



Università Degli Studi Della Tuscia Di Viterbo

Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

BIOTECNOLOGIE VEGETALI - XXII CICLO.

Trasferimento di geni da specie selvatiche a frumento tramite ingegneria cromosomica: potenzialità di questa strategia ed eventuali ostacoli

AGR07

Coordinatore: Prof.ssa Stefania Masci

Firma

Tutor: Prof.ssa Carla Ceoloni

Firma.....

Co-tutore: Dott. Andrea Gennaro

Firma.....

Dottoranda: Maria Rosaria
Grossi

Firma

1 INTRODUZIONE	1
1.1 <i>Il frumento</i>	3
1.2 <i>Origine ed evoluzione dei genomi di frumento</i>	4
1.3 <i>Strategie non convenzionali per il miglioramento dei frumenti coltivati</i>	6
1.3.1 <i>L'ingegneria cromosomica</i>	6
1.3.2 <i>L'ingegneria cromosomica applicata al frumento duro</i>	8
1.4 <i>Il trasferimento di geni utili da <i>Thinopyrum ponticum</i></i>	11
1.4.1 <i>I geni <i>Lr19</i> ed <i>Yp</i></i>	11
1.4.2 <i>Il trasferimento di un potenziale QTL per la produttività</i>	16
1.4.2.1 <i>Problematiche connesse al trasferimento di segmenti da specie affini</i>	16
1.5 <i>Strumenti di ausilio all'ingegneria cromosomica</i>	17
1.5.1 <i>Tecniche di analisi citologica</i>	17
1.5.1.1 <i>La gametogenesi pollinica</i>	18
1.5.2 <i>Tecniche di genetica e citogenetica molecolare</i>	19
1.6 <i>Scopo del lavoro</i>	22
2 MATERIALI E METODI	23
2.1 <i>Materiali</i>	24
2.1.1 <i>Materiali vegetali</i>	24
2.1.2 <i>Sonde</i>	25
2.1.2.1 <i>Sonde utilizzate per il preannealing-GISH</i>	25
2.1.2.2 <i>Marcatori microsatelliti</i>	25
2.1.2.3 <i>STS (Sequenze Tagged Sites)</i>	26
2.2 <i>Metodi</i>	27
2.2.1 <i>Metodi di estrazione del DNA e stima della concentrazione</i>	27
2.2.1.1 <i>Estrazione del DNA genomico</i>	27
2.2.1.2 <i>Estrazione di DNA da cariossidi</i>	27
2.2.1.3 <i>Stima della concentrazione del DNA estratto</i>	28
2.2.2 <i>Analisi molecolari basate su reazioni a catena della polimerasi (PCR)</i>	29
2.2.2.1 <i>Microsatelliti</i>	29
2.2.3 <i>Realizzazione di primers per la banda AG15₆₀₀, 7Ag specifica</i>	30
2.2.3.1 <i>Amplificazione e Recupero dal gel della bande AG15600</i>	30
2.2.3.2 <i>Clonaggio delle bande e controllo dei trasformanti</i>	30
2.2.3.3 <i>Primers specifici per la banda AG15₆₀₀</i>	31
2.2.4 <i>Ibridazione <i>in situ</i>: considerazioni generali</i>	31
2.2.4.1 <i>Ottenimento dei preparati microscopici per l'analisi di cromosomi somatici</i>	33
2.2.4.2 <i>Preparazione delle sonde</i>	34
2.2.4.3 <i>Pretrattamenti dei preparati citologici</i>	36
2.2.4.4 <i>Ibridazione <i>in situ</i> con la tecnica del pre-annealing GISH</i>	36
2.2.4.5 <i>Lavaggi post-ibridazione e rilevamento indiretto</i>	37
2.2.4.6 <i>Microscopia ad epifluorescenza ed acquisizione computerizzata delle immagini</i>	38
2.2.5 <i>Tecnica per l'esame di cromosomi meiotici</i>	38
2.2.6 <i>Tecnica per l'esame della gametogenesi.</i>	40
2.2.7 <i>Esecuzione degli incroci e autofecondazioni</i>	41
2.2.8 <i>Allevamento delle piante</i>	41
3. RISULTATI	42
3.1 <i>Ulteriore ingegnerizzazione del segmento 7AgL della linea R23-1</i>	43
3.1.1 <i>Genotipizzazione della popolazione F2 ottenuta dall'incrocio di R23-1x R9-1</i>	43
3.1.2 <i>Selezione mediante preannealing-GISH</i>	49
3.1.3 <i>Genotipizzazione delle popolazioni F3 e F4 generate per autofecondazione da piante F2 avente il cromosoma R9-23 in condizione eterozigote.</i>	57
3.2 <i>Studio della segregazione del ricombinante R23-1</i>	58
3.2.1 <i>Selezione del ricombinante R23-1 nei diversi backgrounds varietali</i>	58

3.3 Analisi di effetti ascrivibili a geni <i>Sd</i> del <i>Th. ponticum</i> sulla meiosi e gametogenesi pollinica di ricombinanti frumento duro- <i>Th. ponticum</i>	63
3.3.1 Analisi di meiosi e gametogenesi di BC ₁ F ₃ dall'incrocio R23-1 x Simeto	64
3.3.2 Analisi di meiosi e/o gametogenesi di diverse generazioni F1-F2 ed F3 ottenuti dall'incrocio R23-1 x R9-1	72
3.3.3 Analisi di meiosi e gametogenesi di diversi ricombinanti <i>T. durum-Th. ponticum</i>	72
4 DISCUSSIONE	76
5 CONCLUSIONI	87
6. BIBLIOGRAFIA	91

1 INTRODUZIONE

1.1 Il frumento

Il frumento (*Triticum spp.*) ha avuto il suo centro di origine e differenziazione nella zona del Medio Oriente, compresa tra la costa del Mediterraneo e la pianura del Tigri e dell'Eufrate.

Oggi il frumento è la specie più coltivata al mondo, su una superficie di circa 223 milioni di ettari e con una produzione annua di circa 690 milioni di tonnellate (FAOSTAT 2008). E' una delle prime specie domesticate e sebbene le sue condizioni ottimali di crescita siano quelle presenti a latitudini comprese tra i 30° e 60° N e i 27° e i 40° S, la sua adattabilità, dovuta soprattutto alla condizione allopoliploide, ne ha consentito la diffusione ad areali complessivamente molto più ampi e diversificati.

Inizialmente, la diffusione in diversi ambienti e condizioni e la selezione antropica contribuirono alla creazione di razze locali di frumento ("*land races*"), popolazioni geneticamente eterogenee, ben adattate alle condizioni ambientali nelle quali si sono selezionate.

Grazie alla scoperta delle leggi che regolano l'ereditarietà dei caratteri e, inizialmente agli albori del miglioramento genetico, anche all'oscuro delle leggi di Mendel, la variabilità genetica presente all'interno delle razze locali venne sempre più deliberatamente utilizzata in sistematici programmi di miglioramento genetico, basati essenzialmente sulla ibridazione intraspecifica. Questi, durante il secolo scorso, trovarono la loro massima espressione, in sinergia con le innovazioni agronomiche, in quelle che vengono definite "Rivoluzioni verdi", da quella portata avanti dall'italiano Nazareno Strampelli nei primi decenni del 1900 (Worland, 1999), a quella condotta da Norman Borlaug e collaboratori del CYMMIT (Borlaug, 1968).

Gli obiettivi di questi interventi miravano per lo più all'ottenimento di varietà di frumento geneticamente uniformi e sempre più rispondenti, in termini di produttività, ai molteplici ed ingenti input energetici della moderna agricoltura intensiva.

I traguardi raggiunti, senz'altro largamente positivi in termini di aumento delle rese, hanno però comportato una prolungata pressione selettiva. La diffusione su scala mondiale di un numero relativamente limitato di varietà, peraltro molto simili tra loro, ha fortemente ristretto la base genetica disponibile per ulteriori interventi migliorativi.

Gli effetti dell'erosione genetica che ne è scaturita sono particolarmente evidenti oggi, in coincidenza con un cambiamento dei criteri che guidano le politiche agricole, non più rivolti, almeno nei Paesi sviluppati, al solo aumento delle produzioni, ma anche alle

elevate qualità nutrizionali e tecnologiche degli alimenti e a metodi di produzione ecocompatibili.

Tra gli effetti più evidenti della riduzione della variabilità genetica si assiste ad una maggiore suscettibilità ai patogeni e alle variazioni delle condizioni ambientali delle specie coltivate.

Sebbene esistano nuovi strumenti di cui la tecnologia ha dotato potenzialmente i *breeders* (l'ingegneria genetica) per aumentare la variabilità genetica delle specie coltivate utilizzando anche geni provenienti da specie filogeneticamente distanti, per alcune di esse, e tra queste il frumento, esistono ancora molti fattori limitanti, tra cui la complessità genetica: il frumento tenero, esaploide, ha un genoma aploide con oltre 17×10^9 bp, rispetto al riso con 4×10^8 bp e all'*Arabidopsis* con 1.3×10^7 bp. Tali approcci trovano inoltre la forte opposizione dell'opinione pubblica, soprattutto europea, che blocca la produzione e la commercializzazione di sementi transgeniche.

Per ampliare la variabilità dei frumenti coltivati per una serie di caratteri di rilevanza agronomica, un'alternativa consiste nel poter attingere dal genoma di specie filogeneticamente appartenenti al genere *Triticum* (Fedak, 1985, 1998; Friebe *et al.*, 1996; Sun e Xu, 1998), attraverso metodologie di “ingegneria cromosomica” (vedi § 1.3).

1.2 Origine ed evoluzione dei genomi di frumento

Il comune frumento tenero esaploide (*T. aestivum* L.) e il frumento duro tetraploide (*T. durum* L.) appartengono al genere *Triticum*, sottotribù delle *Triticinae*, tribù delle *Triticeae*, famiglia delle *Poaceae* (*Gramineae*).

Kihara (1919) e Sax (1922) dimostrarono l'appartenenza di tutte le *Triticinae* ad un ampio gruppo avente numero cromosomico di base $x=7$.

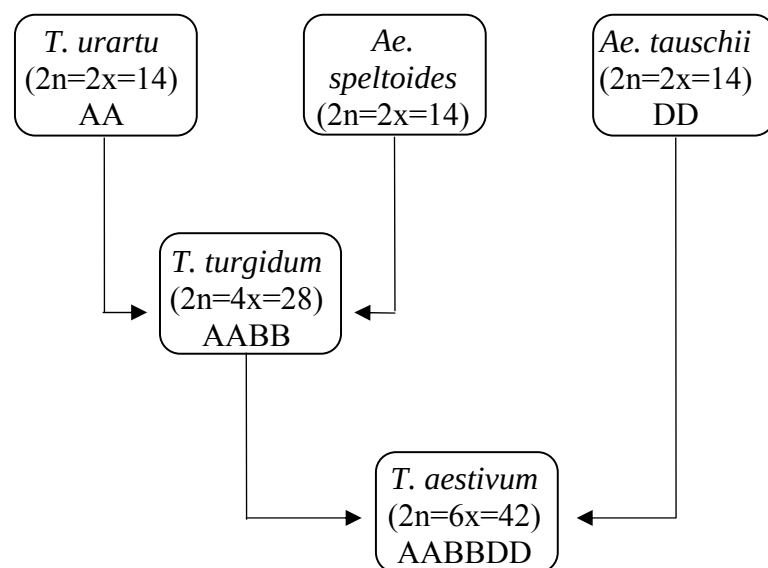
Sulla base di tale evidenza le *Triticinae* vennero suddivise, in base al diverso livello di ploidia, in diploidi ($2n=2x=14$), tetraploidi ($2n=4x=28$) ed esaploidi ($2n=6x=42$). In seguito ad ibridazione spontanea tra un *Triticum* diploide con genoma A ed una specie donatrice del genoma B, si formarono i progenitori allotetraploidi degli attuali frumenti duri (Kihara, 1924). Successivamente, e con analoghi meccanismi, l'ibridazione del *Triticum* tetraploide con una specie diploide donatrice del genoma D portò alla formazione dei *Triticum* esaploidi, progenitori dell'attuale frumento tenero.

Ciascun cromosoma di un dato genoma (es. A) ha un suo “corrispondente” nell'altro (B) o negli altri (BD) genomi, definito “omeologo” (parzialmente omologo). Dato il numero cromosomico di base 7, comune ai diversi genomi, esistono 7 gruppi di omeologia, ovverosia 7 gruppi di cromosomi omeologhi.

Ciò è stato inizialmente dimostrato da evidenze di tipo citogenetico (Sears 1952, 1954, 1966) e, in particolare, dalla possibilità di creare e mantenere stabilmente linee nulli-tetrasomiche in cui, la mancanza di una coppia cromosomica è funzionalmente “compensata” da una extra dose di un'altra dello stesso gruppo. Inoltre, la creazione di linee di addizione e di sostituzione nel genoma di frumento di singoli cromosomi o bracci cromosomici provenienti da genomi di specie affini, ha permesso di dimostrare che relazioni di omeologia esistono anche tra i cromosomi dei diversi genomi presenti negli allopoliploidi coltivati e quelli delle altre *Triticinae* (Feldman e Sears, 1981).

Numerosi studi (es. Feldman *et al.*, 1995 e Zhang 2002) hanno permesso di individuare con sempre maggiore precisione le specie potenzialmente candidate come donatrici dei diversi genomi dei frumenti poliploidi coltivati. In particolare, il *T. urartu* ($2n=2x=14$) e l' *Ae. squarrosa* (= *Ae. tauschii*, $2n=2x=14$) sono largamente accettati come donatori rispettivamente dei genomi A e D. Il donatore del genoma B sembra appartenere alla sezione Sitopsis del genere *Aegilops*. A questa sezione afferiscono le quattro specie, *Ae. speltoides*, *Ae. bicornis*, *Ae. longissima* e *Ae. searsii*, il cui genoma è risultato molto simile all'attuale B dei frumenti poliploidi (Fig.1).

Fig. 1. Probabile origine dei frumenti poliploidi



Al successo evolutivo dei frumenti ha contribuito l'autogamia (cleistogamia), che ha permesso di fissare i tipi che si formavano da eventi mutazionali spontanei e ricombinativi e, soprattutto, il loro comportamento da simil-diploidi alla meiosi, che ne ha garantito una regolarità meiotica, con un'eredità dei caratteri di tipo disomico ed una conseguente elevata fertilità (Feldman *et al.*, 1995). Nei frumenti tetraploidi ed esaploidi, infatti, nonostante la similitudine fra i cromosomi dei due o tre genomi parentali, alla meiosi si formano rispettivamente 14 e 21 bivalenti e mai associazioni multiple tra gli omeologhi.

Lo stesso fenomeno si verifica negli ibridi di frumento con altre Triticinae aventi genomi omeologhi. Di norma infatti, sia nei frumenti che nei loro derivati da ibridazione interspecifica, si verifica appaiamento e ricombinazione soltanto fra cromosomi perfettamente omologhi. Il comportamento da poliploidi disomici è in gran parte dovuto ad un complesso sistema di controllo dell'appaiamento tra cromosomi omeologhi che coinvolge geni localizzati su diversi cromosomi dei vari genomi (Sears, 1976). A tal fine è risultato di fondamentale importanza l'isolamento, sia in frumento tenero (Sears, 1977) che in duro (Giorgi, 1978, 1983) di mutanti al locus *Ph1*, il più importante per il controllo di tale fenomeno. Tali mutanti rappresentano infatti lo strumento essenziale per “accedere” ai genomi omeologhi di Triticinae, tra cui molte specie selvatiche, la cui ricchezza in geni utili per il miglioramento delle forme coltivate è enorme (Feldman e Sears, 1981).

1.3 Strategie non convenzionali per il miglioramento dei frumenti coltivati

1.3.1 L'ingegneria cromosomica

Come accennato nel § 1.1, la variabilità genetica dei frumenti coltivati si è andata via via restringendo in tempi recenti e ciò limita fortemente la possibilità di ulteriori miglioramenti facendo solo ricorso al germoplasma intraspecifico.

Tuttavia, le specie selvatiche affini ai frumenti coltivati costituiscono un'ampia riserva di variabilità genetica, ancora relativamente sotto-utilizzata, da cui attingere.

Per poter sfruttare proficuamente questa enorme risorsa è necessario superare eventuali barriere genetiche esistenti tra le specie, facendo ricorso a sistemi che promuovono il trasferimento di una o poche caratteristiche definite che migliorino quelle del genoma ricevente senza alterarne stabilità e caratteristiche endogene positive. Infatti, il successo è fortemente condizionato dalla capacità della specie “ricevente” di tollerare la presenza

di cromatina estranea e, in questo senso, ibridi interpecifici completi o anfidiploidi da essi derivati non rispondono in genere a tali requisiti. Anche un solo intero cromosoma può recare diversi geni per caratteristiche indesiderabili (*linkage drag*) ai fini della coltivazione del frumento ricevente, soprattutto se la specie donatrice è una specie selvatica non adatta alla coltivazione.

Ciò vale soprattutto per specie delle Triticeae che hanno genomi non completamente omologhi (omeologhi) a quelli di frumento, per le quali il trasferimento di geni richiede tecniche citogenetiche particolari dette di “ingegneria cromosomica”.

Sears (1972), coniò il termine “ingegneria cromosomica” riferendosi all'insieme di metodologie citogenetiche volte a consentire tali trasferimenti. Le manipolazioni citogenetiche che ne costituiscono la base metodologica permettono il trasferimento di brevi segmenti cromosomici contenenti i geni di interesse. Poiché tali geni vengono “attinti” da specie appartenenti alla stessa tribù delle Triticeae, si osserva in genere una buona tolleranza del genoma ricevente verso introgressioni di entità comunque superiori al singolo gene “*target*”.

Tra i diversi approcci originariamente proposti e in parte applicati per ottenere il trasferimento, tra cui l'uso di radiazioni ionizzanti (Sears, 1956; Knott, 1961 e Sharma e Knott, 1966), le rotture e fusioni spontanee di bracci cromosomici diversi (Mettin *et al.*, 1973 e Zeller, 1973) e l'induzione di appaiamento e ricombinazione tra cromosomi omeologhi, quest'ultimo consente sicuramente una migliore “precisione di intervento”.

Tra tutti i geni coinvolti nella soppressione dell'appaiamento omeologo il più potente è il *Ph1* (*Pairing homoeologous*) ad eredità dominante, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 5 del genoma B (Riley e Chapman, 1958; Sears e Okamoto, 1958). In effetti l'assenza del *Ph1* è sufficiente a permettere ai cromosomi omeologhi di riconoscere le loro parziali omologie (omeologie) e quindi di sostenere, seppur con frequenza inferiore rispetto a cromosomi completamente omologhi, un certo grado di appaiamento e ricombinazione.

Le ricombinazioni omeologhe possono essere anche indotte per ridurre l'ammontare di cromatina estranea trasferita, sottoponendo i cromosomi a più cicli di appaiamento e ricombinazione.

Tale obiettivo può essere perseguito seguendo diverse vie. Queste dipendono dal materiale disponibile e dalla localizzazione del gene (geni) di interesse. Se il gene è localizzato in posizione distale, infatti, dove densità genica e frequenza di ricombinazione sono più elevate, un singolo scambio può risultare sufficiente a produrre

cromosomi di frumento con brevi segmenti terminali estranei. Una localizzazione più prossimale dello stesso gene, può invece determinare la sostituzione di una cospicuo segmento cromosomico per ottenere un prodotto di minor valore pratico. Mediante ripetuti cicli di ricombinazione indotta, si può infine arrivare ad ottenere il risultato desiderato, cioè trasferire il più piccolo segmento di materiale cromosomico estraneo ancora contenente il gene desiderato. In alternativa, per evitare che i ripetuti cicli di ricombinazione omeologa possano provocare una destabilizzazione della meiosi e portare a pesanti riduzioni in termini di stabilità e fertilità dei tipi ricombinanti, soprattutto nel caso del frumento duro (vedi § 1.3.2), si può ricorrere alla combinazione di incrocio tra due cromosomi ricombinanti, ottenuti in una prima fase di lavoro e che abbiano una distribuzione “complementare” della cromatina di frumento e di quella estranea (Sears, 1983). Se entrambi i ricombinanti in esame sono cioè il risultato di un singolo scambio, e se uno ha il sito di scambio in posizione prossimale e l'altro in posizione distale rispetto al gene di interesse, il gene oggetto del trasferimento si troverà in una regione estranea comune (omologa) all'interno della quale potrà avvenire un *crossing-over* e si potrà ottenere un segmento estraneo intercalare (Ceoloni *et al.*, 2005b). Questo risultato sarà equivalente a quello prodotto in un doppio scambio, evento estremamente raro tra cromosomi omeologhi anche in condizioni geneticamente permissive (mutazione del locus *Ph1*) (Lukaszewski, 1995). I limiti di tale segmento corrisponderanno ai siti di scambio prossimale e distale dei due ricombinanti parentali, per cui il segmento sarà tanto più breve quanto più vicini questi saranno lungo l'asse centromero-telomero.

1.3.2 L'ingegneria cromosomica applicata al frumento duro

Esistono numerose evidenze a sostegno dell'efficacia delle metodologie di ingegneria cromosomica per il trasferimento nei frumenti coltivati di caratteristiche di grande interesse provenienti da specie affini (vedi, ad esempio, Ceoloni, 1987; Gale e Miller, 1987; Friebe *et al.*, 1996; Ceoloni *et al.*, 2005a).

La maggior parte dei prodotti di potenziale ed effettivo impiego nel breeding, sono però stati ottenuti ingegnerizzando il frumento tenero e ciò non solo per una sua maggiore importanza economica a livello mondiale, ma anche per la netta diminuzione della tolleranza verso alterazioni del genoma che il frumento duro tetraploide manifesta nei confronti del tenero esaploide. Tale caratteristica rende altresì più difficile ottenere e

mantenere linee aneuploidi di frumento duro rispetto alla possibilità che in tal senso ampiamente offre, per numero e tipologia, il frumento tenero (Joppa, 1998; Ceoloni *et al.*, 2005a).

D'altra parte, anche in termini di frequenza e spettro di mutazioni per geni essenziali (ad esempio mutazioni clorofilliane), i *Triticum* tetraploidi mostrano un comportamento molto simile a quello dei diploidi piuttosto che degli esaploidi (Mac Key, 1981). Tutto ciò indica che, non ultimo per la loro più antica origine (Feldman *et al.*, 1995; Salamini *et al.*, 2002), i tetraploidi coltivati risentono in maniera più marcata rispetto agli esaploidi delle conseguenze dei processi di diploidizzazione genica (§ 1.2), con conseguente minore “capacità tampone” del loro genoma verso alterazioni geniche e cromosomiche.

La minore capacità che il frumento duro mostra nel tollerare trasferimenti interspecifici/intergenerici di cospicua entità fu evidente dai primi tentativi, che videro impiegate, come intermedi per il trasferimento, linee di frumento tenero portatrici di interi bracci cromosomici estranei, al posto di bracci cromosomici dei genomi A o B, comuni ai frumenti tetraploidi.

Un approccio di questo tipo fu utilizzato per tentare di trasferire in frumento duro il gene di resistenza alla ruggine bruna *Sr27* dal cromosoma 3R di segale (*Secale cereale*), e l'*Sr26* dal 6Ae di *Agropyron elongatum* (Rao, 1978). Nel primo caso, due cicli di reincrocio con una linea di addizione nel frumento tenero Chinese Spring, ditelosomica per il braccio corto del cromosoma 3R di segale, con un ricorrente di duro suscettibile, produssero inizialmente linee di addizione monotelosomiche (14"+t) che, trattate con radiazioni ionizzanti, generarono piante tetraploidi resistenti recanti traslocazioni. Per la traslocazione frumento duro-*Ag. elongatum*, si fece ricorso invece ad incrocio e reincrocio con la varietà di frumento tenero Thatcher, in cui il braccio 6AeL della specie affine si andò a sostituire (traslocazione centrica) al 6AeL di frumento (Friebe *et al.*, 1996). In entrambi i casi descritti, non risultò possibile isolare linee di frumento duro omozigoti per i cromosomi ricombinati. Questi, evidentemente, subivano selezione avversa attraverso la linea germinale maschile, a conferma della intolleranza del genoma tetraploide verso estese alterazioni. D'altra parte la stessa traslocazione, ben tollerata invece a livello esaploide, è stata ampiamente usata in Australia in programmi di miglioramento genetico del frumento tenero (McIntosh *et al.*, 1995).

Un ulteriore esempio del diverso comportamento delle due specie è rappresentato dalla traslocazione 2BS.2RL, portatrice del gene *H21* di segale (genoma R) per la resistenza

alla *Mayetiola destructor*. A livello esaploide, infatti, la mancanza dell'intero braccio cromosomico 2BL endogeno è efficientemente compensata dalla presenza di quello estraneo, tanto da non avere impatto deleterio, ma anzi, determinare una sorta di effetto eterotico sul vigore e la fertilità delle linee portatrici (Friebe *et al.*, 1990). A livello tetraploide, invece, questi stessi parametri mostrano essere considerevolmente influenzati in senso negativo nelle linee omozigoti, solo successivamente ottenute, rispetto a quelle portatrici di un singolo cromosoma ricombinato (Friebe *et al.*, 1999), rendendo questa traslocazione non direttamente utilizzabile per il miglioramento genetico del frumento duro.

Meglio tollerata anche in frumento duro appare la traslocazione sull'1B dell'intero braccio corto del cromosoma 1R di segale (Friebe *et al.*, 1987), su cui sono localizzati geni di resistenza a numerose patologie dei frumenti, tra cui l' *Yr9* per la ruggine gialla, l'*Lr26* per la bruna, l'*Sr31* per la nera, e i geni *Pm8* e *Pm17* per l'oidio (Friebe *et al.*, 1996). Tali linee di frumento duro, mostrano però, se testate in ambiente italiano un decremento di alcuni parametri agronomici rispetto alle cultivar italiane localmente adattate (Boggini *et al.*, 1998). Inoltre, l'analisi delle progenie F2, derivate dall'incrocio con i diversi frumenti duri italiani, ha rivelato una deviazione rispetto alla segregazione 1:2:1 dei marcatori per proteine di riserva sull'1RS e sull'1BL, indicando una trasmissione ridotta del cromosoma 1BL.1RS attraverso la linea germinale maschile (Mazza *et al.*, 1995).

Sono invece risultate decisamente migliori le prestazioni di linee di frumento duro in cui l'intero braccio 1AL è stato sostituito dall'1DL del tenero (Joppa *et al.*, 1998). Oltre a manifestare il fenotipo atteso, tali linee 1AS/1DL, nel confronto con vari genotipi di controllo, hanno manifestato buone caratteristiche agronomiche. Tale risultato può essere in parte attribuito alla considerevole affinità esistente tra i genomi A e D, ed in particolare tra 1A e 1D (Naranjo *et al.*, 1987), che ne determina una elevata capacità compensativa.

Tuttavia, poiché casi come quest'ultimo rimangono eccezionali, l'approccio che si basa sull'uso di mutazioni al locus *Ph1* (Giorgi 1978, 1983) è senz'altro, soprattutto per il frumento duro, quello in grado di portare con molto maggiore probabilità a risultati di validità pratica, ovverosia all'ottenimento di genotipi in cui, anche attraverso interventi successivi, l'entità del materiale estraneo è ridotta, e così il suo possibile impatto negativo sul genotipo ricevente.

Ciò comporta, in generale, l'ottenimento di una gamma relativamente ampia di ricombinanti, nell'ambito dei quali possono essere individuati i tipi meglio rispondenti ai suddetti requisiti (Ceoloni *et al.* 1998, 2000, 2005b; Gennaro *et al.*, 2007).

In linea di principio, un tale risultato è raggiungibile con tanto maggiore facilità quanto più stretta è l'affinità intergenomica che intercorre tra la specie donatrice e quella ricevente, e, non meno importante, con quanto maggiore precisione possono essere caratterizzati i materiali di interesse.

