

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI PRODUZIONE VEGETALE

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
ORTOFLOROFRUTTICOLTURA XX CICLO

AGR/04

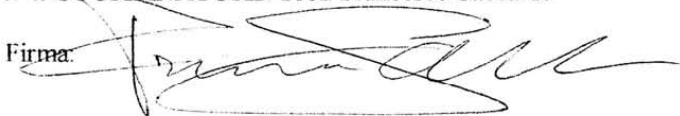
TITOLO TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

***“Sviluppo di metodologie di citogenomica a flusso in cece
(Cicer arietinum L.)”***

COORDINATORE: Prof. Alberto Graifenberg

x il ~~COORDINATORE~~: Prof. Francesco Saccardo

Firma:



TUTOR:

Dott. Sergio Lucretti

Firma



DOTTORANDA:

Dott.ssa Mariaincoronata Roselli

Firma



*What we call the beginning is often
the end and to make an end is to
make a beginning.*

The end is where we start from.

-T. S. Eliot

*Nature fits all her children with
something to do,
He who would write and can't
write, can surely review.*

-James Russell Lowell

PARTE GENERALE

Caratteristiche della specie <i>Cicer arietinum</i> L.	- 6 -
La mappa genetica del cece.....	- 7 -
Dal mappaggio genetico al mappaggio fisico	- 7 -
Breeding per resistenza a stress biotici.....	- 9 -
Mappaggio di <i>QTL</i> per resistenza ad <i>Ascochyta rabiei</i>	- 10 -
Mappaggio di <i>QTL</i> per resistenza ad <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Ciceris</i>	- 12 -
<i>Breeding</i> per resistenza a stress abiotici: tolleranza al freddo durante la fioritura.....	- 13 -
<i>Breeding</i> per resistenza a stress abiotici: epoca di fioritura	- 14 -
<i>Breeding</i> per resistenza a stress abiotici: tolleranza alla siccità.....	- 15 -
Citogenetica a flusso: un nuovo approccio per lo studio dei genomi vegetali	- 16 -

LE BASI DELLA CITOFUORIMETRIA A FLUSSO

Le basi della citofluorimetria a flusso	- 19 -
---	--------

OBIETTIVO DEL DOTTORATO

Obiettivo del dottorato.....	- 26 -
Obiettivi specifici del dottorato: sviluppo delle diverse attività.....	- 26 -

MATERIALI E METODI

1.1 MATERIALE VEGETALE	- 29 -
1.2 METODI	- 29 -
1.2.1 Sincronizzazione e blocco in metafase mitotica di apici radicali.....	- 29 -
1.2.2 Preparazione di <i>squash</i> metafisici per analisi citologica al microscopio	- 30 -
1.2.3 Analisi citofluorimetrica.....	- 31 -
1.2.3.1 Ottimizzazione della preparazione di sospensioni cromosomiche	- 31 -
1.2.3 Cariotipizzazione a flusso della specie.....	- 32 -
1.2.4 <i>Sorting</i> cromosomico e assegnazione dei picchi a specifici cromosomi.....	- 33 -
1.2.5 Caratterizzazione delle frazioni cromosomiche <i>sortate</i> attraverso la messa a punto di tecniche di ibridazione <i>in situ</i> (FISH)	- 34 -

1.2.6 <i>Physical mapping</i> di marcatori associati alla resistenza a <i>Fusarium oxysporum</i>	- 35 -
--	--------

RISULTATI

2.1 Sincronizzazione del ciclo cellulare	- 38 -
2.2 Ottimizzazione della preparazione di sospensioni cromosomiche.....	- 39 -
2.3 <i>Cariotipizzazione</i> della specie	- 39 -
2.4 <i>Sorting</i> cromosomico e caratterizzazione morfologica dei picchi sortati	- 41 -
2.5 <i>Physical mapping</i> sulle frazioni <i>sortate</i> di marcatori associati a resistenza a <i>Fusarium</i> -	44 -
2.6 Ibridazione fluorescente <i>in situ</i> (FISH) della sequenza <i>Ver17</i>	- 46 -

DISCUSSIONE

Discussione.....	- 49 -
------------------	--------

CONCLUSIONI

Conclusioni.....	- 53 -
------------------	--------

BIBLIOGRAFIA	- 55 -
---------------------------	--------

PARTE GENERALE

PARTE GENERALE

Caratteristiche della specie *Cicer arietinum* L.

Il cece (*Cicer arietinum* L.) è la sola specie coltivata del genere *Cicer*; è autogama e diploide ($2n=2x=16$) con un genoma relativamente piccolo di 740 Mb [1]. L'areale di coltivazione del cece è rappresentato dalle zone del mondo a clima arido e semiarido. Con oltre 10 milioni di ha il cece è il terzo legume più coltivato al mondo (FAO, 2006). I maggiori produttori sono l'India, il Pakistan e la Turchia.

Il cece, contrariamente alla sua elevata diversità morfologica, possiede una scarsa variabilità genetica probabilmente a causa della discendenza monofiletica dalla specie non coltivata *Cicer reticulatum* L. [2-4].

I semi di cece contengono un 20-30% di proteine, circa il 40% di carboidrati e solo il 3-6% di grassi [5] e sono una buona fonte di calcio, potassio, magnesio, fosforo, ferro, zinco e manganese [6]. A differenza della soia, il cece non contiene un elevato tasso di *isoflavonoidi* (USDA-ARS, 2004), ma fornisce all'alimentazione più carotenoidi (β -carotene) del riso geneticamente modificato *Golden Rice* [7]. Rispetto ad altri legumi, nel cece sono quasi assenti i composti antinutrizionali [8] e pertanto la specie viene considerata come cibo funzionale o nutraceutico [9], [10], [11].

Il *Cicer arietinum* L. è distinto in due gruppi: *desi* e *kabuli*. Il primo tipo è caratterizzato da seme generalmente piccolo e pigmentato mentre il secondo ha semi grossi e con colorazione chiara dei tegumenti esterni. Il tipo *kabuli* viene consumato come seme tal quale mentre dal tipo *desi* normalmente si ottengono sfarinati per uso zootecnico [12]. Questa distinzione all'interno della specie è stata superata dalla classificazione in tipi *microsperma* e *macrosperma* proposta da Moreno *et al.*, 1978 [13].

Attualmente la produttività del cece risulta molto bassa (produttività media mondiale di circa 0,8 t/ha, FAOSTAT, 2006) e con tassi di accrescimento pressoché nulli negli ultimi anni. Questa situazione trova giustificazione negli stress abiotici e biotici cui è soggetto il cece, questi ultimi causati soprattutto da *Ascochyta rabiei* e *Fusarium oxysporum*. Tuttavia l'obiettivo principale dei miglioratori genetici è attualmente ricercare per il cece forme di

resistenza a stress biotici e tolleranza a stress abiotici avvalendosi di strumenti di indagine genetica quali l'individuazione di marcatori molecolari per lo sviluppo di mappe genetiche o tecniche di *transcription profiling* per l'identificazione di regioni genomiche o geni espressi e coinvolti nella risposta agli stress.

In questa parte introduttiva del lavoro verrà presentato lo stato delle conoscenze attuali riguardo allo sviluppo e l'applicazione del *breeding* molecolare per il miglioramento del cece per resistenza a stress biotici e abiotici.

La mappa genetica del cece

La conoscenza delle basi ereditarie dei caratteri agronomici è un requisito fondamentale per identificare i geni di interesse e integrarli con le mappe di associazione e per utilizzare queste per la selezione assistita da marcatori (*Marker Assisted Selection*). Per il cece caratteri quali la resistenza ad *Ascochyta* [14], [15], [16], [17] e a *Fusarium* [18], [19], tolleranza alle basse temperature durante la fioritura [20] ed epoca di fioritura [21] sono stati ampiamente studiati. Attualmente, molti genetisti del cece ritengono che la generazione di una mappa genetica integrata della specie, che comprenda loci importanti sia da un punto di vista scientifico che economico, sia un obiettivo fondamentale. Fino ad oggi, però, il basso livello di polimorfismo del genoma di cece e la scarsa disponibilità di marcatori *codominanti* ha rappresentato un serio ostacolo per il raggiungimento del suddetto obiettivo. L'avvento dei marcatori *STMS* (*Sequenze Tagged Microsatellite Sites*) ha fornito l'opportunità di integrare le diverse mappe disponibili [22]

Negli ultimi anni i marcatori *SMTS* sono stati impiegati per generare mappe genetiche su cece ottenute da popolazioni ricombinanti di *C. arietinum* L. x *C. reticulatum* L. [23].

Dal mappaggio genetico al mappaggio fisico

La costruzione di una mappa fisica completa del genoma di qualsiasi specie è di

fondamentale importanza per la comprensione della struttura, della composizione e funzione del genoma stesso [24].

Questo obiettivo non può essere raggiunto soltanto attraverso il mero mappaggio per ricombinazione che spesso trova limitazioni nella mancanza di marcatori riconoscibili del processo di segregazione.

Inoltre l'isolamento di geni di importanza agronomica (per esempio geni che codificano per i recettori della chinasi, le proteine di trasmissione dei segnali, i fattori di trascrizione, le proteine regolatrici o gli *RNA* regolatori, i *pathway* enzimatici di difesa delle piante da stress) necessita inevitabilmente del mappaggio fisico. L'ottenimento di una mappa fisica in cece è un obiettivo ancora lontano dall'essere realizzato, sebbene siano già state ottenute almeno quattro librerie *BAC* (*Bacterial Artificial Chromosome*), effettivamente sottoutilizzate [25], e sia vicina la costruzione di una mappa citogenetica dei cromosomi di cece [26].

Una delle librerie *BAC* è stata descritta con dettaglio [27]. Una seconda libreria, derivata dalla cultivar resistente a *Fusarium* ICC 4958, è stata costruita utilizzando il vettore binario *V41* con una copertura media del genoma pari a 5X. Tale libreria è stata *spottata* su filtri in *nylon* ad alta densità e impiegata per esperimenti di ibridazione. Questi esperimenti dimostrano che alcuni marcatori localizzati su mappe genetiche integrate sono di tipo *low copy* (per esempio il gene codificante per la *PRP5*) o mediamente ripetuti (per esempio il gene codificante per l'*N-idrossi cinnamoil-benzoil transferasi* o per la proteina catalizzante un *step* del via biosintetica della *fitoalessina*) o altamente ripetuti (per esempio gli elementi retrotrasponibili *Ty3* o il marcatore *CS 27* [28]).

Recentemente, Lichtenzveig *et al.*, 2005 [25] hanno realizzato una *BAC* e *BIBAC* (*Binary Bacterial Chromosome*) *library* per il cece; le due librerie contengono un totale di 38016 cloni che equivalgono ad una copertura media del genoma di 7X. Le librerie *BAC*, pertanto, potrebbero essere impiegate per la generazione di una mappa fisica tramite BES (*BAC End Sequencing*) e allineamento dei *CONTIG* e potrebbero rappresentare una risorsa effettiva per il sequenziamento completo del genoma di cece [29].

Un valido sostegno alla realizzazione di un mappaggio fisico potrebbe essere lo sviluppo di metodologie di citogenomica a flusso per lo sviluppo di librerie *BAC* cromosoma- specifiche, già avviate da alcuni ricercatori [26] con lo scopo di creare un ponte tra i due approcci (mappe genetiche ricombinanti ed osservazioni citogenetiche da un lato, e

sequenziamento casuale del genoma totale dall'altro) e facilitare notevolmente la localizzazione diretta evitando l'interferenza nell'allineamento dei *CONTIG* dovuta alle sequenze ripetute presenti sui diversi cromosomi vegetali.

Breeding per resistenza a stress biotici

Nell'area del Mediterraneo il cece è tradizionalmente seminato in primavera ottenendo, come conseguenza del periodo siccitoso, che caratterizza la stagione estiva, durante la quale si ha l'accrescimento della pianta, una bassa produzione di biomassa. La semina invernale amplia il periodo di crescita vegetativa e migliora la resa in granella che si attesta intorno alle 2t/ha [30], [31]. Gli agricoltori raramente adottano la semina invernale perché l'andamento climatico freddo e umido, tipico degli inverni Mediterranei, favorisce lo sviluppo di *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab., fungo necrotrofico che attacca le parti aeree della pianta. Il patogeno rappresenta un serio problema non solo per i Paesi del Mediterraneo ma anche per il Nord America, il Pakistan, l'India Nordoccidentale e l'Australia. Sono state già identificate fonti di resistenza [14] e lo sviluppo di linee stabili resistenti ad *ascochyta* consentirebbe un anticipo del periodo di semina alla stagione invernale. Attualmente non sono disponibili cultivar resistenti in maniera durevole al patogeno e il raggiungimento di tale obiettivo potrebbe realizzarsi *piramidando*, ossia inserendo nello stesso genoma, i geni di resistenza via *MAS*.

Il secondo più importante patogeno per il cece è rappresentato da *fusarium* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*; [32]. Molte cultivar *kabuli*, tradizionalmente coltivate nel Mediterraneo, sono suscettibili al patogeno e fonti di resistenza sono state rinvenute in alcune cultivar *desi* [33]. Tuttavia lo sviluppo di cultivar resistenti è ostacolato dalla variabilità patogenetica del fungo. Attualmente vengono riportate otto razze di *Fusarium*, discriminate in base alle risposte sintomatiche di differenti set di cultivar [34]. Oltre alle malattie fungine qui riportate, sono stati descritti in cece altre problematiche e altri parassiti, rinvenuti soltanto in determinati areali. In India e in Australia rappresenta un serio rischio per le coltivazioni il tonchio del baccello (*Helicoverpa armigera*) mentre la muffa grigia, causata da *Botrytis*, può insorgere in particolari condizioni e in campi ad alta densità di coltivazione [35]. Patogeni

che attaccano l'apparato radicale quali *Sclerotium*, *Pythium* spp. e *Phytophthora* sono invece più diffusi nelle aree tropicali e subtropicali [36], [37]. La ruggine di cece (*Uromices ciceris arietini*) può rappresentare un problema per i climi freddi e umidi. Talvolta gli attacchi possono comparire contemporaneamente a quelli dell'*ascochyta* [32] specialmente ad elevate altitudini come ad esempio nel Messico centrale [38], [39]. Per la ruggine sono attualmente disponibili solo forme di resistenza incompleta e parziale [40].

Mappaggio di QTL per resistenza ad *Ascochyta rabiei*

La genetica della resistenza ad *ascochyta* è stata esaustivamente descritta in quanto il patogeno causa la malattia più importante per il cece da un punto di vista agronomico ed economico. Attualmente non è chiaro se i geni di resistenza riportati rappresentino *loci* differenti poiché non sono stati eseguiti test allelici. A complicare il quadro è la presenza di geni in grado di modificare l'espressione della resistenza e la difficoltà di caratterizzarla in campo perché spesso vi è la contemporanea presenza, nella stessa coltivazione e talvolta nella stessa lesione della pianta, di diversi *patotipi* [41], [42], [43]. L'assortimento genico dei diversi *patotipi* può contribuire all'aumento di variabilità genetica del fungo come mezzo di superamento delle resistenze introgresse nelle cultivar [13]

Diversi metodi sono stati adottati per il saggio di severità della malattia. Lo *screening* in condizioni controllate (serra o camera di crescita), associato a quello in campo, garantisce una maggiore riproducibilità dei risultati poiché la severità e la diffusione della malattia dipendono dalle condizioni ambientali e specialmente dall'umidità che può variare annualmente.

Cho *et al.*, 2004 [44] hanno osservato un incremento drammatico della severità della malattia in condizioni di umidità al 100% protratte per due giorni dopo l'inoculazione rispetto alle normali condizioni di serra. Inoltre, più loci possono contribuire alla resistenza alla malattia nelle diverse fasi fenologiche della pianta [45]. Poiché la scala utilizzata per la valutazione della malattia (scala da 1 a 9 [46]) è particolarmente soggettiva per i valori intermedi, la valutazione del ricercatore può introdurre delle alterazioni che possono anche

influenzare l'accuratezza dell'indagine dei geni di resistenza con i marcatori. Infatti, alcuni autori adottano due diversi sistemi di valutazione della malattia nello stesso ambiente [47].

Per migliorare l'attendibilità del mappaggio dei QTL per resistenza ad *ascochyta*, vengono utilizzate linee *inbred* ricombinanti (RIL) valutate in anni successivi. Per esempio Tekeoglu *et al.*, 2000 [48] hanno impiegato tre diverse RIL e le hanno testate in campo per due annate successive utilizzando i più diffusi patotipi di *Aschochyta rabiei* in USA. Questo studio ha identificato due geni *major* che complementano diversi geni modificatori.

