



**DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE PER
L'AGRICOLTURA, LE FORESTE, LA NATURA E L'ECOLOGIA**

DAFNE

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

BIOTECNOLOGIE VEGETALI - XXII CICLO

***“Gene pyramiding” via ingegneria cromosomica di geni di
resistenza a fusariosi e ruggini trasferiti in frumento tenero e
duro da specie selvatiche del genere *Thinopyrum****

AGR07

Coordinatore: **Prof.ssa Stefania Masci**

Firma

Tutor: **Prof.ssa Carla Ceoloni**

Firma.....

Dottoranda: **Paola Forte**

Firma

INDICE

Elenco contenuti	
Elenco figure	III
Elenco tabelle	VI
RIASSUNTO	VIII
1.INTRODUZIONE	2
1.1 Il frumento: incremento di produttività in risposta alle esigenze globali	2
1.2 Il frumento: origini e attuali problematiche fitopatologiche	3
1.2.1 Il frumento e la sua coltivazione: dalla storia all'attualità	3
1.2.2 I patogeni del frumento: dinamiche di diffusione alla luce dei cambiamenti climatici.....	4
1.3 Il frumento: filogenesi ed organizzazione del genoma	9
1.3.1 Variabilità genetica per la resistenza alla fusariosi della spiga ed alle ruggini: tipologia e conoscenza delle fonti	13
1.4 L'ingegneria cromosomica: strategia di scambio di informazione genetica tra frumenti coltivati e tra specie ad essi affini	16
1.4.1 Marcatori molecolari e ibridazione in situ come aiuto dell'ingegneria cromosomica.....	19
1.5 Il genere <i>Thinopyrum</i> come fonte di geni utili	21
1.5.1 Geni sul gruppo di omeologia 7 del genere <i>Thinopyrum</i>	23
1.6 Scopo del lavoro	31
2 MATERIALI E METODI	32
2.1 MATERIALI	33
2.1.1 Materiali vegetali	33
2.1.2 Sonde per ibridazione in situ	35
2.1.3 Marcatori molecolari	35
2.2 METODI	38
2.2.1 Metodi di estrazione del DNA e stima della concentrazione	38
2.2.1.1 Estrazione del DNA genomico	38
2.2.1.2 Estrazione di DNA da cariossidi o da porzione di foglia	38
2.2.1.3 Stima della concentrazione del DNA estratto	39
2.2.2 Analisi molecolari basate su reazioni a catena della polimerasi (PCR)	40
2.2.3 Ibridazione in situ	41
2.2.3.1 Considerazioni generali	41

2.2.4. Ottenimento preparati citologici	42
2.2.4.1 Tecnica per l'esame di cromosomi mitotici	42
2.2.4.2 Tecnica per l'esame di cromosomi meiotici	43
2.2.5.1 Preparazione delle sonde	44
2.2.6.1 Protocollo di ibridazione genomica in situ	45
2.2.6.1.2 Pretrattamenti dei preparati citologici	45
2.2.6.1.3 Ibridazione in situ con la tecnica del pre-annealing GISH	46
2.2.6.1.4 Lavaggi post-ibridazione	46
2.2.6.1.5 Rilevamento indiretto	46
2.2.6.1.6 Microscopia ad epifluorescenza ed acquisizione computerizzata delle immagini.....	47
2.2.7 Allevamento delle piante	47
2.2.8 Esecuzione degli incroci e autofecondazioni	48
2.2.9 Infezioni FHB	48
2.2.9.1 Preparazione dell'inoculo di <i>Fusarium</i> spp.	48
2.2.9.2 Inoculazione e test di virulenza su spiga	48
 3 RISULTATI	 52
3.1 Selezione e caratterizzazione di ricombinanti 7el ₁ L+ 7el ₂ L in frumento tenero	52
3.2 Isolamento e caratterizzazione di ricombinanti 7el ₁ L/7el ₂ L in frumento duro	59
3.3 Valutazione della resistenza al <i>Fusarium</i> spp. delle linee ricombinanti 7DL-7elL di frumento tenero	65
3.4 Prova fenotipica del QTL <i>FHBres7el₂</i> in frumento duro	71
4.1 Selezione e caratterizzazione di ricombinanti 7el ₁ L+ 7E in frumento tenero	75
 BIBLIOGRAFIA	 81

Elenco figure

Introduzione

Figura 1: Nazareno Strampelli, il primo a destra, Benito Mussolini, al centro e Vittorio Emanuele III, a sinistra.

Figura 2: Sintomi della fusariosi della spiga in campo e, nel particolare, striminzimento delle cariossidi raccolte dalle spighe malate (www.uky.edu)

Figura 3. Diffusione spaziale e temporale della razza Ug99 di ruggine dello stelo (stem rust) dalla sua prima apparizione in Uganda (Figura da Vurro et al., 2010).

Figura 4. Le ruggini del frumento: ruggine nera (*Puccinia graminis* sp.tritici); ruggine bruna (*Puccinia recondita* sp.tritici), al centro; ruggine gialla (*Puccinia striiformis*), a destra

Figura 5. La probabile origine dei frumenti poliploidi (figura da Gennaro, 2006).

Figura 6. Esempio di localizzazione (3BS) del principale QTL (*Fhb1*) in frumento tenero (“Lod score” di diversi colori per gli anni 2010/2011/2012 e media-in giallo-; Cai J., 2012).

Figura 7. Ottenimento di ricombinanti di frumento duro recanti porzioni di diversa entità del cromosoma 7el1 di *Th. ponticum*.

Figura 8. Mappa genetica e fisica della regione distale 7AL/7el1L in diversi ricombinanti di frumento duro-*Th. ponticum*

Figura 9. Linea di sostituzione, traslocazione e linee ricombinanti, esaploidi e tetraploidi utilizzate nel progetto di pyramiding nel corso del dottorato.

Materiali

Figura 10 Inoculazione su spiga della sospensione conidica di *Fusarium* spp.

Figura 11. Ciclo vegetativo del frumento, tra parentesi è indicato lo stadio vegetativo Zadoks sotto il tempo necessario per passare da uno stadio vegetativo all’altro. Tratta da:<http://www.extension.umn.edu/distribution/cropsystems/DC2548.html>. È indicata la fase fenologica in cui è stata condotta l’infezione

Risultati

Figura 12. GISH di cromosomi alla metafase I meiotica di piante F1 (KS24-1 x T4) a 2n=42: DNA genomico di *Th. ponticum* rilevato con FITC (fluorescenza verde intenso); DNA genomico di frumento tenero rilevato con Cy3 (fluorescenza rossa); giallo-arancio-rosso genoma A e B, giallo-verde pallido genoma D).

Figura 13. Profilo di amplificazione di due importanti marcatori distali codominanti, CFA2240 e BE445653.

Figura 14. Mappa citogenetica del cromosoma 7D/7eL, presente in linee ricombinanti di frumento tenero derivanti dall'incrocio (KS24-1 x T4), definita tramite marcatori SSR, STS e EST e analisi GISH

Figura 15. Marcatori presunti avere una localizzazione prossimale sul 7DL (<http://wheat.pw.usda.gov/>) mappati sulle linee ricombinanti 7D/7eL di frumento tenero. In grassetto sono riportati i marcatori polimorfici usati nella caratterizzazione genetica delle linee 7DS.7DL/7eL.

Figura 16. Ibridazione *in situ* genomica (GISH) che evidenzia i due tipi di cromosomi 7DS.7DL/7eL presenti in linee di frumento tenero: a sinistra il 70% del 7DL sostituito da 7eL₁L (T4); a destra il 100% del 7DL sostituito da 7eL₂L (KS24).

Figura 17 GISH di cromosomi alla metafase I meiotica di piante F1 (KS24-1 x R23-1/R5-2-10) (2n=35): a sinistra, la formazione di un trivalente tra i cromosomi parentali, 7DS.7eL₂L, 7AS.7AL-7eL₁ e 7AS.7AL; a destra, assenza di appaiamento dei cromosomi 7DS.7eL₂L e 7AS.7AL-7eL₁. DNA genomico di *Th. ponticum* rilevato con FITC (fluorescenza verde intenso); DNA genomico di frumento duro rilevato con Cy3 (fluorescenza giallo-arancio).

Figura 18. Mappa citogenetica dei ricombinanti “primari” 7A di frumento duro e relativi parentali di incrocio con alcuni dei marcatori utilizzati.

Figura 19. GISH dei cromosomi ricombinanti 7AS.7AL/7eL delle linee R129 e R85: DNA genomico di *Th. ponticum* rilevato con FITC (fluorescenza verde intenso); DNA genomico di frumento duro rilevato con Cy3 (giallo-arancio).

Figura 20 Schema di produzione di ricombinanti “secondari” utili per il *breeding*.

Figura 21: Sintomatologia causate dal *Fusarium* spp.: confronto fra una spiga inoculata e una non sottoposta a infezione appartenenti allo stesso genotipo suscettibile di una linea ricombinante di frumento tenero.

Figura 22: Fenotipo delle spighe infettate con *Fusarium* spp. al 21° giorno post inoculo; a sinistra: genotipo ricombinante portatore del QTL *FHBres-7eL₂*; a destra: genotipo ricombinante, senza il QTL *FHBres-7eL₂*, completamente suscettibile.

Figura 23. Risposta dei quattro gruppi ricombinanti 7DL/7eL e delle linee di controllo all'infezione con *Fusarium* spp.: percentuali delle spighe infette a 7, 14 e 21 giorni dopo l'inoculazione (d.p.i.).

Figura 24 Fenotipo di alcune linee di frumento duro inoculate con *Fusarium* spp. al 21d.p.i.; R85 (OM+ QTL*Fhb*) resistente, R112-4 ed R85 (OM- QTL*Fhb*) suscettibili.

Figura 25 Risposta dei due gruppi ricombinanti 7AL/7eL e delle due linee di controllo all'infezione con *Fusarium* spp.: percentuali delle spighe infette a 7, 14 e 21 giorni dopo l'inoculazione (d.p.i.).

Figura 26. Risposta all'infezione con *Fusarium spp.* delle linee di tenero CS7E(7D), con il QTL *Fhbres-7E*, e la relativa varietà di controllo suscettibile CS a 7, 14 e 21 d.p.i..

Figura 27. Schema di incrocio per il gene *pyramiding* del QTL *Fhbres.7E* di *Th elongatum* e i geni *Lr19*, *Sr25* e *Yp* di *Th. ponticum* (7el₁).

Figura 28. GISH di cromosomi meiotici di piante F1CS7E(7D) x T4: a sinistra, appaiamento bivalente aperto (ROD) tra le porzioni omeologhe dei cromosomi 7DS.7DL/7el₁ e 7ES./7EL; a destra gli stessi cromosomi non appaiati (univalenti). DNA genomico di *Th. ponticum* / *elongatum* rilevato con FITC (verde brillante); DNA genomico di frumento tenero rilevato con Cy3 (gialloarancio genoma A e B, verde pallido genoma D).

Figura 29 Profilo di amplificazione di due marcatori telomerici codominanti, mappati nel corso del dottorato ed utilizzati per la selezione genotipica.

Figura 30 Mappa citogenetica delle linee parentali e dei ricombinanti spontanei selezionati nella generazione di incrocio F1(CS7E(7D) x T4) x varietà di tenero e/o la linea mutante CSph2a.

Figura 31 Confronto di localizzazione dei marcatori impiegati per la mappa 7DL-7el₁-2,L e 7AL-7el₁L verso la mappa bin del 7DL di frumento.

Figura 32 Schema di incroci delle linee di frumento tenero CS7E(7D) (QTL *Fhbres-7E*) e T4 (*Lr19*, *Sr25* e *Yp*) con la linea mutante CSph2a scelti per aumentare la frequenza di appaiamento, in MI meiotica, tra i cromosomi 7EL ed 7el₁L.

Elenco tabelle

Introduzione

Tabella 1: Le reazioni di resistenza sulla base delle manifestazioni fenotipiche sono state classificate in 5 tipologie (Wang et al., 2005)

Tabella 2: Specie di Triticinae raggruppate secondo i rapporti filogenetici con i genomi di frumento tenero e duro (da Feldman, 1979).

Tabella 3: Livelli di ploidia di specie del genere *Thinopyrum* (Dewey, 1984; Chen Q., 2005).

Materiali

Tabella 4: Linee ricombinanti di frumento tenero e duro recanti porzioni di 7eL di *Th. ponticum* rispettivamente sui bracci 7DL e 7AL ; linea di sostituzione *Th. elongatum* in cui la coppia 7E sostituisce la coppia di frumento tenero 7D.

Tabella 5: Marcatori molecolari utilizzati nel corso del progetto di dottorato per la caratterizzazione genotipica e per la costruzione di una mappa genetica 7eL e 7E

Tabella 6: Condizioni di amplificazione in reazioni PCR dei diversi tipi di primers/marcatori utilizzati (Ta = temperatura di *annealing*, variabile a seconda del marcatore).

Tabella 7. Miscela per la marcatura con digossigenina e biotina tramite Nick Translation

Tabella 8 Tabella x Miscela di ibridazione

Risultati

Tabella 9. Analisi dell'appaiamento alla metafase I meiotica di piante F1(KS24-1 x T4).

Tabella 10. Elenco marcatori saggiati ed effettivamente impiegati per la relativa specificità allelica. In rosso sono evidenziati quelli mappati nel corso della tesi di dottorato.

Tabella 11. Linee ricombinanti di frumento tenero in cui sono presenti i geni di interesse in combinazione multipla o solo il QTL per resistenza all'FHB.

Tabella 12. Analisi della segregazione (test del χ^2) delle progenie F2 dei 17 gruppi genotipici di frumento tenero ricombinanti 7eL1-7eL2.

Tabella 13. Studio dell'appaiamento dei cromosomi ricombinanti 7D/7eL2 e 7A/7eL1 alla metafase I meiotica di piante F1 (KS24-1 x R23-1/R5-2-10).

Tabella 14. Progenie ottenute dagli incroci [(KS24 x R5/R112/R23) x cv. frumento duro]: numero di semi e piante ottenute e relativa selezione genotipica con indicate le percentuali di piante ricombinanti determinate

Tabella 15. Risultati della selezione genotipica, con il marcatore codominante CFA2240, della progenie F2 da (R85 x cv. Ariosto).

Tabella 16: Forme alleliche dei vari marcatori molecolari saggiati sulle linee ricombinanti eL1+eL2 di frumento duro, sia di tipo R5-2-10 (R129) che di tipo R23-1 (R85).

Tabella 17 Genotipizzazione con il marcatore CFA2240 delle progenie F2 delle linee di ricombinanti “secondari” di frumento duro (derivati di R85, ricombinante primario) e relativa combinazione cromosomica determinata con i marcatori Ag15₆₀₀, PSR129 e WMC790.

Tabella 18: Genotipi dei ricombinanti 7DL/7eLL e delle linee controllo ai loci *XBE445653* e *Xcfa2240*; (la risposta attesa all’FHB è basata su dati di letteratura, vedi testo Shen & Ohm, 2007 e Zhang et al., 2011).

Tabella 19: Analisi della varianza (ANOVA) dei gruppi di genotipi ricombinanti e loro controlli analizzati a 7, 14 e 21 d.p.i.

Tabella 20 Prospetto riassuntivo del Tukey test condotto sui valori di NDS rilevati sui vari gruppi genotipici a 7, 14 e 21 d.p.i.; i valori di P in rosso indicano un valore significativo ($P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$). Per la denominazione dei gruppi vedi Tab. 13 (A, D ed E sono gli attesi resistenti -R/R?- e tutti gli altri i suscettibili -S/S?- a FHB).

Tabella 21: Media (%) $\pm$ errore standard (ES) del numero di spighe infette (NDS) a 7, 14 e 21 giorni dopo infezione con *Fusarium* spp.

Tabella 22: Genotipi omozigoti dei ricombinanti 7AL/7eLL e delle linee controllo al locus *Xcfa2240*

Tabella 23: Analisi della varianza (ANOVA) dei gruppi di genotipi ricombinanti e loro controlli analizzati a 7, 14 e 21 d.p.i.

Tabella 24. Prospetto riassuntivo del Tukey H.S.D test (Post Hoc ANOVA) condotto sui valori di NDS rilevati sui vari gruppi genotipici a 14 e 21 d.p.i.; i valori di P in rosso indicano un valore significativo ($P < 0,001$). Per la denominazione dei gruppi vedi Tab. 22

Tabella 25: Media (%) $\pm$ errore (%) standard del numero di spighe infette (NDS) a 7, 14 e 21 giorni dopo infezione con *Fusarium* spp.

