrata su specie erbacee, come il riso e l'orzo, anche se almeno altre 15 specie sono state analizzate, inclusa la pianta modello *Arabidopsis* e alcune arboree (Dorlodot *et al.*, 2007), portando all'identificazione di alcuni QTL per caratteri dell'RSA coinvolti nella risposta a fattori ambientali, come l'azoto in *Arabidopsis* (Rauh *et al.*, 2002), l'alluminio in sorgo (Magalhaes *et al.*, 2004), l'arsenico in riso (Dasgupta *et al.*, 2004), il fosforo in riso, fagiolo ed *Arabidopsis* (Wissuwa *et al.*, 2002; Ochoa *et al.*, 2006; Reymond *et al.*, 2006), nonché QTL che influenzano l'architettura radicale in mais, con o senza imposizione di *stress* (Giuliani *et al.*, 2005; Landi *et al.*, 2005; Salvi *et al.*, 2016). QTL per la lunghezza e per la produzione di radici laterali sono stati individuati in riso, dimostrando che un accrescimento in lunghezza dell'apparato radicale conferisce una maggiore tolleranza allo *stress* idrico (Horie *et al.*, 2005; Steele *et al.*, 2007; Henry *et al.*, 2011; Kano *et al.*, 2011). A tal proposito è stato rilevato che lo *stress* idrico, applicato in stadio di plantula, in frumento può indurre un allungamento delle radici ed un aumento della superficie radicale (Kimurto *et al.*, 2005); in frumento tenero è stato inoltre osservato una correlazione positiva tra il vigore fogliare e un aumento della biomassa radicale, della lunghezza e della densità delle radici durante l'accrescimento in condizioni di scarsa disponibilità idrica (Palta *et al.*, 2011). Evidentemente, la capacità di una pianta di accrescere le sue radici verso gli strati più profondi di un terreno, dove l'acqua è maggiormente disponibile, è un elemento cruciale per sostenere la crescita durante la fase vegetativa e, soprattutto, durante la delicata fase di riempimento della granella (Richards and Passioura, 1981a,b; El-Hafid *et al.*, 1998; Kashiwagi *et al.*, 2005; Sanguineti *et al.*, 2007). Oltre ai caratteri suddetti anche l'angolo di diffusione radicale e il numero delle radici seminali, valutati in fase di plantula, danno un'indicazione dell'adattabilità delle colture allo *stress* idrico, sia negli stati di sviluppo iniziali

che in quelli più avanzati (riscontrato sia in mais che in frumento; Canè *et al.*, 2014; Salvi *et al.*, 2016). Il numero delle radici è predittivo del volume di radicazione, ovvero della “porzione di suolo esplorata” dalla pianta nelle fasi iniziali di sviluppo (radici seminali) e durante la fase adulta, con la produzione delle radici laterali. L’angolo di diffusione radicale fornisce una capacità aggiuntiva, con un ruolo critico per la capacità della coltura di affrontare condizioni di scarsa disponibilità idrica e/o altri vincoli ambientali, quali un elevato pH, ioni tossici, scarsa disponibilità di nutrienti (Devaiah *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007), che possono presentarsi lungo il profilo del suolo (Sanguineti *et al.*, 2007). La valutazione di tale angolo allo stadio di plantula può essere inoltre utilizzato per predire la ripartizione della biomassa radicale lungo il profilo del terreno allo stadio di pianta adulta, caratteristica rilevante in frumento per un efficiente utilizzo delle risorse idriche (Reynolds *et al.*, 2007; Christopher *et al.*, 2013). Ciò nonostante, pochi sono i risultati disponibili sulla variabilità genetica per tali numerosi caratteri radicali in frumento duro, né sono stati trovati QTL realmente efficaci (Sanguineti *et al.*, 2007; Palta *et al.*, 2011; Christopher *et al.*, 2013; Canè *et al.*, 2014).

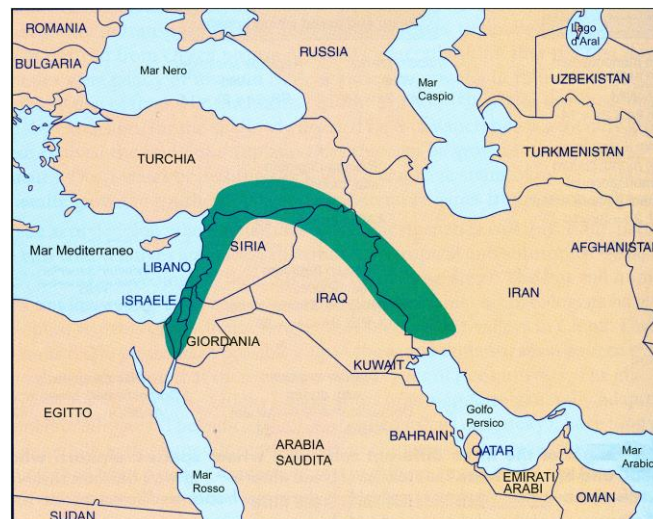
Pertanto l’ideotipo di frumento a cui è auspicabile che puntino gli attuali e futuri miglioratori, dovrà tener conto delle evoluzioni sociali ed ambientali in atto, cercando di innalzare le rese unitarie, in vista della riduzione delle superfici destinate alla coltivazione, ma anche mirando alla massima salubrità e sostenibilità complessiva delle produzioni. Inoltre i programmi di *breeding* dovranno agire su più fronti, ovvero valutare l’architettura della pianta nella sua totalità, in modo da raggiungere quella plasticità nel tempo e nello spazio da consentire un incremento delle rese e del mantenimento di queste anche in caso di *stress*. Per il raggiungimento di tali obiettivi un requisito essenziale è rappresentato dall’ampliamento della variabilità genetica, rivolgendosi anche alle specie selvatiche affini al frumento che possono offrire alleli favorevoli per il miglioramento di numerosi caratteri, del germoplasma coltivato.

1.2. Le origini del frumento e la sua variabilità genetica

1.2.1. La storia evolutiva del frumento

Il frumento tenero, esaploide (*Triticum aestivum* L.), e il frumento duro, tetraploide (*T. durum* L.), appartengono al genere *Triticum*, sottotribù delle *Triticinae*, tribù delle *Triticeae*, famiglia delle *Poaceae* (*Graminaeae*). Si tratta di graminacee annuali, appartenenti al complesso tassonomico *Triticum-Aegilops*, con centro d'origine primario e massima diversità nelle aree steppiche del Mediterraneo centro-orientale, regioni caucasiche e Medio Oriente (Fig. 1).

Figura 1: Mezzaluna fertile: centro di origine primario dei generi *Triticum* ed *Aegilops*.



Kihara (1919) e Sax (1922) dimostrarono l'appartenenza di tutte le *Triticinae* ad un ampio gruppo avente numero cromosomico di base $x = 7$. A partire da tale evidenza, le *Triticinae* vennero suddivise, in base al diverso livello di ploidia, in diploidi ($2n = 2x = 14$), tetraploidi ($2n = 4x = 28$) ed esaploidi ($2n = 6x = 42$).

I diversi genomi, presenti nei frumenti poliploidi, condividono una notevole affinità intergenomica, tale da farli considerare degli allopoliploidi segmentali piuttosto che genomici. In effetti, ogni cromosoma di un dato genoma (es. A) ha un suo “corrispondente” nell'altro genoma (B nel caso del frumento duro) o negli altri (BD, se ci riferiamo al frumento tenero), definito per questo motivo “omeologo”. Partendo da ciò, sono stati identificati sette gruppi di omeologia, il numero essendo corrispondente al numero cromosomico di base ($x = 7$). Questa peculiarità è stata inizialmente dimostrata attraverso evidenze citogenetiche (Sears 1952, 1956, 1966) ed in modo particolare dalla possibilità di creare linee nulli-tetrasomiche stabili, dove la mancanza di

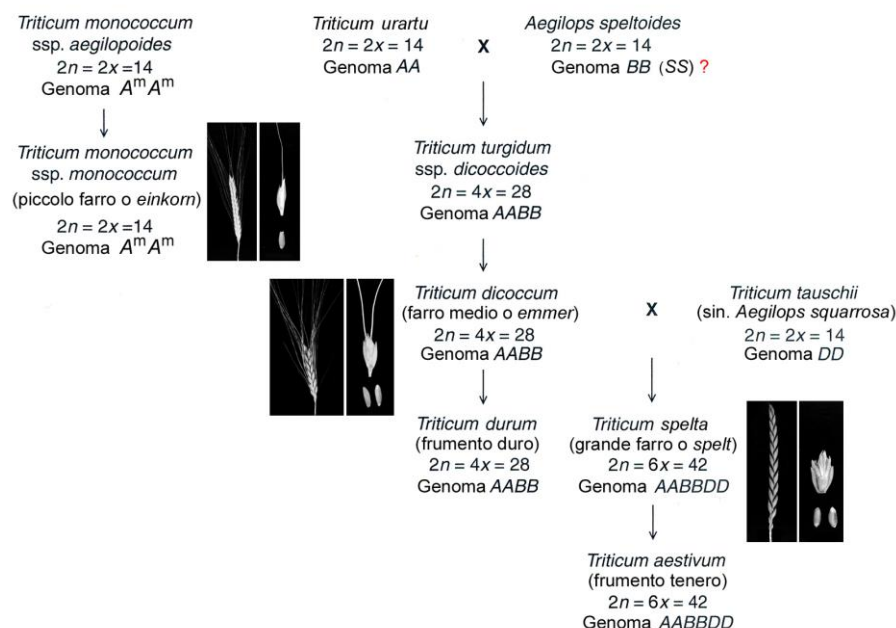
una coppia cromosomica (es. nulli 1A) è funzionalmente “compensata” da un’extra dose di un’altra dello stesso gruppo di omeologia (es. tetra 1B).

Numerosi studi (Fedman *et al.*, 1995; Zhang, 2002), basati su analisi citogenetiche (cariotipo, appaiamento cromosomico) e molecolari (vari tipi di marcatori), hanno consentito l’individuazione, sempre più puntuale, delle specie donatrici dei diversi genomi che costituiscono gli attuali frumenti poliploidi coltivati.

Il frumento duro e quello tenero derivano da un processo caratterizzato da eventi di ibridazione interspecifica seguita dal raddoppiamento cromosomico (poliploidizzazione): due specie diploidi selvatiche ($2n = 2x = 14$), il *Triticum urartu* con genoma AA ed una *Aegilops*, con genoma simile a quelle dell’odierno gruppo delle Sitopsis, in particolare ad *Ae. speltoides*, avente genoma SS (il genoma S risulta molto simile al genoma B dei frumenti poliploidi), diedero origine al progenitore tetraploide selvatico (*Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides*, $2n = 4x = 28$) del farro dicocco (*Triticum dicoccum*, *emmer*), la forma domesticata con genoma AABB, che comparve nella Mezzaluna Fertile circa 9000 anni fa. Da questo antenato si originò la specie *Triticum turgidum* subsp. *durum*, l’attuale frumento duro, impiegato maggiormente in epoca moderna per la produzione di pasta.

L’espansione del *Triticum dicoccum* fu molto rapida, arrivando fino alle regioni del Mar Caspio, dove, in seguito all’ibridazione con un’altra specie selvatica diploide, l’*Aegilops squarrosa*, nota anche come *Aegilops* o *Triticum tauschii* ($2n = 2x = 14$, genoma DD), ebbe origine il primo frumento esaploide, *Triticum spelta* ($2n = 4x = 48$, con genoma AABBDD), riportato anche come grande farro o *spelt*. L’odierna ipotesi presuppone che l’attuale frumento tenero o *Triticum aestivum* subsp. *aestivum*, impiegato per la produzione di pane, sia il frutto della domesticazione dello *spelta* (Fig. 2).

Figura 2: Origine delle forme coltivate di frumento.



Il frumento è stato tra le prime specie oggetto di domesticazione tanto che la sua coltivazione ha riguardato areali molto più ampi rispetto alle sue condizioni di crescita ottimali (latitudini fra 30° e 60°N e 27° e 40°S). La diffusione di questo cereale in diversi ambienti, associata con l'attività di selezione antropica, ha contribuito alla creazione di “*land races*” (razze locali), popolazioni geneticamente eterogenee, ben adattate alle più diverse condizioni ambientali.

Nelle fasi iniziali del miglioramento genetico, in un primo momento anche all'oscuro delle leggi di Mendel, la variabilità genetica contenuta nelle razze locali venne sempre più coscientemente utilizzata in programmi sistematici, mirati alla creazione di varietà omogenee. Tali programmi, in combinazione con le innovazioni agronomiche, trovarono la loro massima espressione durante il secolo scorso nelle “Rivoluzioni Verdi” (vedi § 1.1.2).

Il risultato di tale operato, soprattutto quello condotto su più larga scala dal CIMMYT, fu di cambiare totalmente il panorama varietale internazionale e nuove varietà di frumento adatte ai diversi ambienti pedo-climatici sono state via via prodotte, sempre più rispondenti ai molteplici ed ingenti *input* energetici della moderna agricoltura intensiva (§ 1.1.2).

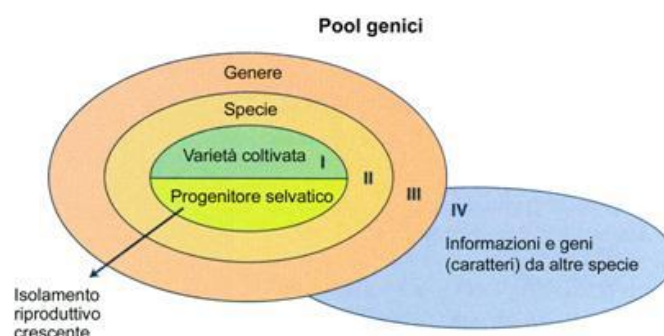
I traguardi raggiunti, largamente positivi, sono il risultato di una prolungata pressione selettiva a favore di alcuni, pur rilevanti obiettivi (es. l'abbassamento della taglia), ma a discapito di altri. La diffusione su scala mondiale di un numero relativamente limitato di varietà, fra loro relativamente simili, è stato causa di un forte restringimento della base genetica disponibile per ulteriori scopi migliorativi.

1.2.2. Specie selvatiche: nuova variabilità genetica da esplorare

A fronte della ristretta variabilità genetica entro le specie, negli ultimi anni si è andata sviluppando un nuovo concetto di *breeding*, indicato come “*smart breeding*” (McCouch, 2004). Questo nuovo approccio sostiene l'utilizzo intelligente delle risorse naturali, tenendo conto delle attuali esigenze di eco-sostenibilità delle colture, utilizzando in modo efficiente le nuove tecnologie. L'erosione genetica potrebbe così essere arginata e la variabilità genetica notevolmente aumentata ricorrendo non soltanto al germoplasma dei frumenti coltivati, ma anche alle specie selvatiche affini, come donatori di caratteri utili (ad esempio componenti della resa, Reynolds *et al.*, 2001), per la risposta alla siccità (Dodig, 2010) e per la tolleranza ad altri stress (Takeda and Matsuka, 2008).

Come detto, i frumenti coltivati appartengono ad un complesso tassonomico ricco di specie, da cui è possibile trasferire, mediante ricombinazione, caratteri d'interesse (come sarà discusso più avanti, vedi §1.4). Il primo passo necessario è l'identificazione e la caratterizzazione dei genomi donatori e dei loro singoli cromosomi, in particolare quello/i su cui il gene/i di interesse è localizzato, e definire i loro rapporti citogenetici (omologia/omeologia) con quelli della specie ricevente. Come per le altre specie, le risorse genetiche disponibili per il *breeding* del frumento possono essere raggruppati in *pool* genici (primario, secondario e terziario. Fig. 3) in base alla relativa affinità filogenetica, che corrisponde a rapporti di omologia piuttosto che di omeologia tra i relativi genomi e cromosomi, (Tab. 1) e, su questa base, ad una maggiore o minore possibilità di ricombinazione tra gli stessi (Feldman, 1979).

Figura 3: Rappresentazione grafica di pool genici di specie più o meno strettamente correlate.



Le specie appartenenti al *pool* primario condividono una piena omologia con i genomi dei frumenti coltivati e non vi è nessun ostacolo che limiti la ricombinazione tra i rispettivi cromosomi; vi rientrano le accessioni di frumento esaploide e tetraploide e le specie donatrici dei genomi A e D (presenti nei *Triticum* coltivati).

Tabella 1: Specie di Triticeae raggruppate secondo i rapporti filogenetici con i genomi di frumento tenero e duro (in parte da Feldman, 1979).

Tipo di affinità intergenomica	Specie	Genoma
I. SPECIE CON GENOMI OMOLOGHI		
1. I progenitori più prossimi	<i>T. turgidum</i> var. <i>dicoccoides</i>	AB
2. Diploidi donatori dei genomi A e D	<i>T. urartu</i>	A
	<i>T. monococcum</i> var. <i>boeoticum</i>	A
	<i>T. tauschii</i> (= <i>Ae. tauschii</i> , <i>Ae. squarrosa</i>)	D
3. Poliploidi che condividono un genoma		
a. genoma A	<i>T. timopheevii</i>	AG, AAG
b. genoma D	<i>T. crassum</i> (= <i>Ae. crassa</i>)	DM ^{cr}
	<i>T. ventricosum</i> (= <i>Ae. ventricosa</i>)	DM ^v
	<i>T. cylindricum</i> (= <i>Ae. cylindrica</i>)	CD
	<i>T. juvenile</i> (= <i>Ae. juvenalis</i>)	DM ^{cr} C ^u
II. SPECIE CON GENOMI OMEOLOGHI		
1. Specie strettamente affini	<i>T. searsii</i> (= <i>Ae. searsii</i>)	S ^s
	<i>T. longissimum</i> (= <i>Ae. longissima</i>)	S ^l
	<i>T. bicornis</i> (= <i>Ae. bicornis</i>)	S ^b
	<i>T. speltoides</i> (= <i>Ae. speltoides</i>)	S
	<i>T. variabilis</i> (= <i>Ae. . variabilis</i>)	C ^u S ^v
	<i>T. kotschyi</i> (= <i>Ae. kotschyi</i>)	C ^u S ^v
2. Specie meno affini	<i>T. tripsacoides</i> (= <i>Ae. mutica</i>)	M ^t
	<i>T. dichasians</i> (= <i>Ae. caudata</i> , <i>Ae. markgrafii</i>)	C, M
	<i>T. comosum</i> (= <i>Ae. comosa</i>)	M ^u
	<i>T. uniaristatum</i> (= <i>Ae. uniaristata</i>)	C ^u
	<i>T. umbellulatum</i> (= <i>Ae. umbellulata</i>)	C ^u M ^o
	<i>T. ovatum</i> (= <i>Ae. ovata</i>)	C ^u M ^t
	<i>T. triaristatum</i> (= <i>Ae. triaristata</i>)	C ^u M ^t M ^{t2}
	<i>T. macrochaetum</i> (= <i>Ae. biuncialis</i>)	C ^u M ^b
	<i>T. columnare</i> (= <i>Ae. columnaris</i>)	C ^u M ^c
	<i>T. triunciale</i> (= <i>Ae. triuncialis</i>)	C ^u C
3. Specie più distanti	Generi <i>Thinopyrum</i> , <i>Agropyron</i> , <i>Secale</i> , <i>Dasypyrum</i> , <i>Elymus</i> , e altre <i>Triticeae</i>	Vari

Il *pool* genico secondario è costituito da specie per lo più poliploidi che hanno uno o più genomi in comune con i frumenti coltivati, ma con una ricombinazione interspecifica complessivamente ridotta. Numerose specie di *Triticum/Aegilops*, incluse le specie diploidi della sezione Sitopsis (genoma $S \approx B$) sono incluse in questo *pool* genico.

Il *gene pool* terziario comprende specie diploidi e poliploidi più distanti rispetto ai frumenti, con i quali il trasferimento genico può avvenire facendo ricorso a strategie citogenetiche di “ingegneria cromosomica” (vedi più avanti, §1.3). Appartengono a questo gruppo specie di generi noti ed importanti come fonte di variabilità utile, tra cui *Thinopyrum*, *Agropyron*, *Dasyphyrum* e *Secale*,

1.3. Trasferimento cromosomico di geni utili da specie selvatiche affini al frumento: le tappe dell'ingegneri cromosomica

La variabilità genetica delle specie affini al frumento è stata utilizzata per il trasferimento di geni utili già a partire dalla metà del XX secolo (Friebe *et al.*, 1996; Ceoloni *et al.*, 2005b); tuttavia, lo sfruttamento efficace di questa fonte per un'utilizzazione pratica nel *breeding* è ancora da considerare non di larga diffusione, a fronte della disponibilità dei nuovi strumenti metodologici di genetica e citogenetica molecolare che si è venuta a realizzare solo nell'ultimo ventennio (Ceoloni *et al.*, 1998; Varshney *et al.*, 2006; Jiang and Gill, 2006; Qi *et al.*, 2007).

La scelta delle modalità di trasferimento genico, interspecifico o intergenerico, dipende dalla totale o parziale omologia (omeologia) del cromosoma donatore, portatore del gene/i d'interesse, con il corrispondente cromosoma ricevente del frumento (vedi § 1.2.2). In base a questo criterio, si possono attuare diverse procedure per sfruttare la variabilità "aliena" presente in specie affini alle coltivate, partendo dall'incorporazione dell'intero genoma donatore, mediante la formazione di ibridi e raddoppiamento-cromosomico (anfidiplodia), fino all'introggressione di un singolo cromosoma o braccio cromosomico, o soltanto un piccolo segmento cromosomico (Feldman, 1983; Gale and Miller, 1987; Ceoloni, 1987; Ceoloni and Jauhar, 2006; Qi *et al.*, 2007).

In generale si è rilevato che rispetto alle cultivar dei *Triticum* coltivati gli anfidiploidi sono inferiori; a tal proposito, l'unica eccezione è rappresentata dal Triticale, anfidiplode sintetico derivante dall'incrocio tra il tetraploide *T. durum* e la segale, *Secale cereale* L. L'inadeguatezza di tali anfidiploidi, nonostante la stabilizzazione e il recupero della fertilità rispetto all'ibrido F1, deriva dalla quantità eccessiva di geni "indesiderati" del genitore selvatico, che li rende non competitivi rispetto alle cultivar di frumento ben adattate. Questi genotipi sono comunque utili punti partenza per la creazione di linee di addizione o sostituzione di singole coppie cromosomiche nel genoma di frumento, soprattutto tenero, (Feldman and Sears, 1981; Ceoloni and Jauhar, 2006) che, a loro volta, risultano materiali ideali per l'inserimento di segmenti sub-cromosomici nelle linee di frumento riceventi. Il passaggio da anfidiplode a linee di addizione/sostituzione consente sia di verificare l'espressione del gene desiderato, una volta enucleato dalla specie di origine, sia di iniziare la graduale riduzione del materiale genetico del donatore eccedente rispetto al gene *target*, che è poi lo scopo dell' "ingegneria cromosomica".

Con questo termine Sears nel 1972 descrisse originariamente ed applicò ai genomi di frumento e Triticinae più o meno affini, quelle metodologie citogenetiche che consentono di trasferire porzioni sub-cromosomiche contenenti geni utili (ad esempio per resistenza a patogeni).

In un'accezione più ampia, l'ingegneria cromosomica è riferibile a qualsiasi trasferimento tra specie che abbiano almeno una parziale compatibilità sessuale; tuttavia, essa viene impiegata soprattutto nei casi in cui i cromosomi della specie donatrice e della ricevente sono tra loro omeologhi, risultando perciò necessario utilizzare appropriate strategie citogenetiche che favoriscano il verificarsi di scambi tra tali cromosomi e quindi i trasferimenti genici desiderati.

Nella storia di questa, tra i diversi approcci originariamente proposti e utilizzati per ottenere i trasferimenti genici interspecifici vi è l'uso di radiazioni ionizzanti (Sears, 1956; Knott, 1961; Sharma and Knott, 1966), la rottura e fusione spontanea di bracci cromosomici appartenenti a cromosomi diversi, soprattutto omeologhi (Mettin *et al.*, 1973; Zeller, 1973) ed infine l'induzione di appaiamento e ricombinazione tra cromosomi omeologhi. Quest'ultimo approccio consente di ottenere la massima "precisione di intervento", sia in termini di quantità di materiale genetico estraneo che per la relativa "specificità" (= non casualità) del trasferimento nel cromosoma ricevente.

Occorre ricordare che nei frumenti poliploidi, sia tenero che duro, esistono diversi geni implicati nella normale soppressione dell'appaiamento tra i cromosomi omeologhi appartenenti ai diversi genomi (Sears, 1976). All'azione di tali geni, di cui il più potente è il *Ph1* (*Pairing homoeologous*), i frumenti devono il loro comportamento alla meiosi da simil-diploidi, che, con la formazione di soli bivalenti tra coppie di cromosomi omologhi, ne ha garantito la regolarità meiotica, con la conseguente elevata fertilità e quindi il successo evolutivo (Feldman *et al.*, 1995).

In effetti l'assenza del solo *Ph1*, ad eredità dominante e localizzato sul braccio lungo del cromosoma 5 del genoma B (Riley and Chapman, 1958; Sears and Okamoto, 1958) è sufficiente a permettere ai cromosomi omeologhi di appaiarsi e ricombinare, seppur con frequenza inferiore rispetto a quanto avviene tra omologhi. È risultato perciò di fondamentale importanza l'isolamento, sia in frumento tenero (Sears, 1977) che in duro (Giorgi, 1983), di mutanti al locus *Ph1*. Dal momento che il gene *Ph1* normalmente sopprime l'appaiamento tra cromosomi omeologhi sia nel genoma di frumento che in ibridi interspecifici parziali o totali, tali mutanti rappresentano lo strumento essenziale per "accedere" ai genomi/cromosomi omeologhi di Triticeae e quindi trasferire nel materiale coltivato porzioni sub-cromosomiche estranee di entità anche molto contenuta, così da minimizzare la probabilità che, con il gene di interesse, vengano co-trasferiti geni non desiderati della specie donatrice (*linkage drag*).

Tale obiettivo può essere raggiunto anche nel corso di più generazioni, e comunque dipende dalla localizzazione del gene/i *target*. Se il gene presenta una localizzazione distale, dove, peraltro, la frequenza di ricombinazione è più elevata, un singolo scambio può risultare

sufficiente a produrre cromosomi di frumento con brevi segmenti terminali estranei. Se il gene “*alien*” è invece localizzato in posizione più prossimale, scambi singoli in prossimità del gene porterebbero generare ricombinanti con una parte cospicua del braccio sostituito dal segmento estraneo, che avranno, in generale, minor valore applicativo. In tali casi, per ridurre la porzione di cromatina estranea si può ricorrere a ripetuti cicli di ricombinazione omeologa indotta (in presenza di mutazioni al locus *Ph1*). Si è però constatato, in particolare nel frumento duro, che ripetuti cicli di ricombinazione tra cromosomi omeologhi possono provocare una destabilizzazione della meiosi, causando perdite in termini di stabilità e fertilità dei tipi ricombinanti (Ceoloni and Jauhar, 2006).

In alternativa all’approccio appena descritto si può ricorrere alla combinazione di incrocio di due cromosomi ricombinanti, ottenuti in una prima fase del lavoro (ricombinanti “primari”), caratterizzati da una distribuzione “complementare” della cromatina di frumento e di quella estranea (Sears, 1983). Se i ricombinanti in esame sono il prodotto di un singolo evento ricombinativo e se questi presentano il sito di scambio l’uno in posizione prossimale e l’altro in posizione distale rispetto al gene *target*, il gene oggetto del trasferimento si troverà in una porzione “*alien*” comune (omologa), all’interno della quale potrà avvenire un *crossing-over*, tale da produrre un segmento estraneo intercalare di dimensioni sicuramente inferiori a quelle dei ricombinanti primari (Ceoloni *et al.*, 2005b). Il risultato ottenuto sarà equivalente a quello prodotto in un doppio scambio, evento che però risulta estremamente raro tra cromosomi omeologhi anche in condizioni geneticamente permissive (mutazione del locus *Ph1*) (Lukaszewski, 1995).

La casistica dei lavori che dimostrano come le metodologie di ingegneria cromosomica, possano essere utilizzate per introdurre nei frumenti coltivati caratteri di grande interesse presenti in specie affini è senz’altro ampia (vedi, ad esempio, Ceoloni, 1987; Gale and Miller, 1987; Friebe *et al.*, 1996; Ceoloni *et al.*, 2005b; Ceoloni and Jauhar, 2006). Tuttavia, soprattutto se si considerano i prodotti di potenziale o effettivo impiego nel *breeding*, questi sono stati in gran parte ottenuti ingegnerizzando il frumento tenero.

Ciò non è solo dovuto alla maggiore importanza economica di quest’ultimo a livello mondiale, che comunque può aver stimolato una più intensa ricerca, ma anche al fatto che il frumento duro, tetraploide, manifesta una netta diminuzione nella tolleranza verso alterazioni del genoma, soprattutto se di cospicua entità, rispetto a quella che presenta il frumento tenero, esaploide. È per tale motivo che risulta molto più difficile ottenere e mantenere linee aneuploidi di frumento duro rispetto alle possibilità che in tal senso offre, in numero e tipologia, il frumento tenero (Joppa, 1998; Ceoloni *et al.*, 2005b). Per aggirare tale problematica, perciò,

l'introggressione è stata spesso prima condotta nel frumento tenero, poi un tipo ricombinante con poca cromatina estranea è stato selezionato per il trasferimento del gene desiderato anche in frumento duro (Ceoloni *et al.*, 1996; Ceoloni and Jauhar, 2006). Tuttavia, più recentemente, utilizzando opportuni strumenti di selezione (vedi avanti), si è riusciti ad applicare con successo l'ingegneria cromosomica direttamente al frumento duro, trasferendo in questo, anche in combinazione, brevi segmenti cromosomici contenenti geni di resistenza a patogeni (*Lr19*, *Pm13*, *Fhb-7el₂*) e per caratteristiche qualitative (*Glu-D3*, *Glu-D1* e *Yp*) provenienti da tre differenti Triticinae (*Triticum aestivum*, *Aegilops longissima* e *Thinopyrum ponticum*), senza alterare la stabilità del genoma del frumento duro ricevente (Gennaro *et al.*, 2007; Forte *et al.*, 2014).

1.3.1. Nuovi strumenti di selezione e caratterizzazione di prodotti di ingegneria cromosomica

Il progresso tecnologico in Genetica e Citogenetica, associato alla recente “*Genomics revolution*”, ha permesso non solo di migliorare la comprensione della struttura e funzione dei genomi, compresi quelli complessi delle specie vegetali di rilievo per l'agricoltura come riso, mais e frumento, ma ha anche dato enormi potenzialità operative per la manipolazione mirata di tali genomi. Nel complesso queste innovazioni stanno avendo un impatto crescente sulle strategie di miglioramento genetico, sia quelle tradizionali che quelle più innovative, compresa l'ingegneria cromosomica.

Effettivamente la *marker technology* e le metodiche di citogenetica molecolare, come l'ibridazione *in situ* (es. FISH e GISH), rappresentano un supporto importante ai metodi classici di analisi (l'analisi dell'appaiamento meiotico, localizzazione cromosomica e mappatura di geni mediante linee aneuploidi, l'utilizzo di marcatori biochimici, citologici e morfologici), consentendo un'individuazione e caratterizzazione molto più efficiente ed accurata dei prodotti di trasferimento frumento-specie affini.

Riguardo alla *marker technology*, oggi si dispone di un gran numero e tipi di marcatori molecolari associati ai geni/QTL di interesse. I primi marcatori molecolari messi a punto sono stati gli RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), che consentono di distinguere gli individui sulla base del polimorfismo dei frammenti di restrizione del loro DNA. A questi è seguita una seconda “generazione” di marcatori, basati sulla reazione a catena della polimerasi

(Polymerase Chain Reaction, PCR) (Mullis, 1986). Questa tecnologia, rapida ed efficiente, ha fornito le basi per lo sviluppo quasi illimitato di marcatori molecolari e la loro ottimizzazione, come la conversione, previo sequenziamento, degli RFLP in STS (Sequence Tagged Site), lo sviluppo dei RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), degli ALFP (Amplified Fragment Length Polymorphism), dei microsatelliti o SSR (Simple Sequence Repeats). A questi si aggiungono i più recenti EST-SSRs (EST = Espressed Sequence Tag) (Gadaleta *et al.*, 2009) e la nuova classe di marcatori SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), utilizzati per lo sviluppo di mappe genetiche sempre più dense (Zhang *et al.*, 2003; Chao *et al.*, 2009).

Gli SSR risultano particolarmente utili alla selezione assistita da marcatori molecolari (MAS = Marker Assisted Selection), perché sono spesso codominanti, locus-specifici e molto polimorfici anche a livello intraspecifico (Plaschke *et al.*, 1993; Roder *et al.*, 1995).

Per ciò che riguarda le analisi di citogenetica molecolare, notevoli passi avanti in termini di risoluzione e rapidità sono stati raggiunti nelle tecniche di ibridazione *in situ* (ISH), metodologia utilizzata per rilevare su preparati citologici l'ibridazione di un DNA (o RNA) sonda ed il DNA cromosomico fissato sul vetrino.

Ormai da tempo per la ISH non si utilizzano sonde marcate radioattivamente, come in passato (Gall and Pardue, 1969; John *et al.*, 1969), ma sonde marcate mediante l'inserimento nella sequenza dell'acido nucleico (DNA) di un nucleotide modificato (spesso dUTP = deossiuridin-trifosfato), legato ad una molecola di biotina (vitamina H) o digossigenina (steroidi presente in natura nel genere *Digitalis*), oppure un fluorocromo (Leitch *et al.*, 1994). In tal modo sono state superate le problematiche connesse all'utilizzo del radioattivo, tra cui la scarsa sicurezza, i lunghi tempi di esposizione e la bassa risoluzione del segnale emesso e si è acquisita la possibilità di utilizzare e rilevare sonde multiple (marcate con fluorocromi differenti) sullo stesso preparato e di riutilizzare quest'ultimo per successive ibridazioni (Cuadrado *et al.*, 1997).

Per rilevare tramite ISH l'introggressione di segmenti cromosomici derivati da un genoma diverso dal ricevente si possono impiegare come sonde sequenze di DNA specie- o genoma-specifiche. Tuttavia nelle Triticinae le sonde disponibili non sono sempre in grado di marcare differenzialmente tutto il genoma di frumento e quello della specie affine. Per avere una "copertura" più omogenea, può essere utilizzato come sonda il DNA genomico della specie donatrice del frammento cromosomico trasferito (Ananthawat-Jonsson *et al.*, 1990), seguendo la metodologia definita GISH (Genomic *in situ* Hybridization) che non presenta differenze sostanziali dall'ISH con sonde specifiche.

Anche se di più complessa applicazione, quando si lavora sul materiale vegetale per la presenza della parete cellulare, il maggiore grado di condensazione dei cromosomi, e la difficoltà

di sincronizzazione del ciclo cellulare, l'ibridazione *in situ* è ad oggi una metodica largamente usata nell'identificazione di genomi, cromosomi o segmenti cromosomici sia a livello intra- sia inter-specifico (Ceoloni *et al.*, 1996, 1998), di variazioni strutturali del genoma (delezioni, duplicazioni, traslocazioni o inversioni) e per studi di appaiamento meiotico (Cuadrado *et al.*, 1997); è inoltre anche impiegata nell'analisi dell'organizzazione fisica dei genomi e dei singoli cromosomi e nella relazione tra mappe fisiche e mappe genetiche (Biagetti *et al.*, 1999; Gennaro *et al.*, 2012).

1.4. Il genere *Thinopyrum* e la specie *Thinopyrum ponticum*, valida risorsa per il *breeding* del frumento

Diverse specie selvatiche appartenenti al *gene pool* terziario delle Triticeae sono state impiegate nei programmi di miglioramento dei frumenti coltivati, in modo particolare come fonti di resistenza a *stress* biotici ed abiotici (Friebe *et al.*, 1996; Ceoloni *et al.*, 2015; Lukaszewski 2015; Molnár-Láng and Linc, 2015). Un contributo significativo è stato senz'altro dato da specie appartenenti al genere *Thinopyrum* (Löve, 1982; Dewey, 1984). Il genere comprende un gran numero di specie perenni caratterizzate da una vasta gamma di livelli di ploidia, da diploidi a decaploidi (Tab. 2).

Tabella 2: Livelli di ploidia di specie del genere *Thinopyrum* (Dewey, 1984; Chen, 2005).

Livelli di ploidia	Specie
1. Diploidi, 2n=14	<i>Th. bessarabicum</i> , [Savul. And Rayss] A. Love <i>Th. elongatum</i> [Host] D. Dewey
2. Tetraploidi segmentali, 2n=28	<i>Th. junceforme</i> [Love and Love] Love <i>Th. distichum</i> [Thunb.] Love
3. Alloesaploidi segmentali, 2n=42	<i>Th. intermedium</i> [Host]Barkwarth and D. Dewey <i>Th. junceum</i> [L.] Love
4. Octoploidi segmentali, 2n=56	<i>Th. runemarkii</i> Love
5. Decaploide segmentali, 2n=70	<i>Th. ponticum</i> [Podp.] Barkwarth and D. Dewey

Le specie diploidi ($2n = 2x = 14$), *Th. elongatum* (sin. *Agropyron elongatum*, *Lophopyrum elongatum*) e *Th. bessarabicum* (sin. *Agropyron bessarabicum*), così come l'esaploide ($2n = 6x = 42$) *Th. intermedium* (sin. *Agropyron intermedium*, *Elytrigia intermedia*) ed il decaploide ($2n = 10x = 70$) *Th. ponticum* (sin. *Agropyron elongatum*, *Lophopyrum ponticum*, *Elytrigia pontica*) sono tra le specie più ampiamente utilizzate nel *breeding* del frumento (Ceoloni *et al.*, 2015). Negli ultimi 50 anni da tali specie sono stati trasferiti geni per resistenza a malattie (Li and Wang, 2009), a *stress* ambientali, come la salinità (Colmer *et al.*, 2006), le alte temperature e la siccità (Li *et al.*, 2008), ed anche geni per la qualità (Liu *et al.*, 2008), e perfino per caratteri legati alla produttività (Singh *et al.*, 1998; Kuzmanović *et al.*, 2014, 2016).

Riguardo alla composizione genomica, si può considerare relativamente consolidata (Jauhar, 1990; Wang, 2011) l'assegnazione del genoma E (= E^e) a *Th. elongatum* e del genoma J (= E^b),

simile ma non completamente omologo a E, a *Th. bessarabicum*; al contrario, la composizione genomica delle specie poliploidi è da tempo motivo di dibattito (Zhang *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1998; Chen, 2005; Wang, 2011). E' comunque opinione condivisa che un terzo genoma, denominato St o S, caratteristico del genere *Pseudoroegneria* e affine a E e J, sia presente in *Th. intermedium* e *Th. ponticum*. Le formule genomiche suggerite per tali specie includono E^eE^bSt e E_1E_2St oppure JJ^sS per *Th. intermedium*, e $E^eE^bE^xStSt$ o $JJJJ^sJ^s$ per *Th. ponticum* (Ceoloni *et al.*, 2014b, 2015).

Come rappresentato da quest'ultima formula (Chen *et al.*, 1998), è probabile che *Th. ponticum* sia un auto-allo-poliploide segmentale, con tre set cromosomici del genoma J e due set del genoma J^s , un genoma J modificato avente parziale omologia, soprattutto nelle regioni cromosomiche centromeriche, con il genoma S. Rispetto ai genomi di frumento A,B e D, sia il genoma S che i genomi J presentano una maggiore affinità con il genoma D, a seguire con il genoma A ed infine minore con il B (Liu *et al.*, 2007).

Sulla base di precedenti attribuzioni tassonomiche, soprattutto quando il cromosoma in esame non è attribuito ad uno specifico genoma, cromosomi di *Th. ponticum* vengono ancora denominati come “Ag” o “el”.

1.4.1. *Th. ponticum* geni: sul gruppo di omeologia 7

Il *Th. ponticum* è la specie selvatica presa in esame nel presente lavoro, in quanto fonte di svariati geni e su cui è stata condotta un'attività di “ingegneria cromosomica” sia in frumento tenero che duro.

Sebbene su gran parte dei cromosomi di *Th. ponticum* sono stati localizzati geni utili al miglioramento del frumento (Wang, 2011; Ceoloni *et al.*, 2015), particolarmente ricco è risultato il cromosoma che presenta un'elevata omeologia con il gruppo 7 dei cromosomi di frumento e per questo denominato 7Ag (Sears, 1973) o 7el (Sharma and Knott, 1966; Knott *et al.*, 1977).

1.4.1.1. Geni di resistenza ed il gene *Yp*

Negli ultimi anni sono iniziati lavori finalizzati all'utilizzazione di geni localizzati sul braccio lungo di due cromosomi 7el (o 7Ag), derivanti da due diverse accessioni della stessa specie *Th. ponticum*, indicati come 7el₁ e 7el₂. Sulla base del loro pressoché completo appaiamento meiotico, in modo particolare a livello del braccio lungo (L), è verosimile che si tratti di cromosomi omologhi (Dvorak, 1975; Forte *et al.*, 2011, 2014).

Quando introdotti in cultivar di frumento sotto forma di linee di sostituzione o traslocazione/ricombinazione, entrambe i cromosomi 7el hanno mostrato di possedere geni determinanti la pigmentazione gialla della farina (*Yp*) e geni per la segregazione distorta (*Sd*) (Kim *et al.*, 1993), ma diversi fenotipi per resistenza verso ruggine bruna (geni *Lr*) e nera (geni *Sr*) e verso la fusariosi della spiga (FHB): 7el₁ è associato alla suscettibilità a FHB ma possiede gli efficaci geni *Lr19* e *Sr25*, mentre 7el₂ è suscettibile alle ruggini ma conferisce resistenza a FHB (Shen and Ohm, 2007; Zhang *et al.*, 2011; Forte *et al.*, 2014).

Una prima linea di traslocazione di un cromosoma 7el in frumento tenero cultivar Thatcher fu ottenuta mediante irraggiamento (Sharma and Knott, 1966). La linea, definita T4 (detta anche Agatha), contiene circa il 70% del braccio lungo del cromosoma 7el₁ (=7el₁L) sul braccio lungo del cromosoma 7DL (Friebe *et al.*, 1996). Fenotipicamente tale linea di traslocazione mostra resistenza alla ruggine bruna, determinata dal gene dominante *Lr19*, strettamente associato al gene *Yp*, (Bournival *et al.*, 1994), responsabile di un aumento dell'indice di giallo dell'endosperma; sullo stesso segmento 7el₁L, in posizione distale rispetto a *Lr19+Yp* (Ceoloni *et al.*, 2014b), è presente il gene *Sr25*, uno dei pochi geni *major* ancora in grado di conferire resistenza alla nuova razza di ruggine nera Ug99.

Visto l'elevato valore della linea T4, soprattutto puntando all'utilizzazione del gene di resistenza *Lr19*, furono messi in atto diversi tentativi per ridurre la lunghezza del segmento 7el₁L, per separare l'*Lr19* dall'*Yp*, quest'ultimo poco desiderato in frumento tenero. Knott (1980) provò a raggiungere lo scopo mediante l'uso di agenti mutageni, ma il tentativo non ebbe successo. Sears (1973), utilizzando delle linee nulli 5B (mancanti del cromosoma 5B) e di conseguenza non aventi il gene *Ph1* in esso localizzato, indusse la ricombinazione tra il cromosoma 7el₁ ed i suoi omeologhi di frumento, ottenendo diverse linee ricombinanti, tutte coinvolgenti il 7D ad eccezione di una, chiamata Transfer 12, in cui il cromosoma di frumento ricombinante era il 7A (Eizenga, 1987). Tutte le linee ottenute da Sears mostravano però il carattere giallo delle farine (Sears, 1978), che, come detto, le rendeva non adatte ad un utilizzo pratico nel miglioramento del frumento tenero.

Diversamente dal frumento tenero, l'associazione *Lr19+Sr25+Yp* risulta estremamente vantaggiosa per il frumento duro, non solo per le resistenze alle ruggini ma anche per l'incremento del pigmento nelle semole e nella pasta, aspetto molto apprezzato. Quest'ultimo carattere, determinato dall'aumento del contenuto di carotenoidi nell'endosperma del seme, rappresenta un requisito estetico importante per la maggioranza dei consumatori e conferisce anche un valore aggiunto in termini di salubrità, vista l'attività antiossidante di tali molecole (Adom *et al.*, 2003).