1.4 Il trasferimento di geni utili da *Thinopyrum ponticum*

1.4.1 I geni *Lr19* ed *Yp*

Fino ad oggi sono stati identificati più di 45 geni di resistenza alla ruggine bruna, una tra le più dannose fitopatie dei frumenti, causata dal fungo *Puccinia recondita* f. sp. tritici. Verso la quasi totalità di tali geni il patogeno ha sviluppato geni di virulenza.

Dall'analisi delle circa 30 linee quasi-isogeniche (NILs) disponibili nel background della varietà suscettibile di frumento tenero Thatcher, ognuna recante un differente gene di resistenza *Lr* (leaf rust) a questo patogeno, le quali vengono testate annualmente in vari ambienti per saggiarne l'efficacia, emerge che le linee portatrici dei geni *Lr9* ed *Lr19* sono le sole resistenti ormai da molti anni ed in tutte le località di prova in Italia (Pasquini *et al.*, 2001) e in altri paesi europei (Masterhazy *et al.*, 2000), confermando l'ampia efficacia spazio-temporale di questi geni.

Appare interessante notare che sia l'*Lr9* che *Lr19* derivano da Triticinae selvatiche, il primo da *Aegilops umbellulata* ($2n=2x=14$), il secondo da *Thinopyrum ponticum* (sinonimi *Th. elongatum*, *Agropyron elongatum*, *Lophopyrum ponticum*, $2n=10x=70$).

Per quanto riguarda l' *Lr19*, un gene ad ereditarietà dominante, fin dagli anni '60, si è cercato di trasferirlo dal *Thinopyrum ponticum* al frumento tenero.

Il primo tentativo (Sharma e Knott, 1966), vide l'impiego di radiazioni ionizzanti come metodo per indurre la desiderata traslocazione frumento tenero-*Thinopyrum*. Una linea di traslocazione così ottenuta, chiamata Agatha, presentava la regione estranea (corrispondente a quasi l'intero braccio del *Thinopyrum*) sul cromosoma di frumento 7D (= linea di traslocazione 7DS.7DL/7AgL). Questa linea presentava però, oltre alla resistenza alla ruggine bruna, anche una farina relativamente “gialla” (Knott, 1968). Tale fenomeno risultò causato dalla presenza, nel segmento traslocato proveniente da *Th. ponticum* corrispondente all'intero braccio lungo (7AgL), di uno o più geni

responsabili della colorazione delle farine (denominato *Yp* = Yellow pigment). Successive analisi confermarono la presenza del gene che risultò localizzato distalmente rispetto all'*Lr19* (Bournival *et al.*, 1994). Questo carattere, ovviamente non apprezzato nelle farine di frumento tenero, precluse la possibilità di utilizzare Agatha in programmi di miglioramento genetico per introdurre l'*Lr19* in varietà destinate alla coltivazioni. A tal fine era necessario separare i due geni.

Knott (1980) provò a raggiungere lo scopo mediante l'uso di agenti mutageni, ma in tentativo non ebbe successo. Sears (1973), utilizzando l'assenza del cromosoma 5B, e quindi del gene *Ph1* in esso localizzato, per indurre ricombinazione tra il cromosoma 7Ag ed i suoi omeologhi di frumento, ottenne diverse linee ricombinanti, tutte coinvolgenti il cromosoma 7D eccetto una, chiamata Transfer N°12, in cui il cromosoma di frumento ricombinato era il 7A (Eizenga, 1987). Tutte le linee ottenute da Sears, tuttavia, presentavano la caratteristica di produrre farine gialle (Sears, 1978), risultando anch'esse non adatte a programmi di miglioramento volti a trasferire in frumento tenero la resistenza conferita dall'*Lr19*.

Tali limiti, posti dalla presenza del gene *Yp*, vengono però a cadere nel momento in cui l'obiettivo del miglioramento diventa il frumento duro. Tale specie infatti viene impiegata principalmente nella produzione di pasta, in cui la colorazione gialla delle semole è una caratteristica qualitativa molto apprezzata dal consumatore (Boggini e Pogna, 1990).

Ottenere linee di frumento duro recanti i gene *Lr19* + *Yp*, è stato l'obiettivo di ricerche svolte presso il laboratorio di Citogenetica vegetale dell'Università della Tuscia, che hanno effettivamente portato al risultato desiderato.

Per poter trasferire l'*Lr19* e l'*Yp* fu scelta come linea “donatrice” la Transfer N°12 ottenuta da Sears (1973, 1978) in cui la combinazione coinvolgeva il cromosoma 7A, comune anche al genoma di frumento duro (AB). Tale scelta permetteva di sfruttare la normale ricombinazione omologa che può avvenire tra il cromosoma 7A/7Ag del frumento tenero, già recante un segmento del 7Ag con in geni *Lr19* + *Yp*, ed il 7A del duro. Per ottenere tale risultato, la linea Transfer N°12, omozigote per il cromosoma 7A/7Ag, fu incrociata e reincrociata con varietà di frumento duro, sino a ristabilire la desiderata condizione tetraploide ($2n=28$).

Tuttavia, dall'autofecondazione della linea tetraploide ottenuta (detta ricombinante “primario”), inizialmente eterozigote, non fu ottenuto alcun omozigote per il cromosoma 7A/7Ag (Ceoloni *et al.*, 1996), evidentemente non tollerato in tale

condizione dal genoma di frumento duro, pur essendolo in quello di tenero. Mediante ibridazione *in situ* genomica (GISH, § 1.5.2) fu infatti evidenziato che sia nella “Transfer N°12” che nei ricombinanti primari di frumento duro il segmento di *Th. ponticum* era molto più esteso di quanto stimato precedentemente (Sears, 1973, 1978; Eizenga, 1987), rimpiazzando l'intero braccio lungo e circa metà del braccio corto del cromosoma 7A (Ceoloni *et al.*, 1996). Inoltre, si era notato che la trasmissibilità di tale segmento, normale attraverso la linea geminale femminile, era quasi nulla attraverso quella maschile. Ciò dava conto dell'assenza di omozigoti registrata in F2. Probabilmente la cospicua entità del segmento 7Ag riduceva fortemente la trasmissibilità del cromosoma ricombinato attraverso il polline in genotipi tetraploidi, dove la capacità di compensazione di eventuali sbilanci genici causati dalla traslocazione, è nota essere minore rispetto a quella degli esaploidi (§ 1.3.2).

Per poter impiegare i geni utili di *Th. ponticum* in programmi di miglioramento del frumento duro, si rendeva perciò necessaria una riduzione della porzione cromosomica estranea fiancheggiante i geni *Lr19* e *Yp*. Ciò è stato ottenuto attraverso metodologie di ingegneria cromosomica, inducendo ricombinazione, tramite l'uso di mutanti *Ph1* di frumento duro, tra un normale cromosoma 7A e quello recante la traslocazione 7A/7Ag sopra descritta (ricombinante “primario”).

Dopo aver incrociato e reincrociato il ricombinante “primario” con la varietà di Cresò mutata al locus *Ph1* (*ph1c/ ph1c*), nelle progenie di linee omozigoti *ph1c* ed eterozigoti per il cromosoma ricombinante, in cui era attesa verificarsi ricombinazione tra omeologhi, si sono ricercati i possibili ricombinanti “secondari”, recanti cioè una porzione ridotta di *Th. ponticum* sul cromosoma 7A rispetto a quella del ricombinante “primario”. La selezione di tali ricombinanti, avvenuta in fasi precedenti al presente lavoro, è stata effettuata tramite GISH, utilizzando come sonda il DNA totale di *Th. ponticum*, nonché verificando in plantule di vari individui ricombinanti, la risposta resistente (presenza dell'*Lr19*) all'infezione da ruggine bruna.

Con una frequenza di ricombinazione 7AL-7AgL di circa il 2.5%, sono stati isolati 10 ricombinanti “secondari” (Fig. 2; Ceoloni *et al.*, 2005b). Il confronto tra i vari ricombinanti con porzioni 7AgL distali di diversa entità, distinti da diverso fenotipo di resistenza/suscettibilità (rispettivamente presenza o assenza del gene *Lr19*), ha permesso di dedurre che il gene *Lr19* è localizzato nel 25% più distale del braccio lungo, e precisamente nella porzione che differenzia i ricombinanti R5-2-10 (23% di 7AgL, resistente), ed R14-1 (22% di 7AgL, suscettibile).

Progenie omozigoti della linea R5-2-10, derivate dal suo incrocio con buone varietà attualmente coltivate, ma suscettibili alla ruggine bruna, hanno dato risultati molto incoraggianti in prove preliminari di pieno campo (Gennaro *et al.*, 2003, 2006).

La presenza del segmento 7AgL di questa linea non sembra avere effetti negativi sulla stabilità e sulle caratteristiche agronomiche del genotipo portatore. Ciò indica che la linea R5-2-10 rappresenta un buon materiale ai fini di una utilizzazione pratica nel miglioramento genetico del frumento duro per le caratteristiche conferite dai geni *Lr19* e *Yp*.

L'osservazione che la distribuzione della cromatina (77% 7AL+ 23% distale di 7AgL) di questo ricombinante risulta praticamente comune, nella regione cromosomica di interesse, a quella della linea R8-6-4 (90% 7AgL + 10% 7AL distale), con entrambi i cromosomi ricombinanti essendo portatori dei geni *Lr19+Yp* (Fig. 2), ha portato a considerare fattibile la possibilità di ridurre ulteriormente la quantità di cromatina associata ai geni di interesse.

A tal fine sono state prodotte F1 tra le due linee portatrici di tali cromosomi ricombinanti, R8-6-4 e R5-2-10, nelle quali era stata ristabilita la normale condizione dominante al locus *Ph1*.

In questa condizione, infatti, i cromosomi ricombinanti delle due linee utilizzate possono dar luogo a ricombinazione solo nella ristretta regione omologa 7Ag comune. Uno dei due tipi cromosomici attesi e di fatto isolati in seguito a tale ricombinazione corrisponde ad un intercalare 7AgL, avente lo stesso limite prossimale del cromosoma 7A/7Ag presente nella linea R5-2-10 (FL = frazione di 1 della distanza rispetto al centromero = 0.77), ed il limite distale corrispondente a quello della linea R8-6-4 (FL = 0.90). Dati tali limiti, la regione intercalare di cromatina estranea (7AgL), compresa tra FL 0.77 e 0.90, rappresenta circa il 13% del braccio ricombinato (Fig. 3 e Ceoloni *et al.*, 2005b).

Fig. 2 Ottenimento di ricombinanti di frumento duro recanti porzioni di diversa entità del cromosoma 7Ag di *Th. ponticum*. Sul 7AgL sono localizzati i geni *Lr19* (resistenza alla ruggine bruna) e *Yp* (=Yellow pigment). Le mappe fisiche sono state ottenute tramite GISH (Ceoloni *et al.*, 2005b).

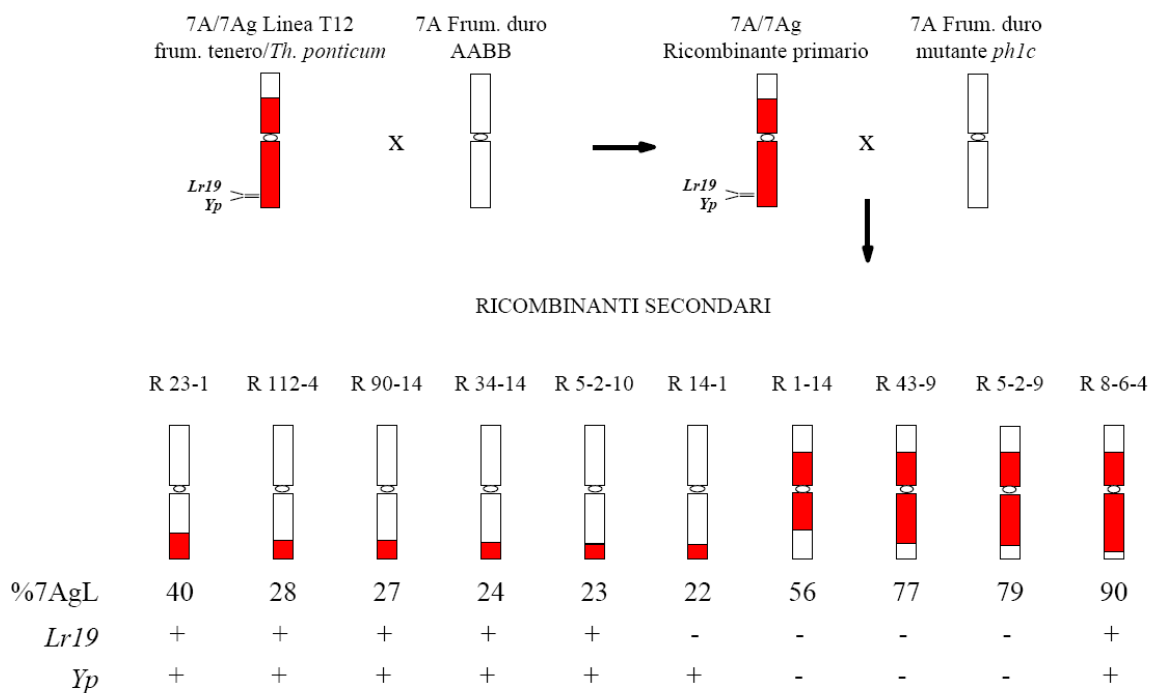
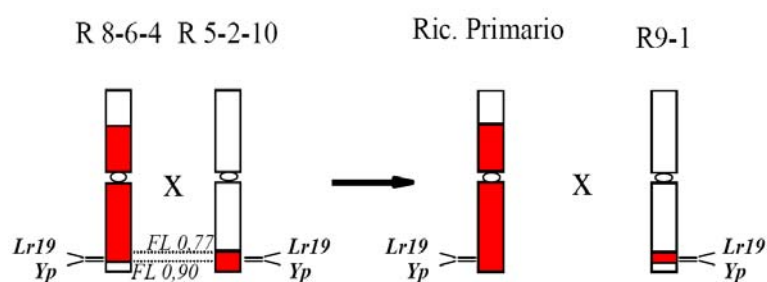


Fig. 3. Ottenimento del ricombinante R9-1 di frumento duro recante una porzione intercalare del braccio 7AgL contenente i geni *Lr19*+*Yp* (Ceoloni *et al.*, 2005b).



1.4.2 Il trasferimento di un potenziale QTL per la produttività

L'interesse si è recentemente rivolto verso un altro ricombinante, R23-1, contenente circa il 40% di 7AgL (Fig. 2), comprensivo dell'*Lr19* e dell'*Yp*, oltre che di un potenziale QTL per produttività. Diverse evidenze indicano che tale QTL, localizzato in posizione prossimale rispetto all'*Lr19* e *Yp*, sarebbe presente nel ricombinante R23-1 e assente nell'R5-2-10.

Ad evidenziare questo QTL (qui denominato *Yld-7AgL*) ed i suoi effetti positivi sulla produttività sono state soprattutto indagini condotte dal CYMMIT in diversi ambienti e per diversi anni su linee quasi isogeniche (NILs) della linea di traslocazione 7D/7Ag denominata T4 (Sharma e Knott, 1966) nel background di diversi frumenti. Tali indagini hanno rilevato nelle NILs con la traslocazione T4 un significativo aumento (>10%) di biomassa ed anche di resa in granella (>15%) (Singh *et al.*, 1998; Reynolds *et al.*, 2001; Monneveux *et al.*, 2003).

Il confronto tra la mappa genetica dell'R23-1 e dati recentemente ottenuti in frumento tenero (Quarrie *et al.*, 2006) suggeriscono una possibile ortologia tra l'*Yld-7AgL* ed uno colineare sul 7AL, con effetti analoghi sulla produttività. Per tale QTL è stato suggerito un gene candidato che porterebbe ad un aumento della larghezza della foglia bandiera e del suo contenuto in clorofilla e quindi a maggior quantità di assimilati trasferiti alla spiga (Quarrie *et al.* 2006). Anche nelle NILs di tenero recanti la traslocazione 7DL-7AgL della linea T4 (con il 70% di 7AgL sul 7DL), in aggiunta agli effetti agronomici, è stata osservata un'aumentata capacità fotosintetica della foglia bandiera durante la fase di riempimento del seme (Reynolds *et al.*, 2001). Tali evidenze hanno rafforzato il nostro interesse per la linea R23-1, anche in considerazione di dati preliminari di misura della larghezza della foglia bandiera di piante eterozigoti che, come nel caso del QTL sul 7AL, è risultata significativamente maggiore rispetto al controllo.

1.4.2.1 Problematiche connesse al trasferimento di segmenti da specie affini

L'ottenimento e l'effettivo impiego pratico in frumento duro di materiali derivanti da ingegneria cromosomica portatori di caratteri migliorativi, è necessariamente il risultato di un lavoro “fine”.

Fin dai primi rilievi successivi all'isolamento della linea ricombinante R23-1 (Ceoloni *et al.*, 2005b) e, più chiaramente, nel corso dello sviluppo di una linea quasi-isogenica attraverso reincroci alla varietà di frumento duro Simeto (usata come genitore

maschile), il cromosoma R23-1 aveva mostrato una ridotta trasmissibilità attraverso la linea germinale maschile. In effetti, da analisi condotte su cromosomi di frumento tenero ingegnerizzati con diverse porzioni di 7AgL della stessa accessione di *Th. ponticum* (Sears, 1978; Marais 1989), era emerso che alcuni mostravano un'anomala trasmissibilità attraverso il polline. Il fenomeno era stato attribuito alla presenza sul 7AgL, in posizione prossimale rispetto ai geni *Lr19* e *Yp*, di un gene del *Th. ponticum* denominato *Sd1* (Segregation distortion 1) (Zhang e Dvorak, 1990). Tuttavia, inizialmente, dal confronto tra i dati di mappa genetica relativi al cromosoma R23-1 (Gennaro *et al.*, non pubblic.) e una mappa genetica di un cromosoma ricombinante di tenero recante *Sd1* (Marais *et al.*, 2000), si era escluso, almeno su questa base, la presenza del gene *Sd1* nell'R23-1. Gli studi condotti in frumento tenero indicavano inoltre un comportamento di cromosomi contenenti *Sd1* variabile a seconda del background varietale ricevente (Knott, 1971; Prins e Marais, 1999).

Dagli studi riguardanti gli effetti dei geni *Sd* in diversi organismi (Hurst, 1993; Taylor, 2003), si evince che l'azione di tali geni sia in molti casi di tipo gametocidico: i gameti portatori, esplicando un'azione *killer* sui gameti, determinano la propria trasmissione preferenziale o addirittura esclusiva.

1.5 Strumenti di ausilio all'ingegneria cromosomica

Per seguire un processo di introgressione nelle sue varie fasi vengono utilizzate sia analisi citologiche e citogenetiche classiche sia metodologie di genetica e citogenetica molecolare.

1.5.1 Tecniche di analisi citologica

Le tecniche di analisi citologica (analisi dell'appaiamento meiotico, localizzazione cromosomica e mappatura di geni mediante linee aneuploidi) consentono di ottenere un importante riscontro sulla stabilità dei ricombinanti in corso di sviluppo, anche per un loro eventuale uso in programmi di *breeding*.

In particolare, l'analisi del comportamento dei cromosomi alla metafase I meiotica, consente di stabilire la regolarità dell'appaiamento tra cromosomi omologhi, prerequisito ad una loro corretta segregazione.

Anche l'analisi della gametogenesi può fornire utili informazioni circa l'effetto dell'introgressione a livello gametofitico, in particolare di quello maschile, in genere il più soggetto a selezione avversa in caso di svantaggio competitivo.

1.5.1.1 La gametogenesi pollinica

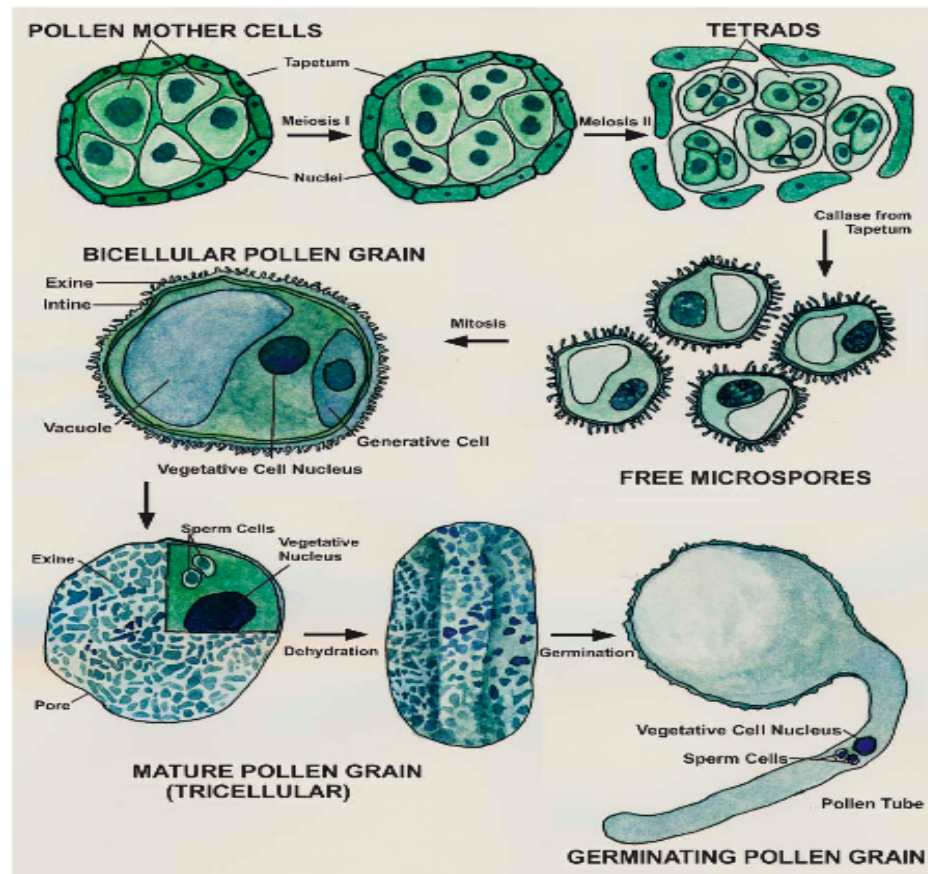
Lo sviluppo del gametofito maschile coinvolge una serie di eventi che culminano nella produzione e nel rilascio di granuli pollinici maturi (McCormick, 1993, 2004). Il granulo pollinico maturo è considerato una cellula nella cellula, dotata di funzioni molto specializzate. Chiusa all'interno di una particolare parete cellulare, la cellula vegetativa ospita un citoplasma con un specifico pattern di espressione genica. Il suo destino finale è trasportare le due cellule spermatiche attraverso i tessuti femminili e il loro rilascio in prossimità della cellula uovo (Boavida *et al.*, 2005).

Tutto il processo ha inizio all'interno dell'organo riproduttivo maschile, lo stame, che consiste in un'antera, nella quale avviene lo sviluppo del polline, e di un peduncolo simile a uno stelo di supporto per il trasporto dei nutrienti e per facilitare la dispersione del polline (Scott *et al.*, 1991; Irish 1999).

Lo sviluppo del polline avviene all'interno del locus dell'antera o sacco pollinico e coinvolge più geni di quelli di ogni altro processo di sviluppo della pianta (Scott *et al.*, 2004). Il differenziamento delle antere porterà a diverse cellule specializzate e tessuti coinvolti in funzioni riproduttive e non (supporto e deiscenza) (Koltunow *et al.*, 1990). Una rappresentazione schematica e riassuntiva dei maggiori eventi della gametogenesi maschile con i corrispondenti stadi di differenziamento delle antere è riportato in Fig. 4. Le due divisioni meiotiche trasformano ogni microsporocito (o cellula madre del polline = PMC) in una tetrad di microspore aploidi incassate in una unica parete costituita da callosio. In molte specie la dissoluzione della parete di callosio determina il rilascio delle microspore aploidi dalle tetradi (McCormick 1993). Dopo il rilascio, le microspore aploidi vanno incontro a riorganizzazione citoplasmatica, collasso dei piccoli vacuoli in un unico più grande che polarizza la maggior parte del citoplasma in un'unica zona periferica della cellula e il nucleo in un'altra. Tale processo risulta mediato dal citoscheletro (Brown and Lemmon, 1991; Zonia *et al.*, 1999). Questa polarizzazione conduce ad una asimmetrica divisione, chiamata I mitosi del polline (PMI), essenziale per il differenziamento di una grande cellula vegetativa (VC) e di una piccola cellula generativa (GC), che successivamente produrrà i nuclei spermatici. In molte specie (tra cui il frumento) la cellula generativa si divide ulteriormente (II mitosi del polline), dando vita ai due nuclei spermatici prima che il polline venga rilasciato, in altre invece questa divisione avviene solo dopo la germinazione del polline. Alla fine di questa divisione (PMII) il nucleo vegetativo e i due nuclei spermatici assumeranno un caratteristico arrangement strutturale, l'unità germinativa maschile (MGU). Le fasi

finali della maturazione del polline sono di solito coincidenti con l'antesi fiorale e la deiscenza delle antere, che terminano con il rilascio di granuli pollinici maturi.

Fig. 4 Schema della microgametogenesi (da Mc Cormick, 2004)



1.5.2 Tecniche di genetica e citogenetica molecolare

I metodi classici, utilizzati per seguire un processo di introgressione nelle sue varie fasi, possono oggi essere affiancati da altri metodi di analisi che derivano dalle recenti acquisizioni nei campi della genetica e citogenetica molecolare.

Tra questi, la *marker technology* permette di disporre di un gran numero e tipi di marcatori molecolari. I primi marcatori molecolari messi a punto sono stati gli RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), che consentono di distinguere individui sulla base del polimorfismo dei frammenti di restrizione del loro DNA. A questi, il cui numero è enormemente aumentato negli ultimi anni (oltre 1100 mappati nel genoma già nel 1995, vedi Law, 1995), ha fatto seguito una seconda “generazione” di marcatori,

basati sulla reazione a catena della polimerasi (*Polymerase Chain Reaction*, PCR). Questa rapida ed efficiente tecnologia che, fra l'altro permette di utilizzare più agevolmente un RFLP convertito, previo sequenziamento, in un STS (*Sequence Tagged Site*), è comune a numerosi sistemi di marcatura, tra cui i RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), gli ALFP (*Amplified Fragment Length Polymorfism*), i microsatelliti (chiamati anche SSR = *Simple Sequence Repeats*) ed i più recenti EST-SSRs, (EST = *Espressed Sequence Tag*) utilizzati per lo sviluppo di mappe sempre più dense.

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

Riguardo alla citogenetica molecolare, le principali potenzialità e sviluppi sono legati alla tecnica dell'ibridazione *in situ* (ISH), grazie alla quale è possibile rivelare su preparati citologici l'ibridazione tra DNA (o RNA) usato come sonda e quello corrispondente fissato sul preparato.

Tra i più importanti miglioramenti metodologici della tecnica dell' ISH, è stata fondamentale la sostituzione dell'impiego di sonde marcate con radioattivo (Gall e Pardue, 1969; John *et al.*, 1969) con sistemi di marcatura degli acidi nucleici non radioattivi. In tal modo è stato possibile superare gli svantaggi connessi con l'uso del radioattivo, tra cui la scarsa sicurezza, i lunghi tempi di esposizione e la bassa risoluzione del segnale emesso.

I sistemi di marcatura non radioattiva (Leitch *et al.*, 1994), prevedono l'inserzione nel DNA della sequenza di interesse (sonda) di un analogo di un nucleotide (spesso dUTP = deossiuridin-trifosfato) legato ad una molecola, quale la biotina (vitamina H), la digossigenina (steroidi presente in natura nel genere *Digitalis*), oppure un fluorocromo, che permetta di marcare la sonda.