Tabella 26. Studio di appaiamento dei cromosomi ricombinanti alla metafase I meiotica di piante F1 [(CS7E(7D) x T4)]

Tabella 27. Elenco marcatori saggiati ed effettivamente impiegati per la relativa specificità allelica, In rosso sono evidenziati quelli mappati nel corso della tesi di dottorato.

Tabella 28 Selezione degli individui eterozigoti derivanti dall’incrocio (CS7E(7D) x T4) x c.v. Blasco/CSph2a; sono rappresentati il numero di individui per ciascun genotipo e la relativa percentuale, sul totale della progenie esaminata

RIASSUNTO

Favorite dai cambiamenti climatici, le ruggini e la fusariosi della spiga (FHB), gravi malattie del frumento in tutto il mondo, sono diventate una minaccia anche in aree di distribuzione insolite. Pertanto, si rende necessaria l'introduzione di validi geni di resistenza in varietà adattate alla coltivazione, in modo da mantenere la loro capacità di resa e la qualità della granella. Il trasferimento di cromosomi estranei o di parte di essi nel genoma di frumento, definito "ingegneria cromosomica", è una strategia di miglioramento che, combinata con l'utilizzazione di sistemi avanzati di selezione, permette di accedere ed impiegare nel *breeding* geni derivanti da specie selvatiche affini al frumento. Attraverso tale strategia, un gene/QTL di resistenza all'FHB (*FHBres7el₂*), presente nell'accessione della Triticina selvatica *Thinopyrum ponticum* contenente cromatina el₂, è stato trasferito da una linea di frumento tenero (KS24, 7DS.7el₂L) in genotipi di frumento tenero (T4, 7DS.7DL/7el₁L) e duro (7AS.7AL/7el₁L), già portatori di altri geni utili, *Lr19+Sr25+Yp*, precedentemente trasferiti da una diversa accessione (el₁) dello stesso *Th. ponticum*. Allo stesso modo, anche un altro gene/QTL di resistenza all'FHB (*FHBres7E*), presente in un'altra specie dello stesso genere, il *Thinopyrum elongatum*, è stato oggetto di un altro trasferimento da una linea di frumento tenero, CS7E(7D), in genotipi di frumento tenero (T4, 7DS.7DL/7el₁L) sempre in associazione ai geni *Lr19+Sr25+Yp*. Le progenie di incrocio derivanti da tali linee sono state caratterizzate e selezionate tramite l'ausilio di marcatori molecolari e tecniche di ibridazione in situ (GISH). Sebbene con diversa frequenza, sia in frumento tenero che in duro è stato possibile ottenere il *pyramiding* dei vari geni delle due accessioni di *Th. ponticum* (el₁ + el₂); nei frumenti teneri sono stati associati i geni provenienti dalle due specie *Th. ponticum* e *Th. elongatum* (el₁ + E). Inoltre, sono stati sottoposti ad infezione con *Fusarium* spp., genotipi ricombinanti di tenero (7DS.7DL-7el₁7el₂L) ed di duro (7AS.7AL-7el₁7el₂L) per valutare l'efficacia dell'*FHBres* in entrambe le specie. Le linee selezionate, portatrici della nuova combinazione el₁ (*Lr19+Sr25+Yp*) + el₂ (*FHBres*), hanno in tutti i casi evidenziato una significativa riduzione (60-70%) della suscettibilità alla fusariosi della spiga.

Introduzione

1.Introduzione

1.1 Il frumento: incremento di produttività in risposta alle esigenze globali

A livello mondiale il frumento viene coltivato su più di 240 milioni di ettari ed il suo commercio è maggiore di qualsiasi altra coltura agricola; rappresenta inoltre la più importante fonte di carboidrati nella maggior parte dei Paesi (Curtis et al., 2002), contribuendo a circa un quinto dell'apporto calorico totale della popolazione mondiale e a quasi la metà di quello di regioni quali il Nord Africa, Turchia e Asia Centrale (Reynolds et al., 2008). L'attuale produzione mondiale è stimata intorno alle 690 milioni di tonnellate annue (FAO, 2013), in incremento rispetto agli anni precedenti.

Nonostante l'ampia offerta, la domanda globale ed il consumo di cereali necessari all'alimentazione umana, alla produzione di mangimi e di biocarburante è in continuo e rapido aumento (Edgerton, 2009). Molti fattori - la crescita demografica mondiale (Hoisington et al., 1999), la diminuzione delle superfici coltivabili in seguito all'aumento dell'urbanizzazione, la scarsità d'acqua e i decrementi produttivi e qualitativi dovuti ai recenti cambiamenti climatici - spingono ad un imprescindibile obiettivo: incrementare la produttività dei frumenti rispettando l'ambiente e soddisfacendo gli standard attuali di sicurezza alimentare (Chakraborty e Newton, 2011). I cambiamenti climatici influenzano inoltre l'epidemiologia e lo sviluppo delle patologie vegetali, deprimendo considerevolmente la potenziale produttività delle colture agricole e limitando la qualità dei raccolti, quindi la salubrità alimentare (Miraglia et al., 2009; Luck et al., 2011).

I patogeni più aggressivi per il frumento, in ogni areale di coltivazione, sono soprattutto i funghi; tra questi spiccano per diffusione e gravità di attacco ed incidenza economica quelli del genere *Fusarium* spp., in grado di produrre micotossine dannose per la salute umana ed animale (Miraglia et al., 2009; D'Egidio e Desiderio, 2006) e quelli appartenenti al genere *Puccinia*, responsabili delle ruggini (Luck et al., 2011). Se nel caso della fusariosi della spiga (FHB) l'incremento dell'incidenza della malattia è causato soprattutto da variazioni nella distribuzione delle piogge (spostamenti degli areali e della stagionalità) e dal riscaldamento globale, per le ruggini le perdite produttive sono principalmente dovute all'evoluzione di nuove razze virulente ed alla riduzione dell'efficienza della resistenza delle varietà coltivate (Chakraborty, 2011; Chakraborty e Newton, 2011).

Oggi più che mai il controllo delle malattie delle piante è una componente molto importante delle attività di ricerca e sviluppo, mirate a produrre di più mantenendo elevati standard di salubrità alimentare e sostenibilità ambientale.

1.2 Il frumento: origini e attuali problematiche fitopatologiche

1.2.1 Il frumento e la sua coltivazione: dalla storia all'attualità

Le prime tracce della sua coltivazione risalgono a circa 10000 anni fa e sono state rinvenute in Medio Oriente nella zona della “Mezzaluna fertile”, compresa tra la costa del Mediterraneo e la pianura del Tigri e dell'Eufrate. Specie importante per la nascita di molte civiltà indoeuropee, il frumento pose le basi delle economie agricole grazie al suo buon valore nutrizionale, alta conservabilità e facilità di trasporto; la sua ampia adattabilità ai diversi areali e la selezione antropica, esercitata nella scelta degli individui più produttivi e resistenti alle avversità, favorirono la comparsa di razze locali (*land races*), cioè di popolazioni geneticamente eterogenee caratterizzate da specificità di distribuzione, elevata rusticità e buon adattamento ambientale. Dopo la scoperta dell'eredità dei caratteri mendeliana, di quella che era stata una pratica agricola se ne fece una metodologia e si sperimentarono e produssero incroci interspecifici che nel XIX secolo, insieme alle innovative tecniche agrochimiche, portarono alle “Rivoluzioni verdi”- da quella di Nazareno Strampelli nei primi decenni del 1900 in Italia (Worland, 1999) (Fig 1), a quella poi condotta da Norman Borlaug e collaboratori (Borlaug, 1968) del CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo) - che aumentarono enormemente le produzioni, risolvendo molti dei problemi alimentari.

Figura 1: Nazareno Strampelli, il primo a destra, Benito Mussolini, al centro e Vittorio Emanuele III, a sinistra.



Grazie a quest'ultima, di cui uno degli aspetti caratterizzanti fu l'abbassamento della taglia, fu possibile incrementare l'apporto di azoto alla pianta, ottenendo cospicui incrementi produttivi ma diffondendo sistemi agricoli ad alti input energetici ed ambientali. Nel corso degli anni, la pressione selettiva esercitata a favore dei soli caratteri necessari a migliorare le rese ha eroso la base genetica delle specie coltivate, limitando la possibilità di nuovi interventi migliorativi. Le grandi estensioni monoculturali e mono-varietali hanno favorito inoltre la diffusione epidemica dei patogeni del frumento, favoriti dalle abbondanti concimazioni, e l'insorgenza di nuove razze, anche in seguito all'uso continuo di pesticidi.

1.2.2 I patogeni del frumento: dinamiche di diffusione alla luce dei cambiamenti climatici.

“Adaptation” è la definizione coniata dall’IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) per definire l’insieme delle proprietà che le colture agricole devono avere per affrontare gli effetti delle modifiche ambientali (Ainsworth e Ort, 2010); gran parte sono relative a pratiche agronomiche, ma essenziale è anche una buona base di variabilità genetica. La risposta dei frumenti ai rapidi cambiamenti climatici dovrebbe essere quindi principalmente funzione di un arricchimento genetico delle varietà coltivate per i caratteri necessari ad aumentare le soluzioni di adattamento.

L’incremento della pressione esercitata dai patogeni vegetali è tra gli effetti maggiormente incidenti sulle rese e sulla qualità dei raccolti dei cereali ed anch’esso può e deve essere combattuto sia in campo, con buone pratiche agricole, che con adatti programmi di “breeding” e/o con biotecnologie. Per il frumento, a differenza del mais, le soluzioni biotecnologiche trovate sono poche e poco applicate, ma molto si è già fatto e si sta facendo tramite il miglioramento genetico assistito da MAS (Marker Assisted Selection) (Edgerton, 2009). Tra le malattie fungine dei frumenti, emergono per la loro nuova diffusione e gravità, la fusariosi della spiga (Chakraborty e Newton, 2011), anche chiamata FHB dall’acronimo inglese (Fusarium Head Blight) e la ruggine nera del frumento (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) (Luck et al., 2011). La riacutizzazione di entrambe le patologie che ha origine comune nei mutamenti del clima (incremento di CO₂, aumento del volume vegetativo, modifica delle temperature e dell’umidità durante i cicli vegetativi ecc.) si diversifica nelle relative dinamiche di sviluppo e diffusione.

La fusariosi della spiga è favorita dal clima caldo e umido all’antesi. Provoca un parziale o completo disseccamento della spiga (Fig. 2), che riduce la resa e la qualità, diminuendo il peso dei semi (striminzimento delle cariossidi) e producendo uno o più tipi di micotossine. L’aumento della concentrazione potenziale di micotossine sulle sementi è, infatti, direttamente correlato al numero di giorni di pioggia ed al numero di giorni con umidità maggiore del 75%, ma decresce con valori di temperatura inferiori ai 12°C e superiori ai 32°C (Schaafsma e Hooker, 2007).

L’FHB è una malattia ad eziologia complessa determinata da diverse specie fungine appartenenti al genere *Fusarium* e *Microdochium*. Essendo causata da differenti patogeni facoltativi essi possono agire contemporaneamente e/o separatamente in relazione alla temperatura, all’umidità e alla specie ospite (orzo, avena, segale, triticale, riso, mais e sorgo), fattori che determinano la predominanza di una specie di *Fusarium* rispetto ad un’altra (Moretti et al., 2002).

Sul frumento oggi nel mondo predominano le specie *Fusarium graminearum* Schwabe (telomorfo: *Giberella zeae* Schw. (Petch) e *Fusarium culmorum* (Xu & Nicholson, 2009).

Il *Fusarium culmorum* e *Microdochium nivale* sono diventate le specie prevalenti nel clima

temperato freddo europeo, ma nell'ultima decade, in seguito all'innalzamento delle temperature, il *Fusarium graminearum* è risultato la specie dominante nell'eziologia dell'FHB in Olanda (Waalwijk et al., 2003), Inghilterra, Galles (Jennings et al., 2004) e nel nord della Germania (Miedaner et al., 2008).

Figura 2: Sintomi della fusariosi della spiga in campo e, nel particolare, striminzimento delle cariossidi raccolte dalle spighe malate (www.uky.edu)



Dato che il *F. graminearum* è il principale produttore di micotossine (deossinivalenolo), la concentrazione di queste nelle sementi è di conseguenza aumentata. A partire dal 1995 anche in Italia si è riscontrata una diffusione significativa della fusariosi e, dal monitoraggio condotto da 1995 al 2004 (Campagna et al., 2005), si è notata una maggiore incidenza di tale patologia nelle regioni settentrionali, quali l'Emilia Romagna e la Lombardia, e quelle centrali, quali Toscana, Umbria, Lazio ed Abruzzo. Nelle regioni meridionali, invece, la malattia è risultata spesso assente, a causa delle condizioni climatiche (scarse precipitazioni ed elevate temperature), meno favorevoli allo sviluppo degli agenti causali. Anche in Italia, e in particolare in Emilia-Romagna, la frequenza di isolamento di *F. culmorum* è in costante crescita (Pancaldi et al., 2010).

Le tossine prodotte da *Fusarium* appartengono al gruppo dei tricoteceni. Il deossinivalenolo (DON), in particolare, detto anche vomitossina, può avere nei mammiferi effetti neurotossici e immunotossici ed è responsabile di sindromi ematiche e anoressiche negli allevamenti zootecnici. Oltre ai tricoteceni, *F. culmorum* produce zerealenone, che ha un'azione estrogeno-simile molto evidente nella specie suina (Campagna et al., 2005). Il DON persiste anche nei processi di conservazione e trasformazione industriali delle granelle (produzione bibite ed

alimenti) passando anche all'uomo quando questi prodotti vengono consumati (Harcz et al., 2007).

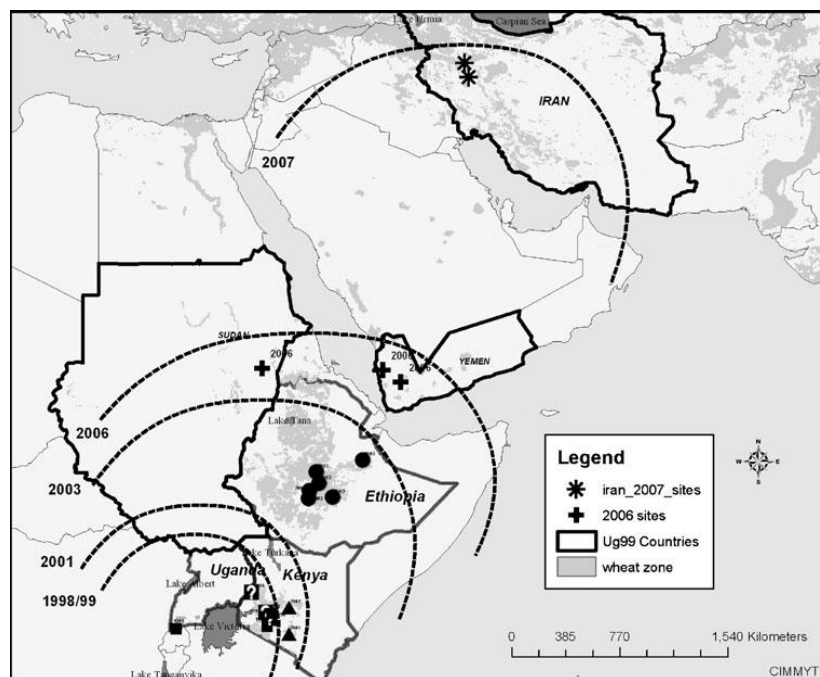
In generale dunque l'aumento e la composizione delle micotossine sono legate ai cambiamenti climatici (Magan et al., 2011). Sulla base dei modelli di Fernandes et al. (2004) si prevede, nei prossimi 30 anni, che l'indice di rischio della Fusariosi sarà di molto superiore rispetto a quello attuale in specifiche aree del Brasile, Uruguay e Argentina; usando sempre un modello simile, Madgwick et al. (2011) presumono che dal 2050 aumenterà in tutto il Regno Unito il rischio di epidemie di FHB ed il numero di colture in cui i livelli di micotossine sarà superiore al termine fissato dall'UE (regolamento comunitario n. 856/2005).