Il trasferimento combinato dei suddetti geni nel frumento duro tetraploide è stato realizzato dal Laboratorio di Citogenetica vegetale presso l'Università della Tuscia. Per il raggiungimento di tale obiettivo la linea Transfer 12 (Tr#12) sembrò un donatore ideale in quanto derivante dalla ricombinazione omeologa del 7el₁ con il cromosoma 7A del frumento tenero, presente anche nel duro (Sears, 1973, 1978; Eizenga, 1987). Tuttavia si riscontrò che l'autofecondato della linea tetraploide ottenuta dall'incrocio di Tr#12 con un frumento duro (chiamato ricombinante "primario"), inizialmente in eterozigosi per il cromosoma traslocato 7el₁/7AL, non dava, nella progenie di autofecondazione, nessun individuo omozigote per il cromosoma ricombinante (Ceoloni *et al.*, 1996). Una successiva analisi GISH rivelò che la quantità di cromatina di *Th. ponticum* trasferita era in quantità maggiore rispetto a quanto stimato da Sears (1973, 1978), tanto da interessare tutto il braccio lungo e quasi la metà del braccio corto del cromosoma 7A. La irregolare trasmissibilità attraverso la linea germinale maschile del cromosoma 7A/7el₁ della linea Tr#12 quando inserito in frumento duro, confermò la minor tolleranza del genoma tetraploide (2n= 4x= 28), rispetto a quello esaploide del frumento tenero, alle alterazioni cromosomiche.

Per ridurre la porzione cromosomica 7el₁L, il ricombinante "primario" è stato incrociato e reincrociato con il mutante *ph1* del frumento duro Cresò (vedi §1.3) e dalla ricombinazione così promossa tra cromosomi omeologhi sono stati ottenuti dieci ricombinanti "secondari" 7el₁L/7AL, con una minor quantità di 7el₁ rispetto al ricombinante primario (Ceoloni *et al.*, 2005a).

Tramite GISH (§ 1.3.1), si è rilevato nei diversi cromosomi 7el₁L/7AL delle varie linee ricombinanti un contenuto di 7el₁L pari ad un minimo del 22% fino al 90% del braccio 7AL (Fig. 4; Ceoloni *et al.*, 2005a).

Il confronto tra i diversi ricombinanti, distinti sulla base del loro fenotipo resistente/suscettibile alla ruggine bruna, ha consentito la localizzazione del gene *Lr19* nella porzione del 25% più distale del braccio lungo del 7A ricombinante, e precisamente nella

porzione che differenzia i ricombinanti R5-2-10 (23% di 7el₁L, resistente) ed R14-1 (22% di 7el₁L, suscettibile).

Questi materiali sono stati caratterizzati sia geneticamente che citogeneticamente. È stata realizzata una densa mappa genetica dei cromosomi 7A-7el₁ contenuti in ogni linea ricombinante, sviluppata con un'ampia gamma di marcatori molecolari che consentono di seguire agevolmente i segmenti cromosomici esogeni in progenie di incrocio tra le linee ricombinanti e varietà coltivate di frumento duro (Fig. 5; Gennaro *et al.*, 2010; Kuzmanović 2011).

La linea R5-2-10, contenete il più piccolo frammento cromosomico 7el₁ ancora contenente i geni *Lr19+Yp+Sr25*, è stata la prima ad essere utilizzata nel *breeding*. In effetti, da sue progenie di incrocio con frumenti duri italiani, soprattutto la varietà Simeto, è stata ottenuta una nuova varietà denominata Cincinnato, iscritta nel 2010 al Registro Varietale Italiano.

Figura 4: Ottendimento di ricombinanti di frumento duro recanti porzioni di diversa entità del cromosoma 7el₁ di *Th. ponticum*. Le mappe fisiche sono state ottenute tramite GISH (Ceoloni *et al.*, 2005a).

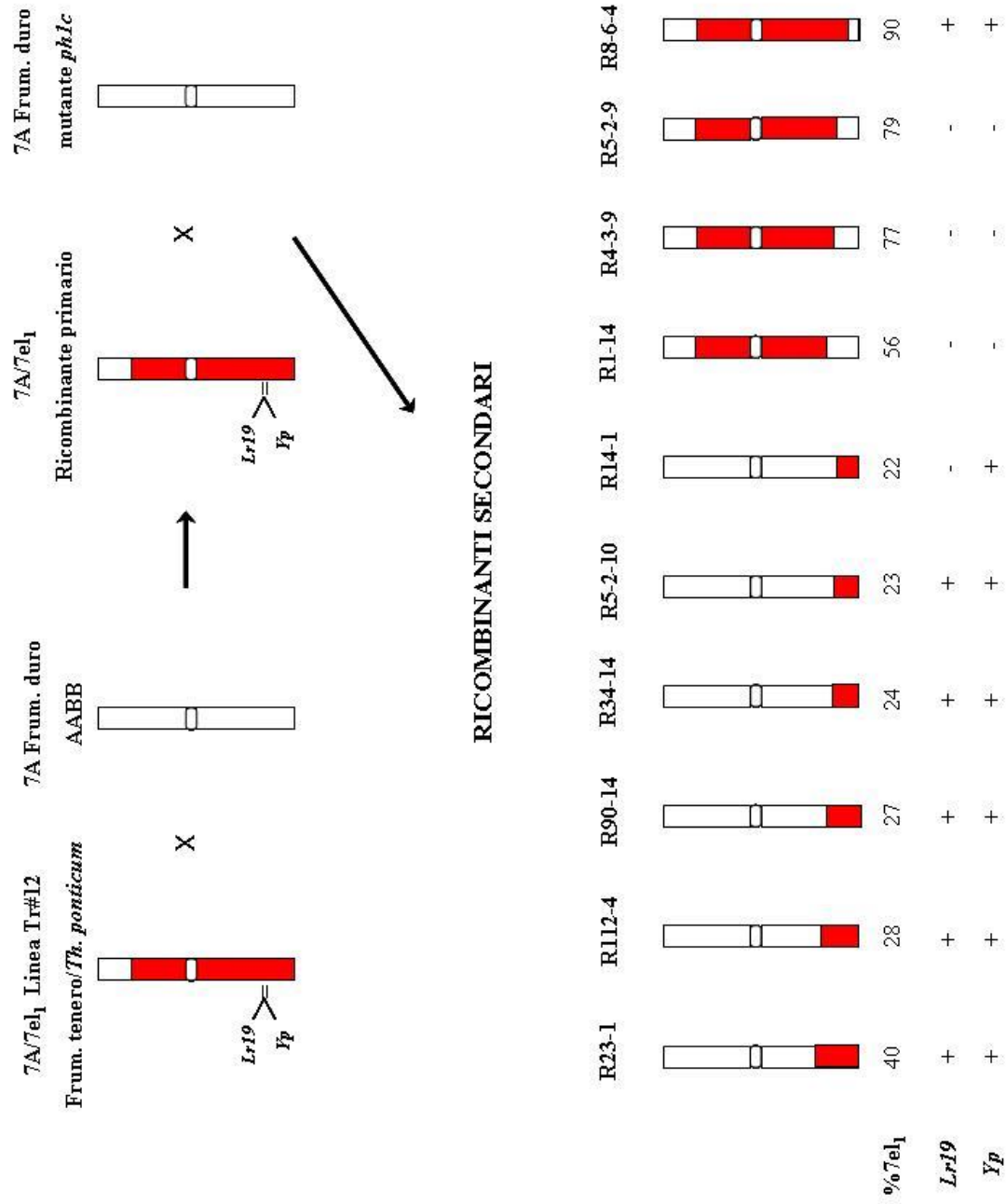
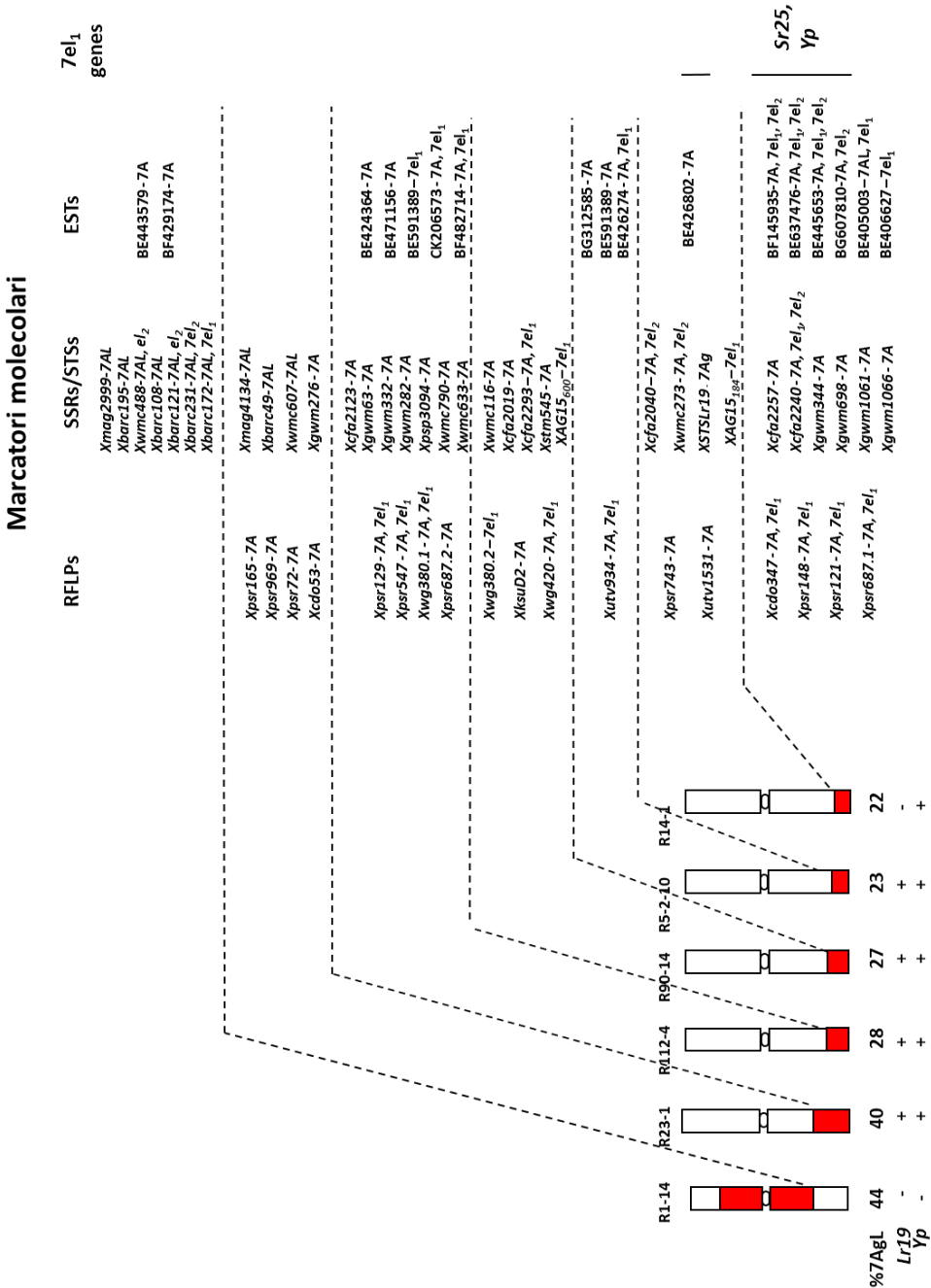


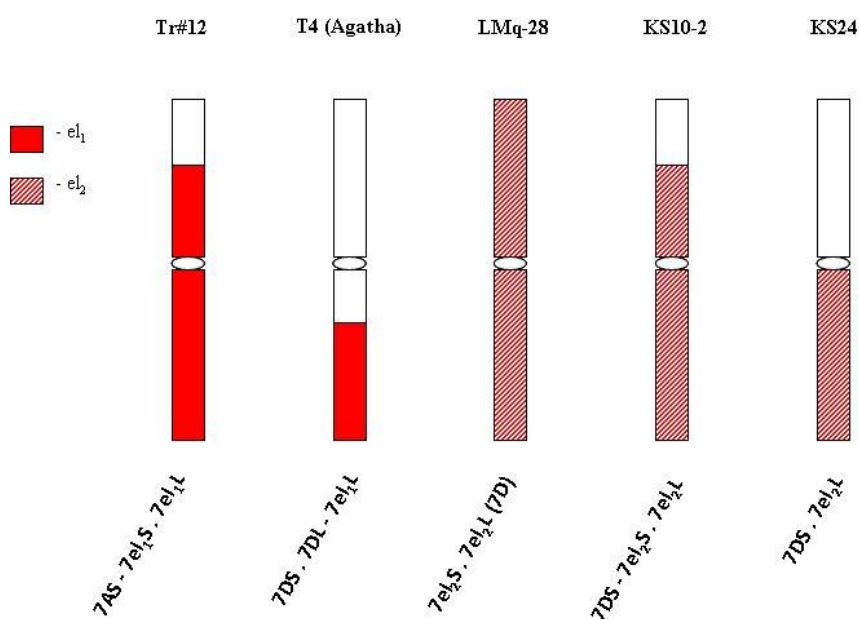
Figura 5: Mappa genetica e fisica ad alta risoluzione della regione distale 7AL/7el₁L.



Come detto in precedenza, l'accessione el_2 del *Th. ponticum* presenta sul braccio lungo del cromosoma 7 el (= 7 el_2L) un QTL di resistenza (*Fhb-7 el_2*) molto efficace verso l'FHB (Shen *et al.*, 2004; Shen and Ohm, 2007), a differenza dell'accessione portatrice dei geni *Lr19* e *Yp*, che invece risulta molto suscettibile a questa patologia. Da analisi fenotipiche condotte su alcune linee ricombinanti 7D/7 el_2 risulta che il contributo dato da tale QTL nella riduzione dei sintomi causati dall'FHB è pari al 69,54%, protezione di molto superiore rispetto a quella fornita dal gene *major Fhb1* di Sumai 3 (Zhang *et al.*, 2010). È da sottolineare che la localizzazione sul 7 el_2L del QTL per resistenza all'FHB è nella stessa regione (25% terminale del braccio) in cui sull'omologo 7 el_1L sono localizzati i geni *Lr19+Yp* (Shen and Ohm 2007; Forte *et al.*, 2014).

Partendo dalla linea di traslocazione di frumento tenero KS24 (7DS.7 el_2 ; vedi Fig. 6), sfruttando l'appaiamento alla meiosi quasi completo osservato fra i cromosomi 7 el_1 e 7 el_2 ed alla disponibilità di dati di mappa per il 7 el_1 (Gennaro *et al.*, 2010; Ayala-Navarette *et al.*, 2007) e il 7 el_2 (Shen and Ohm, 2007; Kuzmanović *et al.*, 2011) è stato possibile trasferire e piramidare, sia in genotipi di frumento tenero (T4, 7DS.7DL-7 el_1L) che duro (7AS.7AL-7 el_1L , linee R5-2-10, R112-4), i geni contenuti nei cromosomi 7 el delle due accessioni del *Th. ponticum* (da una fonte *Lr19*, *Sr25*, *Yp*, dall'altra *Fhb-7 el_2*) (Forte *et al.*, 2014).

Figura 6: Cromosomi ricombinanti utilizzabili per migliorare il frumento, portatori di cromatina aliena delle due accessioni di *Th. ponticum*.



1.4.1.2. QTL che influenzano positivamente la produttività

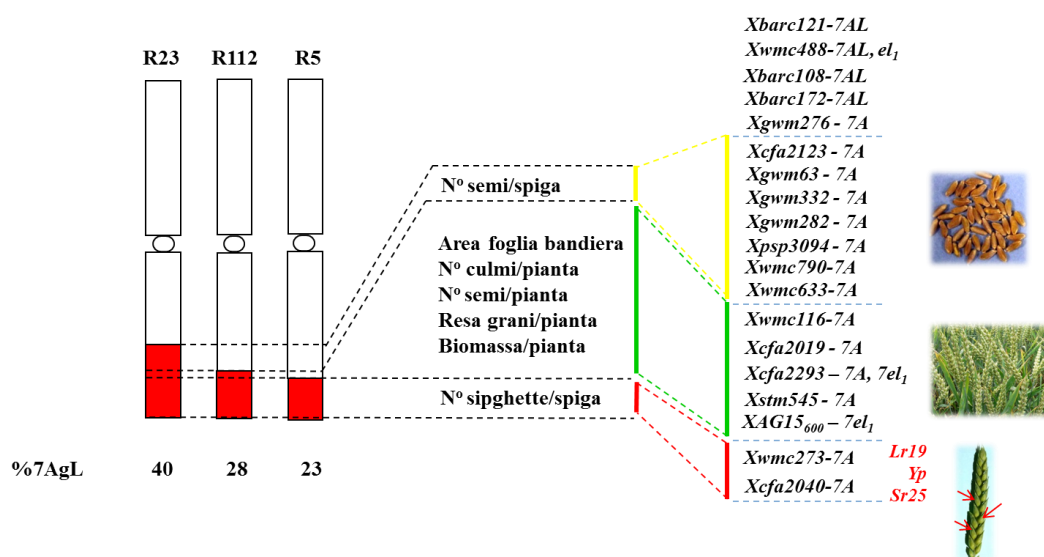
Oltre agli efficaci geni di resistenza (*Lr19* e *Sr25*), indagini condotte in pieno campo dal CIMMYT in diversi ambienti e per diversi anni su linee quasi isogeniche (NIRLs) contenenti la traslocazione T4 (70% di 7eL₁L sul 7DL) nel *background* di diversi frumenti teneri, hanno suggerito la presenza di uno o più QTL (qui denominato/i *Yld-7eL₁*, vedi Fig. 6) che influenzano positivamente la produttività. Tali indagini hanno rilevato nelle NIRLs con la traslocazione T4 un significativo aumento (>10%) di biomassa ed anche di resa in granella (>15%) (Singh *et al.*, 1998; Reynolds *et al.*, 2001; Monneveux *et al.*, 2003). Secondo Singh *et al.* (1998) l'effetto positivo di questo/i QTL sarebbe particolarmente evidente in assenza di *stress* idrico (siccità); tuttavia, Sibikeev *et al.* (2000), analizzando l'effetto della traslocazione T4 in differenti varietà e ambienti, non hanno rilevato un'associazione tra aumento delle rese e condizioni di *stress*. È interessante osservare che un QTL per la resa, espresso prevalentemente in situazioni di *stress*, è stato identificato sul 7AL di frumento, in una regione prossimale rispetto a quella corrispondente alla localizzazione dell'*Lr19* (Quarrie *et al.*, 2005, 2006; Fig. 5).

Sulla base di tali evidenze, si è considerata l'opportunità di utilizzare in simile sperimentazione alcune NIRLs di frumento duro ricombinanti 7AL-7eL₁L (Ceoloni *et al.*, 2005a), cioè R23-1, R112-4 e R5-2-10 (da qui in avanti abbreviate rispettivamente R23, R112, R5; vedi Fig. 4 e 5), aventi diversi *breakpoint* 7AL-7eL₁L intorno alla regione del 7AL candidata per contenere il/i QTL per la resa. Tali materiali sono stati inizialmente impiegati in prove comparative a semina spaziata in campo confermando un generale effetto positivo sulle rese, ma, in più, l'influenza su caratteristiche diverse associate a differenti sub-regioni del 7eL₁L (Kuzmanović *et al.*, 2014).

Infatti, le tre linee ricombinanti hanno mostrato un fenotipo diverso per alcuni dei principali parametri legati alla produttività, tra cui il numero di culmi per pianta, la biomassa e resa in granella: la linea che complessivamente ha manifestato un rendimento significativamente maggiore (+35%), ascrivibile principalmente al numero di culmi produttivi per pianta, è la R112; d'altra parte, la linea R23 ha mostrato, in più, un aumento rilevante del numero di semi per pianta (+36%), associato, però, ad una diminuzione del peso dei semi e quindi della resa finale in granella; quest'ultimo aspetto è presumibilmente legato agli effetti negativi del gene *Sd* (vedi avanti) sul peso dei semi (vedi avanti). Questi dati preliminari sono stati poi confermati in prove di campo condotte in parcelle replicate in condizioni di densità di semina convenzionali (Kuzmanović *et al.*, 2016). Tale sperimentazione pluriennale ha confermato la localizzazione in specifiche regioni delle porzioni di 7AgL (o 7eL₁) dei putativi QTL che contribuiscono alle rese,

tra cui uno o più responsabili di un aumento del numero di culmi per pianta, nonché della larghezza e dell'area della foglia a bandiera, della biomassa totale e della resa in granella per pianta e per m², nel segmento 7AgL comune ai due cromosomi ricombinanti R112 ed R23 ma assente nel R5 (Fig. 7). È stato inoltre confermato il QTL coinvolto nell'incremento del numero di semi per spiga (+ 40%) nella regione più prossimale del 7AgL, esclusiva dell'R23, ed inoltre sono stati associati a specifici segmenti 7AgL delle tre NIRLs ulteriori caratteri che possono contribuire alle resa, come la fertilità e la biomassa in antesi, la durata delle fasi fenologiche, il contenuto in clorofilla della foglia a bandiera durante la fase di riempimento della granella (Fig. 7).

Figura 7: Dissezione funzionale e strutturale del 40% 7AgL, presente nelle tre NIRLs R5, R112, R23, per caratteri che contribuiscono alla produttività.



La caratterizzazione agronomica e fisiologica sulle linee quasi-isogeniche ricombinanti *Th. ponticum*–frumento duro, ha attribuito al 5% di 7AgL che differenzia il cromosoma ricombinante R112 da quello dell'R5 la maggioranza degli effetti positivi sulle rese (resa in granella e biomassa). Nella R112 è stata anche rilevata l'espressione combinata di diversi caratteri (area foglia a bandiera +8%, contenuto in clorofilla +15-22%, numero di culmi e biomassa +20%) che suggeriscono una maggiore efficienza fotosintetica e nella traslocazione dei nutrienti.

1.4.1.3. Geni per la segregazione distorta (*Sd*)

Accanto a tanti geni utili, diverse specie del genere *Thinopyrum*, tra cui il *Th. ponticum*, sono risultate portatrici di geni, noti con l'acronimo *Sd* (= Segregation distortion), che in ibridi con altre specie, tra cui il frumento, portano ad una segregazione distorta (SD), ovvero ad una deviazione rispetto ai rapporti mendeliani attesi in una popolazione segregante. Gli eventi di segregazione distorta possono essere il risultato di una competizione gametofitica, derivante dalla fecondazione preferenziale o dall'aborto dei gameti maschili o femminili o dello zigote, che nella maggioranza dei sistemi è a carico dei gameti maschili. In realtà, anomalie della segregazione sono state osservate in una vasta gamma di organismi compresi funghi, piante, insetti e mammiferi. In effetti, gli elementi genetici che causano la SD, potrebbero rappresentare forze evolutive molto potenti, in termini di differenziazione delle specie e di riorganizzazione del genoma (Hurst, 1993; Taylor and Ingvarsson, 2003).

In molte Triticinae selvatiche sono stati identificati geni *Sd* che manifestano i loro effetti per lo più sulla gametogenesi maschile in ibridi parziali o completi con frumento (Faris *et al.*, 1998).

All'interno del genere *Thinopyrum* tra le specie poliploidi, sembra esservi a livello del gruppo cromosomico 7 un certo grado di conservazione nel portare geni *Sd*; ne sono un esempio il *Th. intermedium* (Kong *et al.*, 2008) e il *Th. ponticum* (Kibirige-Sebunya and Knott 1983; Scoles and Kibirige-Sebunya, 1983; Prins and Marais, 1999; Cai *et al.*, 2011).

Il braccio 7elL delle accessioni el₁ ed el₂ di *Th. ponticum* contengono uno o più geni *Sd*. Le prime osservazioni furono fatte su piante eterozigoti per il 7el₂ o porzioni di questo (portatori del gene di resistenza *Sr43*), che manifestavano una trasmissione preferenziale del 7el₂ rispetto al cromosoma 7D del frumento attraverso la linea germinale femminile (Kibirige-Sebunya and Knott, 1983). L'entità della distorsione risultò essere dipendente dal *background* genetico delle diverse varietà utilizzate di frumento in cui il 7el₂ o sue porzioni erano trasferite. Osservazioni simili sono state fatte sulla linea T4, sul cui 7el₁ è stato inizialmente localizzato, in posizione prossimale al gene di resistenza *Lr19*, il gene *Sd1*, la cui azione SD sembra essere il risultato di effetti negativi sul gametofito maschile (Knott, 1971; Marais, 1992; McIntosh *et al.*, 1995). Curiosamente, con la progressiva riduzione del segmento 7el₁ portato dalla T4, mediante ripetuti cicli di ricombinazione omeologa, è stato rilevato un effetto opposto rispetto a quello del gene *Sd* sul 7el₂, con l'*Sd1* in grado di determinare una più o meno forte auto-eliminazione, ovvero una mancata trasmissione di cromosomi portatori del gene (Prins and Marais, 1999; Marais *et al.*, 2001; Groenewald *et al.*, 2005). Ciò ha fatto presupporre che i segmenti più piccoli avessero

perso il gene *Sd1* (Zhang and Dvorak, 1990) o qualche altro fattore presente sul segmento 7el₁ di partenza, in grado di interagire con il primo e di modificarne l'effetto (Marais *et al.*, 2001).

L'effetto di uno o più geni *Sd* è stato anche osservato in alcune delle linee ricombinanti frumento duro-*Th. ponticum* portatrici di *Lr19+Yp*; in particolare, il cromosoma ricombinante 7A/7el₁ della linea R23 (ma anche di altre linee con quantità maggiori di cromatina 7el₁; vedi Fig. 4 e 5) mostra un basso tasso di trasmissione attraverso la linea germinale maschile (Ceoloni *et al.*, 2005a). Dal confronto della mappa genetica della R23 con quelle, di cromosomi di frumento tenero indicati come portatori del gene *Sd1* (Marais *et al.*, 2001), era stata inizialmente esclusa la presenza dell'*Sd1* nel cromosoma ricombinato della R23. Tuttavia, la localizzazione di *Sd1* rimane controversa (Groenewald *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2011) e, d'altra parte, non sembra da escludere la presenza di più di un gene *Sd* sul braccio lungo dei cromosomi 7el₁ di *Th. ponticum*. Le evidenze comunque confermano che, anche se con effetti quantitativamente diversi a seconda delle varietà riceventi, la porzione distale del 7el₁L come quella presente nella linea R23 ma non nella R112 o R5 quando inserita in frumento duro determina non solo una segregazione difettiva del cromosoma ricombinato attraverso la linea germinale maschile, ma anche vari effetti negativi sul fenotipo, inclusa una generale instabilità e, riguardo a parametri di produttività, uno striminzimento delle cariossidi e, a volte, difetti di germinazione (Grossi, 2010; Kuzmanović *et al.*, 2014, 2016). A queste anomalie si aggiunge un comportamento anomalo osservato nella gametogenesi pollinica della R23, almeno nelle fasi iniziali di sviluppo e mantenimento della linea, comprendente varie aberrazioni nel corso delle due divisioni mitotiche post-meiotiche, tra cui ponti in anafase-telofase, frammentazione nucleare, presenza di micronuclei e condensazione anomala della cromatina (Grossi *et al.*, 2009; Grossi 2010).

1.5. Ibridazione interspecifica: effetti sul *pattern* di metilazione del DNA

Nel corso dell'evoluzione delle piante l'ibridazione interspecifica, seguita da poliploidizzazione, è stato un fenomeno ricorrente, con un ruolo determinante nella diversificazione e speciazione e conseguente capacità adattativa delle nuove combinazioni genomiche e genotipiche (Rieseberg *et al.*, 2003; Soltis and Soltis, 2009).

D'altra parte, l'introduzione di materiale genetico "estraneo" attraverso la creazione di ibridi interspecifici/intergenerici, considerato da tempo un approccio promettente di "*radical wheat breeding*" (Sears, 1941; McFadden and Sears, 1947), è ampiamente riconosciuta come una strategia efficace per arricchire di nuovi caratteri le specie coltivate (McCouch, 2004). Nei programmi di miglioramento genetico dei frumenti coltivati, sono state utilizzate diverse specie affini, selvatiche e coltivate, di Triticeae, in particolar modo come fonti di resistenza a *stress* biotici e abiotici (Friebe *et al.*, 1996; Ceoloni *et al.*, 2005b; Ceoloni *et al.*, 2014). Ne sono un esempio le specie appartenenti al genere *Thinopyrum* (Löve, 1982; Dewey, 1984) ed la segale (*Secale cereale* L.), ampiamente utilizzati come valide fonti di geni per il miglioramento della resistenza alle malattie, dell'adattamento a varie condizioni ambientali e perfino della produttività (Friebe *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 2009; Ren *et al.*, 2011; Forte *et al.*, 2014; Kuzmanović *et al.*, 2014, 2016; Vedi §1.3 e §1.4.1).

Data l'importanza dei fenomeni di ibridazione e poliploidizzazione sia naturali che sperimentalmente prodotti, numerosi studi sono stati condotti per chiarire i meccanismi all'origine dei nuovi caratteri in progenie di ibridi e anfidiploidi, caratteri a volte non mostrati dai parentali (Birchler *et al.*, 2010; Hofmann, 2012). Come anticipato dagli studi pionieristici di Barbara McClintock (1984), è indubbio che ibridazione e poliploidizzazione rientrano in quei fenomeni di "*shock* genomico" che comportano cospicue riorganizzazioni genomiche, con effetti rilevanti sull'espressione genica (Feldman *et al.*, 2012; Buggs, 2013). I cambiamenti osservati già in ibridi F1 e nei loro prodotti di raddoppiamento cromosomico, non sono solo di natura genetica (ad esempio, perdita di sequenze anche geniche), ma anche epigenetica (Dong *et al.*, 2006; Scascitelli *et al.*, 2010; Feldman *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2012), .

Secondo la definizione di Alan Wolffe (Wolffe and Matzke, 1999), "epigenetici" sono "*quei cambiamenti ereditabili nell'espressione genica che avvengono senza alterazioni nella sequenza del DNA*", attraverso i quali la funzionalità genica è selettivamente attivata o inattivata all'interno delle cellule. Numerose evidenze sperimentali indicano infatti che l'espressione genica non è determinata solo dal codice genetico, ma anche da modificazioni epigenetiche che possono essere ereditate da una generazione all'altra; quindi l'epigenetica è "*lo studio delle*

modifiche ereditabili nella funzione del genoma che si verificano senza cambiamenti della sequenza di DNA" (Haig, 2004).

Negli eucarioti, la metilazione del DNA, tipicamente a carico di residui di citosina (5-metilcitosina = 5-mC), è il principale evento di modificazione epigenetica (Bird, 1980; Chen *et al.*, 2010). Tramite il reclutamento di complessi proteici che si legano al DNA metilato, essa modula la struttura della cromatina, generando un “*mark*” epigenetico stabile ed ereditabile (Jeddeloh *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 2002). Tale rimodellamento della cromatina gioca un ruolo cruciale nel modulare l’attività trascrizionale di una cellula, fornendo un addizionale livello di regolazione oltre a quello intrinseco nella sequenza primaria di DNA. Tale stato cromatinico, può essere mantenuto durante le divisioni cellulari, dando origine ad un processo definito, come detto, eredità epigenetica (Hsieh and Fischer, 2005; Bertrand *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2002; Sung and Amasino, 2004; Katz *et al.*, 2004). Strettamente associata a varie modificazioni degli istoni e ad altri fenomeni di variazione conformazionale della cromatina (Klose and Bird, 2006), la metilazione del DNA è un meccanismo essenziale nella regolazione di svariati processi nucleari, tra cui il silenziamento genico e la ricombinazione (Buard and Massy, 2007), ma anche nello sviluppo embrionale, nel differenziamento cellulare e quindi nella crescita e nello sviluppo degli organismi sia animali che vegetali (Finnegan *et al.*, 1996; Kakutani *et al.*, 1996; Panning and Jaenisch, 1996). La metilazione del DNA è stata inoltre associata con il controllo dell’integrità cromosomica e con meccanismi di difesa contro l’invasione di sequenze di DNA “estraneo” all’interno del genoma; infine, protegge il genoma dagli elementi trasponibili, garantendone la stabilità (Weber and Schubeler, 2007; Sekhon and Chopra, 2009; Li *et al.*, 2013).

Le piante, essendo organismi immobili, sembrano largamente dipendere da meccanismi epigenetici, tra cui la metilazione/de-metilazione, per attuare strategie rapide ed efficienti in risposta a cambiamenti ambientali e *stress* biotici e abiotici (Kovarik *et al.*, 1997; Steward *et al.*, 2002; Dyachenko *et al.*, 2006). Tali modificazioni possono essere ereditate come “*stress memory*”, migliorando la tolleranza delle piante al medesimo *stress* nelle generazioni successive (Molinier *et al.*, 2006; Boyko *et al.*, 2007; Zhu, 2008; Chinnusamy and Zhu, 2009). Non a caso, il genoma vegetale ha un livello di metilazione maggiore rispetto a quello degli animali: più del 40% delle citosine sono metilate nelle piante, rispetto all’8% degli animali (Adams and Burdon, 1985). In effetti, le stime del tasso di metilazione del DNA a livello genomico globale sembra variare a seconda della specie, oscillando dal 6% in *Arabidopsis* al 25% in *Zea mays* (Steward *et al.*, 2002). Altri studi (Zhang *et al.*, 2008b) indicano valori compresi tra il 20% e 50% del genoma di piante superiori. Tali misurazioni sono ancora incerte, e spesso non definite per tipo di tessuto o fase di sviluppo. La distribuzione delle 5-mC non è casuale, le sequenze

maggiormente modificate essendo quelle simmetriche, CG e CNG (dove N è A, T o C), che rappresentano circa il 90% dei siti metilati (Finnegan *et al.*, 1998; Madlung *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007). I *pattern* di metilazione dei genomi, come altre modificazioni epigenetiche, sono ereditati durante la replicazione del DNA (sia attraverso la meiosi che la mitosi) sotto forma di sequenze emi-metilate (Chen *et al.*, 2010).

Negli ultimi anni, numerosi studi hanno descritto una vasta gamma di cambiamenti “rivoluzionari” (Feldman and Levy, 2009), genetici ed epigenetici, rapidamente conseguenti a eventi di ibridazione e poliploidizzazione in diversi sistemi vegetali, tra cui *Arabidopsis* (Comai *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004, 2006; Zhang *et al.*, 2008a, b; Groszmann *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2012), Brassica (Albertin *et al.*, 2006; Gaeta *et al.*, 2007), cotone (Adams *et al.*, 2004), riso (Liu *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009), frumento (Shaked *et al.*, 2001; Bottley *et al.*, 2006; Feldman and Levy, 2009), e *Spartina* (Salmon *et al.*, 2005).

In frumento è stato osservato che l’alterazione del *pattern* di metilazione delle citosine è una delle più importanti, immediate e riproducibili (ovvero non casuali) risposte del genoma ad eventi di ibridazione e successiva allopoliploidizzazione, a carico sia di sequenze di DNA ripetute che a basso numero di copie in proporzioni approssimativamente uguali (Shaked *et al.*, 2001; Feldman and Levy, 2009; Feldman *et al.*, 2012).

In contrasto con l’ampia documentazione relativa agli effetti risultanti dalla nuova “coabitazione” di interi genomi, come in ibridi o anfidiplidi completi, poco è noto circa l’impatto sul genoma ricevente conseguente al trasferimento di porzioni di un genoma “estraneo”, anche se affine. E’ questo il caso di materiali genetici, prodotti in gran numero nel genoma ricevente di frumento e, in minor misura, in altre Triticeae, a partire da ibridi interspecifici con specie affini, corrispondenti a linee di addizione o di sostituzione di singoli cromosomi o bracci cromosomici dell’altra specie, ma anche le altrettanto numerose linee di introgressione “segmentale”, ovvero linee di traslocazione e ricombinazione, contenenti solo definiti segmenti cromosomici “estranei” (Ceoloni, 1987; Gale and Miller, 1987; Ceoloni and Jauhar, 2006).

In anni recenti, studi condotti su materiali prodotti da trasferimento nel genoma in riso (*Oryza sativa* L.) di segmenti di DNA della specie selvatica *Zizania latifolia* Griseb., hanno evidenziato che l’introgressione anche di quantità minimali del DNA “estraneo” (< 0.1%) ha indotto estese alterazioni, quali- e quantitative, della metilazione del DNA ed anche della trascrizione, sia di geni che di elementi trasponibili (Liu *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2006). Questo insieme di modificazioni è stato ipotizzato spiegare, almeno in parte, quei numerosi fenotipi “trasgressivi”

(forma della pianta, epoca di fioritura, resistenza a malattie, caratteri di produttività, ecc.), ereditabili, osservati *de novo* nelle linee di introgressione (Liu *et al.*, 1999).

In accordo con questi risultati, diversi studi hanno analizzato l'effetto dell'introgressione in frumento tenero del braccio cromosomico 1RS di *Secale cereale* (linee di traslocazione centrica 1RS.1BL) o porzioni di questo, evidenziando sia il manifestarsi di nuove caratteristiche, stabili e riproducibili, non manifestate dai genitori (Ren, 1991, 1993; Ren and Zhang, 1997), che cospicue variazioni del *pattern* di metilazione del DNA, a carico sia di DNA ripetuto, come retrotrasposoni e sequenze ripetute a tandem, che a basso numero di copie (Zhang *et al.*, 2008). Sequenze corrispondenti a retrotrasposoni sono risultate il principale “*target*” di estese variazioni genetiche ed epigenetiche in progenie di linee di addizione monosomica in frumento tenero di cromosomi 2R e 5R di *S. cereale* (Fu *et al.*, 2013). Tali alterazioni sono state riscontrate anche in piante nelle quali, a causa della condizione monosomica, il cromosoma “estraneo” non era stato trasmesso, indicando che l'aggiunta di un singolo cromosoma è causa di un considerevole “*reshuffling*” del genoma ricevente, con effetti che persistono anche in assenza dell'induttore e con potenziali ricadute positive in termini di creazione di nuova variabilità genetica.

Molto rimane da studiare sugli effetti epigenetici conseguenti all'introgressione in frumento di svariati (per origine ed entità) segmenti cromosomici di specie affini, trasferiti dai moderni “ingegneri cromosomici” (vedi §1.3) per migliorare caratteristiche definite della specie ricevente (*T. aestivum* o *T. durum*).

2. SCOPO DEL LAVORO

Le linee ricombinanti quasi-isogeniche (NIRL) di frumento duro-*Thinopyrum ponticum*, R5, R112 e R23 (vedi §1.4.1) avevano mostrato, in precedenti sperimentazioni, il contributo positivo dato dai diversi segmenti 7AgL su diversi caratteri che direttamente influenzano la produttività (vedi §1.4.1.2), tra i quali il numero di culmi per pianta e per m², il numero di semi per spiga e la biomassa totale (Kuzmanović *et al.*, 2014, 2016). D'altra parte, anche considerando l'habitus del donatore selvatico, il *Thinopyrum ponticum*, che come altre graminacee perenni è caratterizzato da ampi e profondi apparati radicali, era possibile ipotizzare un effetto di tali trasferimenti anche su questa porzione della pianta e, magari, di conseguenza, sulle rese in granella e biomassa. A sostegno di questa ipotesi, studi condotti su linee di traslocazione frumento-segale 1RS.1BL (Sharma *et al.*, 2009) e su una linea di ricombinazione frumento tenero-*Th. ponticum* (7DS.7DL/7AgL; (Placido *et al.*, 2013), hanno correlato alle porzioni cromosomiche selvatiche trasferite l'incremento in biomassa della radice ed altri effetti sull'architettura dell'apparato radicale (RSA). Un obiettivo della presente ricerca è stato perciò quello di ampliare la caratterizzazione fenotipica delle linee ricombinanti quasi-isogeniche (NIRLs) frumento duro-*Th. ponticum*, prendendo in considerazione le caratteristiche dell'apparato radicale, parte della pianta che, come descritto in precedenza (vedi §1.1.2), ha un ruolo importante nell'adattabilità delle colture a diversi ambienti e condizioni climatiche, contribuendo alla entità e stabilità delle rese. Le NIRLs a disposizione, contenenti diversi segmenti 7AgL localizzati distalmente sul 7AL del frumento duro, sono un materiale ideale per poter eventualmente associare alle diverse sub-regioni del 7AgL loci putativamente coinvolti nel controllo dei caratteri radicali analizzati. Avendo a disposizione anche linee ricombinanti e di traslocazione di frumento tenero-*Th. ponticum* (KS24 e T4), in cui porzioni del cromosoma 7 derivano da accessioni diverse della stessa specie (vedi §1.4.1.1), anche queste sono state incluse nell'analisi dell'RSA, per confrontare il comportamento delle due specie di *Triticum* ed anche gli effetti di diverse forme alleliche del *Th. ponticum*.

Dato il ruolo che l'apparato radicale ha nel reperimento di acqua, oltre che di nutrienti, dal terreno, e quindi nella risposta a quel rilevante stress abiotico per il frumento che è la carenza idrica, soprattutto in aree vocate alla coltivazione del frumento duro, ulteriore obiettivo perseguito è stata l'analisi della biomassa e dell'architettura radicale delle linee di introgressione di frumento duro e anche tenero in risposta ad una stress idrico imposto.

Da diversi anni a tutt'oggi, linee di introgressione interspecifica prodotte attraverso l'utilizzo dell'ingegneria cromosomica, ovvero linee di sostituzione, addizione, traslocazione e

ricombinazione, sono state ottenute in gran numero in frumento tenero e anche duro, rappresentando un importante strumento di analisi e anche un materiale di crescente considerazione e utilizzo in programmi di miglioramento genetico (vedi §1.3). È noto che l'ibridazione interspecifica è causa di cospicui cambiamenti epigenetici, tra cui principalmente la variazione del profilo di metilazione del DNA (vedi §1.5). Finora, però, gli studi si sono concentrati soprattutto su ibridi completi e anfiploidi, mentre molto poco si conoscono gli effetti sul metiloma conseguenti al trasferimento di limitate quantità di materiale genetico da specie affini (un cromosoma o segmenti cromosomici), anche dopo diverse generazioni dalla creazione di tali “ibridi parziali”. Anche per questo tipo di indagine le NIRLs R5, R112 e R23, dotate di una buona stabilità genotipica (generazione BC₄₋₅F₇) e fenotipica, sono materiali idonei per verificare eventuali differenze nel *pattern* di metilazione del DNA associabili ai diversi segmenti 7AgL in esse presenti. L'interesse è in particolare rivolto alla linea ricombinante R23, che in generazioni precedenti ha mostrato diverse anomalie e instabilità sia fenotipiche che genetiche, potenzialmente associate alla presenza della porzione di 7AgL non condivisa con le altre due NIRLs di un gene *Sd* per “segregazione distorta” (vedi § 1.4.1.3), che sembra causare alterazioni nel corso delle divisioni mitotiche del micro-gametofito (Grossi *et al.*, 2009; Grossi 2010). Anche in considerazione di ciò, si è ritenuto interessante analizzare lo stato di metilazione delle NIRLs sia in diverse fasi di sviluppo vegetativo che alla micro-gametogenesi, quindi saggiando DNA estratto da tessuti differenti (foglie e antere).

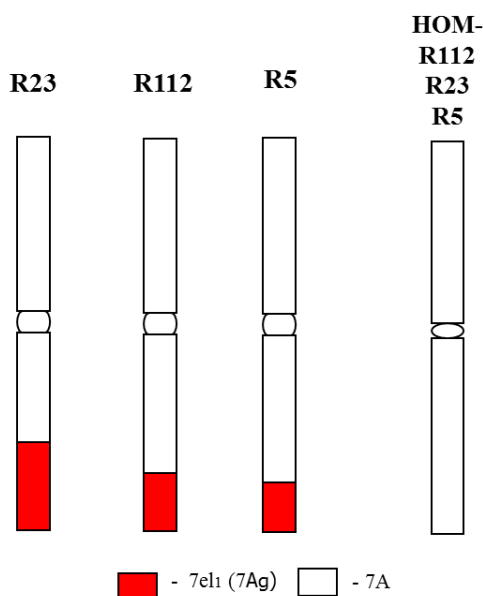
3. MATERIALI E METODI

3.1. Materiale Vegetale

3.1.1. Materiale vegetale per l'analisi dell'architettura radicale

Sono state utilizzate tre linee ricombinanti quasi-isogeniche (NILs) di frumento duro–*Th. ponticum*, denominate R5-2-10, R112-4 e R23-1 in Ceoloni *et al.* (2005a) e qui abbreviate in R5, R112 e R23, rispettivamente, sviluppate mediante reincrocio (BC) delle linee ricombinanti primarie (Ceoloni *et al.*, 2005a; vedi §1.4.1.1) con la cultivar ricorrente cv. Simeto. Le NILs sono caratterizzate da porzioni distali del braccio 7AL sostituito per il 23%, 28% e 40% da porzioni omeologhe del braccio 7AgL (7el₁L) del *Th. ponticum*, tutte contenenti nella porzione sub-telomerica del 7AgL i geni *Lr19* + *Sr25* + (Fig. 8). Ogni genotipo, corrispondenti alle progenie BC₅F₇ (R5 e R112) e BC₄F₇ (R23), era rappresentato da piante omozigoti per la presenza (HOM+) e assenza (HOM–) dei rispettivi segmenti 7AgL.