Il sistema di rilevamento mediante fluorocromi (Trask, 1991), detto FISH (*Fluorescence In situ Hybridization*), è quello oggi più utilizzato, dati gli innumerevoli vantaggi ad esso legati: l'alta risoluzione del segnale, la possibilità di visualizzare sullo stesso preparato più sonde marcate con diversi fluorocromi, ed anche la possibilità di sottoporre un preparato a più ibridazioni successive (Cuadrado *et al.*, 1997).

Per rilevare tramite ISH l'introggressione di segmenti cromosomici da una specie ad un'altra, si possono impiegare come sonde sequenze di DNA specie- o genoma-specifiche. Tuttavia quelle disponibili, almeno nell'ambito delle *Triticinae*, non sono

numerose e comunque non in grado di marcare differenzialmente tutto il genoma sia di frumento che della specie affine.

Per migliorare la “copertura” differenziale dei vari genomi, un efficace approccio alternativo deriva dall'uso come sonda del DNA genomico totale della specie da cui deriva il segmento cromosomico trasferito nel genoma di frumento (Anamthawat-Jonsson *et al.*, 1990). Tale metodologia, definita GISH (Genomic in situ Hybridization), non si differenzia in maniera sostanziale dall'ISH con sonde specifiche.

Anche se di più difficile applicazione nel campo vegetale, a causa di alcune caratteristiche intrinseche del materiale vegetale (presenza della parete cellulare, maggiore grado di condensazione dei cromosomi, difficoltà di sincronizzare il ciclo cellulare e quindi di accumulare cellule ad uno stadio determinato), l'ibridazione *in situ* trova oggi numerose applicazioni, come l'identificazione di genomi, cromosomi o porzioni di questi: l'analisi di variazioni strutturali come delezioni, duplicazioni, traslocazioni o inversioni; il rilevamento di introgressioni in ibridi interspecifici e loro derivati (Ceoloni *et al.*, 1996, 1998); l'analisi di eventi meiotici quali l'appaiamento (Cuadrado *et al.*, 1997); lo studio dell'organizzazione fisica di sequenze nell'ambito del genoma e di singoli cromosomi e quindi, lo studio della relazione tra mappe fisiche e mappe genetiche (Biagetti *et al.*, 1999).

1.6 Scopo del lavoro

L'obiettivo di questa tesi di dottorato è stato l'ottenimento di un cromosoma 7A/7Ag contenente i geni *Lr19*, *Yp* e il potenziale QTL per la produttività associati ad una quantità di cromatina 7AgL ridotta rispetto al ricombinante R23-1, e la valutazione del suo impatto in frumento duro, a livello gametofitico e sporofitico, anche a confronto con quello dell'R23-1.

L'osservazione che la distribuzione della cromatina (60% 7AL+ 40% distale di 7AgL) di questo ricombinante risulta praticamente complementare, almeno nella regione cromosomica di interesse, a quella della linea R9-1 (87% 7AL + 13% 7AgL intercalare), con entrambi i cromosomi ricombinanti essendo portatori dei geni *Lr19+Yp* (Fig. 2), ha portato a considerare fattibile la possibilità di ridurre ulteriormente la quantità di cromatina associata ai geni di interesse.

A tal fine sono state prodotte F1 tra le due linee portatrici di tali cromosomi ricombinanti, R23-1 e R9-1, nelle quali era stata da tempo ripristinata la normale condizione dominante al locus *Ph1*.

In questa condizione i cromosomi ricombinanti delle due linee utilizzate possono dar luogo a ricombinazione solo nella ristretta regione omologa 7Ag comune. Uno dei due tipi cromosomici attesi in seguito a tale ricombinazione corrisponderà ad un segmento 7AgL intercalare, avente lo stesso limite prossimale del cromosoma 7A-7Ag presente nella linea R23-1 (FL = 0,60), ed il limite distale corrispondente a quello della linea R9-1 (FL = 0,90). Dati tali limiti, la regione intercalare di cromatina estranea (7AgL), compresa tra FL = 0.60 e 0.90, rappresenterà circa il 30% del braccio ricombinato (Fig. 5, § 3.1.1).

2 MATERIALI E METODI

2.1 Materiali

2.1.1 Materiali vegetali

Per l'ottenimento di un nuovo ricombinante frumento duro-*Th. ponticum* sono state incrociate due linee a disposizione del laboratorio, aventi porzioni di 7AgL di diverse dimensioni sul braccio lungo del cromosoma 7A di frumento duro. I cromosomi ricombinanti, portati dalle due linee oggetto di studio, sono schematizzati in Tab.1 e il loro ottenimento è descritto in dettaglio nel paragrafo (§ 1.6).

In Tab.1 sono riportate, in percentuale rispetto alla lunghezza del braccio 7AL/7AgL, le relative estensioni delle porzioni 7AgL presenti in ciascun ricombinante. La linea R23-1 usata nell'incrocio effettuato per generare il nuovo ricombinante, è eterozigote per il cromosoma ricombinato e per un 7A di frumento. Il braccio 7AL/7AgL della linea R23-1 possiede una porzione distale di 7Ag sul cromosoma 7A, pari al 40% del braccio lungo, comprensivo dei tre geni d'interesse, quali il gene *Lr19*, l'*Yp* e un potenziale QTL per la produttività (*Yld-QTL*). L'altro ricombinante, denominato R9-1 (Tab. 1) utilizzato nell'incrocio è una linea omozigote per tale cromosoma ricombinato ed è caratterizzato dalla presenza di un segmento 7Ag intercalare in posizione distale delle dimensioni di circa il 13% del braccio lungo e contenente due dei geni target.

Uno dei due ricombinanti che si possono ottenere da questo incrocio (come descritto nel § 3.1.1), è un prodotto che già era stato ottenuto presso questo laboratorio denominato l' R5-2-10 (Fig. 2),. Come illustrato, questo ricombinante possiede una porzione distale di 7AgL sul cromosoma 7AL, di circa il 23% del braccio e possiede due (*Lr19* e *Yp*) dei tre geni target della ricerca. L'altro prodotto di ricombinazione ottenibile è al contrario un ricombinante del tutto nuovo, contenente i tre geni di interesse ma caratterizzato dal possedere un ridotto quantitativo di cromatina di *Th. ponticum* rispetto alla linea parentale R23-1.

Sono inoltre state utilizzate una serie di linee di controllo utili alla preparazione delle sonde impiegate, quali la varietà Simeto e la specie selvatica *Th. ponticum*. La varietà Simeto è stata anche utilizzata per l'interpretazione del profilo di amplificazione di alcuni marcatori molecolari e per la produzione di linee di re-incrocio (BC₁F₃) con il ricombinante R23-1.

Tab.1 I ricombinanti frumento duro-*Th.ponticum* impiegati nel presente lavoro di ricerca

Linea ricombinante	% 7AgL	Lr19	Yp	Yield QTL	Impiego nella ricerca
R9-1	13%	+	+	-	parentale per generazione nuovo ricombinante
R5-2-10	23%	+	+	-	analisi della gametogenesi
R112-4	28%	+	+	+	analisi della gametogenesi
R23-1	40%	+	+	+	parentale per generazione nuovo ricombinante e studio della segregazione e della gametogenesi

2.1.2 Sonde

2.1.2.1 Sonde utilizzate per il preannealing-GISH

Per gli esperimenti di ibridazione *in situ* genomica tramite preannealing-GISH (§ 2.2.4) sono state utilizzate come sonde i DNA genomici totali di *Th. ponticum* e frumento duro.

2.1.2.2 Marcatori microsatelliti

I marcatori microsatelliti, detti anche SSR (Simple Sequence Repeats), rappresentano un valido strumento in lavori di mappatura e selezione sia per la numerosità e distribuzione nei genomi degli Eucarioti, sia per l'elevato grado di polimorfismo che li caratterizza. Le mappe fisiche e genetiche a disposizione contenevano vari marcatori microsatelliti di cui erano già state pubblicate le sequenze dei primers. Per la genotipizzazione delle progenie segreganti ottenute dall'incrocio R23-1 x R9-1, e per l'analisi della segregazione delle popolazioni BC₁F₂ e BC₁F₃ del cromosoma R23-1, sono stati scelti i marcatori microsatelliti riportati di seguito:

1. GWM 344, mappata da Roder et al. (1998), su una popolazione segregante

derivata dall'incrocio tra *T. boeoticum* x *monococcum*. Le sequenze dei primers utilizzati e le condizioni di amplificazione sono pubblicamente disponibili presso le pagine internet <http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/graingenes/report.cgi?class=probe;name=WMS344>

2. CFA2240 e CFA2019, sviluppata a partire da una libreria di DNA genomico di *T. monococcum* spp. *urartu*, donatore del genoma A ai frumento coltivati (Sourdille *et al.*, 2001). Le sequenze dei primers della serie CFA2240 e CFA2019, insieme alle specifiche condizioni di amplificazione, sono pubblicamente disponibili presso le rispettive pagine internet <http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/graingenes/report.cgi?class=marker&name=CFA2240> e <http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/graingenes/report.cgi?class=marker&name=CFA2019>

2.1.2.3 STS (Sequenze Tagged Sites)

Nel corso delle analisi condotte presso questo laboratorio per l'individuazione di una sequenza associata ed eventualmente candidata per il gene di resistenza *Lr19* (Gennaro *et al.*, 2009), sono state disegnate coppie di primers specifiche per tale sequenza (marcatore AG15 di tipo STS). Nel tentativo di ottenere la sequenza completa di tale sequenza candidata per il gene *Lr19*, sono stati sviluppati primers, alcuni dei quali (F1/R5), hanno evidenziato la capacità di amplificare, oltre al frammento candidato per il gene *Lr19*, anche un ulteriore frammento denominato AG15₆₀₀ localizzato prossimalmente al punto di scambio 7AL/7AgL della linea R5-2-10 e in posizione distale rispetto a quello dell'R90-14 (Fig.6).

Per poter sfruttare tale polimorfismo per la selezione dei materiali della presente ricerca (vedi § 3.1.1 e Fig. 5), è stata sviluppata una coppia di primers altamente specifici per la banda AG15₆₀₀ (vedi § 2.2.3).

Difatti la coppia di primers F1/R5, determinava l'amplificazione di una banda (sequenza) 7Ag specifica presente nel ricombinante R23-1 e una molto flebile ma di stessa lunghezza sul DNA di Simeto.

2.2 Metodi

2.2.1 Metodi di estrazione del DNA e stima della concentrazione

2.2.1.1 Estrazione del DNA genomico

Attraverso questa procedura (Tai *et al.*, 1990) è stato estratto il DNA totale utilizzato sia in esperimenti GISH che in analisi PCR.

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

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

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

2.2.1.2 Estrazione di DNA da cariossidi

La disponibilità di un protocollo di estrazione del DNA con tempi di esecuzione brevi, insieme all'utilizzo di porzioni di cariossidi come materiali di partenza, ha consentito di effettuare più speditamente il lavoro di selezione su un numero considerevole di

campioni ed in fasi molto precoci dello sviluppo della pianta. Il procedimento seguito è basato su quello descritto da Dellaporta *et al.*, (1983).

La porzione di ciascun seme previamente prelevata e corrispondente a circa il ½ o il ¼ non contenente l'embrione, è stata inizialmente ridotta in polvere pestellandola attraverso diversi strati di carta da lucido. La polvere, successivamente trasferita in una eppendorf da 1.5 ml, è stata quindi messa ad incubare in 700 µl di tampone di estrazione (Tris 100 mM pH 8, EDTA 50 mM pH 8. NaCl 500 mM, SDS 1.25%) per 30' a 65°C, agitando vigorosamente ogni 10'. Successivamente, alla provetta sono stati aggiunti 200 µl di una soluzione 5 M di potassio acetato e, dopo agitazione, si è incubato per 1h in ghiaccio. Trascorso questo tempo, i campioni sono stati centrifugati per 20' a 13000 rpm e a 4°C. Il sopranatante recuperato, è stato quindi filtrato in una nuova eppendorf, attraverso il passaggio su carta Miracloth (Calbiochem) impacchettata entro un puntale da 1ml. Dopo aggiunta di 500 µl di isopropanolo freddo (-20°C), i campioni sono stati pellettati in centrifuga per 15' a 13000 rpm a T ambiente (RT). Le provette sono state svuotate invertendole e lasciate aperte fino alla completa evaporazione del liquido residuo. Il DNA è stato infine dissolto in un volume variabile, dipendente dalla quantità di materiale iniziale prelevato, tra 30 e 50 µl di acqua ultra pura e conservato a 4°C.

2.2.1.3 Stima della concentrazione del DNA estratto

Prima dell'uso i DNA sono stati saggiati sia per verificare l'integrità e/o la purezza che per stimarne la concentrazione. A questo scopo è stato utilizzato il metodo della misurazione tramite intensità di fluorescenza del bromuro di etidio.

- Misurazione tramite intensità di fluorescenza del bromuro di etidio

Questo metodo è efficace e preferibile nel caso di quantità esigue di DNA (come il caso dell'estrazione da cariossidi). Si basa sulla proporzione diretta esistente tra la quantità di DNA presente in un dato volume e la fluorescenza emessa dal bromuro di etidio intercalato nella doppia elica di questo. 0.5-1 µl di DNA (tal quale o diluito) sono stati caricati su un gel di agarosio all'1% in 1x TBE (Tris 89mM; acido borico 89mM; EDTA 2mM) contenente 0.5 µg/ml di bromuro di etidio, insieme a diversi campioni di λ DNA a concentrazione nota. Dopo una breve corsa elettroforetica (10-20'), l'immagine del gel agli UV è stata acquisita tramite il software KODAK 1D. Dal confronto diretto della fluorescenza emessa da ognuno dei campioni di DNA rispetto a quella dei controlli è stata quindi

ricavata la relativa concentrazione di ciascuno di essi, anche grazie all'ausilio del software dedicato.

2.2.2 Analisi molecolari basate su reazioni a catena della polimerasi (PCR)

La produzione della nuova linea ricombinante si è avvantaggiata di metodi di selezione precoci basati sia sull'ibridazione in situ, sia sull'utilizzo di marcatori molecolari del tipo STS e SSR.

Sono stati identificati marcatori molecolari che hanno permesso di ottimizzare la selezione, riducendo, fra l'altro, l'impiego della più laboriosa tecnica dell'ibridazione in situ.

2.2.2.1 Microsatelliti

Il microsatellite GWM344 è stato amplificato come descritto in Roder et al. (1998), con qualche modifica applicata per ottimizzare le condizioni al termociclatore e alla *Taq* polimerasi utilizzata (Tab.2)

Il volume di reazione di 10 µl conteneva: 1 x Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP mix, 500 nM di ciascun primer (forward e reverse), 0.5 U di *Taq* polimerasi (Amersham). Il protocollo di amplificazione applicato è stato 1 ciclo di 5' a 95°C, seguito da 45 cicli a 94°C per 45", 55°C per 1' e 72°C per 30" seguiti da 5' a 72°C.

Per l'amplificazione dei microsatelliti della serie CFA, le reazioni eseguite sono state condotte in un volume di 10 µl contenente 1 x Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP mix, 500 nM di ciascun primer (forward e reverse), 0.5 U di *Taq* polimerasi (Amersham). Il protocollo di amplificazione applicato è stato: 1 ciclo di 5' a 94°C, seguito da 35 cicli a 94°C per 40", 56°C per 40" e 72°C per 40". Le sequenze dei primers di entrambe le serie sono riassunte in Tab. 2

Come accennato nel § 2.1.2.3, per poter sfruttare il marcatore molecolare STS AG15₆₀₀ specifico per il segmento cromosomico 7Ag presente nei ricombinanti R23-1 e nel nuovo ricombinante R9-23 e assente nei ricombinanti R9-1 ed R5-2-10 (Fig. 5), è stata prodotta una coppia di primers denominata AG15F1₆₀₀/AG15R5 il cui ottenimento è descritto nel (§ 2.2.3)

Il protocollo di amplificazione applicato è stato: 1 ciclo di 3' a 94°C, seguito da 35 cicli a 94°C per 45", 57°C per 45" e 72°C per 45" seguiti da 5' a 72°C. Le reazioni eseguite sono state condotte in un volume di 10 µl contenente 1 x Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200

μ M dNTP mix, 500 nM di ciascun primer (forward e reverse), 0.5 U di *Taq* polimerasi (Amersham).

Le sequenze dei primers disegnate per questo marcatore sono riportate in Tab. 2

Tab.2 Sequenze dei primers dei marcatori usati nelle selezioni

Nome	Tipo	Forward 5'-3'	Riverse 5'-3'	Locus
CFA2240	SSR	TGCAGCATGCATTTTAGCTT	TGCCGCACTTATTTGTTTAC	Xcfa2240-7A-7Ag
CFA2019	SSR	GACGAGCTAACTGCAGACCC	CTCAATCCTGATGCGGAGAT	Xcfa2019-7A
GWM344	SSR	CAAGGAAATAGGCGGTAAGT	ATTTGAGTCTGAAGTTTGCA	Xgwm344-7A
AG15 ₆₀₀	STS	ATCCTTGATCCAGAGAAAATCA	GGAGGTACCTTTGCCCACTCA	XAG15 ₆₀₀ -7Ag

Indipendentemente dal tipo di microsatellite usato, i prodotti di amplificazione sono stati separati mediante elettroforesi orizzontale su gel di agarosio in 1 x TBE (Tris 89mM; acido borico 89 mM; EDTA 2 mM), portando però le concentrazioni fino al 3%. Ciò utilizzando agarosio di tipo normale.

Il rilevamento infine, è stato effettuato, dopo corsa elettroforetica, tramite colorazione con etidio bromuro (0.5 μ g/ml). L'immagine agli UV è stata acquisita tramite il software KODAK 1D.

2.2.3 Realizzazione di primers per la banda AG15₆₀₀, 7Ag specifica

2.2.3.1 Amplificazione e Recupero dal gel della bande AG15600

La banda AG15₆₀₀ ottenuta mediante l'amplificazione con i primers AG15F1/AG15R5 con il campione R23-1 (banda 7Ag) è stata recuperata dal gel. L'operazione è stata condotta anche su un campione negativo Simeto (banda 7A) che mostrava la presenza di una banda di intensità molto ridotta rispetto a quella ottenuta sul campione R23-1.

2.2.3.2 Clonaggio delle bande e controllo dei trasformanti

Le bande purificate sono state clonate in pGEM-T easy (Promega) ed è stata eseguita una trasformazione batterica tramite shock termico.

Tecnicamente si è proceduto amplificando direttamente le colonie da piastra tramite "colony PCR". Questo sistema è stato eseguito toccando la colonia con un puntale,

messo successivamente in contatto per qualche secondo con 10 µl di miscela PCR preparata con la Hot *Taq* Master Mix (Qiagen) e con 250nM di ciascun primer (M13F-17mer e M13R-17mer). Il ciclo di amplificazione, eseguito con la macchina PCR express Thermo Hybaid, prevedeva: 15' a 95°C, seguiti da 30 cicli di 40'' a 94°C, 40'' a 60°C e 60'' a 72°C. Al prodotto della “colony PCR” sono stati aggiunti 2µl di Loading Dye prima di essere caricati su gel di agarosio per verificare la presenza dell'inserto. Le colonie positive sono state inviate a MWG per il sequenziamento.

2.2.3.3 Primers specifici per la banda AG15₆₀₀

Una volta ottenute le sequenze nucleotidiche delle bande AG15600 7Ag e della corrispondente banda 7A, sono state individuate le basi polimorfiche tra le due sequenze per sviluppare primers altamente specifici per la sequenza 7Ag in grado di produrre un frammento idoneo ad uno screening veloce (dimensione ridotte dell'amplificato) e chiaro (presenza assenza), criteri essenziali per l'ottenimento di un buon marcatore di tipo STS. A seguito dell'individuazione delle basi polimorfiche le sequenze sono state analizzate con il software Primer3, disponibile presso il sito internet http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi, per l'ottenimento dei primers. La serie di oligonucleotidi è stata disegnata lasciando invariati tutti i parametri del programma tranne la temperatura ottimale di annealing, che è stata impostata a 63°C, e la lunghezza ottimale degli oligonucleotidi aumentata a 23meri. Le sequenze oligonucleotidiche scelte, sono state inviate alla Sigma-Genosys per la sintesi.

2.2.4 Ibridazione *in situ*: considerazioni generali

Diverse tecniche citogenetiche permettono di rilevare l'introggressione di segmenti cromosomici da una specie ad un'altra. Nelle Triticinae, da lungo tempo si possono impiegare a tal fine sia il bandeggio-C che l'ibridazione *in situ* (ISH) con sequenze di DNA specie-specifiche, tecniche in grado di permettere la visualizzazione lungo i cromosomi di bande (zone di eterocromatina costitutiva) o, rispettivamente, di siti di ibridazione. Tuttavia, l'efficacia di entrambi i metodi non è tale da marcare differenzialmente tutto il genoma sia di frumento che di specie affini e, nel caso dell'ISH con sequenze di DNA specie-specifiche, quelle disponibili non sono molto numerose e comunque raramente caratterizzate da una distribuzione tale da assicurare una buona “copertura” dell'intero genoma. Un efficace approccio alternativo è

rappresentato dall'uso come sonda in esperimenti di ISH del DNA genomico totale della specie da cui deriva il segmento cromosomico trasferito nel genoma di frumento.

Tale metodologia, definita GISH (Genomic In situ Hybridization), non si differenzia in maniera sostanziale dall'ISH con sonde specifiche se non, ovviamente, nella preparazione della sonda e della miscela di ibridazione di cui questa farà parte insieme ad altri componenti. Nella GISH, a causa della parziale omologia esistente tra i DNA delle due specie (la “donatrice” e la “ricevente”) di cui si desidera analizzare i prodotti di introgressione, usando semplicemente la sonda di DNA totale della donatrice su DNA cromosomico (fissato su preparati microscopici) della ricevente, porterebbe ad una ibridazione diffusa della sonda su tutti o gran parte dei cromosomi del preparato da osservare (cross-ibridazione). Quindi, lo scopo di rendere il legame della sonda più specifico, e perciò discriminabile visivamente nella zona corrispondente al segmento trasferito, si può ricorrere a diversi metodi. Una possibilità è quella di aggiungere nella miscela di ibridazione un forte eccesso di DNA (non marcato) della specie ricevente (frumento, nel nostro caso). Questo DNA (definito, per la sua funzione, DNA “block”), grazie anche a determinate condizioni di “stringenza” in cui l'ibridazione verrà effettuata, andrà anche a ibridarsi con il DNA genomico del frumento con cui è completamente omologo, saturando le regioni del genoma di frumento con DNA che, essendo non marcato con sostanze rilevabili (esempio con un fluorocromo), sarà facilmente distinguibile da quello della sonda (marcato, e quindi fluorescente), che potrà così legarsi con alta preferenzialità al segmento cromosomico omologo trasferito (Anamthawat-Jonsson *et al.*, 1990; Schwarzacher *et al.*, 1992).

Recentemente, poi, è stata messa a punto una variante della tecnica di GISH, denominata “preannealing-GISH”, la quale permette una discriminazione interspecifica/intergenomica ancora più netta. Secondo questo metodo, il DNA del genoma usato come “block” nel metodo GISH sopra descritto viene impiegato come “seconda sonda”, ovvero sia in quantità equimolari rispetto al DNA “target” e comunque marcato, sebbene con un diverso fluorocromo. Durante la fase del “pre-annealing”, le sequenze di DNA comuni alle due sonde di DNA genomico totale si associano e vengono “sottratte” alla successiva ibridazione, lasciando per questa disponibili le sequenze più genoma-specifiche, le quali evidenzieranno più facilmente a livello cromosomico le differenze intergenomiche (Anamthawat-Jonsson e Reader, 1995).

Di seguito sono descritti i vari passaggi propedeutici e la specifica procedura della tecnica del preannealing-GISH.

2.2.4.1 Ottenimento dei preparati microscopici per l'analisi di cromosomi somatici

Le analisi di cromosomi somatici sono state effettuate su cellule di apici radicali, contenenti cellule in attiva divisione. A partire dal seme secco, si è proceduto come segue:

- Germinazione, sincronizzazione del ciclo cellulare e arresto delle cellule in metafase: i semi vengono tenuti per circa 4 ore in acqua distillata per favorire l'imbibizione. Si dispongono quindi in capsule Petri sopra due carte da filtro inumidite con acqua distillata e si tengono per circa 24h a 20-22°C. Quando gli apici hanno raggiunto la lunghezza 1-2 cm, vengono tagliati e trattati con ghiaccio fondente per circa 24h, allo scopo di accumulare cellule in metafase e massimizzare la contrazione cromosomica.
- Fissaggio: al termine del trattamento di arresto il materiale vegetale viene fissato in una soluzione 3:1 di alcool etilico e acido acetico (Carnoy) per almeno qualche ora o preferibilmente per circa una settimana a temperatura ambiente. In tale soluzione il materiale può essere mantenuto per parecchi mesi a 4°C o, per tempi più lunghi e per una migliore fissazione, a -20°C, provvedendo periodicamente alla sostituzione del Carnoy.
- Trattamento enzimatico: per una resa finale ottimale degli esperimenti di ibridazione in situ è essenziale, più che in altri tipi di analisi microscopiche, partire da preparati microscopici di elevata qualità. A tal fine, l'eliminazione della parete cellulare è di fondamentale importanza, in quanto permette un buono spargimento dei cromosomi e, in più, rende il DNA cromosomico più "accessibile" al DNA sonda. Allo scopo, gli apici radicali sono stati posti in tampone di digestione per 5', quindi trasferiti in tampone fresco per 20'. Essi sono stati poi trasferiti in provette con la soluzione enzimatica (vedi di seguito) ed incubati a 37°C per 1-2 ore. Al termine della digestione sono stati lavati con il tampone e quindi utilizzati per la preparazione dei vetrini.

Tampone e soluzione enzimatica

Tampone di digestione:	Acido citrico 0.01M
	Citrato trisodico 0.01M, pH 4.6
Soluzione enzimatica:	2% (w/v) Cellulasi (Sigma)
	4% Pectinasi liquida (Sigma)
La soluzione viene preparata in tampone e conservata a 4°C	

- Preparazione dei vetrini

I cromosomi devono presentare una buona morfologia ed una distribuzione che eviti il più possibile sovrapposizioni. La porzione meristemica dell'apice radicale viene sezionata sotto uno stereomicroscopio per eliminare le parti di tessuto non desiderate e per separare le cellule rimanenti, spargendole in una goccia di acido acetico al 45%. Dopo l'apposizione del coprioggetto, lo schiacciamento e l'esame preliminare al microscopio, i vetrini vengono congelati su ghiaccio secco (CO₂ solida). Dopo aver fatto saltare il coprioggetto e fatti asciugare i vetrini all'aria per alcune ore, questi sono osservati al microscopio in contrasto di fase al fine di registrare le coordinate delle cellule da ricercare per l'analisi dopo l'ibridazione. I preparati si conservano a 4°C (o a -20°C per periodi più lunghi di 3 mesi) fino al momento dell'uso.

2.2.4.2 Preparazione delle sonde

- Frammentazione e marcature dei DNA sonda

Prima della marcatura, i DNA da utilizzarsi come sonde vengono frammentati tramite rottura meccanica ottenuta forzandone il passaggio attraverso l'ago di una siringa Hamilton fino ad ottenere frammenti compresi tra le 5 e le 10 Kbp.. Così frammentato, il DNA viene marcato tramite Nick Translation. Questa procedura prevede l'uso dell'enzima DNAsi I, che in presenza di Mg⁺⁺ produce rotture indipendenti (nicks) su ciascuno dei due filamenti della doppia elica di DNA, e della DNA polimerasi I, che a partire da tali nicks polimerizza in direzione 5'→3' un nuovo filamento incorporando i nucleotidi presenti nella reazione, tra cui quelli modificati. Nel caso della presente ricerca, sono stati utilizzati per la marcatura del DNA genomico di frumento duro il nucleotide modificato biotina-11-dUTP

(Fermentas) e per la marcatura del DNA gnomico di *Th. ponticum* la digossigenina-11-dUTP (Roche) nel rapporto di 5:1 tra dUTP modificato e dTTP. La molecola legata alla base modificata sarà riconosciuta dal corrispondente anticorpo nel corso del rilevamento indiretto (§ 2.2.4.5).