Vi è poi un terzo gene identificabile solo il primo anno; l'assenza di uno dei due geni *major* comporta la suscettibilità della pianta al patogeno mentre i geni modificatori modulano il grado di resistenza alla fitopatia [48]. Questo studio ha individuato inoltre due *QTL* (*QTL-1* e *QTL-2*) che spiegano la resistenza ad *ascochyta* e che risultano identificati da specifici gruppi di associazioni (*LG*, *Linked Group*) di marcatori molecolari. Marcatori di tipo *SMTS* mappati su *LG4* e rilevati su popolazioni segreganti per la resistenza, hanno permesso di localizzare il *QTL-1* nell'intervallo tra *SMTS 11*, *GAA47*, *GA2* e *TR20*. Un altro studio di Tekeoglu *et al.*, 2002 localizza il *QTL-1* all'interno de *LG8*, vicino al marcatore *SMTS GAA47*, e il *QTL-2* ne *LG4*. Una sintesi accurata dei *QTL* indagati per la resistenza ad *ascochyta* con i marcatori associati e i relativi *LG* di appartenenza, è schematizzata nella tabella sotto riportata [49]:

Patotipo	Nome QTL	del	Marcatore diagnostico ^a	LG	Referenza
nd	1		GAA47	4	[50]
nd	2		TA72, GA2	4	[51]
nd	1		TS12b		
	2/3		TA3a/TA3b		
	4/5/6		TA30/TA146/TR20		
nd	AR2		SC/OPK13603	4	[52]
			SC/OPM02935		[53]
			TA72, TA146		
nd	1		STMS11, GA2, GAA47, TR20	4	[54]
I	ar		GA16	2	[55]
II	ar2a		GA16	2	
II	ar2b		TA130, TA72, TS72	4	
I	ar1a		GA20, GA16	2B-6B	[44]
I	ar1b		TA37, TA200	2B	
II	ar2a		GA24, GAA47	4A	
nd	1*		STMS 11, GA2, TR20	4	[56]
nd	2*		XLRRb280	4	

Tabella 1: QTL per la resistenza ad *ascochyta* e marcatori diagnostici che permettono la loro assegnazione a gruppi di associazione (LG) sulla mappa di [57]

nd: non determinato; a = XLRRb₂₈₀ è un marcatore RGA; i marcatori SCAR sono denominati con il prefisso SC; gli altri sono marcatori STMS

Mappaggio di QTL per resistenza ad *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris*

Attualmente, otto razze di *Fusarium Oxysporum* f. sp. *Ciceris* sono state descritte in India, Spagna e USA (0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 e 6; [58] [59] [60]). Ognuna di queste razze costituisce una linea monofiletica, che acquistano virulenza sulle diverse cultivar di cece [60]. Oltre 150 fonti di resistenza sono state identificate e alcune mostrano resistenza a più di una razza. La genetica delle resistenze è, tuttavia, complessa perché per la razza 1, ad esempio, i geni coinvolti sono da due a tre [61].

Molti studi su *RIL* derivanti da incroci intra- e interspecifici hanno dimostrato l'organizzazione dei geni di resistenza per le razze 1, 3, 4 e 5 (*foc1* e *foc3*, *foc4* e *foc5*; [62]; [63]; [64]; [57]; [65]) in due adiacenti *cluster* di geni per la resistenza sul LG2 fiancheggiati dai marcatori STMS GA16 e TA96 (cluster *foc1* e *foc4*) e TA96 e TA27 (cluster *foc3* e *foc5*).

Tuttavia, non solo i geni di resistenza ma anche altre sequenze putativamente coinvolte nella risposta del cece al patogeno sono state localizzate tra, o comunque in prossimità, dei *cluster* genici di resistenza a *fusarium*. Per esempio, la sequenza dei marcatori più strettamente associati ai loci *foc4* e *foc5* è significativamente simile a quella del gene codificante per la proteina PR-5. Nel genoma di *Arabidopsis* omologi di questi geni sono localizzati sui bracci corti dei cromosomi 1 e 5 e suggeriscono una sintenia con i cluster dei geni di resistenza a *Fusarium* in cece [66].

Sull'*LG2* sono localizzati anche i geni di resistenza ad *Aschochyta rabiei* *ar1* e *ar2*, strettamente associati al cluster dei geni *foc* [55].

Tuttavia non tutti i geni di resistenza a *fusarium* sono localizzati su questo gruppo di associazione della mappa di Winter [57]. Per esempio Rubio *et al.*, 2003 [19] hanno dimostrato che i due geni *foc01* e *foc02* conferiscono resistenza alla razza 0 del patogeno e risultano associati al marcatore RAPD *OPJ2060*, di recente mappato sul gruppo di associazione *LG5* [67].

Breeding per resistenza a stress abiotici: tolleranza al freddo durante la fioritura

L'adozione della semina invernale in sostituzione di quella primaverile, che ha reso più efficiente l'utilizzo delle precipitazioni piovose e incrementato le rese nei paesi del Mediterraneo, ha indotto i *breeder* a rivolgere maggiore attenzione al problema della resistenza al freddo (temperature al di sotto di -1,5°C) e alle gelate (temperature tra -1,5 e -15°C) che possono ricorrere in diverse fasi fenologiche della pianta, dalla germinazione alla maturazione [68]. Aborti fiorali a temperature intorno ai 15°C e al di sotto di tale valore sono stati registrati in Australia [69] nel Mediterraneo [70] e in India [71]; [72]. Studi sulle basse temperature, condotti in ambienti controllati, hanno dimostrato che i tubetti pollinici di genotipi resistenti al gelo crescono più velocemente lungo lo stilo ovarico rispetto a quelli sensibili [73]. La variabilità del polline derivante dai diversi genotipi e la co-espressione del carattere di resistenza alle basse temperature nel polline e nella relativa pianta madre (espressione aplo-diplo) ha creato l'opportunità di attuare la selezione sul polline per migliorare la tolleranza alle gelate.

La selezione sul polline, come strumento per agevolare programmi di *breeding*, è stata applicata nello stadio gametofitico del ciclo vitale, come è stato dimostrato per molte specie [74]. Questo approccio è stato di recente applicato al cece per ottenere genotipi idonei alle semine invernali nel sud dell’Australia, ottenendo in tal modo due cultivar del tipo *desi*, Sonali e Rupali, tolleranti alle gelate [73].

L’identificazione dei tipi tolleranti alle gelate, abbinata alla selezione del polline, rappresenta un valido approccio per l’ottenimento di cultivar resistenti alle basse temperature. A questo si è poi aggiunto l’uso di marcatori associati al carattere di interesse [20].

Un nuovo metodo è stato sviluppato per il *breeding* assistito da marcatore in lupino [75] che in futuro potrebbe essere applicato anche su cece. Si tratta di utilizzare marcatori di DNA polimorfici altamente efficienti ancorati a regioni microsatelliti (MFLP, Microsatellite anchored *Fragment Length Polymorphism*). Questi marcatori di tipo co-dominante sono stati impiegati in lupino per assistere i *breeder* nei programmi di selezione per la resistenza a patogeni fungini [76].

Le difficoltà nello screening e nel *breeding* per resistenza a basse temperature sono connesse alla ridotta variabilità genetica del cece coltivato [2]. Per superare tali limitazioni possono essere considerate le fonti di resistenza offerte dalle specie progenitrici del cece [77], [78], e che sono state reperite in cinque specie annuali e una perenne [79]; [80], [81], [82], [68].

***Breeding* per resistenza a stress abiotici: epoca di fioritura**

Il 90% delle coltivazioni di cece vengono realizzate non in irriguo e di conseguenza la siccità rappresenta il più importante stress che limita le produzioni e compromette la stabilità delle rese. Per questo l’epoca di fioritura risulta essere il carattere più importante per quanto riguarda la capacità di adattamento della coltura all’ambiente siccitoso. Tale capacità si traduce nella riduzione del periodo di accrescimento vegetativo (precocità di maturazione) che alcune cultivar presentano e che consente di minimizzare le perdite dovute alla siccità e alle alte temperature poiché la maturazione precoce permette alla pianta di sfuggire al periodo di maggiore stress [83], [84]. Tuttavia, poiché la resa è generalmente correlata al periodo di

accrescimento della coltura in condizioni ottimali, qualsiasi riduzione della durata del ciclo vitale della pianta in condizioni non di stress comporta una riduzione delle rese [85]; [86]. Kumar *et al.*, [87] hanno sviluppato la cultivar con la minore durata del ciclo produttivo che permette un sostanziale ampliamento dell'area di coltivazione del cece.

Nei climi mediterranei la fioritura precoce ha un effetto positivo sulla resa in granella [88], [89].

Il cece è in genere considerata una pianta longigiurna [90], [91], [92] sebbene siano state ottenute linee insensibili alla durata del giorno, ottenute da incroci che hanno coinvolto germoplasma derivante dalle basse latitudini, come l'Africa orientale, l'India, il Messico e l'Iran [84]. Riguardo alla genetica della fioritura, sono disponibili poche informazioni relative a due geni: il gene major *efl-1*[93] e il gene *ppd* (Or *et al.*, [21]). Non è ancora stato chiarito se i due geni siano differenti tra loro poiché non è stato fatto nessun test allelico. Il gene *efl-1* è stato ampiamente utilizzato per sviluppare varietà a maturazione precoce [84], [94].

Cho *et al.*, 2002 [95] hanno mappato sull'LG3 un QTL per i giorni intercorrenti dalla semina alla fioritura del 50% della parcella insieme ad un altro QTL identificato su una popolazione RIL e che spiega il 28% della variabilità fenotipica riguardo a tale carattere [96].

Breeding per resistenza a stress abiotici: tolleranza alla siccità

Il *breeding* convenzionale per tolleranza a siccità si basa sulla coltivazione delle piante in condizioni limitanti per la disponibilità idrica e sulla selezione per resa e per le componenti ad essa associate. La valutazione del materiale risulta, però, laboriosa poiché la variabilità ambientale impone la ripetizione delle prove di campo in ambienti e annate differenti. Per il superamento di queste problematiche si sta cercando di identificare in cece tratti morfologici associati alla tolleranza alla siccità [86]. Si tratta, per esempio [97], di valutare il tipo di apparato radicale (un sistema radicale più espanso dimostra una maggiore efficienza di utilizzo della acqua disponibile nel suolo) o l'area fogliare (una ridotta superficie fogliare riduce la perdita di acqua dalla pianta per evapotraspirazione). Linee tolleranti alla siccità sono state sviluppate a partire dal genotipo ICC 4958. La selezione effettuata sulla base della resa si è dimostrata efficace per l'ottenimento di cultivar ad alta produttività mentre la

selezione condotta attraverso una valutazione dei caratteri associati alla tolleranza alla siccità è risultata più efficace per l'ottenimento di linee più adatte agli ambienti siccitosi [97]. Al fine di ottenere linee tolleranti alla siccità ma con capacità produttive simili ai parentali, sono stati effettuati incroci tra l'ICC4958 (linea con apparato radicale espanso) e l'ICC5680 (linea a ridotto sviluppo della superficie fogliare).

La selezione in base alle caratteristiche dell'apparato radicale è molto difficile poiché implica l'adozione di metodi laboriosi per la misurazione delle radici. Pertanto risulta più semplice e accurato l'utilizzo di marcatori molecolari associati al carattere. Oltre 250 STMS e circa 100 EST sono stati rilevati su linee RIL derivanti dall'incrocio tra la cultivar Annigeri e ICC4958.

Citogenetica a flusso: un nuovo approccio per lo studio dei genomi vegetali

I cromosomi rappresentano per gli eucarioti il più alto livello di organizzazione del DNA. Ogni cromosoma consiste di una molecola di acido deossiribonucleico (DNA) combinato ad un sistema di impacchettamento proteico. Il corredo cromosomico di una specie eucariotica racchiude le informazioni necessarie alla realizzazione di tutti i processi vitali. La caratterizzazione fisica e genetica dei cromosomi è necessaria per delineare la fisiologia molecolare normale e quella patologica di un essere vivente.

La citometria a flusso ha fornito nuovi strumenti di indagine alla citogenetica classica garantendo un metodo più rapido e accurato per la misura quantitativa dei cromosomi di una specie o la caratterizzazione di sequenze specifiche.

Sin dagli anni '70 questa tecnologia ha fatto luce sull'organizzazione genetica degli organismi viventi e ha indagato le correlazioni esistenti tra le aberrazioni genetiche e le manifestazioni fenotipiche. Il sistema del *Cell Sorter* fornisce una possibilità aggiuntiva di isolare in purezza frazioni di cromosomi normali e aberranti consentendo il mappaggio di sequenze genetiche direttamente sui cromosomi *sortati* e la costituzione di librerie cromosoma-specifiche.

Non ci sono altre tecnologie che siano in grado di isolare cromosomi ad alta purezza ed integri con la stessa facilità e celerità della metodica citofluorimetrica.

Le librerie cromosoma-specifiche ottenute per l'uomo hanno giocato un ruolo cruciale per il sequenziamento dell'intero genoma (Van Dilla & Deaven, 1990).

Per l'analisi e il mappaggio del genoma di cece è possibile utilizzare, come è stato fatto in altre specie [98], una strategia che impieghi l'analisi citofluorimetrica a flusso e il *sorting* di cromosomi in metafase mitotica (citogenomica a flusso). Nell'ambito dei legumi è già stata sviluppata la citogenomica a flusso per due specie: fava [99], [100] e pisello [101, 102], [103]. I cromosomi sortati per questi due legumi sono stati usati per la costruzione di un set completo di librerie DNA cromosoma-specifiche [102]; su tali cromosomi è stato possibile isolare marcatori molecolari da definite regioni genomiche [104], [105, 106] ed è stato possibile eseguire mappaggio fisico e integrazione di mappe genetiche con mappe fisiche [107], [105]. Il cece si presta ad applicazioni di citogenomica a flusso per le sue caratteristiche intrinseche relative al basso contenuto di DNA del nucleo diploide ($1C=0,75pg$, pari a 740Mb ca.) suddiviso in otto cromosomi (contenuto medio di DNA 10fg ca. pari a 90 Mb ca.) che consentirebbero, con le attuali tecnologie di analisi automatizzata, il sequenziamento completo del DNA dei singoli cromosomi. Tuttavia, la minuta costituzione dei cromosomi stessi li rende particolarmente difficoltosi da analizzare sia con le metodologie di citogenetica classiche che con metodiche di ibridazione.

LE BASI DELLA CITOFUORIMETRIA A FLUSSO

Le basi della citofluorimetria a flusso

La *citofluorimetria* a flusso sfrutta le potenzialità della luce generata da un' intensa sorgente luminosa quando interagisce con un corpo in movimento. La luce incidente sulla particella verrà infatti diffratta e diffusa in base alla grandezza, alla forma ed alla sua costituzione fisica, modulando il segnale luminoso in una maniera rappresentativa della costituzione intrinseca della particella stessa. La luce incidente fornisce inoltre un'energia di eccitazione in grado di portare ad uno stato instabile le molecole fluorescenti (*fluorocromi*), presenti nella particella in esame, che decadendo emettono una quantità di luce misurabile e specifica della molecola emettitrice stessa. Il fenomeno descritto viene denominato fluorescenza e, assieme alla diffrazione e diffusione, è in grado di caratterizzare singole particelle e loro insiemi, secondo una capacità tipica dei citofluorimetri a flusso denominata analisi multiparametrica. Il citofluorimetro a flusso è quindi capace di utilizzare l'emissione fluorescente dei *fluorocromi* per generare dati multiparametrici derivanti dall'analisi di cellule e particelle subcellulari il cui diametro vari da 0,5 μ m a 40 μ m, con possibilità di estendere tale ambito dimensionale da 0,2 μ m a 150 μ m, con opportune modifiche ottiche e fluidiche. Il campione rappresentato dalle particelle in sospensione viene focalizzato idrodinamicamente da una soluzione salina veicolante fino al raggiungimento della linea di intercettazione del raggio laser (punto di interrogazione).

Il fascio luminoso che colpisce le particelle produce un'emissione di luce *scatterata* (dal termine inglese *scattering*: diffrangere), legata alle caratteristiche conformazionali e dimensionali delle stesse, e di fluorescenza in virtù della colorazione del campione con specifici *fluorocromi*. Il raggio laser, infatti, genera uno stato di eccitazione che si manifesta con emissione di energia fotonica (Fig. 1). Tale energia è caratterizzata da specifiche proprietà spettrali che differiscono tra i diversi *fluorocromi* impiegati per la colorazione del campione e le sorgenti luminose utilizzate per l'eccitazione (Figura 2). Una peculiare proprietà del *citofluorimetro* è che la misura della fluorescenza è determinata per singola particella a differenza della spettrofotometria con la quale la misura deriva dalla media delle emissioni dell'insieme delle particelle analizzate.