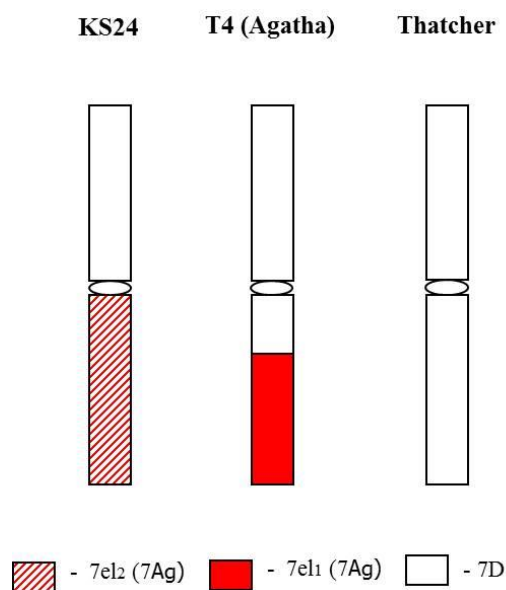
Figura 8: NILs di frumento duro – *Th. ponticum* omozigoti per la presenza (HOM+) e assenza (HOM–) dei differenti segmenti 7AgL.



Sono state inoltre impiegate linee di frumento tenero, quali la KS24, una traslocazione centrica recante l'intero braccio lungo (7el₂L) al posto del 7DL nel *background* della cv. Thatcher (7DS.7el₂L, Fig. 9; Kibirige-Sebunya and Knott, 1983). Sul 7el₂L è localizzato il QTL *Fhb-7el₂* (vedi §1.4.1.1). La linea T4, come descritto in precedenza (§ 1.4.1.1) porta sul braccio

7DL circa il 70% del braccio 7eL₁L, contenente i geni *Lr19*, *Yp*, *Sr25* e uno o più QTL per produttività. In assenza di linee HOM– per i due genotipi descritti, come controllo è stata inserita la cv. Thatcher, in quanto *background* comune a T4 e KS24 (Fig. 9).

Figura 9: NILs di frumento tenero – *Th. ponticum* T4 e KS24 (7D/7AgL), portatrici di porzioni 7eL derivanti da due diverse accessioni del *Th. ponticum*, e la cv. Thatcher utilizzata come controllo.



3.1.2. Materiale Vegetale per l'analisi di metilazione del DNA

Sono state utilizzate le medesime NILs R5, R112 e R23 sopra descritte. Anche in questo caso ogni genotipo, corrispondente alle progenie BC₅F₇ (R5 e R112) e BC₄F₇ (R23), era rappresentato da piante omozigoti omozigoti per la presenza (HOM+) e assenza (HOM–) dei rispettivi segmenti 7AgL. Nel caso del ricombinante R23, caratterizzato dalla presenza del gene *Sd* nel segmento 7AgL, sia per il genotipo HOM+ che per l'HOM– sono state utilizzate due famiglie derivanti da linee sorelle (R23-53 ed R23-64, per le HOM+; R23-26 e R23-31 per le HOM–). Le piante sono state allevate in ambiente controllato (cella climatica).

3.2. Metodi

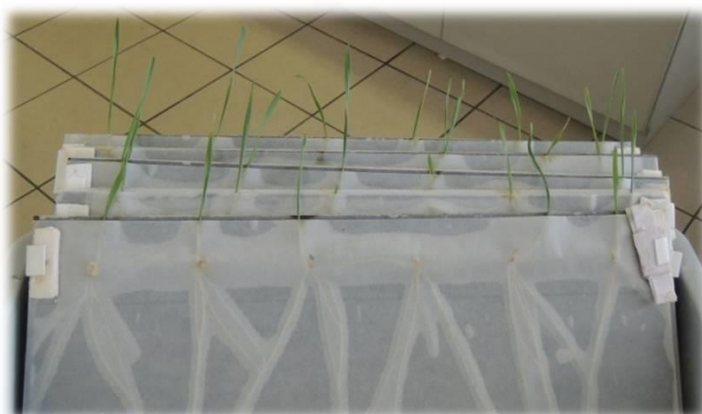
3.2.1. Analisi dell'architettura del sistema radicale (RSA) attraverso micro-metodi

Lo studio delle caratteristiche architettoniche delle radici in condizioni di campo, è un approccio difficile e richiede l'impiego di ingenti risorse, in particolare su specie con radici piuttosto sottili, quali il frumento. Per tale motivo, la maggior parte degli studi in campo effettuati su frumento hanno valutato solo un numero piuttosto limitato di genotipi (Kara *et al.*, 2000; Liao *et al.*, 2006; Manschadi *et al.*, 2006). In alternativa agli esperimenti in campo, l'analisi delle radici in semenzali o piante cresciute in condizioni controllate (lastre di gel, idroponica, carta filtro, vasi, colonne o altri volumi definiti di terreno), offre un mezzo molto meno costoso per indagare la variabilità genetica per i tratti radicali (Robertson *et al.*, 1979; Richards and Passioura, 1981b; Grando and Ceccarelli, 1995; Landi *et al.*, 2002; Tuberosa *et al.*, 2002a,b; Bengough *et al.*, 2004; Trethowan *et al.*, 2005). Inoltre, è ormai largamente riconosciuto che le principali caratteristiche delle radici seminali del frumento sono in larga parte predittive dell'architettura del sistema radicale allo stadio adulto e ciò rende ancora più conveniente lo studio in una fase di crescita precoce (Richards and Passioura, 1981b; Løes and Gahoonia, 2004; Sanguineti *et al.*, 2007). Nel presente lavoro sono stati impiegati diversi micro-metodi descritti di seguito.

3.2.1.1. *Paper no-roll*

Per ogni genotipo, i semi prima di essere messi in piastra Petri a 28°C per 24 h, sono stati sterilizzati immergendoli per 10 minuti in una soluzione all'1% di ipoclorito di sodio e poi sciacquati con acqua distillata. Sei semi omogenei per dimensione, con una normale emissione delle radici seminali, erano posizionati ad una distanza di 5 cm l'uno dall'altro su un foglio di carta filtro disposta sopra ad un piano rettangolare di policarbonato nero (42.5 x 38.5 cm) che garantiva la crescita al buio delle radici (Fig. 10). Per lo sviluppo delle piante è stata fornita esclusivamente acqua distillata. I caratteri dell'RSA sono stati misurati dopo un accrescimento di 7 giorni in cella climatica (22°C con 16 h di luce come fotoperiodo).

Figura 10: Plantule al termine di 7 gg di accrescimento con il micro-metodo *paper no-roll*.



I caratteri della radice e del germoglio misurati al termine dell'esperimento sono riportati nella Tabella 4. I caratteri relativi alla lunghezza, ovvero PRL (lunghezza della radice principale), TRL (lunghezza totale dell'apparato radicale) e ARL (lunghezza media delle radici) sono stati misurati su immagini in formato JPG prese con il software gratuito RootSnap (vedi Fig.11A). L'angolo di diffusione delle radici seminali (SRA) è stato calcolato in radianti, misurando la distanza tra le due radici seminali più esterne, rilevata a 2,5 cm dal seme, applicando la formula: $SRA (\alpha) = \text{Angolo (rad)} = 2 * \text{ASIN}[(x/2)/a]$ (vedi Fig. 11B).

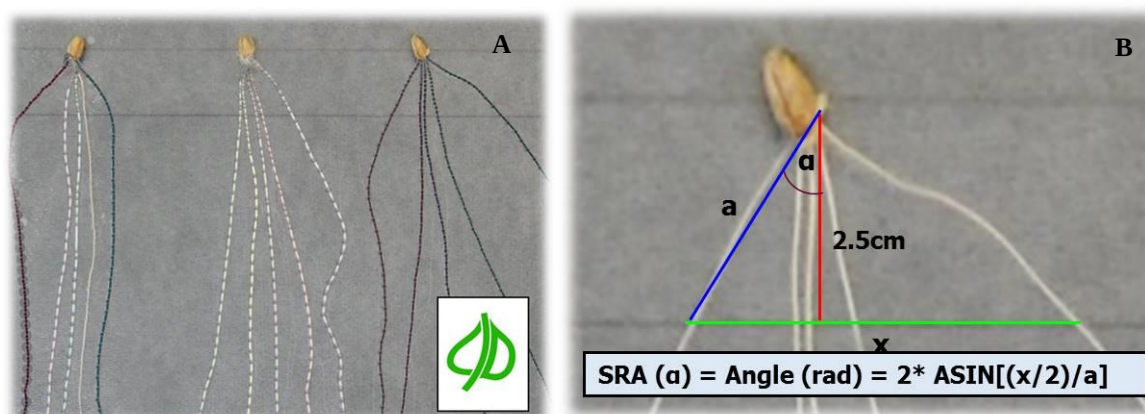
Tabella 4: Caratteri della radice e del germoglio misurati.

Caratteri	
SRA (rad)	Angolo di diffusione radicale
SL (cm)	Lunghezza del germoglio
SDW (mg)	Peso secco del germoglio
SRN	Numero delle radici seminali
PRL (cm)	Lunghezza della radice principale
TRL (cm)	Lunghezza totale delle radici seminali
ARL (cm)	Lunghezza media delle radici
RDW (mg)	Peso secco della radice
RDW (mg)/TRL (cm)	Diametro radicale medio
RDW (mg)/SDW (mg)	Rapporto tra le biomasse di radice e germoglio

L'esperimento è stato condotto in repliche randomizzate. Per il materiale di frumento duro (R5, R112, R23), sono state effettuate 5 repliche, ogni replica contenente 12 plantule HOM+ e 6 plantule HOM- per un totale di ≈ 270 plantule.

Per le analisi dei frumenti teneri (T4; KS24; cv. Thatcher) sono state analizzate 3 repliche, in ciascuna delle quali ogni genotipo era rappresentato da 6 plantule (≈ 54 plantule).

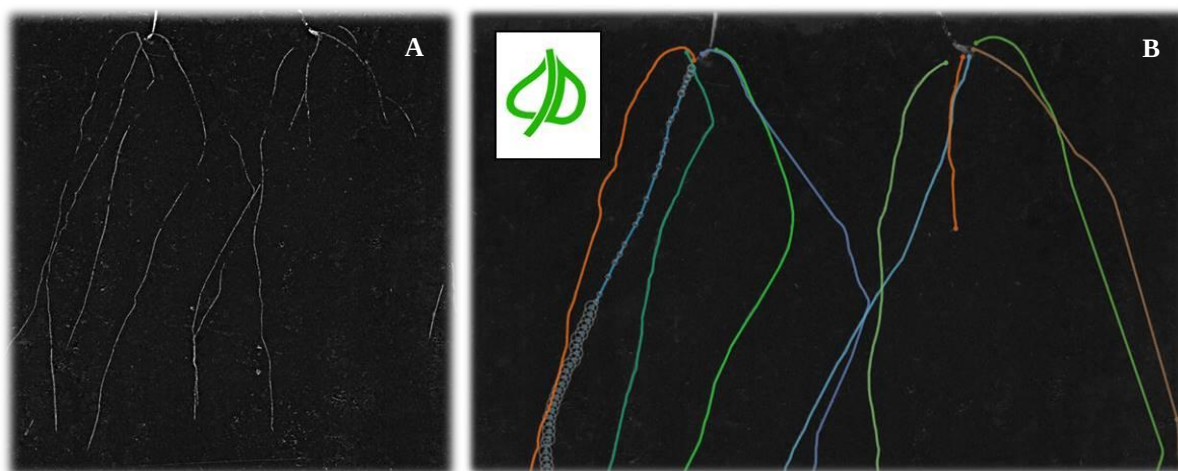
Figura 11A-B: A→ esempio dell'applicazione del software RootSnap per la misurazione dei caratteri di lunghezza delle radici (PRL, ARL, TRL); B→ sistema di misurazione dell'angolo di diffusione radicale (SRA).



3.2.1.2. Rizotroni

Dopo la sterilizzazione (vedi §3.2.1.1) i semi sono stati posti in piastra Petri per 48 h a 28°C; 2 semi per genotipo, correttamente germinati e con una lunghezza delle prime 3 radici seminali di ≈ 1 cm, sono stati posti nel terriccio di riempimento (700 ml di terriccio per apparato) del rizotrone (43,5 X 29,7 X 0,5 cm) ad una distanza di 10 cm. Le piantine sono state irrigate ogni 3 giorni con 50 ml di acqua distillata. L'accrescimento del germoglio e dell'apparato radicale era monitorato mediante l'acquisizione di immagini (Fig. 12A) tramite scannerizzazione (risoluzione = 255 PI; formato = A3); quella effettuata a 12 gg è stata utilizzata per la misurazione delle radici con il software RootSnap (Fig. 12B).

Figura 12A-B: A→ esempio dello sviluppo radicale osservato con il sistema del rizotrone; B→ misurazione del sistema radicale, a 12 gg, con il software RootSnap.



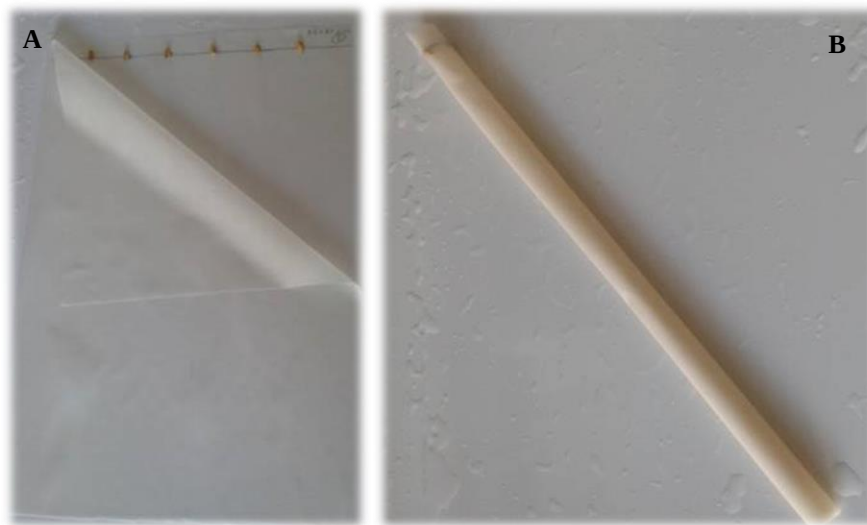
L'esperimento in rizotroni, avvenuto in serra con una temperatura di $\approx 22^{\circ}\text{C}$ ha avuto la durata di 12 giorni, al termine dei quali si è proceduto alla misurazione dei medesimi caratteri analizzati con il micro-metodo *paper no-roll* (vedi Tab. 4).

La sperimentazione è stata allestita in repliche randomizzate, 4 repliche per NIRLs (HOM+ e HOM-) nel caso del frumento duro e 3 repliche per genotipo nel caso del tenero. Per ogni ricombinante frumento duro-*Th. ponticum* e la rispettiva NIRL di controllo, ogni replica era costituita da 4 plantule HOM+ e da 2 HOM- (72 piante totali). Per la prova su T4, KS24 e cv. Thatcher, ogni replica corrispondeva a 2 plantule per ogni genotipo (per un totale di 18 piante).

3.2.1.3. *Paper roll o Cigar roll*

Questo micro-metodo è una variante del metodo *paper no-roll* e la preparazione dei materiali vegetali si è svolta nel medesimo modo (vedi §3.2.1.1); 6 omogenei semi pregerminati sono stati posti, a 5 cm di distanza l'uno dall'altro, sul foglio di carta filtro (47.5 x 35cm) che è stato poi avvolto su se stesso verticalmente (da cui la definizione "*cigar roll*"; vedi Fig. 13A). Nove *cigar rolls*, sono stati posti verticalmente in un *beaker* da 1 L (Fig. 13B).

Figura 13A-B: Allestimento del micro-metodo *Cigar roll*.



L'esperimento, avente durata di 7 giorni, consisteva di due tesi condotte in parallelo in ambiente controllato (27°C; 16 h di luce come fotoperiodo), distinte solo dal diverso quantitativo di acqua disponibile per l'accrescimento delle plantule così da imporre o meno carenza idrica (Fig. 14):

- a. WATER-LIMITED (WL) = nel *beaker* erano aggiunti 50 ml di acqua distillata;
- b. WELL-WATER (W-W) = nel *beaker* erano aggiunti 100 ml di acqua distillata.

Il volume 50 ml o 100 ml durante la sperimentazione è stato mantenuto costante, aggiungendo acqua distillata.

Al termine dei 7 giorni si è proceduto come negli esperimenti precedenti, misurando i caratteri riportati nella Tabella 5.

Tabella 5: caratteri del germoglio e della radice misurati con il micro-metodo *cigar rolls*

Caratteri	
SL (cm)	Lunghezza del germoglio
SDW (mg)	Peso secco del germoglio
SRN	Numero delle radici seminali
PRL (cm)	Lunghezza della radice principale
TRL (cm)	Lunghezza totale delle radici seminali
ARL (cm)	Lunghezza media delle radici
RDW (mg)	Peso secco dell'apparato radicale
RDW (mg)/ TRL (cm)	Diametro radicale medio
RDW (mg)/ SDW (mg)	Rapporto tra le biomasse di radice e germoglio

La sperimentazione è stata allestita in repliche randomizzate; sia per i materiali di frumento duro che tenero sono state effettuate 6 repliche per tipo di trattamento (condizioni idriche limitate “LW” e ben irrigate “WW”); nel caso del frumento duro per ogni replica vi erano, per ogni genotipo, 12 HOM+ e 6 HOM- (per un totale di 324 piante analizzate per trattamento), mentre per il tenero le repliche erano costituite da 6 plantule per genotipo (108 piante analizzate per ogni condizione di trattamento).

Figura 14: Micro-metodo *Cigar roll* al termine dei 7 gg di sviluppo, in ambiente controllato (destra WW, sinistra LW).



3.2.2. Analisi statistica dei dati

Per valutare l'effetto genetico e/o dei fattori ambientali e l'interazione tra di essi nelle variabili analizzate in questo studio, è stata condotta l'analisi della varianza (ANOVA) con l'utilizzo del software SYSTAT12 (Systat Software Incorporated, San Jose, CA, USA). E' stato applicato il General Linear Model (GLM) e ogni variabile (o carattere misurato) è stata analizzata come un fattore "dipendente", contrapposto a fattori "indipendenti". I fattori "indipendenti" comuni a tutte le analisi sono stati "*background* del genotipo" (G), la presenza/assenza dei "segmenti 7AgL" (7AgL – nested) e le "repliche" (R). Per l'esperimento con il *cigar roll* è stato incluso un altro fattore "indipendente", il "trattamento" (T), ovvero l'applicazione o meno di carenza idrica.

Per ogni esperimento sono state analizzate le interazioni di secondo, terzo e quarto ordine (dove il numero dei fattori era superiore a tre), ad esempio 7AgL/G – nested, G x T e T x 7AgL(G). Sono stati considerati tre livelli di significatività, corrispondenti a $P < 0.05$, $P < 0.01$ o $P < 0.001$. Tutte le variabili contenenti tre livelli (e.s. genotipo) che hanno mostrato un effetto significativo dei fattori fissi o delle loro interazioni, sono state successivamente sottoposte al Tukey Test (Honestly-Significant-Difference, HSD) attraverso la comparazione a coppie delle differenze tra le medie (il valore di P della comparazione a coppie è stato calcolato con il Post Hoc Test; livello di confidenza = 0,95), Dopo l'analisi ANOVA, ovviamente gli *outliers* sono stati eliminati.

3.2.3. Analisi di metilazione del DNA

3.2.3.1. Estrazione del DNA

Il DNA totale di buona qualità (integrità e purezza) è stato estratto dai tessuti fogliari e dalle antere delle NIRLs di frumento duro-*Th. ponticum* (HOM+ e HOM-, vedi §3.1.2) attraverso la procedura di Tai e Tanksley (1990).

L'estrazione è stata effettuata partendo da tessuto fogliare verde per le fasi Z1.3 (4° foglia) e Z2.2 (accestimento) e da antere contenenti granuli pollinici in I e II divisione mitotica post-meiotica (microgametogenesi), omogeneizzato con mortaio e pestello in presenza di azoto liquido. Ad ogni campione, contenente circa 0.15 gr di tessuto fogliare, sono stati aggiunti 700 µl di tampone di estrazione (100 mM TrisHCl pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 500mM NaCl, 1.25% SDS, 8.3 mM NaOH, 0.38% sodio bisolfito) preriscaldato a 65°C ed il campione è stato incubato in un bagnetto caldo a 65°C per 10' agitando di tanto in tanto. Sono stati quindi aggiunti 0.22 ml di potassio acetato 5M ed il campione posto in ghiaccio per almeno 40'; poi è stato centrifugato a 4°C per 3' e il sopranatante è stato recuperato. Sono stati aggiunti 600 µl di isopropanolo e si è centrifugato di nuovo a 4°C per 3', eliminando poi il sopranatante e sciacquando il *pellet* due volte con 800 µl di etanolo al 70%.

Sono stati poi aggiunti al *pellet* 300 µl di T5E (50 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA pH 8), il campione è stato vortexato e posto a 65°C per 5'. Il campione è stato poi nuovamente vortexato per risospendere il *pellet* e sono stati aggiunti 150 µl di ammonio acetato 7.4 M, poi è stato centrifugato 3' e al sopranatante sono stati aggiunti 330 µl di isopropanolo. Il campione è stato centrifugato 3' e, dopo aver eliminato il sopranatante, il *pellet* è stato sciacquato due volte con etanolo al 70%. Sono stati aggiunti 100 µl di T5E ed è stato incubato a 65°C per 5'.

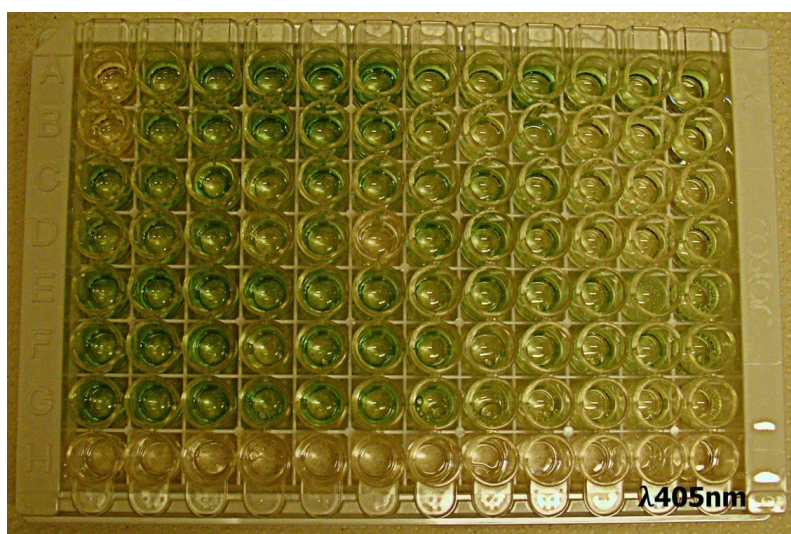
Sono stati aggiunti 10 µl di sodio acetato 3 M e 75 µl di isopropanolo, poi il campione è stato centrifugato 3', è stato eliminato il sopranatante ed in fine sono stati effettuati due lavaggi con etanolo al 70%. Il *pellet* è stato asciugato in Savant per 15', poi risospeso *overnight* (o.n.) a 4°C in 25 µl di acqua bi-distillata sterile. Il giorno successivo il campione è stato scaldato a 65°C per 5' e quindi conservato a -20°C.

3.2.3.2. Saggio immunologico ELISA per la quantizzazione delle citosine metilate (5-mC)

Il saggio immunologico ELISA, di tipo colorimetrico, utilizzato per quantificare il totale delle citosine metilate (5-mC), è stato condotto impiegando il Kit della ZYMO RESEARCH, 5-mC DNA ELISA Kit. Il riconoscimento delle 5-mC è basato sull'utilizzo di un anticorpo monoclonale anti-5-metilcitosina.

I campioni per l'analisi (replicati in doppio) consistevano in 100 ng di DNA estratto (vedi §3.2.3.1) da ogni NIRLs portatrice (HOM+) e non-portatrice (HOM-) dei segmenti 7AgL nelle varie fasi di sviluppo (Z1.3; Z2.2; I e II divisione pollinica). La misurazione dell'assorbanza è avvenuta a 405-450 nm mediante il lettore spettrofotometrico Thermo Scientific Multiskan GO microplate spectrophotometer (Fig. 15).

Figura 15: Saggio immunologico ELISA per la presenza di citosine metilate (5-mC).



Per la quantificazione percentuale di 5-mC nei campioni di DNA è stata prodotta una curva standard, rapportando in modo differente il controllo negativo e positivo (vedi Tab. 6), aventi rispettivamente lo 0 e 100% di metilazione; di seguito sono riportati i rapporti tra i due controlli utilizzati per generare la curva standard con 5 punti. Anche in questo caso sono stati utilizzati 100 ng di DNA.

Tabella 6: Rapporti tra il controllo negativo (0% di 5-mC) e il controllo positivo (100% di 5-mC) per la produzione dei diversi campioni per la costruzione della curva di calibrazione.

% 5-mC	Controllo Negativo (100 ng/μl)	Controllo Positivo (100 ng/μl)
0%	10,0 μl	0 μl
10%	9,0 μl	1,0 μl
25%	7,5 μl	2,5 μl
50%	5,0 μl	5,0 μl
75%	2,5 μl	7,5 μl
100%	0 μl	10,0 μl

L'assorbanza per ogni miscela è stata poi plottata come funzione dell'assorbanza a 405 nm (asse Y) vs. la percentuale (%) di 5-mC (asse X). Usando la seguente equazione, derivata dalla regressione logaritmica di secondo-ordine, è stata determinata la percentuale di 5-mC per campioni di DNA (incognite) sulla base della loro assorbanza (Fig. 16).

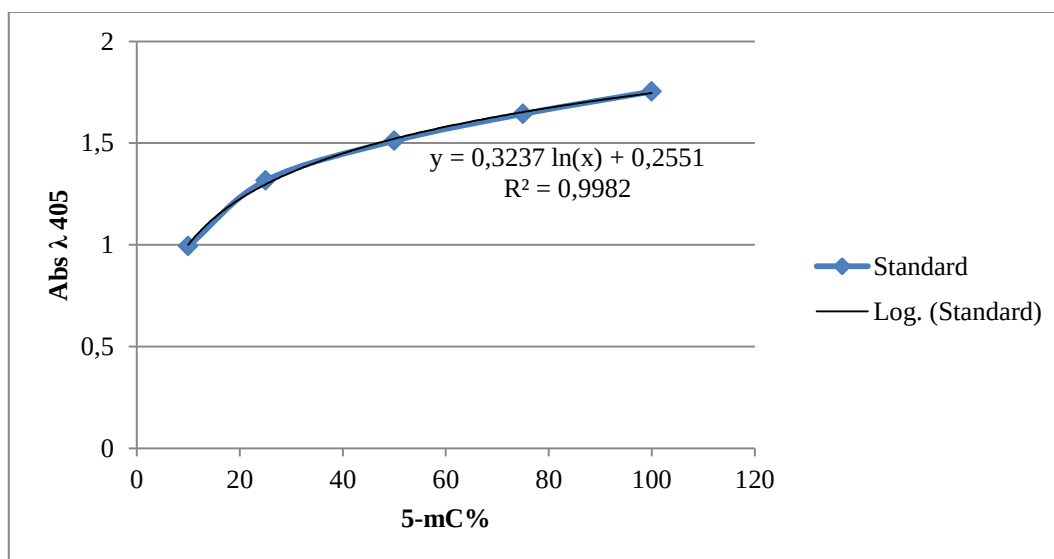
$$\%5\text{-mC} = e^{\left\{ \frac{(\text{assorbance} - y\text{-intercept}/\text{intercetta})}{\text{slope}(\text{pendenza})} \right\}}$$

Dove:

y-intercetta= valore di y (assorbanza per X/% di metilazione pari a 0)

pendenza= il coefficiente angolare della curva $\Delta Y/\Delta X$ (=b)

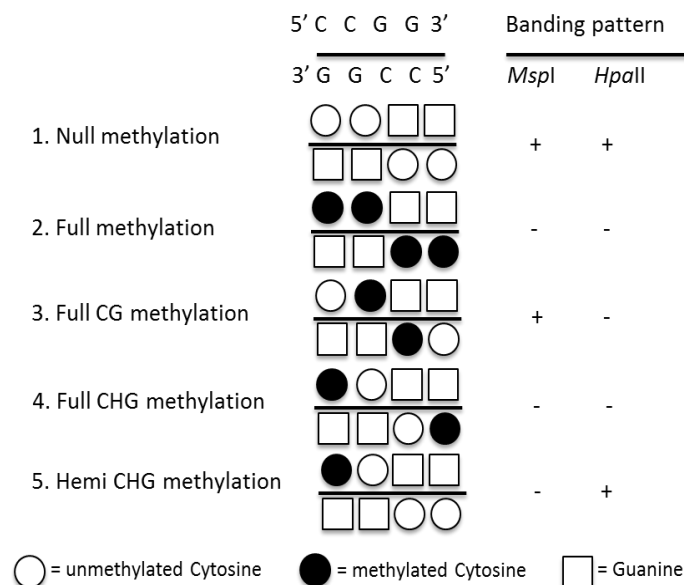
Figura 16: Retta di calibrazione (retta di regressione) passante per 5 punti (10, 25, 50, 75, 100) calcolata ad assorbanza λ 405 dei campioni a concentrazione nota.



3.2.3.3. Analisi MSAP (Methylation Sensitive Amplification Polymorphism)

Il secondo approccio intrapreso per valutare le variazioni del *pattern* di metilazione del DNA nei ricombinanti di frumento duro in seguito al trasferimento di segmenti cromosomici derivanti dalla specie selvatica affine *Th. ponticum*, è noto come MSAP (Methylation Sensitive Amplification Polymorphism). Questa metodologia si basa sulla diversa sensibilità alla metilazione delle citosine da parte di due enzimi di restrizione, Msp I ed Hpa II; queste endonucleasi, pur riconoscendo la medesima sequenza tetra-nucleotidica 5'-CCGG-3' (isoschizomeri), effettuano un taglio differenziale del DNA dipendente dalla posizione della 5-mC in relazione alle basi adiacenti e dalla presenza di 5-mC nella sequenza *target* su uno solo (emi-metilazione) o entrambi (*full*-metilazione) i filamenti di DNA. Come illustrato in Fig. 17, entrambe le endonucleasi tagliano il sito di restrizione quando questo non è metilato, mentre in caso di *full*-metilazione solo MspI riconosce la sequenza (se del tipo CG), mentre il DNA emi-metilato è riconosciuto da HpaII. A questi casi vi è da aggiungere l'assenza di digestione del sito ne da MspI ne da HpaII che si ha quando le citosine esterne delle tetranucleotide sono metilate su entrambi i filamenti di DNA. Inoltre, per ottenere un *pattern* dei frammenti di restrizione riproducibile, il DNA genomico è stato contemporaneamente digerito con il *rare cutter* Eco RI che risulta insensibile alla metilazione del suo sito di taglio (5'-GAATTC-3').

Figura 17: Interpretazione dei prodotti di digestione degli enzimi Msp I ed Hpa II.



La procedura seguita per l'MSAP si è basata sul protocollo di Shaked *et al.* (2001), di cui la Figura 18 riporta schematicamente i passaggi. Gli adattatori e *primers* utilizzati sono stati scelti da un'analisi di letteratura; (Xiong *et al.*, 1999; Shaked *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2013).

Per l'analisi sono stati utilizzati per ogni campione 500 ng di DNA genomico, digerito utilizzando, in reazioni separate, l'uno o l'altro isoschizomero e EcoRI, ligati con degli adattatori.

ADATTATORI:

EcoRI-adaptors-F → 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'

EcoRI-adaptors-R → 5'-AATTGGTACGCAGTC-3'

HpaII/MspI-adaptors-F → 5'-GATCATGAGTCCTGCT-3'

HpaII/MspI-adaptors-R → 5'-CGAGCAGGACTCATGA-3'

MISCELA DI REAZIONE E LIGAZIONE:

Componenti	Conc/quantità per 1 campione
DNA genomico	500 ng = 0,5 µg
<i>Eco</i> RI (10U/ µl)	10 U
<i>Mse</i> I (o <i>Hpa</i> II o <i>Msp</i> I) (10U/ µl)	12 U
Tango (Buffer)	10 X
T4DNA Ligase Buffer	5 X
EcoRI-adaptors	50 ng
<i>Mse</i> I (o <i>Hpa</i> II o <i>Msp</i> I)-adaptors	50 ng
T4 DNA Ligase (5U/ µl)	1 U
Volume totale	10 µl

La miscela di reazione è stata posta per 3h a 37°C.

AMPLIFICAZIONE PRESELETTIVA: I frammenti di restrizione ottenuti sono stati amplificati con dei *primers* costruiti sulla sequenza degli adattatori, aventi un unico nucleotide selettivo all'estremità 3' (vedi avanti); la miscela di reazione per l'amplificazione preselettiva era allestita come riportato nella seguente tabella:

Componenti	Conc/quantità per 1 campione
DNA digerito e ligato	≈50 ng
<i>EcoRI</i> -A primers	75 ng
<i>MseI</i> -C (o <i>HpaII</i> / <i>MspI</i> -T) primers	75 ng
Taq-Green_Promega	3X
H ₂ O	Per portare a volume
Volume totale	12 µl

PRIMERS PER LA PREAMPLIFICAZIONE:

EcoRI-A → 5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'

HpaII/*MspI*-T → 5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGT-3'

Ciclo di pre-amplificazione:

STEP 1	95°C	5'	1x
STEP 2-a	94°C	30''	30x
STEP 2-b	56°C	1'	
STEP 2-c	72°C	1'	
STEP 3	72°C	5'	1x

CONTROLLO DELL'AVVENUTA AMPLIFICAZIONE: Il prodotto di reazione è stato corso, su gel di agarosio all'1-1,5 %; il profilo atteso è uno *smear* di frammenti di DNA di dimensione compresa tra le 1500 e le 100 bp.

Il rimanente volume di reazione di amplificazione è stato diluito 1:20 con acqua bi-distillata (ad esempio per 4 µl di amplificato sono stati aggiunti 76 µl di H₂O bi-distillata);

AMPLIFICAZIONE SELETTIVA

I prodotti di pre-amplificazione sono ri-amplificati con 8 coppie di *primers* selettivi. Le coppie di “*primers* selettivi”, di seguito riportati, presentano la medesima sequenza di quelli preselettivi ma con l’aggiunta di 2 o 3 nucleotidi variabili all’estremità 3’ che conferiscono la specificità.

COPPIE DI PRIMERS SELETTIVI:

<i>EcoRI</i> -ACA+ <i>HpaII</i> / <i>MspI</i> -TCA	<i>EcoRI</i> -ACA+ <i>HpaII</i> / <i>MspI</i> -TTC
<i>EcoRI</i> -ACC+ <i>HpaII</i> / <i>MspI</i> -TGC	<i>EcoRI</i> -ACC+ <i>HpaII</i> / <i>MspI</i> -TTC
<i>EcoRI</i> -ACG+ <i>HpaII</i> / <i>MspI</i> -TCCA	<i>EcoRI</i> -AAG+ <i>HpaII</i> / <i>MspI</i> -TCGA
<i>EcoRI</i> -ACA+ <i>HpaII</i> / <i>MspI</i> -TCGA	<i>EcoRI</i> -ACT+ <i>HpaII</i> / <i>MspI</i> -TCGA
<i>EcoRI</i> -AAC+ <i>HpaII</i> / <i>MspI</i> -TGC	<i>EcoRI</i> -AAC+ <i>HpaII</i> / <i>MspI</i> -TTC

La soluzione di amplificazione era costituita:

componenti	Conc/quantità per un campione
DNA pre-amplificato	~50 ng
<i>EcoRI</i> -A..	30 ng
<i>MseI</i> -C.. (o <i>HpaII</i> / <i>MspI</i> -T..)	30 ng
Taq-Green_Promega	2,5 X
H ₂ O	Per portare a volume
Volume totale	10 µl

Ciclo di amplificazione selettiva:

STEP 1	94°C	5'	1x
STEP 2-a	94°C	30''	1x 8x 27x (totale 36 cicli)
STEP 2-b1	65°C	30''	
STEP 2-b2	-1°C*	30''	
STEP 2-b3	56°C	30''	
STEP 2-c	72°C	1'	
STEP 3	72°C	5'	1x

Terminata l'amplificazione selettiva, i prodotti sono stati poi risolti in un gel di acrilamide denaturante al 6% (Fig. 19).

Figura 18: Protocollo MSAP seguito.

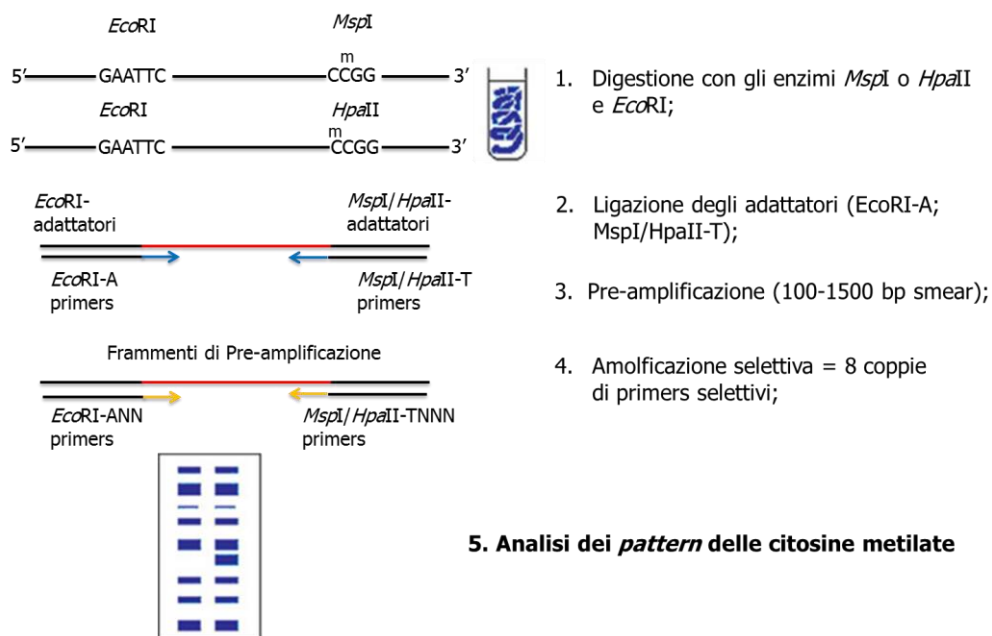
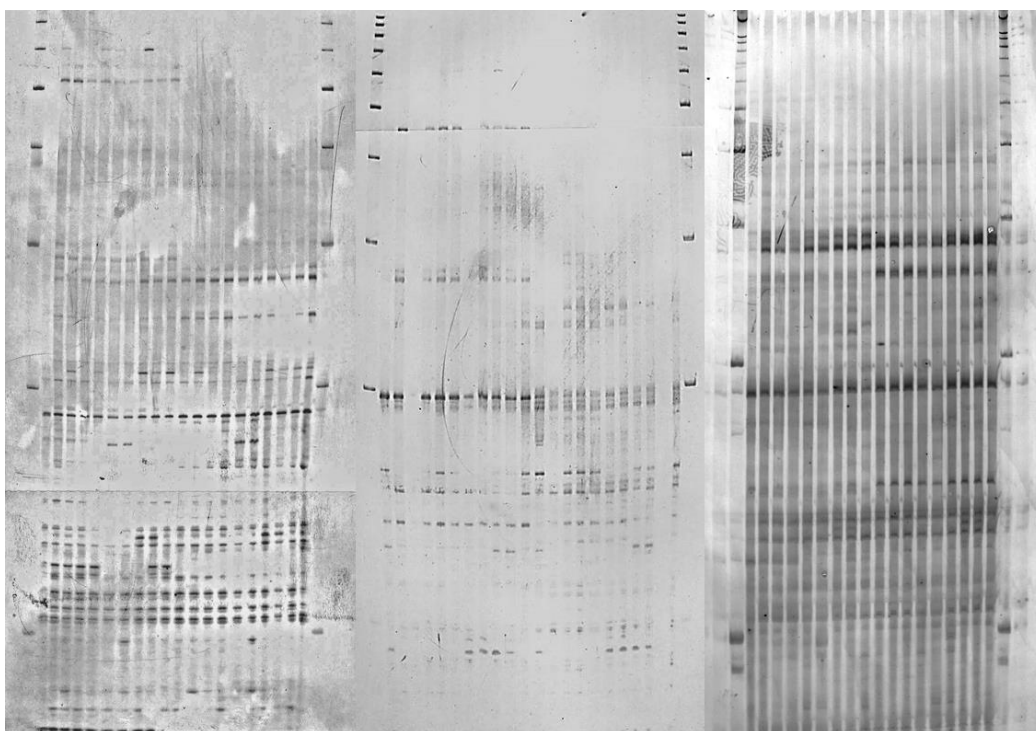


Figura 19: Esempi di pattern di metilazione risolti in gel di acrilamide denaturante al 6%.



4. RISULTATI

4.1. Analisi del sistema dell'architettura radicale (RSA) in linee ricombinanti e di traslocazione di *Th. ponticum* in frumento duro e tenero attraverso diversi micro-metodi

Attraverso i micro-metodi *paper no-roll* (PNR) e rizotroni (RHZ) è stata effettuata un'analisi comparativa delle linee quasi-isogeniche di frumento (ricombinanti e di traslocazione), in cui sono stati misurati diversi parametri relativi allo sviluppo dell'apparato radicale ed anche del germoglio su due diversi substrati di crescita (carta e terriccio). Come detto in precedenza (vedi §3.2.1), questi metodi vengono considerati molto utili nel predire l'architettura del sistema radicale (RSA) della pianta adulta.

4.1.1. Dissezione funzionale-strutturale del 7AgL presente nelle NIRLs frumento duro-*Th. ponticum* per caratteristiche dell'apparato radicale

Lo studio comparativo di plantule delle linee ricombinanti di frumento duro R5, R112, R23 (HOM+) e delle rispettive linee di controllo (HOM-) attraverso i 2 micro-metodi (vedi § 3.2.1), ha evidenziato che la presenza dei segmenti 7AgL non ha effetti significativi sul germoglio (SL e SDW; vedi Tab. 7A – 7B e Fig. 20); difatti, seppur l'ANOVA-GLM relativa alla biomassa del germoglio (SDW) indica un effetto significativo associato alla presenza del 7AgL, l'analisi a coppie (test di Tukey) non evidenzia nessuna differenza significativa tra le linee ricombinanti e i rispettivi controlli (HOM+ vs HOM-), anche se il genotipo R23 (sia HOM+ che HOM-) presenta il valori di SDW significativamente minori rispetto a R5 ed R112. D'altro canto le stesse analisi hanno mostrato che per molti dei caratteri dell'architettura e biomassa radicale è significativa l'interazione dei genotipi con la presenza del segmento 7AgL.

Tabella 7 A-B: Quadrati medi dell'ANOVA-GLM per i caratteri misurati (SL- lunghezza del germoglio (cm); SDW-biomassa del germoglio (mg); SRA-angolo di diffusione delle radici seminali (radianti); SRN-numero delle radici seminali; PRL-lunghezza della radice principale (cm); ARL-lunghezza media delle radici (cm); TRL- lunghezza totale dell'apparato radicale (cm); RDW-biomassa radicale (mg); RDW/TRL-stima del diametro radicale (mg/cm); RDW/SDW- rapporto tra le biomasse di radici e germoglio) negli esperimenti con i due micro-metodi (A = *paper no-roll*; B = rizotroni) sulle coppie di NIRLs (HOM+ e HOM-), R5, R112, R23. *,**,*** indicano la significatività del fattore a $P < 0,05, 0,01$ e $0,001$, rispettivamente.

A	Fattore	Genotipo	7Ag(Genotipo)	R		Errore
	Df	2	3	3		194
	SL	2.703	9.221	11.397	*	3.717
	SDW	17.516 *	3.053	5.387		3.483
	SRA	0.051	0.598 **	0.248		0.128
	SRN	0.442	0.135	0.309		0.330
	PRL	41.460 **	42.040 **	13.963		7.976
	TRL	943.488 *	674.568	185.100		257.191
	RDW	12.784 ***	28.529 ***	1.207		1.294
	RDW/TRL	0.000 *	0.001 ***	0.000		0.000
	RDW/SDW	0.039	0.139 ***	0.053 *		0.019
	Df	2	3	3		911
	ARL	86.996 *	89.063 *	142.232 ***		26.150
B	Fattore	Genotipo	7Ag(Genotipo)	R		Errore
	Df	2	3	3		72
	SL	10.031	3.010	21.695 **		4.022
	SDW	395.899 ***	214.915 **	170.980 *		49.274
	SRA	0.122	0.803 ***	0.014		0.104
	SRN	0.318	0.215	0.533 *		0.165
	PRL	37.739 *	27.556 *	32.210 *		8.658
	TRL	1612.670 **	822.729 *	2637.365 ***		242.423
	RDW	75.827 *	173.743 ***	151.194 ***		18.230
	RDW/TRL	0.001	0.011 ***	0.008 **		0.001
	RDW/SDW	0.002	0.050 ***	0.017 *		0.004
	Df	2	3	3		290
	ARL	364.773 ***	143.504 ***	582.953 *		37.910

Con entrambi i micro-metodi si evidenzia un effetto significativo della presenza del 7AgL sull'angolo di diffusione radicale (SRA), la lunghezza della radice principale (PRL), la biomassa radicale (RDW), il diametro radicale (RDW/TRL) e la ripartizione dei nutrienti tra radice e germoglio (RDW/SDW).