Che il clima influenzi la frequenza e la gravità delle epidemie è suggerito da diversi studi. La gravità di attacchi di fusariosi della spiga e di ruggine gialla in Cina e di ruggine nera negli USA sono stati collegati all'Indice di Oscillazione di El Niño (Schermo e Yang 1995), e la prevalenza/gravità della ruggine bruna e gialla in Svezia associata alle condizioni climatiche nel lungo termine (Wiik e Ewaldz, 2009).

Per le ruggini, che sono tra i patogeni più pericolosi per i cereali nel mondo, l'umidità, le alte temperature e i venti sono i tre fattori ambientali che influenzano le epidemie di vari tipi di ruggine (Luck et al., 2011). I recenti cambiamenti climatici, soprattutto l'innalzamento della temperatura, uniti all'incremento di CO₂ nell'atmosfera, favoriscono l'aumento delle biomassa delle colture e il tempo di crescita vegetativa, ritardando l'epoca di raccolta. Tutto ciò permette un maggior numero di cicli di infezione, l'aumento delle popolazioni fungine ed una più rapida evoluzione di nuove razze (Chakraborty et al., 2011). Il caso emblematico e di maggior impatto socio-economico, è quello della nuova razza di *Puccinia graminis tritici*, agente causale della ruggine nera o ruggine del culmo (black o stem rust), denominata Ug99 (sin. TTKSK). Questa ruggine è estremamente pericolosa per i danni che provoca sugli organi colpiti (culmo, foglie, guaine, glume); le lacerazioni epidermiche sono causa di notevoli perdite d'acqua, le quali determinano un mancato riempimento delle cariossidi con il conseguente striminzimento delle stesse se non, nei casi più gravi, il totale disseccamento della pianta.

La Ug99, originatasi in Uganda nel 1999 (Pretorius, 2000) ha continuato la sua epidemia globale (Fig. 3) provocando enormi danni soprattutto a causa del superamento della resistenza conferita dal gene *Sr31*, che era stato ampiamente usato nel miglioramento di quasi tutte le varietà (Vurro et al., 2010); in continua evoluzione, Ug99 ha prodotto altri ceppi per cui sempre più frumenti risultano suscettibili (Singh et al., 2008). Alcune previsioni affermano che, nel volgere di meno di un decennio, raggiungerà anche l'Europa (Stanca, 2008) e si diffonderà in Pakistan ed in India attraverso l'Iran (Ejaz et al., 2012).

Figura 3: Diffusione spaziale e temporale della razza Ug99 di ruggine nera dalla sua prima apparizione in Uganda (figura da Vurro et al., 2010).



Nel corso degli ultimi quindici anni la ruggine nera non è stata registrata in molti paesi europei. Ciò era probabilmente dovuto alla diffusa coltivazione di genotipi resistenti, in combinazione con l'eliminazione della sua ospite alternativo (*Berberis vulgaris*), e la coltivazione di genotipi precoci in grado di sfuggire infezione della malattia. In Italia, infezioni di ruggine nera sono state osservate solo occasionalmente su genotipi a maturazione tardiva (Pasquini et al., 2008). Recentemente (Nocente et al., 2011) è stata riportata la sua presenza su alcune varietà di frumento tenero in zone ristrette del centro Italia. Ai due patotipi isolati gran parte delle varietà di frumento duro e tenero sono risultate resistenti. Tuttavia, patotipi virulenti, come la Ug99, possono essere introdotti, o i nuovi patotipi possono evolversi in tipi virulenti verso geni di resistenza finora efficaci. Per la ruggine gialla vi è la prova che nuovi patotipi abbiano mostrato notevole adattamento a temperature più calde, causando gravi epidemie in ambienti precedentemente sfavorevoli (Milus et al. 2009). Lo stesso potrebbe accadere per le altre ruggini. Data la situazione, negli ultimi anni si sono costituite reti di monitoraggio e studio delle ruggini (Borlaug Global Rust Initiative, <http://www.globalrust.org>) nelle diverse regioni del globo. Lo stesso potrebbe accadere per le altre ruggini (Fig. 4).

Data la situazione, negli ultimi anni si sono costituite reti di monitoraggio e studio delle ruggini (Borlaug Global Rust Initiative, <http://www.globalrust.org>) nelle diverse regioni del globo.

Appare evidente dunque la necessità di rispondere adeguatamente agli attacchi di patogeni in rapida evoluzione creando “nuovi frumenti” capaci di resistere o almeno tollerare l’epidemie di tali malattie.

Figura 4. Le ruggini del frumento: ruggine nera (*Puccinia graminis sp.tritici*); ruggine bruna (*Puccinia recondita sp.tritici*), al centro; ruggine gialla (*Puccinia striiformis*), a destra



Per i patogeni biotrofici, quali le ruggini, il meccanismo di controllo genetico delle resistenze è quello di specificità ospite-patogeno, anche detto ‘gene-per-gene’ o resistenza verticale; per questi la gestione della malattia è più sostenibile se si ricorre alla combinazione di più geni di resistenza, identificati ed uniti utilizzando la selezione assistita da marcatori molecolari (MAS). Studi previsionali sugli scenari climatici e sulla “longevità” (*durability*) di risposta dei geni di resistenza potrebbero aiutare nella continua ricerca di geni efficaci (Huang et al., 2006).

Per i patogeni necrotrofi, quali gli agenti della fusariosi, l’espressione genetica delle resistenze non è specifica, ma si basa su molti geni e forse anche vari meccanismi di difesa (resistenza orizzontale o quantitativa regolata da geni o QTL = Quantitative Traits Loci), ognuno contribuente ad una parziale riduzione della malattia, ma non in grado di fornire una completa protezione (Tab.1). Inoltre, il fungo necrotrofo riesce a crescere saprofiticamente sui residui colturali e produce grandi quantità di inoculo che possono infettare le colture successive. Si rende così necessaria, ai fini dell’avanzamento della difesa dei frumenti nel quadro dei cambiamenti climatici, l’integrazione tra le strategie di miglioramento genetico e l’attuazione di pratiche agronomiche che abbassino le concentrazioni degli inoculi.

Tabella 1: Le reazioni di resistenza sulla base delle manifestazioni fenotipiche sono state classificate in 5 tipologie (Wang et al., 2005)

Tipo I	resistenza all’infezione iniziale
Tipo II	resistenza alla diffusione dell’infezione nelle spighe;
Tipo III	resistenza all’infezione della cariosside;
Tipo IV	resistenza all’accumulo di micotossine;
Tipo V	tolleranza alla malattia, ovvero un genotipo capace di fornire rese più elevate rispetto ad altri posti nelle medesime condizioni d’infezione.

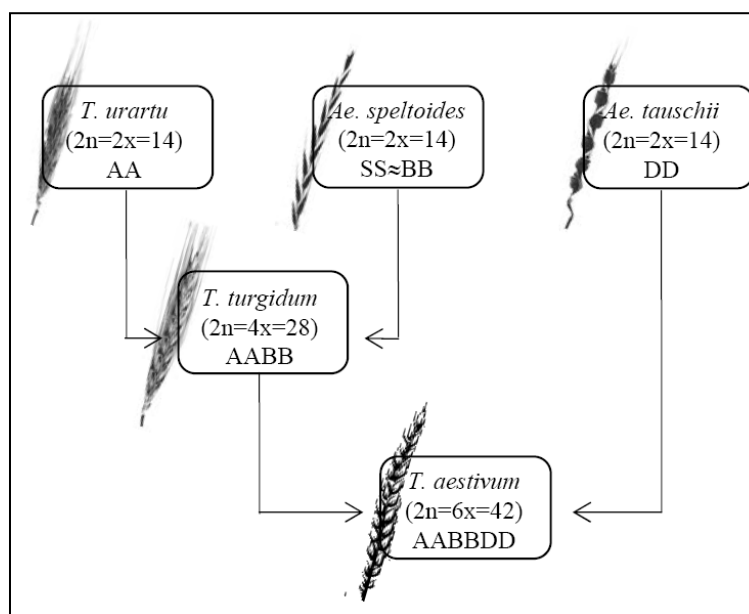
1. 3 Il frumento: filogenesi ed organizzazione del genoma

Il frumento (*Triticum spp.*) appartiene come classificazione tassonomica al genere *Triticum*, sottotribù delle *Triticinae*, tribù delle *Triticeae*, famiglia delle *Poaceae* (*Gramineae*).

Lo studio della filogenesi dei frumenti coltivati, il tenero esaploide (*T. aestivum* L.) ed il duro tetraploide (*T. durum* L.), ha inizio con gli studi di Kihara (1919) e Sax (1922) che hanno dimostrato l'appartenenza di tutte le *Triticinae* ad un ampio gruppo di specie avente numero cromosomico di base $x = 7$.

Partendo da questa evidenza le *Triticinae* vennero suddivise, in base al diverso livello di ploidia, in diploidi ($2n = 2x = 14$), tetraploidi ($2n = 4x = 28$) ed esaploidi ($2n = 6x = 42$). La formazione dei primi allotetrapoliploidi, progenitori del frumento duro, avvenne per ibridazione spontanea tra un *Triticum* diploide con genoma A ed una specie donatrice del genoma B che, generando probabilmente gameti non ridotti, produssero il raddoppiamento cromosomico quindi l'anfidiploide AABB (Kihara, 1924). L'ulteriore evento casuale di incrocio tra il *Triticum* tetraploide con una specie diploide donatrice del genoma D portò alla formazione dei *Triticum* esaploidi, progenitori dell'attuale frumento tenero (Fig.4).

Figura 5. La probabile origine dei frumenti poliploidi (figura da Gennaro, 2006).



I frumenti sono dunque allopoliploidi, ma, essendoci un forte grado di similitudine genetica tra i genomi che lo compongono, si possono considerare allopoliploidi segmentali e non genomici (Feldman et al., 1995).

Ciascun cromosoma di un dato genoma (es. A), ha infatti un suo “corrispondente” nell’altro (B) o negli altri due (BD) genomi, definiti “omeologhi” (parzialmente omologhi). Dato il numero

cromosomico di base ($x=7$) comune ai diversi genomi, esistono sette gruppi di omeologia, ovverosia sette gruppi di cromosomi omeologhi (ad es. gruppo 1 = cromosomi omeologhi 1A, 1B e 1D).

Ciò è stato dimostrato inizialmente 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 (es. nulli 1A), è funzionalmente “compensata” da un’extra-dose di un’altra dello stesso gruppo (es. tetra 1B). Inoltre, la creazione di linee di addizione e 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 (Feldman et al., 1995; Zhang 2002 e Petersen et al., 2006), basati su analisi citogenetiche (cariotipo, appaiamento cromosomico) e molecolari (ad esempio tramite marcatori RFLP, Internal Transcribed Spacers = ITS), 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* (= *T. tauschii*, $2n = 2x = 14$) sono ormai largamente accettati come donatori rispettivamente del genoma A e D. L’origine del genoma B rimane controversa; il genoma della specie considerata tra i più probabili donatori, l’*Aegilops speltoides* ($2n=2x=14$), non è indicato B ma S (Cox, 1998; Huang et al., 2002; Wang et al., 1996) (Fig.4). Il genoma S è condiviso da un gruppo di specie (*Aegilops* sezione *Sitopsis* (Jaub. e Spach) Zhuk.), in cui oltre alla *Ae. speltoides* (S) sono comprese *Ae. bicornis* (S^h), *Ae. longissima* (S^l) ed *Ae. searsii* (S^s) (Feldman et al., 1995) (Tab. 2).

L’elevato livello di sintenia e colinearità dei cromosomi omeologhi delle diverse Triticinae e dei genomi delle Poaceae, viene confermato, oltre che dai risultati citogenetici, dai recenti e continui progressi nella costituzione di mappe genetiche e fisiche di frumento e specie affini, dalla disponibilità delle relative sequenze nucleotidiche e dalle analisi comparative dei loro genomi (Devos and Gale, 2000; Akhunov et al., 2009; Devos, 2010).

I frumenti coltivati e le specie ad essi correlate possono essere raggruppati in *pool* genici in base alla relativa affinità filogenetica, la quale corrisponde a rapporti di omologia o di omeologia (parziale omologia) tra i relativi genomi e cromosomi, (Tab. 2) e, su questa base, ad una maggiore o minore possibilità di ricombinazione tra gli stessi.

Specie appartenenti al *pool* genico primario condividono una completa omologia con i genomi dei frumenti coltivati e nessun ostacolo limita la ricombinazione tra i rispettivi cromosomi; vi rientrano le accessioni di frumento esaploide e tetraploide, le razze autoctone e le specie donatrici dei genomi A e D.

Il *gene pool* secondario è costituito da specie per lo più poliploidi che hanno uno o più genomi

in comune con i frumenti coltivati, ma con una ricombinazione interspecifica complessivamente ridotta. Numerose specie di *Triticum/Aegilops*, incluse le specie diploidi della sezione Sitopsis (genoma $S \approx B$), sono incluse in questo *pool* genico. Il *pool* genico terziario comprende specie diploidi e poliploidi più distanti rispetto ai frumenti, con i quali il trasferimento genico può avvenire facendo ricorso a strategie citogenetiche di “ingegneria cromosomica” (vedi più avanti, § 1.4). Appartengono a questo gruppo specie di generi noti e importanti come fonte di variabilità utile, tra cui *Secale*, *Agropyron*, *Thynopyrum*, *Haynaldia*.

Per la ricerca di nuove fonti di resistenze genetiche, che possano contribuire alla creazione dell'ideotipo frumento “adattabile” alle nuove esigenze globali, diverse specie appartenenti alla famiglia della Triticinae, tribù delle Triticeae, già da tempo hanno dimostrato di essere una fonte importante di geni di resistenza, utili per il miglioramento genetico delle specie coltivate (Friebe et al., 1996; Cai et al., 2005; Hajjar e Hodgkin, 2007).

Tabella 2: Specie di Triticinae raggruppate secondo i rapporti filogenetici con i genomi di frumento tenero e duro (da Feldman, 1979).

Tipo di affinità intergenomica	Specie	Genoma
<i>Pool I</i> = specie con genomi omologhi		
1. I progenitori più prossimi	<i>T. turgidum</i> var. <i>dicoccoides</i>	AB
2. Diploidi donatori del genoma A	<i>T. monococcum</i> var. <i>boeoticum</i> <i>T. monococcum</i> var. <i>urartu</i> <i>T. tauschii</i> (= <i>Ae. tauschii</i> , <i>Ae. squarrosa</i>)	A A D
3. Poliploidi che condividono un genoma		
a. genoma A	<i>T. timopheevii</i>	AG, AAG
b. genoma D	<i>T. crassum</i> (= <i>Ae. crassa</i>) <i>T. ventricosum</i> (= <i>Ae. ventricosa</i>) <i>T. cylindricum</i> (= <i>Ae. cylindrica</i>) <i>T. juvenile</i> (= <i>Ae. juvenalis</i>)	DM ^{cr} DM ^v CD DM ^{cr} C ^u
<i>Pool II</i> = specie con genomi omologhi		
1. Specie strettamente correlate	<i>T. searsii</i> (= <i>Ae. searsii</i>) <i>T. longissimum</i> (= <i>Ae. longissima</i>) <i>T. bicornis</i> (= <i>Ae. bicornis</i>) <i>T. speltooides</i> (= <i>Ae. speltooides</i>) <i>T. variabilis</i> (= <i>Ae. . variabilis</i>) <i>T. kotschy</i> (= <i>Ae. kotschy</i>) <i>T. tripsacoides</i> (= <i>Ae. mutica</i>)	S ^s S ^l S ^b S C ^u S ^v C ^u S ^v M ^t
2. Specie meno strettamente correlate	<i>T. dichasians</i> (= <i>Ae. caudata</i> , <i>Ae. markgrafii</i>) <i>T. comosum</i> (= <i>Ae. comosa</i>) <i>T. uniaristatum</i> (= <i>Ae. uniaristata</i>) <i>T. umbellulatum</i> (= <i>Ae. umbellulata</i>) <i>T. ovatum</i> (= <i>Ae. ovata</i>) <i>T. triaristatum</i> (= <i>Ae. triaristata</i>) <i>T. macrochaetum</i> (= <i>Ae. biuncialis</i>) <i>T. triunciale</i> (= <i>Ae. triuncialis</i>) Alcune specie <i>Agropyron</i>	C, M M ^u C ^u C ^u M ^o C ^u M ^t C ^u M ^t M ⁱ² C ^u M ^b C ^u C
<i>Pool III</i> = Specie non strettamente correlate	Specie dei generi <i>Secale</i> , <i>Haynaldia</i> , <i>Agropyron</i> , <i>Thinopyrum</i> , <i>Elymus</i> , e altre <i>Triticinae</i>	

1.3.1 Variabilità genetica per la resistenza alla fusariosi della spiga ed alle ruggini: tipologia e conoscenza delle fonti

La resistenza all’FHB è un tipico carattere a controllo poligenico, la cui manifestazione è la risultante del contributo di molti geni con effetti additivi, definiti QTL (Quantitative Trait Loci) (Ruckenbauer et al., 2001; Buerstmayr et al., 2009). Da numerosi studi condotti è noto che la risposta all’infezione che determina l’FHB è modulato dai fattori genetici dell’ospite (elementi di resistenza nella pianta), da quelli del patogeno (virulenza del fungo/i), dalle condizioni ambientali che influenzano lo sviluppo della patologia e dall’interazione genotipo-ambiente (Fuentes et al., 2005). Inoltre, come detto in precedenza, la fusariosi della spiga può essere indotta da differenti specie di *Fusarium* e la composizione dell’inoculo può facilmente modificarsi in base alle condizioni climatiche (Moretti et al., 2002), esprimendo quindi diversi gradi di aggressività.