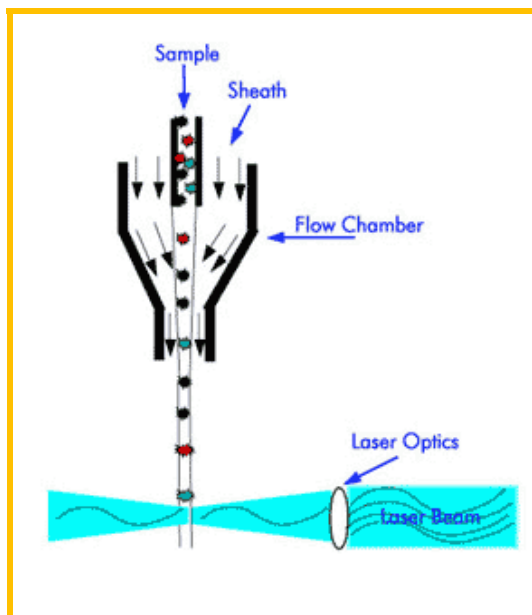


Figura 1

Fig. 1: I citometri a flusso sfruttano il principio della focalizzazione idrodinamica. Il campione iniettato al centro di un fluido veicolante giunge al punto di intercettazione del raggio laser (punto di interrogazione). La focalizzazione del campione consente di poter analizzare singolarmente le particelle al punto di interrogazione.

Fig. 2: Lo spettro di fluorescenza dei comuni fluorocromi: lo spettro di eccitazione è rappresentato da una linea grigia mentre lo spettro di emissione è mostrato in nero. La parte inferiore della tabella mostra una sintesi delle lunghezze d'onda delle varie sorgenti luminose usate in citofluorimetria.

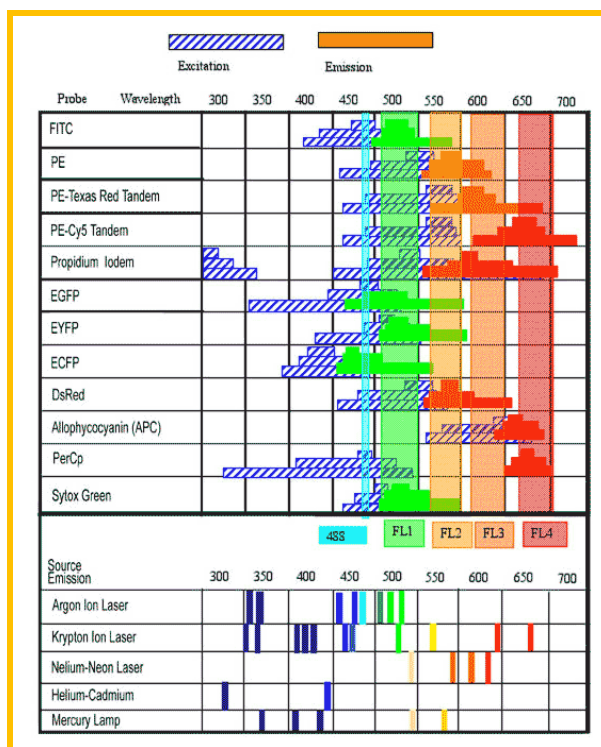


Figura 2

La luce *scatterata* ed emessa dalle particelle in sospensione viene convertita in impulsi elettrici dal sistema di rilevamento ottico (*optical detector*) di cui è dotato lo

strumento dove giunge convogliata da filtri ottici. Per esempio, un filtro "passa banda" a 525 nm posto prima del detector lungo il percorso della fluorescenza emessa consentirà solo alla luce verde di raggiungere il *detector* stesso.

Il tipo di *detector* più comunemente usato (Fig.3) è il tubo fotomoltiplicatore (PMT).

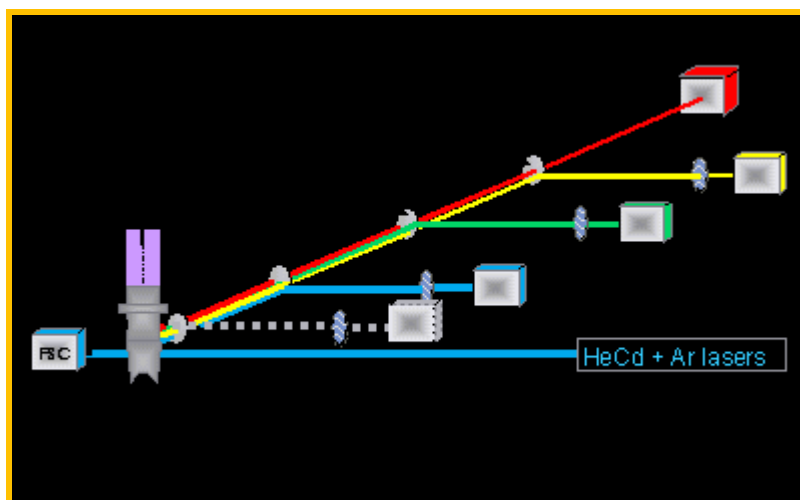


Fig. 3: Sistema ottico schematizzato di un *citofluorimetro*.

Gli impulsi elettrici, che si generano dalla luce rilevata dai fotomoltiplicatori, sono successivamente processati da una serie di amplificatori lineari e logaritmici. L'amplificazione logaritmica estende la scala di misura per i segnali deboli e comprime la scala per i segnali intensi o per specifici segnali di fluorescenza, facilitando l'analisi di segnali caratterizzati da un ampio ambito dinamico.

I diversi segnali o impulsi amplificati vengono successivamente computati da un convertitore *ADC* (*Analog to Digital Converter*) che trasforma questi da analogici a segnali digitali al fine di poter rappresentare un' analisi citofluorimetrica in scala grafica ossia con istogrammi a uno o più parametri.

I dati di un' analisi di citometria a flusso possono essere raccolti in formato elettronico utilizzando software di acquisizione e di analisi specifici.

Le sospensioni possono essere analizzate tenendo conto di più parametri come il *Forward Scatter* (FLS: diffrazione diretta), *Side Scatter* (SSC: diffrazione a 90°), e segnali derivati dalla scomposizione dell' emissione fluorescente nelle sue componenti

derivate dalle caratteristiche temporali e di intensità di emissione dell'onda elettromagnetica *Fluorescence Height* (Fluorescenza Altezza = FLH) e *Fluorescence Area* (Fluorescenza Area = FLA) e *Fluorescence Width* (Ampiezza della Fluorescenza = FLW). Queste informazioni permettono ai ricercatori di identificare e caratterizzare varie sottopopolazioni di particelle, caratterizzate in base a dimensione e quantità di *fluorocromo* legato.

Tale possibilità rappresenta il presupposto per poter separare (*sorting*) da una sospensione diverse sottopopolazioni rintracciabili sugli istogrammi o i *Dot Plot* (istogrammi multiparametrici tracciati su uno spazio cartesiano) ottenuti dall'analisi.

Nel caso dei cromosomi, il primo aspetto fondamentale è la preparazione del campione, previa sincronizzazione del ciclo cellulare e accumulo di cellule in metafase mitotica. L'impiego di tessuti arricchiti in metafasi rappresenta un prerequisito necessario per l'ottenimento di una concentrazione sufficiente di cromosomi.

Il secondo aspetto, che in genere segue la fase di accumulo di cellule in metafase, è il rilascio dei cromosomi in sospensione.

Prima dell'analisi il campione deve essere colorato con un *fluorocromo*, la cui scelta rappresenta una fase critica per generare un'analisi di intensità di fluorescenza ad alta risoluzione. Il coefficiente di variazione (CV) della fluorescenza, stima della variabilità della misura rispetto al valore mediano dell'emissione, dovrebbe essere inferiore al 2%, valore sufficiente a discriminare alterazioni anche parziali del cariotipo come nel caso di linee aneuploidi [108]. Per raggiungere tale risultato è necessario allineare attentamente lo strumento in tutte le sue componenti in maniera da ottenere la massima intensità del segnale raccolto dai sensori e minimizzare il contributo aspecifico di segnali incongrui autogenerati dal sistema.

L'analisi di migliaia di cromosomi si realizza in pochi secondi e in situazioni ottimali ogni cromosoma può essere visualizzato in un istogramma dell'intensità di fluorescenza emessa dal DNA colorato con un *fluorocromo* specifico come singolo picco ossia come singola popolazione *sortable* (cariotipo di flusso).

Nei sistemi di *sorting* un cristallo piezoelettrico interrompe il flusso del campione in microgocce caricate elettrostaticamente solo se contenenti i cromosomi di interesse e

deflesse in *ependorf* o su vetrino da placche metalliche anch'esse cariche con un campo elettromagnetico indotto di $\pm 2500V$ (Fig. 4).

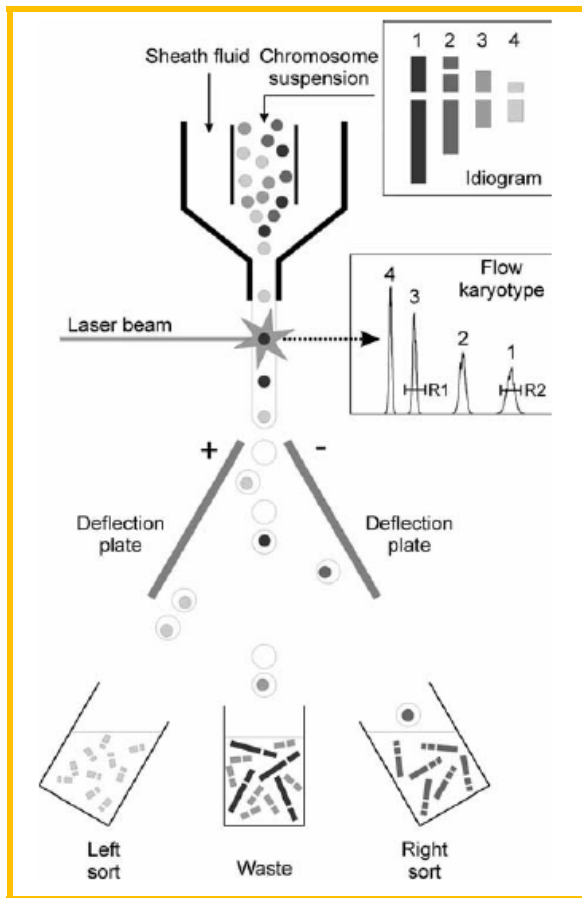


Fig. 4: Sistema di *sorting* di un *citofluorimetro*

Figura 4

I cromosomi isolati da un cariotipo a flusso sono in realtà contaminati da frammenti di DNA le cui dimensioni possono variare ed essere rappresentate da bracci cromosomici, cromatidi, doppietti e *clumps* di cromosomi. Queste particelle di solito formano un *background* continuo di detriti sul quale si sovraimpongono picchi cromosomici, presenti in alta concentrazione e quindi maggiormente rappresentati rispetto al rumore di fondo.

Tuttavia specifici frammenti e aggregati possono essere presenti ad alta frequenza e formare pertanto picchi propri. E' il caso dei cromatidi che formano picchi a metà dell'intensità di fluorescenza del relativo intero cromosoma [109]. Se, invece, l'intensità di fluorescenza relativa a frammenti o a *clumps* cromosomici è molto simile a quella dei

cromosomi integri, diventa più difficile discriminarli e possono inquinare le frazioni *sortate*.

E' per questo che risulta utile affiancare alla citofluorimetria la microscopia. La verifica della purezza della frazioni *sortate*, lì dove è possibile, si realizza attraverso l'ibridazione fluorescente *in situ* (FISH) di sequenze specifiche per i diversi cromosomi e con la valutazione morfologica degli stessi.

La citogenetica a flusso è pertanto una metodologia interessante per lo studio di genomi vegetali e animali e se, affiancata dalla microscopia, consente di verificare l'accuratezza dell'analisi e anche ampliare le speculazioni che si possono effettuare dopo il *sorting* cromosomico, seguendo, ad es., i riarrangiamenti evolutivi inter ed intra di singoli cromosomi separati e isolando quantità di cromosomi per il clonaggio e la costituzione di mappe fisiche.

OBIETTIVO DEL DOTTORATO

Obiettivo del dottorato

Il presente lavoro di dottorato si è prefisso l'obiettivo di sviluppare per il cece tecniche di citogenomica a flusso attraverso la messa a punto di protocolli idonei per la sincronizzazione del ciclo cellulare e la preparazione di sospensioni cromosomiche. L'istogramma relativo all'intensità di fluorescenza (cariotipo a flusso), ottenuto dopo l'analisi dei cromosomi colorati con opportuni composti in grado di legarsi al DNA ed emettere radiazioni a determinate lunghezze d'onda, è servito all'individuazione del cariotipo reale della specie, con la rilevazione dei picchi e delle corrispondenti frazioni *sortabili*. La cariotipizzazione è stata condotta su entrambi i tipi morfologici della specie, *desi* e *kabuli*. Sulle frazioni cromosomiche *sortate* è stato possibile effettuare il mappaggio fisico di regioni specifiche del genoma. Obiettivo finale del lavoro di dottorato è stato quello di localizzare sequenze marcatrici SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) associate alla resistenza a *Fusarium oxysporum* su linee *desi* e *kabuli* di cece e fornire le metodologie di base, così come è stato possibile fare per altre specie vegetali, per costruire librerie DNA sub-genomiche, utili per l'individuazione e il mappaggio fisico di regioni geniche codificanti per caratteri agronomici di rilievo, fondamentali per il miglioramento genetico della specie.

Obiettivi specifici del dottorato: sviluppo delle diverse attività

1. PRIMO ANNO:

- 1.1 Sincronizzazione del ciclo cellulare;
- 1.2 Ottimizzazione della preparazione di sospensioni cromosomiche;
- 1.3 Ottenimento del cariotipo a flusso della specie.

2. SECONDO ANNO:

- 2.1 *Sorting* cromosomico e assegnazione dei picchi a specifici cromosomi;
- 2.2 Verifica della purezza delle frazioni cromosomiche *sortate* attraverso la messa a punto di tecniche di ibridazione *in situ* (FISH).

3. TERZO ANNO:

3.1 Ibridazione fluorescente *in situ* (FISH) della sequenza *Ver17*

3.2 *Physical mapping* sulle frazioni *sortate* di marcatori associati a resistenza a *Fusarium*

MATERIALI E METODI

1.1 MATERIALE VEGETALE

L'ottimizzazione delle metodologie di citogenomica a flusso è stata realizzata su due cultivar, una del tipo desi (Otello, brevetto ENEA n°392, Brunori A. Crinò P. Vitale P., data deposito 23 Ottobre 1996) e una di tipo kabuli (Sultano, brevetto ENEA n°358, Saccardo F. Crinò P. Iaiani M. Calcagno F., data deposito 10 Maggio 1993).

Entrambe le cultivar sono state fornite dalla ditta sementiera MARTEA, Monreale (Palermo).

1.2 METODI

1.2.1 Sincronizzazione e blocco in metafase mitotica di apici radicali

Una sospensione cromosomica ottimale è necessaria per l'analisi citofluorimetrica e per il *sorting*; la sua qualità è stabilita in base alla frequenza di cromosomi integri, all'assenza di aggregati cromosomici e all'assenza di frammenti di DNA o cromatidi. Questo dipende in parte dalla procedura di isolamento meccanico seguito ma dipende molto dal grado di sincronizzazione del ciclo cellulare e dalla possibilità di accumulo di cellule in metafase mitotica. Infatti, una buona frequenza di piastre metafisiche nel tessuto sottoposto a sincronizzazione cellulare, è un fattore essenziale che influenza molto la qualità delle sospensioni. Dolezel *et al.*, 1992 [99] hanno dimostrato che i meristemi radicali risultano più facilmente sincronizzabili rispetto ad altri tessuti in attiva crescita e posso risultare idonei per isolare cromosomi integri indispensabili per la citometria a flusso. Per raggiungere un alto livello di sincronizzazione mitotica la procedura più efficace si è dimostrata quella del “doppio blocco”, per cui si abbina un trattamento con un inibitore della sintesi di DNA, tipo idrossiurea, con un composto in grado di bloccare, dopo la sincronizzazione cellulare, le cellule in metafase, inibendo quindi la formazione delle fibre del fuso mitotico che portano al distacco e alla migrazione ai poli dei cromatidi.

Nel presente lavoro la procedura di sincronizzazione e blocco delle cellule in metafase è stata seguita secondo il protocollo di seguito riportato sia per la cultivar *desi* Otello che quella *kabuli* Sultano:

1. Sterilizzare i semi con una soluzione acquosa al 7% di $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ per 10 minuti. Imbibire i semi in aeratore per 24 ore a 25°C. Porre i semi a germinare su carta bibula per 48 ore a 25°C. Quando le radichette hanno raggiunto una lunghezza di circa 2-3 cm, porre le plantule in soluzione di *Hoagland* [110] con idrossiurea (HU) 1,25mM.
2. Lavare i germinelli in acqua distillata a temperatura sempre di 25 °C e porli successivamente in *Hoagland* HU Free per 4,5h in aeratore a 25°C.
3. Lavare i germinelli in acqua distillata a temperatura controllata e porli in *Hoagland* con *orizalina* (DUCHEFA BIOCHEMIE, Olanda) 10µM per 2,5 h a temperatura di 25 °C in aeratore.
4. Togliere i germinelli dalla soluzione con *orizalina* e porli in acqua ghiacciata *overnight*.