Le linee ricombinanti R112 e R23 mostrano, a 7gg (PNR) rispetto alle loro linee di controllo non portatrici del segmento 7AgL (HOM–), un medesimo incremento dell'SRA, pari al 17%, e a 12 gg (RHZ) per la NIRL R112 HOM+ un aumento, altamente significativo ($P < 0,001$), del 37%, a fronte di un +14% per R23 HOM+.

Associato al ricombinante R112 (HOM+) è stato inoltre riscontrato l'aumento rispetto al corrispondente HOM– dei caratteri che indicano la capacità della radice di colonizzare gli strati più profondi del terreno, ovvero PRL, ARL e TRL. Per l'accrescimento in lunghezza delle radici, i dati ottenuti a 7 gg dall'accrescimento su carta (PNR) hanno segnalato una tendenza positiva del 28% del 7AgL (vedi Fig. 20), risultato poi significativo (+12%, +15% e + 15,6%, rispettivamente per PRL, TRL e ARL) nello stadio di crescita più avanzato (12 gg; RHZ).

Gli altri due segmenti 7AgL, 23% in R5 e 40% in R23, non hanno dato nessun contributo positivo per i medesimi caratteri, sebbene il segmento dell'R5 sia parte di quello portato dall'R112 e quest'ultimo parte di quello dell'R23. Per di più, associata a quest'ultimo segmento è stata la tendenza ad un minore accrescimento verticale dell'apparato radicale, in particolar modo nei primi 7 gg (PNR) rispetto a tutte le altre NIRLs, con valori che sembrano poi livellarsi, come rilevato con il metodo RHZ (vedi Fig. 20).

Anche per la biomassa radicale (RDW), l'effetto dei segmenti 7AgL è stato altamente significativo ($P < 0,001$) e, anche per questo carattere, la linea ricombinante R112 ha mostrato sia con l'analisi PNR che RZH, non solo un incremento altamente significativo ($P < 0,001$) e superiore al 30% rispetto alla sua NIRL di controllo, ma anche il valore più alto rispetto a tutte le altre NIRLs analizzate (vedi Fig. 21). Opposto è risultato il comportamento del ricombinante R23, il quale ha mostrato una riduzione significativa rispetto al suo controllo (– 31% e –28%, per PNR e RHZ).

Analogamente per il rapporto RDW/TRL (stima del diametro radicale), la presenza o l'assenza dei segmenti 7AgL ha prodotto effetti significativi sul fenotipo ($P < 0,001$); come per i caratteri precedenti, la NIRL R112 HOM+ risulta dotata di un diametro radicale maggiore sia rispetto al suo HOM- (+14.4% e +33%, PNR e RHZ) che rispetto agli altri genotipi (R5 ed R23). Si contrappone a questo il fenotipo, la diminuzione significativa associata al 12% di cromatina 7AgL esclusiva del ricombinante R23 (la zona più prossimale del suo segmento), pari al –20% e – 25% verso il suo controllo HOM–, rilevata con PNR e RHZ, rispettivamente (Fig. 21).

Figura 20: Risultati, espressi come media $\pm$ errore standard, dei micro-metodi *paper no-roll* e rizotroni per i caratteri SL (lunghezza del germoglio), SDW (biomassa secca del germoglio), PRL (lunghezza della radice principale), ARL (lunghezza media radiale), TRL (lunghezza totale dell'apparato radicale) e SRA (angolo di diffusione delle radici seminali); le lettere diverse indicano i rapporti di significatività ottenuti dal Tukey test.

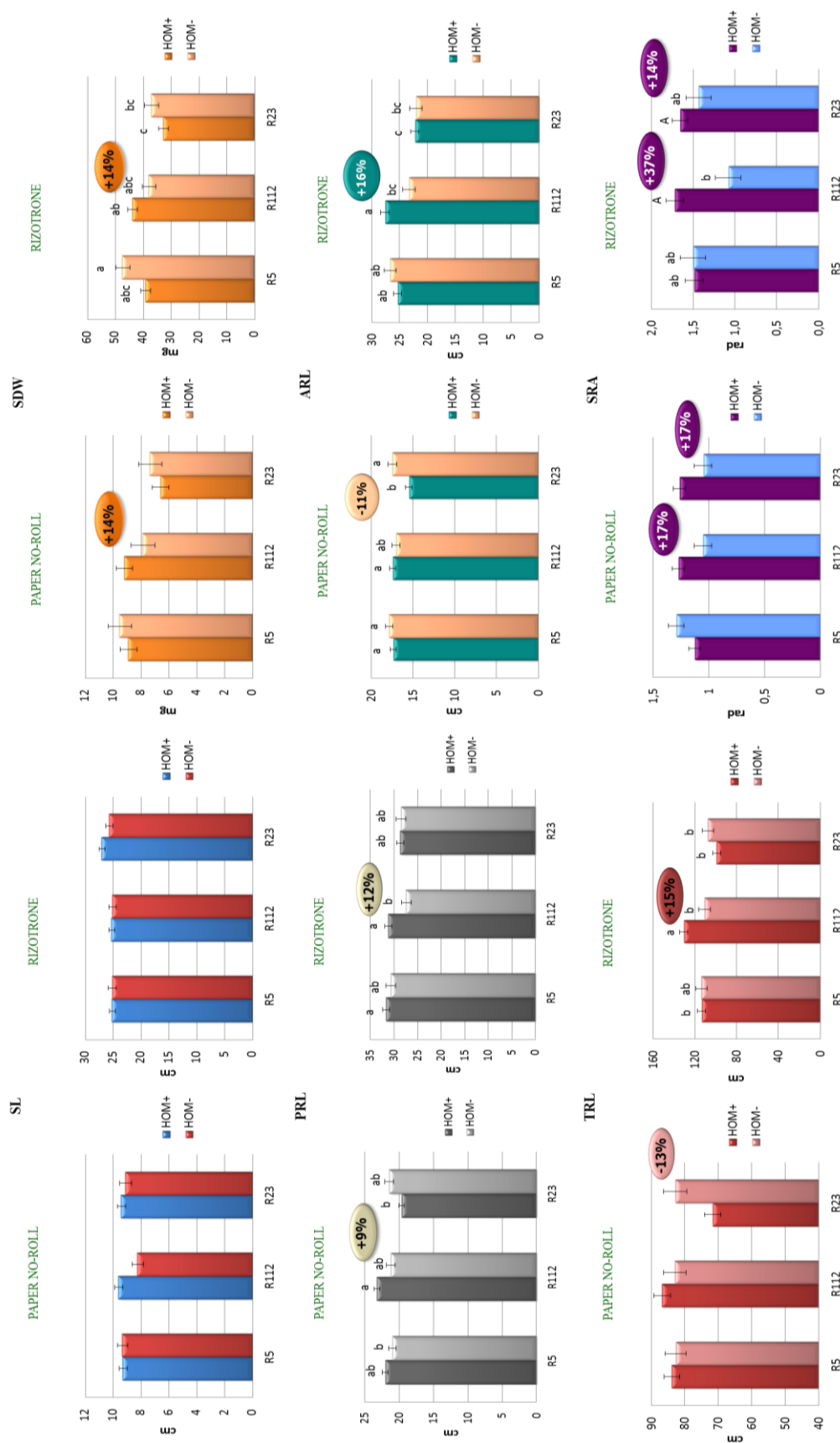
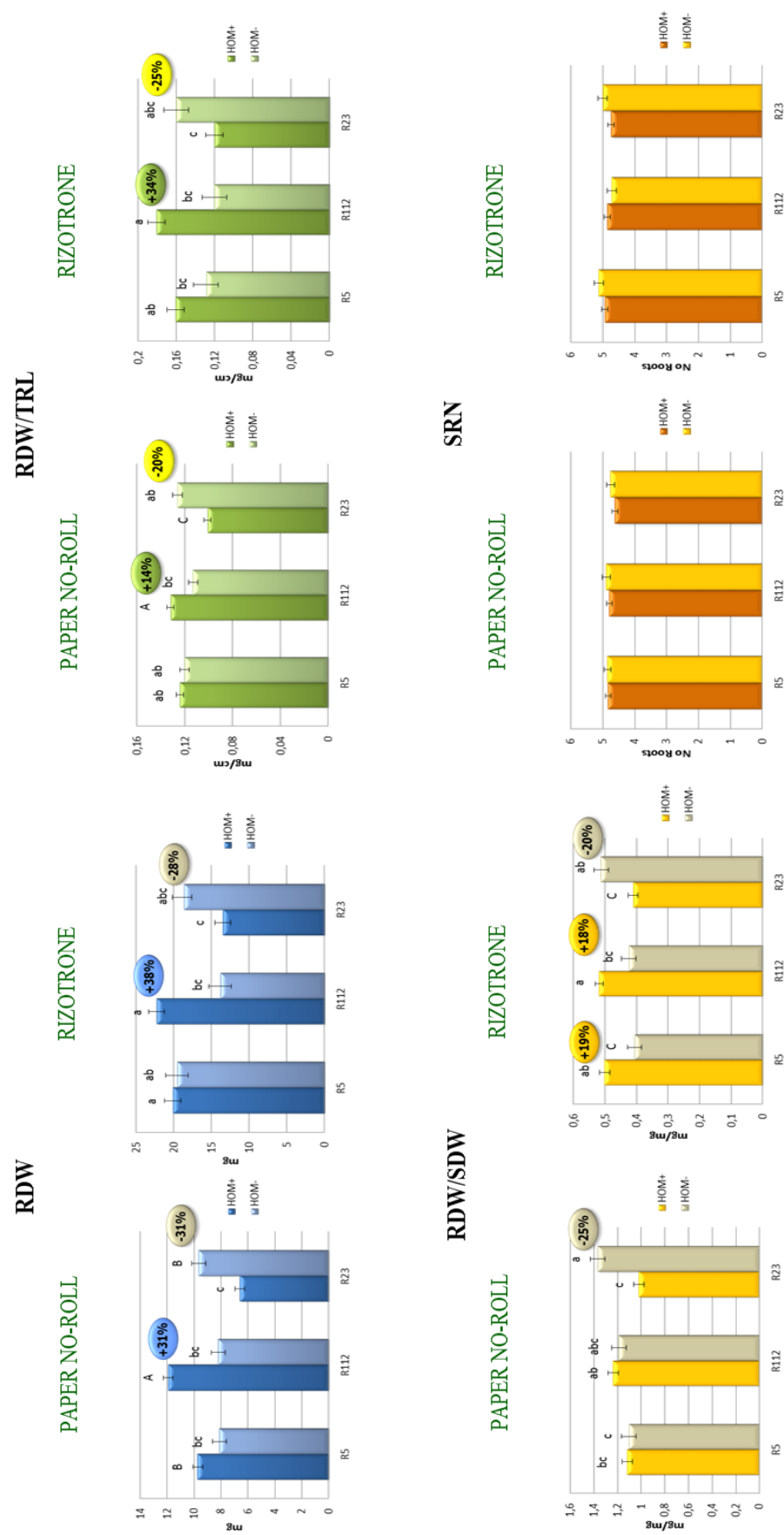


Figura 21: Risultati, espressi come media $\pm$ errore standard, dei micro-metod *paper no-roll* e rizotroni per i caratteri RDW (biomassa secca della radice), RDW/TRL (diametro radicale medio), RDW/SDW (rapporto biomassa delle radici e biomassa del germoglio), SRN (numero delle radici seminali); le lettere diverse indicano i rapporti di significatività ottenuti dal Tukey test.

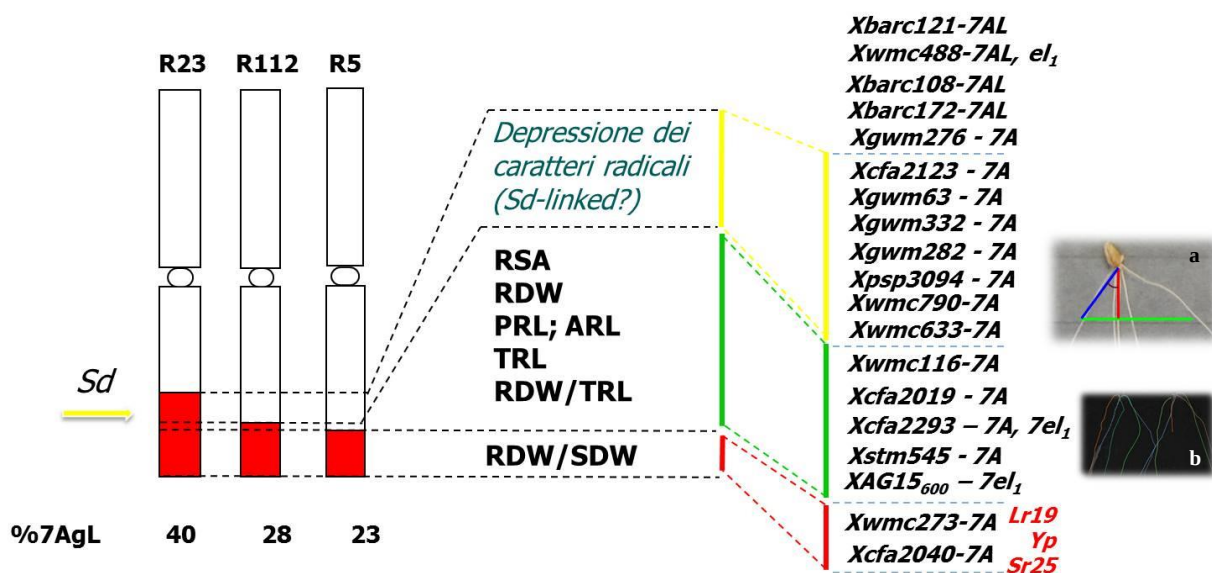


Come osservabile dall'ANOVA-GLM, il rapporto tra biomassa delle radici e biomassa del germoglio, indicativo della ripartizione dei nutrienti tra radice e germoglio, è risultata significativamente ($P < 0,001$) influenzata dalla presenza del segmento in entrambi i micro-metodi di analisi; in particolare, al 23% del 7AgL risulta essere associato un incremento del 19% e del 18% (RHZ), osservato rispettivamente negli HOM+ di R5 e R112 verso i rispettivi HOM-. Anche in questo caso, è stato rilevato un effetto negativo del 7AgL associato alla linea ricombinante R23 (-25% e -19,7%, PNR e RHZ).

Un carattere che invece non appare influenzato né dal *background* delle NIRLs (genotipo) né dai segmenti 7AgL (vedi Tab. 7) è il numero delle radici seminali (SRN).

Nel complesso, i dati ottenuti dai due micro-metodi, risultati fra loro coerenti, hanno permesso la localizzazione di geni/QTL putativamente responsabili dei vari parametri connessi allo sviluppo dell'apparato radicale, e quindi una “dissezione” in sub-regioni del 40% 7AgL complessivamente contenuto nelle NIRLs frumento duro-*Th. ponticum* (Fig. 22).

Figura 22: Sub-regioni del 7AgL di *Th. ponticum*, presente nelle linee ricombinanti di frumento duro analizzate (R5, R112 e R23), contenenti putativi geni/QTL per i vari caratteri dell'architettura e biomassa radicale. a = angolo di diffusione delle radici seminali; b = sistema radicale in rizotrone, misurato con il software Root Snap.



In particolare, molti dei loci per i caratteri analizzati risultano risiedere nella porzione 7AgL compresa tra il 23 e il 28% del braccio, una porzione del 7AgL condivisa dai ricombinanti R112 e R23 (Fig. 22); alleli 7AgL in questa compresi determinano un incremento significativo dell'RSA (angolo di diffusione della radice), del diametro medio delle radici e della biomassa radicale. Gli effetti positivi sono quasi esclusivamente osservabili nel ricombinante R112, sia

verso la linea di controllo (HOM-) che verso le altre NIRLs, mentre R23 HOM+, pur condividendo la medesima regione 7AgL, ha mostrato una depressione di quasi tutti i caratteri misurati (Fig. 20-21). Un fattore contribuente a quanto osservato, potrebbe essere la presenza del gene per la Segregazione Distorta (*Sd*), gene/i presente unicamente nella porzione 7AgL specifica del segmento della R23 (28 – 40% del braccio sostituito; Ceoloni *et al.*, 2014b; vedi §1.4.1.3).

4.1.2. Analisi del contributo sull'architettura radicale di due diverse accessioni del *Th. ponticum* in NILs di frumento tenero

La medesima indagine comparativa, attraverso i micro-metodi *paper no-roll* e rizotroni (vedi §3.2.1), è stata condotta in linee di frumento tenero, quali la linea di traslocazione frumento tenero-*Th. ponticum* T4 (70% 7AgL sul 7DL, lo stesso 7AgL o 7el₁L diversamente frazionato nelle NIRLs di frumento duro) e la linea frumento tenero-*Th. ponticum* KS24, in cui l'intero 7DL è sostituito dal 7el₂L, oltre alla cv. Thatcher come controllo (Fig. 9).

Come è possibile osservare nelle Tabelle 8A-B, analogamente a quanto osservato per i frumenti duri (§4.1.1), l'analisi della varianza per i 3 genotipi non ha evidenziato nessuna differenza significativa associabile alla presenza di una o l'altra delle porzioni 7el₁L o 7el₂L rispetto al controllo Thatcher per la lunghezza e la biomassa del germoglio, sia a 7 gg che a 12 gg di sviluppo (SL e SDW).

Tabella 8 A-B: Quadrati medi dell'ANOVA-GLM per i caratteri misurati (SL- lunghezza del germoglio (cm); SDW-biomassa del germoglio (mg); SRA-angolo di diffusione delle radici seminali (radianti); SRN-numero delle radici seminali; PRL-lunghezza della radice principale (cm); ARL-lunghezza media delle radici (cm); TRL- lunghezza totale dell'apparato radicale (cm); RDW-biomassa radicale (mg); RDW/TRL-stima del diametro radicale (mg/cm); RDW/SDW-rapporto tra le biomasse di radici e germoglio) negli esperimenti con i due micro-metodi (A = *paper no-roll*; B = rizotroni) sulle NILs (HOM+ e HOM-) T4 e KS24 e su Thatcher. *,**,*** indicano la significatività del fattore a P <0,05, 0,01 e 0,001, rispettivamente.

A	Fattore	Genotipo	R	Errore
	Df	2	2	48
	SL	6.817	2.010	3.576
	SDW	0.200	0.056	0.258
	SRA	1.511	*** 0.067	0.157
	SRN	8.348	*** 1.636	** 0.269
	PRL	67.601	*** 5.129	4.462
	TRL	1960.508	*** 2.633	96.893
	RDW	3.577	* 1.077	0.285
	RDW/TRL	0.000	* 0.000	* 0.000
	RDW/SDW	0.065	0.003	0.014
	Df	2	2	182
	ARL	261.989	*** 22.005	23.512

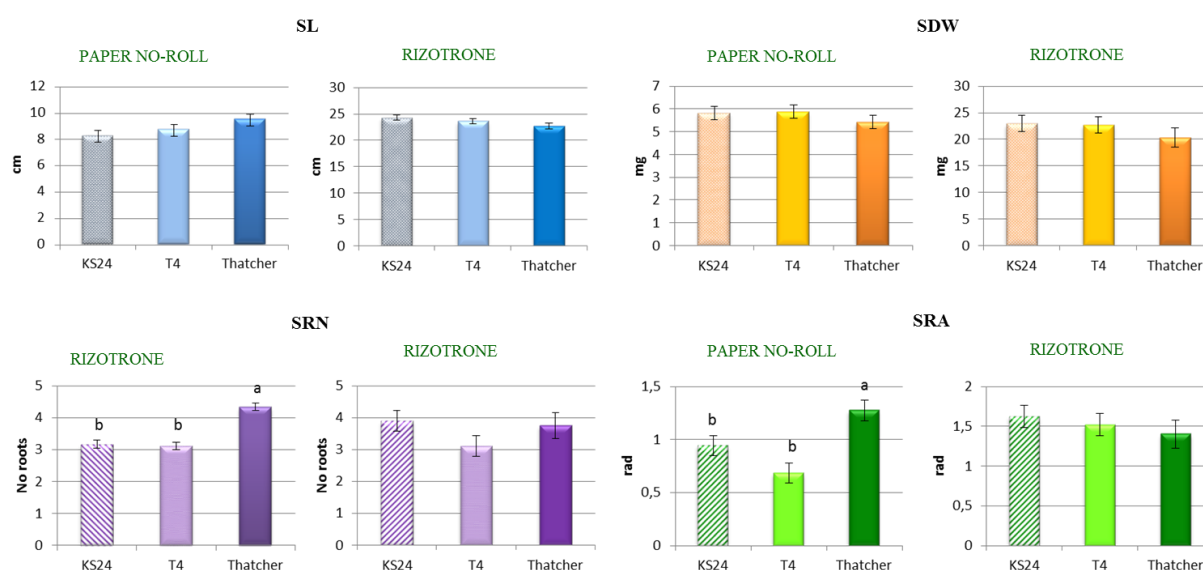
B	Fattore	Genotipo	R	Errore
	Df	2	2	9
	SL	2.634	5.078	* 1.030
	SDW	8.383	12.467	10.896
	SRA	0.051	0.307	0.095
	SRN	0.883	1.117	0.507
	PRL	31.514	** 7.715	2.269
	TRL	32.516	2.303	34.724
	RDW	15.783	* 3.991	2.030
	RDW/TRL	0.018	* 0.008	0.004
	RDW/SDW	0.006	*** 0.001	* 0.000
	Df	2	3	47
	ARL	194.280	** 21.657	30.801

Dal confronto delle due metodologie è risultato che a 7 gg, il numero delle radici seminali (SRN) è significativamente diverso tra le tre linee analizzate (P <0,001); Thatcher ha mostrato il valore significativamente più alto (+28%) rispetto a T4 e KS24, anche se poi tale differenza non

è confermata con i dati ottenuti dai rizotroni (12 gg), segnalando un recupero da parte degli altri due genotipi (vedi Fig. 23).

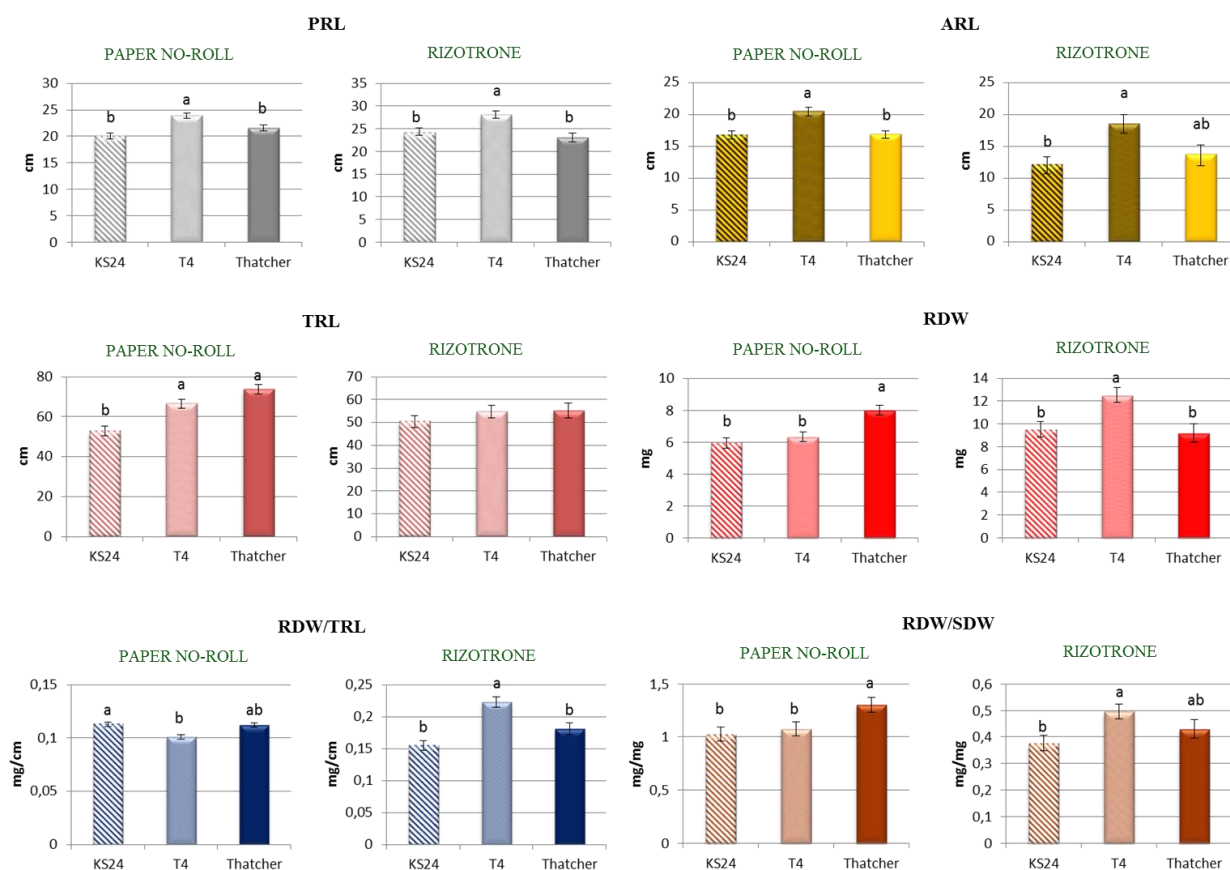
Altro carattere che ha mostrato un andamento simile è l'angolo di diffusione delle radici seminali (SRA), probabilmente influenzato dal più alto SRN iniziale della cv. Thatcher (vedi Fig.23).

Figura 23: Risultati, espressi come media $\pm$ errore standard, dei micro-metodi *paper no-roll* e rizotroni per i caratteri SL (lunghezza del germoglio), SDW (biomassa secca del germoglio), SRN (numero delle radici seminali) e SRA (angolo di diffusione delle radici seminali); le lettere diverse indicano i rapporti di significatività ottenuti dal Tukey test.



I risultati ottenuti non hanno in generale evidenziato nessun effetto significativo sull'RSA da parte della linea KS24, contenente il braccio 7el₂L; al contrario, le significatività rilevate sono associate, per la maggioranza dei caratteri misurati, al 70% del 7el₁L incorporato nella linea T4, con incrementi significativi verso KS24 e la cv. Thatcher (Tab. 8 e Fig. 23-24), confermando gli effetti positivi di alleli 7el₁ osservati nei ricombinanti di frumento duro (vedi §4.1.1). È stato infatti osservato un incremento significativo rispetto al controllo della lunghezza della radice principale (10% e 18%, PNR e RHZ rispettivamente), della lunghezza media delle radici (+18% e +26%, PNR e RHZ) del diametro medio delle radici (+19%, RHZ), della biomassa radicale (+27%, RHZ) e del rapporto tra la biomassa radicale e del germoglio (+13%, RHZ) (Fig. 24).

Figura 24: Risultati, espressi come media $\pm$ errore standard, dei micro-metodi *paper no-roll* e rizotroni per i caratteri PRL (lunghezza della radice principale), ARL (lunghezza media della radice), TRL (lunghezza totale dell'apparato radicale), RDW (biomassa secca della radice), RDW/TRL (stima del diametro radicale) e RDW/SDW (rapporto tra le biomasse di radici e germoglio); le lettere diverse indicano una differenza significativa ($P < 0,05$; $< 0,01$; $< 0,001$).



4.2. Analisi dell'architettura radicale delle linee ricombinanti e di traslocazione di frumento duro e tenero – *Th. ponticum* (NILs) in risposta ad una bassa disponibilità idrica

Le caratteristiche dell'RSA mostrato dalle NILs/NIRLs di frumento tenero e duro-*Th. ponticum*, rilevate attraverso i micro-metodi *paper no-roll* e rizotroni, unitamente a evidenze di letteratura su vari materiali genetici (Ehdaie *et al.*, 2003; Placido *et al.*, 2013) hanno stimolato ulteriori analisi, volte a verificare il comportamento dell'RSA in condizioni di crescita carenti di acqua. Di seguito sono riportati i risultati del comportamento delle radici e del germoglio di plantule sottoposte a stress idrico adottando il micro-metodo *paper roll* (vedi §3.2.1.3). Le

analisi hanno coinvolto sia le NIRLs di frumento duro- *Th. ponticum* (e relativi HOM-) sia le NILs di frumento tenero T4, KS24 e la cv. Thatcher.

4.2.1. Linee ricombinanti di frumento duro – *Th. ponticum*

L'analisi comparativa dell'RSA delle 6 NIRLs (3 7AgL HOM+ e 3 HOM-) allevate in condizioni di limitata (LW) o buona (WW) disponibilità idrica, applicando la metodologia *paper roll* (vedi §3.2.1.3), ha evidenziato che la presenza del 7AgL, in condizioni di *stress* idrico ha un'azione positiva sui caratteri radicali misurati. Un effetto significativo è stato rilevato su tutti i 9 i caratteri analizzati (Tab. 9). In particolare, per i caratteri SDW (biomassa del germoglio), SRN (numero delle radici seminali), PRL (lunghezza dalle radice principale), TRL (lunghezza totale dell'apparato radicale), RDW (biomassa dell'apparato radicale) e RDW/SDW (rapporto tra le biomasse di radici e germoglio, indicatore della capacità di ripartizione dei nutrienti).

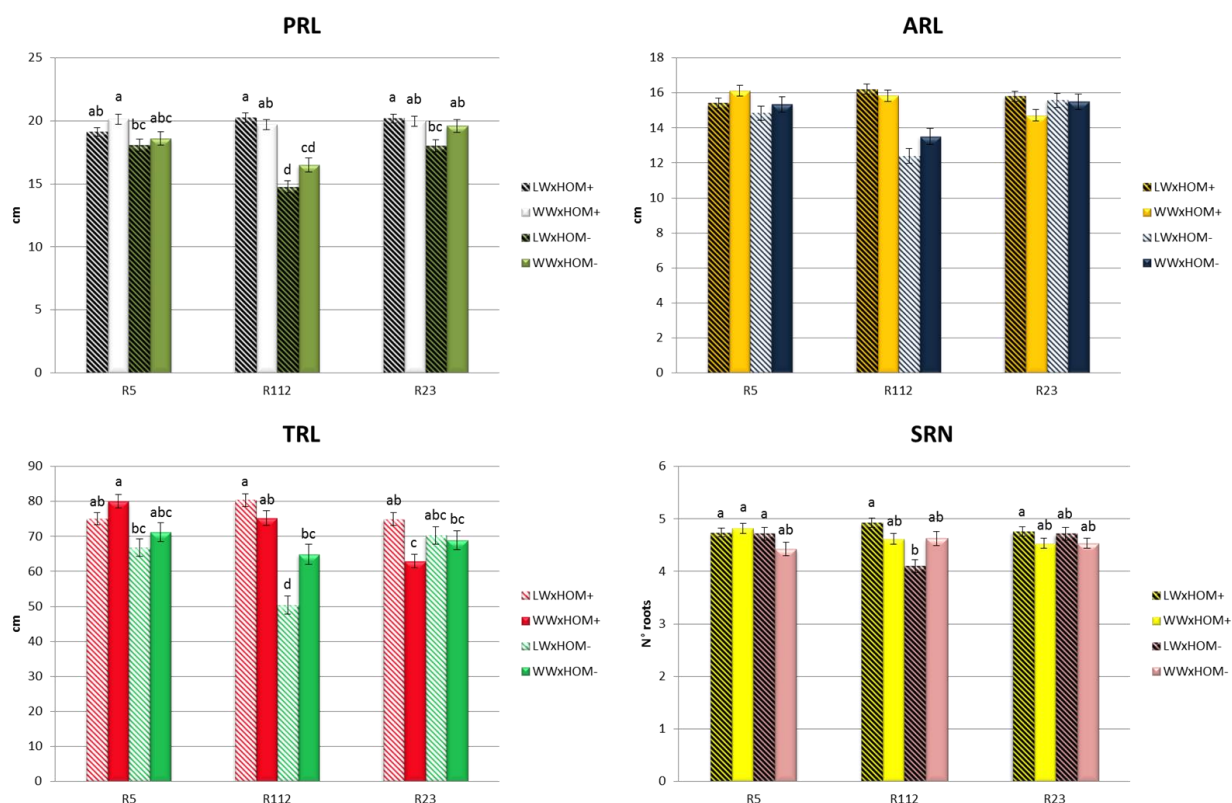
Le condizioni di carenza idrica (LW) hanno, come atteso, avuto un'azione negativa sulla maggioranza dei parametri analizzati, evidenziato dal comportamento dei genotipi di controllo HOM-, che hanno mostrato una riduzione di ogni fattore analizzato in relazione alle condizioni LW.

Tabella 9: Quadrati medi dell'ANOVA-GLM per i caratteri misurati al termine delle due condizioni di crescita, LW e WW (SL- lunghezza del germoglio (cm); SDW-biomassa del germoglio (mg); SRN-numero delle radici seminali; PRL-lunghezza della radice principale (cm); ARL-lunghezza media delle radici (cm); TRL-lunghezza totale dell'apparato radicale (cm); RDW-biomassa radicale (mg); RDW/TRL- diametro radicale medio (mg/cm); RDW/SDW- rapporto tra le biomasse di radici e germoglio) con il micro-metodo *cigat roll* delle coppie di NIRLs (HOM+ e HOM-) R5, R112 e R23 . *,**,*** indicano la significatività del fattore a P <0,05, <0,01 e <0,001, rispettivamente. G = genotipo; T = trattamento (LW o WW).

Fattore	G		T		R		T x G		7Ag(G)		T x 7Ag(G)		Errore
Df	2		1		5		2		3		3		91
SL	27.050	***	6.725		10.686	*	3.317		50.985	***	8.024		4.024
SDW	30.394	***	0.547		1.600		4.763	*	6.990	***	7.749	***	1.187
SRN	0.448		0.633		0.988	*	1.062		2.358	***	2.322	***	0.425
PRL	95.911	***	0.012	*	43.850	***	0.264		244.223	***	24.008	*	6.757
TRL	1143.327	**	78.781		860.359	***	1474.283	***	5294.263	***	1366.590	***	117.323
RDW	12.879	***	7.932	**	1.575		4.708	**	54.220	***	11.174	***	0.748
RDW/TRL	0.007	***	0.173		0.000	*	0.000		0.004	***	0.000		0.000
RDW/SDW	0.027	***	0.001		0.003		0.024	***	0.101	***	0.018	***	0.002
Df	2		1		5		2		3		3		2120
ARL	172.050	***	7.593		183.310	***	63.676	*	484.647	***	40.957		21.047

In risposta alla scarsa disponibilità di acqua (LW), tutte e tre le linee ricombinanti (7AgL HOM+) hanno mostrato un significativo incremento del TRL rispetto alle loro NIRLs di controllo (HOM-), pari al +11%, +37% e +6% per R5, R112 ed R23, rispettivamente (Fig. 25). Come evidente dall'analisi della varianza (Tab. 9), la presenza del 7AgL ha un'azione positiva sul carattere ARL, ma il trattamento LW (seppur in maniera non significativa, $P = 0,055$) ne ha determinato una riduzione nella maggioranza delle NIRLs, fatta eccezione per la linea ricombinante R112, che ha mostrato un aumento della lunghezza media delle radici rispetto a quando cresciuta in condizioni di WW, ed anche, in LW, verso il suo HOM- (+23%) e le altre NIRLs. Andamento analogo, anche se meno evidente, ha mostrato il ricombinante R23 rispetto al suo controllo HOM- (Fig. 25).

Figura 25: Risultati, espressi come media $\pm$ errore standard, rilevati nelle due tesi (trattamenti LW e WW) del micro-metod *cigar roll* per i caratteri PRL (lunghezza della radice principale), ARL (lunghezza media della radice), TRL (lunghezza totale dell'apparato radicale) e SRN (numero delle radici seminali); le lettere diverse indicano i rapporti di significatività ottenuti dal Tukey test.



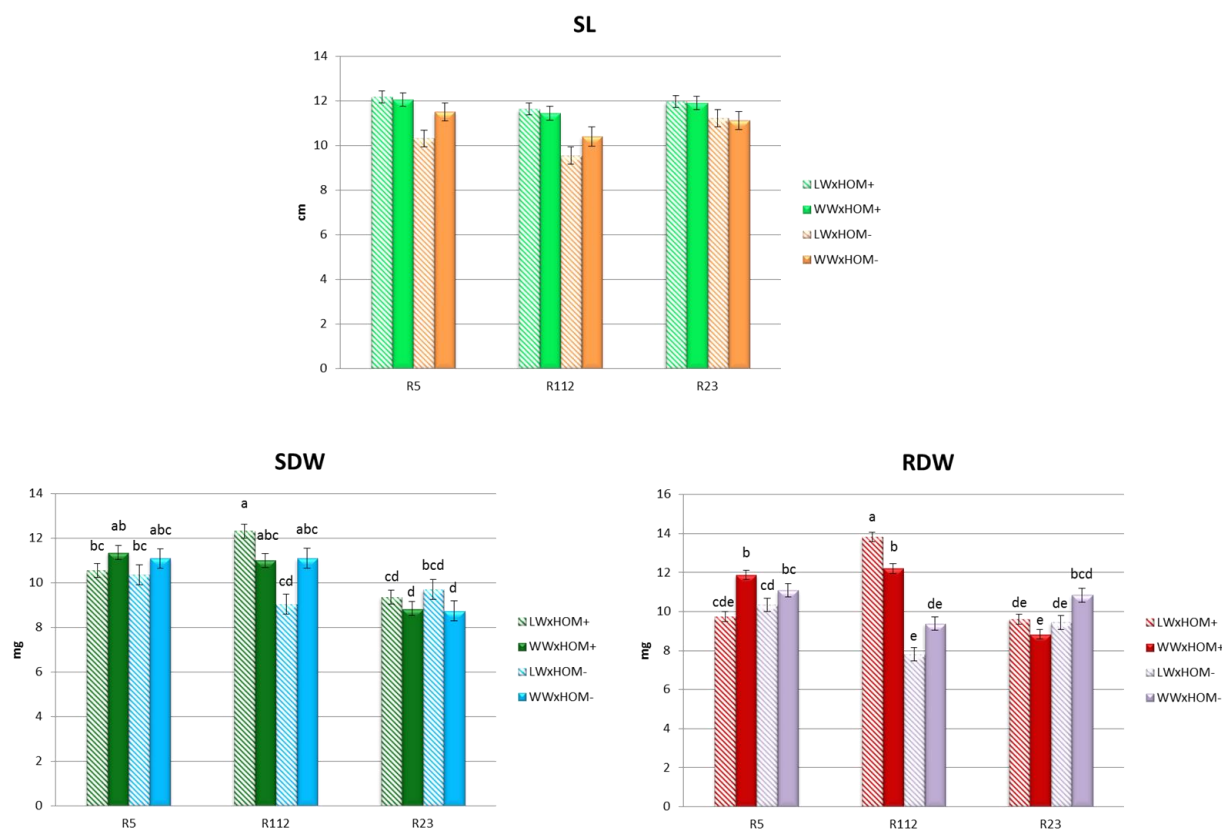
L'altro carattere relativo alla lunghezza della radice, il PRL, ovvero la lunghezza della radice principale, noto essere uno dei fattori che più contribuiscono alla capacità dell'apparato radicale a raggiungere gli strati più profondi del terreno, è risultato significativamente influenzato

dall'interazione tra i segmenti 7AgL e il trattamento [T x 7Ag(G)]. Le NIRLs R112 e R23, portatrici rispettivamente del 28% e del 40% del 7AgL, hanno mostrato un aumento significativo (+27% e +11%, rispettivamente) relativo ai loro controlli, in risposta al trattamento LW. Non è stato riscontrato nessun contributo del segmento 7AgL della linea R5 (Fig. 25).

Anche il numero delle radici seminali (SRN) è risultato significativamente influenzato dall'interazione del 7AgL con il trattamento. Tale significatività è associata alla risposta differenziale al WW e LW del ricombinante R112; in caso di normale disponibilità idrica (WW) non è stata rilevata differenza significativa per il SRN fra R112 HOM+ e il rispettivo HOM-, come del resto per le altre coppie di NIRLs (in accordo con i risultati precedentemente osservati; vedi §4.1.1), diversamente, in risposta alla bassa disponibilità d'acqua (LW), la linea ricombinante mostra un aumento (+27%) del valore di tale fattore, divenendo significativa la differenza fra la coppia di NIRLs (HOM+ vs HOM-, Fig. 25).

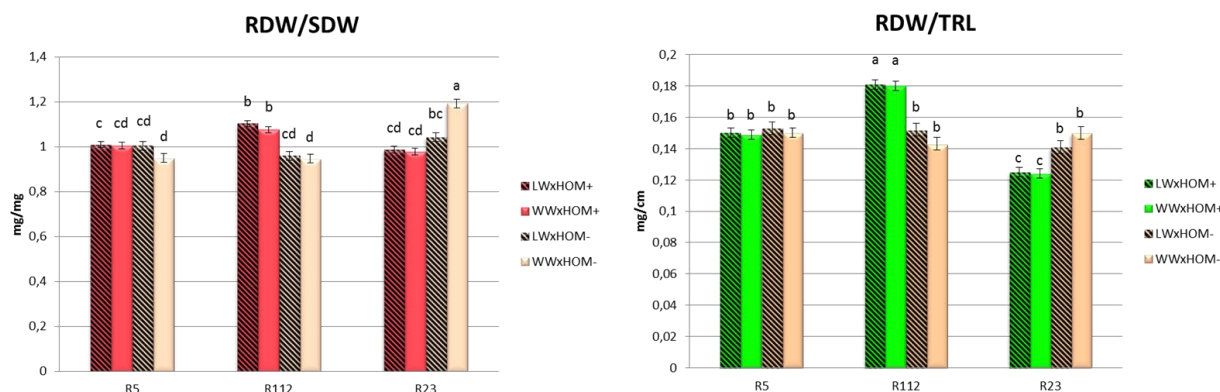
Sia la biomassa del germoglio che quella delle radici sono risultate significativamente influenzate non solo dal segmento 7AgL ma anche dal trattamento LW, che per entrambi gli organi ne determina prevalentemente una riduzione (Tab. 9; Fig. 26). La condizione WW non ha evidenziato, come atteso sulla base dei precedenti esperimenti (vedi §4.1.1), una differenza tra le NIRLs per SDW associabile alla presenza dei segmenti 7AgL; è però risultato significativo l'effetto del *background* (G = genotipo) della coppia R23 (HOM+ e HOM-) anche in relazione al trattamento, associandovi i valori più bassi osservati in ambedue le tesi (≈ 8.7 mg e 9.5 mg, rispettivamente per WW e LW; Fig. 26). Anche per questo carattere, la linea R112 HOM+ ha mostrato la *performance* migliore, attribuibile al segmento 7AgL, con un incremento altamente significativo (+ 27%, $P < 0,000$) verso il controllo non-portatore del segmento (HOM-). Analogamente a SDW, la biomassa della radice (RDW) è risultata positivamente influenzata dalla porzione 7AgL compresa tra il 28% ed il 40% e difatti entrambe le NIRLs con il 7AgL R112 e R23 hanno fatto rilevare un incremento rispetto al trattamento WW del +12% e +8%, rispettivamente (Fig. 26). Dal confronto tra le coppie di NIRLs, l'R112 ha fatto osservare, sempre in risposta a LW, il valore significativamente più alto (+43% vs R112 HOM-; Fig. 26).

Figura 26: Risultati, espressi come media $\pm$ errore standard, rilevati nelle due tesi (trattamenti LW e WW) del micro-metodo *cigar roll* per i caratteri SL (lunghezza del germoglio), SDW (biomassa secca del germoglio) e RDW (biomassa secca della radice); le lettere diverse indicano i rapporti di significatività ottenuti dal Tukey test.



La capacità di ripartizione dei nutrienti, valutata indirettamente dal rapporto della biomassa radicale su quella del germoglio (RDW/SDW), non è risultata particolarmente influenzata dal trattamento in sé, ma dalla presenza dei segmenti 7AgL e dall'interazione di questo con il "T": ciò è risultato particolarmente evidente nella coppia di NIRLs R112, il cui confronto (HOM+ vs. HOM-) ha evidenziato un incremento del 12% associato alla presenza del segmento 7AgL (Fig. 27).