La reazione di marcatura tramite nick translation per l'incorporazione dei nucleotidi legati a digossigenina e a biotina è stata eseguita utilizzando prodotti Fermentas e, seguendo le modalità di seguito riportate:

Miscela per la marcatura con digossigenina e biotina tramite Nick Translation		
Composto	Volume	Conc. Finale
DNA (5-10Kbp)	µl variabili (1 µg)	20 ng/µl
Reaction Buffer 10X	5 µl	1X
d(GAC)TP mix 0,4 mM	1 µl	0,02mM
dTTP 1 mM	0,2 µl	0,004mM
Dig-11-dUTP / Bio-11-dUTP 1mM	1 µl	0,02mM
DNasi I, RNasi-free 0,002U/µl	1 µl	0,002U
DNA Polimerasi I, E. coli (10U/ µl)	2 µl	20U
H ₂ O distillata	Fino a 50 µl	-

La miscela si pone a 15°C per 2h.

Prima di terminare la reazione di marcatura viene verificato se le dimensioni dei frammenti ottenuti tramite nick translation abbiano dimensioni < di 1kbp. Qualora fossero di dimensioni maggiori si protrae la reazione sino all'ottenimento delle idonee dimensioni. Tale controllo viene eseguito separando su gel di agarosio all'1% 3 µl della reazione di marcatura. La reazione viene terminata mediante denaturazione degli enzimi per 10' a 75°C o con l'aggiunta di EDTA.

Il DNA marcato viene purificato tramite apposite colonnine (NucleoSpin[®] Extract II, Macherey-Nagel) seguendo il protocollo del produttore.

2.2.4.3 Pretrattamenti dei preparati citologici

- Trattamento con RNAsi: tale trattamento è necessario per eliminare segnali di sottofondo dovuti a ibridazione tra sonda marcata e RNA cellulare. Allo scopo, si prepara dapprima una soluzione stock di RNAsi 10 mg/ml in Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 e NaCl 15 mM. Si fa bolire la soluzione per 15', lasciandola poi raffreddare prima di aliquotarla (si conserva a -20°C). La soluzione di lavoro si prepara diluendo 1:100 la soluzione stock in tampone 2xSSC (0.3 M Na-citrato, 0.3 M NaCl) per ottenere una concentrazione d'uso di 100 µg/ml. 100 µl di tale soluzione vengono posti su ciascun preparato citologico, incubato poi per 1 ora a 37°C. Trascorso tale tempo, i vetrini sono lavati tre volte per 5' in 2xSSC.
- Fissazione con paraformaldeide: una volta che i vetrini si sono asciugati, vengono trattati con una soluzione acquosa di paraformaldeide al 4% (w/v). Tipicamente, 2g della sostanza vengono posti in 50 ml di acqua distillata. Per agevolare la solubilizzazione, la soluzione viene portata a 60°C, aggiungendo 5 ml di soluzione di NaOH 0.4 M. Il pH viene poi portato alla neutralità con l'aggiunta di 10x PBS (tampone fosfato salino, 1.3 M NaCl, 70 mM Na₂HPO₄, 30 mM NaH₂PO₄), portando poi il tutto a volume. Si lascia raffreddare fino alla temperatura ambiente prima dell'uso. Il lavaggio con la soluzione (va preparata fresca, sotto cappa, prima di ogni esperimento) è effettuato in agitazione per 10' a temperatura ambiente. Dopo il trattamento i vetrini vengono lavati tre volte per 5' con 2xSSC a temperatura ambiente.
- Disidratazione: si realizza sottoponendo i vetrini ad una serie di bagni in alcool etilico (3' in alcool 70%, 3' in alcool 90% e 3' in alcool al 100%), facendoli asciugare all'aria per almeno un'ora.

2.2.4.4 Ibridazione in situ con la tecnica del pre-annealing GISH

Quantità equivalenti di entrambe i DNA genomici totali (specificamente frumento duro, e *Th. ponticum*) da usarsi come sonda, vengono unite in un'unica provetta. Nella soluzione, oltre ai DNA, sono presenti altri componenti tra cui solfato di destrano, che, fornendo una sorta di “trama”, favorisce la concentrazione della sonda e quindi la reazione di ibridazione. La composizione della soluzione è riportata di seguito:

Miscela di ibridazione

Soluzione Stock (conc, iniz)	Quantità/vetrino	Conc. Finale
Solfato di destrano	8 µl	10%
20xSSC	4 µl	2x
SDS (10% in acqua)	1 µl	0.25%
Sonda	100 ng (di ciascuna sonda)	
H2O	q.b. a 40 µl/vetrino 1)	
1) volume necessario nella successiva fase di ibridazione		

La miscela con le sonde viene denaturata 5' a 99°C e immediatamente dopo posta a 58°C per 30' (pre-annealing). Dopo la denaturazione ed il pre-annealing, la miscela viene dispensata sui vetrini, che, coperti con coprioggetto in vetro, sono posti nell'apposito cicizzatore termico a 63°C per 2 ore.

2.2.4.5 Lavaggi post-ibridazione e rilevamento indiretto

I vetrini sono stati lavati due volte per 5' in 2xSSC alla stessa temperatura di ibridazione e quindi a 37°C per 20'.

Le sonde marcate con digossigenina-11-dUTP, sono state visualizzate attraverso una reazione immunocitochimica basata sul legame con un anticorpo anti-digossigenina, coniugato al fluorocromo FITC (isotiocianato di fluoresceina, Boehringer), contraddistinto da fluorescenza verde. Le sonde marcate con biotina-11-dUTP sono state rilevate in seguito alla reazione di questa con l'avidina, a sua volta coniugata al fluorocromo Cy3 (Amersham Pharmacia) a fluorescenza rossa.

Per la colorazione della cromatina “di fondo” (controcolorazione), utile soprattutto per visualizzare le caratteristiche morfologiche dei cromosomi, è stato usato il DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolo), contraddistinto da fluorescenza blu.

Dopo i lavaggi si procede perciò come segue:

1. incubare i vetrini per 5' a T ambiente con 100 µl di BSA (albumina di siero bovino) al 5% (w/v) in 4xSSC/Tween
2. Rimuovere l'eccesso di liquido e aggiungere 20 µl/ml di “anti-digoxigenina-FITC” e 2.5 µg/ml di “avidina-Cy3” (in 5% BSA block).
3. Apporre un coprioggetto e incubare a 37°C per 1h in camera umida.

4. Rimuovere il coprioggetto e lavare 3x8' in 4xSSC/Tween.
5. Aggiungere 100 µl di DAPI (2 µg/ml tampone McIlvane: acido citrico 9mM, Na₂HPO₄ 80 mM, MgCl₂ 2.5 mM, pH 7) ad ogni vetrino, apporre un coprioggetto di plastica e incubare per 15'.
6. Lavare velocemente ogni vetrino in 4xSSC/Tween.
7. Porre sul vetrino una goccia di “Vectashield” (Vector Laboratories), per evitare il rapido decadimento della fluorescenza.

2.2.4.6 Microscopia ad epifluorescenza ed acquisizione computerizzata delle immagini

Dopo la chiusura con “Vectashield” i vetrini sono stati posti a 4°C e l'osservazione al microscopio ad epifluorescenza (Nikon FXA) effettuata dopo alcune ore, quando i fluorocromi risultano sufficientemente protetti contro il fenomeno di decadimento della fluorescenza. I vetrini possono essere conservati in frigorifero per un massimo di tre-quattro settimane, dopo le quali il segnale mostra una progressiva diminuzione in intensità. I siti di ibridazione vengono visualizzati scegliendo gli opportuni filtri per epifluorescenza ed utilizzando obiettivi appositi ad olio per immersione che non diano interferenze. Il DAPI, legandosi alle basi adenina e timina, mette in evidenza tutto il materiale cromatinico, non discriminando le eventuali diversità intergenomiche/interspecifiche, ma permettendo, già a basso ingrandimento, l'individuazione delle cellule di interesse.

Le immagini delle cellule selezionate sono state captate tramite un sistema di acquisizione e analisi di immagini, composto da una telecamera monocromatica raffreddata Leica DFC360FX collegata al microscopio, ed un computer per l'elaborazione dell'immagini catturate dalla telecamera tramite il software dedicato “ImageJ for Microscopy” (Abramoff *et al.*, 2004). Tramite lo stesso software si è potuto migliorare contrasto e luminosità delle immagini, nonché effettuare misurazioni percentuali della lunghezza relativa di determinate porzioni dei cromosomi di interesse rispetto alla lunghezza totale dei bracci corrispondenti.

2.2.5 Tecnica per l'esame di cromosomi meiotici

Questa tecnica ha permesso di valutare il grado e il tipo di appaiamento di cromosomi alla metafase I del processo meiotico.

- Preparazione del materiale vegetale

Il materiale su cui effettuare le analisi meiotiche proviene da spighe immature dalle quali vengono estratte le antere, contenenti, se selezionate al giusto stadio, numerose cellule madri delle microspore, cioè del polline (PMC=pollen mother cells) in vari stadi della meiosi.

Il culmo che racchiude la spiga viene inciso quando quest'ultima si trova a circa metà dell'ultimo internodo. Questa è infatti la fase corrispondente alla piena meiosi delle antere, per cui nel prelievo ci si aspetta che almeno parte di queste si trovino in metafase I.

Normalmente si tende a recidere l'intero culmo ma in questo caso si è preferito preservarlo in modo tale da poter eseguire i prelievi successivi per lo studio della gametogenesi. Sono perciò stati effettuati i prelievi di singole spighette.

Il culmo, quindi è stato reciso con l'aiuto di una lancetta, effettuando un taglio il più piccolo possibile, così da raggiungere la spiga ed effettuare il prelievo della spighetta. Solitamente il prelievo è iniziato su una spiga partendo dalle spighette centrali che portano i fiori con le fasi più avanzate tenendo presente che nell'ambito della spiga il processo di meiosi procede dalla porzione centrale verso i due estremi. Il prelievo della spighetta è stato effettuato con l'aiuto di una pinzetta sottile e una volta terminato, la spiga è stata accuratamente inserita nel culmo in modo che proseguisse la maturazione. Appena prelevata, la spighetta può essere fissata in Carnoy. Se viene reciso l'intero culmo e prelevata la spiga, essa può essere conservata allo stesso modo, provvedendo però a cambiare il Carnoy più spesso nei primi giorni, una volta al mese successivamente.

Dalla spiga o dalla spighetta appena fissata, ma anche da materiale appena reciso si può procedere all'estrazione delle antere. La spighetta viene posizionata in una capsula Petri aggiungendo acqua distillata. Con l'aiuto di ago e lancetta si provvede all'estrazione delle antere. Da ognuna di esse si recuperano in genere tre fiori (nelle piante utilizzate erano rari i quarti e quinti fiori, risultando talvolta sterili anche i terzi fiori). Ogni fiore viene delicatamente aperto e le tre antere estratte; di queste una viene esaminata a fresco, schiacciandola in una goccia di acetocarminio al 2% e, se da questo esame si individua la fase desiderata (metafase I o altro) le altre due vengono fissate in Carnoy. Nel caso la fase risultasse differente da quella ricercata si procede con l'estrazione di altre antere tenendo presente che nell'ambito di ogni spighetta il fiore in fase più avanzata è il primo.

- Procedura di colorazione

In genere non vengono effettuate analisi sull'antera “campione” (in aceto carminio) perchè la preparazione a fresco non permette di raggiungere il grado di “nitidezza” necessario. Le antere fissate in Carnoy perciò (potendo qui rimanere per tempi lunghi) vengono colorate secondo il metodo Feulgen.

Il fissativo è sostituito da alcool al 70%, che viene lasciato per 5' e successivamente sostituito con acqua distillata per almeno 5' o fin quando le antere scendono spontaneamente verso il fondo della provetta, perchè idratate.

Si sostituisce l'acqua distillata con HCl 1N (da termostato a 60°C) e si lascia idrolizzare per 10' a 60°C. Si procede quindi alla colorazione utilizzando il reagente di Schiff o la fucsina basica per 1-3 ore. Si sostituisce il colorante con acqua distillata (conservare a 4°C per alcune ore).

- Preparazione dei vetrini permanenti

L'antera viene sminuzzata in una goccia di acido acetico al 45%. Posto il coprioggetto si procede poi allo schiacciamento (più delicato che nel caso degli apici radicali) per ottenere il giusto grado di spargimento dei meiociti e dei cromosomi in essi contenuti. Si congela quindi il preparato ponendo il vetrino su un blocco di ghiaccio secco (CO₂ solida) per almeno 5' e, dopo aver fatto saltare il coprioggetto, si immerge il vetrino in tre bagni successivi di alcool (95%-assoluto-assoluto) per 5-10'/bagno. Si procede quindi alla “chiusura” del preparato, usando varie resine.

Nel nostro caso è stato usato l'Euparal solubile in alcool.

2.2.6 Tecnica per l'esame della gametogenesi.

Questa tecnica ha consentito di valutare la presenza e il grado di aberrazioni della gametogenesi (Nasuda *et al.*, 1998).

- Preparazione del materiale vegetale

Le spighe immature dalle quali sono stati effettuati prelievi di spighe per le analisi dell'appaiamento meiotico sono state lasciate maturare per altri 5-7 giorni. Il prelievo viene effettuato quando la spiga è fuoriuscita dal culmo. A questo stadio, esattamente come descritto nel caso delle osservazioni della meiosi, viene effettuato un prelievo delle spighe. Esse vengono dissezionate a fresco o conservate in Carnoy estraendo le antere come descritto nel § 2.2.5. La

gametogenesi, si svolge in maniera rincrona all'interno dei fiori di una stessa spighetta; tra una divisione e l'altra intercorrono circa 6-7 giorni.

- Procedura di colorazione e preparazione di vetrini permanenti

Tali procedure descritte per l'osservazione dei cromosomi meiotici, sono state applicate anche per l'analisi delle divisioni mitotiche del polline.

2.2.7 Esecuzione degli incroci e autofecondazioni

Per prevenire l'autoimpollinazione in spighe destinate all'incrocio, si procede all'emasculazione delle spighe già fuoriuscite dalla foglia a bandiera nel momento in cui le antere sono ancora versi e gli stigmi immaturi. Di norma l'emasculazione viene eseguita sui primi tre fiori di ciascuna spighetta, poiché i restanti sono spesso sterili o comunque molto piccoli; sia questi che le spighette basali e apicali vengono eliminati.

Un paio di giorni dopo l'emasculazione si effettua l'impollinazione: si asportano le antere, questa volta mature, cioè gialle e rigonfie, della linea scelta come genitore maschile ed il loro contenuto viene applicato sugli stigmi delle piante precedentemente emasculate. Dato il differente momento di recettività degli stigmi nei diversi fiori di ogni spiga, l'impollinazione viene spesso ripetuta per più giorni.

2.2.8 Allevamento delle piante

I materiali vegetali oggetto del presente studio sono stati allevati, secondo le necessità in condizioni climatiche controllate o in pieno campo.

L'allevamento in celle climatiche ha consentito di allevare almeno due generazioni per anno. Dopo la germinazione dei semi ed un periodo di circa un mese e mezzo di allevamento a basse temperature (8-10°C di “notte” e 13-15°C di “giorno”), con un fotoperiodo di 12 h di buio e 12 di luce, è seguito un altro periodo di durata simile con temperature di 13-15°C di “notte” e 18-20°C di “giorno”, con un fotoperiodo di 8 ore di buio e 16 ore di luce. Nel periodo della maturazione le temperature sono state elevate a 20-25°C. Durante il ciclo di crescita, le piante sono state fertilizzate con soluzioni nutritive.

3. RISULTATI

3.1 Ulteriore ingegnerizzazione del segmento 7AgL della linea R23-1

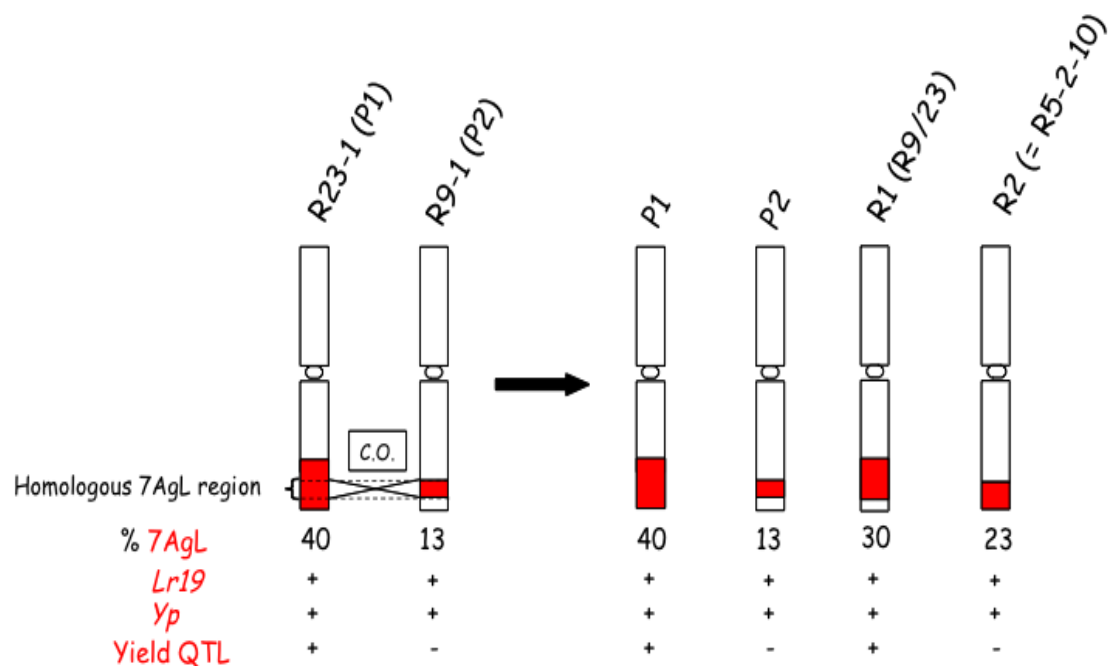
Uno degli obiettivi di questa ricerca è stata la riduzione del segmento 7AgL di *Th. ponticum* presente sul braccio lungo del cromosoma 7A di frumento duro della linea ricombinante R23-1, recante i tre geni d'interesse (*Lr19*, *Yp* e *Yld-QTL*).

Tale obiettivo è stato perseguito come una possibile strategia per superare le problematiche relative alla trasmissione del cromosoma ricombinante R23-1 considerando che un eccessivo quantitativo di cromatina estranea cotrasferita con i tre geni d'interesse potesse rappresentare una possibile causa.

3.1.1 Genotipizzazione della popolazione F2 ottenuta dall'incrocio di R23-1x R9-1

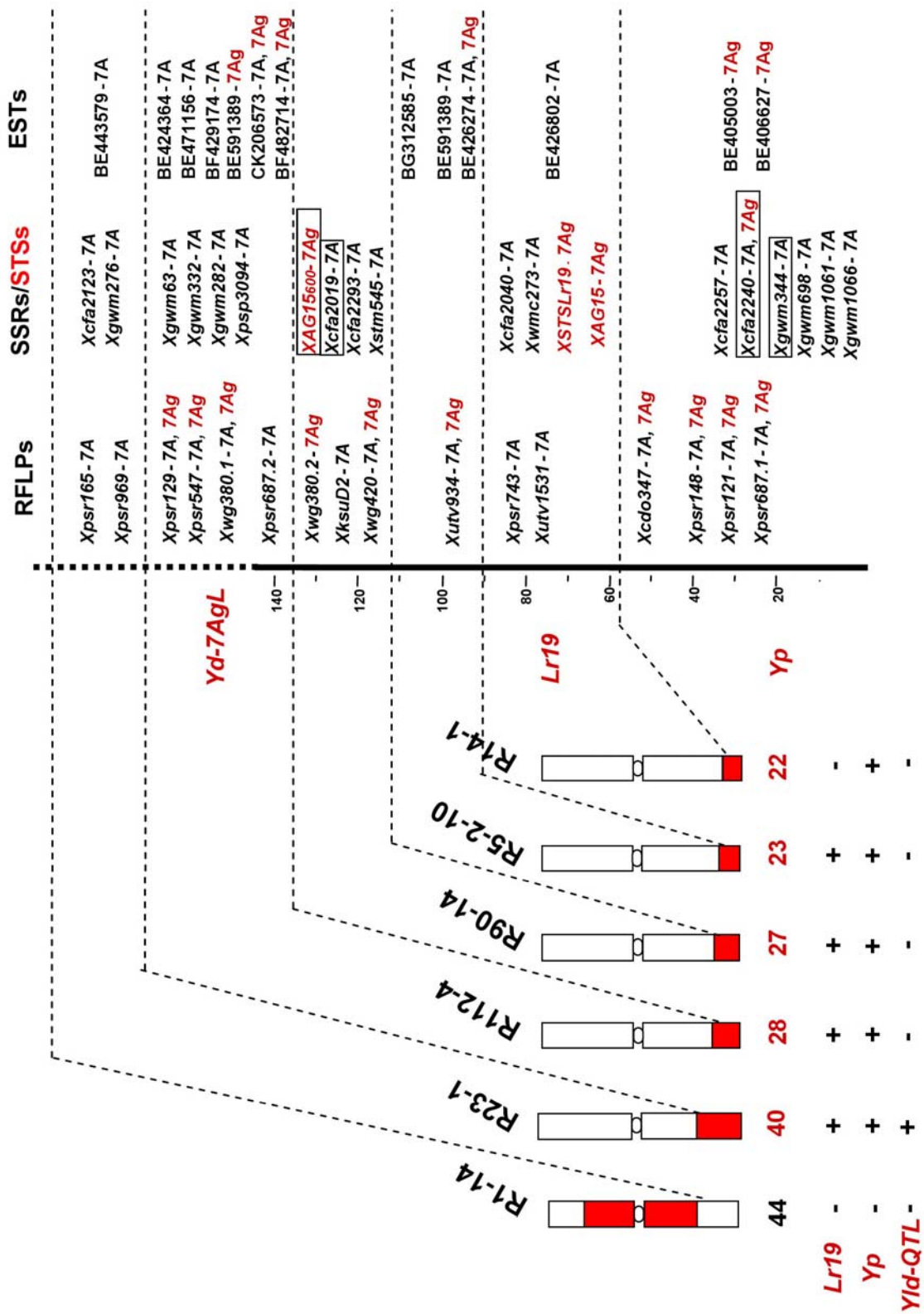
A tale scopo è stato effettuato un incrocio tra due linee ricombinanti ottenute in precedenza, R23-1 e R9-1 (Ceoloni et al., 2005b) (Fig.5). Alla meiosi delle piante F1 così prodotte era attesa verificarsi ricombinazione omologa nella regione 7AgL distale comune ai due cromosomi ricombinanti. E' stato così prodotto un nuovo ricombinante, denominato R9-23, nel quale sul braccio 7AL è presente un segmento 7AgL intercalare (ca 30% del braccio), di minore entità rispetto a quello di R23-1 (ca. 40% del braccio).

Fig. 5. Produzione del nuovo ricombinante R9-23 mediante ricombinazione omologa nella regione 7AgL comune ai due cromosomi R23-1 e R9-1.



La popolazione F2 segregante ottenuta da tale incrocio è stata genotipizzata mediante selezione assistita da marcatori. Sulla base delle mappe genetiche e fisiche già disponibili presso il laboratorio (Fig. 6) sono stati scelti quattro marcatori molecolari di tipo SSR e STS (CFA 2240, CFA2019, AG15₆₀₀ e GWM 344), analizzabili tramite reazioni PCR, mediante i quali è stato possibile discriminare otto dei dieci genotipi totali ottenibili da tale incrocio. Le amplificazioni sono state condotte su DNA genomico estratto da cariossidi di 315 campioni F2 e di opportuni controlli rappresentati dalle linee R23-1, R9-1 e dalla cv. Simeto (Tab. 3, Fig. 7).

Fig. 6. Mappe genetiche e fisiche della regione distale 7A/7AgL in diversi ricombinanti frumento duro-*Th. Ponticum*

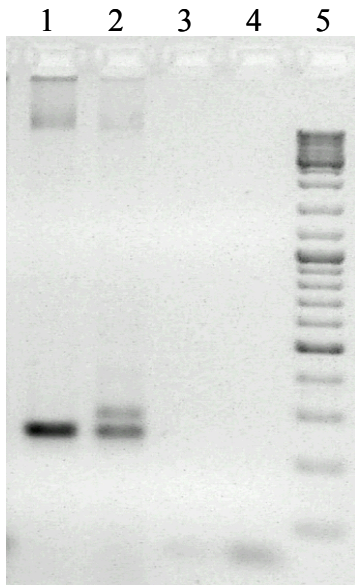


Tab. 3. Schema dei profili di amplificazione attesi per i diversi genotipi della progenie segregante ottenuta dall'incrocio R23-1 X R9-1. Due dei 10 genotipi (P1P2 e R1R2) hanno uguali profili di amplificazione.

Genotipo	Profilo di amplificazione			
	CFA 2240	CFA2019	AG15 ₆₀₀	GWM 344
P1P1	+	-	+	-
P2P2	-	+	-	+
R1R1	-	-	+	+
R2R2	+	+	-	-
P1P2	+	+	+	+
R1R2	+	+	+	+
P1R1	+	-	+	+
P1R2	+	+	+	-
P2R1	-	+	+	+
P2R2	+	+	-	+

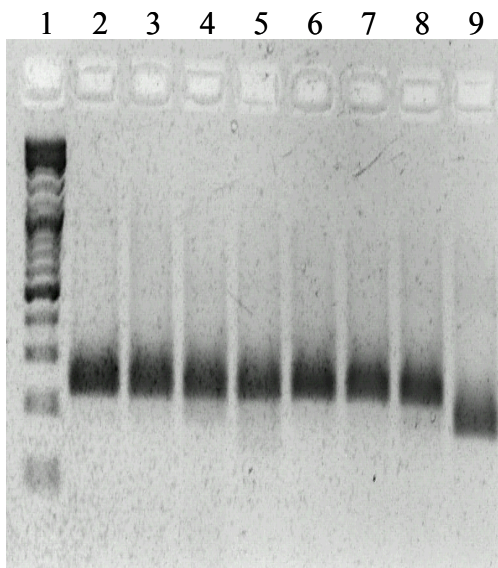
Fig. 7. Separazione su gel di agarosio a diverse concentrazioni dei prodotti PCR dei marcatori utilizzati per la selezione di genotipi segreganti dall'incrocio tra i ricombinanti R23-1 (P1) x R9-1 (P2).

a) CFA 2240



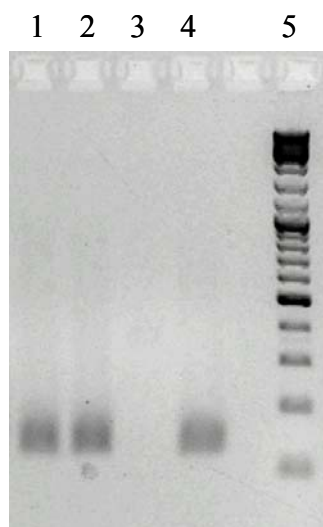
Corsie: 1) R23-1OM+; 2) R23-1 ET; 3) R9-1; 4) R9-23; 5) Marker 100bp

b) CFA2019



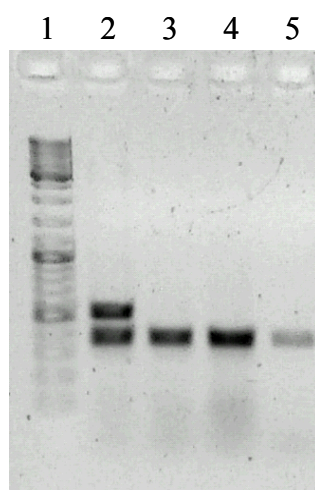
Corsie: 1) Marker 100bp; da 2 a 8 R9-1; 9) R23-1

c) GWM344



Corsie: 1)Simeto; 2)R9-1; 3) R23-1; 4) R9-23; 5) Marker 100bp

d) AG15₆₀₀



Corsie: 1) Marker 100bp; 2) R23-1; da 3 a 5) R9-1

I risultati della genotipizzazione delle piante F2 basata sull'uso dei marcatori SSR (MAS = *marker-assisted selection*) sono riportati in Tab. 4.