Allo stato dell’arte attuale, mediante metodi di mappatura basati sulla correlazione tra genotipo e fenotipo e con l’ausilio di marcatori molecolari come RFLP, AFLP e SSR, è stata suggerita l’esistenza nel germoplasma dei frumenti coltivati di più di 100 QTL, (Liu et al., 2009; Buerstmayr et al., 2009). Ventidue di tali QTL (genericamente definiti *FHBres*), localizzati sui cromosomi 1B, 1D, 2A, 2B, 2D, 3A, 3B, 3D, 4B, 5A, 5B, 6A, 6B, 7A e 7B, sono stati confermati in differenti popolazioni di mappa (Buerstmayr et al., 2009), risultando perciò i più affidabili.

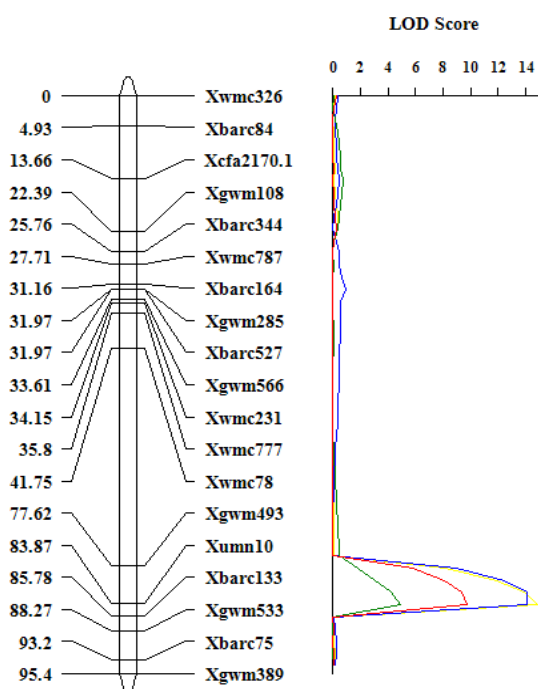
Le principali fonti di resistenza risultano genotipi asiatici, anche per via della lunga tradizione di *breeding* verso questo carattere in diverse regioni dell’Asia, ma fonti di rilievo provengono anche dall’America Latina e da germoplasma europeo (Buerstmayr et al., 2009). Tra tutti, i più noti e più efficaci (*major*) QTL, denominati *Fhb1* e *Fhb2*, sono stati localizzati rispettivamente sul braccio 3BS e sul 6BS della cultivar cinese Sumai 3 (Liu e Anderson, 2003); ad essi è imputato un effetto medio del 17-37% nella riduzione dei sintomi dell’FHB (resistenza del Tipo II). Il QTL maggiormente utilizzato a livello mondiale nei programmi di miglioramento genetico via MAS (Marker assisted selection) è l’*Fhb1* (syn. *Qfhs.ndsu-3BS*), quello risultato più efficace e che da solo permette una riduzione media della malattia del 20-25% (Pumphrey et al., 2007).

Altri 3 QTL (Anderson et al., 2007) sono stati identificati nella cultivar giapponese ‘Ning7840’, derivata da Sumai 3, anch’essa impiegata nel breeding, di cui uno sul 3BS, nella stessa regione del *Fhb1*, e gli altri due, aventi un effetto minore, sul 2BL e 2AS (Zhou et al., 2002). Due QTL sono stati invece localizzati nella cultivar CM-82036 ed in modo particolare il *Qfhis.ifa-5A*, sul 5AS, che sembra avere effetti paragonabili all’*Fhb1* (Buerstmayr et al., 2002, 2003a). Un'altra fonte è Wangshuibai, altra cultivar derivante dal germoplasma cinese, non collegata al Sumai3, in cui la presenza di QTL *minor* è stata rilevata sui cromosomi 2B, 3B, 4B, 5B e 7A

(Mesterhazy, 1997; Ban, 2000; Rudd et al., 2001). Anche nel germoplasma americano si sono trovate fonti di moderata resistenza (Tipo I), tra cui Frontana (sul 3AL e 5A), Encruzilhada dal Brasile (Ban, 2001; Mesterhazy, 1995; Singh et al 1997); Ernie e Freedom dagli Stati Uniti (Rudd et al., 2001).

Tra le varietà dell'Europa dell'Est ricordiamo "Prag 8" (Mentewab et al., 2000), Sincron, dove è stata identificata una resistenza di Tipo II sull'1DS (Ittu et al., 2000), Arina, caratterizzata da una resistenza moderata (Paillard et al., 2004), la linea ottenuta in Romania Fundulea 20R1 che ha più di un QTL con effetti moderati sui cromosomi 1B, 3A e 5A (Shen et al., 2003) e Renan, recante diversi QTL associati al 2A, 2BS e al 5AL (Badea et al., 2008; Buerstmyer et al., 2009). In sintesi, tre sono i QTL di frumento che attualmente conferiscono una protezione confermata nel tempo e nello spazio alla FHB; essi sono mappati sui bracci cromosomici 3BS (*Fhb1*) e 6BS (*Fhb2*) del frumento tenero Sumai3, e sul 5AS (*Qfhis.ifa-5A*) della cultivar CM-82036; fra di essi *Fhb1* è quello impiegato con maggior frequenza nei programmi di *breeding* (Anderson et al., 2007; Buerstmayr et al., 2009; Fig 6).

Figura 6: Esempio di localizzazione (3BS) del principale QTL (*Fhb1*) in frumento tenero ("Lod score" di diversi colori per gli anni 2010/2011/2012 e media-in giallo-; Cai J., 2012).



Come per il frumento tenero anche per il duro, vi è la necessità di trovare fonti di resistenza alla fusariosi. Nell'ambito di specie tetraploidi, presentano geni/QTL *FHBres* il *T. turgidum* subsp. *carthlicum* (Nevski) Á. Löve and D. Löve (Cai et al., 2005), il *Triticum dicoccum* ed anche il progenitore selvatico *Triticum dicoccoides*, nel quale sono stati individuati 2 QTL con effetti apprezzabili su 3AS e 7AL (Buerstmayr et al., 2009).

Il gene pool terziario (vedi § 1. 3), che comprende numerose specie selvatiche meno affini ai frumenti coltivati, è stato mostrato essere una fonte importante di geni/QTL di resistenza a fitopatie (Hajjar e Hodgkin, 2007); spesso, per l’FHB del frumento, tali geni sono risultati più efficaci di quelli identificati nel frumento e alcuni capaci di determinare un fenotipo quasi immune (Cai et al., 2005). Sono molti, infatti, gli esempi in cui la cromatina estranea contenente geni di resistenza all’FHB sono stati integrati con successo nei genomi di frumento (Shen et al., 2004; Cai et al., 2005; Chen et al., 2005 b; Oliver et al., 2005). Il più interessante è quello di Shen et al. (2004) che, valutando diverse linee di sostituzione e traslocazione frumento tenero/*Thinopyrum ponticum* ($2n = 2x = 70$) (accessione el2), hanno riscontrato una forte resistenza alla diffusione fungina nelle linee portatrici del cromosoma 7el2. Tale QTL è stato successivamente mappato nella porzione distale del braccio lungo del cromosoma 7el2 (Shen et al. 2007; vedi anche §1.5.1). Dal genere *Thinopyrum* derivano altri efficienti QTL localizzati sul braccio lungo del cromosoma 7E (Cai et al 2005; Oliver et al., 2005; Miller et al., 2011) e sul cromosoma 1E (Jauhar e Peterson, 2011) del *Th. elongatum* ($2n = 2x = 14$, EE). Da ricordare è anche la resistenza alla fusariosi rilevata sul braccio 1RS di segale (*Secale cereale* L., $2n = 2x = 14$, genoma RR). Diverse altre specie selvatiche sono risultate potenziali donatrici di geni di resistenza all’FHB, finora non associati a specifici cromosomi, tra cui *Elymus humidus* ($2n = 6x = 42$, SSHHYY), *Elymus racemifer* ($2n = 4x = 28$, SSYY), *Leymus racemosus* ($2n = 4x = 28$, JJNN) (Buerstmayr et al., 2009), alcune accessioni di *Th. intermedium* ($2n = 6x = 42$) e di *Th. junceum* ($2n = 6x = 42$) (Cai et al., 2005).

Anche verso ciascuna delle diverse ruggini sono stati identificati e mappati circa 50 geni di resistenza (McIntosh et al., 2008). Tuttavia, molti di tali geni, conferendo una resistenza “verticale” o razza-specifica, hanno perso la loro efficacia. Emblematico il caso già citato della nuova razza di ruggine nera Ug99 e dei suoi derivati (Jinet et al. 2007) (vedi § 1.2.2) che ha superato la resistenza conferita da geni presenti in varietà largamente coltivate, quali l’*Sr31* in Uganda (Pretorius et al., 2000) e l’*Sr24* e l’*Sr36* in Kenia (Jin et al., 2008, 2009). Molti studi vengono condotti per cercare di monitorare le cultivar di frumento resistenti alle nuove razze virulente (Liu et al., 2010; Ejaz M., 2012; Haile et al., 2012) ma molto si sta facendo per cercare di produrne di nuove. Mantengono per ora la loro efficacia verso nuovi patotipi virulenti geni come l’*Sr25* e l’*Sr26* che derivano, come l’*Sr24*, dalla specie selvatica *Th. ponticum* (Liu et al., 2010). Sebbene anche verso l’*Sr25* sia stato riportato di recente un inizio di virulenza in India (Jain et al. 2009), in generale geni di resistenza derivati da specie affini mantengono più a lungo la loro efficacia. E’ poi interessante notare che spesso tali geni sono localizzati in *cluster*, con specificità verso fitopatie diverse. E’ questo il caso dell’*Sr24* e *Sr25*, associati rispettivamente all’*Lr24* e all’*Lr19*, geni di resistenza alla ruggine bruna. Negli ultimi anni questi si stanno utilizzando in programmi di miglioramento anche in Italia, soprattutto per la elevata efficacia alla ruggine bruna (Ceoloni et al., 2005; Gennaro et al., 2009), tra i patogeni più ampiamente

distribuiti nel Paese. *Lr19* è un buon gene per il breeding del frumento duro per la sua associazione con il gene *Yp*, coinvolto nel controllo dei livelli di pigmento giallo dell'endosperma (vedi § 1.5.1). L'inserimento dell'*Lr19* in frumento duro e tenero, associato a segmenti cromosomici di *Thinopyrum ponticum* di varie dimensioni ha comportato per selezione indiretta la resistenza a *P. graminis* conferita dall'*Sr25*, e ciò risulta attualmente un punto di forza, soprattutto per quelle varietà derivate da costituzioni del CIMMYT, quali Oasis 86, coltivate in diversi Paesi in tutto il mondo (Ceoloni et al., 2013).

Con efficaci geni “esotici” si sta recentemente applicando la strategia del “*gene pyramiding*”, ovvero la combinazione di più geni di resistenza in un unico genotipo, attesa avere un effetto di maggiore durata nel tempo in quanto con minore spinta selettiva sul patogeno. E' questo il caso dei geni *major* derivanti dal *Th. ponticum* *Sr25* e *Sr26* (Liu et al. nel 2010), o di quelli *minor* quali *Sr2*, *Sr13* e *Sr9e* (Haile, 2012). Anche per le ruggini, come per la fusariosi della spiga, molta della variabilità genetica efficace è dunque reperibile nel vasto bacino genetico delle specie affini ai frumenti coltivati, Triticinae selvatiche e non (Cai et al., 2005; Wang, 2011).

Appartenendo però al *pool genico* terziario del frumento (vedi § 1.3) i loro genomi sono simili (omeologhi) ma non uguali ad esso e presentano livelli diversi di ploidia (da 2x a 10x); per procedere al trasferimento di caratteri utili sarà dunque necessario fare riferimento alla metodologia denominata “ingegneria cromosomica” che verrà di seguito descritta.

1.4 L'ingegneria cromosomica: strategia di scambio di informazione genetica tra frumenti coltivati e tra specie ad essi affini.

Per poter sfruttare proficuamente questa enorme risorsa genetica, quale è il germoplasma interspecifico ed intergenerico dei frumenti, il limite da superare sono le barriere genetiche tra le specie che rendono difficile il trasferimento di una o poche caratteristiche definite, che migliorino quelle del genoma ricevente (cultivars di frumento), senza alterarne stabilità e caratteristiche endogene positive (fertilità, produttività ecc.).

In effetti, l'incorporazione dell'intero genoma donatore, mediante la formazione di ibridi e raddoppiamento cromosomico (anfidiplodia), ha solo in pochi casi prodotto specie adatte alla coltivazione, quali il Triticale (anfidiplode sintetico derivante dall'incrocio tra il tetraploide *T. durum* e la segale diploide, *Secale cereale*). Sono risultate molto utili invece le numerose linee aneuploidi, tra cui linee di addizione o sostituzione di singole coppie cromosomiche di specie affini nel genoma di frumento, soprattutto tenero, (Feldman e Sears, 1981), linee mono e ditelosomiche, con un solo o una coppia di bracci cromosomici, e tutte le altre che sono state impiegate per innumerevoli studi citogenetici e genetici e per iniziare il processo di graduale riduzione del materiale genetico del donatore eccedente il gene *target*, che è poi lo scopo dell'

“ingegneria cromosomica”. Infatti, l’addizione o la sostituzione di interi cromosomi di specie pur affini ai frumenti è spesso associata ad effetti negativi (*linkage drag*).

Il termine “ingegneria cromosomica” venne coniato nel 1972 da E.R. Sears riferendosi all’insieme di metodologie citogenetiche che consentono di trasferire porzioni sub-cromosomiche contenenti geni utili nell’ambito dei genomi omeologhi della tribù delle Triticeae.

Tale strategia si basa sulla manipolazione genetica del complesso controllo della ricombinazione cromosomica alla metafase I meiotica nei frumenti poliploidi e nei loro ibridi interspecifici. Nei frumenti poliploidi, sia tenero che duro, esistono diversi geni implicati nella normale soppressione dell’appaiamento tra i cromosomi omeologhi appartenenti ai diversi genomi A, B, D (Sears, 1976). All’azione di tali geni, di cui il più potente è il *Ph1* (*Pairing homoeologous*), i frumenti devono il loro comportamento alla meiosi da simil-diploidi che, con la formazione di soli bivalenti tra coppie di cromosomi omologhi, ne ha garantito la regolarità meiotica, con la conseguente elevata fertilità e quindi il successo evolutivo (Feldman et al., 1995).

In effetti l’assenza del solo *Ph1*, ad eredità dominante e localizzato sul braccio lungo del cromosoma 5 del genoma B (Riley & Chapman, 1958; Sears & Okamoto, 1958), è sufficiente a permettere ai cromosomi omeologhi di appaiarsi e ricombinare, seppur con frequenza inferiore rispetto a quanto avviene tra omologhi. E’ risultato perciò di fondamentale importanza l’isolamento, sia in frumento tenero (Sears, 1977) che in duro (Giorgi, 1983), di mutanti al locus *Ph1*. Inoltre, sono state isolate linee mutanti ad altri loci di controllo dell’appaiamento meiotico dei cromosomi omeologhi; tra questi la linea *CSph2a*, ottenuta tramite irraggiamento (Sears, 1982), presenta una delezione sul cromosoma 3DS comprendente il locus *Ph2*. E’ stato dimostrato che la rimozione del gene *Ph2* induce un livello intermedio di appaiamento omeologo negli ibridi di frumento con specie affini, ma non ha effetti rilevanti sull’appaiamento dei cromosomi del frumento (come, invece, la mutazione per il *Ph1*) (Sears, 1977, 1982).