Figura 27: Risultati, espressi come media $\pm$ errore standard, rilevati nelle due tesi (trattamenti LW e WW) del micro-metodo *cigar roll* per i caratteri RDW/SDW (rapporto tra le biomasse di radici e germoglio) e RDW/TRL (diametro radicale medio; le lettere diverse indicano i rapporti di significatività ottenuti dal Tukey test).



Un parametro che è risultato non influenzato dalle due differenti condizioni di crescita è il diametro radicale medio (RDW/TRL) che ha dato risultati in linea con quelli ottenuti con gli altri due micro-metodi condotti in assenza di *stress* idrico; è stato infatti confermato il contributo positivo del 28% del 7AgL, portato dalla linea R112 HOM+ (+18% vs. R112 HOM-, valore medio per i due trattamenti) e l'azione significativamente negativa del 12% di 7AgL esclusiva del ricombinante R23 (-11% vs R23 HOM-).

4.2.2. Linee di traslocazione frumento tenero – *Th. ponticum*

Parallelamente alla prova condotta sulle NIRLs di frumento duro è stata allestita la medesima sperimentazione, attraverso il micro-metodo *cigar roll* (o *paper roll*), con le 3 linee di frumento tenero, T4 (portatrice della cromatina 7el₁L, omologa a quella delle linee ricombinanti frumento duro-*Th. ponticum*), KS24, portatrice di un intero braccio 7el₂L e la linea di controllo cv. Thatcher.

A differenza di quanto emerso dalle prove in condizioni di non-stress (PNR e RHZ, §4.1.2), l'analisi comparativa di 216 plantule (108 piante per ogni tesi, WW vs. LW) svolta al termine dei 7 gg di accrescimento in ambiente controllato, ha indicato che la presenza del 7AgL, di entrambe le accessioni, è associata all'aumento, sebbene spesso non significativo, dei valori dei caratteri analizzati in risposta alle condizioni LW. Che il trattamento LW avesse avuto effetto è stato evidenziato dal comportamento del genotipo di controllo Thatcher, che ha mostrato una riduzione di ogni fattore analizzato in relazione alle condizioni LW (Fig. 28-29).

L'analisi della varianza (Tab. 10) ha rilevato che i 9 caratteri fenotipici analizzati sono significativamente influenzati da una o l'altra delle accessioni del 7AgL (espresso per queste linee come "G") ed inoltre che tale effetto dà un contributo significativo all'interazione con il trattamento (LW) su SRN (numero delle radici seminali), PRL (lunghezza della radice principale), TRL (lunghezza dell'apparato radicale), RDW (biomassa della radice) e RDW/SDW (rapporto tra le biomasse di radici e germoglio, indice di ripartizione dei nutrienti). In generale, però, le differenze tra le linee traslocate e la cv. Thatcher sono meno rilevanti di quanto osservato nei confronti tra le NIRLs di frumento duro.

Tabella 10: Quadrati medi dell'ANOVA-GLM per i caratteri misurati al termine delle due condizioni di crescita LW e WW (SL- lunghezza del germoglio (cm); SDW-biomassa del germoglio (mg); SRN-numero delle radici seminali; PRL-lunghezza della radice principale (cm); ARL-lunghezza media delle radici (cm); TRL- lunghezza totale dell'apparato radicale (cm); RDW-biomassa radicale (mg); RDW/TRL- diametro radicale medio (mg/cm); RDW/SDW-rapporto tra le biomasse di radici e germoglio) con il micro-metodo *cigat roll* delle NILs T4 e KS24 e la cv. Thatcher (G = indica T4, KS24 ed Thatcher). *, **, *** indicano la significatività del fattore a P <0,05, 0,01 e 0,001, rispettivamente.

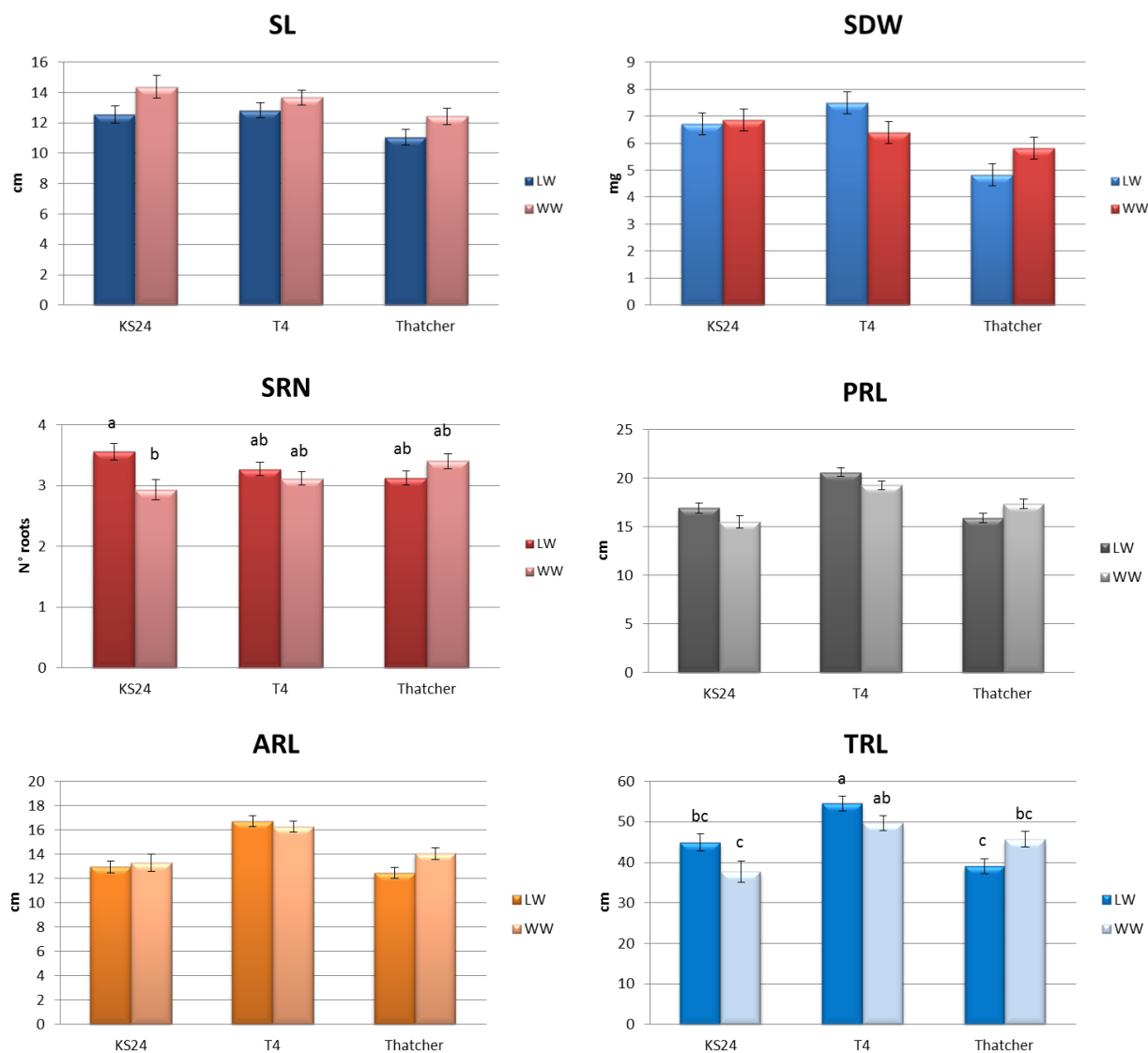
Fattore	G		T		R		T x G		Errore
Df	2		1		5		2		153
SL	46.506	**	68.392	**	14.362		2.961		8.108
SDW	9.699	***	0.005		5.483	**	3.323		0.988
SRN	0.089		0.904		0.909		2.046	**	0.419
PRL	235.623	***	7.636		133.675	***	36.814	**	6.487
TRL	2002.388	***	126.799		1342.781	***	703.395	**	104.402
RDW	6.277	***	0.564		8.234	***	6.307	**	0.468
RDW/TRL	0.001	**	0.000		0.001	***	0.000		0.000
RDW/SDW	0.048	*	0.011		0.056	**	0.030	*	0.009
Df	2		1		5		2		512
ARL	653.072	***	27.719		208.119	***	51.771		21.061

Per il carattere SRN, la presenza sia del 7el₁L che del 7el₂L è associata ad un aumento del 4% e 10%, rispettivamente, rispetto alla cv. Thatcher, non significativo nel confronto basato sul test di Tukey (Tab. 10 e Fig. 28).

Per tutti i parametri che descrivono l'accrescimento in lunghezza dell'apparato radicale (PRL, TRL, ARL) è stato evidenziato un contributo positivo del 7el₁L della linea T4, indipendentemente dalle condizioni LW o WW, particolarmente evidente per TRL (Fig. 28). Per i caratteri PRL e TRL, è risultata significativa (P <0,01) anche l'interazione "T x G" (T x 7AgL

(G)), indicando il contributo positivo di entrambi i 7AgL nell'incrementare, rispetto al controllo, tali fattori (+6% e 13%, per KS24 e +23% e +28%, per T4).

Figura 28: Risultati, espressi come media $\pm$ errore standard, rilevate nelle due tesi LW e WW del micro-metodo *cigar roll* per i caratteri SL (lunghezza del germoglio), SDW (biomassa secca del germoglio), PRL (lunghezza della radice principale), ARL (lunghezza media della radice), TRL (lunghezza totale dell'apparato radicale) e SRN (numero delle radici seminali); le lettere diverse indicano i rapporti di significatività ottenuti dal Tukey test.



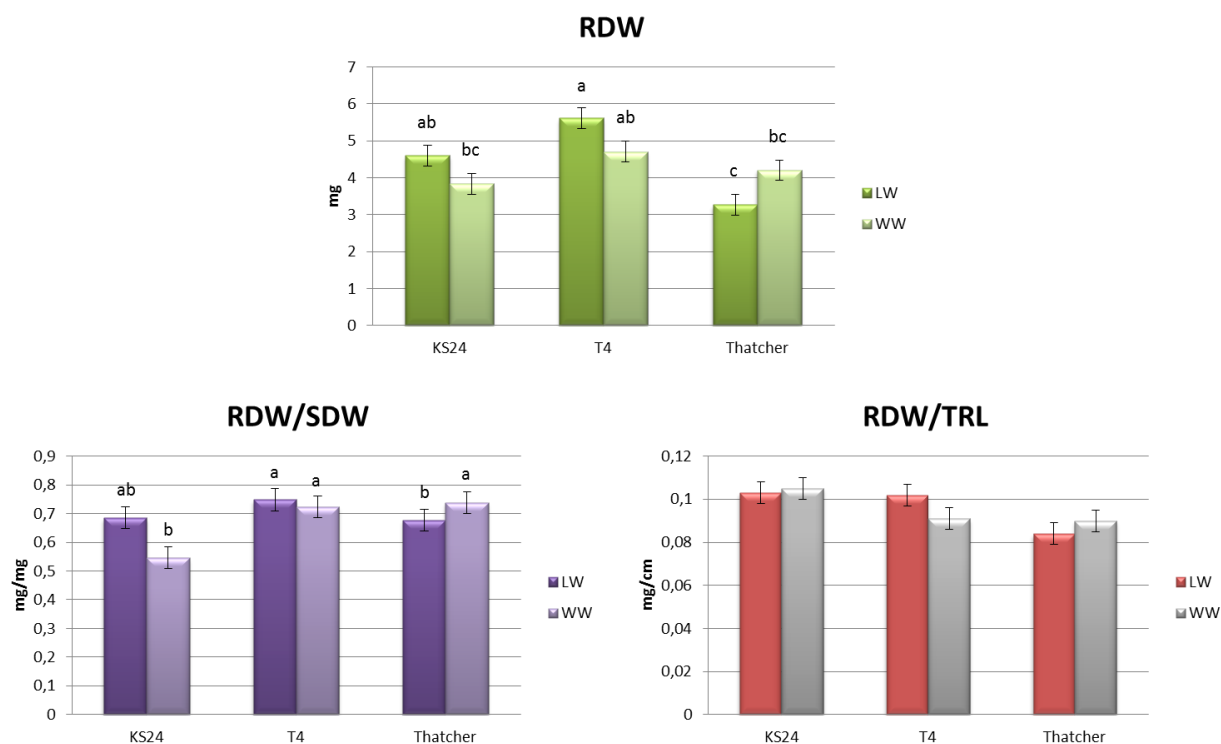
Il parametro RDW è risultato poi significativamente influenzato dalla presenza del 7elL in condizioni di LW: sia nella KS24 (7el₂L) che nella T4 (7el₁L) sono stati osservati aumenti significativi della biomassa radicale in risposta alla bassa disponibilità d'acqua rispetto alla cv. Thatcher (+28% e +42%, rispettivamente, Fig. 29).

Da sottolineare che la T4 per ambedue i trattamenti (LW e WW) manifesta i valori più alti per il carattere RDW, confermando sia i risultati osservati nei precedenti esperimenti sullo stesso materiale (vedi §4.1.2) che i dati osservati nelle linee ricombinanti frumento duro–*Th. ponticum* (vedi §4.2.1).

In relazione alla biomassa radicale anche quella del germoglio è risultata influenzata dal genotipo (G, Tab. 10); infatti, seppur in modo non significativo, i risultati del confronto a coppie hanno evidenziato un aumento (+11%) del fattore associato alla T4 in risposta allo stress idrico che si contrappone alla marcata diminuzione (-17%) dello stesso osservata nel genotipo di controllo Thatcher (Fig. 29).

Come già rilevato in frumento duro, né la lunghezza del germoglio né il diametro radicale risentono dell'effetto del trattamento.

Figura 29: Risultati, espressi come media $\pm$ errore standard, rilevati nelle due tesi (trattamenti LW e WW) del micro-metodo *cigar roll* per i caratteri RDW (biomassa secca della radice), RDW/SDW (rapporto tra le biomasse di radici e germoglio) e RDW/TRL (diametro radicale medio); le lettere diverse indicano i rapporti di significatività ottenuti dal Tukey test.



4.3. Impatto del trasferimento di diversi segmenti 7AgL in frumento duro: analisi di metilazione del DNA nelle coppie di NIRLs (R5, R112, R23) in diversi stadi di sviluppo

Per valutare l'impatto sul metiloma delle linee ricombinanti di frumento duro R5, R112 e R23, eventualmente ascrivibile ai segmenti cromosomici 7AgL di diversa entità in esse trasferiti, si è dapprima impiegato un test puramente quantitativo, ovvero un saggio ELISA, e successivamente una metodologia più fine (nota con l'acronimo MSAP). Quest'ultima consente non solo una misurazione quantitativa, ma anche di rilevare variazioni "sequenza-specifica" del *pattern* di metilazione del DNA. Con entrambe le metodologie, è stato analizzato il DNA estratto dalle NIRLs dei vari ricombinanti 7AL/7AgL (HOM+ e HOM-, portatrici o meno dello specifico segmento) in coincidenza di 4 fasi di sviluppo: quarta foglia (Z1.3), accestimento (Z2.2-Z2.3), I e II divisione pollinica, e quindi utilizzando anche diversi tessuti (foglia ed antere). Per il genotipo R23, che, come descritto nei paragrafi precedenti, presenta maggiore instabilità fenotipica e alterazioni durante la gametogenesi maschile, potenzialmente ascrivibili alla presenza di un gene *Sd* (vedi § 1.4.1.2 e 1.4.1.3), sono state analizzate due linee sorelle HOM+, R23-64 e R23-53, e due HOM-, R23-31 e R23-26.

4.3.1. Variazione globale delle 5-mC fra le NIRLs di frumento duro

Nel confronto tra le diverse fasi di sviluppo, l'andamento dei livelli globali di metilazione del DNA, rilevata con il saggio ELISA, ha mostrato, come atteso, un progressivo aumento con il procedere dello sviluppo. In particolare, nelle due fasi di sviluppo vegetativo, i livelli medi tra le NIRLs di 5-mC osservati nel DNA estratto da foglie sono risultati del 5,82% in coincidenza dello stadio di 4^a foglia (Z1.4) e del 19,95% alla fase di accestimento (Z2.2-Z2.3). In tessuti specializzati come quelli delle antere, campionati in due fasi della micro-gametogenesi (I e II divisione mitotica del polline), il tasso di citosine metilate si è attestato intorno al 46% (Fig. 30 e 31; Tab. 11).

Tabella 11: Valori medi $\pm$ errore standard di metilazione delle citosine globali delle NIRLs HOM+ ed HOM- (R5, R112 ed R23) rilevati nelle 4 fasi di sviluppo analizzate; nell'ultima riga sono riportati i valori medi per fase della percentuale di 5-mC rilevata (Z1.3, Z2.2-Z2.3, I e II divisione pollinica).

NIRL	Z1.3		Z2.2-Z2.3		I div. pollinica		II div. pollinica	
	media	Err. St	media	Err. St	media	Err. St	Media	Err. St
R5 HOM+	7,46	$\pm 1,29$	16,98	$\pm 2,02$	ab 47,51	$\pm 3,52$	61,42	$\pm 0,57$
R5 HOM-	3,78	$\pm 2,01$	25,33	$\pm 6,58$	ab 49,12	$\pm 1,74$	50,78	$\pm 12,96$
R112 HOM+	8,19	$\pm 2,87$	10,76	$\pm 3,80$	a 56,23	$\pm 4,25$	34,86	$\pm 1,30$
R112 HOM-	3,84	$\pm 1,25$	20,41	$\pm 0,94$	a 58,92	$\pm 8,05$	41,89	$\pm 6,67$
R23 HOM+	7,64	$\pm 1,14$	24,71	$\pm 5,45$	ab 46,23	$\pm 2,50$	43,49	$\pm 4,43$
R23 HOM-	4,01	$\pm 0,78$	18,37	$\pm 2,28$	b 32,08	$\pm 3,43$	45,20	$\pm 1,01$
Totale Fase	5,82	$\pm 0,69$	19,95	$\pm 1,92$	46,05	$\pm 2,70$	45,79	$\pm 2,50$

Il confronto complessivo tra le NIRLs nelle diverse fasi di sviluppo analizzate non ha evidenziato differenze significative nei livelli di 5-mC imputabili ai segmenti cromosomici 7AgL (Tab. 12), anche a causa di una considerevole variazione tra i valori delle due repliche (vedi M & M), riscontrata in diverse fasi e genotipi (Tab. 11).

Prendendo in esame le diverse fasi, allo stadio di 4^a foglia la presenza di tutti i segmenti 7AgL è associata ad un aumento delle 5-mC globali, rispetto alle NIRLs HOM- (Tab. 11 e Fig. 30). Al contrario, in fase di accestimento (Z2.2-Z2.3), il DNA delle linee R5 e R112 HOM+ presenta un minor livello di metilazione (16,98% e 10,76%) rispetto a quello delle corrispondenti HOM- (25,33% e 20,41%). Nella stessa fase, si osserva un andamento opposto nel confronto delle NIRLs HOM+ (24,71%) e HOM- (18,37%) della linea R23 (Tab. 11).

Figura 30: Percentuale di 5-mC rilevata tramite il test ELISA nel DNA estratto da foglie delle NIRLs HOM+ ed HOM- nelle fasi vegetative Z1.3 e Z2.2-Z2.3.

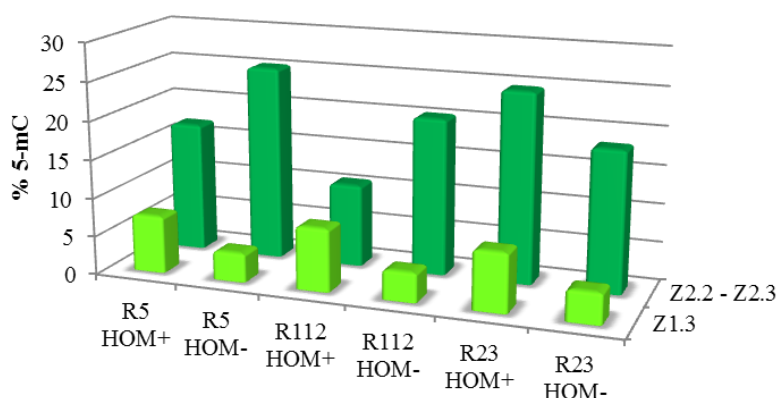
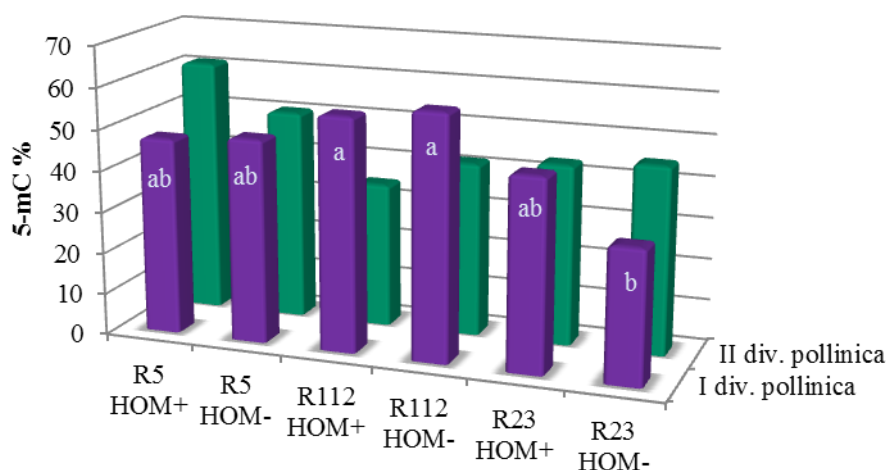


Tabella 13: Quadrati medi dell'ANOVA-GLM per la percentuale di 5-mC globale osservata nelle NIRLs HOM+ e HOM- nelle 4 fasi di sviluppo analizzate (Z1.3, Z2.2-Z2.3, I e II divisione pollinica). *, **, *** indicano la significatività del Fattore per $P < 0,05$, $0,01$ e $0,001$, rispettivamente.

Fattore	NIRL	Replica	Errore
Df	5	1	9
Z1.3	11,822	9,526	4,940
Z2.2	69,069	52,366	54,634
I div poll	268,475	** 83,483	36,628
II div poll	166,034	117,678	62,018

Anche in antere allo stadio di I e II divisione mitotica post-meiosi, la metilazione globale del DNA non è risultata essere, nel complesso, marcatamente influenzata dalla presenza dei segmenti 7AgL, sebbene alcune differenze tra genotipi siano emerse (Tab. 11). In I divisione mitotica, l'ANOVA ha infatti indicato differenze fra le NIRLs (Tab. 12), riscontrabili anche dai valori medi di Tabella 11. Tra le diverse NIRLs, la percentuale di metilazione della R23 HOM+ (46,23%) si discosta in maniera cospicua (prossima alla significatività) da quella della corrispondente HOM- (32,08%). In corrispondenza della II divisione mitotica, sebbene i confronti tra genotipi non abbiano rivelato differenze significative (Tab. 11 e 12), la NIRL HOM+ del ricombinante R5, quello con minor quantità di cromatina 7AgL (vedi M & M), ha mostrato una metilazione globale molto più estesa rispetto a quella della R112 HOM+ (+ 74%) e della R23 HOM+ (+ 41%) (Fig. 31).

Figura 31: Percentuale di 5-mC rilevata tramite il test ELISA nel DNA di antere delle NIRLs HOM+ ed HOM- nelle fasi di I e II divisione pollinica.



4.3.2. Analisi del pattern di metilazione delle NIRLs di frumento duro con l'approccio MSAP

L'analisi del *pattern* di metilazione del DNA delle linee ricombinanti di frumento duro-*Th. ponticum* e delle relative linee di controllo estratto da foglia e da antere nelle 4 fasi di sviluppo prese in considerazione (Z1.3, Z2.2-Z2.3, I e II divisione pollinica) è stata condotta anche mediante la metodologia MSAP (Metilato Sensitive Amplification Polymorphism), che consente di identificare non solo delle variazioni a livello quantitativo del *pattern* di metilazione del DNA ma anche i polimorfismi di metilazione “sequenza specifica”.

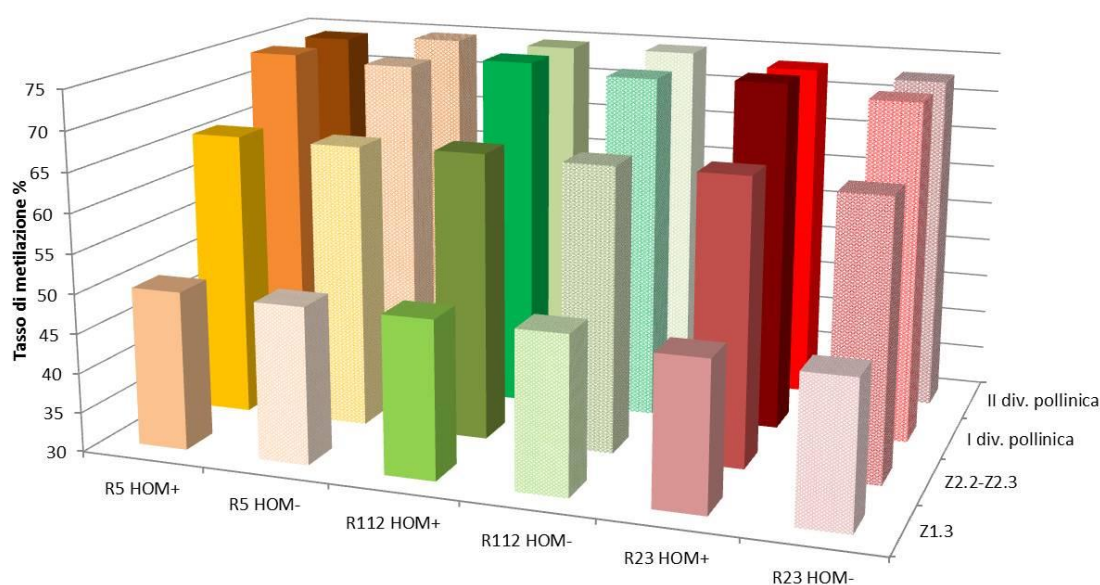
Come descritto in precedenza (vedi §3.2.4.2), questa metodica consente di rilevare le variazioni di metilazione dei siti “CG” grazie all'attività di due endonucleasi di restrizione, che, pur riconoscendo lo stesso sito di taglio 5'-CCGG-3', mostrano diversa sensibilità alle 5-mC. L'enzima MspI è in grado di riconoscere i siti non metilati e *full*-metilati, diversamente da HpaII che digerisce le sequenze non metilate e quelle emi-metilate. A questi casi è da aggiungersi l'assenza di digestione del sito sia da parte di MspI che di HpaII, evento che si ha quando le citosine esterne del tetranucleotide sono metilate su entrambi i filamenti di DNA (sequenza *full*-metilata non amplificata). Dal confronto dei profili di amplificazione ottenuti dalla precedente digestione alternativa con uno e l'altro dei 2 isoschizomeri e dal confronto di questi con quelli ottenuti nelle altre fasi, è stato possibile classificare i siti “CCGG” in 4 classi:

- Non-metilato → sito non metilato, riconosciuto da entrambi gli isoschizomeri;
- *Full*-metilato → sito *full*-metilato, presente solo nel pattern di digestione/amplificazione di MspI;
- Emi-metilato → sito emi-metilato, rilevato solo nel profilo di digestione/amplificazione di HpaII;
- Sito non-amplificato → sequenza *full*-metilata, identificata dal confronto con i profili ottenuti in altre fasi di sviluppo.

Le 8 coppie di *primers* selettivi hanno consentito l'amplificazione di 574 siti, nell'insieme descrittivi del profilo di metilazione delle NIRLs di frumento duro, del DNA da foglia o antera nelle 2 fasi vegetative e in corrispondenza delle 2 divisioni mitotiche della micro-gametogenesi. In accordo con l'andamento mostrato dal test ELISA (vedi §4.3.1), è stato osservato un progressivo incremento dei livelli totali di metilazione, proporzionale all'avanzamento dello sviluppo. I valori sono invece risultati assai diversi e tutti superiori: le fasi vegetative di 4^a foglia (Z1.3) e accestimento (Z2.2-Z2.3) hanno mostrato una metilazione media del 49% e 65,7%,

rispettivamente, mentre le due fasi di I e II divisione pollinica hanno evidenziato un livello simile di metilazione, prossimo al 74% (Fig. 32).

Figura 32: Percentuale di 5-mC rilevata tramite il test ELISA nelle NIRLs HOM+ ed HOM- nelle 4 fasi di sviluppo analizzate (Z1.3, Z2.2-Z2.3, I e II divisione pollinica).



Dal confronto dei *pattern* di metilazione ottenuti nelle diverse fasi emerge che il 38% dei siti rilevati sono specifici del tessuto fogliare delle 2 fasi vegetative, mentre il 20% erano rilevati solo nel DNA estratto da antere durante la micro-gametogenesi e 49 erano comuni a tutte le fasi e tessuti (vedi Tab. 13).

Tabella 13: *Pattern* di metilazione specifici per il DNA estratto da foglia nelle fasi vegetative (Z1.3 e Z2.2-Z2.3) e quello estratto da antere nel corso della micro-gametogenesi (I e II div. pollinica) e comuni alle fasi e tessuti analizzate.

		Pattern specifici						Pattern comuni	
Combinazione primers	Siti amplificati	Fase vegetativa			Micro-gametogenesi				
		Fase Z1.3	Fase Z2.2-Z2.3	Fasi Z1.3 + Z2.2-Z2.3	I div. pollinica	II div. pollinica	I + II div. pollinica	Tutte le fasi	Alcune fasi
E-AAG + H/M-TCGA	75	20	4	8	4	6	3	13	17
E-ACT + H/M-TCGA	101	37	7	8	3	9	0	10	27
E-ACG + H/M-TCCA	57	8	14	4	2	4	2	2	21
E-ACC + H/M-TGC	65	17	6	2	7	6	2	2	23
E-ACC + H/M-TTC	87	20	5	2	3	9	9	9	30
E-ACA + H/M-TCA	62	12	12	2	5	12	0	2	17
E-ACA + H/M-TCGA	60	5	3	4	4	5	3	5	31
E-ACA + H/M-TTC	67	11	6	3	4	6	7	6	24
Totale	574	130	57	33	32	57	26	49	190
Percentuale (%)		22,6	9,9	5,7	5,6	9,9	4,5	8,5	33

In fase Z1.3, sono stati amplificati ed analizzati 373 siti “CCGG”, di cui 130 risultano specifici di questa fase e tessuto (Tab. 13). In questo stadio le linee di frumento duro hanno mostrato un livello simile di metilazione (media 49%, Tab. 14; Fig. 33). A fronte di valori di circa il 50% delle NIRLs R5 e R112 (HOM+ e HOM-), è stata osservata una lieve diminuzione dei siti metilati nelle NIRLs della R23, anche in questo caso sia nella HOM+ (48,6%) che nella HOM- (48,3%; Fig. 33). Tale decremento è attribuibile ad una de-metilazione dei siti *full*-metilati, il cui valore medio per le 4 NIRLs R23 è di 64, rispetto ai 73 osservati mediamente nelle NIRLs R5 e R112 (Tab. 14).

Figura 33: Percentuale dei siti “CCGG” metilati delle linee HOM+ ed HOM-, R5, R112 ed R23 (R23-64, R23-53, R23-31 ed R23-26), in fase di 4^a foglia (Z1.3).

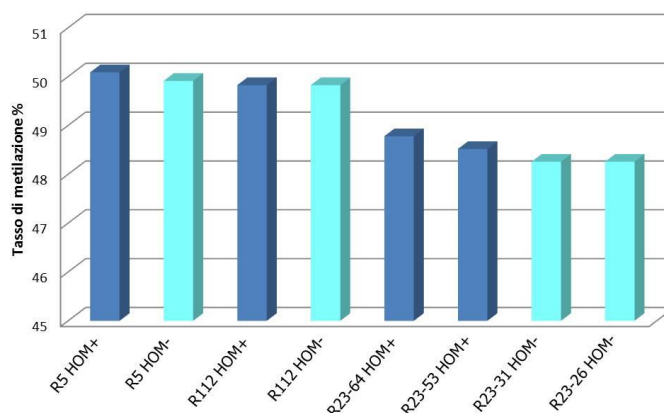


Tabella 14: Analisi e classificazione dei profili di metilazione delle linee HOM+ ed HOM-, R5, R112 ed R23 (R23-64, R23-53, R23-31 ed R23-26) in fase Z1.3 ottenuti con le 8 coppie di *primers*-selettivi. Non-metil = sito “CCGG” non metilato; Full = sito *full*-metilato; Emi- = sito emi-metilato; Siti non-amplificati = sito full-metilato identificato dal confronto con le altre fasi analizzate; Siti amplificati = siti amplificati nella fase.

Combinazione primers	Siti amplificati	Siti Non amplificati	R5 HOM+			R5 HOM-			R112 HOM+			R112 HOM-			R23-64 HOM+			R23-53 HOM+			R23-31 HOM-			R23-26 HOM-		
			Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil
			Full	Emi		Full	Emi		Full	Emi		Full	Emi		Full	Emi		Full	Emi		Full	Emi		Full	Emi	
E-AAG + H/M-TCGA	55	20	7	8	40	7	8	40	8	8	39	7	8	40	7	8	40	7	8	40	5	8	42	5	8	42
E-ACT + H/M-TCGA	86	15	17	2	67	15	2	69	17	2	67	15	2	69	16	2	68	15	2	69	14	2	70	14	2	70
E-ACG + H/M-TCCA	25	32	2	2	21	5	2	18	2	2	21	5	2	18	2	2	21	2	2	21	2	2	21	2	2	21
E-ACC + H/M-TGC	42	23	13	5	24	12	5	25	12	5	25	12	5	25	12	5	25	12	5	25	13	5	24	13	5	24
E-ACC + H/M-TTC	55	32	16	2	37	15	2	38	14	2	39	14	2	39	12	2	41	12	2	41	11	2	42	11	2	42
E-ACA + H/M-TCA	33	29	9	2	22	9	2	22	10	1	22	10	1	22	7	5	21	7	4	22	9	2	22	9	2	22
E-ACA + H/M-TCGA	38	22	6	0	32	6	0	32	6	0	32	6	0	32	5	0	33	5	0	33	5	0	33	5	0	33
E-ACA + H/M-TTC	39	28	4	4	31	4	4	31	4	4	31	4	4	31	4	4	31	4	4	31	5	3	31	5	3	31
Totale	373	201	74	25	274	73	25	275	73	24	276	73	24	276	65	28	280	64	27	282	64	24	285	64	24	285
Tot. Siti Metilati			300			299			298			298			294			292			289			289		
Tasso di metilazione (%)			47,9		2,2	47,7		2,2	47,7		2,1	47,7		2,1	46,3		2,4	46,2		2,4	46,2		2,1	46,2		2,1
			50,1			49,9			49,8			49,8			48,8			48,5			48,3			48,3		

Dal confronto dei profili di digestione/amplificazione ottenuti da foglia in fase Z1.3 (quest’analisi è stata applicata anche per le altre 3 fasi) dalle NIRLs HOM+ dei ricombinanti R5, R112 ed R23 (R23-64 e R23-53) e le relative linee HOM-, sono state osservate le seguenti, principali tipologie di *pattern* di metilazione “sequenza-specifica” (Tabella 15):

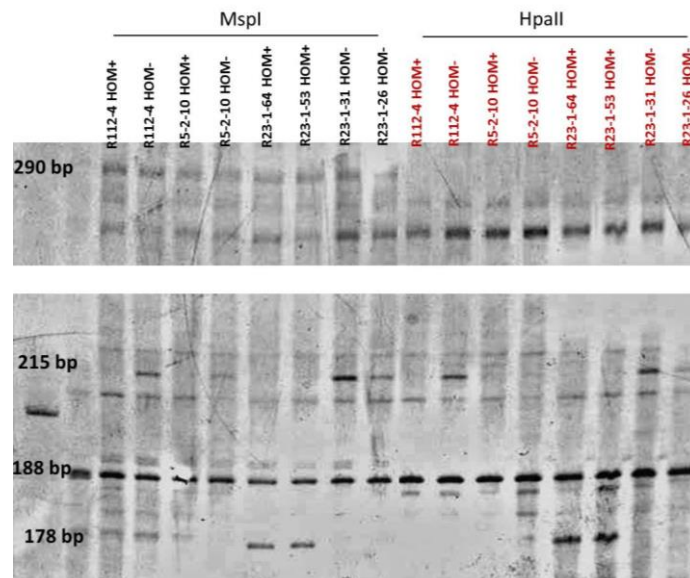
- siti monomorfici, comuni a tutte le linee ricombinanti (HOM+) ed ai loro controlli HOM- (Tipo “A”, suddivisi in A1 (*full*-metilati), A2 (emi-metilati) e A3 (siti *full*-metilati ma non amplificati nella specifica fase); Tab. 15 e Fig. 34);
- siti polimorfici, comprensivi di variazioni di iper- o de-metilazione associate con la presenza dei segmenti del *Th. ponticum*, R5, R112 ed R23 (Tipo B; Tab. 15 e Fig. 34);

- polimorfismi erratici, non classificati (Tipo C).

All'interno del “Tipo B” è stata effettuata un'ulteriore classificazione:

- variazioni di iper- o de-metilazione comuni a tutti i genotipi HOM+ (in NERO, Tab. 15);
- variazioni di iper- o de-metilazione specifiche di una linea HOM+ nei confronti del suo HOM- e degli altri genotipi (HOM+ e HOM-) (GIALLO per R5, VERDE per R112, ROSSO per R23; Tab. 15);
- variazioni di iper- o de-metilazione comuni ad HOM+ e HOM- di un genotipo ma diverse per gli altri (HOM+ ed HOM-) (GIALLO per R5, VERDE per R112, ROSSO per R23; Tab. 15; Fig. 34).

Figura 34: Esempi di siti CCGG del Tipo A (comuni a tutti i genotipi), banda a 290bp e 188bp, della Tipo B, comune a tutti gli HOM+, 215bp, e Tipo B variazione di metilazione specifiche di una linea ricombinante vs. tutte le altre NIRLs, 178 bp.



In fase Z1.3, sul totale di 305 siti metilati, compresi quelli (A3) *full*-metilati ma non amplificati nella specifica fase (vedi sopra), l'85,6% ha mostrato il medesimo *pattern* di metilazione in tutte le NIRLs (Classe A). Nel rimanente 14,4% dei casi, la presenza dei segmenti 7AgL è stata invece associata ad eventi di iper- o de-metilazione con una prevalenza di quelli di de-metilazione (8,2%), riconducibile per oltre il 50% a polimorfismi relativi al genotipo R23, conservati, nella maggioranza dei casi, anche nelle linee di controllo R23 HOM- (Tabella 15). È stato anche osservato (BH2; BH6; BD3 e BD4 in Tabella 15) che nei diversi genotipi ricombinanti (7AgL HOM+), lo stesso sito “CCGG” può presentare polimorfismi opposti (iper-metilazione piuttosto che de-metilazione), o anche variazioni di intensità dello stesso evento di metilazione, espresso come estensione della metilazione o de-metilazione delle citosine del sito.

Come visibile nella Tabella 15, i polimorfismi di sequenza associati alla presenza del 23% (R5) e 28% (R112) di 7AgL sono numericamente inferiori (5 e 8, rispettivamente) rispetto ai 19 eventi associati a 40% (R23) di 7AgL.

Tabella 15: Analisi e classificazione delle variazioni sequenza-specifica dei *pattern* di metilazione delle linee HOM+ ed HOM+, R5, R112 ed R23 (R23-64, R23-53, R23-31 ed R23-26) in fase Z1.3 ottenuti con le 8 coppie di *primers*-selettivi. Tipo A1, A2 e A3 = variazione del pattern di metilazione comune a tutte le linee, rispettivamente casi di *full*-, *emi*- e non-metilazione; Tipo B = variazioni di iper- (BH) o de-metilazione (BD) associate con la presenza dei segmenti del *Th. ponticum* (di tutti i segmenti = NERO; R5 = GIALLO; R112 = VERDE; R23 = ROSSO); Tipo C = variazioni erratiche, non classificate. M = MspI; H = HpaII.

Pattern di metilazione	R5 HOM+		R5 HOM-		R112 HOM+		R112 HOM-		R23-64 HOM+		R23-53 HOM+		R23-31 HOM-		R23-26 HOM-		N° di siti	Totale (%)
	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H		
A																		261 (85,6)
A1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	42	
A2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	18	
A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	201	
B																		44 (14,4)
Iper-metilato																		17 (5,6)
BH1	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	2	
BH2	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	1	
BH3	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	1	
BH4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	
BH5	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	
BH6	-	-	+	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	1	
BH7	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	
BH8	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	2	
BH9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	2	
BH10	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2	
BH11	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	1	
BH12	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	1	
De-metilato																		25 (8,2)
BD1	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	3	
BD2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	
BD3	/	/	/	/	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	1	
BD4	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	1	
BD5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
BD6	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	1	
BD7	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
BD8	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
BD9	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	/	/	/	/	-	-	1	
BD10	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	1	
BD11	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	1	
BD12	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	2	
BD13	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	1	
BD14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	1	
BD15	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	1	
BD16	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	1	
BD17	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	3	
BD18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	1	
BD19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	1	
BD20	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	1	
C																		2 (0,7)
C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	1	
C2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	1	

Il tasso di metilazione in fase di accestimento (Z2.3-Z2.3) aumenta rispetto alla fase vegetativa precedente di circa il 25%, attestandosi intorno al valore medio di 65,7%. Dal confronto con le altre fasi e tessuti, 57 siti “CCGG” sono risultati amplificati unicamente in tale fase e tessuto (Tab. 13). Nel complesso, la presenza dei segmenti 7AgL (linee HOM+) non sembra modificare il livello di metilazione rispetto a quello delle linee di controllo (HOM-); anche in questa fase, le NIRLs R23 presentano valori lievemente più bassi (media HOM+/HOM- 65,4%) delle altre linee (66,2%) (Fig. 35; Tab. 16).

Figura 35: Percentuale dei siti “CCGG” metilati delle linee HOM+ ed HOM-, R5, R112 ed R23 (R23-64, R23-53, R23-31 ed R23-26), in fase Z2.2-Z2.3 (accestimento).

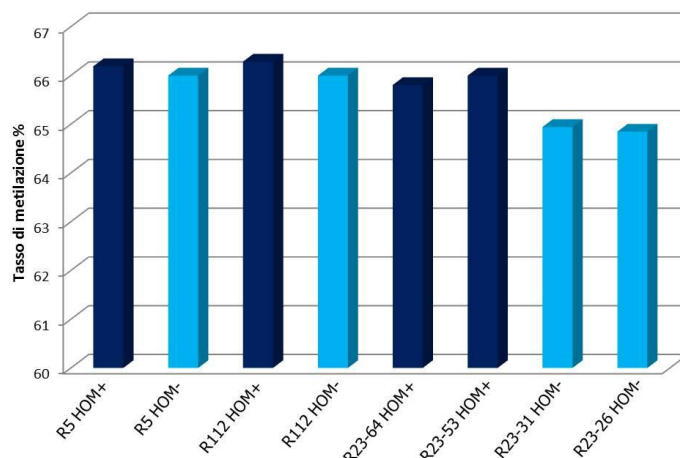


Tabella 16: Analisi e classificazione dei profili di metilazione delle linee HOM+ ed HOM-, R5, R112 ed R23 (R23-64, R23-53, R23-31 ed R23-26) in fase Z2.2-Z2.3 ottenuti con le 8 coppie di *primers*-selettivi. Non-metil = sito “CCGG” non metilato; Full- = sito *full*-metilato; Emi- = sito *emi*-metilato; Siti non-amplificati = sito *full*-metilato identificato dal confronto con le altre fasi analizzate; Siti amplificati = siti amplificati nella fase.