Tab. 4. Selezione MAS (Marker Assisted Selection) della popolazione F2 segregante.

Genotipo	Campioni Determinati	% Tot
P1P2	11	3,49
P2P2	31	9,84
R1R1	8	2,54
R2R2	13	4,12
P1P2 R1R2	104*	33
P1R1	13	4,12
P1R2	40	12,7
P2R1	30	9,52
P2R2	65	20,6

Le piante incluse nel riquadro centrale corrispondono ai due genotipi non discriminabili mediante MAS.

3.1.2 Selezione mediante preannealing-GISH

Ventuno delle piante aventi genotipo non discriminabile mediante PCR (Tab.4 evidenziate con il riquadro) sono state analizzate mediante preannealing-GISH. Gli apici radicali, raccolti e sincronizzati mediante trattamento con ghiaccio, sono stati digeriti enzimaticamente e con essi preparati vetrini per l'ibridazione. Le sonde per tale selezione sono state prodotte utilizzando DNA genomico estratto da foglie di frumento duro (*T. durum*) cv Simeto e di *Th. ponticum*. La marcatura indiretta di questi ultimi è

stata effettuata tramite Nick-translation (vedi § 2.2.4.2). I risultati di questa selezione sono riportati in Tab. 5 e Fig. 8.

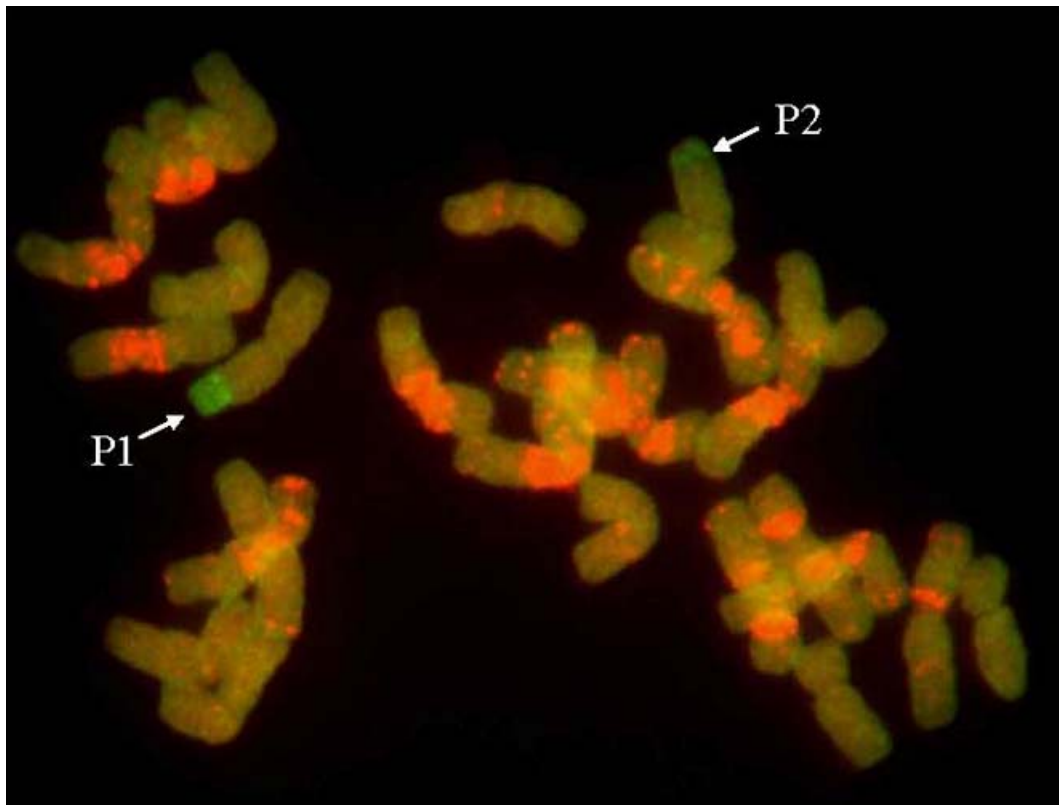
Tab. 5. Selezione mediante preannealing-GISH di progenie F2 avente genotipo non discriminabile unicamente mediante MAS.

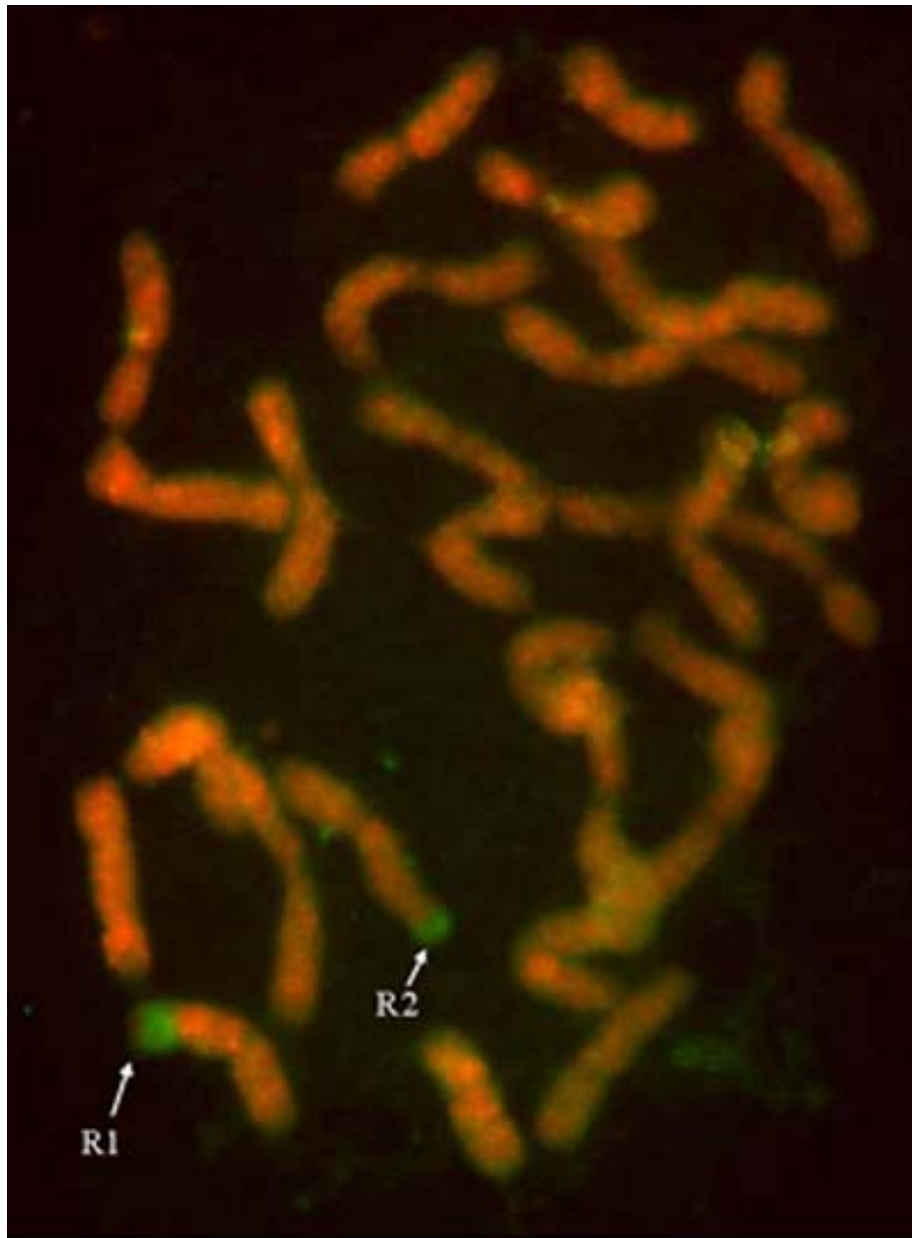
Genotipo	N°campioni determinati	% Tot
P1P2	18	85,71
R1R2	3	14,29

Come atteso e come evidente dalla Tab. 5, la percentuale maggiore dei campioni selezionati risulta avere genotipo parentale (P1P2).

Fig. 8. Genotipi P1P2 (R23-1/R9-1, A) e R1R2 (R9-23/R5-2-10, B) osservati in seguito a preannealing-GISH.

A)

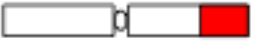
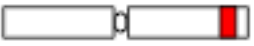
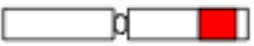




B)

Combinando i risultati della MAS e del preannealing-GISH, è quindi possibile ricavare le frequenze dei gameti trasmessi e dei genotipi presenti nella popolazione F2 (Tab. 6), assumendo che ciò che è stato osservato nella doppia selezione delle 21 piante sopracitate sia un risultato estendibile all'intero gruppo di piante costituito dalle 104 piante.

Tab. 6. Tipi e frequenze di gameti e genotipi parentali e ricombinanti nella progenie segregante F2

Tipo		%	N° piante (% progenie)	
P1		26	P1P1	11 (3,49)
P2		39	P2P2	31 (9,84)
R1		12	R1R1	8 (2,54)
R2		23	R2R2	13 (4,12)
			P1P2	71 (28,25)
			P1R1	13 (4,12)
			P1R2	40 (12,7)
			P2R1	30 (9,52)
			P2R2	65 (20,6)
			R1R2	12 (4,76)

I dati di frequenza relativa dei gameti trasmessi indicano chiaramente uno svantaggio competitivo dei gameti P1 (R23-1) e R1 (R9-23) nei riguardi di quelli P2 (R9-1) e R2 (R5-2-10), che potrebbe essere genericamente attribuito ad una differenza in contenuto di cromatina estranea 7AgL nei vari tipi (P1 = 40%; P2 = 13%; R1 = 30%; R2 = 23%), o, comunque, al permanere anche nel nuovo ricombinante R9-23 di fattori specifici che condizionano negativamente la trasmissibilità del cromosoma portatore.

I semi degli 8 individui omozigoti per il cromosoma R9-23 non sono stati in grado di germinare. Tuttavia il nuovo ricombinante è comunque stato isolato in condizione di eterozigosi, prevalentemente in associazione con il parentale R9-1, in circa il 9% dei casi (30 piante) e solo nell'4% (13 piante) in associazione con il parentale R23-1.

Un limitato numero di tali individui F2, 15 piante aventi genotipo R9-1/R9-23, sono state allevate in condizioni controllate insieme con 14 individui aventi genotipo R9-1 omozigote, e con 11 individui della cv Simeto. I dati di fertilità registrati per ciascuno dei genotipi presenti mostrano una riduzione della fertilità a carico delle piante eterozigoti R9-1/R9-23 (Tab. 7).

Tab. 7. Confronto di alcuni parametri di fertilità tra piante aventi genotipi R9-1 OM e R9-1/R9-23 tra loro e verso la cv Simeto. I dati riportati si riferiscono al solo culmo principale.

(* = $P<0,05$; **= $P<0,01$; ***= $P<0,001$)

Genotipo 7A.7Ag	H (cm) media spiga	Dev. Standard	t	P
R9-1 OM	6,75	0,67		
R9-1/R9-23	4,8	0,37		
Simeto	7,06	0,32		
R9-1 OM vs. R9-1/R9-23			9,78	***
R9-1/R9-23 vs. Simeto			17,99	***
R9-1 OM vs. Simeto			1,64	ns
	Peso medio spiga			
R9-1 OM	2,87	0,52		
R9-1/R9-23	1,12	0,6		
Simeto	3,67	0,51		
R9-1 OM vs R9-1/R9-23			8,82	**
R9-1/R9-23 vs. Simeto			11,21	***
R9-1 OM vs. Simeto			3,83	*
	N° medio spighe			
R9-1 OM	16,5	2,56		
R9-1/R9-23	11,6	1,72		
Simeto	15,8	2,04		
R9-1 OM vs R9-1/R9-23			6	**
R9-1/R9-23 vs. Simeto			5,62	**
R9-1 OM vs. Simeto			0,71	ns
	N° medio semi prodotti			
R9-1 OM	40,14	10,21		
R9-1/R9-23	13,73	11,16		
Simeto	46,81	7,62		
R9-1 OM vs R9-1/R9-23			6,63	**
R9-1/R9-23 vs. Simeto			8,47	**
R9-1 OM vs. Simeto			1,8	ns

I dati relativi ai principali parametri di fertilità delle piante F2 aventi genotipo R9-1/R9-23, evidenziano una ridotta fertilità a carico di questi ultimi rispetto agli individui aventi genotipo R9-1 omozigote. Risultano essere inferiori sia la lunghezza che il peso delle spighe così come il numero di spighe in esse contenute. Questi dati risultano inoltre essere coerenti con il numero di semi medio prodotto per spiga, che appare anch'esso significativamente inferiore per le piante aventi genotipo R9-1/R9-23. Differenze analoghe o più marcate sono evidenti se si effettua un confronto degli stessi parametri tra queste ultime e individui della cv Simeto.

Non è invece evidenziabile alcuna differenza per i medesimi parametri tra individui con genotipo R9-1 omozigote e quelli della cv Simeto.

Un ulteriore dato che si può dedurre dai risultati di trasmissibilità gametica riguarda la frequenza di ricombinazione (*rf*) omologa verificatasi nella porzione 7AgL comune ai due ricombinanti P1 e P2. Questa si può stimare corrispondere al doppio della frequenza del gamete R2, che si può legittimamente assumere non aver subito alcuno svantaggio competitivo, ovverosia $0.23 \times 2 = 0.46$. Ciò significa che l'appaiamento nella porzione omologa 7AgL, estesa per il 13% del braccio (vedi Fig. 5) è stato di oltre il 90% (doppio della *rf*), indicando che la presenza di regioni fiancheggianti omeologhe sui due cromosomi P1 e P2 non ha inciso negativamente sul verificarsi di ricombinazione in tale regione, che, data la sua posizione distale, è attesa essere sede altamente preferenziale di crossing-over nei cromosomi delle Triticaceae (Saintenac *et al.*, 2009). Un quadro simile era stato del resto riscontrato nel corso dell'ottenimento del ricombinante R9-1 (Ceoloni *et al.*, 2005b).

3.1.3 Genotipizzazione delle popolazioni F3 e F4 generate per autofecondazione da piante F2 avente il cromosoma R9-23 in condizione eterozigote.

Anche allo scopo di poter eventualmente re-isolare piante con genotipo R9-23 omozigote da individui che possedevano il cromosoma ricombinato in eterozigosi, piante con genotipo R9-1/R9-23 e R5-2-10/R9-23 sono state allevate in condizioni controllate e parte della loro progenie, prodotta per autofecondazione, è stata selezionata mediante MAS (utilizzando due marcatori molecolari, CFA2019 e AG15₆₀₀). I dati di segregazione di progenie F3 ed F4 continuano ad evidenziare difetti di trasmissione di gameti contenenti il cromosoma ricombinante R9-23 (Tab. 8).

Tab. 8. Risultati della genotipizzazione di progenie F3 ed F4 di piante eterozigoti R9-1/R9-23 e R5-2-10/R9-23 (* =P<0,05; **=P<0,01; ***=P<0,001)

Gener.	Genotipo 7A- 7Ag (N. pianta)	N°semi analizzati	Genotipi segreganti			χ^2 1:2:1	P
F3	R9-1/R9-23		R9-1 OM	R9-1/R9-	R9-23		
	(V06X95-6-3)	37	17	11	9	9,83	*
F3	R5-2-10/R9-23		R5-2-10 OM	R5-2-10/ R9-23	R9-23 OM		
	(V06X91-12-20)	24	8	16	0	8	*
	(V06X91-12-21)	24	13	11	0	14,25	***
	(V06X91-12-30)	24	9	15	0	8,25	*
F4	R9-1/R9-23		R9-1	R9-1/R9-23	R9-23		
	(V06X95-6-3-8)	23	8	14	1	5,35	*
	(V06X95-2-10-8)	21	9	12	0	8,22	*
	(V06X95-2-10-9)	20	6	14	0	6,8	*

Alcuni individui della progenie F3 (19 piante totali), tutti derivati dalla stessa pianta V06X95-6-3, e aventi genotipi R9-1/R9-23 e R9-1 omozigote sono stati cresciuti in condizioni controllate. I dati di fertilità ottenuti dalle suddette piante F3 (6 piante aventi genotipo R9-1/R9-23 e 13 piante con genotipo R9-1 omozigoti) e riportati in Tab. 9 non mostrano significative differenze tra questi due gruppi di individui.

Tab. 9. Confronto di alcuni parametri di fertilità tra piante appartenenti alla stessa popolazione F3 aventi genotipo R9-1 OM o R9-1/R9-23. I valori si riferiscono al solo culmo principale.

(* = $P<0,05$; **= $P<0,01$; ***= $P<0,001$)

Genotipo 7A-7Ag	Peso medio spiga	Dev. Standard	T	P
R9-1 OM	2,38	0,84	1,03	ns
R9-1/R9-23	1,99	0,51		
	N° spighe			
R9-1 OM	15,15	2,7	0,6	ns
R9-1/R9-23	14,33	2,8		
	N° semi prodotti			
R9-1	28,4	13,8	0,55	ns
R9-1/R9-23	24,6	13,7		

3.2 Studio della segregazione del ricombinante R23-1

3.2.1 Selezione del ricombinante R23-1 nei diversi backgrounds varietali

Per verificare se anche la trasmissibilità del cromosoma R23-1 fosse background-dipendente, un campione di 20-30 semi di 4-5 piante BC₁F₂ prodotte dall'incrocio di della linea ricombinante R23-1 con cinque diverse varietà di frumento duro (Langdon, Duilio, Cresco, Meridiano e Simeto) è stato utilizzato per determinare i diversi genotipi attesi (omozigote o eterozigote per il cromosoma R23-1 o non portatore) tramite MAS con il marcatore SSR codominante CFA2240 (Fig. 6; Tab. 10). Lo screening ha evidenziato un comportamento variabile, comprendente F2 con rapporti genotipici coincidenti con il normale 1:2:1 (tutte le F2 dall'incrocio con la varietà Langdon), altre in cui la segregazione appare fortemente distorta (tutte le F2 dall'incrocio con

Meridiano), ma anche situazioni eterogenee tra progenie di incrocio con una stessa varietà (incrocio per varietà Duilio, Creso e Simeto).

Delle diverse piante BC_1F_2 sono stati registrati dati relativi allo sviluppo e alla fertilità (N° semi/pianta; N° semi/spiga e N° culmi). Nel complesso, non sembra esistere una chiara correlazione tra regolarità della trasmissione del cromosoma ricombinato e fertilità delle progenie, sebbene le cinque piante F_2 dall'incrocio con la varietà Langdon, tutte con segregazione regolare, hanno prodotto un numero di semi nettamente superiore agli altri gruppi di progenie. D'altra parte, tra piante derivate dallo stesso incrocio, si osserva una fertilità in genere indipendente dall'esistenza e dall'entità della deviazione dei rapporti di segregazione rispetto al normale. In effetti ciò potrebbe indicare che, pure nel caso di produzione di gameti aberranti, a partecipare alla fecondazione e quindi essere trasmessi siano in ogni caso quelli pressoché normali. Questo è particolarmente possibile nel caso del frumento duro (tetraploide), nel quale la selezione gametofitica è senz'altro più stringente che nel tenero (esaploide). I dati di fertilità delle diverse piante BC_1F_4 sembrano invece piuttosto variabili, sebbene tale variazione non sembri essere coerente con i dati sulla segregazione delle medesime piante.

Tab. 10. Determinazione dei rapporti genotipici in progenie BC₁F₂ dall'incrocio del ricombinante R23-1 con diverse varietà di frumento duro (* =P<0,05; **=P<0,01; ***=P<0,001)

VARIETA'	N° Culmi	N°semi/ pianta	N°semi/spiga	N°semi	GENOTIPO			X ² 1:2:1	P
					OM+	ET	OM-		
MERIDIANO									
V06X176-1	12	371	31	23	0	7	16	25.78	***
V06X176-2	9	338	37	22	0	6	16	27.82	***
V06X176-3	10	396	30	20	0	8	12	15.2	***
V06X176-4	10	301	30	22	0	9	13	16.09	***
V06X176-5	20	619	31	23	0	10	13	15.09	***
DUILIO									
V06X177-1	15	421	28	22	3	7	12	10.27	**
V06X177-2	11	226	21	22	9	8	5	3.09	ns
V06X177-3	8	287	36	20	8	7	5	2.7	ns
V06X177-4	10	326	33	21	6	10	5	0.14	ns
CRESO									
V06X178-1	13	351	27	23	2	15	6	3.52	ns
V06X178-2	11	411	37	22	3	12	7	1.64	ns
V06X190-1	6	185	11	24	0	11	23	35.35	***
V06X190-2	13	368	28	31	0	16	15	14.55	***
LANGDON									
V06X193-1	23	1200	52	21	4	8	9	3.57	ns
V06X193-2	15	606	40	24	7	10	7	0.67	ns
V06X193-3	13	468	36	23	3	12	8	2.22	ns
V06X193-4	18	678	38	18	5	8	5	0.22	ns
SIMETO									
V06X191-2	10	263	26	67	18	31	18	0,37	ns
V06X191-3	6	110	18	18	0	9	9	9	*
V06X191-4	6	206	34	23	0	14	9	8,13	*
V06X191-5	10	279	28	40	1	17	22	22,95	***

Sulle progenie dall'incrocio con la varietà Simeto la segregazione è stata seguita anche nella generazione successiva (BC_1F_3) di piante dell'unica famiglia BC_1F_2 che aveva mostrato una segregazione regolare (V06X191-2). Sebbene prevalgano progenie F3 con rapporti di segregazione normali, alcune presentano deviazioni più o meno marcate rispetto all' 1:2:1 (Tab. 11), ancora una volta suggerendo che assetti allelici diversi nelle diverse piante riceventi possano essere responsabili di effetti diversi, in qualità e/o quantità, conseguenti alla possibile presenza di un gene *Sd*.

In effetti, non avendo finora sviluppato vere e proprie linee isogeniche per il cromosoma R23-1 (peraltro forse non realizzabile in tutti i diversi background varietali, visto che in certi tipi di progenie di incrocio la trasmissibilità per via maschile sembra nulla), più che di effetti ascrivibili al background varietale sembra più corretto confermare l'influenza di insieme di forme alleliche ad una serie di loci "modificatori" del genotipo della specie ricevente che influenzano differenzialmente la trasmissibilità del cromosoma ricombinante (Marais, 1992; Prins e Marais, 1999). Per questo, ad una situazione di "temporanea" regolarità osservata nella progenie BC_1F_2 V06X191-2, ha probabilmente fatto seguito, come conseguenza della segregazione a tali loci, una variazione anche delle modalità di segregazione del cromosoma in questione.

Tab. 11. Risultati della segregazione di progenie BC₁F₃ dalla BC₁F₂ V06X191-2 (R23-1x Simeto).
(* =P<0,05; **=P<0,01; ***=P<0,001)

Famiglia BC₁F₃	N° semi prodotti	N° semi analizzati	OM+	ET	OM-	χ² 1:2:1	P
V06X191-2-27	127	48	8	26	14	1,83	ns
V06X191-2-28	103	45	5	20	20	10,56	***
V06X191-2-29	162	43	11	17	15	2,63	ns
V06X191-2-32	54	46	9	25	12	0,74	ns
V06X191-2-33	123	39	5	20	14	4,17	ns
V06X191-2-35	129	48	14	21	13	0,79	ns
V06X191-2-43	137	48	9	25	14	1,13	ns
V06X191-2-52	131	46	6	24	16	4,43	ns
V06X191-2-58	164	48	8	23	17	3,46	ns
V06X191-2-63	156	39	3	17	19	13,77	***
V06X191-2-67	42	23	1	13	9	5,96	*
V06X191-2-72	72	43	4	27	12	5,79	*

E' comunque una indicazione positiva quella riscontrata in prove di germinabilità di semi BC₁F₃ di varie famiglie e di diverso genotipo per il cromosoma R23-1. Sebbene condotte su piccola scala, queste indicano una buona capacità germinativa non significativamente diversa in individui OM+, ET e OM- delle famiglie -28, -29, -32, -35, -63 e -72 (vedi Tab. 11), il che indica che la mancata germinazione dei semi dei pochi individui omozigoti per il cromosoma R9-23 isolati (vedi § 3.1.2) possa essere attribuita a cause contingenti e non rappresenti un'alterazione a livello zigotico sistematicamente associata all'omozigosi per *Sd1*. Alcune delle piante così ottenute (famiglie -28 e -35), sono state peraltro oggetto di analisi nei vari stadi della microsporogenesi e gametogenesi (vedi § 3.3.1).

3.3 Analisi di effetti ascrivibili a geni *Sd* del *Th. ponticum* sulla meiosi e gametogenesi pollinica di ricombinanti frumento duro-*Th. ponticum*

I risultati ottenuti suggerivano che l'alterata segregazione di gameti maschili portatori del cromosoma R23-1 o del suo derivato R9-23 non fosse da imputare ad un generico eccesso di cromatina proveniente dalla specie *Th. ponticum*, ma piuttosto alla presenza di specifici fattori (uno o più) di tipo *Sd*. Come descritto nell'Introduzione (§ 1.4.2.1), dagli studi riguardanti gli effetti dei geni *Sd* in diversi organismi (Hurst, 1993; Taylor *et al.* 2003), si evince che l'azione di tali geni sia in molti casi di tipo gametocidico (geni *Gc*): i gameti portatori, esplicando un'azione *killer* sui gameti non portatori, determinano la propria trasmissione preferenziale o addirittura esclusiva. In effetti, il gene *Sd1* del *Th. ponticum* era stato originariamente descritto determinare prevalentemente questo tipo di effetto sulla segregazione in frumento tenero (Zhang e Dvorak, 1990) e ciò aveva prospettato come perseguibile l'obiettivo di utilizzare anche nel breeding di frumento duro, come già in tenero (Singh *et al.*, 1998; Reynolds *et al.*, 2001), il potenziale QTL per produttività (*Yld*-QTL). Tuttavia, sia per l'*Sd1* che altri geni *Sd*, sono anche state osservate situazioni, quale quella da noi associata al genotipo R23-1, in cui, anche a seconda del genotipo ricevente (Knott, 1971; Marais, 1992; Prins e Marais, 1999), la distorsione della segregazione è in senso opposto, ovvero si ha azione "suicida" (auto-eliminazione) del gamete portatore. In entrambi i casi i gameti bersaglio (*Sd*-portatori o meno) presentano prevalentemente alterazioni della gametogenesi, con meiosi invece essenzialmente regolari. Questo, fra l'altro, è stato osservato in linee ricombinanti di frumento recanti introgressioni da specie affini (review di Endo, 2007; vedi anche Discussione).

Come primo approccio allo studio del meccanismo d'azione del gene *Sd* (= *Sd1*?) del 7AgL di *Th. ponticum*, sono state condotte analisi della meiosi delle cellule madri del polline (PMC) e della microgametogenesi su piante di diverse progenie, aventi l'uno o l'altro dei cromosomi ricombinanti R23-1 e R9-23, e di opportuni controlli, anche al fine di definire la posizione dell'eventuale gene/i *Sd* sulla base del confronto tra vari ricombinanti a disposizione, aventi un segmento 7AgL distale di dimensioni progressivamente crescenti.