Tali mutanti rappresentano uno strumento essenziale per “accedere” ai genomi omeologhi di Triticinae e riuscire a perseguire l’obiettivo di trasferire nel materiale coltivato porzioni subcromosomiche estranee di entità quanto più possibile ridotta, così da minimizzare la probabilità che con il gene di interesse vengano co-trasferiti geni non desiderati della specie donatrice. In effetti l’ingegneria cromosomica, in confronto agli altri approcci originariamente proposti e utilizzati per ottenere il trasferimento genici interspecifici quali le radiazioni ionizzanti (Sears, 1956; Knott, 1961; Sharma & Knott, 1966) e la rottura e fusione spontanea di bracci cromosomici appartenenti a cromosomi soprattutto omeologhi (Mettin et al., 1973 e Zeller, 1973), appare senz’altro il sistema migliore per ottenere la massima “precisione di intervento”, sia in termini di quantità di materiale genetico estraneo trasferito che per la relativa specificità dei cromosomi interessati allo scambio.

L'obiettivo del trasferimento "minimo" può essere raggiunto progressivamente, nel corso di più generazioni, e comunque dipende anche dalla localizzazione cromosomica del gene/i *target*. Se il gene presenta una localizzazione distale, dove la frequenza di ricombinazione è più elevata, un singolo scambio può essere sufficiente a produrre cromosomi di frumento con brevi segmenti di DNA estranei in posizione telomerica o sub-telomerica. Se il gene estraneo è invece localizzato in posizione via via più prossimale, scambi singoli in prossimità del gene, oltre che meno frequenti (vedi ad es. Saintenac et al., 2009), porterebbero a cromosomi ricombinanti con parte porzioni "estrane" cospicue, spesso con problemi di *linkage drag*. Per ridurre ulteriormente la porzione di cromatina estranea si può ricorrere a ripetuti cicli di ricombinazione omeologa indotta tramite mutazioni al locus *Ph1*. Si è però constatato, in particolare nel frumento duro, che ripetuti cicli di ricombinazione tra cromosomi omeologhi possono provocare una destabilizzazione della meiosi, causando riduzione della fertilità dei tipi ricombinanti. In alternativa si può ricorrere alla combinazione di incrocio di due cromosomi ricombinanti (detti "primari"), ottenuti nella prima fase del lavoro, caratterizzati da una distribuzione "complementare" della cromatina di frumento e di quella estranea (Sears, 1983). Se i ricombinanti primari presentano il sito di scambio uno in posizione prossimale e l'altro in posizione distale rispetto al gene *target*, il gene oggetto del trasferimento si troverà nella porzione aliena comune (omologa) all'interno della quale potrà avvenire un *crossing-over* spontaneo, così da ottenere un segmento estraneo intercalare di dimensioni inferiori a quelle dei ricombinanti primari (Ceoloni et al., 2005b). Il risultato ottenuto sarà equivalente a quello prodotto in un doppio scambio (doppio *crossing-over*), evento estremamente raro tra cromosomi omeologhi anche in condizioni geneticamente permissive di mutazione del locus *Ph1* (Lukaszewski, 1995).

Molti sono gli esempi di lavori nei quali è stata impiegata la strategia dell'ingegneria cromosomica per introdurre nei frumenti coltivati caratteri di grande interesse da specie affini (Ceoloni, 1987; Friebe et al., 1996; Ceoloni et al., 2005a; Jauhar et al., 2009; Z. Niu et al., 2011).

I maggiori risultati in termini di *breeding* "assistito dall'ingegneria cromosomica" si sono raggiunti in frumento tenero, sia perché più estesamente coltivati nel mondo ma soprattutto in quanto il genoma esaploide ($2n=6x=42$) rispetto a quello tetraploide ($2n=4x=28$) dei duri manifesta una maggiore tolleranza verso alterazioni del genoma, soprattutto se di cospicua entità. E' a causa di ciò che risulta molto più difficile ottenere e mantenere linee aneuploidi di frumento duro rispetto alle possibilità che in tal senso offre, in numero e tipologia, il frumento tenero (Joppa, 1998; Ceoloni et al., 2005b). In alcuni casi, perciò, il trasferimento di materiale genetico estraneo è stato prima ottenuto nel frumento tenero, poi è stato selezionato un tipo ricombinante con la minima quantità di cromatina estranea per il trasferimento del gene desiderato anche in frumento duro (Ceoloni et al., 1996; Ceoloni e Jauhar, 2006). Tuttavia, più

recentemente, utilizzando opportuni strumenti di selezione (vedi avanti), si è riusciti ad applicare con successo l'ingegneria cromosomica direttamente al frumento duro, in questo trasferendo, anche in combinazione (Gennaro et al., 2007), brevi segmenti cromosomici contenenti geni di resistenza a patogeni (*Lr19* e *Pm13*) e per caratteristiche qualitative (*Glu-D3*, *Glu-D1* e *Yp*) provenienti da tre differenti Triticinae (*Triticum aestivum*, *Aegilops longissima* e *Thinopyrum ponticum*), senza alterare la stabilità del genoma del frumento duro ricevente.

1.4.1 Marcatori molecolari e ibridazione *in situ* come aiuto dell'ingegneria cromosomica

Negli ultimi dieci anni circa sono cresciuti enormemente gli studi sulle sequenze genomiche (NGS = Next generation sequencing) e le relative applicazioni portando al sequenziamento di interi genomi, anche molto grandi e complessi.

La possibilità di una tale accelerazione nella lettura e nell'assemblaggio delle sequenze di DNA è dovuta allo sviluppo di nuove strumentazioni ed anche di nuovi software in grado di assemblare numerosissime sequenze in contemporanea e di elaborare enormi quantità di dati informatici. La gestione di tali quantità di informazioni in banche dati elettroniche ad uso comune ha semplificato gli sforzi dei ricercatori di tutto il mondo rendendo accessibile a tutti, nell'ambito degli specifici studi, la fruizione di "informazioni genetiche" sui genomi delle più disparate specie viventi.

Per il frumento, ad esempio, nonostante la sua natura poliploide, l'applicazione di tecniche di NGS è risultata utile per l'individuazione di mutazioni SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Rajeev et al., 2009) fino ad arrivare, nel 2012, all'importante obiettivo del suo primo sequenziamento (Brenchley et al., 2012).

L'ampliamento delle conoscenze sul genoma favorisce, fra l'altro, la *marker technology*, accelerando la nascita e moltiplicando, in numero e tipologia, i marcatori molecolari necessari alla selezione e caratterizzazione genotipica in programmi di miglioramento genetico (MAS = *Marker Assisted Selection*). Oggi si dispone di un gran numero e tipi di marcatori molecolari associati ai geni/QTL di interesse. I primi marcatori molecolari messi a punto sono stati gli RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), che consentono di distinguere gli individui sulla base del polimorfismo dei frammenti di restrizione enzimatica del loro DNA. A questi è seguita una seconda "generazione" di marcatori, basati sulla reazione a catena della polimerasi (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) (Mullis, 1986). Questa tecnologia, rapida ed efficiente, ha fornito le basi per lo sviluppo quasi illimitato di marcatori molecolari e la loro ottimizzazione, come la conversione, previo sequenziamento, degli RFLP in STS (*Sequence Tagged Site*), lo sviluppo dei RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), degli ALFP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), dei microsatelliti o SSR (*Simple Sequence Repeats*). A questi, dopo la divulgazione *on line* di numerosi EST (*Expressed Sequence Tags*) (<http://wheat.pw.usda.gov/>), si aggiungono i più recenti EST-SSRs (EST = *Espressed Sequence Tag*) (Akunova et al, 2009;

Gadaleta et al., 2009) e la nuova classe di marcatori SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), utilizzati per lo sviluppo di mappe genetiche sempre più dense (Zhang et al., 2003; Chao et al., 2009).

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

Tutte le metodiche descritte consentono un'individuazione e caratterizzazione molto più efficiente ed accurata dei prodotti di trasferimento frumento-specie affini di quanto finora possibile, dando un aiuto importante all'ingegneria cromosomica. Ulteriore supporto deriva anche dalle metodologie di citogenetica molecolare, quali l'ibridazione *in situ* (es. FISH e GISH). L'evoluzione raggiunta, in termini di risoluzione e rapidità, nelle tecniche di ibridazione *in situ* (ISH), metodologia utilizzata per rilevare su preparati citologici l'ibridazione di un DNA (o RNA) sonda con il DNA cromosomico fissato sul vetrino, ha permesso una alta definizione cromosomica delle piante oggetto di miglioramento. Ormai da tempo per la ISH non si utilizzano sonde marcate radioattivamente (Gall & Pardue, 1969; John et al., 1969), ma sonde marcate mediante l'inserimento nella sequenza dell'acido nucleico (DNA) di un nucleotide modificato (spesso dUTP = deossiuridin-trifosfato), legato ad una molecola di biotina (vitamina H) o digossigenina (steroidi presente in natura nel genere *Digitalis*), oppure un fluorocromo (Leitch et al., 1994). In tal modo sono state superate le problematiche connesse all'utilizzo del radioattivo, tra cui la scarsa sicurezza, i lunghi tempi di esposizione e la bassa risoluzione del segnale emesso e si è acquisita la possibilità di utilizzare e rilevare sonde multiple (marcate con fluorocromi differenti) sullo stesso preparato e di riutilizzare quest'ultimo per successive ibridazioni (Cuadrado et al., 1997).

Per individuare il DNA di segmenti cromosomici, derivati da un genoma diverso da quello del ricevente, il sistema migliore è l'ibridazione *in situ* genomica (GISH), in cui come sonda si utilizza il DNA genomico della specie donatrice del frammento cromosomico trasferito (Anamthawat-Jonsson et al., 1990). La GISH (Genomic *in situ* Hybridization) non presenta differenze sostanziali dall'ISH con sonde specifiche (sequenze nucleotidiche di lunghezza definita), ma risulta in genere più efficace nella individuazione dei DNA di specie affini trasferiti tramite ingegneria cromosomica.

Anche se di più complessa applicazione quando si lavora sul materiale vegetale per la presenza della parete cellulare, il maggiore grado di condensazione dei cromosomi, e difficoltà di sincronizzazione del ciclo cellulare, l'ibridazione *in situ* è ad oggi una metodica largamente usata nell'identificazione di genomi, cromosomi o segmenti cromosomici, sia a livello intra- che inter-specifico (Ceoloni et al., 1996, 1998), di variazioni strutturali del genoma (delezioni, duplicazioni, traslocazioni o inversioni) e per studi di appaiamento meiotico (Cuadrado et al., 1997; Forte et al., 2011); è inoltre anche impiegata nell'analisi dell'organizzazione fisica dei

genomi e dei singoli cromosomi e nella relazione tra mappe fisiche e mappe genetiche (Biagetti et al., 1999; Gennaro et al., 2012).

1.5 Il genere *Thinopyrum* come fonte di geni utili

Con il termine inglese *wheatgrasses* si indicano, tra le graminacee selvatiche, le specie foraggiere più importanti delle regioni temperate del mondo (Asay e Jensen 1996a, b). Esse comprendono cinque generi della tribù delle Triticeae, ovvero *Agropyron*, *Pseudoroegneria*, *Psathyrostachys*, *Elymus*, *Leymus* e *Thinopyrum*, a morfologia molto variabile. Queste piante erbacee sono resistenti alla siccità, sono ottime fonti di foraggio e habitat per bestiame e animali selvatici, e sono apprezzate per il controllo delle infestanti, la stabilizzazione del suolo contro l'erosione ed anche per la regimentazione delle acque (Wang, 2011). Molte di queste specie sono state utilizzate come fonti di geni di resistenza alle malattie, tolleranza alla salinità e per altri caratteri in programmi di breeding di cereali coltivati tra cui frumento, orzo e segale. In frumento tenero e duro molti sono gli studi e gli obiettivi raggiunti (vedi, ad esempio, Knott 1989; Friebe et al., 1996; Ceoloni et al., 2005b; Qiet al., 2007; Jauhar et al., 2009; Ceoloni et al., 2013). Un contributo significativo, è stato senz'altro dato da specie appartenenti al genere *Thinopyrum* (Löve, 1982; Dewey, 1984). Il genere comprende un gran numero di specie perenni caratterizzate da una vasta gamma di livelli di ploidia, da diploidi a decaploidi (Tab. 3).

Tabella 3: Livelli di ploidia di specie del genere *Thinopyrum* (Dewey, 1984; Chen Q., 2005).

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

Le specie diploidi ($2n = 2x = 14$), *Th. elongatum* (sin. *Agropyron elongatum*, *Lophopyrum elongatum*) e *Th. bessarabicum* (sin. *Agropyron bessarabicum*), così come l'esaploide ($2n = 6x = 42$) *Th. intermedium* (sin. *Agropyron intermedium*, *Elytrigia intermedia*) ed il decaploide ($2n = 10x = 70$) *Th. ponticum* (sin. *Agropyron elongatum*, *Lophopyrum ponticum*, *Elytrigia pontica*) sono tra le specie più ampiamente utilizzate nel breeding del frumento. Negli ultimi 50 anni da tali specie sono stati trasferiti geni per resistenza a malattie (Li & Wang, 2009), a stress ambientali, come la salinità (Colmer et al., 2006), le alte temperature e la siccità (Li et al.,

2008), ma anche geni per la qualità (Liu et al., 2008), e perfino per caratteri legati alla produttività (Singh et al., 1998; Kuzmanovic et al., 2012).

Riguardo alla composizione genomica, si può considerare relativamente consolidata (Jauhar, 1990; Wang, 2011) l'assegnazione del genoma E (= Ee) a *Th. elongatum* e del genoma J (= Eb), simile ma non completamente omologo a E, a *Th. bessarabicum*; al contrario, la composizione genomica delle specie poliploidi è da tempo motivo di dibattito (Zhang et al., 1996; Chen et al., 1998; Chen Q., 2005; Wang R.R-C 2011). E' comunque opinione condivisa che un terzo genoma, denominato St o S, caratteristico del genere *Pseudoroegneria* e affine a E e J, sia presente in *Th. intermedium* e *Th. ponticum*. Le formule genomiche suggerite per tali specie includono EeEbSt e E1E2St oppure JJsS per *Th. intermedium*, e EeEbExStSt o JJJJsJs per *Th. ponticum* (Ceoloni et al., 2013).

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

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

1.5.1 Geni sul gruppo di omeologia 7 del genere *Thinopyrum*

Specie del genere *Thinopyrum* sono state utilizzate nel presente lavoro come fonte di diversi geni di resistenza, trasferiti in combinazione (*gene pyramiding*) in varietà di frumento tenero e duro tramite “ingegneria cromosomica”. Nello specifico, sia *Th. ponticum*, decaploide, che *Th. elongatum*, diploide, hanno fornito geni di interesse a questo progetto di dottorato.

Sebbene geni utili al miglioramento del frumento siano stati localizzati su gran parte dei cromosomi di specie del genere *Thinopyrum* (Wang, 2011), particolarmente ricco è risultato il gruppo cromosomico che presenta omeologia con il gruppo 7 dei cromosomi di frumento. Cromosomi delle due specie per questo sono stati variamente (e non sempre in relazione alla specie di origine) denominati 7Ag (Sears, 1973), 7el (Sharma & Knott, 1966; Knott et al., 1977) o 7E (Dvorak 1980).

Due di tali cromosomi, derivanti da due diverse accessioni della stessa specie *Th. ponticum*, sono stati indicati come 7el1 e 7el2. E' plausibile che si tratti di cromosomi omologhi, almeno sulla base del loro pressoché completo appaiamento meiotico (Dvorak, 1975; Forte et al., 2011). Quando introdotti in cultivar di frumento sotto forma di linee di sostituzione o traslocazione, i due cromosomi 7el presentano geni/fenotipi di resistenza diversi verso ruggine bruna e nera, ma entrambe possiedono geni determinanti la pigmentazione gialla della farina (*Yp*) e geni per la segregazione distorta (*Sd*) (Kim et al., 1993; Friebe et al., 1996). In relazione alla resistenza alla fusariosi della spiga, linee di frumento recanti l'uno o l'altro cromosoma 7el presentano fenotipi distinti: 7el1 è associato alla suscettibilità, mentre 7el2 conferisce resistenza (Shen & Ohm 2007; Zhang et al., 2011). Il cromosoma 7E (da *Th. elongatum*) reca anch'esso geni utili che determinano resistenza alla fusariosi della spiga (Shen e Ohm 2004) e alla ruggine nera (Xu et al., 2009a).