1.2.2 Preparazione di *squash* metafisici per analisi citologica al microscopio

Prima di ottenere il cariotipo a flusso della specie, relativamente alle due cultivar, *desi* e *kabuli*, gli apici radicali sono stati trattati per ottenere degli “schiacciamenti” o *squash* su vetrino al fine di verificare la percentuale di cellule in metafase mitotica dopo il trattamento di sincronizzazione e blocco del ciclo cellulare.

A tal scopo è stato condotto il seguente protocollo di preparazione degli *squash*:

- Fissazione degli apici radicali in Carnoy (3:1 Etanolo 95% : Acido Acetico Glaciale) per 18 ore a 4°C;
- Lavaggio in acqua distillata degli apici per 3 volte successive;
- Idrolisi degli apici in HCL 1N per 15 minuti a 60°C;
- Lavaggio in acqua distillata degli apici per 3 volte successive;

- Colorazione con *Reattivo di Schiff* (Carlo Erba Reagenti, Italia) degli apici per 1 ora a temperatura ambiente;
- Lavaggio in acqua distillata degli apici per 3 volte successive;
- Idrolisi con soluzione enzimatica * pH 5,6 degli apici per 15 minuti a 37°C;
- Lavaggio in acqua distillata degli apici per 3 volte successive
- Asportazione dell'apice dalla radichetta (1 mm ca.), posizionamento dello stesso su vetrino portaoggetti in una goccia di acido acetico al 45% (5µl ca) e frammentazione. I vetrini sono stati precedentemente ben puliti con detergente in acqua e poi mantenuti in alcol etilico 70% per 18 ore.
- Posizionamento del vetrino coprioggetto esercitando una pressione normale rispetto al piano per favorire la dispersione del materiale sulla superficie ed evitando ogni slittamento laterale che danneggerebbe l'integrità cellulare del materiale.

* MES 0.11% (p/v), Cellulasi 1% (p/v) [Cellulase Onozuka RS, YAKULT HONSHA CO., LTD., Giappone], Macerasi 1% (p/v) [Macerozyme YAKULT HONSHA CO., LTD., Giappone], Pectoliasi 0,2% (p/v) [Pectolyase Y-23, DUCHEFA BIOCHEMIE, Olanda]

1.2.3 Analisi citofluorimetrica

1.2.3.1 Ottimizzazione della preparazione di sospensioni cromosomiche

Il rilascio in sospensione di cromosomi integri da cellule vegetali rappresenta il principale obiettivo per lo sviluppo della citogenetica a flusso in pianta. Sebbene siano state tentate altre vie per l'isolamento dei cromosomi, il metodo risultato ottimale consiste nell'omogeneizzazione degli apici radicali previa fissazione degli stessi in un *buffer* contenente formaldeide (Sigma Aldrich, Germania) [99]. Questa procedura, infatti, consente di migliorare la stabilità meccanica dei preparati, mantenendo invariate le caratteristiche morfologiche dei cromosomi isolati.

La buona qualità delle sospensioni permette un' idonea localizzazione delle sequenze di DNA attraverso l'ibridazione *in situ* [111] e dà la possibilità di sviluppare nuove linee di ricerca quali l'individuazione attraverso immunofluorescenza di proteine cromosomiali.

Sono state effettuate prove atte a determinare la migliore procedura di fissazione ed estrazione cromosomica dagli apici tramite cinetiche di trattamento con formaldeide a diversa concentrazione (1-2-3-4%) e per tempi diversi (10-20-30 min), sottoponendo gli apici a velocità estrattive diverse (9.000-13.500-20.000 rpm) per vari tempi di omogeneizzazione (10-13-15-18 sec).

Nel presente lavoro la fissazione degli apici radicali è stata condotta utilizzando un *buffer* di fissazione al 3% di formaldeide, per 30 minuti a 4°C e successiva estrazione in LB01 [112] a 13.500 rpm per 18sec utilizzando un omogeneizzatore (Ultra-Turrax T 25, Janke & Kunkel, IKA®-LABORTECHNIK, Germania).

1.2.3 Cariotipizzazione a flusso della specie

Dall'analisi citofluorimetrica di una specie è possibile ottenere un cariotipo dopo aver preparato gli isolati cromosomici con coloranti in grado di interagire specificatamente, attraverso legami di tipo ionico o covalente, con la molecola di DNA. Il risultato è dato da una serie di picchi corrispondenti a cromosomi singoli o gruppi cromosomici distinti in base al diverso grado di intensità di fluorescenza, parametro direttamente correlato al relativo contenuto di DNA.

Secondo Ohri [114] il cariotipo teorico del cece consiste di 5 picchi mentre secondo Ocampo [115] di 7. Dall'analisi citofluorimetrica condotta da Vlacilova [26] il cariotipo a flusso mostra 8 picchi con un coefficiente di variabilità che oscilla tra 1,7-2,3%.

Il cariotipo a flusso ottenuto nel presente lavoro ha rilevato la presenza di 5 picchi come in quello teorizzato da Ohri, di cui risultano *sortabili* 3 o 4, con un coefficiente di variabilità oscillante tra 1,7-2%. Nel primo picco ricade il cromosoma metacentrico più piccolo (cromosoma H), nella seconda frazione *sortabile* sono inclusi i cromosomi G, E, D, F e C di cui quest'ultimo è l'unico cromosoma sub metacentrico; il terzo picco include i

cromosomi B ed A, di cui A risulta satellitato e ricade in un picco unico nel caso della cultivar Otello.

1.2.4 Sorting cromosomico e assegnazione dei picchi a specifici cromosomi

La sospensione cromosomica, ottenuta dopo la sincronizzazione e il blocco in orizalina degli apici radicali, è stata colorata con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole) ad una concentrazione finale di 2 µg/ml ed analizzata ad una velocità compresa tra le 300-500 particelle al secondo utilizzando il citometro a flusso *FACStar Plus* dotato di *sorter* (Becton Dickinson, Mountain View, CA – USA).

Lo strumento è equipaggiato con un laser ad argon in grado di sviluppare una potenza di 300 mW in UV (emissione multilinea 353-361nm). Una soluzione di 50mM di NaCl è stata impiegata come *sheat fluid*.

L' intensità di fluorescenza emessa dai cromosomi colorati in DAPI è stata valutata dall'analisi di 2 istogrammi riportanti i relativi valori di FL1-H (Fluorescence Height = fluorescenza altezza) e FL1-A (Fluorescence Area = fluorescenza area) e da un *dot plot* che riporta sull'asse delle ascisse i valori di FL1-H e sull'asse delle ordinate i valori di FSC (*Forward Scatter*). Di ogni sospensione sono stati analizzati almeno 10000 cromosomi per l'ottenimento dei relativi istogrammi di fluorescenza. I cromosomi sono stati successivamente sortati ad una frequenza di 50-100/s in base alla diversa composizione dei picchi e sulla base dei valori caratteristici di FL1-A e FL1-W (Fluorescence Width).

I cromosomi sono stati sortati su vetrino e osservati al microscopio e fotografati per la loro caratterizzazione indicativa su base morfologica.

1.2.5 Caratterizzazione delle frazioni cromosomiche *sortate* attraverso la messa a punto di tecniche di ibridazione *in situ* (FISH)

1000 cromosomi sono stati sortati da ciascun picco in 10µl di LB01 contenente 5% di saccarosio. Affinché i cromosomi possano essere identificati in maniera univoca si utilizzano le capacità discriminanti della FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*).

A tale scopo è stata sviluppata una sonda ribosomiale *Ver17* rappresentante le sequenze di rDNA 18s e 25s [116]. L'ibridazione su vetrino dei cromosomi di cece è stata eseguita secondo il protocollo di Neumann [117]: 1 µg di sonda è stata marcata con biotina-11-dUTP (Fermentas International INC, Canada) mediante *nick translation* in accordo con il protocollo proposto da Kubalakova [118]: biotin-11-dUTP 25 µM, β-mercaptoetanol 10 µM, dACG 50 µM (Fermentas International INC, Canada), TTP 5 µM (Fermentas International INC, Canada), buffer 1X (Tris-HCl pH 8,00 0,5M, MgCl₂ 50mM, BSA 0,5 mg/ml), DNA Polimerasi I (Fermentas International INC, Canada) 1 U e DNAsi I (Sigma-Aldrich, Germania) 0,2 U in 50 µl di volume di reazione finale, a 15°C per 1,5 ore. La sonda è stata successivamente denaturata, contemporaneamente ai cromosomi seccati all'aria su vetrino, in un buffer 1X SSC contenente 40% formammide (v/v), 10% di destrano solfato (p/v) e 250 mg/ml di DNA di sperma di salmone a 80°C per 10 min. L'ibridazione è stata condotta a 37°C *overnight* con successivi lavaggi stringenti a 42°C in 0,1XSSC, 2mmol/l MgCl₂ e 0,1% Triton X-100 secondo la modalità indicata in tabella 1.1. I siti di ibridazione sui cromosomi sono stati rilevati mediante anti-biotina FITC (Sigma-Aldrich, Germania) e successiva amplificazione del segnale con antimouse-FITC (Sigma-Aldrich, Germania). Per la visualizzazione al microscopio, i vetrini sono stati colorati in DAPI µg/ml addizionato con soluzione *Antifade* (ProLong® Gold Antifade Reagent, Molecular Probe, USA) .

Lavaggi post ibridazione	Temperature	Tempi
2X SSC*	42°C	10 min
0,1X SSC	42°C	5 min
2X SSC	42°C	10 min
2X SSC	Temperatura ambiente	10 min
4X SSC/ Tween 0,1%	Temperatura ambiente	10 min
Blocking buffer**	Temperatura ambiente	15 min

Tabella 1.1: Sequenza e modalità dei lavaggi post ibridazione dei vetrini.

* 0,3 M NaCl, 0,03 M sodio citrato, 0,1 mM EDTA,

** 5 % BSA in 4xSSC 0.03 % Tween 20

1.2.6 *Physical mapping* di marcatori associati alla resistenza a *Fusarium oxysporum*

Per il mappaggio fisico di marcatori SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) associati alla resistenza a *Fusarium* [66] sono stati *sortati*, dai picchi rilevabili dal cariotipo a flusso, circa 1500 cromosomi per il picco 1 e 3 e 4400 cromosomi dal picco 2. Ogni frazione è stata *sortata* in eppendorf in un volume variabile di acqua sterile: 18 µl per i picchi 1 e 3 e 15 µl per il picco 2 per ottenere un volume finale di 20µl. I cromosomi sono stati successivamente conservati a -20°C fino al momento del loro impiego. Prima del loro uso in PCR, i cromosomi sono stati sottoposti a un doppio scongelamento a 94°C per 5 min con successivo passaggio su *vortex* al fine di favorire lo spaccettamento cromosomico. L'amplificazione su termociclatore *Mastercycler gradient thermocycler* (Eppendorf, Hamburg, Germania) è stata condotta in un volume finale di 50µl contenente 10mmol/l Tris Buffer, 1,5mmol/L MgCl₂, 0,2Mmol/L dNTPs, 5 unità/100µl di *Taq DNA Polimerase* (Sigma, St. Louis, USA) e 40nmol di *primer* SCAR (tabella 1.2).

Le PCR sono state realizzate alle seguenti condizioni: denaturazione iniziale a 94°C per 5 min seguita da 35 cicli consistenti in 20sec a 94°C, 50sec alla temperatura di

annealing specifica per i diversi *primer* (tabella 1.2) e 50s a 72°C con un' estensione finale a 72°C per 10 min. I prodotti di PCR sono stati analizzati su gel di agarosio all' 1,5% e visualizzati mediante colorazione in bromuro di etidio.

<i>Marker</i>	<i>Sequenza primer left e right 5'-3'</i>	<i>Dimension e marker bp</i>	<i>Temperatura di annealing °C</i>
OP-M20-2	GTCTTGGGACTGTGCGTTTC AGGTCTTGGGCCATGGAG	1045	58
OP-M20-3	GTCTTGGGCAAAAGATTCCA AGGTCTTGGGCCATGGAG	1103	56
OP-P06-4	GGCTGACGTGATGATGTTCTT GGCTGACGATTGTCTACAAGG	784	58
OP-P08-1	CATCGCCCAATTAAGAGTTAGA TCGCCCATCTAATTGTGTGT	314	56
OP-P15-3	AAGCCAACCACTAAATAA AAGCCAACGATTGTGAAAGG	490	54
OP-P15-4	GAAGCCAACCAGAGATAAGG GCCAACAACCATACAAAAA	492	54
OP-U17-1	ACCTGGGGAGCCTGAGAC TGGGGAGAAACAAAATGGAG	1014	54
R-2609-1	CCTACGGAGGACGAAAATGA GGACAGGGATGGAGATGGTA	855	58

Tabella 1.2: Elenco dei *primer* per l'amplificazione di sequenze SCAR associate a resistenza a *Fusarium foc4* [66]

RISULTATI

2.1 Sincronizzazione del ciclo cellulare

L'analisi al microscopio di cromosomi isolati dopo la sincronizzazione e il blocco in metafase mitotica (Fig. 2.1), ha mostrato come le cellule degli apici radicali abbiano risposto in modo soddisfacente ai trattamenti e ai tempi di incubazione prima con idrossiurea e poi con orizalina.

La scelta dell'orizalina come inibitore della formazione del fuso mitotico, essenziale per ottenere il blocco in metafase delle cellule in attiva divisione, è stata subordinata alla necessità di limitare la formazione di *clumps* cromosomici che si formavano con maggiore frequenza se si utilizzava l'APM (amiprophos - methyl).

L'efficienza della sincronizzazione è stata stimata essere del 50% circa di cellule in metafase sul totale delle cellule in divisione.

L'analisi al microscopio ha rilevato anche una buona morfologia, intesa come grado di condensazione cromosomica, e un'elevata percentuale di cromosomi integri (300 cromosomi/sec ad un *flow rate* del campione di 0,4 ml/min pari ad una concentrazione di 5×10^4 cromosomi/ml ca.) pertanto idonei all'analisi citofluorimetrica.

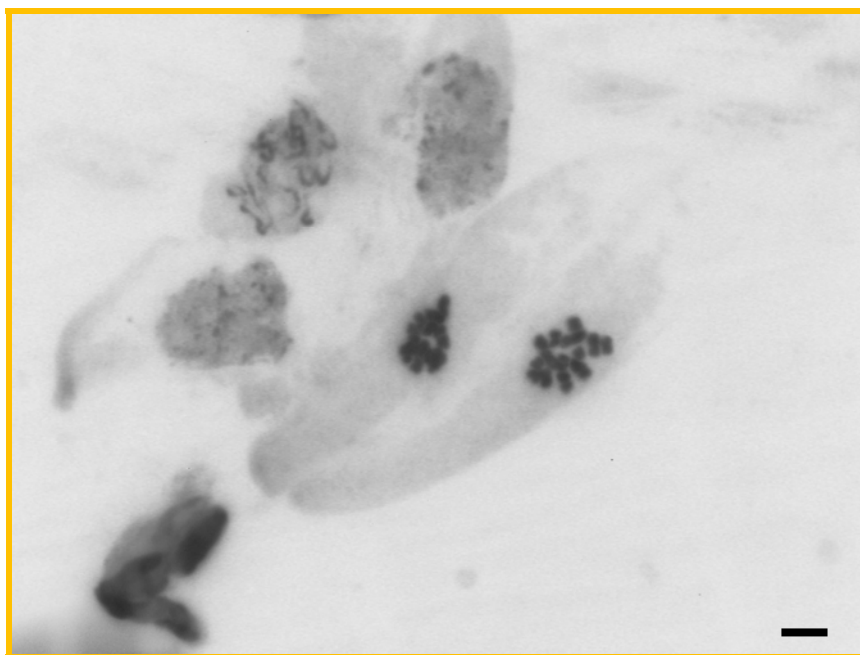


Fig. 2.1: Dettaglio (*scale bar*=20 μ m) di due metafasi di cece (cultivar Otello) osservate al microscopio e ottenute da apici radicali sincronizzati con idrossiurea 1.25 mM per 18 ore a 25°C e bloccati con *orizalina* 10 μ M per 2,5 h a 25°C

2.2 Ottimizzazione della preparazione di sospensioni cromosomiche

I tempi di trattamento e la concentrazione di formaldeide influenzano sia la quantità di cromosomi che la loro integrità dopo il rilascio in sospensione a seguito di omogeneizzazione meccanica degli apici radicali.