3.3.1 Analisi di meiosi e gametogenesi di BC₁F₃ dall'incrocio R23-1 x Simeto

Le analisi sono state condotte su antere prelevate a vari stadi di sviluppo e sottoposte a colorazione Feulgen. Le analisi meiotiche si sono concentrate sulla MI/AI, per verificare la regolarità dell'appaiamento (attesi 14 bivalenti) o l'eventuale presenza di univalenti e/o appaiamenti multipli e le modalità di migrazione anafasica; sono inoltre state analizzate fasi successive, quali tetradi/primo polline per verificare la presenza di micronuclei. Della gametogenesi sono state analizzate le anafasi della prima e della seconda divisione mitotica, così da verificare la presenza di rotture cromosomiche, frammentazione e ponti, aberrazioni frequentemente osservate come effetto dell'azione di geni *Gc* in frumento (Nasuda *et al.* 1998) e, quando possibile, le profasi.

Le analisi sono state condotte su piante con diverso genotipo per il cromosoma R23-1 (OM+, ET e OM-), derivanti da due famiglie BC₁F₃ (R23-1 x Simeto), denominate V06X191-2-28 e V06X191-2-35 e su meiociti e granuli pollinici della varietà Simeto usata come controllo. Le due famiglie erano state scelte in quanto una aveva mostrato una segregazione regolare (V06X191-2-35) e l'altra aberrante (V06X191-2-28). Le frequenze delle aberrazione riscontrate sono riportate in Tab. 12 e 13.

Tab. 12. Frequenza di aberrazioni meiotiche (microsporogenesi) di piante BC₁F₃ dall'incrocio R23-1 x Simeto con diverso genotipo segreganti per il cromosoma ricombinante

Linea	Fasi analizzate	N° cell osservate	Normali (%)	Aberranti (%)
Simeto	MI	50	50 (100)	0 (0)
	AI-Tetradi	50	50 (100)	0 (0)
V06X191-2-28 OM+	MI	96	96 (100)	0 (0)
	AI-Tetradi	52	52 (100)	0 (0)
V06X191-2-28 ET	MI	72	72 (100)	0 (0)
	AI-Tetradi	42	42 (100)	0 (0)
V06X191-2-28 OM-	MI	50	50 (100)	0 (0)
	AI-Tetradi	61	61 (100)	0 (0)
V06X191-2-35 OM+	MI	55	0 (0)	55 (100)
	AI-Tetradi	64	4 (6,25)	60 (93,75)
V06X191-2-35 ET	MI	77	7 (9,1)	70 (90,9)
	AI-Tetradi	84	33 (39,3)	51 (60,7)
V06X191-2-35 OM-	MI	45	5 (11,1)	40 (88,9)
	AI-Tetradi	39	8 (20,5)	31 (79,5)

Tab. 13. Frequenza di aberrazioni alla gametogenesi del polline di piante BC₁F₃ dall'incrocio R23-1 x Simeto con diverso genotipo segreganti per il cromosoma ricombinante

Linea	Fasi analizzate	N° cell. osservate	Normali (%)	Aberranti (%)
V06X191-2-28 OM+	Prof I	48	44 (91,6)	4 (8,4)
	Anaf I DIV	126	42 (33,4)	84 (66,6)
	Anaf II DIV	85	39 (45,9)	46 (54,1)
V06X191-2-28 ET	Prof I	45	45 (100)	0 (0)
	Anaf I DIV	73	18 (24,65)	55 (75,35)
	Anaf II DIV	69	24 (34,8)	45 (65,2)
V06X191-2-28 OM-	Prof I	43	43 (100)	0 (0)
	Anaf I DIV	55	15 (27,28)	40 (72,72)
	Anaf II DIV	67	8 (11,94)	59 (88,06)
V06X191-2-35 OM+	Prof I	46	6 (13,1)	40 (86,9)
	Anaf I DIV	62	15 (25,19)	47 (74,81)
	Anaf II DIV	44	9 (20,5)	35 (80,5)
V06X191-2-35 ET	Prof I	104	26 (25)	78 (75)
	Anaf I DIV	69	4 (5,8)	65 (94,2)
	Anaf II DIV	50	8 (16)	42 (84)
V0X191-2-35 OM-	Prof I	52	8 (15,4)	44 (84,6)
	Anaf I DIV	96	45 (46,9)	51 (53,1)
	Anaf II DIV	68	26 (38,2)	42 (61,8)

In contrasto con le attese, i risultati di tali analisi mostrano un elevato numero di aberrazioni presenti in entrambe le famiglie, sia in quella a segregazione regolare (V06X191-2-35) che in quella con segregazione irregolare (V06X191-2-28). Particolarmente inatteso poi è il fatto che le aberrazioni sono molto più frequenti e si estendono a più fasi proprio in piante della famiglia V06X191-2-35 e, inoltre, in entrambe le famiglie, esse sono presenti sia in piante portatrici (OM+ e ET) che in nulli segreganti per il cromosoma R23-1. In particolare, piante della famiglia V06X191-2-28 mostrano fasi meiotiche normali, mentre sono presenti aberrazioni cospicue (ca il 60% dei casi) nella I e II divisione mitotica del polline, particolarmente evidenti all'anafase

(Fig. 10); piante della famiglia V06X191-2-35, invece, sempre indipendentemente dal genotipo, mostrano cospicue aberrazioni della meiosi (ca 90% dei casi) oltre che aberrazioni cospicue della I e II divisione del polline.

La gamma di aberrazioni meiotiche riscontrate sono visibili in Fig. 9: alla prima divisione meiotica è stato osservato un ridotto appaiamento cromosomico alla metafase (MI), con un numero di univalenti variabile da 4 a 21 (Fig. 9), una disorganizzata migrazione dei cromosomi alla AI (Fig. 9) e la presenza di un elevato numero di micronuclei in seconda divisione e nelle tetradi (Fig. 9).

Nel corso della gametogenesi una tipologia ricorrente di aberrazione è rappresentata da un'anomala condensazione della cromatina a partire dal polline allo stadio di profase della I divisione mitotica; tale aberrazione, quando molto severa, permane anche agli stadi successivi, che risultano caratterizzati da frammentazioni più o meno cospicue della cromatina, fino a casi in cui è stata evidenziata una completa “polverizzazione” della stessa (Fig. 10).

In casi di minore gravità del quadro aberrante, sono stati comunque osservati micronuclei dalla profase I alla AI-TI. Alla seconda divisione mitotica sono stati osservati ponti di cromatina tra i due nuclei generativi e una ricorrente rottura di uno o di entrambi questi nuclei (Fig.10).

Fig. 9. Aberrazioni della meiosi (MI, AI e II divisione/tetradi) di piante BC_1F_3 dall'incrocio R23-1 x Simeto

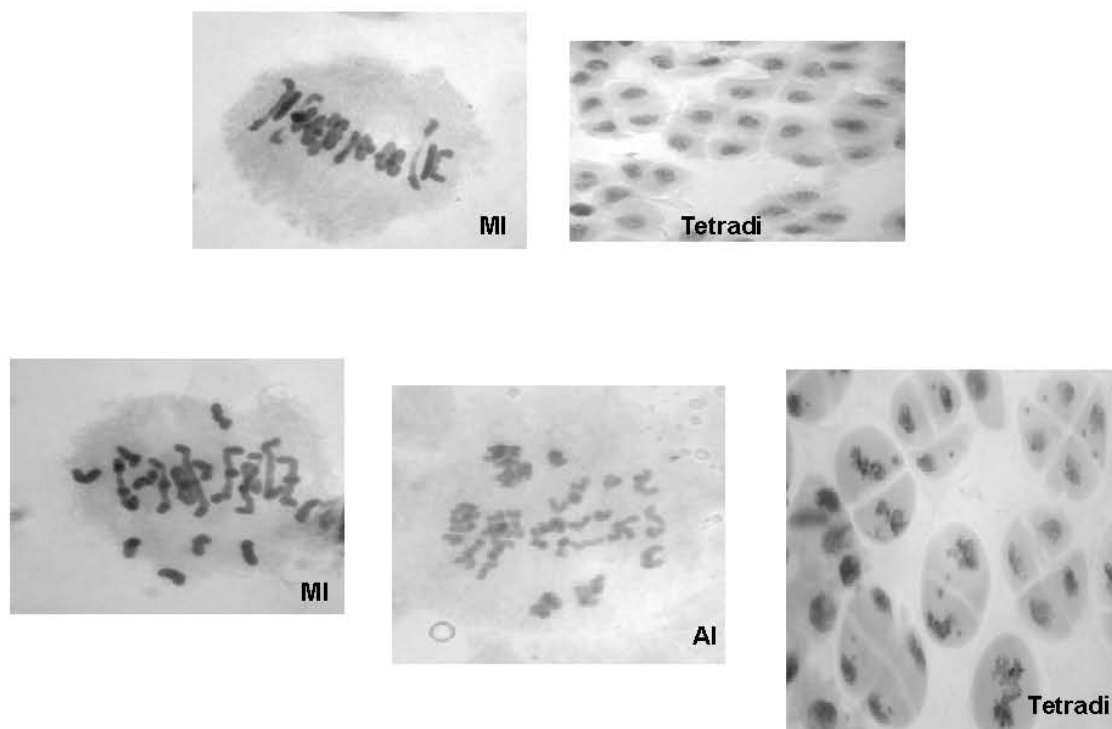
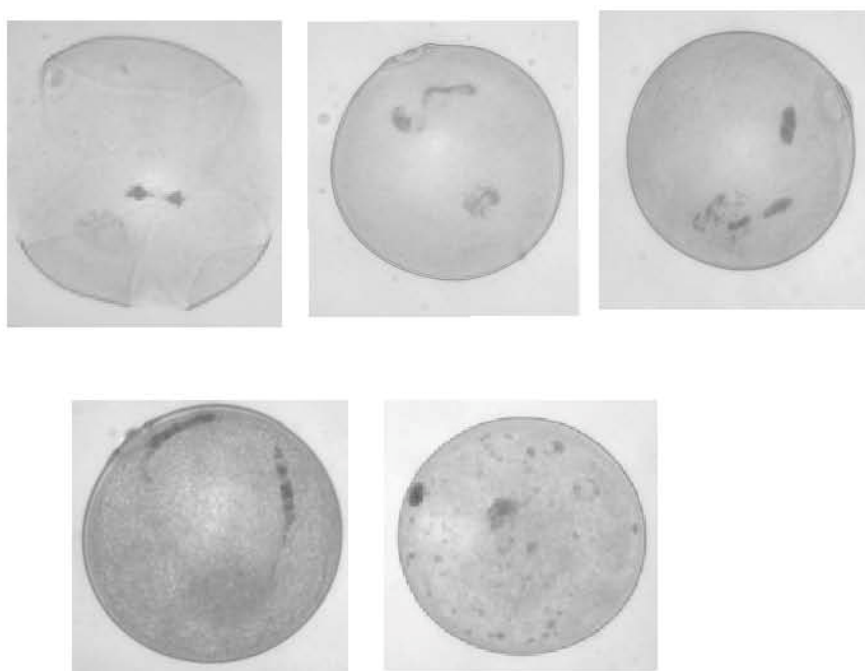


Fig. 10. Tipologie di aberrazioni della gametogenesi (I e II divisione mitotica del polline)

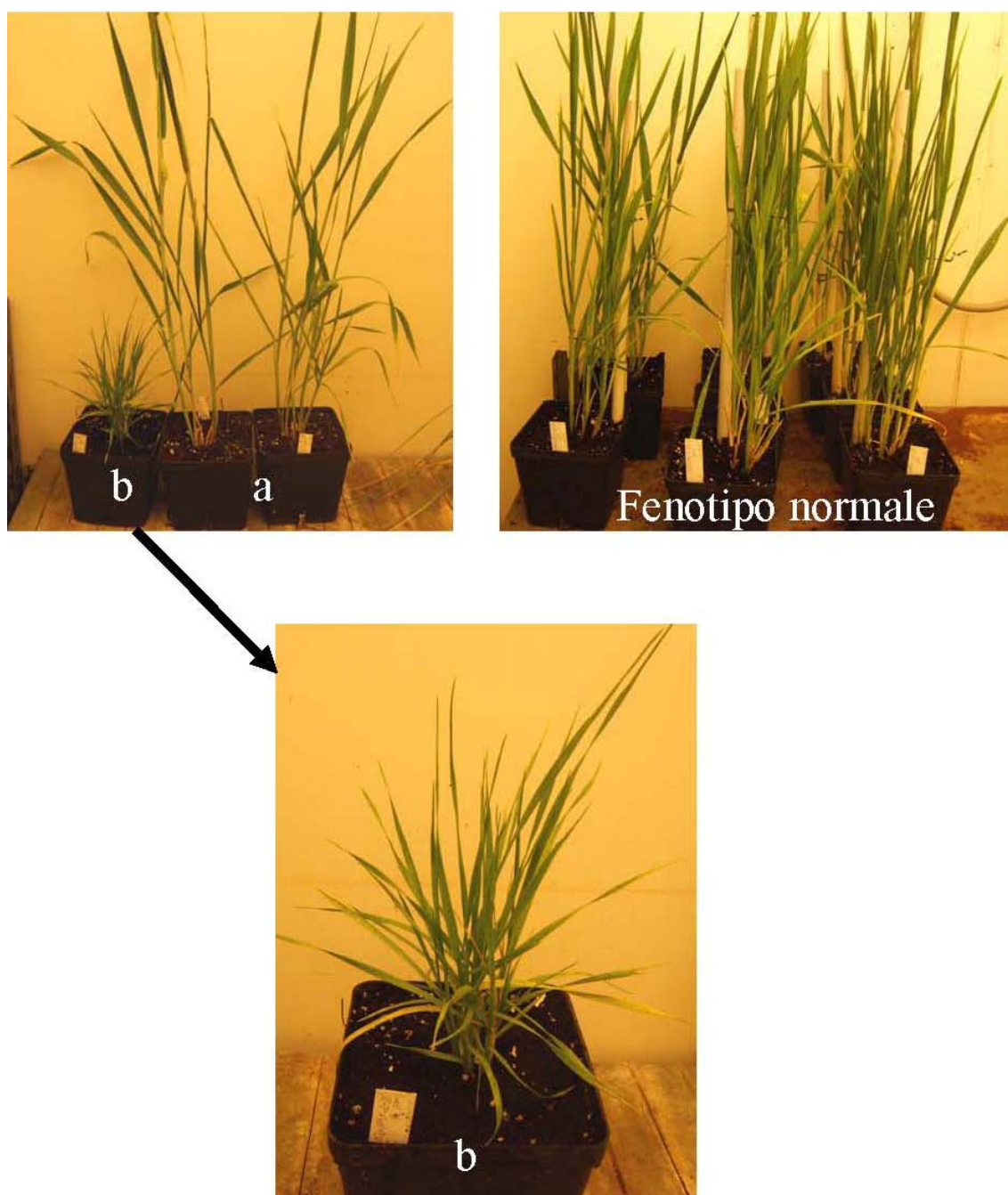


L'elevata frequenza di aberrazioni della microsporogenesi e microgametogenesi osservata in piante della famiglia V06X191-2-35 sembra essere in linea con una drastica riduzione della fertilità, avendo 8 piante prodotto complessivamente solo 18 semi (Tab. 14). La fertilità della famiglia V06X191-2-28 sembra invece essere nel complesso migliore, anche se molto variabile anche tra piante aventi lo stesso genotipo per il cromosoma R23-1. Alcune delle piante di questa famiglia presentano un fenotipo particolare, apparentemente anche in questo caso non legato al genotipo, caratterizzato da bassa statura, produzione di molti culmi di accestimento, ma esigua distanza tra gli internodi di ogni culmo. Tali piante mostrano inoltre un limitato numero di spighe, poiché non tutti i culmi procedono nello sviluppo e/o producono seme, ad indicare un arresto dello sviluppo ad una fase essenzialmente vegetativa (Fig. 11). Tuttavia, accanto a piante con queste anomalie fenotipiche, la maggior parte delle progenie di V06X191-2-28, incluse piante OM+ per R23-1, hanno mostrato uno sviluppo regolare ed hanno dato una buona produzione di seme (Tab. 14). Sarà interessante verificare la capacità germinativa dei semi raccolti, lo sviluppo delle piante e le caratteristiche a stadi critici sia meiotici che post-meiotici.

Tab. 14 Fertilità e aspetto fenotipico di piante BC₁F₃ dall'incrocio R23-1 x Simeto

Pianta V06x191-2-28	Genotipo	N°culmi	N°semi tot	N°semi/ spiga	Fenotipo
V06x191-2-28-1	OM+	3	25	8	fenotipo anomalo (Fig. 11a)
V06X191-2-28-27	OM+	4	13	3	pianta con culmi sottili e spighe piccole
V06X191-2-28-35	OM+	3	75	25	fenotipo normale
V06X191-2-28-42	OM+	1	19	19	fenotipo cespuglioso (Fig. 11b)
V06X191-2-2	ET	3	64	21	pianta esile e clorotica, ma ± normale
V06X191-2-28-7	ET	2	25	12	fenotipo cespuglioso, pianta clorotica
V06X191-2-28-10	ET	3	66	22	fenotipo normale
V06X191-2-28-11	ET	2	0	0	pianta esile e clorotica
V06V191-2-28-3	OM-	3	45	15	fenotipo normale
V06X191-2-28-4	OM-	2	0	0	fenotipo cespuglioso (Fig. 11b)
V06X191-2-28-6	OM-	2	0	0	fenotipo cespuglioso (Fig. 12b)
V06X191-2-28-12	OM-		0	0	fenotipo anomalo
Pianta V06X191-2-35	Genotipo	N°culmi	N°semi tot	N°semi/s piga	Fenotipo
V06X191-2-35-6	OM+	3	0	0	fenotipo normale, spighe esili
V06X191-2-35-9	OM+	3	1		fenotipo normale
V06X191-2-35-10	OM+	4	3		fenotipo normale
V06X191-2-35-7	ET	3	6	2	fenotipo normale
V06X191-2-35-17	ET	2	0	0	Fenotipo normale, 1 culmo vuoto
V06X191-2-35-4	OM-	4	1		fenotipo normale
V06X191-2-35-19	OM-	2	7	3	Fenotipo normale, 1 culmo vuoto
V06X191-2-35-21	OM-	4	0	0	fenotipo anomalo (Fig. 11a)

Fig. 11. Fenotipo particolare di piante BC_1F_3 dall'incrocio di R23-1 x Simeto.



3.3.2 Analisi di meiosi e/o gametogenesi di diverse generazioni F1-F2 ed F3 ottenuti dall'incrocio R23-1 x R9-1

Le analisi meiotiche sono state condotte anche sulla maggior parte delle piante F1 prodotte dall'incrocio di R23-1 x R9-1. In questo caso l'osservazione si è per lo più concentrata sulle metafasi e anafasi I delle cellule madri del polline. I risultati di tali analisi hanno avuto esito variabile, con situazioni in cui il comportamento meiotico è sembrato essere totalmente regolare e altre in cui il grado di aberrazione riscontrata era cospicuo e più o meno diffuso (casi in cui la gran parte dei cromosomi alla metafase I erano non appaiati, con conseguenti anomalie all'anafase I e presenza di svariati micronuclei nelle tetradi).

Analisi di questo tipo sono perciò state intraprese anche su piante F2 ed F3 con vari genotipi, eterozigoti o non portatori di cromosomi R23-1 o R9-23. Sebbene non siano ad oggi disponibili dati quantitativamente significativi, sembra permanere una variabilità tra piante in quanto a presenza/assenza e grado di intensità delle anomalie meiotiche e post-meiotiche. In analogia a quanto osservato in segreganti di famiglie BC₁F₃ dall'incrocio R23-1 x Simeto (Tab. 12 e 13), situazioni aberranti sembrano riguardare anche segreganti omozigoti R9-1, ovverosia individui nel cui genotipo non è più presente alcun cromosoma R23-1 o R9-23, mentre segreganti con genotipo R9-1/R9-23 da F1 con varie irregolarità sembrano avere “raggiunto” una completa stabilizzazione della meiosi e fasi successive dello sviluppo del polline.

3.3.3 Analisi di meiosi e gametogenesi di diversi ricombinanti *T. durum-Th. ponticum*

Le medesime analisi in meiosi e post-meiosi sono state condotte su piante omozigoti e nulli segreganti per il cromosoma R23-1 selezionate nell'ambito di progenie BC₁F₃ dall'incrocio con il frumento duro Simeto (derivate dalla F2 V06X191-2 e quindi sorelle delle V06X191-2-28 e V06X191-2-35). Tali piante sono state allevate in condizioni di campo insieme ad altre due linee ricombinanti che si possono considerare linee quasi isogeniche (BC₆F₃₋₄ da incrocio con la varietà Simeto), cioè R112-4 (28% 7AgL) e R5-2-10 (23% 7AgL) (Fig. 6). Le analisi, condotte su 5 piante per genotipo (OM+ e OM-) per ogni ricombinante, sono state effettuate per confermare l'assenza del gene/i *Sd* in altri cromosomi ricombinanti della stessa serie (i quali, comunque, non

avevano mai mostrato difetti di segregazione, Ceoloni et al., 2005b e dati non pubbl.) e quindi per definire la localizzazione del fattore/i responsabile della segregazione distorta e delle alterazioni ad esso apparentemente associate ad uno specifico intervallo cromosomico del 7AgL.

Tab.15 Frequenza di aberrazioni alla meiosi di piante OM+ e OM- per i cromosomi ricombinanti R23-1, R112-4 e R5-2-10

Linea	Fasi osservate	N° cell osservate	Normali (%)	Aberranti (%)
R23-1 OM+	MI/AI	113	102 (90,27)	11 (9,73)
	Tetradi	224	210 (93,75)	14 (6,25)
R23-1 OM-	MI/AI	131	122 (93,13)	9 (6,87)
	Tetradi	166	139 (83,73)	27 (16,27)
R112-4 OM+	MI/AI	50	50 (100)	0 (0)
	Tetradi	47	41 (87,23)	6 (12,77)
R112-4 OM-	MI/AI	50	50 (100)	0 (0)
	Tetradi	44	44 (100)	0 (0)
R5-2-10 OM+	MI/AI	67	67 (100)	0 (0)
	Tetradi	39	37 (94,87)	2 (5,13)
R5-2-10 OM-	MI/AI	42	42 (100)	0 (0)
	Tetradi	50	50 (100)	0 (0)

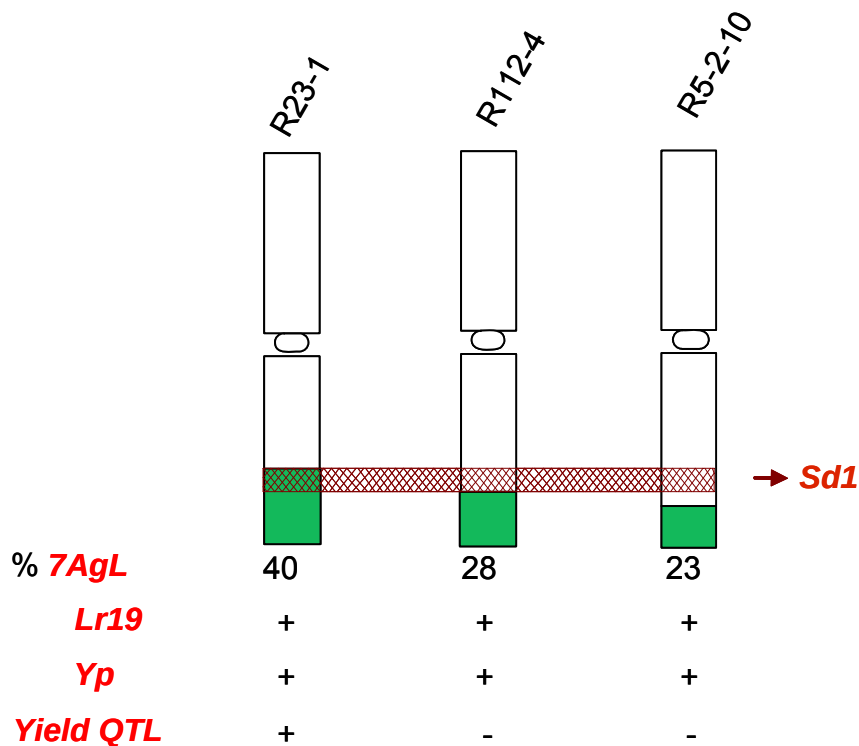
Tab 16 Frequenza di aberrazioni alla gametogenesi del polline di piante OM+ e OM- per i cromosomi ricombinanti R23-1, R112-4 e R5-2-10

Linea	Fasi osservate	N° cell osservate	Normali (%)	Aberranti (%)
R23-1 OM+	Prof I DIV	413	268 (64,89)	145 (35,11)
	I DIV	89	69 (77,53)	20 (22,47)
	II DIV	43	16 (37,2)	27 (62,8)
R23-1 OM-	Prof I	390	348 (89,23)	42 (10,77)
	I DIV	191	146 (76,44)	45 (23,56)
	II DIV	112	52 (46,43)	60 (53,57)
R112-4 OM+	Prof I	71	67 (94,37)	4 (5,63)
	I DIV	33	29 (87,88)	4 (12,12)
	II DIV	69	69 (100)	0 (0)
R112-4 OM-	Prof I	77	77 (100)	0 (0)
	I DIV	61	56 (91,8)	5 (8,2)
	II DIV	50	50 (100)	0 (0)
R5-2-10 OM+	Prof I	77	77 (100)	0 (0)
	I DIV	66	66 (100)	0 (0)
	II DIV	71	71 (100)	0 (0)
R5-2-10 OM-	Prof I	65	65 (100)	0 (0)
	I DIV	50	50 (100)	0 (0)
	II DIV	50	50 (100)	0 (0)

Le analisi evidenziano una bassa frequenza di aberrazioni, solo consistenti in sporadici micronuclei nelle tetradi, alla meiosi anche dei ricombinanti R112-4 e R5-2-10, forse ascrivibili alle variabili condizioni climatiche legate all'allevamento in campo. Tale frequenza aumenta invece in piante R23-1 OM+ e OM- (Tab.15), pur mantenendosi al di sotto dei livelli osservati per segreganti V06X191-2-35 (vedi Tab. 12), allevati in condizioni controllate ottimali per lo svolgersi della meiosi e gametogenesi. Le differenze tra genotipi diventano più cospicue quando si prendono in esame le due divisioni mitotiche del polline, che non sembrano significativamente alterate nei ricombinanti R112-4 e R5-2-10 (Tab. 16). Ciò induce a circoscrivere il/i fattore/i che

determinano le varie anomalie osservate in questi ed altri materiali precedentemente descritti all'interno della regione di 7AgL che differenzia il cromosoma ricombinante R23-1 da R112-4 (Fig. 12). La frequenza delle aberrazioni R23-1-dipendenti sembra anche in questo caso meno elevata di quella delle famiglie V06X191-2-35 e V06X191-2-28 (Tab. 13). Tuttavia, ancora una volta si conferma la presenza di aberrazioni, pressoché equivalenti in tipologia e frequenza, sia in portatori omozigoti che in nulli segreganti per il cromosoma R23-1. Ciò suggerisce che una volta indotti dalla presenza del fattore/i *Sd*, gli effetti possono permanere, sebbene verosimilmente in dipendenza del background del ricevente, anche una volta che il fattore stesso non è più presente.

Fig. 12. Possibile localizzazione del/i fattore/i *Segregation distortion* (*Sd1*?) sul braccio 7AgL del *Th. ponticum*.