Combinazione primers	Siti ampli-ficati	Siti Non ampli-	R5 HOM+			R5 HOM-			R112 HOM+			R112 HOM-			R23-64 HOM+			R23-53 HOM+			R23-31 HOM-			R23-26 HOM-		
			Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil
			Full	Emi		Full	Emi		Full	Emi		Full	Emi		Full	Emi		Full	Emi		Full	Emi		Full	Emi	
E-AAG + H/M-TCGA	36	39	7	4	25	7	4	25	8	4	24	7	4	25	9	2	25	9	2	25	6	2	28	7	2	27
E-ACT + H/M-TCGA	34	26	6	4	24	7	4	23	6	4	24	7	4	23	6	4	24	5	4	25	5	4	25	5	3	26
E-ACG + H/M-TCCA	38	22	5	7	26	4	8	26	4	8	26	4	8	26	4	9	25	4	9	25	4	8	26	4	8	26
E-ACC + H/M-TGC	18	42	5	3	10	5	3	10	5	3	10	5	3	10	5	3	10	5	3	10	5	3	10	5	3	10
E-ACC + H/M-TTC	33	54	7	8	18	7	8	18	7	8	18	7	8	18	4	10	19	6	10	17	7	8	18	7	8	18
E-ACA + H/M-TCA	29	31	9	4	16	8	4	17	8	4	17	8	4	17	9	4	16	8	6	15	8	4	17	7	5	17
E-ACA + H/M-TCGA	35	25	10	2	23	10	2	23	11	2	22	10	2	23	9	2	24	9	2	24	10	2	23	9	2	24
E-ACA + H/M-TTC	27	33	5	7	15	4	8	15	5	7	15	4	8	15	5	7	15	5	7	15	2	9	16	3	8	16
Totale	250	272	54	39	157	52	41	157	54	40	156	52	41	157	51	41	158	51	43	156	47	40	163	47	39	164
Tot. Siti Metilati			365			365			366			365			364			366			359			358		
Tasso di metilazione (%)			62,5		3,7	62,1		3,9	62,5		3,8	62,1		3,9	61,9		3,9	61,9		4,1	61,1		3,8	61,1		3,7
			66,2			66,0			66,3			66,0			65,8			66,0			64,9			64,8		

L'analisi dei polimorfismi "sequenza-specifica" dei 448 siti "CCGG" metilati ha evidenziato (Tab. 17), nell'88,9% degli eventi, un comune livello di metilazione (siti monomorfici, Classe A). I polimorfismi "sequenza-specifica" hanno confermato l'osservazione quantitativa, ovvero che la presenza dei segmenti 7AgL era associata alla iper-metilazione del sito; difatti, dei polimorfismi di metilazione di "Classe B" (37 eventi), il 67,6% era costituito da eventi di iper-metilazione. Come nella fase vegetativa precedente, la R23 ha mostrato il maggior numero di polimorfismi di metilazione "sequenza-specifica", sia comuni con le altre NIRLs HOM+ (BH2 – BH6; BD1; BD2), sia esclusivi di tale NIRL (BH11 – BH18; BD4 – BD8) per un totale di 31 siti "CCGG" amplificati (Tab. 17). Tra i polimorfismi osservati per i due ricombinanti R23 HOM+, 9 erano comuni anche con le NIRL R23 HOM- (BH12; BH14; BD8).

Tabella 17: Analisi e classificazione delle variazioni sequenza-specifica dei *pattern* di metilazione delle linee HOM+ ed HOM-, R5, R112 ed R23 (R23-64, R23-53, R23-31 ed R23-26) in fase Z2.2-Z2.3 ottenuti con le 8 coppie di *primers*-selettivi. Tipo A1, A2 e A3 = variazione del pattern di metilazione comune a tutte le linee, rispettivamente casi di *full*-, *emi*- e non-metilazione; Tipo B = variazioni di iper- (BH) o de-metilazione (BD) associate con la presenza dei segmenti del *Th. ponticum* (di tutti i segmenti = NERO; R5 = GIALLO; R112 = VERDE R23 = ROSSO); Tipo C = variazioni erratiche, non classificate.

Pattern di metilazione	R5 HOM+		R5 HOM-		R112 HOM+		R112 HOM-		R23-64 HOM+		R23-53 HOM+		R23-31 HOM-		R23-26 HOM-		N° di siti	Totale (%)
	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H		
A																		336 (88,9)
A1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	30	
A2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	34	
A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	272	
B																		37 (9,8)
Iper-metilato																		25 (6,6)
BH1	+	-	+	+	+	-	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/	1	
BH2	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	1	
BH3	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	1	
BH4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	1	
BH5	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	1	
BH6	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
BH7	-	-	+	-	+	-	+	-	/	/	/	/	/	/	/	/	1	
BH8	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	/	+	+	1	
BH9	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	1	
BH10	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	
BH11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	3	
BH12	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
BH13	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	2	
BH14	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	3	
BH15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	1	
BH16	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	2	
BH17	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	2	
BH18	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	1	
De-metilato																		12 (3,2)
BD1	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	1	
BD2	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	1	
BD3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
BD4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	1	
BD5	/	/	/	/	/	/	/	/	+	+	+	+	+	-	+	-	1	
BD6	/	/	/	/	/	/	/	/	-	+	-	+	+	-	+	-	1	
BD7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	1	
BD8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	5	
C																		5 (1,3)
C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	1	
C2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	1	
C3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	1	
C4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	1	
C5	/	/	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	1	

L'analisi MSAP del DNA da antere in I divisione pollinica ha consentito di amplificare ed analizzare 205 siti "CCGG" (Tab.18), dei quali 4 sono specifici di questo tessuto e fase della micro-gametogenesi (Tab.13). Il tasso medio di metilazione è risultato del 73,8%, con una tendenza, anche in questa fase, ad una maggiore metilazione delle linee ricombinanti (75%) verso le linee di controllo (73%, Fig. 36). Sebbene non siano state osservate delle sostanziali variazioni quantitative tra le linee *carrier* o non-*carrier* dei segmenti 7AgL, come nelle due fasi vegetative, ancora una volta le linee R23, in particolare quelle di controllo (NIRL senza segmento o HOM-), presentano livelli di metilazioni più bassi (74,15% per le HOM+ e 72,8% per le HOM-) (Fig. 36; Tab. 18).

Figura 36: Percentuale dei siti "CCGG" metilati delle linee HOM+ ed HOM-, R5, R112 ed R23 (R23-64, R23-53, R23-31 e R23-26), in I divisione pollinica.

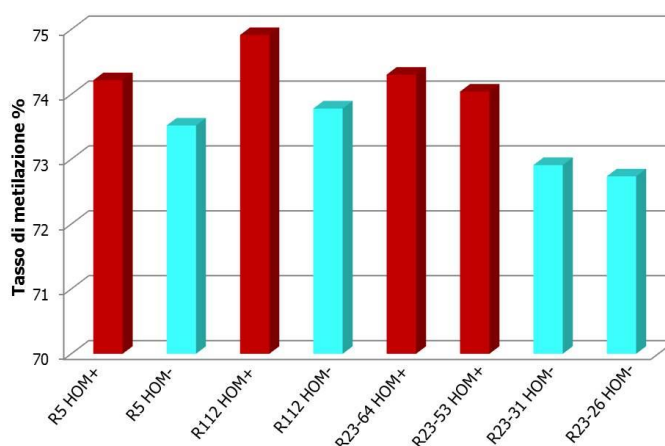


Tabella 18: Analisi e classificazione dei profili di metilazione delle linee HOM+ ed HOM-, R5, R112 ed R23 (R23-64, R23-53, R23-31 ed R23-26) in I divisione pollinica ottenuti con le 8 coppie di *primers*-selettivi. Non-metil = sito "CCGG" non metilato; Full- = sito full-metilato; Emi- = sito emi-metilato; Siti non-amplificati = sito full-metilato identificato dal confronto con le altre fasi analizzate; Siti amplificati = siti amplificati nella fase.

Combinazione primers	Siti amplificati	Siti Non amplificati	R5 HOM+			R5 HOM-			R112 HOM+			R112 HOM-			R23-64 HOM+			R23-53 HOM+			R23-31 HOM-			R23-26 HOM-		
			Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil
			Full	Emi		Full	Emi		Full	Emi		Full	Emi		Full	Emi		Full	Emi		Full	Emi		Full	Emi	
E-AAG + H/M-TCGA	30	45	12	0	18	9	0	21	12	0	18	9	0	21	9	0	21	9	0	21	7	0	23	7	0	23
E-ACT + H/M-TCGA	25	76	6	1	18	7	1	17	6	2	17	7	1	17	5	3	17	5	3	17	4	3	18	4	3	18
E-ACG + H/M-TCCA	14	43	2	0	12	4	0	10	2	1	11	4	0	10	4	1	9	4	0	10	5	0	9	4	0	10
E-ACC + H/M-TGC	26	39	6	4	16	3	4	19	7	4	15	4	5	17	7	5	14	7	4	15	5	4	17	5	4	17
E-ACC + H/M-TTC	32	55	12	0	20	10	0	22	12	0	20	11	0	21	11	0	21	11	0	21	9	0	23	10	0	22
E-ACA + H/M-TCA	20	42	6	1	13	5	2	13	7	2	11	4	2	14	6	1	13	5	2	13	5	1	14	4	1	15
E-ACA + H/M-TCGA	31	29	4	1	26	6	0	25	5	0	26	6	0	25	5	0	26	5	0	26	5	0	26	5	0	26
E-ACA + H/M-TTC	27	40	5	1	21	5	1	21	5	1	21	5	1	21	5	1	21	5	1	21	5	1	21	5	1	21
Totale	205	369	53	8	144	49	8	148	56	10	139	50	9	146	52	11	142	51	10	144	45	9	151	44	9	152
Tot. Siti Metilati			430			426			435			428			432			430			423			422		
Tasso di metilazione (%)			73,5		0,7	72,8		0,7	74,0		0,9	73,0		0,8	73,3		1,0	73,2		0,9	72,1		0,8	72,0		0,8
			74,2			73,5			74,9			73,8			74,3			74,0			72,9			72,7		

Come riportato nella Tabella 19, le linee presentano nell'87,5% dei casi variazioni comuni del profilo di metilazione, con un notevole incremento dei siti *full*-metilati (369 eventi), rispetto alle altre fasi/tessuti analizzate (Tab. 19, A3). Le variazioni del pattern di metilazione associate alla presenza dei segmenti 7AgL (Tipo B) rappresentano il 12,2% degli eventi identificati; i polimorfismi di metilazione, anche se di diverso tipo (iper- o de-metilazione), hanno interessato per il 46% gli stessi siti "CCGG" nelle diverse linee ricombinanti HOM+ (Tab. 19, NERO). A questo riguardo, R5 e R112 hanno mostrato modificazioni largamente coincidenti (BH1 – BH11; BD1 – BD7), mentre diverse sono state quelle evidenziate nel genotipo R23 (BH6 - BH13 e BD-BH9; Tab. 21). Come già osservato per le 2 fasi vegetative (Z1.3 e Z2.2-Z2.3), i polimorfismi di sequenza attribuibili esclusivamente al 40% del 7AgL sono risultati quelli prevalenti (22 eventi, vs. 7 R5-specifici e nessuno R112-specifico) e spesso conservati anche nelle 2 linee R23 HOM- (vedi eventi BH22 – BH24 e BD17, BD18 Tab. 19).

Tabella 19: Variazioni sequenza-specifica dei *pattern* di metilazione in I divisione pollinica delle HOM+ ed HOM+, R5, R112 ed R23 (R23-64, R23-53, R23-31 ed R23-26). Tipo A1, A2 e A3 = variazione comune alle NIRLs, *full*-, emi- e non-metilazione; Tipo B = variazioni di iper- (BH) o de-metil. (BD) associate ai segmenti 7AgL (tutti i segmenti = NERO; R5 = GIALLO; R112 = VERDE; R23 = ROSSO); Tipo C = variazioni erratiche, non classificate.

Pattern di metilazione	R5 HOM+		R5 HOM-		R112 HOM+		R112 HOM-		R23-64 HOM+		R23-53 HOM+		R23-31 HOM-		R23-26 HOM-		N° di siti	Totale (%)
	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H		
A																		399 (87,5)
A1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	23	
A2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	7	
A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	369	
B																		56 (12,2)
Iper-metilato																		32 (7)
BH1	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	1	
BH2	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	1	
BH3	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	1	
BH4	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	1	
BH5	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	1	
BH6	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	
BH7	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4	
BH8	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	1	
BH9	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
BH10	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	
BH11	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	1	
BH12	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	1	
BH13	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	1	
BH14	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	
BH15	/	/	/	/	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	
BH16	/	/	/	/	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	1	
BH17	/	/	/	/	/	/	/	/	+	-	+	-	-	+	-	+	1	
BH18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	1	
BH19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	1	
BH20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	1	
BH21	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	2	
BH22	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	3	
BH23	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
BH24	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	
De-metilato																		24 (5,2)
BD1	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	1	
BD2	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	1	
BD3	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	1	
BD4	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	1	
BD5	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	1	
BD6	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
BD7	+	+	-	-	+	+	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	1	
BD8	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	1	
BD9	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	1	
BD10	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
BD11	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	1	
BD12	+	+	-	+	/	/	/	/	+	+	+	+	+	+	+	+	1	
BD13	+	+	-	-	+	+	+	+	/	/	/	/	+	+	+	+	1	
BD14	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
BD15	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	1	
BD16	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	1	
BD17	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	6	
BD18	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	1	
BD19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	1	
C																		1 (0,2)
C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	1	

Il DNA estratto da antere allo stadio di II divisione mitotica del polline il livello medio di metilazione, diminuisce leggermente rispetto alla fase precedente, attestandosi al 73,7%, in accordo con i risultati quantitativi ottenuti con il saggio immunologico vs. le 5-mC globali (vedi §4.3.1). In questa fase la tendenza osservata è apparsa però diversa rispetto a quanto osservato nello stesso tessuto ma allo stadio di I divisione mitotica, ovvero la presenza dei segmenti 7AgL sembra portare ad una lieve de-metilazione dei siti “CCGG”, più marcata, ancora una volta, nel gruppo delle R23. In particolare, le R23 HOM+ hanno mostrato un tasso di metilazione del 73,3% rispetto al 72,6% osservato nelle HOM- (Tab. 20 e Fig. 37). Il livello medio di metilazione delle coppie (HOM+ e HOM-) di NIRLs R5 e R112 è risultato intorno la 74,5%, apprezzabilmente maggiore rispetto al 72,9% osservato per le 4 famiglie R23.

Figura 37: Percentuale dei siti “CCGG” metilati delle linee HOM+ ed HOM-, R5, R112 ed R23 (R23-64, R23-53, R23-31 ed R23-26), in II divisione pollinica.

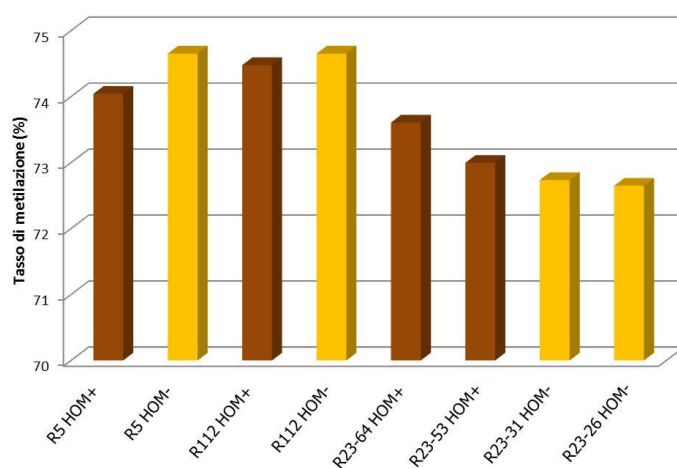


Tabella 20: Analisi e classificazione dei profili di metilazione delle linee HOM+ ed HOM-, R5, R112 ed R23 (R23-64, R23-53, R23-31 ed R23-26) in II divisione pollinica ottenuti con le 8 coppie di *primers*-selettivi. Non-metil = sito “CCGG” non metilato; *Full*- = sito *full*-metilato; Emi- = sito emi-metilato; Siti non-amplificati = sito *full*-metilato identificato dal confronto con le altre fasi analizzate; Siti amplificati = siti amplificati nella fase.

Combinazione primers	Siti amplificati	Siti Non amplificati	R5 HOM+			R5 HOM-			R112 HOM+			R112 HOM-			R23-64 HOM+			R23-53 HOM+			R23-31 HOM-			R23-26 HOM-		
			Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil	Siti Metilati		Non metil
			Full	Emi		Full	Emi		Full	Emi		Full	Emi		Full	Emi		Full	Emi		Full	Emi		Full	Emi	
E-AAG + H/M-TCGA	34	41	15	3	16	14	4	16	15	4	15	14	4	16	14	5	15	14	5	15	13	5	16	12	5	17
E-ACT + H/M-TCGA	36	65	16	5	15	16	5	15	16	5	15	16	5	15	14	5	17	14	5	17	14	5	17	14	5	17
E-ACG + H/M-TCCA	26	31	6	5	15	9	5	12	8	6	12	9	5	12	7	5	14	7	5	14	7	5	14	7	5	14
E-ACC + H/M-TGC	22	43	5	4	13	5	4	13	5	4	13	5	4	13	5	4	13	5	4	13	5	4	13	5	4	13
E-ACC + H/M-TTC	53	34	18	7	28	19	6	28	18	6	29	18	6	29	17	6	30	16	6	31	16	6	31	17	6	30
E-ACA + H/M-TCA	22	40	5	3	14	5	3	14	5	3	14	6	3	13	5	4	13	5	4	13	5	4	13	4	5	13
E-ACA + H/M-TCGA	31	29	17	3	11	17	2	12	17	3	11	17	2	12	18	2	11	14	5	12	14	4	13	15	2	14
E-ACA + H/M-TTC	40	27	15	6	19	16	6	18	15	6	19	16	6	18	14	6	20	14	6	20	14	6	20	14	6	20
Totale	264	310	97	36	131	101	35	128	99	37	128	101	35	128	94	37	133	89	40	135	88	39	137	88	38	138
Tot. Siti Metilati			443			446			446			446			441			439			437			436		
Tasso di metilazione (%)			70,9	3,1		71,6	3,0		71,3	3,2		71,6	3,0		70,4	3,2		69,5	3,5		69,3	3,4		69,3	3,3	
			74,0			74,7			74,5			74,7			73,6			73,0			72,7			72,6		

L’analisi “sequenza-specifica” dei *pattern* di metilazione in questa fase della microgametogenesi, ha segnalato una conservazione del profilo di metilazione del 90,7% dei siti “CCGG” analizzati. Come per la precedente, dei 38 eventi di iper- e de-metilazione rilevati in questo tessuto e fase, la maggioranza sono stati osservati nei *pattern* di metilazione del ricombinante R23, includendo sia 8 polimorfismi comuni con le linee ricombinanti R5 ed R112 (BH1 – 3; BD1; BD2; BD6 – BD8; Tab. 22 Tipo B, in NERO) sia 20 eventi R23-specifici (BH6 – BH12; BD14 – BD21; Tab. 21 Tipo B in ROSSO). Anche in questa fase, le variazioni di metilazione “sequenza specifica” osservate nei profili delle due famiglie ricombinanti R23 includono 8 polimorfismi comuni alle linee R23 HOM- (vedi BH9, BD14, BD19 – BD21; Tab. 21).

Le linee R5 e R112 HOM+ hanno mostrato 18 eventi polimorfici totali (BH1 – BH5; DH1 – DH13), con una simile tendenza alla de-metilazione (DH1 – DH13) rispetto alle loro linee di controllo; inoltre, fra i polimorfismi di sequenza identificati per queste due linee ricombinanti, 5 erano esclusivi del ricombinante R5 (Tab. 21 in GIALLO), 2 erano mostrati solo dalla NIRL R112 HOM+ (Tab. 21 in VERDE), mentre 7 risultavano comuni ad entrambe (BH1; BH2; BD3 – 5; Tab.21).

Tabella 21: Variazioni sequenza-specifica dei *pattern* di metilazione delle linee HOM+ ed HOM-, R5, R112 ed R23 (R23-64, R23-53, R23-31 ed R23-26) in II divisione pollinica ottenuti con le 8 coppie di *primers*-selettivi . Tipo A1, A2 e A3 = variazione del pattern di metilazione comune a tutte le linee, rispettivamente casi di *full*-, emi- e non-metilazione; Tipo B = variazioni di iper- (BH) o de-metilazione (BD) associate con la presenza dei segmenti del *Th. ponticum* (di tutti i segmenti = NERO; R5 = GIALLO; R112 = VERDE; R23 = ROSSO); Tipo C = variazioni erratiche, non classificate.

Pattern di metilazione	R5 HOM+		R5 HOM-		R112 HOM+		R112 HOM-		R23-64 HOM+		R23-53 HOM+		R23-31 HOM-		R23-26 HOM-		N° di siti	Totale (%)
	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H		
A																		408 (90,7)
A1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	67	
A2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	31	
A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	310	
B																		39 (8,7)
Iper-metilato																		14 (3,1)
BH1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	1	
BH2	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	1	
BH3	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	1	
BH4	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	1	
BH5	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	
BH6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	2	
BH7	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	1	
BH8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	1	
BH9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	1	
BH10	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	1	
BH11	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	1	
BH12	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	2	
De-metilato																		25 (5,5)
BD1	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	1	
BD2	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	1	
BD3	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
BD4	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
BD5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1	
BD6	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	1	
BD7	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	1	
BD8	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	1	
BD9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
BD10	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
BD11	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	/	/	/	1	
BD12	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	1	
BD13	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	1	
BD13	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	1	
BD14	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	1	
BD15	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	1	
BD16	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	1	
BD17	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	1	
BD18	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	1	
BD19	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	4	
BD20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	1	
BD21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	1	
C																		3 (0,6)
C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	2	
C2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1	
C3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1	

L'analisi MSAP dei 56 (Tab. 19) e 39 (Tab. 21) dei siti che hanno mostrato polimorfismo di metilazione rispettivamente nella I e II divisione pollinica, ha dimostrato che per il 60,7% e 47,4% dei casi, tali modificazioni erano esclusivamente attribuibili ai genotipi R23 (22 eventi e 20 eventi, rispettivamente per I e II divisione pollinica) contro i soli 16 eventi totali ascrivibili all'effetto degli altri due segmenti 7AgL (Tab. 22).

Tabella 22: Polimorfismi di metilazione (iper- o de- metilazione) associati ai tre segmenti 7AgL delle linee R5, R112 e R23, rilevati nelle fasi vegetative (Z1.3 e Z2.2-Z2.3) e nella micro-gametogenesi (I e II div. pollinica)

Fasi	R5			R112			R23		
	Siti metilati			Siti metilati			Siti metilati		
	Iper-	De-	Specifici ^{a)}	Iper-	De-	Specifici ^{a)}	Iper-	De-	Specifici ^{a)}
Z1.3	7	4	5	7	11	8	10	19	19
Z2.2-Z2.3	9	3	5	5	2	0	20	11	24
I divisone mitotica del polline	16	14	7	17	8	1	19	16	22
II divisone mitotica del polline	3	10	5	4	9	3	12	16	20
Totale	35	31	22	33	30	12	61	62	85
Tot. polimorfismi	66			63			123		

^{a)} Siti il cui polimorfismo è stato esclusivamente rilevato nel ricombinante (HOM+) in questione

Riassumendo, sul totale dei 574 siti “CCGG” rilevati globalmente nelle diverse fasi e tessuti, 173 (30%), di cui 42 in Z1.3, 37 in Z2.2 – Z2.3, 56 in I divisione pollinica e 38 in II divisione pollinica, hanno mostrato polimorfismi di metilazione associati alla presenza o all'assenza di specifici segmenti 7AgL (Tab. 15; 17; 19; 21). Le variazioni osservate rappresentano nell'insieme numeri simili, per ogni genotipo ricombinante, di casi di iper- e de-metilazione, sebbene ci siano variazioni dipendenti dalla fase/tessuto (Tab. 22). Emerge inoltre chiaramente che il maggior numero di polimorfismi di metilazione “sequenza-specifica” (123) sono mostrati dal ricombinante R23, dei quali circa il 70% (85 dei 123) non comuni alle altre NIRLs HOM+, R5 e R112 (Tab. 22).

6. Discussione

Lo studio delle caratteristiche dell'architettura dell'apparato radicale (RSA) di piante allevate in condizioni di campo è alquanto difficile e richiede l'impiego di ingenti risorse, in particolare su specie con radici piuttosto sottili come il frumento. Per tale motivo, nella maggior parte degli studi effettuati su frumento allevato in campo è stato valutato un numero limitato di piante (Kara *et al.*, 2000; Liao *et al.*, 2006; Manschadi *et al.*, 2006). In alternativa agli esperimenti in campo, l'analisi delle radici in semenzali ovvero su piante cresciute in condizioni controllate (lastre di gel, idroponica, *paper roll*, vasi, colonne di terreno, ecc.), rappresenta un approccio molto meno costoso ed efficiente per indagare la variabilità genetica per i tratti radicali (Robertson *et al.*, 1979; Richards and Passioura, 1981; Grando and Ceccarelli, 1995; Landi *et al.*, 2002; Tuberosa *et al.*, 2002; Bengough *et al.*, 2004; Trethowan *et al.*, 2005).

In questo lavoro l'analisi dell'architettura radicale delle linee ricombinanti di frumento duro-*Th. ponticum* R5, R112 e R23 (omozigoti per la presenza dei rispettivi segmenti 7AgL, definite HOM+) e delle relative NIRLs di controllo (non portatrici dei segmenti 7AgL, definite HOM-), è stata condotta attraverso due micro-metodi, *paper no-roll* (PNR) e rizotroni (RHZ), dimostratisi essere predittivi delle caratteristiche dell'RSA in fase di sviluppo avanzato. Difatti, è ormai largamente riconosciuto che le principali caratteristiche delle radici seminali del frumento vanno a determinare l'architettura del sistema radicale allo stadio adulto e ciò rende ancora più conveniente lo studio in una fase di crescita precoce (Richards and Passioura, 1981; Løes and Gahoonia, 2004; Sanguineti *et al.*, 2007).

L'uso delle tre linee ricombinanti ha consentito la dissezione funzionale e strutturale del 40% di 7AgL in esse presente in diverse proporzioni. Infatti, i risultati ottenuti suggeriscono la presenza di loci putativi per il controllo di diversi attributi dell'architettura radicale (vedi §4.1.1). Associato al 28% di 7AgL della linea R112 è stato rilevato un incremento significativo, nei confronti della sua linea di controllo, dell'angolo di diffusione radicale (SRA), della lunghezza della radice principale (PRL), di quella media (ARL) e dell'apparato radicale totale (TRL), del diametro radicale (RDW/TRL), della biomassa (RDW) e del rapporto tra la biomassa della radice e quella del germoglio (RDW/SDW); questi caratteri sono noti in letteratura dare vantaggi alla pianta durante la colonizzazione del terreno, nella competizione con le infestanti e nel reperire acqua e nutrienti (Tennant and Hall, 2001; Palta *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2014).

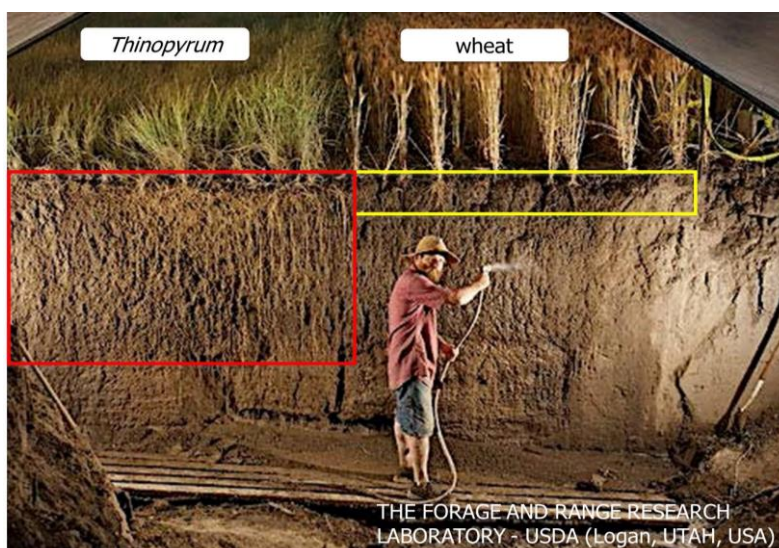
L'angolo di diffusione radicale (SRA) nelle fasi iniziali di crescita è predittivo delle modalità di sviluppo della biomassa radicale lungo il profilo del terreno negli stadi successivi e, come dimostrato anche in frumento, è una caratteristica rilevante per l'efficienza d'utilizzo dell'acqua

(Manschadi *et al.*, 2006; Reynolds *et al.*, 2007). I ricombinanti R112 e R23 (HOM+) hanno entrambi mostrato un incremento dei valori di SRA (+17% e +37% con i metodi PNR e RHZ, rispettivamente per R112 e +17% e 14% con il PNR e RHZ per R23), rispetto alle loro linee di controllo (HOM-); ciò indica una propensione del loro apparato radicale ad una diffusione orizzontale, attesa contribuire positivamente all'efficienza di reperimento dell'acqua durante le piogge stagionali in fase vegetativa (Liao *et al.*, 2006; Sanguineti *et al.*, 2007), in particolare in caso di pioggia intermittente e limitata, associata ad un'elevata evaporazione.

In frumento, le radici seminali restano, insieme a quelle nodali, funzionalmente attive per tutta la vita della pianta; in quest'ottica le radici seminali sono particolarmente importanti per sostenere la resa, perché possono crescere più in profondità nel profilo del suolo. In particolare, in caso di limitata umidità del suolo le piante raggiungono la maturità basandosi prevalentemente sulle radici seminali. La linea ricombinante R112 ha mostrato a 12gg di accrescimento in rizotrone, valori medi di PRL e TRL di 31,2 cm e 130 cm, significativamente più alti rispetto al suo controllo (27,4 cm e 110,5 cm, rispettivamente per PRL e TRL), indicando un accrescimento del suo apparato radicale verso gli strati più profondi del terreno. L'accrescimento in lunghezza è noto essere una funzione adattiva per l'assorbimento dell'acqua quando le risorse sono limitate (Ito *et al.*, 2006); questa caratteristica dell'architettura radicale, associata con il diametro radicale, influenza la capacità del sistema di penetrare in terreni compatti e quindi la capacità di assorbimento dell'acqua e dei nutrienti, così incidendo sulle *performance* della coltura (Kashiwagi *et al.*, 2005; Pinto and Reynolds, 2015). Un contributo positivo a tale aspetto è stato associato al 5% di 7AgL che differenzia i ricombinanti R5 e R112: quest'ultima linea ha infatti rivelato un incremento significativo del diametro radicale (RDW/TRL) rispetto al controllo HOM- (+14% e +34% con i metodi PNR e RHZ, rispettivamente).

Come osservato da Sharma *et al.* (2009) per la linea di traslocazione 1RS.1BL e in linea con le caratteristiche dell'apparato radicale del donatore selvatico dei segmenti 7AgL, il *Th. ponticum* (Fig. 38), il trasferimento interspecifico ha determinato un incremento della biomassa radicale. Ciò è stato osservato nella NIRLs R112 che, con 12 mg rilevati dopo 7 giorni di crescita con il metodo PNR, e 22 mg a 12 giorni di crescita in rizotroni, ha dato i valori RDW significativamente più alti rispetto al suo HOM-, ma anche maggiori di quelli delle altre NIRLs analizzate.

Figura 38: Sezione verticale del terreno che mette a confronto l'apparato radicale di un *Thinopyrum* e quello di frumento coltivato.



L'ipotesi della presenza di geni/QTL del 7AgL che influenzano vari caratteristiche dell'RSA si estende anche a fattori che controllano altri caratteri, quali TRL, RDW/TRL, RDW/SDW e per RDW, dei quali sono stati identificati loci lungo il 7AL e il 7DL di frumento, in regioni corrispondenti (omeologhe) a quelle 7AgL presenti nelle linee R5, R112 e R23 (Sanguineti *et al.*, 2007; Petrarulo *et al.*, 2015).

Dall'analisi dei risultati ottenuti, è possibile affermare che l'incremento delle rese e biomassa mostrato dalla parte aerea (Kuzmanović *et al.*, 2014, 2016; vedi §1.4.1.2) è strutturalmente correlato alle caratteristiche positive dell'RSA, anche in termini di biomassa, determinate dalla presenza nelle stesse sub-regioni di geni/QTL del 7AgL. Sebbene non sia possibile affermare una causalità diretta tra le due manifestazioni fenotipiche, certamente non la si può escludere. Inoltre, dall'analisi comparativa delle NIRLs dei 3 ricombinanti, la R112 ha espresso la gran parte degli effetti positivi per l'architettura e biomassa radicale associati alla cromatina 7AgL. Quindi, come nel caso dei caratteri relativi alle rese (Kuzmanović *et al.*, 2014, 2016), è probabile che all'interno della porzione prossimale del segmento 7AgL in essa presente, compresa tra le frazioni 0.77 e 0.72 del braccio 7AL/7AgL (intero braccio esteso da 0 = centromero a 1 = telomero), sono probabilmente localizzati più loci relativi all'RSA. In contrasto con gli altri, il fenotipo della R23 ha mostrato una depressione della maggioranza dei caratteri analizzati: -31% (PNR) e -28% (RHZ) per RDW, -20% (PNR) e -25% (RHZ) per RDW/TRL, -25% e -20%, rispettivamente per PNR e RHZ, per RDW/SDW. Anche in questo caso, una simile tendenza è stata osservata per diversi parametri di produttività (Kuzmanović *et al.*, 2014, 2016). Dal

momento che il segmento 7AgL della R23 comprende quello della R112, è verosimile supporre che nel 12% di cromatina 7AgL esclusiva dell'R23 possa esserci uno o più geni/QTL con azione repressiva, oppure che il gene *Sd* (vedi § 1.4.1.3), localizzato in questa regione, determini effetti negativi anche sui caratteri dell'RSA.

L'indagine condotta sulla linea ricombinante (KS24) e di traslocazione (T4) di frumento tenero-*Th. ponticum* ha prodotto risultati in accordo con quelli relativi alle NIRLs di frumento duro, anche se il contributo positivo dato dalle porzioni cromosomiche “selvatiche” è risultato meno cospicuo. Il segmento 7AgL della T4 ha determinato rispetto al controllo un incremento significativo della lunghezza della radice principale (+10% e +18%, PNR e RHZ rispettivamente), del diametro medio delle radici (+19%, RHZ), della biomassa radicale (+27%, RHZ) e del rapporto tra la biomassa radicale e del germoglio (+13%, RHZ). Non è stato invece riscontrato nessun contributo positivo associato al braccio 7el₂L dell'altra accessione del *Th. ponticum*, presente in KS24, indicando una specificità allelica (alleli “*plus*” quelli del 7AgL o 7el₁ e non quelli del 7el₂) e non di specie nella determinazione degli effetti osservati.

L'indagine sull'architettura e la biomassa dell'apparato radicale delle stesse linee di ricombinazione/traslocazione di frumento duro e tenero sottoposte a *stress* idrico, ha confermato il possibile contributo dei geni/QTL presenti sul 7AgL anche in tali condizioni. Infatti, anche in condizioni di carenza idrica la presenza del 7AgL risulta determinare, in un *background* di frumento duro, un accrescimento in lunghezza dell'apparato radicale (PRL, TRL, ARL), della biomassa radicale (RDW) e quella del germoglio (SDW), indicando una maggiore vigoria della pianta anche in condizioni di sviluppo sfavorevoli. Si aggiunge, inoltre, l'aumento del numero delle radici seminali (SRN), parametro noto offrire vantaggi nell'ampliare la sezione di terreno sondata dalla pianta e nel migliorare la sua capacità di adattamento (Manschadi *et al.*, 2008; Ruta *et al.*, 2009, 2010). Anche in caso di *stress* idrico (LW), gli effetti positivi associati alla presenza di cromatina 7AgL si sono riscontrati soprattutto nella linea R112, che ha mostrato in caso di LW un miglior vigore vegetativo (+ 26,7% per SDW e + 43,5% per RDW, rispetto al suo HOM-) e i valori più elevati per la maggioranza dei caratteri analizzati, tra cui un diametro radicale (RDW/TRL) significativamente più elevato al confronto con il suo controllo (+ 18%) ma anche verso le altre linee. Numerosi studi indicano l'aumento del diametro radicale come un fattore che favorisce l'accumulo di acqua e nutrienti in caso di carenza e la capacità di penetrazione dell'apparato radicale in terreni compatti (Dorlodot *et al.*, 2007; Sanguineti *et al.*, 2007; Clark *et al.*, 2008; Rahnema *et al.*, 2011; Steele *et al.*, 2013). Altro carattere noto essere associato ad una risposta adattativa alla carenza idrica e che, al contempo, tende a stabilizzare o a incrementare le rese, è rappresentato dalla biomassa radicale (Sanguineti *et al.*, 2007; Steele *et al.*, 2013; Sharma

et al., 2010; Pinto and Reynolds, 2015). I risultati della presente ricerca suggeriscono l'esistenza di uno o più geni/QTL per RDW in condizioni di LW nella regione 7AgL comune ai ricombinanti R112 e R23 (compresa tra le frazioni 0.77 e 0.72, vedi pure sopra). Entrambi i ricombinanti hanno infatti mostrato un incremento di tale carattere rispetto alle condizioni WW (+11,7% per R112 e +8% per R23). Il contributo del 7AgL sui caratteri dell'RSA in risposta alla carenza idrica, emerso dai risultati di questo studio, è in accordo con quanto osservato da Placido *et al.* (2013): questi autori hanno associato l'accrescimento in biomassa e in lunghezza dell'apparato radicale, in risposta allo stress idrico, ad un segmento interstiziale del 7AgL di *Th. ponticum* trasferito sul 7DL che, seppur non descritto con precisione, sembrerebbe corrispondere ad una regione 7AgL compresa nelle linee ricombinanti R112 e R23.

Anche in linea con i risultati di Placido *et al.* (2013) e con quelli osservati in frumento duro, la prova di stress idrico (LW) sulle linee di frumento tenero KS24 e T4 ha confermato che la presenza del 7AgL del ricombinante T4 è associata all'aumento, rispetto al controllo Thatcher, dei caratteri dell'RSA analizzati, come la biomassa radicale (+32%), la lunghezza della radice primaria (+23%) e dell'apparato radicale (TRL, +28%).

Complessivamente i dati ottenuti fanno ipotizzare che le caratteristiche dell'RSA determinate dalla presenza di geni/QTL del 7AgL, possano conferire alle linee portatrici sia in frumento duro che tenero numerosi vantaggi, potenzialmente contribuenti ad una maggiore stabilità produttiva, anche in condizioni di carenza idrica (Richards and Passioura, 1989; Ehdaie *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2008; Steele *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2010; Pinto and Reynolds, 2015). Ciò appare di grande rilievo, soprattutto alla luce dei cambiamenti climatici, già in atto ma attesi essere ancor più marcati in futuro, tra i cui effetti più devastanti è proprio la siccità e, in particolare, la carenza idrica nelle fasi finali dello sviluppo della pianta ("*terminal drought*"), determinanti ai fini delle rese, quali la fioritura e la fase di riempimento della cariosside (Farooq *et al.*, 2014).

È noto che il germoplasma selvatico include numerose specie dotate di interessanti attributi che, trasferiti nei frumenti coltivati, contribuiscono, direttamente o indirettamente, ad aumentarne le rese e la stabilità produttiva (vedi anche §1.2.2). Sembra però da sottolineare il caso, davvero particolare, del 7AgL di *Th. ponticum*, che, in una regione di dimensioni relativamente limitate, include sia geni di resistenza a importanti patogeni del frumento, quali l'*Lr19* e l'*Sr25*, che geni/QTL che migliorano parametri di produttività (tra cui il numero di il numero di semi per spiga e di culmi per pianta e per m², nonché la quantità di clorofilla e la superficie della foglia a bandiera, vedi Kuzmanović *et al.*, 2014, 2016), e inoltre, come evidenziato dalla presente ricerca, l'architettura e lo sviluppo dell'apparato radicale, anche questi verosimilmente contribuenti al miglioramento delle prestazioni produttive.

Questi materiali hanno consentito di evidenziare quindi gli effetti positivi del 7AgL su diversi caratteri interessanti per il *breeding* del frumento (geni di resistenza, QTL per produttività e per RSA) ma anche di esplorare un aspetto ancora poco conosciuto, riguardante le modificazioni epigenetiche indotte nel genoma ricevente dal trasferimento di materiale genetico estraneo, in particolare di segmenti cromosomici di entità ridotta, nel complesso ben tollerati, tanto da entrare nella costituzione di linee *pre-breeding* e varietà (vedi § 1.5).

In questo studio, utilizzando due differenti approcci, saggio immunologico e MSAP, è stata valutata l'entità globale delle citosine metilate e la presenza e tipologia di polimorfismi sequenza-specifici nelle tre linee ricombinanti, R5, R112 e R23 (HOM+) e nelle loro linee controllo HOM-. Il saggio immunologico ha dato complessivamente dei valori di metilazione inferiori rispetto al MSAP e nel complesso non ha evidenziato cospicue differenze tra i genotipi. L'approccio MSAP consente certamente un'analisi più mirata e sensibile, in quanto rileva il livello di metilazione delle citosine ai siti "CCGG" del DNA, riconosciuti dai due isoschizomeri MspI ed HpaII, siti che rappresentano le regioni preferenzialmente soggette a tale modificazione epigenetica (Finnegan *et al.*, 1998; Madlung *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007). Con entrambe i metodi di analisi, con il procedere delle fasi di sviluppo e quindi del grado di differenziamento del tessuto considerato, è stato osservato, come atteso, un progressivo aumento dei livelli di metilazione: il DNA genomico estratto da foglia nelle due fasi vegetative, 4^a foglia e accestimento, ha presentato una percentuale media di 5-mC pari al 5,82% e al 19,95% con il test ELISA e un tasso medio di metilazione dei siti "CCGG" del 49% e del 65,7%, rispettivamente, con l'approccio MSAP; il DNA estratto da antere nel corso delle due fasi di divisione mitotica della micro-gametogenesi (I e II divisione mitotica) ha dato i valori di metilazione più elevati, rispettivamente del 46,05% e 45,79% (ELISA) e del 73,8% e 73,7% rilevati mediante MSAP. Nel confronto tra le NIRLs HOM+ e HOM- è stato rilevato solo un lieve aumento, non significativo, del livello globale di entrambi i tipi di metilazione, *full*- o *emi*-metilazione: in fase Z1.3 le HOM+ mostravano un tasso di metilazione dei siti "CCGG" del 0,5% più alto rispetto alle HOM-, in fase di accestimento l'incremento è stato dell'1%, mentre nelle antere in I e II divisione post-meiotica esso è stato rispettivamente dell'1,7% e dello 0,2%. Quindi, sebbene l'introggressione di materiale genetico estraneo comporti cospicui cambiamenti epigenetici, tra cui la metilazione del DNA, nel genoma ricevente, come osservato in linee ricombinanti di riso-*Zizania latifolia* (Dong *et al.*, 2006), in linee di traslocazione frumento-*Secale cereale* 1RS.1BL (Zhang *et al.*, 2008), nonché ibridi e anfidiploidi (Shaked *et al.*, 2001; Feldman and Levy, 2009; Feldman *et al.*, 2012), tali alterazioni sono attese essere meno evidenti, soprattutto a livello quantitativo, dopo diverse generazioni di re-incrocio e di autofecondazione dall'evento iniziale

di trasferimento intraspecifico. Delle linee ricombinanti R5, R112 e R23 oggetto di questa ricerca, sono state analizzate piante alla generazione BC₄₋₅F₇ dopo il trasferimento dei vari segmenti di *Th. ponticum* nel genoma di frumento duro (Ceoloni *et al.*, 2005). Tali materiali mostrano ormai da diverse generazioni fenotipi del tutto normali e molto simili (salvo per i caratteri specificamente trasferiti dal 7AgL) alle linee di controllo HOM- ed al genitore ricorrente, cv. Simeto. A questo proposito, è da notare che diversamente dai materiali qui analizzati, le linee di introgressione di riso (Wang *et al.*, 2005) e frumento utilizzate negli studi sopra citati contenevano un gran numero di anomalie fenotipiche rispetto alle linee parentali (Zhang *et al.*, 2008). Quindi visto il ruolo della metilazione nel regolare l'espressione genica e nel proteggere e stabilizzare il genoma, è possibile ipotizzare che dopo l'iniziale "shock" epigenetico, comprensivo dell'alterazione dei profili di metilazione del DNA, causato dall'evento di ibridazione intraspecifica, il genoma tenda a stabilizzarsi durante le generazioni e infine raggiungere una nuova omeostasi, magari riassumendo, almeno quantitativamente, profili di metilazione simili a quelli del genoma parentale ricevente (pre-ibridazione).

Mentre la maggioranza degli studi ad oggi condotti hanno riguardato ibridi completi o anfidiploidi, o anche linee di sostituzione per un intero cromosoma o un braccio, i ricombinanti R5, R112 e R23 sono caratterizzati da sostituzioni del 23% (R5), 28% (R112) e 40% (R23) del braccio 7AL di frumento duro. Non possiamo perciò escludere un possibile effetto "dose" del materiale genetico "estraneo" sulle alterazioni di metilazione del genoma ricevente. In effetti, i tassi di metilazione dei ricombinanti R5 e R112 sono apparsi più simili tra loro che rispetto all'R23. Ad esempio, il tasso di metilazione dei siti "CCGG" in fase Z1.3 è risultato del 48,7%, a fronte del 50,1% e del 49,8% per i ricombinanti R5 e R112; anche nelle antere in II divisione pollinica le citosine metilate ai siti "CCGG" sono state il 73,3% in R23 HOM+, a fronte del 74,3% in R5 e R112.