Le sospensioni ottenute dopo l'omogeneizzazione degli apici radicali fissati a percentuali del 2 e 4% di formaldeide avevano una maggiore concentrazione, ma con una maggiore frequenza di cromosomi non integri. Il miglior rapporto tra resa e integrità cromosomica è stato ottenuto dopo fissazione al 3% di formaldeide per 30 minuti a 5°C, utilizzando per la preparazione 30 apici radicali per 1 ml di sospensione. La resa in cromosomi è stata pari a circa 5×10^5 cromosomi/ml.

2.3 Cariotipizzazione della specie

La cariotipizzazione a flusso di *Cicer arietinum* L. è stata ottenuta dopo analisi citofluorimetrica di sospensioni cromosomiche delle due cultivar Otello e Sultano. Secondo Ohri [114] il cariotipo teorico del cece consiste di 5 picchi mentre secondo Ocampo [115] di 7. Dall'analisi citofluorimetrica condotta da Vlacilova [26] il cariotipo a flusso mostra 8 picchi con un coefficiente di variazione (CV) che oscilla tra 1,7-2,3%.

Il cariotipo a flusso ottenuto nel presente lavoro (Figure 2.2 e 2.3) ha rilevato la presenza di 5 picchi come in quello teorizzato da Ohri, di cui risultano *sortabili* 3-4 (Sultano e Otello, rispettivamente), con un CV oscillante tra 1,7-2%. Nel primo picco ricade il cromosoma metacentrico più piccolo (cromosoma H), nella seconda frazione *sortabile* sono inclusi i cromosomi G, E, D, F e C di cui quest'ultimo è l'unico cromosoma sub metacentrico; il terzo picco include i cromosomi B ed A, di cui A risulta satellitato.

La sospensione cromosomica, ottenuta dopo la sincronizzazione e il blocco in orizalina degli apici radicali, è stata colorata con DAPI ad una concentrazione finale di 2 µg/ml ed analizzata ad una velocità compresa tra le 300-500 particelle al secondo utilizzando il

FACS Star Plus dotato di *sorter*. Di ogni sospensione sono stati analizzati circa 10000 cromosomi per l'ottenimento dei relativi cariotipi a flusso.

Per la cultivar Otello (tipo *desi*) sono stati rilevati 4 picchi sugli istogrammi di fluorescenza (*FLH* = *Fluorescence Height* e *FLA* = *Fluorescence Area*) corrispondenti ad altrettante popolazioni sui *Dot Plot* delle fluorescenze e del *Forward Scatter* (Fig.2).

Per la cultivar Sultano (tipo kabuli) sono stati evidenziati 3 picchi sugli istogrammi corrispondenti ad altrettante popolazioni sui *Dot Plot* delle fluorescenze *FLH* e *FLA* e del *Forward Scatter* e *FLW* (Fig. 3).

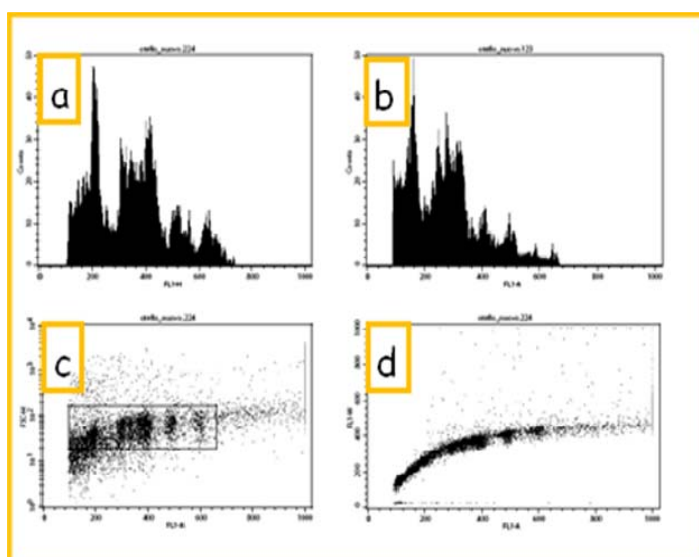


Fig. 2.2: Cariotipizzazione della cultivar Otello: a. Istogramma della *Fluorescenza Altezza* (FLH), b. Istogramma della *Fluorescenza Area* (FLA), c. *Dot Plot* FLA/FSC (*Forward Scatter*), d. *Dot Plot* FLA/FLW (*Fluorescence Width*)

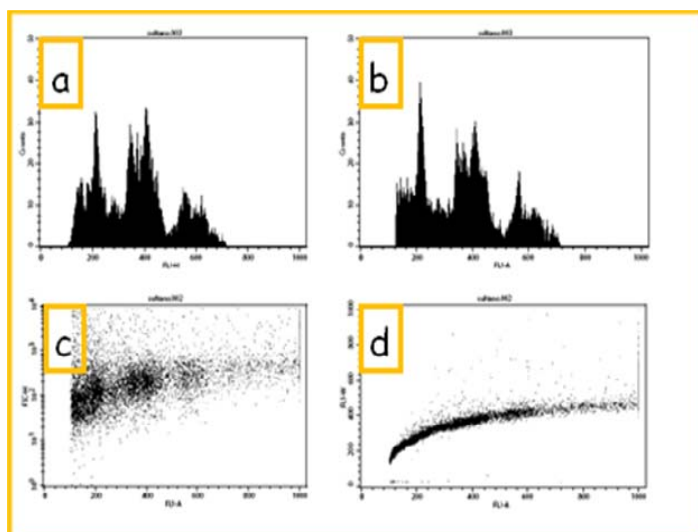


Fig. 2.3: Cariotipizzazione della cultivar Sultano: a. Istogramma della *Fluorescenza Altezza* (FLH), b. Istogramma della *Fluorescenza Area* (FLA), c. *Dot Plot* FLA/FSC (*Forward Scatter*), d. *Dot Plot* FLA/FLW (*Fluorescence Width*)

2.4 *Sorting* cromosomico e caratterizzazione morfologica dei picchi sortati

Prima di effettuare la caratterizzazione morfologica dei cromosomi e il mappaggio fisico (*physical mapping*) di sequenze di DNA specifiche è stato necessario effettuare il *sorting* dai diversi picchi che caratterizzano il cariotipo a flusso di Otello e Sultano.

I cromosomi sono stati *sortati* ad una frequenza di 5-50/s in base alla diversa composizione dei picchi e sulla base dei valori caratteristici di FL1-A (*Fluorescence Area*) e FL1-W (*Fluorescence Width* = Ampiezza del segnale di fluorescenza).

I 1000 cromosomi *sortati* su vetrino sono stati successivamente seccati all'aria prima dell'osservazione al microscopio e hanno mostrato di perdere facilmente la loro morfologia se non *sortati* in 5 μ l di LB01 addizionato del 5% di saccarosio.

Dall'osservazione al microscopio è stato possibile caratterizzare morfologicamente i cromosomi per cui è stato possibile determinare la composizione di ciascun picco per ognuno dei cariotipi a flusso di Otello e Sultano.

In entrambi i cariotipi nel picco I è presente il cromosoma H metacentrico di dimensione più piccola rispetto agli altri; nel picco II sono stati caratterizzati i cromosomi metacentrici G, E, D, F e quello submetacentrico C: nel picco III di Otello è presente il cromosoma metacentrico B; nel picco IV di Otello è presente il cromosoma *satellitato* A. I due cariotipi sono risultati uguali fatta eccezione per il picco III di Sultano che include entrambi i cromosomi B e A (Fig. 2.6).

Per il *sorting* in *ependorf* è stato effettuato un calcolo del DNA totale necessario per un'amplificazione PCR e per ottenere, nel caso di frazioni composte da più cromosomi, una buona rappresentatività di ciascun tipo senza incrementare troppo il numero complessivo di cromosomi per *ependorf* che avrebbe reso difficile lo spaccettamento di questi prima di eseguire la PCR. Stimando il contenuto di DNA per nucleo 2C pari a circa 1,53pg (1476Mbp) [1] nel caso di picco I a singolo cromosoma, ossia il cromosoma più piccolo H del cariotipo a flusso di entrambe le cultivar, e il picco III e IV di Otello sono state *sortate* 1500 particelle corrispondenti ad una quantità di DNA di 0,14ng ; per il picco II sia di Otello che di Sultano, che include 5 tipi cromosomici, sono state *sortate* 4500 particelle corrispondenti a 0.42ng di DNA totale; per il picco III di Sultano, che include due tipi cromosomici, sono state *sortate* 2200 particelle corrispondente a 0,20ng di DNA totale.

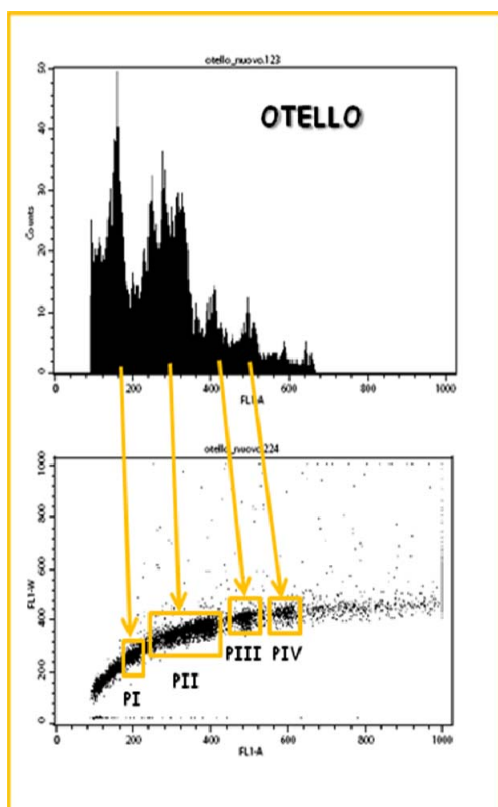


Fig. 2.4: Istogramma della FLA e *Dot Plot* FLA/FLW di Otello e indicazione su quest'ultimo delle aree di *sorting* cromosomico

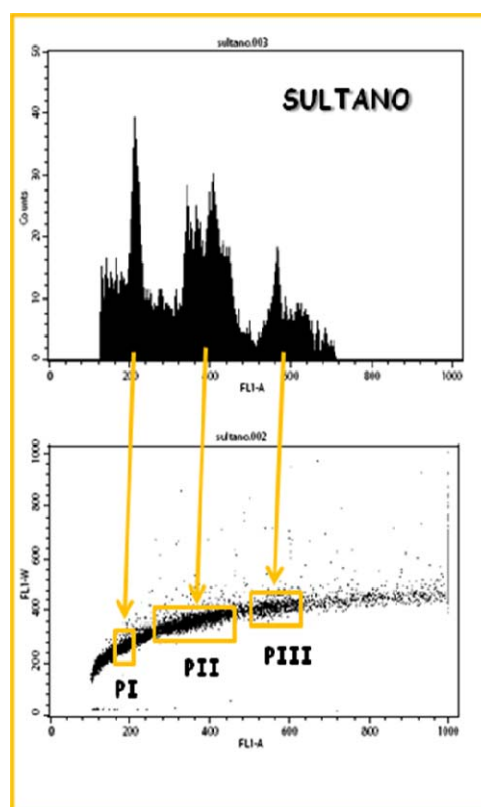


Fig. 2.5: Istogramma della FLA e *Dot Plot* FLA/FLW di Sultano e indicazione su quest'ultimo delle aree di *sorting* cromosomico

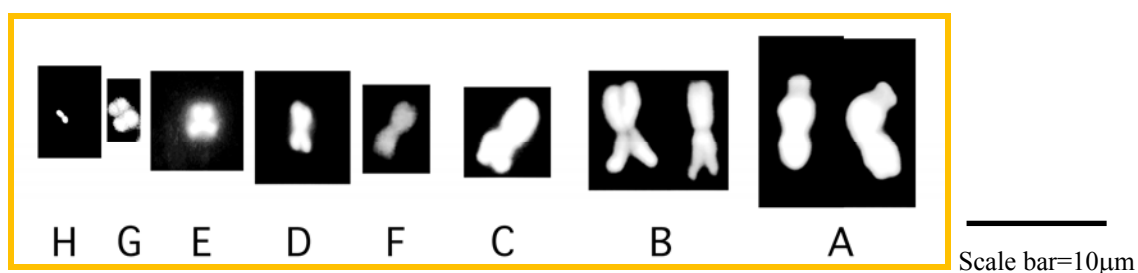


Fig. 2.6: cromosoma **H**, corrispondente al Picco I di Otello e Sultano; cromosoma **G**, cromosoma **E**, cromosoma **D**, cromosoma **F**, cromosoma **C**, inclusi nel Picco II di Otello e Sultano; cromosoma **B**, presente nel Picco III di Otello e Sultano; cromosoma **A**, presente nel Picco IV di Otello e nel Picco III di Sultano.

2.5 Physical mapping sulle frazioni sortate di marcatori associati a resistenza a *Fusarium*

Nel lavoro di Benko-Iseppon *et al.*, 2003 è stata considerata una popolazione segregante di 131 linee ricombinanti ottenute dall'incrocio tra *Cicer arietinum* L. (parentale resistente) e *Cicer reticulatum* L. (parentale suscettibile) per ottenere marcatori strettamente associati ai loci per la resistenza a *fusarium foc4* e *foc5*. La *Bulked Segregant Analysis* (BSA), attraverso il clonaggio di marcatori risultati polimorfici di tipo DAF (DNA Amplification Fingerprinting), ha permesso di generare marcatori *single copy* di tipo SCAR da utilizzare per la *Marker Assisted Selection*. Per otto marcatori DAF sono stati disegnati otto coppie di *primers* SCAR testati nel presente lavoro per il mappaggio fisico delle relative sequenze sulle frazioni *sortate* dal cariotipo a flusso di cece, sia in Otello che in Sultano. I marcatori presi in considerazione sono risultati, dal suddetto lavoro, appartenente al gruppo di associazione LG2 di cece e associati alla resistenza a *fusarium foc4*. La loro distanza genetica rispetto a *foc4* varia da 4.1 a 9 cM. Quattro di questi marcatori hanno generato prodotti di amplificazione unici ripetendo tre volte le relative amplificazioni.

Le PCR eseguite sulle frazioni cromosomiche delle due cultivar di cece hanno generato prodotti di amplificazione nel secondo picco sia in Otello che in Sultano (Fig. 2.7a-f).

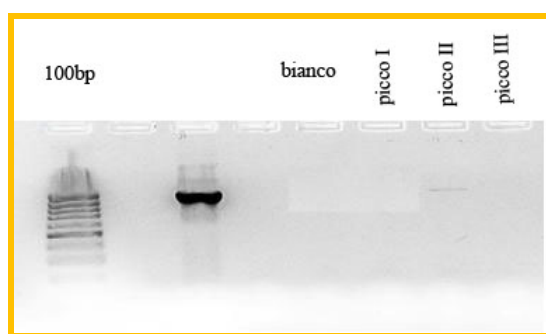


Fig. 2.7_a

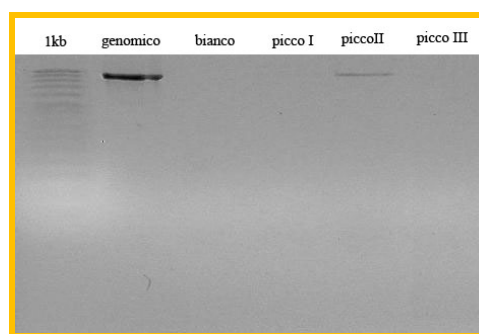


Fig. 2.7_b

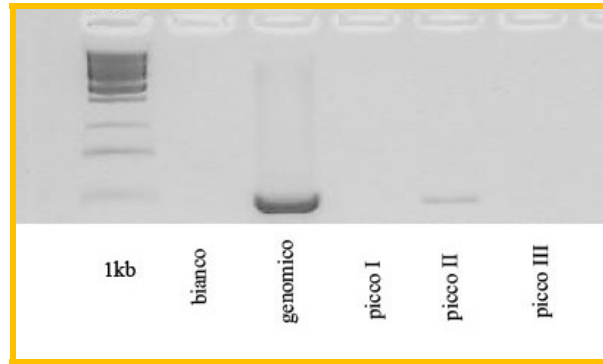


Fig. 2.7_c

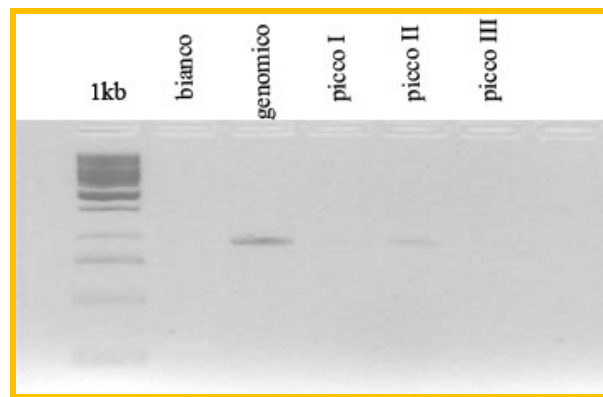


Fig. 2.7_d



Fig. 2.7_e

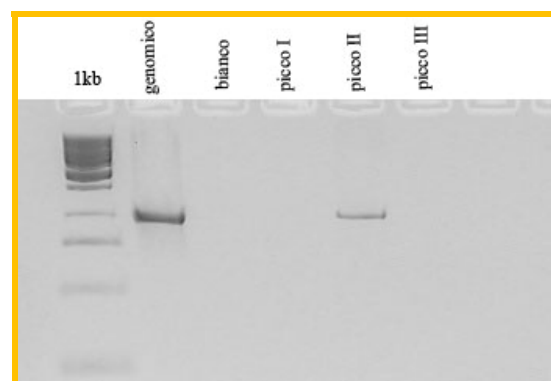


Fig. 2.7_f

Fig. 2.7: **a.** OP-M20-2, Otello; **b.** OPU-17, Otello; **c.** OPU17, Sultano; **d.** OP-P15-3, Sultano; **e.** OP-M20-2, Sultano; **f.** OP-P08, Sultano.