4 DISCUSSIONE

Il lavoro di ingegneria cromosomica del cromosoma ricombinante 7A/7AgL R23-1 intrapreso allo scopo di ottenere un cromosoma ricombinante (R9-23) contenente i tre geni d'interesse per il breeding, ovverosia *Lr19*, *Yp* e *Yld-QTL* derivanti dal 7AgL di *Th. ponticum*, sebbene abbia consentito l'ottenimento di un nuovo cromosoma 7AL/7AgL con una ridotta quantità di cromatina estranea, non sembra essere stato risolutivo del problema.

I risultati finora ottenuti sono comunque utili a meglio definire la base genetica e cellulare dell'osservata ridotta trasmissibilità di cui appare soffrire sia il cromosoma ricombinante R23-1 che il suo derivato R9-23. Questa sembra essere imputabile non ad un generico eccesso di cromatina omeologa (7AgL) trasferita sul 7AL, quanto piuttosto alla presenza in essa di uno o più geni, responsabile/i dell'azione gametocidica di tipo suicida. Almeno il principale di tali fattori appare essere localizzato nella frazione (ca. 12%) di cromatina del 7AL proveniente dal braccio 7AgL del *Th. ponticum* che differenzia i due cromosomi R23-1 (40% di 7AgL) e R112-4 (28% di 7AgL).

Le osservazioni effettuate sui materiali ricombinanti recanti o derivati da genotipi in cui almeno per una generazione era stato presente il cromosoma R23-1 o l'R9-23, ed in particolare la tipologia delle aberrazioni riscontrate, confrontate con casistiche riportate in letteratura, riferite per lo più ad altri organismi (Lyttle, 1991), evidenziano diverse similitudini.

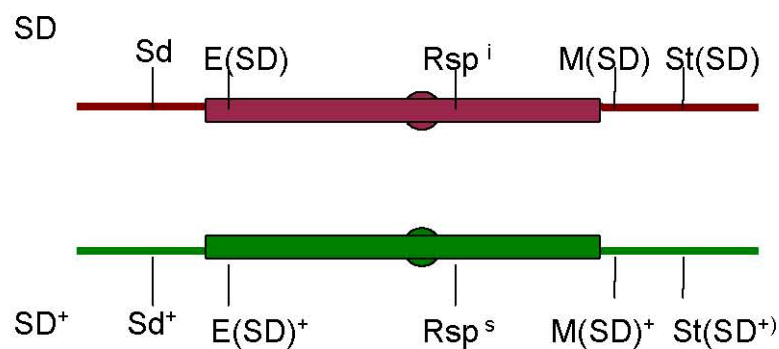
Tra i fenomeni di segregazione distorta meglio studiati è quello associato al gene *Sd* di *Drosophila melanogaster*. Nel 1956 fu fortuitamente scoperto in popolazioni di *D. melanogaster* del Madison, Wisconsin, che il cromosoma SD di maschi eterozigoti (SD/SD^+) era trasmesso a circa il 99% della progenie, mentre nella linea germinale femminile la trasmissione risultava essere normale (Ganetzky, 2000). Analisi di ricombinazione e delezione hanno rivelato la natura multifattoriale di tale sistema, in cui il gene *Sd* è il gene chiave, responsabile della segregazione distorta (SD si riferisce all'intero cromosoma che mostra segregazione distorta, mentre *Sd* allo specifico gene sul cromosoma SD). Esso si comporta come un gene dominante che conferisce funzione, la cui presenza sul cromosoma SD è necessaria affinché si abbia distorsione, tanto che in caso di delezione viene persa tale capacità (Ganetzky, 1977). Tuttavia, il cromosoma 2 di *Drosophila* presenta almeno due loci coinvolti nel *drive* meiotico: il locus Segregation distorter (*Sd*) e il locus Responder (*Rsp*). Il gene *Sd* esiste in due

forme alleliche, che corrispondono alla presenza (Sd) o all'assenza (Sd^+) dell'attività di segregazione distorta; Rsp è un locus *target* di Sd e consiste in una sequenza di DNA ripetuto il cui numero di copie risulta correlato al grado di sensibilità nei confronti del gene Sd (Little *et al.*, 1991): alleli supersensibili (Rsp^{ss}) contengono circa 3000 copie di questa ripetizione, quelli sensibili (Rsp^s) ne contengono circa 500-700 copie, mentre gli alleli insensibili (Rsp^i) ne portano solo qualche dozzina.

Per causare alti livelli di distorsione, il gene Sd richiede la presenza di un insieme di modificatori localizzati in vari punti lungo i cromosomi SD, come Promotori di SD o Enhancer, E(SD), Modificatori di SD M(SD), e Stabilizzatori di SD St(SD) (Kusano *et al.*, 2003) (Fig. 13).

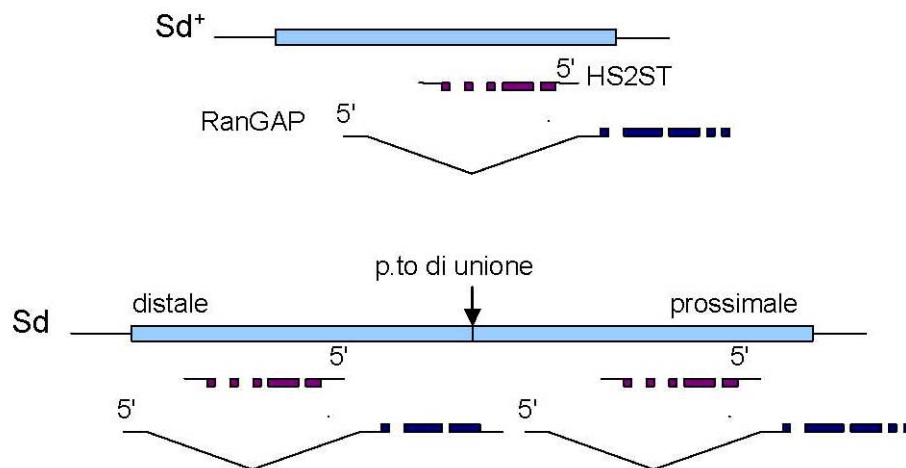
Fig. 13 Rappresentazione schematica dei componenti genetici dei cromosomi SD e loro distribuzione lungo il cromosoma 2.

Le linee sottili indicano porzioni di eucromatina del cromosoma mentre le linee più spesse l'eterocromatina centromerica. Il centromero è rappresentato come un cerchio. Un tipico cromosoma SD+ porta gli alleli *wild-type* di tutti gli elementi modificatori e un allele sensibile Rsp (Rsp^s). Il cromosoma SD invece porta un Rsp insensibile (Rsp^i).



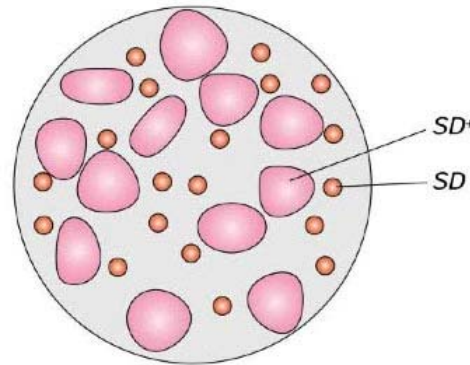
Il locus *Sd* è stato isolato mediante clonaggio posizionale ed è stato trovato essere associato con una duplicazione in tandem che sostituisce il frammento *wild-type* (*Sd*⁺) di 6.5 kb con uno di 11.5 kb. Le analisi di sequenza dei frammenti *Sd*, *Sd*⁺ e dei cDNA da essi derivati hanno rivelato la presenza di due unità di trascrizione in *Sd*⁺ che sono duplicate in *Sd* (Kusano *et al.*, 2003) (Fig. 14). Uno di questi geni codifica per una sulfotransferasi (*HS2ST*), importante per varie vie di segnalazione mediate dal ligando, l'altro per una RanGAP, una GTP-asi attivatore di Ran, una proteina regolatrice nucleare. L'attenzione si è focalizzata su quest'ultimo gene, il solo ad essere alterato nella duplicazione presente in *Sd*. Mentre infatti nel frammento di 11.5 kb, il gene *HS2ST* risultava inalterato e presente in doppia copia, il gene *RanGAP*, si presentava normale nella metà prossimale della duplicazione, e incompleto in quella distale (Fig. 14). Viene così prodotto un trascritto aberrante (Sd-RanGAP) troncato di 234 aminoacidi all'estremità C-terminale. Sebbene sia troncata, tale proteina risulta essere comunque attiva, in linea con l'evidenza che *Sd* agisce come mutazione che conferisce funzione. Studi di immunolocalizzazione hanno confermato che sebbene l'attività enzimatica di tale proteina sia normale, essa mostra una localizzazione subcellulare alterata (Kusano *et al.*, 2001). Negli spermatociti primari la proteina RanGAP *wild-type* è localizzata nel citoplasma, associata all'esterno della membrana nucleare; la Sd-RanGAP invece risulta essere distribuita diffusamente nel citoplasma e mostra anche localizzazione interna ai nuclei degli spermatociti primari. La segregazione distorta potrebbe essere conseguenza dello sconvolgimento di alcune funzioni nucleari della proteina durante la maturazione dello spermatidio.

Fig. 14 Organizzazione molecolare del DNA genomico e delle unità di trascrizione dei segmenti che comprendono i loci Sd^+ (in alto) e Sd (in basso). I cloni di DNA genomico sono rappresentati in alto, mentre al di sotto sono allineate le sequenze di cDNA. Gli esoni sono rappresentati come box di diverso colore (rosa quelli del gene HS2ST e blu del gene RanGAP), mentre le regioni di cDNA non codificanti di ciascun gene sono rappresentate come linee sottili (dritte quelle del gene HS2ST, e a forma di V quelle del gene RanGAP). In alto è rappresentato il locus Sd^+ in cui si trovano i due geni con opposto orientamento. Il trascritto di HS2ST è interamente contenuto all'interno della larga regione intronica del trascritto di RanGAP. In basso invece è rappresentato il locus Sd : la sequenza genomica contiene una duplicazione in tandem il cui punto di giunzione è indicato dalla freccia. Ciascuna metà della duplicazione contiene le due unità di trascrizione HS2ST e RanGAP. Esse appaiono essenzialmente normali nella metà prossimale (destra), mentre il gene RanGAP nella metà distale (sinistra) della duplicazione è prematuramente troncato al sito di giunzione della duplicazione.



In particolare, l'errata localizzazione nucleare di RanGAP riduce la concentrazione nucleare della stessa e interrompe la normale via di segnalazione di Ran. Questo provoca un compromesso stato di condensazione della cromatina negli spermatidi maturi (Fig. 15) e quindi la loro disfunzione. Sebbene in questi nuclei aploidi si verifichi un basso livello di trascrizione, essi vanno incontro a drammatiche modificazioni dello sviluppo, culminanti nella produzione di nuclei estremamente condensati ed allungati. Fra l'altro, a questo stadio si verifica la sostituzione degli istoni somatici con istoni spermatidio-specifici. Questo ed altri eventi richiedono un intenso trasporto di mRNA e proteine che il difetto di RanGAP altera, magari limitando l'apporto di fattori necessari alla condensazione della cromatina (Fig. 15).

Fig. 15. Diagramma della spermatogenesi in individui eterozigoti SD/SD^+ : i nuclei di spermatidi SD^+ non sono in grado di raggiungere il normale grado di condensazione.



Per spiegare come la presenza di un locus sensibile (Rsp^s) possa determinare un'azione preferenziale di Sd solo su una parte degli spermatidi, sono state formulate due ipotesi. La prima suggerisce che il RanGAP nucleare presente negli spermatociti primari sia diversamente distribuito nei nuclei dopo la prima divisione meiotica, accumulandosi preferenzialmente in quelli portatori del locus Rsp^s . Tale sproporzione potrebbe essere causata dal legame di Sd -RanGAP alle ripetizioni di eterocromatina di Rsp . Ciò spiegherebbe anche il motivo per cui esiste una correlazione tra numero di copie delle ripetizioni di Rsp e grado di sensibilità alla distorsione.

Una seconda ipotesi è che il RanGAP nucleare si distribuisca equamente tra i due nuclei aploidi dopo la prima divisione meiotica. Entrambe le classi di nuclei mostrerà perciò un deficit nel trasporto nucleare di RanGAP o qualsiasi altro deficit dipendente da Ran. Sarebbe l'eventuale presenza di un largo blocco di eterocromatina che corrisponde a Rsp^s o Rsp^{ss} ad essere ulteriormente responsabile di disfunzioni di questi spermatidi, e la variazione nel numero di ripetizioni in grado di determinare un'ampia variabilità negli effetti. D'altra parte, un ruolo importante quasi quanto lo stesso gene Sd sembra quello di altri fattori, tra cui il modificatore Enhancer = $E(SD)$ che in doppia dose sembra incrementare l'effetto del gene, bloccando all'interno del nucleo la RanGAP mutata.

Comparando tra loro i meccanismi d'azione dei *drive* meiotici più studiati (oltre all' Sd di *D. melanogaster*, anche quelli di *Neurospora intermedia*, di topo, ecc., vedi Lyttle, 1991), si possono così riassumere gli aspetti chiave e comuni a tali meccanismi:

- tutti i sistemi coinvolgono gli alleli di almeno due loci associati: un *distorter* e un suo *target*;
- tutti implicano disfunzioni dei gameti come *modus operandi* di base;

- le varie specie “ospiti” hanno accumulato classi simili di alleli target insensibili, e di polimorfismi soppressori/promotori, come mezzo per disattivare questi sistemi ultra egoisti (ultra-selfish).

Le similitudini tra i vari sistemi sono per lo più indipendenti dal meccanismo biologico mediante il quale avviene la distorsione della segregazione, sebbene in gran parte risultino coinvolti vari aspetti e fasi della gametogenesi.

A questo riguardo, tuttavia, appare interessante sottolineare che parecchi meccanismi di *drive* meiotico in *Drosophila*, incluso SD, risultano temperatura-sensibili ed in tutti il periodo sensibile corrisponde all’inizio della meiosi. L’effetto di trattamenti con alte o basse temperature somministrate a meiociti *SD/SD+* a questo stadio porta ad una tendenza più o meno marcata alla normalizzazione della segregazione (Mange, 1968). In questo senso, quindi, la segregazione distorta è un vero fenomeno meiotico, sebbene gli effetti più evidenti e/o meglio studiati siano quelli osservati nel corso della gametogenesi. Peraltro, considerando popolazioni naturali di *Drosophila*, normalmente esposte a “sbalzi” di temperatura, si potrebbe pensare che la sensibilità a tale fattore ambientale e la conseguente disattivazione del meccanismo SD potrebbe avere un ruolo adattativo.

Le evidenze ad oggi disponibili circa la presenza di difetti meiotici nelle cellule madri del polline associati al gene/i *Sd* di *Th. ponticum* inserito in frumento, sia quelle derivate dal presente lavoro che quelle appena accennate in uno precedente (Littlejohn e Pienaar, 1994), non sono facilmente spiegabili. Infatti, se presenti, sono sempre accompagnate da aberrazioni della gametogenesi, ma la loro presenza non è costante in tutte le piante in cui, comunque, le divisioni mitotiche post-meiotiche sono aberranti. Una possibile e comunque generica speculazione a questo stadio delle conoscenze potrebbe essere che variazioni alleliche a loci del background ricevente determinino una diversa sensibilità agli effetti del sistema *Sd* su diversi fasi del processo di formazione e maturazione dei gameti.

Allo stesso polimorfismo del background, del resto, sembra attribuibile l’erraticità con cui l’effetto di distorsione della segregazione e le correlate aberrazioni gametiche si continuano a manifestare o meno in progenie segreganti da individui in cui tali fenomeni erano stati o meno osservati (vedi il caso delle progenie BC₁F₃ V06X191-2-

28 e V06X191-2-35 derivate dalla stessa pianta BC₁F₂ (V06X191-2) dall'incrocio R23-1 x Simeto (vedi Risultati, § 3.2.1 e 3.3.1). Questo quadro di non costanza di una situazione aberrante o meno attraverso generazioni successive di autofecondazione di uno stesso genotipo segregante da F₁ in cui era stato presente un cromosoma ricombinante di tipo R23-1 è verosimilmente attribuibile alla variazione ad una serie di loci “modificatori” del genotipo della specie ricevente, che influenzano differentemente la trasmissibilità del cromosoma ricombinante. Una serie di analisi in ricombinanti di frumento tenero in cui era stata osservata segregazione associata al 7AgL di *Th. ponticum* hanno evidenziato il coinvolgimento di almeno cinque cromosomi di frumento (2A, 2B, 5B, 5D e 6D) nella modulazione del fenotipo SD (Marais, 1992; Prins e Marais, 1999), chiaramente indicando che la risposta del genotipo ricevente ha una base poligenica. Geni “responders” su tali cromosomi agiscono da promotori o soppressori dell'azione gametocidica e le forme alleliche presenti in diversi background varietali mostrano una cospicua variazione quantitativa.

Un altro aspetto interessante del problema riguarda la direzione dell'effetto SD, ovverosia trasmissione preferenziale del gamete portatore o sua auto eliminazione. Cromosomi traslocati o ricombinanti 7D-7Ag di frumento tenero, in cui braccio lungo include cospicua frazione del 7AgL contenente i geni *Lr19*, *Yp* e il potenziale gene che incrementa la produttività (*Yld*-QTL), ha in pratica sempre mostrato una trasmissibilità preferenziale, più o meno marcata a seconda del genotipo ricevente, rispetto al normale 7D (Sears, 1978; Zhang e Dvorak, 1990; Marais, 1990). Ciò era stato attribuito alla presenza di un gene SD, denominato *Sd1* (Zhang e Dvorak, 1990), tentativamente localizzato (Prins *et al.*, 1997) tra il centromero ed il locus RFLP *Xpsr165* (posizione fisica nel terzo prossimale del braccio, vedi Fig. 6)

Tuttavia, quando tramite ingegneria cromosomica, ovverosia inducendo ricombinazione tra il segmento 7AgL di una di tali linee (T4, 70% di 7AgL) e porzioni di cromosomi omeologhi del genoma ricevente di frumento tenero, sono stati ottenuti cromosomi con porzioni 7AgL di entità minore (lo scopo era quello di separare i geni *Lr19* e *Yp*, quest'ultimo non desiderabile in frumento tenero), essi mostravano un quadro diverso e variegato in termini di SD. In particolare, cromosomi in cui il nuovo segmento 7AgL era più corto dell'originale sia all'estremità distale che a quella prossimale, e quindi doveva aver perso *Sd1*, avevano un comportamento opposto, ovverosia una auto-eliminazione (Marais *et al.*, 2001; Groenewald *et al.*, 2005). Sebbene in tali casi il cromosoma di frumento portatore delle varie porzioni 7AgL risultò essere 7B e non

l'originario 7D (effetto della ricombinazione omeologa protratta per diverse generazioni), il diverso comportamento è stato ipoteticamente attribuito alla presenza di un secondo gene *Sd*, denominato *Sd2*, localizzato distalmente al gene *Lr19* (Marais *et al.*, 2001, 2005). Tale gene non sarebbe il diretto responsabile degli effetti diversi da quelli osservati in presenza di *Sd1*, quanto piuttosto la sua dissociazione da *Sd1*. In altre parole, il fenotipo SD 7AgL-dipendente sarebbe il risultato di un sistema genetico duplice, *Sd1* + *Sd2*, come tale induttore di trasmissione preferenziale, e invece alterato nei suoi effetti in conseguenza della dissociazione.

L'ipotesi, che ricorda il sistema *Sd-Rsp* di *Drosophila* (vedi sopra), è senz'altro attraente. In *Drosophila* è stato osservato che scambi prossimali rispetto al locus *Sd*, che portano a separazione di *Sd* da *Rsp*, producono cromosomi ricombinanti con comportamento "suicida" piuttosto che "ultra-selfish" (Lyttle, 1991). Il coinvolgimento di due loci è stato anche ipotizzato in ricombinanti di *Pisum sativum* con introgressioni sui cromosomi 5 e 7 derivanti da *P. fulvum*. In questo caso la segregazione distorta, risultante da selezione post-zigotica, sembrerebbe implicare l'interazione tra loci di *P. fulvum* presenti nei segmenti introgressiti su entrambe i cromosomi 5 e 7 (De Martino *et al.*, 2000).

Tuttavia, molti aspetti di questa pur possibile ipotesi non trovano riscontro in quanto osservato nei nostri materiali, come, in parte, anche nei ricombinanti di frumento tenero sopra citati. In particolare, la possibile esistenza di un gene *Sd2* distale all'*Lr19* appare non validata dal comportamento di ricombinanti, quali l'R5-2-10, l'R9-1 e l'R112-4 (Fig. 6), perfettamente normale sia in termini di segregazione che nel corso di meiosi e gametogenesi pollinica (vedi Risultati, § 3.3.3). Il caso più evidente di "normalità" è quello del ricombinante R5-2-10, utilizzato per la produzione di una varietà di frumento duro in corso di iscrizione al registro varietale nazionale. D'altra parte, il diverso comportamento potrebbe essere associato alla diversa localizzazione cromosomica e alla composizione genomica delle diverse specie riceventi dei segmenti 7AgL: sul 7D quelli associati a trasmissione preferenziale e sul 7B quelli con mutato comportamento (trasmissione ridotta) per quanto riguarda i ricombinanti di frumento tenero, specie con genoma AABBDD; sul 7A quelli trasferiti in frumento duro (genoma AABB). Gli effetti di "posizione" e di background genomico potrebbero poi interagire con quelli di background genetico, cioè ai molti loci "responders" (vedi sopra), diversi per numero e varianti omo- e omeo-allele nei vari tipi ricombinanti.

Allo stato attuale delle conoscenze appare impensabile formulare ipotesi precise circa il controllo genetico ed il meccanismo d'azione a livello cellulare dell'osservato fenomeno di SD associato al braccio 7AgL del *Thinopyrum ponticum* una volta inserito in genomi “estranei” anche se affini come quelli dei vari *Triticum*. Tuttavia, le evidenze acquisite nel corso del presente lavoro, ancorchè non conclusive, permettono di confermare ma anche ampliare le considerazioni, utili anche a individuare possibili ulteriori sviluppi della ricerca. Tra queste considerazioni:

- la risposta all'interazione di *Sd*-7AgL con il genoma di frumento sembra avere complesse basi genetiche (multigenica). Essa è dovuta all'interazione del/i fattore/i “scatenante”, di tipo *Sd*, presente nella specie selvatica, e diversi loci “modificatori” presenti nel genoma della specie ricevente.
- Una volta che il fattore *Sd* è attivato nell'ibrido parziale frumento-*Th. ponticum* (es. una linea ricombinante) il suo effetto può essere rilevato anche nei genotipi non portatori del cromosoma ricombinato (vedi Risultati, Tab. 12 e 13). Ciò suggerisce che tale fattore può agire come “innesco” la cui presenza è necessaria solo per elicitare, in un contesto permissivo, l'espressione di una gamma di fenotipi anormali.
- I tipi di anomalie riscontrate, soprattutto in corso di sporogenesi (asinapsi, segregazione anafasica irregolare e formazione di micronuclei) e gametogenesi pollinica (alterazioni della condensazione nucleare, frammentazione nucleare e presenza di micronuclei), benchè non sempre espresse simultaneamente, risultano essere ricorrenti, suggerendo l'esistenza di determinati loci *target* per i prodotti diretti o mediati da *Sd* o forse l'alterazione di funzioni comuni alla meiosi e alle divisioni mitotiche ad essa successive.

Alla luce dei risultati del presente lavoro, non sembra che il tipo di aberrazioni gametiche, e quindi, presumibilmente, il meccanismo induttore 7AgL-associato, sia assimilabile a quello di fenotipi SD causati da geni ad azione gametocidica (*Gc*) derivanti da varie specie del genere *Aegilops* (affine a *Triticum*) e “attivati” una volta introdotti in frumento (Endo, 2007). I fattori *Gc* di varie specie e cromosomi sono elementi genetici “egoisti” (*selfish*) che assicurano la loro trasmissione preferenziale inducendo rotture cromosomiche prevalentemente in gameti (soprattutto maschili) non portatori (Finch *et al.*, 1984; Endo, 1990). Le aberrazioni cromosomiche indotte

risultano verificarsi prevalentemente nella prima interfase post-meiotica (Nasuda *et al.*, 1998) e comunque non sono state mai riportate anomalie della meiosi.

Ipotesi, al momento del tutto speculative, circa il coinvolgimento di determinati geni nel controllo del meccanismo SD associato al 7AgL di *Th. ponticum* includono quel gruppo di geni, presenti in tutti gli Eucarioti, codificanti per proteine SMC (Structural Maintenance of Chromosome). Di questo gruppo fanno parte coesine, condensine e altre proteine che con queste si associano variamente in diverse specie e tessuti per espletare numerose funzioni, tra cui coesione tra cromatidi e cromosomi, condensazione cromosomica, controllo della ricombinazione e della segregazione, sia in interfase che nel corso delle divisioni mitotiche e meiotiche (vedi review di Shubert, 2009). Evidenze preliminari in piante superiori (*Arabidopsis* e riso) indicano almeno per alcuni di tali geni SMC la presenza nel genoma di diversi paraloghi, alcuni con funzioni polline-specifiche (Tao *et al.*, 2007).

5 CONCLUSIONI

Fenomeni di segregazione distorta (SD) e geni ad essi preposti, sia di tipo *Gc* che di altra natura e agenti attraverso diversi meccanismi sono frequenti nelle piante, dove si evidenziano soprattutto in situazioni ibride, intra- (ad es. Morishima *et al.*, 1992; Faris *et al.*, 1998) che, soprattutto, interspecifiche (vedi, ad es., Chetelat *et al.* 2000; Endo, 1990, 2007; Anhalt *et al.*, 2008).

Tali geni e/o i loro cromosomi portatori hanno sicuramente un ruolo evolutivo importante in termini di isolamento riproduttivo e quindi di speciazione e come determinanti di riarrangiamenti del genoma. La natura “selfish” di tali geni/cromosomi ne promuove la diffusione tra popolazioni e specie affini, spesso attraverso l’eradicazione di gameti non portatori; qualcuno ha detto: “come un cavallo di Troia...” (Endo, 2007).

L’SD è quindi un fenomeno naturale che non può essere evitato. Tuttavia, se da una parte se ne può trarre vantaggio, come nel caso della produzione di linee di delezione di frumento, generate dall’azione mutagenica “naturale” di alcuni geni *Gc* di varie specie di *Aegilops* (Endo, 2007), o nel mantenere in associazione e preferenzialmente trasmessi blocchi genici desiderabili derivanti da specie affini (vedi ad es. Finch *et al.*, 1984; Weide *et al.* 1993), dall’altra, se ne deve tener conto in una prospettiva di miglioramento genetico, ovverosia nello sviluppo di varietà stabili.

E, in quest’ottica, l’efficacia di qualunque strategia di controllo è legata alla conoscenza del fenomeno. Ciò riguarda in particolare casi come quello incontrato nel corso del presente lavoro, di cui poco è ancora chiaro sia in termini di esatta temporalità e target cellulare che di base genetica.

Probabilmente la SD associata al 7AgL di *Th. ponticum* segue meccanismi che sono comuni a popolazioni di specie selvatiche strettamente affini, dal momento che fenomeni SD analoghi a quelli descritti nel presente lavoro sono stati osservati sia in linee ricombinanti di frumento tenero recanti porzioni di 7AgL derivanti da accessioni di *Th. ponticum* diverse da quella donatrice dei geni *Lr19* e *Yp* (Scoles e Kibirige-Sebunya 1983), che in ricombinanti contenenti porzioni del braccio 7EL (Dvorak, 1980), omeologo del 7AgL e derivante dalla specie diploide *Agropyron elongatum* (un tempo considerata addirittura dello stesso genere dell’attuale *Thinopyrum ponticum*, decaploide).