Una prima linea di traslocazione in frumento tenero, denominata T4 (= Agatha o K11695) (Fig. 8), ottenuta per irraggiamento (Sharma e Knott, 1966), contiene circa il 70% del cromosoma 7el₁ di una accessione di *Thinopyrum ponticum* sul braccio lungo del cromosoma 7D (7DL) di frumento tenero, cultivar Thatcher (Friebe et al., 1996). La linea fu scelta in quanto mostrava un fenotipo resistente alla ruggine bruna, per la presenza di un gene ad ereditarietà dominante denominato *Lr19*. Strettamente associato all'*Lr19*, la T4 porta un gene che influenza il colore giallo dell'endosperma delle semole chiamato *Yp* (Bournival et al., 1994) e, in posizione appena distale rispetto all' *Lr19+Yp* (Ceoloni et al., 2013), il gene *Sr25* di resistenza alla ruggine nera, ricordato essere tra i pochi geni efficaci contro la nuova razza di ruggine nera Ug99 (vedi §1.3.1).

Dato l'interessante contenuto genico della linea T4, si tentò di ridurre la lunghezza del braccio cromosomico 7el₁, per irraggiamento o attraverso ricombinazione omeologa, allo scopo di

ridurre l'effetto *linkage drag* ed eliminare i caratteri indesiderati, in particolare il gene *Yp* nel miglioramento del frumento tenero (Sears, 1972, 1973; Knott, 1980; Marais, 1992.).

Knott (1980) provò a raggiungere lo scopo mediante l'uso di agenti mutageni, ma il tentativo non ebbe pieno successo. Sears (1973), utilizzando l'assenza del cromosoma 5B e di conseguenza del gene *Ph1* in esso localizzato, indusse la ricombinazione tra il cromosoma 7el₁ ed i suoi omeologhi di frumento, ottenendo diverse linee ricombinanti, tutte coinvolgenti il 7D ad eccezione di una, chiamata Transfer 12, in cui il cromosoma di frumento ricombinante era il 7A (Eizenga, 1987). Tutte le linee ottenute da Sears mostravano però il carattere giallo delle farine (Sears, 1978), che, come detto, le rendeva non adatte ad un uso pratico nel miglioramento del frumento tenero

D'altra parte, la stretta associazione tra *Lr19* e *Yp* poteva risultare molto utile per il miglioramento genetico del frumento duro per l'incremento del pigmento nelle semole e nella pasta. Quest'ultimo carattere, determinato dall'aumento del contenuto di carotenoidi nell'endosperma del seme, rappresenta un requisito estetico importante per la maggioranza dei consumatori e conferisce anche un valore aggiunto in termini di salute, vista l'attività antiossidante di tali molecole (Adom et al., 2003); proprio per questo motivo recentemente è stato rivalutato anche per aumentarne il contenuto nelle farine, derivati del frumento tenero (Ravel et al., 2013).

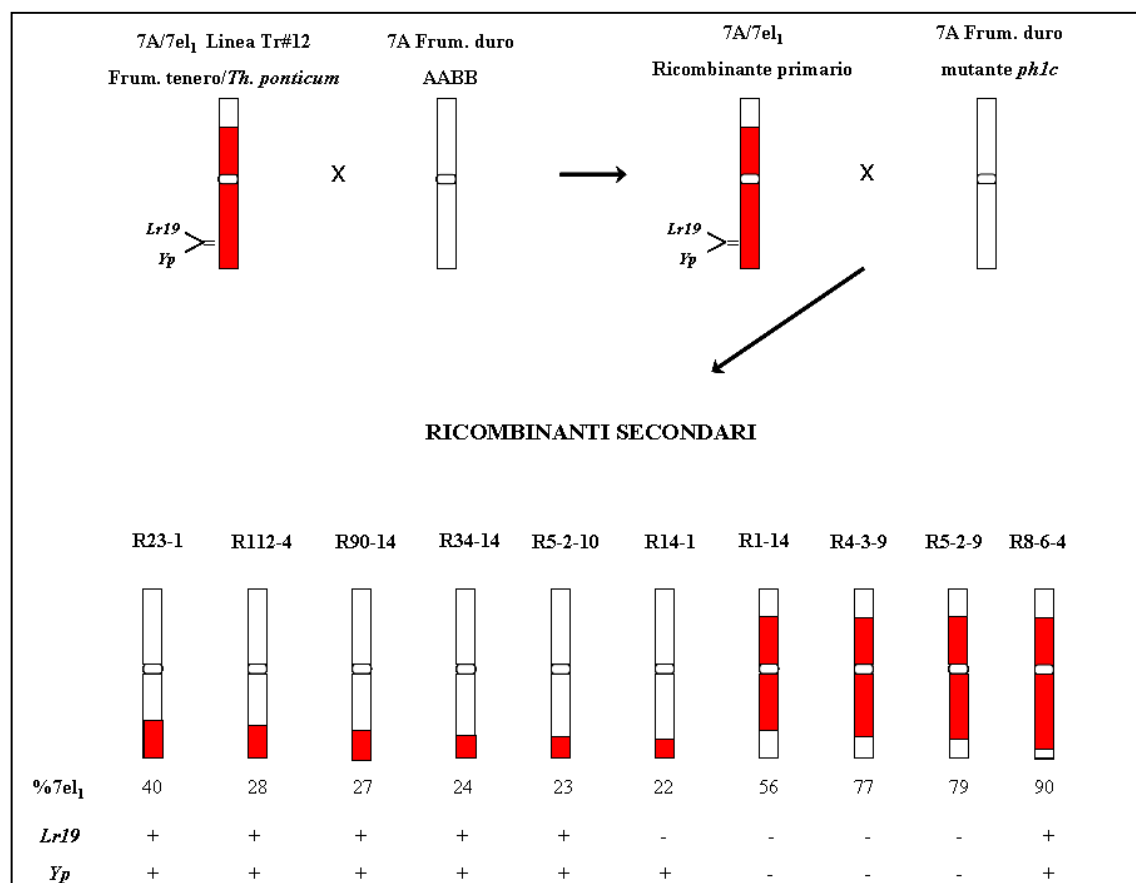
Il trasferimento combinato dei suddetti geni nel frumento duro è stato realizzato dal Laboratorio di Citogenetica vegetale presso l'Università della Tuscia. A tale scopo, tra tutte le linee ottenute per ricombinazione omeologa indotta (con l'uso del gene *ph1*), la linea denominata Transfer 12 (=Tr#12) sembrò la più adatta in quanto cromosomi portava su un cromosoma 7A la porzione di 7el₁ con i geni di interesse, *Lr19+Yp* (Sears, 1973; 1978; Eizenga, 1987).

Tuttavia si riscontrò che piante tetraploidi eterozigoti per il cromosoma 7A/7el₁ ("ricombinante primario"), ottenuto dall'incrocio di Tr#12 con un frumento duro, non davano omozigoti per il cromosoma ricombinato nella progenie di autofecondazione (Ceoloni et al., 1996). Analisi GISH mostrarono che, in realtà, la quantità di cromatina di *Th. ponticum* trasferita era in quantità maggiore rispetto a quanto stimato precedentemente da Sears (1973, 1978), interessando tutto il braccio lungo e quasi la metà del corto del cromosoma 7A (7AS/7el₁, 7el₁). Il cromosoma ricombinato della linea Tr#12 non si trasmetteva quasi per nulla attraverso la linea germinale maschile quando inserito in frumento duro, confermando la minor tolleranza alle alterazioni cromosomiche del suo genoma tetraploide ($2n=4x=28$) rispetto a quello esaploide del frumento tenero ($2n=6x=42$).

Per ridurre la porzione cromosomica 7el₁L, il ricombinante "primario" fu incrociato e re incrociato con il mutante *ph1* del frumento duro Creso (linea CD35) (§ 1.4) e dalla ricombinazione così promossa tra cromosomi omeologhi sono stati ottenuti dieci ricombinanti "secondari" 7el₁L/7AL con minor quantità di 7el₁ rispetto al ricombinante primario (Ceoloni et

al., 2005a). Tramite GISH (§ 2.2.3), si è rilevato nei diversi cromosomi 7el1L/7AL delle varie linee ricombinanti un contenuto di 7el1L pari ad un minimo del 22% fino al 90% del braccio 7AL (Fig. 7; Ceoloni et al., 2005a).

Figura 7: Ottenimento di ricombinanti di frumento duro recanti porzioni di diversa entità del cromosoma 7el1 di *Th. ponticum*.



Il confronto tra i diversi ricombinanti, distinti rispetto al loro fenotipo resistente/suscettibile alla ruggine bruna, ha consentito la localizzazione del gene *Lr19* nella porzione del 25% più distale del braccio lungo del 7A ricombinante, e precisamente nella porzione che differenzia i ricombinanti R5-2-10 (23% di 7el1L, resistente) ed R14-1 (22% di 7el1L, suscettibile).

I risultati ottenuti dalle indagini citogenetiche (GISH) per la precisa caratterizzazione fisica dei cromosomi ricombinanti, e dall'uso di un'ampia gamma di marcatori molecolari, hanno permesso la realizzazione di una fine mappa citogenetica dei cromosomi 7A-7el1 (Fig. 8; Gennaro et al., 2010; Kuzmanovic 2011). La linea R5-2-10, contenente il più piccolo frammento cromosomico 7el1 ancora contenente i geni *Lr19*+*Yp*+*Sr25*, è stata la prima ad essere utilizzata nel breeding. In effetti, da sue progenie di incrocio con frumenti duri italiani, soprattutto la varietà Simeto, è stata ottenuta una nuova varietà denominata Cincinnato, recentemente iscritta (2010) al Registro Varietale Italiano.

Oltre agli efficaci geni di resistenza (*Lr19* e *Sr25*), indagini condotte in pieno campo dal CIMMYT in diversi ambienti e per diversi anni su linee quasi isogeniche (NILs) contenenti la traslocazione T4 (70% di 7el1L sul 7DL) nel background di diversi frumenti teneri hanno suggerito la presenza di uno o più QTL (qui denominato *Yld-7el1*, vedi Fig. 6) che influenzano positivamente la produttività. 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). Studi recenti ed ancora in corso si stanno conducendo su NILs di alcune linee ricombinanti 7AL-7el1L di frumento duro, cioè R23-1, R112-4 e R5-2-10 (vedi Fig. 6 e 7), che, avendo diverse porzioni del 7el1L presente in T4 candidata potrebbero, fra l'altro, permettere una migliore definizione della localizzazione di possibili vari QTL per produttività. Tali materiali si stanno quindi impiegando in prove comparative in campo ed i primi risultati confermano un generale effetto positivo sulle rese, ma anche effetti specifici associati a differenti sub-regioni del 7el1L (Kuzmanovic et al., 2012).

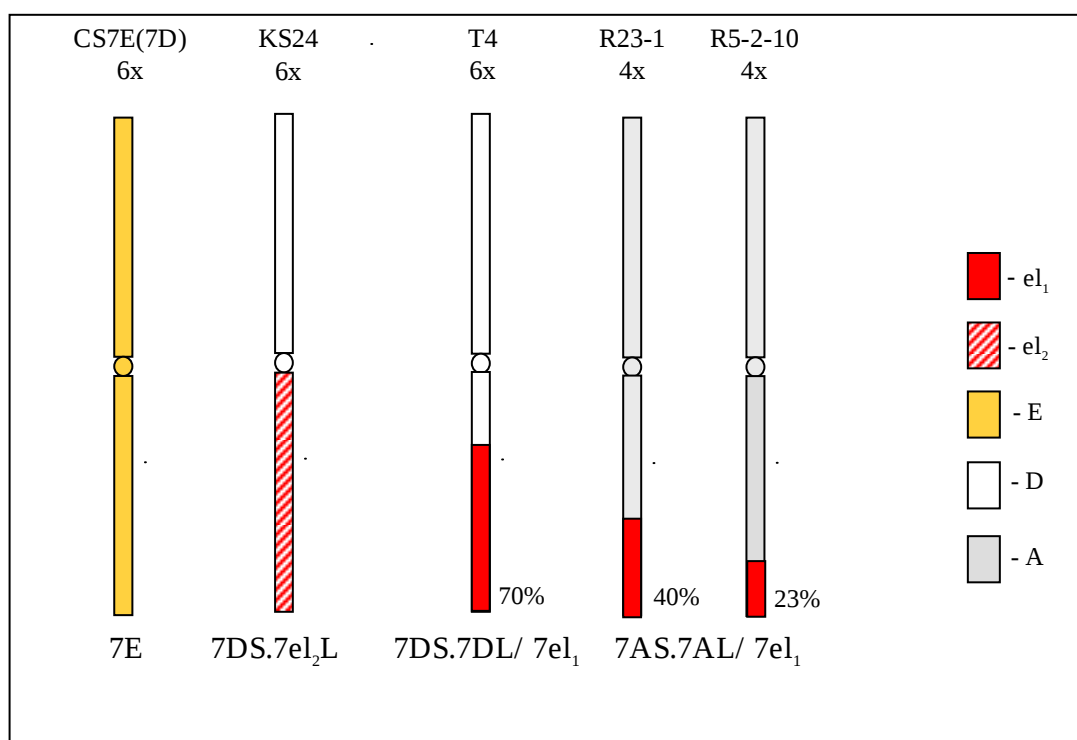
La validazione dell'efficacia del gene *Sr25*, comunque presente nelle linee di duro ricombinanti in quanto associato all'*Lr19*, verso la pericolosa razza Ug99 è chiaramente dedotta dalle pubblicazioni in merito che validano la sua presenza grazie a studi di risposta alle infezioni fungine (dove autorizzate) ed all'associazione con marcatori molecolari (Liu et al., 2010).

Come già detto, mentre esistono poche fonti di resistenza all'FHB reperibili nel germoplasma dei frumenti coltivati, nuove fonti sono state individuate in differenti accessioni della stessa specie di *Thinopyrum ponticum* (2n=70) che contiene i geni *Lr19* e *Yp*, risultata invece suscettibile all'FHB, ed in un'altra specie dello stesso genere, il *Thinopyrum elongatum* (2n=14) (Shen e Ohm, 2004, 2006). Appare molto interessante, per la finalità del "pyramiding", la localizzazione del *Fhb*QTL sul cromosoma 7el₂ (così designato per distinguerlo dal 7el₁ dell'accessione di *Thinopyrum ponticum* che porta *Lr19*, *Sr25* e *Yp*) posizionato in zona subtelomerica del braccio lungo (Shen e Ohm, 2007); resta, invece, ancora sconosciuta la posizione del QTL per *FHB*res lungo il braccio lungo del cromosoma 7E del diploide *Th. elongatum*. Diverse sono le linee di sostituzione e traslocazione che potevano essere utilizzate per il trasferimento; per il *Th. ponticum*: varie linee di traslocazione ottenute nella cultivar Thatcher denominate KS10-2 (7el₂S.7el₂L-7DL), KS24-1 (Fig. 9), KS24-2 e KS23-9 (7DS.7el₂L) (Kibirige-Sebunya e Knott, 1983); per *Th. elongatum*: la linea di addizione CS7E (2n =44) (Dvorak e Knott, 1974) e la linea di sostituzione CS7E (7D) (Dvorak, 1980), entrambe nella cultivar di frumento tenero Chinese Spring. (Fig. 9). Le linee KS10-2 ed KS24-1 risultano portatrici del gene *Sr43* di resistenza alla ruggine nera, anch'esso efficace contro la razza TTKS (Friebe et al., 1996; Xu et al., 2009a) come anche è risultata resistente la linea CS7E per un gene non classificato (Xu et al., 2009a).