Nelle amplificazioni sono stati utilizzati singolarmente tutti i picchi *sortati* (P1, P2 e P3) e come controlli il DNA genomico delle rispettive cultivar (G) e il bianco (B, no DNA). Sebbene nella cultivar Otello i picchi sortabili fossero 4 , per cautela, ricadendo tale picco in una zona ricca di detriti che avrebbero potuto falsare i risultati delle amplificazioni, il *sorting* è stato fatto includendo il cromosoma satellitato A nella popolazione che include il cromosoma B (picco III).

2.6 Ibridazione fluorescente *in situ* (FISH) della sequenza *Ver17*

L' identificazione dei cromosomi dopo il loro *sorting* dal cariotipo a flusso è subordinata alla caratterizzazione morfologica e all'ibridazione *in situ* di sonde specifiche, in grado di fornire *pattern* di ibridazione inequivocabilmente attribuibili ad un dato cromosoma. Ciò è stato possibile farlo in frumento [119], disponendo di sonde microsatelliti in grado di generare profili di ibridazione unici per i diversi cromosomi, mentre per il cece tali sequenze non sono state ancora identificate. Vlacilova *et al.*, 2002 [26] hanno utilizzato per l'assegnazione dei cromosomi ai diversi picchi del cariotipo a flusso, la sonda 5s rDNA che da sola non riuscirebbe a identificare un cromosoma poiché ibrida solo con alcuni cromosomi del cariotipo di cece, rendendo così impossibile una caratterizzazione univoca e completa dell'intero corredo cromosomico.

Inoltre, i cromosomi di cece, relativamente agli esperimenti eseguiti presso il nostro laboratorio, presentano un'elevata instabilità morfologica durante le fasi di ibridazione *in situ* che pregiudica, quindi, i risultati ottenibili dalla mappatura di sequenze di DNA di interesse mediante FISH.

Nel presente lavoro è stato ottimizzato il protocollo FISH su cece utilizzando la sonda codificante per le subunità ribosomiali 18s e 25s (*Ver 17*). L'obiettivo è stato quello di ottenere una procedura che preservasse la morfologia dei cromosomi e che potesse essere utilizzata successivamente per il mappaggio di sequenze di interesse.

In Figura 2.8 (a,b) vengono mostrati i risultati dell'ibridazione di *Ver17* sul cromosoma satellitato A.

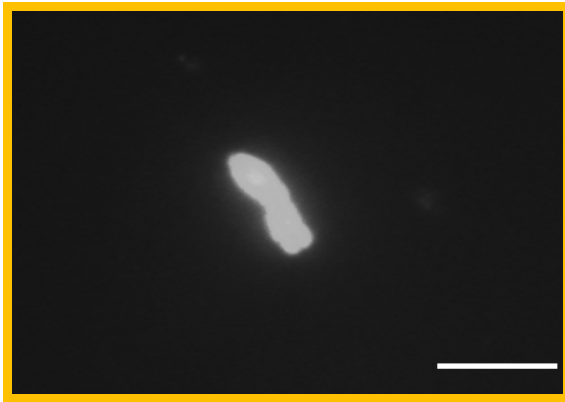


Fig. 2.8_b

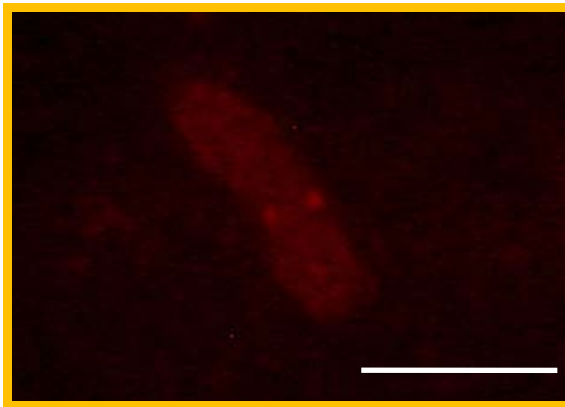


Fig. 2.8_a

Fig. 2.8: **a.** Cromosoma A satellitato di Otello colorato in DAPI (scale bar=10 μ m) e **b.** ibridato con la sonda *Ver 17* (scale bar=10 μ m)

DISCUSSIONE

Discussione

I cromosomi *sortati* dal cariotipo a flusso di una specie sono stati utilizzati per facilitare lo studio dei genomi di un certo numero di colture e piante modello [120],[121],[105].

La citogenetica a flusso ha trovato la sua applicazione più ampia nell'ambito dello studio dei genomi dei cereali e dei legumi [107], [105], [106]. Tali lavori, per quanto riguarda le leguminose, si sono concentrati soprattutto su tre specie: pisello, fava e cece.

Per il cece, la cultivar Otello è stata scelta poiché appartenente al tipo microsperma e in quanto tale non ancora caratterizzata per il suo cariotipo a flusso. Inoltre le cultivar *desi*, più rustiche di quelle del tipo kabuli, possono risultare interessanti per la localizzazione cromosomica di caratteristiche agronomiche importanti quali ad esempio le resistenze a malattie parassitarie o tolleranze a stress abiotici. Sultano è stata scelta per le sue caratteristiche commerciali che la rendono tra le cultivar più coltivate in Italia.

Il presente lavoro aggiunge nuovi risultati a quelli già raggiunti da Vlacilova *et al.*, 2002 [26] per quanto riguarda l'ottenimento del cariotipo a flusso anche su una cultivar di tipo desi (Otello) e il mappaggio fisico di marcatori appartenenti al gruppo di associazione LG2 e strettamente associati alla resistenza a *fusarium*.

Il primo obiettivo da raggiungere per l'analisi citofluorimetrica e il *sorting* è una sospensione cromosomica la cui qualità può essere intesa come frequenza di cromosomi intatti e assenza di *clumps* o frammenti cromatidici. Questi due requisiti sono elementi fondamentali che possono facilitare la discriminazione di singoli cromosomi in un cariotipo a flusso garantendo il loro *sorting* ad elevata purezza [122], [98]. Indispensabile e preliminare all'isolamento cromosomico è la frequenza di cellule in metafase mitotica nei tessuti vegetali utilizzati per l'ottenimento della sospensione.

Dolezel *et al.*, 1992 [99] hanno dimostrato che gli apici radicali rispondono in modo efficiente alle procedure di sincronizzazione e forniscono sospensioni di cromosomi intatti, idonei per l'analisi citofluorimetrica.

Per raggiungere un elevato grado di sincronizzazione degli apici radicali di cece, è stato realizzato un trattamento con idrossiurea, come inibitore della sintesi del DNA e successivamente applicata una sostanza (nello specifico orizalina) in grado di bloccare la

formazione del fuso mitotico [99]. Dai dati reperiti in bibliografia [98], [26], sono stati scelti concentrazioni e tempi di trattamento che fossero in grado di sincronizzare efficientemente le cellule degli apici radicali all'interfaccia tra la fase G1/S e successivamente bloccarle in metafase.

Il rilascio di cromosomi integri da parte delle cellule vegetali ha rappresentato uno degli ostacoli maggiori per lo sviluppo della citometria a flusso in pianta. Sebbene siano stati provati sistemi diversi per il superamento di questo ostacolo, quello della omogeneizzazione meccanica, successivamente alla fissazione degli apici radicali con formaldeide [99], [123], [124] rappresenta attualmente la più efficiente procedura per l'ottenimento di sospensioni ad alta concentrazione di cromosomi. [125]. *a.*[101] hanno dimostrato che la fissazione con formaldeide degli apici meristematici di radice migliora la resa e la stabilità meccanica dei cromosomi isolati. La stabilità morfologica dei cromosomi in sospensione rappresenta un prerequisito fondamentale che garantisce l'ottimizzazione dei protocolli di ibridazione *in situ* per la localizzazione fisica di sequenze cromosoma-specifiche.

L'analisi citofluorimetrica in cece ha portato all'ottenimento del cariotipo a flusso della specie, relativamente sia alla cultivar macrosperma o kabuli (Sultano) che alla cultivar microsperma o desi (Otello). Dall'analisi degli istogrammi di fluorescenza è emersa una discrepanza dei risultati ottenuti nel presente lavoro rispetto a quelli ottenuti da Vlacilova *et al.*, 2002 [26]: il cariotipo generato dall'analisi citofluorimetrica sia di Otello che Sultano presenta un minor numero di picchi di fluorescenza rispetto al lavoro citato ma presenta una maggiore analogia con il cariotipo convenzionale generato da Ohri *et al.*, 1999 [114] sulla base delle misure effettuate direttamente sui cromosomi metafasici.

La ragione di questa discrepanza non è facile da interpretare. E' possibile che le dimensioni dei cromosomi varino in relazione al genotipo analizzato. Tale ipotesi è supportata da un lavoro di Venora *et al.* [126] che hanno individuato piccole differenze nella lunghezza dei cromosomi tra le varie cultivar della specie.

L'identificazione dei cromosomi *sortati* dai diversi picchi del cariotipo a flusso rappresenta la difficoltà maggiore di uno studio di tipo citogenetico. Essa rappresenta una fase fondamentale per il riconoscimento della composizione di picchi e valutazione

della purezza del *sorting*. Se per altre specie, come i frumenti [119], sono disponibili diverse sonde in grado di caratterizzare mediante i loro profili di ibridazione i diversi cromosomi, in cece manca tale disponibilità. Sebbene siano state utilizzate in precedenti lavori sonde ribosomiali e telomeriche [127], [128], [26] queste risultano limitatamente efficienti per la discriminazione dei diversi cromosomi di cece. Pertanto risulta necessaria una caratterizzazione morfologica e l'individuazione, in futuro, di sonde idonee a generare profili di ibridazione unici per i diversi cromosomi.

Un altro punto critico del lavoro è stato l'ottimizzazione dei protocolli di ibridazione *in situ*. Se è vero che la caratterizzazione dei cromosomi debba passare attraverso il rilevamento di profili FISH specifici, bisogna sottolineare le difficoltà relative all'individuazione di protocolli in grado di generare efficientemente *pattern* di ibridazione unici e che preservino le caratteristiche morfologiche dei cromosomi. Pertanto nel presente lavoro è stato messo a punto un protocollo di ibridazione con la sonda ribosomiale *Ver17* caratterizzante il cromosoma satellitato A, utilizzata con successo sia in *Vicia faba* L. che in *Pisum sativum* L. [129].

La possibilità di *sortare* direttamente in *eppendorf* i diversi tipi cromosomici ha portato al mappaggio fisico di sequenze interessanti. E' infatti sufficiente un ridotto numero di cromosomi per poter eseguire un' amplificazione PCR per il *physical mapping* di marcatori molecolari già individuati a livello genomico e appartenenti a gruppi di associazione specifici.

Impiegando tale strategia, è possibile integrare mappe genetiche e mappe fisiche. Inoltre, poiché la citofluorimetria consente di isolare grandi quantità di cromosomi, per preparare DNA ad alto peso molecolare da manipolare successivamente [130], è possibile utilizzare i cromosomi per la costruzione di librerie BAC sub genomiche. Infatti, data la ridotta risoluzione del cariotipo a flusso delle varietà di cece da noi utilizzate, che non consente di ottenere picchi riconducibili ad un unico tipo cromosomico, potrebbe essere possibile solo la creazione di librerie sub genomiche che difatti rendono più accessibile lo studio e il sequenziamento del DNA della specie poiché si riduce il campo di indagine non più all'intero genoma ma ad una parte ben definita di esso.

CONCLUSIONI

Conclusioni

Venticinque anni dopo la pubblicazione dell'articolo di Galbraith *et al.*, 1983 [131], la citofluorimetria in pianta è diventata una metodologia abbastanza diffusa con campi di applicazione che vanno dalla ricerca di base a quella applicata al settore industriale. Negli ultimi anni sono, inoltre, emerse nuove applicazioni: la citofluorimetria è particolarmente indicata per l'analisi di popolazioni numerose come quelle oggetto di studi tassonomici, di biologia di popolazione ed ecologia. Un'altra area interessata dall'impiego della citogenetica a flusso è quella relativa alla determinazione delle dimensioni del genoma di un essere vivente oltre che il livello di plodia.

La *citofluorimetria* facilita l'acquisizione simultanea di un ampio *range* parametrico con un livello di accuratezza e rapidità sempre crescenti. Al contrario di altre tecniche, che generano valori medi di intere popolazioni oggetto di analisi, un *citofluorimetro* è in grado di produrre e acquisire valori unici per ogni singola particella. Le proprietà multiple delle cellule stesse possono essere quantificate e possono essere indagate anche le relazioni intercorrenti tra queste in maniera più realistica rispetto a metodiche che comportano la realizzazione di singoli esperimenti per la determinazione di ciascuna proprietà. Ciò comporta una migliore comprensione dei fattori di funzionamento cellulare.

Accanto ai vantaggi sopra menzionati, la citofluorimetria presenta alcune limitazioni che riguardano l'impossibilità di ottenere informazioni morfologiche delle particelle analizzate. Sebbene sia possibile ottenere indicazioni riguardo al volume, il diametro o la superficie esterna e macroscopiche alterazioni della costituzione citoplasmatica (e.g. cloroplasti, vacuoli), ciò rappresenta in realtà una semplificazione della complessità morfologica e strutturale di un sistema biologico. Inoltre la necessità di disporre di sospensioni a elevata concentrazione di particelle potrebbe rappresentare un ostacolo. Per questo la citofluorimetria deve essere affiancata dalla microscopia che rende la metodologia più flessibile e completa [132].

Nel presente lavoro è stato possibile ottenere i cariotipi a flusso delle forme macro e microsperma di cece. Per la prima volta è stato effettuato il mappaggio fisico di sequenze associate a geni di resistenza a *Fusarium*. Queste tecniche sono state sviluppate su varietà italiane di cece e la scelta di questa specie è stata suggerita dalla necessità di

rilanciare lo studio di una coltura tipica che presenta aspetti nutrizionali interessanti, soprattutto riguardo al suo possibile impiego per l'alimentazione zootecnica.

Il mappaggio fisico di gruppi di associazione a resistenza a fitopatie consente di poter localizzare tali sequenze direttamente su gruppi cromosomici e saturare le mappe genetiche già sviluppate in cece, generando marcatori molecolari direttamente dalle frazioni *sortate*.

Prospettive interessanti possono derivare dalla possibilità di ottenere per il cece librerie BAC sub genomiche accelerando lo studio genomico della coltura con grande vantaggio per i progressi ottenibili dal miglioramento genetico della specie.

BIBLIOGRAFIA

1. Arumuganathan, K. and E.D. Earle, *Nuclear DNA content of some important plant species*. Plant Mol Biol Rep, 1991. **9**: p. 208-218.
2. Abbo, S., J. Berger, and N.C. Turner, *Evolution of cultivated chickpea: four bottlenecks limit diversity and constrain adaptation*. Functional Plant Biology, 2003. **30**(10): p. 1081-1087.
3. Ladizinsky, G. and A. Adler, *Origin of Chickpea Cicer-Arietinum L.* Euphytica, 1976. **25**(1): p. 211-217.
4. Lev-Yadun, S., A. Gopher, and S. Abbo, *Archaeology - Che cradle of agriculture*. Science, 2000. **288**(5471): p. 1602-1603.
5. Gil, J.N., S. Luna, D. Moreno, M. T. DeHaro, A., *Variability of some physico-chemical characters in desi and kabuli chickpea types*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1996. **71**(2): p. 179-184.
6. Ibrikci, H., S.J.B. Knewtson, and M.A. Grusak, *Chickpea leaves as a vegetable green for humans: evaluation of mineral composition*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2003. **83**(9): p. 945-950.
7. Datta, K.B., N. Oliva, N. Torrizo, L. Abrigo, E. Tan, J. Rai, M. Rehana, S. Al-Babili, S. Beyer, P. Potrykus, I. Datta, S. K., *Bioengineered 'golden' indica rice cultivars with beta-carotene metabolism in the endosperm with hygromycin and mannose selection systems*. Plant Biotechnology Journal, 2003. **1**(2): p. 81-90.
8. Williams, P.C., Singh, U., *The Chickpea—Nutritional quality and the evaluation of quality*. The Chickpea, ed. I.M.C.S.K.B.S. (Eds.). 1987, CAB International Wallingford, UK.
9. Agharkar, S.P., *Medicinal Plants of Bombay Presidency*, in *Scientific Publications*. 1991: Jodhpur, India. p. 62-63.
10. McIntosh, G.H., Topping, D.L., *Food legumes in human nutrition*. R. Knight (Ed.), *Linking Research and Marketing Opportunities for Pulses in the 21st Century*. . 2000, Dordrecht, The Netherlands.: Kluwer Academic Publishers. 655-666.