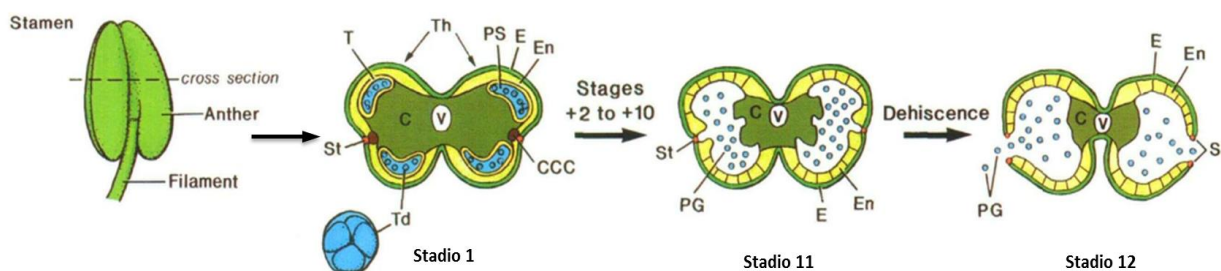
Certamente, più che differenze quantitative, ai fini di eventuali differenze tra genotipi interessanti sono stati i risultati dell'analisi MSAP. Sulla base della digestione differenziale dei due isoschizomeri, e dal confronto con i *pattern* di metilazione ottenuti dai diversi tessuti e dalle differenti fasi di sviluppo analizzate, sono stati identificati 574 loci genomici "CCGG" che includevano nel 30% degli eventi dei polimorfismi di metilazione riconducibili alla presenza dei segmenti 7AgL. Anche nel caso delle variazioni "sequenza-specifiche" le NIRLs hanno dato il medesimo modello di metilazione, *full*- o *emi*-metilazione, nell'85-91% dei siti metilati (Tab. 15, 17, 19, 21) indicando nuovamente che le alterazioni indotte da questi trasferimenti intraspecifici in un *background* di frumento duro sono comunque contenute.

I 173 polimorfismi di metilazione osservati, tra le HOM+ e le HOM- e fra le stesse linee ricombinanti (Tab. 22), hanno incluso modifiche del tipo iper-metilazione e de-metilazione, nonché la conversione di stati di emi-metilazione a *full*-metilazione, o viceversa, al sito “CCGG” rilevato(i). Nel 69% dei siti “CCGG” polimorfici si è osservato un cambiamento nella direzione di iper-metilazione nelle linee HOM+ rispetto alle linee di controllo HOM-. Questa tendenza alla iper-metilazione dei siti “CCGG” è stata rilevata in altri ibridi intraspecifici, sia parziali che totali (es. riso e frumento; Dong *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008), facendo ipotizzare un ruolo di questo fenomeno nel silenziamento di elementi trasponibili o di sequenze ad essi connessi, sia di origine “esogena” che presenti nel genoma donatore, attivati in seguito all’evento d’ibridazione e perciò potenziali cause di destabilizzazione del genoma (Levy and Feldman, 2004; Dong *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008).

A questo riguardo, l’interesse si è concentrato in modo particolare sul ricombinante R23, le cui NIRLs, sebbene si mostrino fenotipicamente e geneticamente stabili da varie generazioni, sono portatrici di un gene *Sd* (*Segregation distortion*) nel 12% prossimale del 7AgL, non condiviso con gli altri due ricombinanti R5 e R112. Come descritto in precedenza (vedi §1.4.1.3), questo gene altera i normali rapporti di segregazione del cromosoma ricombinato attraverso la linea germinale maschile e, nelle fasi iniziali di sviluppo e mantenimento della linea, è stato associato alla presenza di varie anomalie nel corso delle due divisioni mitotiche del micro-gametofito, tra cui segregazione cromosomica aberrante e condensazione anomala della cromatina (Grossi *et al.*, 2009; Grossi, 2010). Alla presenza di *Sd* sono stati tentativamente imputati anche effetti negativi su parametri di produttività, inclusa una diminuzione del peso 1000 semi (Kuzmanović *et al.*, 2014, 2016) e, come osservato nella presente ricerca, anche sui caratteri dell’architettura e biomassa radicale (vedi §4.1.1).

Figura 39: Stadi principali dello sviluppo dell’antera ed evoluzione dei tessuti componenti.

Stadio 1 = antera con meiociti al termine della meiosi (Td = tetrade); Stadio 11 = antera con granuli pollinici (PG) in corso di divisioni mitotiche e differenziamento; Stadio 12 = antera in deiscenza. E, epidermide; En, endotecio; PS, sacco pollinico; C, tessuto connettivo; St, stomium; T, cellule del tappeto; Th, teca; V, fascio vascolare. (modificato da Goldberg *et al.*, 1993)



Le NIRLs R23 HOM+ hanno mostrato differenze nel profilo di metilazione nei confronti delle altre linee ricombinanti, sia in termini quantitativi che di polimorfismi “sequenza-specifici”, non solo nel corso delle due fasi della micro-gametogenesi, ma anche nelle fasi vegetative considerate. Dal punto di vista quantità totale di citosine metilate, questi materiali hanno mostrato i valori più bassi (vedi §4.3.1), risultato peraltro evidenziato non solo dalle linee *carrier* (HOM+) del segmento, ma anche dalle linee sorelle (R23-26 e R23-54) non più portatrici di materiale genetico 7AgL (HOM-). In effetti, le R23 HOM- hanno dato, in tutte le fasi e tessuti analizzati, i livelli di metilazione più bassi e sostanzialmente differenti non solo nei confronti delle corrispettive HOM+, ma anche verso le HOM- di R5 e R112, risultate fra loro più omogenee, così come le corrispondenti NIRLs HOM+. Le differenze osservate non possano essere specificamente attribuibili ai granuli pollinici in divisione, in quanto è stato analizzato il DNA genomico estratto dalle antere intere, che contengono, in fase di micro-gametogenesi, tessuti periferici (epidermide, endotecio, connettivo) e cellule del tappeto, anche se in progressiva degenerazione (Fig. 39; Goldberg *et al.*, 1993; Scott *et al.*, 2004). Con questa precisazione, il tasso di metilazione dei siti “CCGG” misurato nelle NIRLs R23 HOM+ alla fase di I divisione pollinica è risultato minore dell’1% rispetto a quello mediamente osservato nelle altre due HOM+; ciò vale anche per le R23 HOM-, che hanno mostrato una riduzione dell’1,2% nei confronti delle altre due HOM- (R5 e R112). Analogamente, in fase di II divisione post-meiotica è stata osservata una de-metilazione dei siti “CCGG” dell’1,3% nelle R23 HOM+ e del 2,7% nelle R23 HOM- in confronto alle altre NIRLs HOM+ ed HOM-. L’elevato livello di metilazione rilevato nelle antere nel corso delle micro-gametogenesi è probabilmente indice sia dell’elevato grado di differenziamento dell’organo considerato, ma anche della necessità di protezione e stabilizzazione del DNA che andrà poi a costituire lo zigote. Ad esempio, nel genoma di *Arabidopsis*, mentre gli elementi trasponibili nei nuclei vegetativi del granulo pollinico possono essere in alcuni casi riattivati in seguito a de-metilazione, quelli dei nuclei spermatici rimangono sempre metilati e silenti, caratteristica funzionale alla stabilità e integrità del genoma delle cellule della linea germinale (Slotkin *et al.*, 2009). Nei mammiferi, a fronte di un’estesa de-metilazione delle cellule primordiali della linea germinale maschile, il genoma degli spermatidi maturi viene fortemente metilato fino al momento della fecondazione (Feng *et al.*, 2010). Sulla base di queste evidenze, lo stato di relativa de-metilazione osservato nelle NIRLs R23 anche nelle due fasi di divisione del polline può essere indicativo di una parziale instabilità (He *et al.*, 2011). Anche se di poco differente rispetto alle altre NIRLs nella generazione qui analizzata, questa tendenza alla de-metilazione può essere il “relitto” dell’instabilità iniziale, ipoteticamente generata dal gene *Sd*, manifestatasi inizialmente con una più marcata ipo-

metilazione, diminuita progressivamente con il procedere delle generazioni di re-incrocio e autofecondazione, fino a raggiungere l'attuale stato. Naturalmente, per sostanziare questa ipotesi occorrerebbe analizzare l'andamento trans-generazionale dei profili di metilazione, possibile sviluppo futuro della presente ricerca.

La metilazione del DNA, la principale delle modificazioni epigenetiche dei genomi eucariotici, è un fenomeno di grande rilievo per la stabilità di tali genomi, strettamente associata con lo stato di condensazione della cromatina (Klose and Bird, 2006), con il controllo dell'integrità cromosomica, dell'espressione e della ricombinazione genica, con i meccanismi di difesa contro l'invasione di sequenze di DNA estraneo e con il silenziamento degli elementi trasponibili (Weber and Schubeler, 2007; Sekhon and Chopra, 2009; Li *et al.*, 2013b).

Appare interessante sottolineare come in diversi organismi allo stato di condensazione dell'eterocromatina, corrispondente a regioni del genoma povere di geni e costituite principalmente da sequenze ripetute, sono stati associati fenomeni di segregazione distorta (Burt and Trivers 2006). L'eterocromatina centromerica, che nelle piante superiori è caratterizzata da elevati livelli di metilazione del DNA (Lister *et al.*, 2008; Bernatavichute *et al.*, 2008), è anche coinvolta in uno dei casi meglio studiati a tale riguardo, ovvero quello di segregazione distorta (SD) osservato in *Drosophila*. In tale sistema, uno dei loci responsabili, il locus Responder (*Rsp*), è costituito da un semplice *array* ripetuto di 120bp situato entro l'eterocromatina centromerica (Wu *et al.*, 1988) e il numero di ripetizioni determina una diversa sensibilità di *Rsp* all'altro gene coinvolto nel fenomeno di SD, denominato *Sd* (Lyttle, 1991). La disfunzione e quindi la segregazione distorta di spermatidi maturi di *Drosophila* risulta causata da un'alterazione di uno dei due prodotti genici del locus doppio *Sd*, la proteina RanGAP, responsabile di una difettiva condensazione della cromatina (Kusano *et al.*, 2001, 2003). Una modificazione dello stato di metilazione del DNA e, di conseguenza, anche di quello di condensazione della cromatina, potrebbe essere alla base dell'instabilità iniziale generata dal gene *Sd* della R23 e degli eventi aberranti osservati durante la gametogenesi maschile (Grossi *et al.*, 2009; Grossi, 2010). D'altra parte, gli stessi fenomeni potrebbero essere anche ricondotti alla mancanza di soppressione degli eventi ricombinativi, anch'essi legati allo stato di metilazione e condensazione della cromatina (Copenhaver *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2003). Questa ipotesi è in accordo con quanto recentemente osservato in riso in seguito a modificazione genetica o chimica dello stato "eterocromatico" (ovvero altamente condensato) della cromatina centromerica del cromosoma 3, corrispondente ad una de-metilazione; tale studio ha evidenziato la comparsa di un "hotspot" di ricombinazione nella regione centromerica, in cui normalmente la ricombinazione è repressa, probabilmente responsabile della segregazione distorta di una

determinata regione di eterocromatina telomerica dello stesso del cromosoma 3 (Habu *et al.*, 2015). Inoltre, in linea con quanto osservato in studi precedenti effettuati su ibridi interspecifici tra sub-specie di riso (Harushima *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2003) ed anche ipotizzato nel presente lavoro, le distorsioni della segregazione risultavano modificate e/o attenuate nelle generazioni successive, con un recupero della metilazione nelle regioni precedentemente ipo-metilate, pur mostrando delle variazioni di tale profilo rispetto alla situazione originaria.

Come detto in precedenza l'analisi MSAP svolta ha consentito di identificare 173 polimorfismi “sequenza-specifica” associati al trasferimento di cromatina selvatica (7AgL) in un *background* di frumento duro; tali polimorfismi risultano molto più abbondanti nel ricombinante R23, a cui sono state attribuite 123 variazioni del profilo di metilazione sui 574 siti “CCGG” amplificati, rispetto ai 66 e 63 osservati rispettivamente nei ricombinanti R5 e R112. La maggior frequenza di polimorfismi di metilazione associati alla R23 è stata riscontrata in tutte le fasi e tessuti e per il 69% dei casi tali modificazioni non erano osservabili nei *pattern* degli altri due HOM+. I ricombinanti R5 e R112 hanno inoltre mostrato una minore variazione rispetto alle linee di controllo HOM-, indicativa dell'assenza, almeno in questa generazione, di cospicue variazioni epigenetiche eventualmente ascrivibili alla condizione di prodotto di trasferimento intraspecifico. Lo stesso non si può affermare per le NIRLs R23: in questo caso le linee non più portatrici del segmento 7AgL (HOM-) hanno mantenuto il 56,5% degli 85 polimorfismi di metilazione esclusivi della linea ricombinante R23 e, nel contempo hanno mostrato per tutte le fasi considerate uno stato di de-metilazione più elevato rispetto alle altre NIRLs HOM-. Come ipotizzato da Dong *et al.* (2006), le alterazioni di metilazione delle citosine nelle linee di introgressione possono essere causate da diversi meccanismi che potrebbero agire singolarmente o mutualmente: 1) un disturbo generale degli intrinseci stati epigenetici della cromatina del ricevente, causato dall'interazione con il profilo di metilazione del DNA del donatore, come risultato del trasferimento interspecifico; questa interazione è stata proposta essere responsabile del verificarsi di fenomeni simili in animali in cui era stato integrato DNA estraneo (Heller *et al.*, 1995; Remus *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 2001); 2) l'introduzione di un fattore “modificatore della metilazione” esogeno, ovvero del donatore, in questo caso il *Th. ponticum*, *trans*-agente oppure l'attivazione di un fattore endogeno, altrimenti criptico, del genoma ricevente (frumento), conseguente al trasferimento interspecifico. A tal proposito, sono stati identificati due QTL in riso, corrispondenti a “modificatori della metilazione” *trans*-agenti, che si ritiene contribuiscano sia alla creazione sia al mantenimento di specifici modelli di metilazione delle citosine (Riddle and Richards, 2002); altri modificatori dei *pattern* di metilazione genotipo-specifici sono stati indentificati in topo (Schumacher *et al.*, 2000); 3) Gli assetti di metilazione alterati sono diretti

da riarrangiamenti genomici che portano alla formazione di “strutture aberranti” nelle linee di introgressione: è stato dimostrato in *Arabidopsis* che alcune tipologie di sequenza come ripetizioni dirette o invertite del DNA, possono indurre la metilazione *de novo* del DNA in sequenze adiacenti o omologhe (Luff *et al.*, 1999; Melquist *et al.*, 1999).

Questi tre scenari possono spiegare in parte quanto rilevato nelle NIRLs ricombinanti frumento duro-*Th. ponticum*, tenendo anche conto che negli organismi vegetali l’ereditarietà trans-generazionale della metilazione di nuova acquisizione (Riddle and Richards, 2002; Scheid *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2005) può portare ad una diversificazione della metilazione rispetto ai modelli originali. In particolare, per il genotipo R23 ed il gene *Sd* in esso presente, si potrebbe speculare che tale gene potrebbe agire o come trans-attivatore o in modo indiretto attivando dei fattori endogeni del frumento, altrimenti silenti, inducendo variazioni nel modello di metilazione del genoma ricevente; una volta trasferito o attivato, tale fattore potrebbe aver portato ad un generale stato di de-metilazione, determinando la generale instabilità genotipica e fenotipica che ha caratterizzato le prime generazioni (Grossi, 2010). I nuovi *pattern* di metilazione verrebbero poi ereditati nelle generazioni successive anche in assenza del segmento 7AgL (linee HOM-), insieme a caratteri fenotipici alterati (non determinati geneticamente): in effetti, nelle R23 HOM+ e HOM- sono state osservate piante tendenzialmente clorotiche, esili sia nella parte aerea (SDW) che a livello radicale (RDW; TRL, ARL) e di taglia maggiore al confronto con le altre NIRLs HOM- (R5 e R112).

Nel suo insieme la presente ricerca ha aggiunto diverse conoscenze riguardanti gli effetti dell’introgressione di definite porzioni del 7AgL sul braccio 7AL di frumento duro. Le indagini sull’apparato radicale hanno confermato l’utilità di ricorrere alla variabilità genetica delle specie selvatiche per migliorare caratteri che possono direttamente od indirettamente contribuire ad innalzare e stabilizzare le rese, anche in condizioni di stress abiotici quali la carenza idrica. L’effetto significativamente positivo di definite regioni del 7AgL, sulla biomassa radicale, sull’angolo di diffusione radicale e sulla lunghezza di questo, confermano che nella porzione distale del 40% del braccio selvatico vi sono loci che possono influenzare anche l’architettura del sistema radicale. In linea con quanto emerso dalle analisi di parametri di produttività della parte aerea (Kuzmanović *et al.*, 2016), la linea ricombinante con le migliori potenzialità risulta essere il ricombinante R112, almeno quando il genoma ricevente è quello di frumento duro. Infatti la linea R23, che pure presenta un importante e stabile QTL per numero di semi per spiga e per m² (Kuzmanović *et al.*, 2014, 2016), vede le sue potenzialità ridotte da effetti negativi su altri parametri, sia riscontrati nella porzione aerea che in quella radicale. Tali effetti sono stati ipotizzati derivare dalla presenza nella porzione più prossimale del 7AgL, esclusiva di tale linea,

di un gene che distorce la segregazione del cromosoma 7A-7Ag della R23 (ridotta trasmissibilità attraverso il polline) ed anche modifica in maniera più cospicua rispetto alle linee R5 e R112 il pattern di metilazione del DNA estratto da foglie di giovani piante in fasi diverse dello sviluppo vegetativo e da antere in corrispondenza della micro-gametogenesi.

A parte il caso particolare e al contempo affascinante della R23, le analisi degli effetti sulla metilazione del DNA a livello *genome-wide* in genotipi derivanti da trasferimento interspecifico di segmenti cromosomici di limitate entità, finora molto limitate, nonostante la numerosità di tali materiali e il loro potenziale valore ai fini del miglioramento genetico, indicano nel complesso limitate alterazioni dell'epigenoma, almeno dopo diverse generazioni di reincrocio e autofecondazione rispetto al momento di isolamento dei prodotti di ricombinazione interspecifica (Ceoloni *et al.*, 2005). La relativa omogeneità, sia quantitativa che qualitativa della metilazione riscontrata tra le linee ricombinanti R5, R112 e R23 (anche se in quest'ultima con qualche variazione più cospicua), diventa un ulteriore indice della validità dell'ingegneria cromosomica nell'utilizzare la variabilità genetica interspecifica per introdurre in frumento nuovi e più efficaci alleli per svariate caratteristiche di rilevanza agronomica.

Tra gli sviluppi futuri della presente ricerca, oltre all'analisi trans-generazionale del *pattern* di metilazione, si prevede di analizzare, mediante sequenziamento, i polimorfismi di metilazione "sequenza-specifici", in modo da determinare eventuali *target* genomici preferenziali di questa modificazione epigenetica, focalizzando prioritariamente l'attenzione, per quanto detto sopra, sulle sequenze polimorfiche R23-specifiche. Vale la pena menzionare che il segmento 7AgL della R23 (40% del braccio 7AL) è stato recentemente trasferito sul 7AL di frumento tenero (Ceoloni *et al.*, dati non pubbl.), nel cui genoma lo stesso cromosoma 7A-7Ag ricombinato non sembra mostrare alcuna alterazione della segregazione: sarà interessante verificare se, in concomitanza della normale segregazione, anche le alterazioni citologiche (Grossi, 2010) e quelle di alcuni caratteri fenotipici (parte aerea e apparato radicale) e del *pattern* di metilazione del DNA risulteranno "rientrate" nel nuovo contesto genomico.

7. Bibliografia

- Aalfs J.D., Kingston R.E., 2000. What does 'chromatin remodeling' mean? Trends Biochem Science 25, 548–55.
- Adams R.L.P., Burdon R.H., 1985. Molecular Biology of Methylation. Springer–Verlag, New York.
- Adams K.L., Percifield R., Wendel J.F., 2004. Organ–specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid. Genetics 168, 2217–2226.
- Adom K.K., Sorrells M.E., Hai L.R., 2003. Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties. J Agric Food Chem 51, 7825–7834.
- Aina R., Sgorbati S., Santagostino A., Labra M., Ghiani A., Citterio S., 2004. Specific hypomethylation of DNA is induced by heavy metals in white clover and industrial hemp. Physiol Plantarum 121, 472–480.
- Albertin W., Balliau T., Brabant P., Chevre A–M., Eber F., Malosse C., Thiellement H., 2006. Numerous and rapid nonstochastic modifications of gene products in newly synthesized *Brassica napus* allotetraploids. Genetics 173, 1101–1113.
- Ananthawat–Jonsson, K., Schwarzacher, T., Leitch, A.R., Bennett M.D., Heslop–Harrison, J.S., 1990. Discrimination between closely related Triticeae species using genomic DNA as a probe. Theor Appl Genet 79, 721–728.
- Alexandratos N., Bruinsma J., 2012. World agriculture towards 2030/2050. The 2012 Revision. ESA Working paper No. 12–03, April 2012. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome.
- Ayala–Navarette L., Barima H.S., Singh R.P., Gibson J.M., Mechanicos A.A., Larkin P.J., 2007. Trigenomic chromosomes by recombination of *Thinopyrum intermedium* and *Th. ponticum* translocations in wheat. Theor Appl Genet 116, 63–75.
- Ashraf M., 2010. Inducing drought tolerance in plants: recent advances. Biotechnol Adv 28, 169–183.
- Ballestar E., Wolffe A.P., 2001. Methyl–CpG–binding proteins. Eur. J. Biochem 268, 1–6.
- Bartolomei M.S. and Tilghman S.M., 1997. Genomic imprinting in mammals. Annu Rev Genet 31, 493–525.
- Bastow R., Mylne J.S., Lister C., Lippman Z., Martienssen R.A., Dean C., 2004. Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. Nature 427, 164–167.

- Bengough A.G., Gordon D.C., Al-Menaie H., Ellis R.P., Allan D., Keith R., Thomas W.T.B., Forster B.P., 2004. Gel observation chamber for rapid screening of root traits in cereal seedlings. *Plant Soil* 262, 63–70.
- Berger F., Gaudin V., 2003. Chromatin dynamics and *Arabidopsis* development. *Chromosome Res* 11, 277–304.
- Bernatavichute Y.V., Zhang X., Cokus S., Pellegrini M., Jacobsen S.E., 2008. Genome-wide association of histone H3 lysine nine methylation with CHG methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Plos One* 3, e3156.
- Bertrand C., Bergounioux C., Domenichini S., Delarue M., Zhou D.X., 2003. *Arabidopsis* histone acetyltransferase AtGCN5 regulates the floral meristem activity through the WUSCHEL/AGAMOUS pathway. *J Biol Chem* 278, 28246–28251.
- Bestor T.H., 2000. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 9, 2395–2402.
- Biagetti, M., Vitellozzi, F., Ceoloni, C., 1999. Physical mapping of wheat–*Aegilops longissima* breakpoint in mildew-resistant recombinant lines using FISH with highly repeated and low-copy DNA probes. *Genome* 42, 1013–1019.
- Birchler J.A., Yao H., Chudalayandi S., Vaiman D., Veitia R.A., 2010. Heterosis. *Plant Cell* 22, 2105–2112.
- Bird A.P., 1980. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res* 8, 1499–1504.
- Borlaug, N.E., 1968. Wheat breeding and its impact on world food supply. *Proc. 3rd Int. Wheat Genet Symp*, Canberra, Australia, Aust Acad Sci p 1–36.
- Bournival B., Obanni M., Abad A., Ohm H., Mackenzie S., 1994. Isolation of a new species-specific repetitive sequence from *Thynopyrum elongatum* and its use in studies of alien translocations. *Genome* 37, 97–104.
- Boyes J., Bird A.P., 1991. DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell* 64(6), 1123–1134.
- Boyko A., Kathiria P., Zemp J.F., Yao Y., Pogribny I., Kovalchuk I. 2007. Transgenerational changes in the genome stability and methylation in pathogen infected plants (virus-induced genome instability). *Nucl Acids Res* 35 (5), 1714–1725.
- Buard J., de Massy B., 2007. Playing hide and seek with mammalian meiotic crossover hotspot. *Trends Genet* 23(6), 301–309.
- Buggs R.J.A., 2013. Unravelling gene expression of complex crop genomes. *Heredity* 110, 97–98.

- Bustos D.V., Hasan A.K., Reynolds M.P., Calderini D.F., 2013. Combining high grain number and weight through a DH-population to improve grain yield potential of wheat in high yielding environments. *Field Crops Res* 145, 106–115.
- Cai J., Zhang X., Wang B., Yan M., Qi Y., Kong L., 2011. A genetic analysis of segregation distortion revealed by molecular markers in *Lophopyrum ponticum* chromosome 7E. *J Genet* 90, 373–376.
- Cao X. and Jacobsen S.E., 2002. Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. *PNAS* 99, 16491–16498.
- Cao X., Aufsatz W., Zilberman D., Mette M. F., Huang M. S., Matzke M. and Jacobsen S. E., 2003. Role of the DRM and CMT3 methyltransferases in RNA-directed DNA methylation. *Curr Biol* 13, 2212–2217.
- Calderini D.F., Slafer G.A., 1999. Has yield stability changed with genetic improvement of wheat yield. *Euphytica* 107, 51–59.
- Canè M.A., Maccaferri M., Nazemi G., Salvi S., Francia R., Colalongo C., Tuberosa R., 2014. Association mapping for root architectural traits in durum wheat seedlings as related to agronomic performance. *Mol Breed* 34, 1629–1645.
- Ceoloni C., 1987. Current methods of chromosome engineering in wheat. In: EWAC (European Wheat Aneuploid Cooperative) News 1987, 95–109.
- Ceoloni C., Jauhar P.P., 2006. Chromosome engineering of the durum wheat genome: Strategies and applications of potential breeding value. In: Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Cereals Singh R.J., JauharEds P.P., Press C.R.C., Taylor & Francis p 27–59.
- Ceoloni C., Biagetti M., Ciaffi M., Forte P., Pasquini M., 1996. Wheat chromosome engineering at the 4x level: the potential of different alien gene transfers into durum wheat. *Euphytica* 89, 87–97.
- Ceoloni C., Vitellozzi F., Forte P., Basili F., Biagetti M, Bitti A., Delre V.1998. Wheat chromosome engineering in the light of advanced genetic and cytogenetic marker-mediated approaches. In: Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement, ed. T. Lelley, WUV–Universitätsverlag p 43–53.
- Ceoloni C., Forte P., Gennaro A., Micali S., Carozza R., Bitti A., 2005a. Recent developments in durum wheat chromosome engineering. *Cytogenet. Genome Res* 109, 328–344.
- Ceoloni C., Pasquini M., Simeone R., 2005b. The cytogenetic contribution to the analysis and manipulation of the durum wheat genome. In: Durum wheat breeding: current approaches and

- future strategies, Royo, C., Nachit, M.M., Di Fonzo, N., Araus, J-L., Pfeiffer, W.H. and Slafer, G.A. (eds.). The Haworth Press, New York, USA.
- Ceoloni C., Kuzmanović L., Forte P., Gennaro A., Bitti A., 2014a. Targeted exploitation of gene pools of alien Triticeae species for sustainable and multi-faceted improvement of the durum wheat crop. *Crop Pasture Sci* 65, 96–111.
- Ceoloni C., Kuzmanović L., Gennaro A., Forte P., Giorgi D., Grossi M.R., Bitti A., 2014b. Genomes, chromosomes and genes of perennial Triticeae of the genus *Thinopyrum*: the value of their transfer into wheat for gains in cytogenomic knowledge and ‘precision’ breeding. In: *Advances in Genomics of Plant Genetic Resources*. Tuberosa R, Graner A, Frison E (Eds.), Springer.
- Ceoloni C., Kuzmanović L., Forte P., Virili M.E., Bitti A. 2015. Wheat–Perennial Triticeae Introgressions: Major Achievements and Prospects. In: Molnár-Láng M, Ceoloni C, Doležel J (Eds.): *Alien introgression in wheat – Cytogenetics, Molecular Biology, and Genomics* p 273–313.
- Chan S.W., Henderson I.R., Jacobsen S.E., 2005. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Rev Genet* 6, 351–360.
- Chanvivattana Y., Bishopp A., Schubert D., Stock C., Moon Y.H., 2004. Interaction of Polycomb group proteins controlling flowering in *Arabidopsis*. *Development* 131, 5263–5276.
- Chao S., Zhang W., Akhunov E., Sherman J., Ma Y., Luo M.C., Dubcovsky J., 2009. Analysis of gene-derived SNP marker polymorphism in US wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Mol Breed* 23, 23–33.
- Chen Q., Conner R.L., Laroche A., Thomas J.B., 1998. Genome analysis of *Thinopyrum intermedium* and *Thinopyrum ponticum* using genomic in situ hybridization. *Genome* 41, 580–586.
- Chen Q., 2005. Detection of alien chromatin introgression from *Thinopyrum* into wheat using S genomic DNA probe – a landmark approach for *Thinopyrum* genome research. *Cytogenet Genome Res* 109, 350–359.
- Chen P.Y., Cokus S.J., Pellegrini M., 2010. BS Seeker: precise mapping for bisulfite sequencing. *BMC Bioinformatics* 11, 203.
- Chen Y.C., Milliman E.J., Goulet I., Cote J., Jackson C.A., Vollbracht J.A., Yu M.C., 2010. Protein arginine methylation facilitates cotranscriptional recruitment of pre-mRNA splicing factors. *Mol Cell Biol* 30 (21), 5245–5256.

- Chen Y.L., Palta J.A., Clements J., Buirchell B., Siddique K.H.M., Rengel R., 2014. Root architecture alteration of narrow-leaved lupin and wheat in response to soil compaction. *Field Crops Res* 165, 61-70.
- Chinnusamy V. and Zhu J-K, 2009. Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Curr Opin Plant Biol* 12 (2), 133-139.
- Choi Y., Gehring M., Johnson L., Hannon M., Harada J.J., 2002. DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in *Arabidopsis*. *Cell* 110, 33-42.
- Choi C.S., Sano H., 2007. Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. *Mol Genet Genomics* 277, 589-600.
- Christopher J., Christopher M., Jennings R., Jones S., Fletcher S., Borrell A., Manschadi A.M., Jordan D., Mace E., Hammer G., 2013. QTL for root angle and number in a population developed from bread wheats (*Triticum aestivum*) with contrasting adaptation to water-limited environments. *Theor Appl Genet* 126, 1563-1574.
- Clark L.J., Price A.H., Steele K.A., Whalley W.R., 2008. Evidence from near-isogenic lines that root penetration increases with root diameter and bending stiffness in rice. *Funct Plant Biol* 35, 1163-1171.
- Colmer T.D., Flowers T.J., Munns R., 2006. Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *J Exp Bot* 57, 1059-1078.
- Comb M., Goodman H.M., 1990. CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucleic Acids Res* 18(13), 3975-3982.
- Comai L., Tyagi A.P., Winter K., Holmes-Davis R., Reynolds S.H., Stevens Y., Byers B., 2000. Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Cell* 12, 1551-1568.
- Copenhaver G.P., Nickel K., Kuromori T., 1999. Genetic definition and sequence analysis of *Arabidopsis* centromeres. *Science* 286, 2468-2474.
- Cuadrado A., Vitellozzi F., Jouve N., Ceoloni C., 1997. Fluorescence in situ hybridization with multiple repeated DNA probes applied to the analysis of wheat/rye chromosome pairing. *Theor Appl Genet* 94, 347-355.
- Cubas P., Vincent C., Coen E., 1999. An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature* 401, 157-161.
- Cunliffe V.T., 2003. Memory by modification: the influence of chromatin structure on gene expression during vertebrate development. *Gene* 305, 141-150.

- Curtis T., Halford N.G., 2014. Food security: the challenge of increasing wheat yield and the importance of not compromising food safety. *Ann Appl Biol* 164, 354–372.
- Czyczyło-Mysza I., Tyrka M., Marcińska I., Skrzypek E., Karbarz M., Dziurka M., Hura T., Dziurka K., Quarrie S.A., 2013. Quantitative trait loci for leaf chlorophyll fluorescence parameters, chlorophyll and carotenoid contents in relation to biomass and yield in bread wheat and their chromosome deletion bin assignments. *Mol Breed* 32, 189–210.
- Dai A., 2013. Increasing drought under global warming in observations and models. *Nature Climate Change* 3, 52–58.
- Dasgupta T., Hossain S.A., Meharg A.A., Price A.H., 2004. An arsenate tolerance gene on chromosome 6 of rice. *New Phytol* 163, 45–49.
- Demeulemeester M.A.C., Van Stallen N., De Proft M.P., 1999. Degree of DNA methylation in chicory (*Cichorium intybus* L.): influence of plant age and vernalization. *Plant Science* 142, 101–108.
- Dennis E. S., Bilodeau P., Burn J., Finnegan E. J., Genger R., Helliwell C., Kang B. J., Sheldon C.C. and Peacock W. J., 1998. Methylation controls the low temperature induction of flowering in *Arabidopsis*. *Symp Soc Exp Biol* 51, 97–103.
- Devaiah B.N., Nagarajan V.K., Raghothama K.G., 2007. Phosphate homeostasis and root development in *Arabidopsis* synchronized by the zinc finger transcription factor ZAT6. *Plant Physiol* 145, 147–159.
- De Vita P., Nicosia O.L.D., Nigro F., Platani C., Riefolo C., Di Fonzo N., Cattivelli L., 2007. Breeding progress in morpho-physiological, agronomical and qualitative traits of durum wheat cultivars released in Italy during the 20th century. *Eur J Agron* 26, 39–53.
- De Vita P., Mastrangelo A.M., Matteu L., Mazzucotelli E., Virzì N., Palumbo M., LoStorto M., Rizza F., Cattivelli L., 2010. Genetic improvement effects on yield stability in durum wheat genotypes grown in Italy. *Field Crops Res* 119, 68–77.
- Dewey D.R., 1984. The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial Triticeae. In: Gustafson JP (ed.) *Gene manipulation in plant improvement*. Plenum Publ Corp, New York p 209–279
- Dixon J., Braun, H.J., Kosina, P Crouch J, (eds.). 2009. *Wheat facts and futures*. Mexico, D.F.: CIMMYT.
- Dodig D., 2010. *Wheat breeding for drought resistance*. Serbian genetic society, Belgrade.
- Dong Z. Y., Wang Y. M., Zhang Z. J., Shen Y., Lin X. Y, Ou X. F., Han F. P., Liu B., 2006. Extent and pattern of DNA methylation alteration in rice lines derived from introgressive hybridization of rice and *Zizania latifolia* Griseb. *Theor Appl Genet* 113, 196–205.

- Dorlodot S., Forster B., Price A., Tuberosa R., Draye X., 2007. Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Trends Plant Sci* 12, 474–481.
- Dvorak J. 1975. Meiotic pairing between single chromosomes of diploid *Agropyron elongatum* and decaploid *A. elongatum* in *Triticum aestivum*. *Can J Genet Cytol* 17, 329–336.
- Dyachenko O.V., Zakharchenko N.S., Shevchuk T.V., Bohnert H.J., Cushman J.C., Buryanov Y.I., 2006. Effect of hypermethylation of CCWGG sequence in DNA of *Mesembryanthemum crystallinum* plants on their adaptation to salt stress. *Biochem (Mosc)* 71, 461–465.
- Ehdaie E., Whitkus R.W., Waines J.G., 2003. Root Biomass, water-use efficiency, and performance of wheat-rye translocations of chromosomes 1 and 2 in spring bread wheat 'Pavon'. *Crop Sci* 43, 710–717.
- Eizenga G.C., 1987. Locating the *Agropyron* segment in wheat-*Agropyron* 'transfer No.12'. *Genome* 29, 365–366.
- El-Hafid R., Smith D.H., Karrou M., Samir K., 1998. Morphological attributes associated with early-season drought tolerance in spring durum wheat in a Mediterranean environment. *Euphytica* 101, 273–282.
- Evans, A., 2009. The feeding of the nine billion. Global food security for the 21st century – A Chatham House Report . London, UK: Latimer Trend and Co Ltd, 1–59.
- FAO World Food Situation, 2012a. <http://www.fao.org/worldfoodsituation>.
- FAO World Food Situation, 2012b. <http://reliefweb.int/report/world/crop-prospects-and-food-situation-no-2-june-2012>.
- FAO, 2013. FAO statistical year book 2013. In: World Food and Agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, ISBN 978-92-5-107396-4.
- FAO, 2014. FAOSTAT database available at <http://faostat3.fao.org/home/E>. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Farooq M., Hussain M., Siddique K.H.M., 2014. Drought stress in wheat during flowering and grain-filling periods *Crit Rev Plant Sci* 33, 331–349.
- Farrona S., Hurtado L., Bowman J.L., Reyes J.C., 2004. The *Arabidopsis thaliana* SNF2 homolog AtBRM controls shoot development and flowering. *Development* 131, 4965–4975.
- Feldman M., Sears E.R., 1981. The wild gene resources of wheat. *Sci Am* 244, 98–109.
- Feldman M., 1983. Gene transfer from wild species into cultivated plants. *Genetika*, 15, 145–161.
- Feldman M., 1979. Genetic resources of wild wheats and their use in breeding. In *Monografia di genetica agraria*, vol IV, pp 9–26.

- Feldman M., Levy A.A., 2009. Genome evolution in allopolyploid wheat – a revolutionary reprogramming followed by gradual changes. *J Genet Genomics* 36, 511–518.
- Feldman M., Lupton F.G.H., Miller T.E., 1995. Wheats. In *Evolution of crop plants*, ed. J. Smartt and N.W. Simmonds: Longman Group London 184–192.
- Feldman R., Zagoory-Sharon O., Weisman O., Schneiderman I., Gordon I., Maoz R., Shalev I., Ebstein R.P., 2012. Sensitive parenting is associated with plasma oxytocin and polymorphisms in the OXTR and CD38 genes. *Biol Psychiatry* 72, 175–181.
- Feng, S., Jacobsen, S.E., and Reik, W. (2010). Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science* 330, 622–627.
- Finnegan E. J., Peacock W. J., and Dennis E. S., 1996. Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 8449–8454.
- Finnegan E. J., Genger R. K., Kovac K., Peacock W. J., and Dennis E. S., 1998a. DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 5824–5829.
- Finnegan E. J., Genger R. K., Peacock W. J. and Dennis E. S., 1998b. DNA Methylation in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49, 223–247.
- Finnegan E.J., Peacock W.J., Dennis E.S., 2000. DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Curr Opin Genet Dev* 10, 217–223.
- Finnegan E. J., and Kovac K. A., 2000. Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol Biol* 43, 189–201.
- Fischer R.A., Byerlee D., Edmeades G.O., 2009. Can technology deliver on the yield challenge to 2050. *FAO Expert Meeting on How to Feed the World in 2050*, June 2009, 24–26.
- Fischer R.A., Edmeades G.O., 2010. Breeding and cereal yield progress. *Crop Sci* 50, S85–S98.
- Fischer R.A., 2011. Wheat physiology: a review of recent developments. *Crop Pasture Sci* 62, 95–114.
- Fischer T., Byerlee D., Edmeades G., 2014. Crop Yields and Global Food Security: Will Yield Increase Continue to Feed the World? *ACIAR 2014* 978–1–925133–06–6.
- Fitter A.H., 1991. The ecological significance of root system architecture: an economic approach. *Plant Root Growth: An Ecological Perspective* 229–243.
- Forte P., Kuzmanović L., Gennaro A., Bitti A., Ceoloni C., 2011. Using wild species of *Thinopyrum* genus in breeding wheat resistant to *Fusarium* head blight. *Proc Joint Meet AGI–SIBV–SIGA. Assisi, Italy* ISBN 978–88–904570–2–9.

- Forte P., Virili M.E., Kuzmanović L., Moschetti I., Gennaro A., D'Ovidio R., Ceoloni C., 2014. A novel assembly of *Thinopyrum ponticum* genes into the durum wheat genome: pyramiding Fusarium head blight resistance onto recombinant lines previously engineered for other beneficial traits from the same alien species. *Mol Breed* 34, 1701–1716.
- Foulkes M.J., Slafer G.A., Davies W.J., Berry P.M., Sylvester–Bradley R., Martre P., Calderini D.F., Griffiths S., Reynolds M.P., 2011. Raising yield potential of wheat. III. Optimizing partitioning to grain while maintaining lodging resistance. *J Exp Bot* 62, 469–486.
- Friebe B., Jiang J., Raupp W.J., McIntosh R.A., Gill B.S., 1996. Characterization of wheat alien translocations conferring resistance to disease and pests: current status. *Euphytica* 91, 59–87.
- Fu S., Sun C., Yang M., Fei Y., Tan F., Yan B., Ren Z., Tang Z., 2013. Genetic and epigenetic variation induced by wheat–rye 2R and 5R monosomic addition lines. *Plos One* 8 (1), e54057.
- Gadaleta A., Giancaspro A., Giove S.L., Zacheo S., Blanco A., 2009. Genetic and physical mapping of new EST–derived SSRs on the A and B chromosomes of wheat. *Theor App Genet* 188, 1015–1025.
- Gaeta R.T., Pires J.C., Iniguez–Luy F., Leon E., Osborn T.C., 2007. Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* and their effect on gene expression and phenotype. *Plant Cell* 19, 3403–3417.
- Gale M.D., Miller T.E., 1987. The introduction of alien genetic variation into wheat. In: *Wheat Breeding – Its Scientific Basis* ed. F.G.H. Lupton, Chapman and Hall, London pp 173–210.
- Gaju O., Reynolds M.P., Sparkes D.L., Foulkes M.J., 2009. Relationships between large–spike phenotype, grain number, and yield potential in spring wheat. *Crop Sci* 49, 961–973.
- Gennaro A., Forte P., Carozza R., SavoSardaro M.L., Ferri D., Bitti A., Borrelli G.M., D'Egidio M.G., Ceoloni C., 2007. Pyramiding different alien chromosome segments in durum wheat: feasibility and breeding potential. *Isr J Plant Sci* 55, 267–276.
- Gennaro A., Kuzmanović L., Forte P., Lattanzi G., Grossi R., Bitti A., Giorgi D., Quarrie S.A., Ceoloni C., 2010. Genetic and cytogenetic maps of durum wheat–*Thinopyrum ponticum* recombinant chromosomes: a tool to finely describe triticeae 7L arms and to target alien traits. *Proc. 54th SIGA, Matera, Italy – 27/30 September, 2010*, ISBN 978–88–904570–0–5.
- Gennaro A., Forte P., Panichi D., Lafiandra D., Pagnotta M.A., D'Egidio M.G., Ceoloni C., 2012. Stacking small segments of the 1D chromosome of bread wheat containing major gluten quality genes into durum wheat: transfer strategy and breeding prospects. *Mol Breed* 30, 149–167.

- Giorgi B. 1983. Origin, behaviour and utilization of a *Ph1* mutant of durum wheat, *Triticum turgidum* (L.) var. durum. In: Sakamoto, S. (ed.) Proc 6th Int Wheat Genet Symp Kyoto Japan p 1033–1040.
- Giuliani S., Sanguineti M.C., Tuberosa R., Bellotti M., Salvi S., Landi P., 2005. Root-ABA1, a major constitutive QTL, affects maize root architecture and leaf ABA concentration at different water regimes. *J Exp Bot* 56, 3061–3070.
- Goldberg R.B., Beals T.P., Sanders P.M. 1993. Anther development: basic principles and practical applications. *Plant Cell* 5, 1217–1229.
- Gong Z., Morales-Ruiz T., Ariza R.R., Roldan-Arjona T., David L. and Zhu J.K., 2002. ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell* 111, 803–814.
- Grando S., Ceccarelli S., 1995. Seminal root morphology and coleoptile length in wild (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) and cultivated (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) barley. *Euphytica* 86, 73–80.
- Grewal S.I., Moazed D., 2003. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* 301, 798–802.
- Groenewald J.Z., Fourie M., Marais A.S., Marais G.F., 2005. Extension and use of a physical map of the *Thinopyrum*-derived *Lr19* translocation. *Theor Appl Genet* 112, 131–138.
- Grossi M.R., Gennaro A., Forte P., Bitti A., Ceoloni C., 2009. Segregation distortion following introgression of *Thinopyrum ponticum* DNA into durum wheat. Proc 53rd SIGA. Torino, Italia, http://www.geneticagraria.it/attachment/SIGA_2009/7_20.pdf.
- Grossi M.R., 2010. Trasferimento di geni da specie selvatiche a frumento tramite ingegneria cromosomica: potenzialità di questa strategia ed eventuali ostacoli. Tesi di dottorato. Università degli studi della Tuscia, Viterbo, Italia.
- Groszmann M., Greaves I.K., Albertyn Z.I., Scofield G.N., Peacock W.J., Dennis E.S. 2011. Changes in 24-nt siRNA levels in *Arabidopsis* hybrids suggest an epigenetic contribution to hybrid vigor. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 2617–2622.
- Guimil S. and Dunand C., 2006. Patterning of *Arabidopsis* epidermal cells: epigenetic factors regulate the complex epidermal cell fate pathway. *Trends Plant Sci.* 11, 601–609.
- Habu Y., Tetsuji K. and Paszkowski J., 2001. Epigenetic developmental mechanisms in plants: molecules and targets of plant epigenetic regulation. *Curr Opin Genet Dev* 11, 215–220.
- Habu Y., Ando T., Ito S., Nagaki K., Kishimoto N., Taguchi-Shiobara F., Numa H., Yamaguchi K., Shigenobu S., Murata M., Meshi T., Yano M., 2015. Epigenomic modification in rice controls meiotic recombination and segregation distortion. *Mol Breeding* 35, 103.