Certamente, qualunque analisi verrà in futuro condotta per meglio studiare il sistema *Sd-7AgL*/frumento occorrerà disporre di linee quasi-isogeniche (NIL) portatrici o del segmento contenente il/i fattore responsabile della segregazione distorta e delle associate anomalie e di linee sorelle non portatrici.

Questo obiettivo, che si sta già perseguendo, potrebbe non essere facile da raggiungere pienamente, cioè fino all'ottenimento di NIL omozigoti per le opposte condizioni, a causa del difetto in trasmissibilità mostrato da cromosomi tipo R23-1 o R9-23. Tuttavia, già un eventuale confronto tra portatori eterozigoti e nulli segreganti potrebbe essere significativo. Nel contempo, anche lo sviluppo di altre linee ricombinanti frumento duro-*Th. ponticum* con porzioni di 7AgL diverse da quelle presenti nei suddetti cromosomi potrebbe aiutare a meglio circoscrivere i loci (uno o più) responsabili dei vari effetti *Sd*-dipendenti e quindi a meglio analizzarne e definirne il meccanismo. Anche tale attività è in corso, attraverso l'ingegnerizzazione cromosomica, mediata da ricombinazione omologa o omeologa, di cromosomi ricombinanti precedentemente prodotti.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J., Ram, S.J. "Image Processing with ImageJ". Biophotonics International, volume 11, issue 7, pp. 36-42, 2004.
- Anhalt U.C.M., Heslop-Harrison P. (J. S.), Byrne S., Guillard A., Barth S. 2008. Segregation distortion in *Lolium*: evidence for genetic effects. Theor Appl Genet 117:297–306.
- Ananthawat-Jonsson K., Schwarzacher T., Leitch A.R., Bennett M.D. and Heslop-Harrison, J.S., 1990. Discrimination between closely related Triticeae species using genomic DNA as a probe. Theor. Appl. Genet. 79: 721-728.
- Ananthawat-Jonsson, K. and Reader M.S., 1995. Pre-annealing of total genomic DNA for simultaneous genomic *in situ* hybridization. Genome 38: 814-816.
- Biagetti M., Vitellozzi F. and Ceoloni C., 1999. Physical mapping of wheat-Aegilops longissima breakpoint in mildew-resistant recombinant lines using FISH with highly repeated and low-copy DNA probes. Genome 42: 1013-1019.
- Boavida L.C., Becker J., Feijo J.A., 2005. The making of gametes in higher plants. Int. J. Biol. 49: 595-614.
- Boggini G. and Pogna N.E., 1990. Miglioramento genetico del frumento duro: criteri e metodi di selezione per la qualità pastificatoria. Agricoltura Ricerca 114: 59-68.
- Boggini G., Tusa P., Di Silvestro S. and Pogna N.E., 1998. Agronomical and quality characteristics of durum wheat lines containing the 1BL/1RS translocation. J. Genet. & Breed. 53: 167-172
- Bourlag N.E., 1968. Wheat breeding and its impact on world food supply. Proc. 3rd Int. Wheat Genet. Symp., Canberra, Australia, Aust. Acad. Sci., pp. 1-36.
- Bournival B., Obanni M., Abad A., Ohm H. and Mackenzie S., 1994. Isolation of a new species-specific repetitive sequence from *Thynopyrum elongatum* and its use in studies of alien translocations. Genome 37: 97-104
- Brown R.C. and Lemmon B.E., 1991. Pollen development in orchid. 3. A novel generative pole microtubule system predicts unequal pollen mitosis. J. Cell. Sci. 99: 273-281.
- Ceoloni C., 1987. Current methods of chromosome engineering in wheat. In EWAC (European Wheat Aneuploid Cooperative) Newsletter 1987: 95-109.
- Ceoloni C., Biagetti M., Ciaffi M., Forte P. and Pasquini M., 1996. Wheat chromosome engineering at the 4x level: the potential of different alien gene transfers into durum wheat. Euphytica 89: 87-97.
- Ceoloni C., Vitellozzi F., Forte P., Basili F., Biagetti M., Bitti A. and Delre V., 1998. Wheat chromosome engineering in the light of advanced genetic and cytogenetic marker-mediated approaches. In Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement, ed. Lelley T., WUV-Universitätsverlag, pp. 43-53.

- Ceoloni C., Forte P., Ciaffi M., Nenno M., Bitti A., De Vita P. and D'Egidio M.G., 2000. Chromosomal engineered durum wheat: the potential of alien gene introgressions affecting disease resistance and quality. in Proc. Seminar on Durum Wheat Improvement in the Mediterranean Region: New Challenges, Zaragoza, Spain, 12-14 April 2000, Options Méditerranéennes A-40: 363-371.
- Ceoloni C., Pasquini M., Simeone R., 2005a. The cytogenic contribution to the analysis and manipulation of the durum wheat genome. In Durum wheat breeding: current approaches and future strategies, ed Royo C., Nachit M.N., Di Fonzo N., Araus J.L., Pfeiffer W.H., Slafer G.A., The Haworth Press, New York, USA, 1:165-196.
- Ceoloni C., Forte P., Gennaro A., Micali S., Carozza R. and Bitti A., 2005b. Recent developments in durum wheat chromosome engineering. Cytogenet. Genome Res. 109: 328-344.
- Chetelat R.T., Meglic V., Cisneros P. 2000 A genetic map of tomato based on BC1 *Lycopersicon esculentum* x *Solanum lycopersicon* reveals overall synteny but suppressed recombination between these homeologous genomes. Genetics 154: 857–867.
- Cuadrado A., Vitellozzi F., Jouve N. and Ceoloni C., 1997. Fluorescence in situ hybridization with multiple repeated DNA probes applied to the analysis of wheat/rye chromosome pairing. Theor. Appl. Genet. 94: 347-355.
- Dellaporta S.L., Wood J. and Hicks J.B., 1983. A plant DNA miniprep: version II. Plant Mol. Biol. Report 1 (4): 19-21.
- De Martino T., Errico A., Lassandro A, Conicella C. 2000. Distorted segregation resulting from Pea chromosome reconstructions with alien segments from *Pisum fulvum*. J. Hered. 91: 322-25.
- Dvorak, J., 1980. Homoeology between *Agropyron elongatum* chromosomes and *Triticum aestivum* chromosomes. Can. J. Genet. Cytol. 22: 237–259.
- Dvorak, J., di Terlizzi, P., Zhang, H. B., and Resta, P. 1993. The evolution of polyploid wheats: Identification of the A genome donor species. Genome 36, 21–31.
- Eizenga G.C., 1987. Locating the Agropyron segment in wheat-Agropyron 'transfer No.12'. Genome 29: 365-366.
- Endo, T.R. 1990. Gametocidal chromosomes and their induction of chromosome mutations in wheat. Jpn. J. Genet. 65: 135–152.
- Endo T.R. 2007. The gametocidal chromosome as a tool for chromosome manipulation in wheat. Chromosome Research 15:67–75.
- Faris J.D., Laddomada B., Gill B.S. 1998. Molecular Mapping of Segregation Distortion Loci in *Aegilops tauschii*. Genetics 149: 319–327.

- Fedak G., 1985. Alien species as sources of physiological traits for wheat improvement. *Euphytica* 34: 673-680.
- Fedak G., 1998. Procedure for transferring agronomic traits from alien species to crop plants. In Proc. 9th Int. Wheat Genet. Symp., vol 1, compiled by A.E. Slinkard, Saskatoon, Saskatchewan, Canada: Univ. Extension Press. Univ. of Saskatchewan, pp. 1-7.
- Feldman M., Lupton F.G.H. and Miller T.E., 1995. Wheats. In Evolution of crop plants, ed. J. Smartt and N.W. Simmonds: Longman Group, London, pp.184-192.
- Feldman M. and Sears E.R., 1981. The wild gene resources of wheat. *Sci. Am.* 244: 98-109.
- Finch R.A., Miller T.E., Bennett M.D. 1984. "Cuckoo" *Aegilops* addition chromosome in wheat ensures its transmission by causing chromosome breaks in meiospores lacking it. *Chromosoma* 90: 84-88.
- Friebe B., Zeller F.J. and Kunzmann R., 1987. Transfer of 1BL/1RS wheat-rye translocation from hexaploid bread wheat to tetraploid durum wheat. *Theor. Appl. Genet.* 74: 423-425.
- Friebe B., Hatchett J.H., Sears R.G. and Gill B.S., 1990. Transfer of Hessian fly resistance from 'Chaupon' rye to hexaploid wheat via a 2BS/2RL wheat-rye chromosome translocation. *Theor. Appl. Genet.* 79: 385-389.
- Friebe B., Jiang J., Raupp W.J., McIntosh R.A. and Gill B.S., 1996. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to disease and pests: current status. *Euphytica* 91: 59-87.
- Friebe B., Kynast R.G., Hatchett J.H., Sears R.G., Wilson D.L. and Gill B.S., 1999. Transfer of wheat-rye translocation chromosome conferring resistance to Hessian fly from bread wheat into durum wheat. *Crop. Sci.* 39: 1692-1696.
- Gale M.D. and Miller T.E., 1987. The introduction of alien genetic variation into wheat. In Wheat Breeding – Its Scientific Basis ed. F.G.H. Lupton, Chapman and Hall, London: pp 173-210.
- Gall J.G. and Pardue M.L., 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63: 378-383.
- Ganetzky B., 1997. On the components of segregation distortion in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 86: 321-355.
- Ganetzky, B. 2000. Tracking down a cheating gene. *Amer. Scientist* 88 (2): 1-4.
- Gennaro A., Borrelli G.M., D'Egidio M.G., De Vita P., Ravaglia S., Ceoloni C. 2003. A durum wheat line produced by chromosome engineering with novel alien traits and great potential for varietal development. XLII Italian Society of Agricultural Genetics SIGA 1-6 September 2003. P 2.41
- Gennaro A., Koebner R.M.D., Coloni C., 2006. Identification of a linked sequence to the Lr19 leaf rust resistance gene by NBS-profiling of durum wheat-*Thinopyrum ponticum*

- recombinant lines. 5th Plant Genomics European Meeting (PGEM). 11-14 October 2006 pp 349
- Gennaro A., Forte P, Carozza R, Savo Sardaro M.L, Ferri D, Bitti A, Borrelli G.M, Degidio M.G, Ceoloni C., 2007. Pyramiding different alien chromosome segments in durum wheat: feasibility and breeding potential. *Israel journal of plant sciences*. 55:267-276.
- Gennaro A., Koebner R.M.D., Coloni C., 2009. A candidate for Lr19, an exotic gene conditioning leaf rust resistance in wheat. *Func. Int. Genomics*. 9: 325-334.
- Giorgi B., 1978. A homoeologous pairing mutant isolated in *Triticum durum* cv. Cappelli. *Mutat. Breed. Newsl.* 11: 4-5.
- Giorgi B., 1983. Origin, behaviour and utilization of a Ph1 mutant of durum wheat, *Triticum turgidum* (L.) var. durum. In *Proc. 6th Wheat Int. Genet. Symp.*, ed. S. Sakamoto, Kyoto, Japan: Plant Germplasm Inst., Kyoto Univ., pp. 1033-1040.
- Groenewald J.Z., Fourie M., Marais A.S., Marais G.F., 2005. Extension and use of a physical map of the Thinopyrum-derived Lr19 translocation. *Theor. Appl. Genet.* 112: 131-138.
- Hurst L.D., 1993. A model for the mechanism of transmission ratio distortion and for t-associated hybrid sterility. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci* 253: 83-91.
- Irish V.F., 1999. Petal and stamen development. *Curr. Top. Dev. Biol.* 41: 133-161.
- John H., Birnsteil M. and Jones K., 1969. Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. *Plant Methods* 1:5.
(<http://www.plantmethods.com/content/1/1/5>).
- Joppa L.R., Klindworth D.L. and Hareland G.A., 1998. Transfer of high molecular weight glutenins from spring wheat to durum wheat. In *Proc 9th Int. Wheat Genet. Symp.*, vol. 1, ed. Slinkard A.E., Saskatoon, Saskatchewan, Canada: Univ. Extension Press, Univ. of Saskatchewan, pp. 257-260.
- Kibirge-Sebunya I. e Knott D.R. e 1983. Transfer of stem rust resistance to wheat from an *Agropyron* chromosome having a gametocidal effect. *Can. J. Genet. Cytol.* 25: 215-221.
- Kihara H., 1919. Über cytologische Studien bei einige Getreidearten. I. Spezies-Bastarde des Weizens und Weizenroggen-Bastarde. *Bot. Mag.* 32: 17-38
- Kihara H., 1924. Cytologishe und genetishe Studien bei wichtigen Getreidearten. I. Spezies-Bastarde des Weizens und Weizenroggen-Bastarde. *Bot. Mag.* 32: 17-38.
- Knott D.R. 1961 The inheritance of rust resistance. VI. The transfer of stem rust resistance from *Agropyron elongatum* to common wheat. *Canadian Journal of Plant Science* 41, 109-123.
- Knott D.R., 1968. Agropyrons as a source of rust resistance in wheat breeding. In *Proc. 3rd Int. Wheat Genet. Symp.*, Canberra, pp. 204-212.

- Knott, D.R., Talukdar. 1971. Increasing seed weight in wheat and its effect on yield, yield components and quality. *Crop. Sci.* 11: 280-283.
- Knott D.R., 1980. Mutation of a gene for yellow pigment linked to Lr19 in wheat. *Can. J. Genet. Cytol.* 22: 651-654.
- Koebner, R.M.D. e Shepherd, K.W., 1985. Induction of recombination between rye chromosome 1RL and wheat chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 71: 208-215.
- Koltunow A.M., Truettner J., Cox K.H., Wallroth M. and Goldberg R.B., 1990. Different temporal and spazial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell* 2: 1201-1224.
- Kong L., Anderson J.M., Ohm H.W. 2007. Segregation distortion in bread wheat of a *Thinopyrum intermedium* 7E segment carrying Bdv3. *Proc. Plant & Animal Genome XV Conference*, S. Diego, CA: P276.
- Kusano A., Staer C., Ganetzky B. 2001. Nuclear mislocalization of enzymatically active RanGAP causes segregation distortion in *Drosophila*. *Dev. Cell.* 104: 321-324.
- Kusano A, Staber C., Edwin Chan HY, Ganetzky B. 2003. Closing the (Ran)GAP on segregation distortion in *Drosophila*. *BioEssays* 25:108–115.
- Law C.N., 1995. Gentic manipulation in plant breeding – prospects and limitations. *Euphytica* 85: 1-12.
- Leitch A.R., Schwarzacher T., Jackson D. and Leitch I.J., 1994. *In situ Hybridization: a practical guide*. Royal Microscop. Soc., Microscopy Handbooks 27, BIOS Scient. Publ. Ltd. Oxford. UK.
- Lyttle, TW. 1991. Segregation distorters. *Ann. Rev. Genet.* 25: 511-557.
- Littlejohn GM e R DeV Pienaar, 1994. The transfer of *Thinopyrum*-derived leaf-rust resistance from common to durum wheat. *Plant Breed.* 113: 58-64.
- Lukaszewski A.J., 1995. Physical distribution of translocation breakpoints in homoeologous recombinants induced by the absence of the Ph1 gene in wheat and tritcale. *Theor. Appl. Genet.* 90: 714-719.
- Mange EJ. 1968. Temperature sensitivity of segregation-distortion in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 58: 399-413.
- Marais, GF. 1990. Preferential transmission in bread wheat of a chromosome segment derived from *Thinopyrum disticum* (Thunb.) Love. *Plant Breed.* 104: 152-159.
- Marais G.F., 1992 Genetic control of a response to the segregation distortion allele, Sd-1d, in common wheat line 'Indis'. *Euphytica* 60: 89-95.
- Marais G.F., Marais A.S. and Groenewald J.Z., 2001. Evaluation and reduction of Lr19-149, a recombined form of the Lr19 translocation of wheat. *Euphytica* 121: 289-295.

- Marais G.F., Pretorius Z.A., Wellings C.R., McCallum B. and Marais A.S. 2005 Leaf rust and stripe resistance genes transferred to common wheat from *Triticum dicoccoides*. *Euphytica* 143: 115-123.
- Masterhazy A., Bartos P., Goyeau H., Niks R., Csoz M., Andersen O., Casulli F., Ittu M., Jones E., Manisterski J., Manninger K., Pasquini M., Rubiales D., Schachermayer G., Strzembicka A., Szunics L., Todorova M., Unger O., Vanco B., VidaWalther G.U., 2000. European virulence survey for leaf rust in wheat. *Agronomie* 20: 793-804.
- Mazza M., Pagliaricci S., Pasquini M., Iori A., Cacciatori P., Castagna R. and Pogna N.E., 1995. Analisi genetica dei bracci cromosomici 1BS, 1RS e 1AS e loro utilizzazione nel miglioramento genetico del grano duro. In Proc. V Giornate Internazionali sul Grano Duro. ed. Di Fonzo N. and Rognà G., Foggia, Italy, 2-4 May 1995, pp.113-122 (abstract in English).
- McCormick S., 1993. Male gametophyte development. *Plant Cell* 5: 1265-1275.
- McCormick S., 2004. Control of male gametophyte development. *Plant Cell* 16 Suppl.: S142-153.
- McIntosh R.A., Wellings C.R. and Park R.F., 1995. Wheat rusts: an atlas of resistance genes, CSIRO, Australia.
- Mac Key J., 1981. Mutations as a means for analyzing polyploid system. In Induced mutations as a tool in plant research, FAO-IAEA Intern. Symp., Vienna (Austria), 9-13 March 1981, Session II, pp. 143-151.
- Mettin D, Bluthner WD, Schlegel G., 1973. Additional evidence on spontaneous 1B/1R wheat-rye substitutions and translocations. In 'Proceedings of 4th International Wheat Genetics Symposium'. Columbia, Missouri (Eds ER Sears, LMS Sears) pp. 179-184.
- Monneveux P., Reynolds M.P., Gonzalez Aguilar J. and Singh R.P., 2003. Effect of the 7DL.7Ag from *Lophopyrum elongatum* on wheat yield and related morphophysiological traits under different environments. *Plant Breed.* 122: 379-384.
- Morishima H., Sano Y., Oka H.I. 1992. Evolutionary studies in cultivated rice and its wild relatives. *Oxford Surv Evol Biol* 8: 135-184.
- Naranjo T., Roca A., Goicoechea P.G. and Giraldez R., 1987. Arm homoeology of wheat and rye chromosomes. *Genome* 29: 873-882.
- Nasuda S, Friebe B, Gill BS., 1998. Gametocidal genes induce chromosome breakage in the interphase prior to the first mitotic cell division of the male gametophyte in wheat. *Genetics.* 149: 1115-1124
- Pasquini M., Iori A., Sereni L., Casini F., Riccardi M., Gazza L., Siniscalco A., Del Vecchio A., Preiti G., Mameli L., Raimondo I., Di Prima G., Cambrea M., Liotta C., Invernizzi, C. and Notario T., 2001. Malattie fungine più diffuse su frumenti duri e teneri. *L'Informatore Agrario* n. 35: 43-51.

- Plaschke J., Borner A., Xie D.X., Koebner R.M.D., Schlegel R. and Gale M.D. 1993. RFLP mapping of genes affecting plant height and growth habit in rye. *Theor. Appl. Genet.* 85: 1049-1054.
- Prins, R., G.F. Marais, Z.A. Pretorius, B.J.H. Janse & A.S. Marais, 1997. A study of modified forms of the *Lr19* translocation of common wheat. *Theor Appl Genet* 95: 424–430
- Prins R. and Marais G.F., 1999. A genetic study of the gametocidal effect of the *Lr19* translocation of common wheat. *S. Afr. Tydskr. Plant Grond.* 16 (1): 10-14.
- Quarrie S.A., Pekic Quarrie S., Radosevic R., Rancic D., Raminska A., Barnes J.D., Leverington M., Ceoloni C. and Dodig D., 2006. Dissecting a wheat QTL for yield present in a range of environments from the QTL to candidate genes. *J. Exp. Bot.* vol. 57, pp. 2627-2637.
- Rao Prabhakara M.V., 1978. The transfer of alien genes for stem rust resistance to durum wheat. In *Proc. 5th Int. Wheat Genet. Symp.* ed. S. Ramanujam, Indian Soc. Genet. Plant Breed. and Indian Agric. Res. Inst., New Delhi, India, pp. 338-341.
- Reynolds M.P., Calderini D.F., Condon A.G., Rajaram S., 2001. Physiological basis of yield gains in wheat associated with the LR19 translocation from *Agropyron elongatum*. *Euphytica* 119: 137-141.
- Riley R. and Chapman V. 1958. Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. *Nature* 182: 713-715.
- Roder M.S., Plaschke J. Konig S.U., Borner A., Sorrels M.E., Tanksley S.D., Ganal M.W., 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Molecular and General Genetics*, 246 3, pp 327-333.
- Roder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P. and Ganal M.W., 1998. A microsatellite map of wheat *Genetics* 149:2007-2023.
- Saintenac C., Falque M., Martin O., Paux E., Feuillet C and Sourdille P., 2009. Detailed recombination studies along chromosome 3B provide new insights on crossover distribution in wheat (*T. aestivum* L). *Genetics* 181: 393-404.
- Salamini F., Ozkan H., Brandolini A., Schafer-Progl R. and Martin W., 2002. Genetics and geograpy of wild cereal domestication in the Near East, *Nature Reviews*, 3: 429-441.
- Sax K., 1922. Sterility in wheat hybrids. II. Chromosome behaviour in partially sterile hybrids. *Genetics*. 7: 513-522.
- Schubert V. 2009. SMC Proteins and Their Multiple Functions in Higher Plants. *Cytogenet Genome Res* 124: 202–214.
- Scott R., Hodge R., Paul W. and Draper J., 1991. The molecular biology of anther differentiation. *Plant Sci.* 80: 167-191.

- Scott R.J., Spielman M. and Dickinson H.G., 2004. Stamen structure and function. *Plant Cell* 16 Suppl.: S46-60.
- Schwarzacher T., Anamthawat-Jonsson K., Harrison G.E, Islam A.K.M.R., Jia J.Z., King I.P., Leitch A.R., Miller T.E., Reader S.M., Rogers W.J., Shi M. and Heslop-Harrison J.S., 1992. Genomic *in situ* hybridization to identify alien chromosomes and chromosome segments in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 84: 778-786.
- Scoles and Kibi- rige-Sebunya 1983
- Sears E.R., 1952. Homoeologous chromosome in *Triticum aestivum*. *Genetics* 37: 624
- Sears E.R., 1954. The aneuploids of common wheat. *Univ. Mo. Agric. Exp. Stn. Res. Bull.* 572: 1-59.
- Sears E.R., 1956. The transfer of leaf rust resistance from *Aegilops umbellulata* to wheat. *Brookhaven Symposia in Biology* 9, 1–22.
- Sears E.R e Okamoto M., 1958. Intergenomic chromosome relationship in hexaploid wheat. In *Proc. Xth. Intl. Congr. Genet.* 2: 258-259.
- Sears E.R., 1966. Nullisomic-tetrasomic combinations in hexaploid wheat. In *Chromosome manipulations and plants genetics*, ed. Riley R. and Lewis K.R. vol. 20: Oliver and Boyd. Edimburgh, pp. 29-45.
- Sears, E.R., 1972. Chromosome engineering in wheat. p.23-38. In: *Stadler Symposia*, Vol. 4. Univ. of Missouri, Columbia.
- Sears E.R., 1973. Agropyron-wheat transfers obtained by homoeologous pairing. In *Proc. 4th Wheat Genet. Symp.*, Colombia, Missouri, ed. Sears E.R. and Sears L.M.S., pp.191-199.
- Sears E.R., 1976. Genetic control of chromosome pairing in wheat. *Ann. Rev. Genet.* 10: 31-51.
- Sears E.R., 1977. An induced mutant with homoeologous pairing in common wheat. *Can. J. Genet. Cytol.* 19: 585-593
- Sears E.R., 1978. Analysis of wheat-Agropyron recombinant chromosomes. In *Proc. 8th Eucarpia Congress on interspecific Hybridization in Plant Breeding*, Madrid, Spain, 1977: 63-72.
- Sears E.R., 1981. Transfer of alien genetic material to wheat. In ‘Wheat science—today and tomorrow’. (Eds LT Evans, WJ Peacock) pp. 75–89. (Cambridge University Press: Cambridge, UK)
- Sears E.R., 1983. The transfer to wheat of interstitial segments of alien chromosomes. In *Proc. 6th Int Wheat Genet Symp.*, ed. S. Sakamoto, Kyoto, Japan: Plant Germplasm Inst., Kyoto Univ., pp. 5-12

- Sharma D, Knott DR ., 1966. The transfer of leaf-rust resistance from *Agropyron* to *Triticum* by ir radiation. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 8, 137–143.
- Singh R.P. Huerta-Espino J., Rajaram S., Crossa J., 1998. Agronomic effects from chromosome translocations 7DL.7Ag and 1BL.1RS in spring wheat. *Crop Sci* 38: 27-33.
- Sourdille P., Guyomarc'h H., Baron C., Gandon B., Chiquet V., Artiguenave F., Edwards K., Foisset N., Dufour P., 2001. Improvement of the genetic maps of wheat using new microsatellite markers *Plant & Animal Genome IX Abstracts* 167.
- Sun Q.X. e Xu R.Q., 1998. Genetic control of tolerance to high temperature stress in wheat. In *Proc. 9th Int. Wheat Genet. Symp.* vol 1, ed. A.E. Slinkard, Saskatoon, Saskatchewan, Canada: Univ. Extension Press, Univ. of Saskatchewan, pp 33-40.
- Taylor DR, Ingvarsson PK., 2003. Common features of segregation distortion in plants and animals. *Genetica* 117: 27-35
- Tai T.H., Tanksley SD., 1990. A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue. *Plant Mol Biol Rep*; 8: 297-303. Trask B.J., 1991. Fluorescence *in situ* hybridization. *Trends in Genetics* 7 (5): 149-154.
- Tao J., Zhang L., Chong K., Wang T. 2007. *OsRAD21-3*, an orthologue of yeast *RAD21*, is required for pollen development in *Oryza sativa*. *Plant J* 51: 919–930.
- Trask B.J., 1991. Fluorescence in situ hybridization: application in cytogenetics and gene mapping. *Trends Genetics* 7: 149-154.
- Weide R., van Wordragen M.F., Lankhorst R.K., Verkerk R., Hanhart C., Liharska T., Pap E., Stam P., Zabel P., Koornneef M. 1993. Integration of the classical and molecular linkage maps of tomato chromosome 6. *Genetics* 135: 1175–1186.
- Worland A.J., 1999. The importance of Italian wheats to worldwide varietal improvement. *J. Genet. & Breed.*, 53: 165-173
- Zeller F.J., 1973. 1B/1R wheat-rye chromosome substitution and translocations. *Proc 4th Intern. Wheat Genet. Symp.* pp 209-221. Missouri Agric. Exper. Station. Coloumbia
- Zhang W., Qu L.J., Gu H., Gao W., Liu M., Chen J. and Chen Z., 2002. Studies on the origin and evolution of tetraploid wheat based on the internal transcribed spacer (ITS) sequences of nuclear ribosomal DNA. *Theor. Appl. Genet.* 104: 1099-1106
- Zhang H.B. and Dvorak J., 1990. Characterization and distribution of an interspersed repeated nucleotide sequence from *Lophopyrum elongatum* and mapping of segregation distortion factor with it. *Genome* 33: 927-936.
- Zitelli G., 1973. Genetic improvement of durum wheat for disease resistance. In *Proc. Symp. on Genetics and Breeding of durum wheat*. Bari (Italy), pp.473-487

Zonia L., Tupy J. and Staiger C.J., 1999. Unique actin and microtubule arrays co-ordinate the differentiation of microspores to mature pollen in *Nicotiana tabacum*. J. Exp Bot 50: 581-594.