La possibilità di trasferimento dell'informazione genetica si basa sul riconoscimento alla meiosi dei cromosomi omologhi/omeologhi e del loro appaiamento propedeutico alla ricombinazione;

per questo sono stati studiati, nelle diverse linee, i diversi gradi di affinità meiotica dei cromosomi $7e_1$ verso $7e_2$ ed $7e_1$ verso $7E$. Mentre tra i cromosomi $7e_1$ $7e_2$ delle due accessioni del decaploide l'appaiamento alla meiosi avveniva nella quasi totalità dei casi (omologia pressoché totale) (Dvorak, 1975, Knott, 1977; Forte et al., 2011), per il diploide verso il decaploide ($7E$ - $7e_1$) la percentuale di appaiamento risultava essere intorno al 13% dei casi (Dvorak, 1975). Su questa base, al fine di aumentare la probabilità di appaiamento e di scambio tra i cromosomi $7E$ e $7e_1$, è possibile adottare strategie di induzione “soft” alla ricombinazione omeologa, tramite l’uso di mutanti di frumento tenero al locus *ph2a* (vedi § 1.4). Quindi piramidare i geni *Lr19+Sr25+Yp+FHBres* è apparso un obiettivo possibile tramite ingegneria cromosomica e selezione con marcatori molecolari per il $7A/7e_1$ (Gennaro et al., 2010; Ayala- Navarette et al., 2007) e il $7D/7e_2$ (Shen e Ohm, 2007) (Kuzmanovic et al., 2011), sia nel caso dei cromosomi $7e_1$ - $7e_2$ che del $7E$ - $7e_1$ (Dvorak, 1975, Knott, 1977; Kibirige-Sebunya. and Knott, 1983; Shen and Ohm, 2006, 2007). Nel corso del presente progetto di ricerca si sono arricchite ulteriormente con nuovi marcatori, EST e SSR, le mappe genetiche in frumento tenero e duro delle linee di traslocazione e sostituzione parentali e dei nuovi ricombinanti ottenuti, in special modo per la linea di sostituzione CS7E(7D) ed i suoi derivati, caratterizzandone, tramite ibridazione in situ genomica, le entità dei diversi segmenti cromosomici introgressiti.

Figura 9: Linea di sostituzione, traslocazione e linee ricombinanti, esaploidi e tetraploidi utilizzate nel progetto di pyramiding nel corso del dottorato.



Accanto a tanti geni utili, varie specie del genere *Thinopyrum*, tra cui il *Th. ponticum*, sono risultate portatrici di geni, indicati con la sigla *Sd* (= Segregation distortion), che in ibridi con altre specie, tra cui il frumento, portano ad una segregazione distorta (SD), ovvero ad una deviazione dalla normale segregazione mendeliana attesa in una popolazione segregante. Gli eventi di segregazione distorta possono essere il risultato di una competizione gametofitica, derivante dalla fecondazione preferenziale o, al contrario, dall'aborto dei gameti maschili o femminili o dello zigote che recano cromosomi con tali geni. In effetti, gli elementi genetici che causano la SD, presenti un po' in tutti gli eucarioti, potrebbero essere potenti forze evolutive, in termini di differenziazione delle specie e di riorganizzazione del genoma (Hurst, 1993; Taylor e Ingvarsson, 2003).

Geni *Sd* sono stati identificati in molte Triticinae selvatiche che manifestano i loro effetti per lo più sulla gametogenesi maschile in ibridi parziali o completi con frumento (Faris et al., 1998). All'interno del genere *Thinopyrum*, sembra esservi tra le specie poliploidi un certo grado di conservazione a livello del gruppo cromosomico 7 nel portare geni *Sd*; ne sono un esempio il *Th. intermedium* (Kong et al., 2008) e il *Th. ponticum* (Kibirige-Sebunya & Knott 1983; Scoles & Kibirige-Sebunya 1983; Prins & Marais, 1999; Cai et al., 2011).

Il braccio 7elL delle accessioni el1 ed el2 di *Th. ponticum* contengono uno o più geni *Sd*. Le prime osservazioni furono fatte su piante eterozigoti per il 7el2 o porzioni di questo le quali manifestavano una trasmissione preferenziale del 7el2 rispetto al cromosoma 7D del frumento attraverso la linea germinale femminile (Kibirige-Sebunya & Knott, 1983). L'entità della distorsione risultò essere dipendente dal *background* genetico delle diverse varietà di frumento in cui il 7el2 o sue porzioni erano trasferite. Osservazioni simili sono state fatte sulla linea T4, sul cui 7el1 è stato inizialmente localizzato, in posizione prossimale al gene di resistenza *Lr19*, il gene *Sd1*, la cui azione SD sembra essere il risultato di effetti negativi sul gametofito maschile (Knott, 1971; Marais, 1992; McIntosh et al., 1995). Curiosamente, riducendo progressivamente il segmento della T4 mediante ripetuti cicli di ricombinazione omeologa, è stato rilevato un effetto opposto rispetto a quello del gene *Sd* sul 7el2, con l'*Sd1* in grado di determinare una più o meno forte auto-eliminazione, ovvero mancata trasmissione di cromosomi portatori del gene (Prins e Marais, 1999; Marais et al., 2001; Groenewald et al., 2005). Da ciò si è presupposto che i segmenti più piccoli avessero perso il gene *Sd1* (Zhang e Dvorak, 1990) o qualche altro fattore presente sul segmento el1 iniziale, in grado di interagire con il primo e di modificarne l'effetto (Marais et al., 2001).

L'effetto di uno o più geni *Sd* è stato anche osservato in alcune delle linee ricombinanti frumento duro-*Th. ponticum* portatrici di *Lr19+Yp*; in particolare, il cromosoma ricombinante 7A/7el1 della linea R23-1 (ma anche di altre linee con quantità maggiori di cromatina el1; vedi Fig. 7 e 8) mostra un basso tasso di trasmissione attraverso la linea germinale maschile (Ceoloni et al., 2005a). Dal confronto della mappa genetica della R23-1 con quelle di cromosomi di

frumento tenero indicati come portatori del gene *Sd1* (Marais et al., 2001) era stata inizialmente esclusa la presenza dell'*Sd1* nel cromosoma ricombinato della R23-1. Tuttavia, la localizzazione di *Sd1* rimane controversa (Groenewald et al., 2005; Cai et al., 2011) e, d'altra parte, non sembra da escludere la presenza di più di un gene *Sd* sul braccio lungo dei cromosomi 7el di *Th. ponticum*. Le evidenze comunque confermano che, anche se con effetti quantitativamente diversi a seconda delle varietà riceventi, la porzione distale del 7elL come quella presente nella linea R23-1 ma non nella R112-4 o R5-2-10 quando inserita in frumento duro determina non solo una segregazione difettiva del cromosoma ricombinato, ma anche vari effetti negativi sul fenotipo, inclusa una generale instabilità e, riguardo a parametri di produttività, uno striminzimento delle cariossidi e, a volte, difetti di germinazione (Grossi, 2010; Kuzmanovic, 2011).

1.6 Scopo del lavoro

Le parole chiave che manifestano lo scopo del lavoro intrapreso sono: *gene pyramiding*. L'espressione esprime sinteticamente l'obiettivo da raggiungere quello cioè di combinare più geni di resistenza, ed altri caratteri d'interesse, in frumenti coltivati, teneri e duri, attingendo, la necessaria variabilità genetica entro determinate specie del germoplasma selvatico delle Triticinae, Famiglia delle Poaceae (pool genico terziario). Il genere *Thinopyrum*, offre nell'ambito di più specie (nello specifico *Th. ponticum* ed *Th. elongatum*), una ampia serie di efficaci geni di resistenza (Friebe et al., 1996; Cai et al., 2005; Hajjar e Hodgkin, 2007) a importanti patologie fungine quali le ruggini e la fusariosi della spiga, entrambe oggetto di studio del presente progetto di ricerca.

La localizzazione di tutti i geni di interesse sul braccio lungo del gruppo di omeologia del cromosoma 7 delle specie selvatiche (7el₁ e 7el₂, due accessioni del *Th. ponticum*, e 7E di *Th. elongatum*), precedentemente trasferiti in linee ricombinanti e di sostituzione di frumento tenero e duro (vedi § 1.5.1) ha rappresentato un'ottima premessa per la pianificazione di un programma di *gene pyramiding*.

I principali obiettivi che il presente lavoro ha perseguito possono essere così riassunti:

- 1, 2) Ottenimento di linee ricombinanti di frumento tenero e duro in cui fossero contemporaneamente presenti il gene *QTLFhbres7el₂*, presente originariamente nella KS24, linea ricombinante di frumento tenero (7DS.7el₂), ed i geni *Lr19*, *Sr25* e *Yp*, localizzati su porzioni del 7el₁L inserite nella linea di traslocazione tenero T4 (7DS.7DL-7el₁L) e in varie linee ricombinanti di duro (R23-1, R112-4, R5-2-10);
- 3) Ottenimento di linee ricombinanti di frumento tenero in cui fossero contemporaneamente presenti il gene *QTLFhbres7E*, presente originariamente nella CS7E(7D), linea di sostituzione di frumento tenero, ed i geni *Lr19*, *Sr25* e *Yp*, localizzati sulla porzione del 7el₁L inserite nella linea di traslocazione tenero T4 (7DS.7DL-7el₁L);
- 4) Studio citogenetico della frequenza di appaiamento (alla Metafase I meiotica di cellule madri del polline delle diverse progenie F1) dei diversi cromosomi omeologhi del gruppo 7 (7el₁, 7el₂, 7E, 7A e 7D) e quindi della stima del numero di ricombinanti ottenibili per ciascuno dei progetti di combinazione genica;
- 5) Caratterizzazione citogenetica e molecolare delle linee ricombinanti per l'arricchimento delle mappe genetiche e per una migliore conoscenza di genomi delle Triticeae, ma anche allo scopo di individuare le linee più adatte ad una utilizzazione nel miglioramento dei frumenti coltivati.
- 6) Verifica fenotipica della resistenza a FHB, sia per una validazione definitiva di marcatori riportati essere associati al QTL sul 7el₂L, sia per verificare l'efficacia di entrambi i *QTLFHBres* (del 7el₂ e del 7E) verso ceppi di *Fusarium* italiani.

Materiali e metodi

2.1 Materiali

2.1.1 Materiali vegetali

I materiali vegetali scelti per il progetto di combinazione in linee di frumento tenero e duro di più geni utili derivanti dalle due specie *Th. ponticum* (accessione el₁ ed accessione el₂) e *Th. elongatum* sono state essenzialmente linee di ricombinazione, di traslocazione e di sostituzione (vedi § 1) in cui il cromosoma 7, del genoma A e/o D di frumento, recava quantità differenti di cromatina extraspecifica oppure era stato completamente sostituito (Fig. 9).

Frumento tenero

Le linee esaploidi scelte perché portatrici dei geni QTLFHBres (7el₂ e 7E) sono state:

- la KS24, che è uno dei prodotti di introgressione del 7el₂ in frumento tenero (Kibirige-Sebunya e Knott, 1983, vedi § 1.5) e porta l'intero braccio lungo (7el₂L) al posto del 7DL nel background cv. Thatcher (7DS.7el₂L, Fig. 9). La linea risulta suscettibile alla ruggine bruna (Knott et al., 1977) e resistente alla FHB (Shen e Ohm, 2007);

- la CS7E(7D) in cui la coppia cromosomica 7D della cv. Chinese Spring è stata sostituita da quella 7E (Dvorak, 1980) e risulta resistente alla fusariosi della spiga (Shen e Ohm, 2006).

Viceversa la linea di frumento tenero scelta come donatrice dei geni di resistenza alle ruggini è stata:

- la linea T4 (Dvorak and Knott, 1977) che, come descritto in precedenza (§ 1.5), reca, sul braccio 7DL, circa il 70% del braccio 7el₁L contenente i geni *Lr19*, *Yp* e *Sr25* e uno o più QTL per produttività (background cv. Thatcher).

La varietà Blasco, attualmente tra le più coltivate in Italia, è stata quella utilizzata come ricevente nel programma di combinazione genica in frumento tenero.

Le progenie derivanti dall'incrocio del F1(KS24 x T4) x cv. Blasco e le relative F2 ed F3 sono state oggetto di selezione genotipica con marcatori molecolari (MAS), caratterizzazione in situ ed infezione con *Fusarium spp.*, degli individui valutati essere omozigoti per il cromosoma ricombinato.

La linea mutante CSph2a/ph2a, ottenuta tramite irraggiamento (Sears, 1982), che presenta una delezione sul cromosoma 3DS al locus del gene *Ph2* di controllo dell'appaiamento meiotico dei cromosomi omeologhi (§ 1.4), è stata utilizzata nei programmi di incrocio con alcune F1[CS7E(7D) x T4] e/o con ciascuna delle linee parentali per favorire ulteriormente l'appaiamento omeologo ed aumentare la frequenza di ricombinazione tra i cromosomi 7E ed 7DS.7DL/7el₁.

Frumento duro

Le linee di frumento duro scelte in quanto portatrici dei geni di resistenza alle ruggini sono state:

- le linee R5-2-10, R112-4 e R23-1 (Ceoloni et al., 2005) che presentano rispettivamente circa il 23%, il 28% e il 40% di cromatina 7el₁, portatrice dei geni *Lr19*, *Yp* e *Sr25*, nella regione distale del braccio lungo del cromosoma 7A.

La varietà coltivata Ariosto è stata quella utilizzata come ricevente nel programma di combinazione genica in frumento duro.

Per la resistenza alla fusariosi, la linea donatrice del QTL *FHBres7el₂* è la KS24, la stessa scelta per il trasferimento nel frumento tenero.

La progenie F1 pentaploide (KS24 x R23-1 /R112-4/ R5-2-10) incrociata con la cv. di frumento duro Ariosto è stata oggetto di screening e caratterizzazione per l'isolamento degli individui ricombinanti sul braccio cromosomico 7AL (7AL-7el₁/7el₂) che recavano i geni di interesse. Da questa progenie, come anche da una piccola progenie F2, sono stati isolati ricombinanti cromosomici primari (R85, R129-A, R129-B); dall'incrocio del ricombinante primario R85 (*FHBres7el₂/Lr19/Yp/Sr25*) con le linee di duro parentali R112-4 e R5-2-10 (*Lr19/Yp/Sr25*) sono stati isolati altri due ricombinanti cromosomici secondari (R193 e R216).

Tabella 4: Linee ricombinanti di frumento tenero e duro recanti porzioni di 7elL di *Th. ponticum* rispettivamente sui bracci 7DL e 7AL ; linea di sostituzione *Th. elongatum* in cui la coppia 7E sostituisce la coppia di frumento tenero 7D.

Linea ricombinante	2n	%7el/E	<i>Lr19</i>	<i>Sr25</i>	<i>FHB</i>
T4	42	70 (el1)	+	+	-
R23-1	28	40 (el1)	+	+	-
R112-4	28	28 (el1)	+	+	-
R5-2-10	28	23 (el1)	+	+	-
KS24	42	100 (el2)	-	-	+
CS7E(7D)	42	100 (E)	-	-	+

2.1.2 Sonde per ibridazione *in situ*

Per gli esperimenti di ibridazione *in situ* genomica (GISH, vedi § 2.2.3), sono state utilizzate come sonde i DNA genomici totali di *Th. ponticum* e di frumento tenero e duro.

2.1.3 Marcatori molecolari

Sono stati utilizzati microsatelliti o SSR (Simple Sequence Repeats), STS (Sequence Tagged Site) e EST (Expressed Sequence Tag) localizzati sul braccio lungo dei cromosomi del gruppo di omeologia 7 di frumento. Per la genotipizzazione delle progenie di frumento tenero ottenute dall'incrocio (KS24 x T4) x Blasco e relative F₂, e per quelle derivanti dall'incrocio (KS24 x R5-2-10 o R23-1) x Ariosto, la scelta dei marcatori è stata basata sulla loro capacità di rilevare non solo un polimorfismo frumento/*Th.ponticum* (7D/7el o 7A/7el), ma anche tra le due accessioni di *Thinopyrum ponticum* (7el₁/7el₂) almeno nelle regioni contenenti i geni *target*. Tali marcatori erano in parte già mappati presso lo stesso laboratorio lungo i cromosomi ricombinanti 7AL-7el1L (Kuzmanovic, 2011; Ceoloni 2013), in parte sono stati aggiunti nel corso del presente lavoro.