- Haig D., 2004. The (Dual) Origin of Epigenetics. Cold Spring HARB SYM, vol LXIX.
- Hammer G., Dong Z., Mclean G., Doherty A., Messina C., Schussler J., Zinselmeier C., Paszkiewicz S., Cooper M., 2009. Can changes in canopy and/or root system architecture explain historical maize yield trends in the U.S. Corn Belt Crop Sci 49, 299–312.
- Harb A., Krishnan A., Ambavaram M.M.R., Pereira A., 2010. Molecular and physiological analysis of drought stress in *Arabidopsis* reveals early responses leading to acclimation in plant growth. Plant Physiol 154, 1254–1271.
- Harushima Y., Kurata N., Yano M., Nagamura Y., Sasaki T., Minobe Y., Nakagahra M., 1996. Detection of segregation distortions in an indica-japonica rice cross using a high-resolution molecular map. Theor Appl Genet 92, 145–150.
- Hawkesford M.J., Araus J.-L., Park R., Calderini D., Miralles D., Shen T., Zhang J., Parry M.A.J., 2013. Prospects of doubling global wheat yields. Food Energy Secur 2, 34–48.
- He X.J., Chen T., Zhu J.K., 2011. Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. Cell Res 21, 442–465.
- Henikoff S. and Comai L., 1998. A DNA Methyltransferase Homolog With a Chromodomain Exists in Multiple Polymorphic Forms in *Arabidopsis*. Genetics 149, 307–318.
- Henry A., Gowda V.R.P., Torres R.O., McNally K.L., Serraj R., 2011. Variation in root system architecture and drought response in rice (*Oryza sativa*): phenotyping of the *Oryza* SNP panel in rainfed lowland fields. Field Crop Res 120, 205–214.
- Hillel D. and Rosenzweig C. (eds) 2012. Handbook of climate change and agroecosystems. Global and regional aspects and implications. ICP Series on Climate Change Impacts, Adaptation, and Mitigation. Imperial College Press: London.
- Heller H., Kammer C., Wilgenbus P., Doerfler W., 1995. The chromosomal insertion of foreign (adenovirus type 12, plasmid of bacteriophage) DNA is associated with enhanced methylation of cellular DNA segments. Proc Natl Acad Sci USA 92, 5515–5519.
- Hofmann N.R., 2012. A global view of hybrid vigor: DNA methylation, small RNAs, and gene expression. Plant Cell 24, 841.
- Hohn T., Corsten S., Rieke S., Müller M., Rothnie H., 1996. Methylation of coding regions alone inhibits gene expression in plant protoplasts. Proc Natl Acad Sci USA 93, 8334–8339.
- Hoisington D., Khairallah M., Reeves T., Ribaut J.M., Skovmand B., Taba S., Warburton M., 1999. Plant genetic resources: what they can contribute toward increased crop productivity? Proc Natl Acad Sci USA 96, 5937–5943.
- Horii H., Nemoto K., Miyamoto N., Harada J., 2005. Quantitative trait loci for adventitious and lateral roots in rice. Plant Breed 125, 198–200.

- Hsieh T.F., Fischer R., 2005. Biology of chromatin dynamics. *Annu Rev Plant Biol* 56, 327–351.
- Hurst L.D., 1993. A model for the mechanism of transmission ratio distortion and for associated hybrid sterility. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 253, 83–91.
- Ito K., Tanakamaru K., Morita S., Abe J., 2006. Lateral root development, including responses to soil drying, of maize (*Zea mays*) and wheat (*Triticum aestivum*) seminal roots. *Physiol Plant* 127, 260–267.
- Jablonka E. and Lamb M.J., 1989. The inheritance of acquired epigenetics variations. *J Theoret Biol* 139, 69–83.
- Jackson J.P., Lindroth A.M., Cao X., Jacobsen S., 2002. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* 416, 556–60.
- Jeddeloh J.A., Bender J., Richards E.J., 1998. The DNA methylation locus DDM1 is required for maintenance of gene silencing in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 12, 1714–25.
- Jiang J., Gill B.S., 2006. Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome* 49, 1057–68.
- Jin H., Hu W., Wei Z., Wan L., Li G., Tan G., Zhu L., He G., 2008. Alterations in cytosine methylation and species-specific transcription induced by interspecific hybridization between *Oryza sativa* and *O. officinalis*. *Theor Appl Genet* 117, 1271–1279.
- John H.A., Birnstiel M.L., Jones K.W., 1969. RNA–DNA Hybrids at the Cytological Level. *Nature* 223, 582–587.
- Joppa L.R., Klindworth D.L., Hareland G.A., 1998. Transfer of high molecular weight glutenins from spring wheat to durum wheat. In *Proc 9th Int Wheat Genet Symp*, vol. 1, ed Slinkard A.E., Saskatoon, Saskatchewan, Canada: Univ Extention Press Univ of Saskatchewan p 257–260.
- Jung J.K.H. and McCouch S., 2013. Getting to the roots of it: genetic and hormonal control of root architecture. *Front. Plant Sci.*, 18 June 2013 | <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2013.00186>.
- Kakutani T., Jeddeloh J.A., Flowers S.K., Munakata K., Richards E.J., 1996. Developmental abnormalities and epimutations associated with DNA hypomethylation mutations. *Proc Natl Acad Sci* 93, 12406–12411.
- Kankel M.W., Ramsey D.E., Stokes T.L., Flowers S.K., Haag J.R., Jeddeloh J.A., Riddle N.C., Verbsky M.L. and Richards E.J., 2003. *Arabidopsis* MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics* 163, 1109–1122.
- Kano, M., Inukai, Y., Kitano, H. and Yamauchi, A., 2011. Rootplasticity as the key root trait for adaptation to various intensities of drought stress water stresses in rice. *Plant Soil* 342, 117–128.

- Kapoor A., Agius F., Zhu J-K., 2005. Preventing transcriptional gene silencing by active DNA demethylation. *FEBS Letters* 579, 5889–5898.
- Kara Y., Martin A., Souyris I., Rekika D., Monneveux P., 2000. Root characteristics in durum wheat (*T. turgidum* conv. *durum*) and some wild Triticeae species. Genetic variation and relationship with plant architecture. *Cereal Res Commun* 28, 247–254.
- Kashiwagi J., Krishnamurthy L., Upadhyaya H.D., Krishna H., Chandra S., Vadez V., Serraj R., 2005. Genetic variability of drought-avoidance root traits in the mini-core germplasm collection of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Euphytica* 146, 213–222.
- Katz A., Oliva M., Mosquna A., Hakim O., Ohad N., 2004. FIE and CURLY LEAF polycomb proteins interact in the regulation of homeobox gene expression during sporophyte development. *Plant J* 37, 707–719.
- Kell D.B., 2011. Breeding crop plants with deep roots: their role in sustainable carbon, nutrient and water sequestration. *Ann bot* 108, 407–418.
- Klose R.J., Bird A.P., 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 31, 89–97.
- Kibirige-Sebunya I., Knott D.R., 1983. Transfer of stem rust resistance from an *Agropyron* chromosome having a gametocidal effect. *Can J Genet Cytol* 25, 215–221.
- Kihara H., 1919. Über Cytologische Studien bei einige Getreidearten I. Spezies-Bastarde des Weizens und Weizenroggen-Bastarde. *Bot Mag* 32, 17–38.
- Kim N.S., Armstrong K., Knott D.R., 1993. Molecular detection of *Lophopyrum* chromatin in wheat-*Lophopyrum* recombinants and their use in physical mapping of chromosome 7D. *Theor Appl Genet* 85, 561–567.
- Kimurto P.K., Kinyua M.G., Birechl R., Korir P.C., Njoka E.M., Njau P.N., 2005. Root and shoot characteristics as selection criteria for drought tolerance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) at seedling stage under tropical environment. *Discov Innovat* 17, 74–84.
- Knott D.R., 1961. The inheritance of rust resistance VI. The transfer of stem rust resistance from *Agropyron elongatum* to common wheat. *Can J Plant Sci* 41, 109–123.
- Knott D.R., 1971. The transfer of genes for disease resistance from alien species to wheat by induced translocations. In: *Mutation breeding for disease resistance*. IAEA, Vienna 67–77.
- Knott D.R., Dvořák J., Nanda J.S., 1977. The transfer to wheat and homoeology of an *Agropyron elongatum* chromosome carrying resistance to stem rust. *Can J Genet Cytol* 19, 75–79.
- Knott D.R., 1980. Mutation of a gene for yellow pigment linked to Lr19 in wheat. *Can J Genet Cytol* 22, 651–654.

- Koebernick N., Huber K., Kerkhofs E., Vanderborght J., Javaux M., Vereecken H., 2015. Unraveling the hydrodynamics of split root water uptake experiments using CT scanned root architectures and three dimensional flow simulations. *Front Plant Sci* 6, 370.
- Kong L., Anderson J.M., Ohm H.W., 2008. Segregation distortion in common wheat of a segment of *Thinopyrum intermedium* chromosome 7E carrying Bdv3 and development of a Bdv3 marker. *Plant Breed* 128, 591–597.
- Kovarik A., Koukalova B., Fajkus J., Siroky J., 1997. Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress. *FEBS* 414, 289–92.
- Kusano A., Staer C., Gametzky B., 2001. Nuclear mislocalization of enzymatically active RanGAP causes segregation distortion in *Drosophila*. *Dev Cell* 104: 321–324.
- Kusano A., Staber C., Edwin Chan H.Y., Ganetzky B., 2003. Closing the (Ran)GAP on segregation distortion in *Drosophila*. *Bio Essays* 25, 108–115.
- Kuzmanović L., 2011. Cytogenetic, physiological and agronomic characterization of wheat–*Thinopyrum ponticum* recombinant lines carrying relevant breeding traits. PhD Thesis, Department of Agriculture, Forestry, Nature and Energy (DAFNE), University of Tuscia, Viterbo, Italy.
- Kuzmanović, L., Gennaro, A., Benedettelli, S., Dodd, I.C., Quarrie, S.A., Ceolon, i.C., 2014. Structural–functional dissection and characterization of yield–contributing traits originating from a group 7 chromosome of the wheatgrass species *Thinopyrum ponticum* after transfer into durum wheat. *J Exp Bot* 65, 509–525.
- Kuzmanović L., Ruggeri R., Virili M.E., Rossini F., Ceoloni C., 2016. Effects of *Thinopyrum ponticum* chromosome segments transferred into durum wheat on yield components and related morpho–physiological traits in Mediterranean rain–fed conditions. *Field Crops Research* 186, 86–98.
- Labra M., Vannini C., Sale F., Bracale M., 2002. Methylation change in specific sequences in response to water deficit. *Plant Biosyst* 136, 202.
- Labra M., Grassi F., Imazio S., Di Fabio T., Citterio S., Sgorbati S., and Agradi E., 2004. Genetic and DNA–methylation changes induced by potassium dichromate in *Brassica napus* L. *Chemosphere* 54, 1049–1058.
- Landi P., Sanguineti M.C., Darrah L., Giuliani M., Salvi S., Tuberosa R., 2002. Detection of QTLs for vertical rootpulling resistance in maize and overlaps with QTLs for root traits in hydroponics and for grain yield at different water regimes. *Maydica* 47, 233–243.

- Landi P., Sanguineti M.C., Salvi S., Giuliani S., Bellotti M., Maccaferri M, Conti S., Tuberosa R., 2005. Validation and characterization of a major QTL affecting leaf ABA concentration in maize. *Mol Breed* 15, 291–303.
- Le Lamer O., Rousselin X., 2011. The durum wheat market—Worldwide, European Union, France. *France Agri Mer*, Jan 2011, ISSN no. 1779–353X, p 1–44.
- Leitch A.R., Schwarzacher T., Jackson D., Leitch I.J., 1994. In situ Hybridization: a practical guide. Royal Microscop. Soc., Microscopy Handbooks 27, BIOS Scient Publ Ltd Oxford UK.
- Levy A.A., Feldman M., 2004. Genetic and epigenetic reprogramming of the wheat genome upon allopolyploidization. *Biol J Linn Soc* 82, 607–613.
- Li S., Li S.M., Sun J.H., Zhou L.L., Bao X.G., Zhang H.G., Zhang F.S., 2007. Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-deficient soils. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 11192–11196.
- Li Z., Li B., Tong Y., 2008. The contribution of distant hybridization with decaploid *Agropyron elongatum* to wheat improvement in China. *J Genet Genom* 35, 451–456.
- Li H., Wang X., 2009. *Thinopyrum ponticum* and *Thinopyrum intermedium*: the promising source of resistance to fungal and viral diseases of wheat. *J Genet Genom* 36, 557–565.
- Li S., Zhang Y., Deng K., Peng J., Zeng X., Zhang H., Ren Z., 2013a. Analysis of DNA methylation polymorphism in a set of stable chromosome translocation lines. *Mol Breed* 32, 165–176.
- Li S., Garrett-Bakelman F.E., Akalin A., Zumbo P., Levine R., To B.L., Lewis I.D., Brown A.L., D’Andrea R.J., Melnick A., 2013b. An optimized algorithm for detecting and annotating regional differential methylation. *BMC Bioinformatics* 14 (5), 10.
- Liao M.T., Palta J.A., Fillery I.R.P., 2006. Root characteristics of vigorous wheat improve early nitrogen uptake. *Aust J Agr Res* 57, 1097–1107.
- Lindroth A.M., Cao X., Jackson J.P., Zilberman D., McCallum C.M., Henikoff S., Jacobsen S.E., 2001. Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science* 292, 2077–2080.
- Lister R., O’Malley R.C., Tonti-Filippini J., Gregory B.D., Berry C.C., Millar A.H., Ecker J.R., 2008. Highly integrated singlebase resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis*. *Cell* 133, 523–536.
- Liu B., Piao H.M., Zhao F.S., Zhao J.H., Zhao R., 1999. Production and molecular characterization of rice lines with introgressed traits from a wild species of *Zizania latifolia* Griseb. *J Genet Breed* 53, 279–284.

- Liu Z., Wang Y., Shen Y., Guo W., Hao S., Liu B., 2004. Extensive alterations in DNA methylation and transcription in rice caused by introgression from *Zizania latifolia*. *Plant Mol Biol* 54, 571–582.
- Liu S., Gao X., Xia G., 2008. Characterizing HMW–GS alleles of decaploid *Agropyron elongatum* in relation to evolution and wheat breeding. *Theor Appl Genet* 116, 325–334.
- Løes A.K., Gahoonia T.S., 2004. Genetic variation in specific root length in Scandinavian wheat and barley accessions. *Euphytica* 137, 243–249.
- Lopes, M.S., Reynolds, M.P., 2012. Stay–green in spring wheat can be determined by spectral reflectance measurements (normalized difference vegetation index) independently from phenology. *J Exp Bot* 63, 3789–3798.
- Lorincz M.C., Dickerson D.R., Schmitt M., Groudine M., 2004. Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1068–1075.
- Löve A., 1982. Generic evolution of the wheat grasses. *Biol Zentralbl* 101, 199–212.
- Luff B., Pawlowski L., Bender J., 1999. An inverted repeat triggers cytosine methylation of identical sequences in *Arabidopsis*. *Mol Cell* 3, 505–511.
- Lukaszewski A.J., 1995. Physical distribution of translocation breakpoints in homoeologous recombinants induced by the absence of the *Ph1* gene in wheat and triticales. *Theor Appl Genet* 90, 714–719.
- Lukaszewski A.J., 2015. Introgressions Between Wheat and Rye. In: Molnár–Láng M, Ceoloni C, Doležel J (Eds.): *Alien introgression in wheat – Cytogenetics, Molecular Biology, and Genomics* p 163–189.
- Lynch J.P., 2013. Steep, cheap and deep: an ideotype to optimize water and N acquisition by maize root systems. *Ann bot* 112, 347–357.
- Lyttle T.W., 1991. Segregation distorters. *Annu Rev Genet* 25, 511–557.
- MacMillan K., Emrich K., Piepho H.P., Mullins C.E., Price A.H., 2006. Assessing the importance of genotype x environment interaction for root traits in rice using a mapping population II: conventional QTL analysis. *Theor Appl Genet* 113, 953–964.
- Madlung A., Masuelli R.W., Watson B., Reynolds S.H., Davison J., Comai L., 2002. Remodelling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in syntetic *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Phys* 129, 733–746.
- Magalhaes J.V., Garvin D.F., Wang Y., Sorrells M.E., Klein P.E., Schaffert R.E., Li L., Kochian L.V., 2004. Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the Poaceae. *Genetics* 167, 1905–1914.

- Manning K., Tör M., Poole M., Hong Y., Thompson A.J., King J.G., Giovannoni J.J., Seymour G.B., 2006. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nat Genet* 38, 948–952.
- Manschadi A.M., Christopher J., deVoil P., Hammer G., 2006. The role of root architectural traits in adaptation of wheat to water-limited environments. *Funct Plant Biol* 33, 823–837.
- Manschadi A.M., Hammer G.L., Christopher J.T., deVoil P., 2008. Genotypic variation in seedling root architectural traits and implications for drought adaptation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Soil* 303, 115–129.
- Marais G.F., Marais A.S., Groenewald J.Z., 2001. Evaluation and reduction of *Lr19–149*, a recombined form of the *Lr19* translocation of wheat. *Euphytica* 121, 289–295.
- McCaig T.N., Clarke J.M., 1995. Breeding durum wheat in western Canada: historical trends in yield and related variables. *Can J Plant Sci* 75, 55–60.
- McCouch S., 2004. Diversifying selection in plant breeding. *PLoS Biol* 2, 1507–1512.
- McFadden E.S., Sears E.R., 1947. The genomic approach in radical wheat breeding. *Journal of American Society of Agronomy* 39, 1011–1026.
- McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F., 1995. Wheat rusts. An atlas of resistance genes. CSIRO Australia, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, the Netherlands.
- Meister R., Rajani M.S., Ruzicka D., Schachtman D.P., 2014. Challenges of modifying root traits in crops for agriculture. *Trends Plant Sci* 19, 779–788.
- Melquist S., Luff B., Bender J., 1999. *Arabidopsis* PAI gene arrangements, cytosine methylation and expression. *Genetics* 153, 401–413.
- Mettin D., Bluthner W.D., Schlegel G., 1973. Additional evidence on spontaneous 1B/1R wheat-rye substitutions and translocations. *Proc of 4th Int Wheat Genet Sym*, Columbia, Missouri (Eds ER Sears, LMS Sears) 179–184.
- Molinier J., Ries G., Zipfel C., Hohn B., 2006. Transgeneration memory of stress in plants. *Nature* 442, 1046–1049.
- Molnár-Láng M., Linc G., 2015. Wheat-Barley Hybrids and Introgression Lines. Molnár-Láng M, Ceoloni C, Doležel J (Eds.): Alien introgression in wheat – Cytogenetics, Molecular Biology, and Genomics p 315–345.
- Monneveux P., Reynolds M.P., González Aguilar J., Singh R.P., 2003. Effects of the 7DL.7Ag translocation from *Lophopyrum elongatum* on wheat yield and related morphophysiological traits under different environments. *Plant Breed* 122, 379–384.
- Morgan H.D., Suntherland H.G., Martin D.I., Whitelaw E., 1999. Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat. Genet* 23, 314–318.

- Muller K., Heller H., Doerfler W., 2001. Foreign DNA integration. Genome-wide perturbations of methylation and transcription in the recipient genomes. *J Biol Chem* 276, 14271–14278.
- Mullis K.B., Faloona F.A., Scharf S.J., Saiki R.K., Horn G.T., Erlich H.A., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51, 263–273.
- Miralles D.J., Resnicoff E., Carretero R., 2007. Yield improvement associated with *Lr19* translocation in wheat. In: Spiertz, J.H.J. Struik, P.C. van Laar H.H. (Eds.), *Scale and Complexity in Plant Systems Research: Gene–Plant–Crop Relations*. Springer p 171–178.
- Miralles, D.J., Slafer, G.A., 2007. Sink limitations to yield in wheat: how could it be reduced? *J Agr Sci* 145, 139–149.
- Nakao M., 2001. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene* 278, 25–31.
- Ng H.H., Bird A., 1999. DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev* 9, 158–163.
- Ochoa I.E., Blair M.W., Lynch J.P., 2006. QTL analysis of adventitious root formation in common bean under contrasting phosphorus availability. *Crop Sci* 46, 1609–1621.
- Ortiz R, Sayre KD, Govaerts B, Gupta R, Subbarao GV, Ban T, Hodson D, Dixon JM, Ortiz-Monasterio JJ, Reynolds M. 2008. Climate change: can wheat beat the heat? *Agric Ecosyst Environ* 126, 46–58.
- Palta J.A., Chen X., Milroy S.P., Rebetzke G.J., Fernanda Dreccer M., Watt M., 2011. Large root systems: are they useful in adapting wheat to dry environments. *Funct Plant Biol* 38, 347–354.
- Panning B. and Jaenisch R., 1996. DNA hypomethylations can activate *Xist* expression and silence X-linked genes. *Genes Dev* 10 (16), 1991–2002.
- Papa C.M., Springer N.M., Muszynski M.G., Meeley R. and Kaeppler S.M., 2001. Maize Chromomethylase *Zea methyltransferase2* Is Required for CpNpG Methylation. *The Plant Cell* 13, 1919–1928.
- Parry M.A.J., Reynolds M., Salvucci M.E., Raines C., Andralojc P.J., Zhu X.-G., Price G.D., Condon A.G., Furbank R.T., 2011. Raising yield potential of wheat. II. Increasing photosynthetic capacity and efficiency. *J Exp Bot* 62, 453–467.
- Passioura J.B., 1972. The effect of root geometry on the yield of wheat growing on stored water. *Aust J Agric Res* 23, 745–752.
- Plaschke J., Borner A., Xie D.X., Koebner R.M.D., Schlegel R., Gale M.D., 1993. RFLP mapping of genes affecting plant height and growth habit in rye. *Theor Appl Genet* 85, 1049–1054.

- Pedro A., Savin R., Habash D.Z., Slafer G.A., 2011. Physiological attributes associated with yield and stability in selected lines of a durum wheat population. *Euphytica* 180, 195–208.
- Petrarulo M., Marone D., Ferragonio P., Cattivelli L., Rubiales D., De Vita P., Mastrangelo A.M., 2015. Genetic analysis of root morphological traits in wheat. *Mol Genet Genomics* 290, 785–806.
- Pfeiffer W.H., Sayre K.D., Mergoum M., 1996. Enhancing genetic grain yield potential in durum wheat and triticale. In: Reynolds, M.P., Rajaram, S., McNab, A. (Eds.), *Increasing Yield Potential in Wheat: Breaking the Barriers*. CIMMYT Mexico p 90–100.
- Philip J. White P.J., George T.S., Gregory P.J., Bengough A.G., Hallett P.D., McKenzie B.M., 2013. Matching roots to their environment. *Ann Bot* 112, 207–222.
- Pinto R.S., Reynolds M.P., 2015. Common genetic basis for canopy temperature depression under heat and drought stress associated with optimized root distribution in bread wheat. *Theor Appl Genet* DOI 10.1007/s00122–015–2453–9.
- Placido D.F., Campbell M.T., Folsom J.J., Cui X., Kruger G.R., Baenziger P.S., Walia H., 2013. Introgression of novel traits from a wild wheat relative improves drought adaptation in wheat. *Plant Physiol* 161, 1806–1819.
- Prasch and Sonnewald, 2013. C.M. Prasch, U. Sonnewald Simultaneous application of heat, drought, and virus to *Arabidopsis* plants reveals significant shifts in signaling networks. *Plant Physiol* 162 (2013), 1849–1866.
- Price A.H., Steele K.A., Gorham J., Bridges J.M., Moore B.J., Evans J.L., Richardson P., Jones R.G.W., 2002. Upland rice grown in soil-filled chambers and exposed to contrasting water-deficit regimes. I. Root distribution, water use and plant water status. *Field Crops Res* 76, 11–24.
- Prins R., Marais G.F., 1999. A genetic study of the gametocidal effect of the *Lr19* translocation of common wheat. *SAJ Plant Soil* 16, 10–14.
- Qi L., Friebe B., Zhang P., Gill B.S., 2007. Homoeologous recombination, chromosome engineering and crop improvement. *Chromos Res* 15, 3–19.
- Quarrie S.A., Steed A., Calestani C., Semikhodkii A., Lebreton C., Chinoy C., Steele N., Pljevljakusić, Waterman E., Weyen J., Shondelmaier J., Habash D.Z., Farmer P., Saker L., Clarkson D.T., Abugalieva A., Yessimbekova M., Turuspekov Y., Abugalieva S., Tuberosa R., Sanguineti M.C., Hollington P.A., Aragues R., Royo A., Dodig D., 2005. A high-density genetic map of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) from the cross Chinese Spring x SQ1 and its use to compare QTLs for grain yield across a range of environments. *Theor Appl Genet* 110, 865–880.

- Quarrie S.A., Pekic-Quarrie S., Radosevic R., Rancic D., Kaminska A., Barnes J.D., Leverington M., Ceoloni C., Dodig D., 2006. Dissecting a wheat QTL for yield present in a range of environments: from the QTL to candidate genes. *J Exp Botany* 57, 2627–2637.
- Rahnama A., Munns R., Poustini K., Watt M., 2011. A screening method to identify genetic variation in root growth response to a salinity gradient. *J Exp Bot* 62(1), 69–77.
- Rauh B., Basten C., Buckler E., 2002. Quantitative trait loci analysis of growth response to varying nitrogen sources in *Arabidopsis thaliana*. *Theor Appl Genet* 104, 743–750.
- Remus R., Kammer C., Heller H., Schemitz B., Schell G., Doerfler W., 1999. Insertion of foreign DNA into an established mammalian genome can alter the methylation of cellular DNA sequences. *J Virol* 73, 1010–1022.
- Ren Z.L., 1991. Introduction of rye chromatin into wheat and its breeding behavior. *Sci Agric Sin* 24(3), 18–25.
- Ren Z.L., 1993. Effect of wheat genetic background on the expression of the rye gene *Lr26* for resistance to leaf rust in wheat. *Acta Genet Sin* 20(4), 312–316.
- Ren Z.L., Zhang H.Q., 1997. Induction of small-segment-translocation between wheat and rye chromosomes. *Sci China (series C)* 27(3), 258–263.
- Ren T.H., Chen F., Zhang H.Q., Yan B., Ren Z.L., 2011. Application of 1RS.1BL translocation in the breeding of “Chuangnong” series wheat cultivars. *J Triticeae. Crops* 31(3), 430–436.
- Richards R.A., Passioura J.B., 1981a. Seminal root morphology and water use of wheat. I. Environmental effects. *Crop Science* 21, 240–252.
- Richards R.A., Passioura J.B., 1981b. Seminal root morphology and water use of wheat. II. Genetic variation. *Crop Science* 21, 253–255.
- Richards E.J., 2006. Inherited epigenetic variation—revisiting soft inheritance. *Nat Rev Genet* 7, 395–401.
- Rieseberg L.H., Raymond O., Rosenthal D.M., Lai Z., Livingstone K., Nakazato T., Durphy J.L., Schwarzbach A.E., Donovan L.A. and Lexer C., 2003. Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science* 301, 1211–1216.
- Riley R., Chapman V., 1958. Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. *Nature* 182, 713–715.
- Robertson B.M., Waines J.G., Gill B.S., 1979. Genetic variability for seedling root number in wild and domesticated wheats. *Crop Science* 19, 843–847.
- Roder M.S., Plaschke J., König S.U., Börner A., Sorrels M.E., Tanksley S.D., Ganai M.W., 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol General Genet* 246, 327–333.

- Royo C., Alvaro F., Martos V., Ramdani A., Isidro J., Villegas D., García del Moral L.F., 2007. Genetic changes in durum wheat yield components and associated traits in Italian and Spanish varieties during the 20th century. *Euphytica* 155, 259–270.
- Royo C., Martos V., Ramdani A., Villegas D., Rharrabti Y., García del Moral L.F., 2008. Changes in yield and carbon isotope discrimination of Italian and Spanish durum wheat during the 20th century. *Agron J* 100, 352–360.
- Reynolds M.P., Calderini D.F., Condon A.G., Rajaram S., 2001. Physiological basis of yield gains in wheat associated with the *Lr19* translocation from *Agropyron elongatum*. *Euph* 119, 137–141.
- Reynolds M.P., Pelegrineschi A., Skovmand B., 2005. Sink–limitation to yield and biomass: a summary of some investigations in spring yield. *Ann App Biol* 146, 39–49.
- Reynolds M., Drecced F., Trethowan R., 2007. Drought adaptive traits derived from wheat wild relatives and landraces. *J Exp Bot* 58, 177–186.
- Reynolds M., Foulkes M.J., Slafer G.A., Berry P., Parry M.A.J., Snape J.W., Angus W.J., 2009. Raising yield potential in wheat. *J Exp Bot* 60, 1899–1918.
- Reymond M., Svistoonoff S., Loudet O., Nussaume L., Desnos T., 2006. Identification of QTL controlling root growth response to phosphate starvation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Env* 29, 115–125.
- Riddle N.C., Richards E.J., 2002. The control of natural variation in cytosine methylation in *Arabidopsis*. *Genetics* 162, 355–363.
- Rosegrant M.W., Huang J., Sinha A., Ahammad H., Ringler C., Zhu T., 2008. Exploring alternative futures for agricultural knowledge, science and technology (AKST). ACIAR
- Ruta N., Stamp P., Liedgens M., Fracheboud Y., Hund A., 2009. Collocation of QTLs for seedling traits and yield components of tropical maize under limited water availability. *Crop Sci* 50, 1385–1392.
- Ruta N., Liedgens M., Fracheboud Y., Stamp P., Hund A., 2010. QTLs for the elongation of axile and lateral roots of maize in response to low water potential. *Theor Appl Genet* 120, 621–631.
- Salmon A., Ainouche M.L., Wendel J.F., 2005. Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Mol Ecol* 14, 1163–1175.
- Salvi S., Giuliani S., Ricciolini C., Carraro N., Maccaferri M., Presteri T., Ouzunova M., Tuberosa R., 2016. Two major quantitative trait loci controlling the number of seminal roots in maize co-map with the root developmental genes *rtcs* and *rum1*. *J Exp Bot* 67(4), 1149–1159.

- Sanguineti M.C., Li S., Maccaferri M., Corneti S., Rotondo F., Chiari T. and Tuberosa R., 2001. Genetic dissection of seminal root architecture in elite durum wheat germplasm. *Ann Appl Biol* 151, 291–305.
- Sax K., 1922. Sterility in wheat hybrids II. Chromosome behaviour in partially sterile hybrids *Genetics* 7, 513–522.
- Saze H., Scheid O.M. and Paszkowski J., 2003. Maintenance of CpG methylation is essential for epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Nat Genet* 34, 65–69.
- Scascitelli M., Cognet M., Adams K.L., 2010. An interspecific plant hybrid shows novel changes in parental splice forms of genes for splicing factors. *Genetics* 184, 975–983.
- Scheid O.M., Afsar K., Paszkowski J., 2003. Formation of stable epialleles and their paramutation-like interaction in tetraploid *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* 34, 450–454.
- Schumacher A., Koetsier P.A., Hertz J., Doerfler W., 2000. Epigenetic and genotype-specific effects on the stability of *de novo* imposed methylation patterns in transgenic mice. *J Biol Chem* 275, 37915–37921.
- Scoles G.J., Kibirge–Sebunya I.N., 1983. Preferential abortion of gametes in wheat induced by an *Agropyron* chromosome. *Can J Genet Cytol* 25, 1–6.
- Scott R.J., Spielman M., Dickinson H.G., 2004. Stamen structure and function. *Plant Cell* 16 (Suppl.), S46–S60.
- Sears E.R., 1941. Chromosome pairing and fertility in hybrids and amphidiploids in the Triticinae. *Missouri Agric Exp Station Research Bulletin* 337, 1–20.
- Sears E.R., 1952. Homoeologous chromosome in *Triticum aestivum*. *Genetics* 37, 624.
- Sears E.R., 1956. The transfer of leaf rust resistance from *Aegilops umbellulata* to wheat. *Brookhaven Symp Biol* 9, 1–22.
- Sears E.R. and Okamoto M., 1958. Intergenomic chromosome relationship in hexaploid wheat. In *Proc X Intl Congr Genet* 2, 258–259.
- Sears E.R., 1966. Nullisomic–tetrasomic combinations in hexaploid wheat. *Chromosome manipulations and plants genetics*, ed. Riley R. and Lewis K.R. Edinburgh: Oliver & Boyd vol. 20, 29–45.
- Sears E.R., 1973. *Agropyron*–wheat transfers obtained by homoeologous pairing. *Proc 4th Wheat Genet Symp*, Colombia, Missouri, ed. Sears ER and Sears LMS 191–199.
- Sears E.R., 1976. Genetic control of chromosome pairing in wheat. *Ann Rev Genet* 10, 31–51.
- Sears E.R., 1977. An induced mutant with homoeologous pairing in common wheat. *Can J Genet Cytol* 19, 585–593.

- Sears E.R., 1978. Analysis of wheat–*Agropyron* recombinant chromosomes. Proc 8th Eucarpia Congress inters Hybrid Plant Breed, Madrid, Spain 1977 63–72.
- Sekhon R.S. and Chopra S. 2009. Progressive loss of DNA methylation releases epigenetic gene silencing from a tandemly repete maize *Myb* gene. Genetics 181 (1), 81– 91.
- Shaked H., Kashkush K., Ozkan H., Feldman M., Levy A.A., 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.
- Sharma D., Knott D.R., 1966. The transfer of leaf rust resistance from *Agropyron* to *Triticum* by irradiation. Can J Genet Cytol 8, 137–143.
- Sharma S., Bhat P.R., Ehdaie B., Close T.J., Lukaszewski A.J., Waines J.G., 2009. Integrated genetic map and genetic analysis of a region associated with root traits on the short arm of rye chromosome 1 in bread wheat. Theor Appl Genet 119, 783–793.
- Sharma S., Demason D.A., Ehdaie B., Lukaszewski A.J., Waines J.G., 2010. Dosage effect of the short arm of chromosome 1 of rye on root morphology and anatomy in bread wheat. J Exp Bot 61, 2623–2633.
- Shen X., Kong L., Ohm H., 2004. Fusarium Head Blight resistance in hexaploid wheat (*Triticum aestivum*)–*Lophopyrum* genetic lines and tagging of the alien chromatin by PCR markers. Theor Appl Genet 108, 808–813.
- Shen X., Ohm H., 2007. Molecular mapping of *Thinopyrum*–derived Fusarium head blight resistance in common wheat. Mol Breed 20, 131–140.
- Shen H., He H., Li J., Chen W., Wang X., Guo L., Peng Z., He G., Zhong S., Qi Y., Terzaghi W., Deng X.W., 2012. Genome–wide analysis of DNA methylation and gene expression changes in two *Arabidopsis* ecotypes and their reciprocal hybrids. Plant Cell 24, 875–892.
- Sibikeev S.N., Voronina S.A., Krupnov V.A., 2000. Effects from 7DL–7AeL translocation on resistance to environmental factors and grain quality of bread wheat. In Proc of the 11th EWAC conf, Novosibirsk 169–170.
- Singh R.P., Huerta–Espino J., Rajaram S., Crossa J., 1998. Agronomic effects from chromosome translocations 7DL.7Ag and 1BL.1RS in spring wheat. Crop Sci 38, 27–33.
- Slotkin R.K., Vaughn M., Borges F., 2009. Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. Cell, 136, 461–472.
- Soltis P.S., Soltis D.E., 2009. The role of hybridization in plant speciation. Annu Rev Plant Biol 60, 561– 588.
- Steele K.A., Virka D.S., Kumarb R., Prasad S.C., Witcombe J.R., 2007. Field evaluation of upland rice lines selected for QTLs controlling root traits. Field Crops Res 101, 180–186.

- Steele K.A., Price A.H., Witcombe J.R., Shrestha R., Singh B.N., Gibbons J.M., Virk D.S., 2013. QTLs associated with root traits increase yield in upland rice when transferred through marker-assisted selection. *Theor Appl Genet* 126, 101–108.
- Steward N., Ito M., Yamaguchi Y., 2002. Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress. *Biol chem* vol 277, N°40 (Issue of October 4).
- Strahl B.D., Allis C.D., 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41–45.
- Sung S., Amasino R.M. 2004. Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. *Curr Opin Plant Biol* 7, 4–10.
- Tai T.H., and Tanksley S.D., 1990. A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue. *Plant Mol Biol Rep* 8, 297–303
- Takeda S., Matsuoka M., 2008. Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population changes. *Nat Rev Genet* 9, 444–457.
- Tang Z.X., Fu S.L., Ren Z.L., Zhang H.Q., Yang Z.J., Yan B.J., 2009 Characterization of three wheat cultivars possessing new 1BL.1RS wheat–rye translocations. *Plant Breed* 128, 524–527.
- Tardieu F. and Tuberosa R., 2010. Dissection and modelling of abiotic stress tolerance in plants. *Curr Opin Plant Biol* 13, 206–212.
- Taylor D.R., Ingvarsson P.K., 2003. Common features of segregation distortion in plants and animals. *Genetics* 117, 27–35.
- Tian L., Wang J., Fong M.P., Chen M., Cao H., 2003. Genetic control of developmental changes induced by disruption of *Arabidopsis* histone deacetylase 1 (AtHD1) expression. *Genetics* 165, 399–409.
- Trethowan R.M., Reynolds M., Sayre K., Ortiz–Monasterio I., 2005. Adapting wheat cultivars to resource conserving farming practices and human nutritional needs. *Ann App Biol* 146, 405–413.
- Tuberosa R., Salvi S., Sanguineti M.C., Landi P., Maccaferri M., Conti S., 2002. Mapping QTLs regulating morpho-physiological traits and yield: case studies, short coming sand perspectives in drought–stressed maize. *Ann bot* 89, 941–963.
- Tuberosa R., Salvi S., 2006. Genomics based approaches to improve drought tolerance of crops. *Trends Plant Sci* 11, 405–412.
- Tuberosa R., Giuliani S., Parry M.A.J., Araus J.L., 2007. Improving water use efficiency in Mediterranean agriculture: what limits the adoption of new technologies. *An Appl Biol*, 150, 157–162.

- Varshney R.K., Hoisington D.A., Tyagi A.K., 2006. Advances in cereal genomics and applications in crop breeding. *Trends Biotechnol* 24, 490–99.
- Wang J., Tian L., Madlung A., Lee H., Chen M., Lee J., Watson B., Kigochi T., Comai L., Chen Z.J., 2004. Stochastic and epigenetic changes of gene expression in *Arabidopsis* polyploids. *Genetics* 167, 1961–1973.
- Wang Y.M., Dong Z.Y., Zhang Z.J., Lin X.Y., Shen Y., Zhou D., Liu B., 2005. Extensive de Novo Genomic Variation in Rice Induced by Introgression From Wild Rice (*Zizania latifolia* Griseb.). *Genetics* 170, 1945–1956.
- Wang H., Chai Y., Chu X., Zhao Y., Wu Y., Zhao J., Ngezahayo F., Xu C., Liu B., 2009. Molecular characterization of a rice mutator–phenotype derived from an incompatible cross–pollination reveals transgenerational mobilization of multiple transposable elements and extensive epigenetic instability. *BMC Plant Biol* 9, 63.
- Wang R.R.C., 2011. *Agropyron* and *Psathyrostachys*. In: Kole C (ed.) *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Cereals*. Springer Verlag Berlin Heidelberg p 77–108.
- Weber M., Schübeler D., 2007. Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. *Curr Opin Cell Biol* 19 (3), 272–280.
- Weihua Q., Liumin F., 2011. Epigenetics, a mode for plants to respond to abiotic stresses. *Front Biol* 6, 477–481.
- White M.P., Paul S., Ashbullby K., Herbert S., Depledge M.H., 2013. Feelings of Restoration from Recent Nature Visits. *J Envir Psychology* 35, 40–51.
- Wissuwa M., Wegner J., Ae N., Yano M., 2002. Substitution mapping of *Pup1*: a major QTL increasing phosphorus uptake of rice from a phosphorus–deficient soil. *Theor Appl Genet* 105, 890–897.
- Wolffe A.P., Matzke M.A., 1999. Epigenetics: regulation through repression. *Science* 286, 481–486.
- Workman J.L., Kingston R.E., 1998. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem* 67, 545–579.
- Worland A.J., 1999. The importance of Italian wheats to world wide varietal improvement. *J Genet & Breed* 53, 165–173.
- Wu C.I., Lyttle T.W., Wu M.L., Lin G.F., 1988. Association between a satellite DNA sequence and the Responder of Segregation Distorter in *D. melanogaster*. *Cell* 54, 179–189.
- Wu J., Mizuno H., Hayashi-Tsugane M., 2003. Physical maps and recombination frequency of six rice chromosomes. *Plant J* 36, 720–730.

- Xiao W., Custard K.D., Brown R.C., Lemmon B.E., Harada J.J., Goldberg R.B., Fischer R.L., 2006. DNA methylation is critical for *Arabidopsis* embryogenesis and seed viability. *Plant Cell* 18(4), 805–814.
- Xiong L.Z., Xu C.G., Saghai Maroof M. A., Zhang Q., 1999. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation–sensitive amplification polymorphism technique. *Mol Gen Genet* 261, 439–446.
- Zeller F.J. 1973. 1B/1R wheat–rye chromosome substitution and translocations. *Proc 4th Intern Wheat Genet Symp*, Missouri Agric Exper Station Coloumbia 209–221.
- Zhang H.B. and Dvorak J., 1990. Characterization and distribution of an interspersed repeated nucleotide sequence from *Lophopyrum elongatum* and mapping of segregation distortion factor with it. *Genome* 33, 927–936.
- Zhang W., Qu L.J., Gu H., Gao W., Liu M., Chen J., Chen Z., 2002. Studies on the origin and evolution of tetraploid wheat based on the internal transcribed spacer (ITS) sequences of nuclear ribosomal DNA. *Theor Appl Genet* 104, 1099–1106.
- Zhang W., Gianibelli M.C., Ma W., Rampling L., Gale K.R., 2003. Identification of SNPs and development of allele–specific PCR markers from γ –gliadin alleles in *Triticum aestivum*. *Theor Appl Genet* 107, 130–138.
- Zhang X., Dong Y., Wang R.R–C., 1996. Characterization of genomes and chromosomes in partial amphidiploids of the hybrid *Triticum aestivum* x *Thinopyrum ponticum* by in situ hybridization, isozyme analysis, and RAPD. *Genome* 39, 1062–1071.
- Zhang X., Yazaki J., Sundaresan I.R., Shinn P., Pellegrini M., Jacobsen S.E., 2007. Genome–wide high–resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell* 126, 1189–1201.
- Zhang X., Shiu S.H., Cal A., Borevitz J.O., 2008a. Global analysis of genetic, epigenetic and transcriptional polymorphisms in *Arabidopsis thaliana* using whole genome tiling arrays. *PLoS Genet* 4(3), e1000032.
- Zhang Y., Liu Z.H., Liu C., Yang Z.J., Deng K.J., Peng J.H., Zhou J.P., Li G.R., Tang Z.X., Ren Z.L., 2008b. Analysis of DNA methylation variation in wheat genetic background after alien chromatin introduction based on methylation–sensitive amplification polymorphism. *Sci Bull* 53(1), 58–69.
- Zhang, L., Luo, P. , Ren, Z. and Zhang, H., 2011. Controlling fusarium head blight of wheat (*Triticum aestivum* L.) with genetics. *Adv Biosci Biotec* 2, 263–270.
- Zhu J.K., 2008. Epigenome sequencing comes of age. *Cell* 133, 395–397.

- Zhu X.-G., Long S.P., Ort D.R., 2010. Improving Photosynthetic Efficiency for Greater Yield. *Annu Rev Plant Biol* 61, 235–261.
- Zilberman D., Gehring M., Tran R.K., Ballinger T., Henikoff S., 2007. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nat Genet* 39 (1), 61–69.