11. Charles, M.T., R. Dominique, Kumar J., Dangi, O.P., *A preliminary study of the functional properties of chickpea leaves.*, in *Annual Meeting of the Canadian Society of Food and Nutrition*. 2002: Edmonton, Alberta, Canada. p. May 2002.
12. Singh, K.B., *Chickpea breeding*, in *The Chickpea*. CAB International, I.M.C.S.K.B.S. (Eds.), Editor. 1987: Wallingford, UK. p. 127-162.
13. Moreno, M.T. and J.I. Cubero, *Variation in Cicer-Arietinum-L*. Euphytica, 1978. **27**(2): p. 465-485.
14. Singh, K.B. and M.V. Reddy, *Inheritance of Resistance to Ascochyta Blight in Chickpea*. Crop Science, 1983. **23**(1): p. 9-10.
15. Tewari, S.K. and M.P. Pandey, *Genetics of Resistance to Ascochyta Blight in Chickpea (Cicer-Arietinum-L)*. Euphytica, 1986. **35**(1): p. 211-215.
16. Dey, S.K. and G. Singh, *Resistance to Ascochyta Blight in Chickpea - Genetic-Basis*. Euphytica, 1993. **68**(1-2): p. 147-153.
17. Tekeoglu, M.S., D. K. Kaiser, W. J. Muehlbauer, F. J., *Ascochyta blight resistance inheritance in three chickpea recombinant inbred line populations*. Crop Science, 2000. **40**(5): p. 1251-1256.
18. Muehlbauer, F.J., Singh, K.B. *Genetics of chickpea*. in M.C. Saxena & K.B. Singh (Eds.), *The Chickpea*. 1987. CAB International, Wallingford, UK.
19. Rubio, J., E. Moussa, M. Kharrat, M.T. Moreno, Millan, T., Gil, J, *Two genes and linked RAPD markers involved in resistance to Fusarium oxysporum f. sp. ciceris race 0 in chickpea*. Plant Breed, 2003. **122**: p. 188-191.
20. Clarke, H., Siddique, K.H.M. . *Chilling tolerance in chickpea – Novel methods for crop improvement*. in *Chickpea Conference*. 2003. Indira Gandhi Agricultural University, Raipur, India,: In: R.N. Sharma, M. Yasin, S.L. Swami, M.A. Khan & A.J. William (Eds.)
21. Or, E., Hovav, R., Abbo, S, *A major gene for flowering time in chickpea*. Crop Science, 1999. **39**: p. 315-322.
22. Winter, P.P., T. Udupa, S. M. Huttel, B. Sharma, P. C. Sahi, S. Arreguin-Espinoza, R. Weigand, F. Muehlbauer, F. J. Kahl, G., *Characterization and mapping of sequence-tagged microsatellite sites in the chickpea (Cicer arietinum L.) genome*. Molecular and General Genetics, 1999. **262**(1): p. 90-101.

23. Padiglia, A.M., R. Scanu, T. Longu, S. Rossi, A. Floris, G., *Structure and nucleotide sequence of Euphorbia characias copper/TPQ-containing amine oxidase gene*. J Protein Chem, 2002. **21**(7): p. 435-41.
24. Meyers, B.C., S. Scalabrin, and M. Morgante, *Mapping and sequencing complex genomes: Let's get physical!* Nature Reviews Genetics, 2004. **5**(8): p. 578-U1.
25. Lichtenzveig, J.S., C. Dodge, J. Abbo, S. Zhang, H. B., *Construction of BAC and BIBAC libraries and their applications for generation of SSR markers for genome analysis of chickpea, Cicer arietinum L.* Theoretical and Applied Genetics, 2005. **110**(3): p. 492-510.
26. Vlacilova, K.O., D. Vrana, J. Cihalikova, J. Kubalakova, M. Kahl, G. Dolezel, J., *Development of flow cytogenetics and physical genome mapping in chickpea (Cicer arietinum L.)*. Chromosome Research, 2002. **10**(8): p. 695-706.
27. Rajesh, P.N.C., C. Meksem, K. Sharma, K. D. Gupta, V. Muehlbauer, F. J., *Construction of a HindIII Bacterial Artificial Chromosome library and its use in identification of clones associated with disease resistance in chickpea*. Theoretical and Applied Genetics, 2004. **108**(4): p. 663-669.
28. Staginnus, C.W., P. Desel, C. Schmidt, T. Kahl, G., *Molecular structure and chromosomal localization of major repetitive DNA families in the chickpea (Cicer arietinum L.) genome*. Plant Molecular Biology, 1999. **39**(5): p. 1037-1050.
29. Kelleher, C.T.C., R. Shin, H. Bosdet, I. E. Krzywinski, M. I. Fjell, C. D. Wilkin, J. Yin, T. M. DiFazio, S. P. Ali, J. Asano, J. K. Chan, S. Cloutier, A. Girm, N. Leach, S. Lee, D. Mathewson, C. A. Olson, T. O'Connor, K. Prabhu, A. L. Smailus, D. E. Stott, J. M. Tsai, M. Wye, N. H. Yang, G. S. Zhuang, J. Holt, R. A. Putnam, N. H. Vrebalov, J. Giovannoni, J. J. Grimwood, J. Schmutz, J. Rokhsar, D. Jones, S. J. M. Marra, M. A. Tuskan, G. A. Bohlmann, J. Ellis, B. E. Ritland, K. Douglas, C. J. Schein, J. E., *A physical map of the highly heterozygous Populus genome: integration with the genome sequence and genetic map and analysis of haplotype variation*. Plant Journal, 2007. **50**(6): p. 1063-1078.
30. Singh, K.B., Reddy, M.V., *Improving chickpea yield by incorporating resistance to ascochyta blight*. Theor Appl Genet, 1996. **92**: p. 509-515.

31. Singh, K.B., Malhotra, R.S., Saxena, M.C., Bejiga, G., *Superiority of winter sowing over traditional spring sowing of chickpea in the Mediterranean region*. Agron J, 1997. **89**: p. 112-118.
32. Nene, Y.L., Reddy, M.V. . *Chickpea Diseases and their control*. in *The Chickpea*. 1987. CAB International, Wallingford. UK.
33. Kaiser, W.J.A., A. R. Hervasvargas, A. Traperocasas, J. L. Jimenezdiaz, R. M., *Screening of Wild Cicer Species for Resistance to Race-0 and Race-5 of Fusarium-Oxysporum F-Sp Ciceris*. Plant Disease, 1994. **78**(10): p. 962-967.
34. Jiménez-Díaz, R.M., Alcalà-Jiménez, A.R., Hervàs A., Trapero-Casas, J.L. . *Pathogenic variability and host resistance in the Fusarium oxysporum f. sp. ciceris/C. arietinum pathosystem*. 1993. Inst, Radzikòov, Poland.
35. Kaiser, W.J., Ramsay, M.D., Makkouk, K.M., Bretag, T.W., Acikgoz, N. Kumar, J., Nutter, F.W. . *Foliar diseases of cool season food legumes and their control*. in In: R. Knight (Ed.), *Linking Research and Marketing Opportunities for Pulses in the 21st Century*. 2000. Dordrecht, The Netherlands.: Kluwer Academic Publishers.
36. Kraft, J.M., Haware, M.P., Halila, H. Sweetingham, M., Bayaa, B. . *Soilborne diseases and their control*. in In: R. Knight (Ed.), *Linking Research and Marketing Opportunities for Pulses in the 21st Century*. 2000. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
37. Knights, E.J., Siddique, K.H.M., *Chickpea status and production constraints in Australia*, in In: M. Abu Bakr, K.H.M. Siddique & C. Johansen (Eds.), *Integrated Management of Botrytus Grey Mould of Chickpea in Bangladesh and Australia: Summary of Proceedings of a Project Inception Workshop*. 2002: Bangladesh Agricultural Research Institute, Joydebpur, Gazipur, Bangladesh. p. 33-45.
38. Díaz-Franco, A. and P. Perez-Garcia, *Control químico dela roya y la rabia del garbanzoy su influencia en el rendimiento del grano*. Revista Mexicana de Fitopatologia, 1995. **13**: p. 123-125.
39. He, X.Z., J.T. Reddy, and R.A. Dixon, *Stress responses in alfalfa (Medicago sativa L). XXII. cDNA cloning and characterization of an elicitor-inducible isoflavone 7-O-methyltransferase*. Plant Mol Biol, 1998. **36**(1): p. 43-54.

40. Rubio, J.T.M., M. Moral, A. Rubiales, D. Gil, J., *Registration of RIL58-ILC72/Cr5, a chickpea germplasm line with rust and ascochyta blight resistance*. Crop Science, 2006. **46**(5): p. 2331-2332.
41. Morjane, H.G., J. Harrabi, M. Weising, K. Kahl, G., *Oligonucleotide Fingerprinting Detects Genetic Diversity among Ascochyta-Rabiei Isolates from a Single Chickpea Field in Tunisia*. Current Genetics, 1994. **26**(3): p. 191-197.
42. Jamil, F.F.S., N. Sarwar, M. Khan, J. A. Geistlinger, J. Kahl, G., *Genetic and pathogenic diversity within Ascochyta rabiei (Pass.) Lab. populations in Pakistan causing blight of chickpea (Cicer arietinum L.)*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2000. **57**(6): p. 243-254.
43. Peever, T.L.S., S. S. Su, G. Kaiser, W. J. Muehlbauer, F. J., *Historical and contemporary multilocus population structure of Ascochyta rabiei (teleomorph: Didymella rabiei) in the Pacific Northwest of the United States*. Mol Ecol, 2004. **13**(2): p. 291-309.
44. Cho, S.H., W.D. Chen, and F.J. Muehlbauer, *Pathotype-specific genetic factors in chickpea (Cicer arietinum L.) for quantitative resistance to ascochyta blight*. Theoretical and Applied Genetics, 2004. **109**(4): p. 733-739.
45. Collard, B.C.Y., E.C.K. Pang, and P.W.J. Taylor, *Selection of wild Cicer accessions for the generation of mapping populations segregating for resistance to ascochyta blight*. Euphytica, 2003. **130**(1): p. 1-9.
46. Singh, K.B.H., G. C. Nene, Y. L. Reddy, M. V., *Resistance in Chickpeas to Ascochyta-Rabiei*. Plant Disease, 1981. **65**(7): p. 586-587.
47. Flandez-Galvez, H.A., P. K. Ford, R. Pang, E. C. K. Taylor, P. W. J., *QTL analysis for ascochyta blight resistance in an intraspecific population of chickpea (Cicer arietinum L.)*. Theoretical and Applied Genetics, 2003. **107**(7): p. 1257-1265.
48. Tekeoglu, M.T., A. Kaiser, W. J. Muehlbauer, F. J., *Inheritance and linkage of two genes that confer resistance to Fusarium wilt in chickpea*. Crop Science, 2000. **40**(5): p. 1247-1251.
49. Millan, T.C., H. J. Siddique, K. H. M. Buhariwalla, H. K. Gaur, P. M. Kumar, J. Gil, J. Kahl, G. Winter, P., *Chickpea molecular breeding: New tools and concepts*. Euphytica, 2006. **147**(1-2): p. 81-103.

50. Tekeoglu, M., P.N. Rajesh, and F.J. Muehlbauer, *Integration of sequence tagged microsatellite sites to the chickpea genetic map*. Theoretical and Applied Genetics, 2002. **105**(6-7): p. 847-854.
51. Flandez-Galvez, H.F., R. Pang, E. C. Taylor, P. W., *An intraspecific linkage map of the chickpea (Cicer arietinum L.) genome based on sequence tagged microsatellite site and resistance gene analog markers*. Theor Appl Genet, 2003. **106**(8): p. 1447-56.
52. Millan, T.R., J. Iruela, M. Daly, K. Cubero, J. I. Gil, J., *Markers associated with Ascochyta blight resistance in chickpea and their potential in marker-assisted selection*. Field Crops Research, 2003. **84**(3): p. 373-384.
53. Iruela, M.R., J. Barro, F. Cubero, J. I. Millan, T. Gil, J., *Detection of two quantitative trait loci for resistance to ascochyta blight in an intra-specific cross of chickpea (Cicer arietinum L.): development of SCAR markers associated with resistance*. Theoretical and Applied Genetics, 2006. **112**(2): p. 278-287.
54. Rakshit, S.W., P. Tekeoglu, M. Munoz, J. J. Pfaff, T. Benko-Iseppon, A. M. Muehlbauer, F. J. Kahl, G., *DAF marker tightly linked to a major locus for Ascochyta blight resistance in chickpea (Cicer arietinum L.)*. Euphytica, 2003. **132**(1): p. 23-30.
55. Udupa, S.M. and M. Baum, *Genetic dissection of pathotype-specific resistance to ascochyta blight disease in chickpea (Cicer arietinum L.) using microsatellite markers*. Theoretical and Applied Genetics, 2003. **106**(7): p. 1196-1202.
56. Collard, B.C.Y.P., E. C. K. Ades, P. K. Taylor, P. W. J., *Preliminary investigation of QTLs associated with seedling resistance to ascochyta blight from Cicer echinospermum, a wild relative of chickpea*. Theoretical and Applied Genetics, 2003. **107**(4): p. 719-729.
57. Winter, P.B.-I., A. M. Huttel, B. Ratnaparkhe, M. Tullu, A. Sonnante, G. Pfaff, T. Tekeoglu, M. Santra, D. Sant, V. J. Rajesh, P. N. Kahl, G. Muehlbauer, F. J., *A linkage map of the chickpea (Cicer arietinum L.) genome based on recombinant inbred lines from a C-arietinumxC-reticulatum cross: localization of resistance genes for fusarium wilt races 4 and 5*. Theoretical and Applied Genetics, 2000. **101**(7): p. 1155-1163.

58. Haware, M.P. and Y.L. Nene, *Races of Fusarium-Oxysporum F-Sp-Ciceri*. Plant Disease, 1982. **66**(9): p. 809-810.
59. Jimenez-Diaz, R.M., A. R. Alcala-Jimenez, A. Hervas & J. L. Trapero-Casas, *Pathogenic variability and host resistance in the Fusarium oxysporum f. sp. ciceris/C. arietinum pathosystem.*, in In: *Proceedings of the 3rd European Seminar on Fusarium Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity and Host Resistance, Plant Breeding and Acclimatization*. 1993: Inst, Radzikov, Poland,. p. 87-94.
60. Jimenez-Gasco, M.M., J.A. Navez-Cortez & R.M. Jimenez-Diaz, *The Fusarium oxysporum f. sp. ciceris/C. arietinum pathosystem: A case study of the evolution of plant-pathogenic fungi into races and pathotypes*. Intern Microbiol, 2004. **7**: p. 95-104.
61. van Rheenen, H.A., M.V. Reddy, J. Kumar & M.P. Haware, *Breeding for resistance to soil-borne diseases in chickpea*. In: K.B. Singh and M.C. Saxena (Eds.), *Disease Resistance in Chickpea*. 1992, ICARDA, Aleppo, Syria. 55-70.
62. Mayer, M.S.T., A. Simon, C. J. Kumar, J. Kaiser, W. J. Kraft, J. M. Muehlbauer, F. J., *Development of a DNA marker for Fusarium wilt resistance in chickpea*. Crop Science, 1997. **37**(5): p. 1625-1629.
63. Ratnaparkhe, M.B.S., D. K. Tullu, A. Muehlbauer, F. J., *Inheritance of inter-simple-sequence-repeat polymorphisms and linkage with a fusarium wilt resistance gene in chickpea*. Theoretical and Applied Genetics, 1998. **96**(3-4): p. 348-353.
64. Tullu, A., et al., *Inheritance and linkage of a gene for resistance to race 4 of Fusarium wilt and RAPD markers in chickpea*. Euphytica, 1998. **102**(2): p. 227-232.
65. Sharma, K.D.W., P. Kahl, G. Muehlbauer, F. J., *Molecular mapping of Fusarium oxysporum f. sp ciceris race 3 resistance gene in chickpea*. Theoretical and Applied Genetics, 2004. **108**(7): p. 1243-1248.
66. Benko-Iseppon, A.M.W., P. Huettel, B. Staginnus, C. Muehlbauer, F. J. Kahl, G., *Molecular markers closely linked to fusarium resistance genes in chickpea show significant alignments to pathogenesis-related genes located on Arabidopsis chromosomes 1 and 5*. Theoretical and Applied Genetics, 2003. **107**(2): p. 379-386.
67. Cobos, M.J.F., M. J. Rubio, J. Kharrat, M. Moreno, M. T. Gil, J. Millan, T., *A linkage map of chickpea (Cicer arietinum L.) based on populations from Kabuli x Desi*

- crosses: location of genes for resistance to fusarium wilt race 0*. Theor Appl Genet, 2005. **110**(7): p. 1347-53.
68. Croser, J.S.A., F. Clarke, H. J. Siddique, K. H. M., *Utilisation of wild Cicer in chickpea improvement - progress, constraints, and prospects*. Australian Journal of Agricultural Research, 2003. **54**(5): p. 429-444.
 69. Siddique, K.H.M. and R.H. Sedgley, *Chickpea (Cicer-Arietinum-L), a Potential Grain Legume for Southwestern Australia - Seasonal Growth and Yield*. Australian Journal of Agricultural Research, 1986. **37**(3): p. 245-261.
 70. Singh, K.B. *Problems and prospects of stress resistance breeding in chickpea*. in *Breeding for Stress Tolerance in Cool Season Food Legumes*. 1993. Wiley, Chichester.
 71. Savithri, K.S., P.S. Ganapathy, and S.K. Sinha, *Sensitivity to Low-Temperature in Pollen Germination and Fruit-Set in Cicer-Arietinum-L*. Journal of Experimental Botany, 1980. **31**(121): p. 475-481.
 72. Srinivasan, A., C. Johansen, and N.P. Saxena, *Cold tolerance during early reproductive growth of chickpea (Cicer arietinum L): Characterization of stress and genetic variation in pod set*. Field Crops Research, 1998. **57**(2): p. 181-193.
 73. Clarke, H.J. and K.H.M. Siddique, *Response of chickpea genotypes to low temperature stress during reproductive development*. Field Crops Research, 2004. **90**(2-3): p. 323-334.
 74. Hormaza, J.I. and M. Herrero, *Male gametophytic selection as a plant breeding tool*. Scientia Horticulturae, 1996. **65**(4): p. 321-333.
 75. Yang, H.S., M. W. Cowling, W. A. Smith, P. M. C., *DNA fingerprinting based on microsatellite-anchored fragment length polymorphisms, and isolation of sequence-specific PCR markers in lupin (Lupinus angustifolius L.)*. Molecular Breeding, 2001. **7**(3): p. 203-209.
 76. Yang, H.B., J. G. You, M. P. Buirchell, B. J. Sweetingham, M. W., *Development and implementation of a sequence-specific PCR marker linked to a gene conferring resistance to anthracnose disease in narrow-leaved lupin (Lupinus angustifolius L.)*. Molecular Breeding, 2004. **14**(2): p. 145-151.

77. Berger, J., S. Abbo, and N.C. Turner, *Ecogeography of annual wild Cicer species: The poor state of the world collection*. Crop Science, 2003. **43**(3): p. 1076-1090.
78. Shan, F.C., H. C. Plummer, J. A. Yan, G. Siddique, K. H. M., *Geographical patterns of genetic variation in the world collections of wild annual Cicer characterized by amplified fragment length polymorphisms*. Theoretical and Applied Genetics, 2005. **110**(2): p. 381-391.
79. van der Maesen, L.J.G.R.P.S.P., *Availability and use of wild Cicer germplasm*. Plant Genet Resour Newslett, 1984. **57**: p. 19–24.
80. Singh, K.B., L. Holly & G. Bejiga, *A Catalog of Kabuli Chickpea Germplasm*. International Center for Agricultural Research in Dry Areas. 1991, Aleppo, Syria.
81. Singh, K.B., R.S. Malhotra, and M.C. Saxena, *Additional Sources of Tolerance to Cold in Cultivated and Wild Cicer Species*. Crop Science, 1995. **35**(5): p. 1491-1497.
82. Singh, K.B., B. Ocampo, and L.D. Robertson, *Diversity for abiotic and biotic stress resistance in the wild annual Cicer species*. Genetic Resources and Crop Evolution, 1998. **45**(1): p. 9-17.
83. Kumar, J., S.C. Sethi, C. Johansen, T.G. Kelley, M.M. Rahman & H.A. van Rheenen, *The potential of short-duration chickpea varieties*. Indian J Dryland Agric Dev, 1996. **11**: p. 28-32.
84. Kumar, J. and S. Abbo, *Genetics of flowering time in chickpea and its bearing on productivity in semiarid environments*. Advances in Agronomy, Vol 72, 2001. **72**: p. 107-138.
85. Saxena, N.P. *Screening for adaptation to drought: Case studies with chickpea and pigeonpea*. in *In: Adaptation of chickpea and pigeonpea to abiotic stresses. Proceedings of Consultant's Workshop*. 1987. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Patancheru, AP, India, pp. .
86. Turner, N.C., G.C. Wright, & K.H.M. Siddique, *Adaptation of grain legumes (pulses) to water-limited environments*. Adv Agron, 2001. **71**: p. 123-131.
87. Kumar, J. and B.V. Rao, *Registration of ICCV 96029, a super early and double podded chickpea germplasm*. Crop Science, 2001. **41**(2): p. 605-606.

88. Siddique, K.H.M., S.P. Loss & B.D. Thomson. *Cool season grain legumes in dryland Mediterranean environments of Western Australia: Significance of early flowering*. in *Management of Agricultural Drought*. 2003. Enfield (NH), USA: Science Publishers.
89. Rubio, J.F., F. Moreno, M. T. Cubero, J. I. Gil, J., *Effects of the erect/bushy habit, single/double pod and late/early flowering genes on yield and seed size and their stability in chickpea*. *Field Crops Research*, 2004. **90**(2-3): p. 255-262.
90. van der Maesen, L.J.G.R.P.S.P. *Cicer L., a monograph of the genus, with an special reference to the chickpea (Cicer arietinum L.), its ecology and cultivation*. in *Mededlingen Landbouwhogeschool (Communication Agricultural University)*. 1972. Wageningen.
91. Summerfield, R.J.M., F. R. Roberts, E. H. Hadley, P., *Adaptation to Contrasting Aerial Environments in Chickpea (Cicer-Arietinum-L)*. *Tropical Agriculture*, 1981. **58**(2): p. 97-113.
92. Sethi, S.C.B., D. E. Gowda, C. L. L. Green, J. M., *Photoperiodic Response and Accelerated Generation Turnover in Chickpea*. *Field Crops Research*, 1981. **4**(3): p. 215-225.
93. Kumar, J. and H.A. van Rheenen, *A major gene for time of flowering in chickpea*. *J Hered*, 2000. **91**(1): p. 67-8.
94. Musa, A.M., D. Harris, C. Johansen&J.Kumar, *Short duration chickpea to replace fallow after Aman rice: The role of on-farm seed priming in the high Barind tract of Bangladesh*. *Exp Agric*, 2001. **37**: p. 449–457.
95. Cho, S.H.K., J. Shultz, J. L. Anupama, K. Tefera, F. Muehlbauer, F. J., *Mapping genes for double podding and other morphological traits in chickpea*. *Euphytica*, 2002. **128**(2): p. 285-292.
96. Cobos, M.J., M. Iruela, J. Rubio, T. Mill'an, J.I. Cubero&J. Gil. *Genetic analyses of flowering time in a chickpea interspecific cross (Cicer arietinum L. × C. reticulatum Lad.)*. in *In: 5th European Conference on Grain Legumes*. 2004. AEP, Dijon, France.
97. Saxena, N.P. *Management of drought in chickpea—A holistic approach*. in *Management of Agricultural Drought—Agronomic and Genetic Options*. 2003. New Delhi, India: Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd.

98. Dolezel, J.C., J. Weiserova, J. Lucretti, S., *Cell cycle synchronization in plant root meristems*. Methods Cell Sci, 1999. **21**(2-3): p. 95-107.
99. Dolezel, J., J. Cihalikova, and S. Lucretti, *A High-Yield Procedure for Isolation of Metaphase Chromosomes from Root-Tips of Vicia-Faba L.* Planta, 1992. **188**(1): p. 93-98.
100. Lucretti, S.D., J. Schubert, I. Fuchs, J., *Flow Karyotyping and Sorting of Vicia-Faba Chromosomes*. Theoretical and Applied Genetics, 1993. **85**(6-7): p. 665-672.
101. Gualberti, G.D., J. Macas, J. Lucretti, S., *Preparation of pea (Pisum sativum L) chromosome and nucleus suspensions from single root tips*. Theoretical and Applied Genetics, 1996. **92**(6): p. 744-751.
102. Macas, J.G., G. Nouzova, M. Samec, P. Lucretti, S. Dolezel, J., *Construction of chromosome-specific DNA libraries covering the whole genome of field bean (Vicia faba L)*. Chromosome Research, 1996. **4**(7): p. 531-539.
103. Neumann, P.L., M. Dolezel, J. Macas, J., *Isolation of chromosomes from Pisum sativum L. hairy root cultures and their analysis by flow cytometry*. Plant Science, 1998. **137**(2): p. 205-215.
104. Koblizkova, A., J. Dolezel, and J. Macas, *Subtraction with 3' modified oligonucleotides eliminates amplification artifacts in DNA libraries enriched for microsatellites*. Biotechniques, 1998. **25**(1): p. 32-+.
105. Neumann, P.P., D. Vrana, J. Dolezel, J. Macas, J., *Chromosome sorting and PCR-based physical mapping in pea (Pisum sativum L.)*. Chromosome Research, 2002. **10**(1): p. 63-71.
106. Pozarkova, D.K., A. Roman, B. Torres, A. M. Lucretti, S. Lysak, M. Dolezel, J. Macas, J., *Development and characterization of microsatellite markers from chromosome 1-specific DNA libraries of Vicia faba*. Biologia Plantarum, 2002. **45**(3): p. 337-345.
107. Macas, J.W., W. Baumlein, H. Pich, U. Houben, A. Wobus, U. Schubert, I., *Localization of Vicilin Genes Via Polymerase Chain-Reaction on Microisolated Field Bean Chromosomes*. Plant Journal, 1993. **3**(6): p. 883-886.

108. Pfosser, M.A., A. Lelley, T. Heberleborgs, E., *Evaluation of Sensitivity of Flow-Cytometry in Detecting Aneuploidy in Wheat Using Disomic and Ditelosomic Wheat-Rye Addition Lines*. Cytometry, 1995. **21**(4): p. 387-393.
109. Conia, J.M., P. Brown, S. Bergounioux, C. Gadat, P., *Monoparametric Models of Flow Cytometric Karyotypes with Spreadsheet Software*. Theoretical and Applied Genetics, 1989. **77**(2): p. 295-303.
110. Gamborg OL and L.R. Wetter, *Plant Tissue Culture Methods*, in *National Research Council of Canada*. 1975: Saskatoon.
111. Kubalakova, M.L., M. A. Vrana, J. Simkova, H. Cihalikova, J. Dolezel, J., *Rapid identification and determination of purity of flow-sorted plant chromosomes using C-PRINS*. Cytometry, 2000. **41**(2): p. 102-108.
112. Dolezel, J., P. Binarova, and S. Lucretti, *Analysis of Nuclear-DNA Content in Plant-Cells by Flow-Cytometry*. Biologia Plantarum, 1989. **31**(2): p. 113-120.
113. Dolezel, J., *Flow Cytometric Analysis of Nuclear-DNA Content in Higher-Plants*. Phytochemical Analysis, 1991. **2**(4): p. 143-154.
114. Ohri, D., *Cytology of Cicer songaricum Steph ex DC, a wild relative of chickpea*. Genetic Resources and Crop Evolution, 1999. **46**(2): p. 111-113.
115. Ocampo B, V.G., Erico A, Singh KB, Saccardo F, *Karyotype analysis in the genus Cicer*. Journal of Genetics and Breeding, 1992. **46**: p. 229-240.
116. Yakura, K., A. Kato, and S. Tanifuji, *Structural Organization of Ribosomal DNA in 4 Trillium Species and Paris-Verticillata*. Plant and Cell Physiology, 1983. **24**(7): p. 1231-1240.
117. Neumann, P., M. Nouzova, and J. Macas, *Molecular and cytogenetic analysis of repetitive DNA in pea (Pisum sativum L.)*. Genome, 2001. **44**(4): p. 716-728.
118. Kubalakova, M.K., P. Suchankova, P. Cihalikova, J. Bartos, J. Lucretti, S. Watanabe, N. Kianian, S. F. Dolezel, J., *Chromosome sorting in tetraploid wheat and its potential for genome analysis*. Genetics, 2005. **170**(2): p. 823-829.
119. Dolezel, J., et al., *Chromosome-based genomics in the cereals*. Chromosome Research, 2007. **15**(1): p. 51-66.

120. Arumuganathan, K.M., G. B. Telenius, H. Tanksley, S. D. Earle, E. D., *Chromosome 2-Specific DNA Clones from Flow-Sorted Chromosomes of Tomato*. Molecular & General Genetics, 1994. **242**(5): p. 551-558.
121. Kejnovsky, E.V., J. Matsunaga, S. Soucek, P. Siroky, J. Dolezel, J. Vyskot, B., *Localization of male-specifically expressed MROS genes of Silene latifolia by PCR on flow-sorted sex chromosomes and autosomes*. Genetics, 2001. **158**(3): p. 1269-1277.
122. Dolezel, J., S. Lucretti, and I. Schubert, *Plant Chromosome Analysis and Sorting by Flow Cytometry*. Critical Reviews in Plant Sciences, 1994. **13**(3): p. 275-309.
123. Lysak, M.A.C., J. Kubalakova, M. Simkova, H. Kunzel, G. Dolezel, J., *Flow karyotyping and sorting of mitotic chromosomes of barley (Hordeum vulgare L.)*. Chromosome Research, 1999. **7**(6): p. 431-444.
124. Vrana, J.K., M. Simkova, H. Cihalikova, J. Lysak, M. A. Dolezel, J., *Flow sorting of mitotic chromosomes in common wheat (Triticum aestivum L.)*. Genetics, 2000. **156**(4): p. 2033-2041.
125. Sgorbati, S.L., M. Sparvoli, E. Trezzi, F. Lucchini, G., *Cytometry and Flow-Cytometry of 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (Dapi)-Stained Suspensions of Nuclei Released from Fresh and Fixed Tissues of Plants*. Physiologia Plantarum, 1986. **68**(3): p. 471-476.
126. Venora, G.O., B. Singh, K. B. Saccardo, F., *Karyotype of the kabuli-type chickpea (Cicer arietinum L) by image analysis system*. Caryologia, 1995. **48**(2): p. 147-155.
127. Galasso, I.F., M. Maggiani, M. Cremonini, R. Pignone, D., *Chromatin characterization by banding techniques, in situ hybridization, and nuclear DNA content in Cicer L (Leguminosae)*. Genome, 1996. **39**(2): p. 258-265.
128. Gortner, G.N., M. Weising, K. Zink, D. Nagl, W. Kahl, G., *Chromosomal localization and distribution of simple sequence repeats and the Arabidopsis-type telomere sequence in the genome of Cicer arietinum L*. Chromosome Research, 1998. **6**(2): p. 97-104.
129. Yakura, K. and S. Tanifuji, *Molecular-Cloning and Restriction Analysis of EcorI-Fragments of Vicia-Faba Rdna*. Plant and Cell Physiology, 1983. **24**(7): p. 1327-1330.

130. Simkova, H.C., J. Vrana, J. Lysak, M. A. Dolezel, J., *Preparation of HMW DNA from plant nuclei and chromosomes isolated from root tips*. Biologia Plantarum, 2003. **46**(3): p. 369-373.
131. Galbraith, D.W.H., K. R. Maddox, J. M. Ayres, N. M. Sharma, D. P. Firoozabady, E., *Rapid Flow Cytometric Analysis of the Cell-Cycle in Intact Plant-Tissues*. Science, 1983. **220**(4601): p. 1049-1051.
132. Kachel, V. and J. Wietzorrek, *Flow cytometry and integrated imaging*. Scientia Marina, 2000. **64**(2): p. 247-254.

Ringraziamenti

Per il mio lavoro di dottorato ringrazio soprattutto la Dott.ssa Floriana Fiocchetti, una collega di laboratorio, un' interlocutrice scientifica e un' amica.

Il confronto scientifico instaurato con lei è stato incoraggiante e fruttuoso per la realizzazione del progetto di dottorato.

Ringrazio anche il Dott. Lucretti per aver finanziato le attività e per la disponibilità all' uso del laboratorio di citogenetica flusso del CR Enea Casaccia. Infine, ringrazio la Dott.ssa Crinò che, attraverso la ditta sementiera MARTEA di Monreale (Palermo), ha fornito i materiali vegetali su cui è stato svolto il lavoro.