La caratterizzazione genotipica delle progenie esaploidi derivanti dai diversi schemi di incrocio della F₁(CS7E(7D) x T4) con cv. di frumento tenero o con la linea CS, mutante al locus di controllo dell'appaiamento dei cromosomi omologhi (*CSph2a/ph2a*), è stata condotta con marcatori capaci di rilevare sia polimorfismi frumento/*Th. elongatum* (sempre tra il gruppo di omeologia del cromosoma 7) che tra le due specie *Th. elongatum/Th. ponticum* (7E/7el₁). Nel corso della tesi di dottorato sono stati mappati tutti i marcatori utilizzati.

Per i marcatori SSR e EST-SSR, quelli utilizzati in questo rientrano nelle seguenti serie:

- serie GWM, mappata da Röder et al. (1998) e Wang et al., (2002) su una popolazione segregante derivata dall'incrocio tra due linee di frumento tenero, Synthetic (=W7984) e Opata 85.
- serie PSP, mappata su una progenie F₂ di una popolazione Chinese Spring x Synthetic e riportata da Stephenson et al. (1998); le sequenze dei primers sono consultabili presso le pagine internet <http://wheat.pw.usda.gov/>.
- serie BARC, sviluppata da J Song et al.(2005) mediante una libreria BAC della cv. Chinese Spring; le sequenze dei primers sono consultabili presso le pagine internet <http://wheat.pw.usda.gov/>.
- serie WMC, sviluppata nell'ambito dell'International Wheat Microsatellite Mapping Network e riportata in Gupta et al. (2002).

- serie CFA, sviluppata da Sourdille et al. (2001) e mappata geneticamente e fisicamente tramite linee di delezione di frumento (Somers et al., 2004; Sourdille et al., 2004); le sequenze dei primers sono disponibili presso le pagine internet <http://wheat.pw.usda.gov/>.
- serie MAG, prodotta da sequenze EST di frumento da Xue et al. (2008); le sequenze dei primers sono disponibili presso <http://wheat.pw.usda.gov/>.
- serie CFE , sviluppata dal confronto di sequenze EST di frumento con altri cereali da Chen et al (2005).
- serie EDM , sviluppata da sequenze EST di frumento da Mullan et al., (2005).

Due marcatori del tipo STS sono stati sviluppati presso questo laboratorio per individuare sequenze associate al gene di resistenza *Lr19* (Prins et al., 2001; Gennaro et al., 2009) ed all'*Yp* (Gennaro et al., 2010) . Essendo entrambi codominanti, consentono la discriminazione fra le forme alleliche 7AL e 7el1.

Il marcatore del tipo STS derivante da EST associato alla famiglia genica *WheatMeiosis 1* (*WM1.1*) ed al locus del gene di controllo dell'appaiamento *Ph2a* (*Intermedium pairing o Ipm*), localizzato sul cromosoma 3DS di frumento tenero, è stato sviluppato da Whitford et al., (2007). Alcune coppie di primers (EST)-SSRs utilizzati sono stati prodotti nel nostro laboratorio a partire dalle sequenze EST di frumento disponibili in banche dati. I primers sono stati disegnati usando una strategia il sistema ISP (Intron Spanning Polymorfism) che individua sequenze polimorfiche nelle regioni non codificanti utilizzando primers che sono stati disegnati sulle regioni sulle regioni fiancheggianti l'introne di interesse(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (<http://ricegaas.dna.affrc.go.jp/>)(http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (Gennaro, 2006).

Tutte le altre coppie di primers (EST)-SSRs sono state individuate tra le serie pubblicate da altri gruppi (Ayala-Navarette et al., 2007; Zhang et al., 2005, Zhang et al., 2011).

In tabella 5 sono elencati i marcatori impiegati nel corso del dottorato per la caratterizzazione genotipica delle progenie di ciascun progetto di *gene pyramiding*.

Tabella 5: Marcatori molecolari utilizzati nel corso del progetto di dottorato per la caratterizzazione genotipica e per la costruzione di una mappa genetica 7el e 7E (le informazioni relative alla posizione di mappa sono ottenibili da <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>.)

Marcatore molecolare	Tipo	Polimorfismo	Ta (°C)
BARC76	SSR	7AL, 7DL, 7el ₁ , 7el ₂	55
BARC121	SSR	7AL, 7DL, 7el ₂	55
BARC172	SSR	7D, 5B, 7AL	58
BARC184	SSR	7D, 7el ₂	58
BARC1075	SSR	7DL, 7el ₁	55
CFA2040	SSR	7AL, 7BL, 7DL, 7el ₂	52
CFA2240	SSR	7AL, 7DL, 7el ₁ , 7el ₂	56
GWM 111	SSR	7D, 7el ₂	55
GWM 282	SSR	7AL, 7EL	55
GWM344	SSR	7AL, 7EL	55
PSP3123	SSR	7DL, 7el ₂	60
WMC273	SSR	7AL, 7BL, 7DL, 7el ₂	51
WMC488	SSR	7AL, 7DL, 7el ₁	61
WMS 333	SSR	7BL, 7el ₂	55
WMS471	SSR	7AS, 7ES	60
WMS573	SSR	7BS, 7ES	50
PSR680	RFLP SSR	7BL, 7el ₁ , 7el ₂	52
PSR129	RFLP	7AL, 7el ₁ 7el ₂ , 7el ₂	60
	CAPS HaeIII		
Lr19 ₁₃₀ (<i>Lr19</i>)	STS	7el ₁	58
AG15 _{F4R1R5} (<i>Lr19</i>)	STS	7AL,7el ₁	62
AG15- ₆₀₀	STS	7el ₁	58
Psy1 (<i>Yp</i>)	STS CAPS DraI	7AL,7el ₁ , 7EL	56
WM1.1C2 (<i>WM1.1/Ph2a</i>)	EST-STS	3DS	57
CFE166	EST-SSR	7AL, 7BL, 7DL, 7el ₁ , 7el ₂	55
EDM16	EST-SSR	7AL, 7EL	Dec.60-50
EDM105	EST-SSR	7AL, 7EL	Dec.60-50
BE405003	EST-SSR	7AL, 7el ₁ , 7EL	55
BE445653	EST-SSR	7AL, 7BL, 7DL, 7el ₁ , 7el ₂	52
BF145935	EST-SSR	7AL, 7DL, 7el ₁ , 7el ₂ ,7EL	64
BF200943	EST-SSR	7DL, 7el ₁	62
BF473789	EST-SSR	7DL	59
BG607810	EST-SSR	7AL, 7BL, 7DL, 7el ₂	58
MAG32	EST-SSR	7BL, 7el ₁ ,7EL	52
MAG528	EST-SSR	7AL, 7el ₁	55

2.2 Metodi

2.2.1 Metodi di estrazione del DNA e stima della concentrazione

2.2.1.1 Estrazione del DNA genomico

La metodica utilizzata per l'ottenimento del DNA genomico totale (Tai et al., 1990) è stata quella applicata per il recupero del DNA usato come soprattutto come sonda per l'ibridazione in situ genomica ma anche come DNA stampo nella PCR.

Il protocollo di estrazione prevede l'omogeneizzazione di tessuto fogliare verde, 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 o da porzione di foglia

Per accelerare le selezioni genotipiche dei numerosi individui progenie, in fasi molto precoci dello sviluppo della pianta, è stato utilizzato un protocollo di estrazione del DNA con tempi di esecuzione brevi effettuato sulle prime foglie emesse (come anche da sfarinato di piccole porzione di cariossidi). Il procedimento seguito è basato su quello descritto da Dellaporta et al., (1983).

La porzione di ciascun fogliolina previamente prelevata (circa 1-2 cm) viene posta in una eppendorf da 1,5 ml insieme a 250µl di tampone di estrazione (Tris 100 mM pH 8, EDTA 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, SDS 1.25%) e pestellata viene ridotta in poltiglia; vengono poi aggiunti altre 450 µl di tampone di estrazione (700µl totali) e quindi la miscela è messa ad incubare per 30' a 65°C, agitando vigorosamente ogni 10'. Successivamente, alla provetta vengono aggiunti 200 µl di una soluzione 5 M di potassio acetato e, dopo aver agitato vortexando, il campione viene lasciato per 1h in ghiaccio. Trascorso questo tempo, i campioni vengono centrifugati per 20' a 13000 rpm e a 4°C. Il sopranatante recuperato, viene 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), il DNA viene recuperato tramite precipitazione facendolo “pellettare” in centrifuga per 15' a 13000 rpm a T ambiente (RT). Le provette sono state svuotate invertendole; poi vengono aggiunti ad ogni campione circa 300 µl di Etanolo al 70% (Wash buffer), poi di nuovo centrifugati per 5' a 13000 rpm, eliminato l'etanolo e lasciati asciugare i DNA pellets fino alla completa evaporazione del liquido residuo. Il DNA di ogni campione è stato infine disciolto in un volume di 100 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. Questo metodo è efficace e preferibile nel caso di quantità esigue di DNA (come il caso dell'estrazione da porzione di foglia). 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. 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)

Le condizioni utilizzate per l'amplificazione dei diversi marcatori molecolari del tipo SSR, STS e EST-SSR fanno riferimento, in linea generale, a quelle descritte nel protocollo di Roder et al. (1998) adattate, di volta in volta, alle necessità di amplificazione rilevate in corso d'opera.

La tecnica del "gradient-PCR" è stata adoperata per la ricerca della temperatura di appaiamento ottimale per le coppie di primers saggiate per la prima volta, con l'intento di riuscire nell'amplificazione ideale di sequenze polimorfiche adatte ad individuare le varie forme alleliche dei loci di interesse.

L'elenco dei marcatori utilizzati, insieme alle relative temperature di annealing stabilite sono descritti in tabella 5 . <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>

Per tutti i marcatori il volume di reazione PCR usato è stato di 10 µl e consisteva di: 1 X PCR Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200µM dNTP mix (Promega), 200 nM di ogni primers (forward e reverse), 0.35U of *Taq* Polymerase (Amersham, cat# 270799), and 20-40 ng of target DNA. Solo nel caso del Ag15_{F4R1R5} le concentrazioni ideali sono risultate essere di 150nM per il primer AG15_R1, 300 nM per AG15_R5 e di 500 nM per AG15_F4.

Per la selezione genotipica, su larga scala, della popolazione progenie è stata usata la GoTaqR Green Master Mix (Promega, cat#M7112) che ha permesso di abbreviare i tempi di lavoro. 5 µl di GoTaqR Green Master Mix 2X (2X Reaction buffer pH 8,5, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP e 3mM MgCl₂) sono stati usati, su 10 µl totali, mentre la concentrazione di ciascun primer è stata sempre 200 nM .

Le condizioni di amplificazione sono state simili per molti marcatori molecolari, mentre per alcuni sono state necessarie delle modifiche specifiche: in tabella 6 vengono schematizzati i requisiti di amplificazione.

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), con concentrazioni variabile da 1,5% fino al 3%. Sono stati utilizzati sia agarosio di tipo normale che MetaPhor®(Cambrex Bio Science, Rockland Inc., USA) quest'ultimo ad alta risoluzione, in grado di discriminare differenze di poche paia di basi. Il rilevamento infine, è stato effettuato, dopo corsa elettroforetica, tramite colorazione con etidio bromuro (0.5 µg/ml). L'immagine agli UV è stata acquisita tramite il software KODAK 1D.

Tabella 6: Condizioni di amplificazione in reazioni PCR dei diversi tipi di primers / marcatori utilizzati (Ta = temperatura di *annealing*, variabile a seconda del marcatore).

Marcatore	Tipo	Stage 1		Stage 2			Stage 3		
		94°	94°	Ta	72°	N°cicli	72°		
Lr19 ₁₃₀	STS	5’	30’’	40’’	30’’	35	5’		
Psy1 _{F5R1-2}	STS	5’	30’’	40’’	30’’	35	5’		
AG15 _{F4R1R5}	STS	3’	30’’	40’’	30’’	35	5’		
AG15 ₆₀₀	STS	3’	30’’	40’’	40’’	35	8’		
SSR	WMC, GWM, CFA, BARC, PSP, PSR.	5’	30’’	30/40’’	30/40’’	35	5’		
EST-SSR	BE, BF, BG, CFE, MAG.	5’	30’’	30/40’’	30’’	35	5’		
		Stage 1	Stage 2		N°		Stage 3		N°
			Ta=Dec.1°/cicli		cicli				cicli
		94°	94°	Ta	72°	94°	Ta	72°	
EST-SSR	EDM	5’	30’’	45’’	30’’	10	30’’	45’’	30’’
									30

2.2.3 Ibridazione in situ

2.2.3.1 Ibridazione in situ: considerazioni generali

La tecnica citogenetica adottata per rilevare l'introggressione di porzioni cromosomiche dalle specie selvatiche del genere *Thinopyrum* nelle nostre linee di frumento è quella dell'ibridazione *in situ* genomica (GISH) che, utilizzando come sonda il DNA del genoma della specie da cui deriva il segmento cromosomico trasferito, individua e caratterizza l'entità fisica della cromatina estranea sul cromosoma di frumento (Ananthawat-Jónsson et al., 1990; Schwarzbacher et al., 1992).

Il processo di ibridazione interspecifica/intergenomica prevede l'allestimento di preparati citologici (vetrini), su cui sono stati fissati i cromosomi (in Metafase mitotica o meiotica) dei frumenti "riceventi" le porzioni cromosomiche delle specie selvatiche i cui DNA genomici, marcati con fluoro croma, viceversa vengono utilizzati come sonde. Affinché l'appaiamento tra DNA sonda e DNA cromosomico (target) avvenga solo nell'assoluto livello di omologia (*Thinopyrum spp.* versus *Thinopyrum spp.*) evitando fenomeni di "cross ibridazione" tra sequenze simili, presenti nei genomi delle Triticinae affini (*Thinopyrum spp.* versus *Triticum spp.*), è stata scelta una specifica tipologia di ibridazione in situ denominata "Preannealing-GISH". Secondo questo metodo, il DNA del genoma di frumento viene impiegato come "seconda sonda", ovverosia viene comunque marcato, sebbene con un diverso fluoro cromo rispetto al DNA della "prima sonda" (specie selvatica). Prima di apporre le due sonde sul vetrino avviene, in provetta, la fase del "pre-annealing" in cui le sequenze di DNA comuni, alle

due sonde di DNA genomico totale, si associano e vengono così “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-Jönsson e Reader; 1995).

2.2.4. Ottenimento preparati citologici

2.2.4.1 Tecnica per l'esame di cromosomi mitotici

La metodica ha permesso la visualizzazione e la caratterizzazione fisica delle diverse tipologie cromosomiche ricombinanti, delle piante parentali e delle progenie.

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 da 4 ore a tutta la notte 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 sincronizzazione e di arresto, gli apici vengono trasferiti in una soluzione 3:1 di alcool etilico e acido acetico (Carnoy) per almeno qualche ora o per 4-6 giorni a temperatura ambiente. In tale soluzione il materiale vegetale può essere conservato a 4°C per diversi mesi o per tempi più lunghi a -20°C, avendo cura di sostituire periodicamente il Carnoy.

- **Preparazione dei vetrini:** l'allestimento dei vetrini destinati all'ibridazione in situ prevede un trattamento di rimozione o digestione della parete cellulare allo scopo di favorire l'accesso della sonda di DNA genomico verso i cromosomi fissati su vetrino.

Per la preparazione gli apici radicali sono stati prelevati dalla soluzione di conservazione (Carnoy) e posti in una soluzione di aceto carminio all'1% - di cui metà volume è carminio acetico commerciale al 2% e l'altra metà acido acetico al 45%) per 1h massimo 2h a temperatura ambiente. Al termine del trattamento di digestione gli apici, posti su vetrino copri oggetto, vengono immersi in una goccia di soluzione di acido acetico 45% e, avvalendosi dello stereo microscopio, vengono forati con aghi di siringa e picchiettati in modo da favorire la fuoriuscita delle cellule del meristema apicale, che sono in attiva divisione cellulare. Le cellule in sospensione liquida sono state poi coperte con un vetrino copri - oggetto, e di nuovo picchiettate, passate su fiamma e pressate manualmente in modo da ridurre le sovrapposizioni tra le cellule e tra i cromosomi e portare tutto su di uno stesso piano di messa a fuoco microscopica. Infine le cellule vengono fissate ponendo il vetrino su una lastra di ghiaccio

secco(CO₂ solida) per 5 minuti o immergendolo in azoto liquido. Dopo aver congelato il preparato, viene fatto saltare il copri oggetto ed il vetrino viene sottoposto a due lavaggi in acido acetico al 45% : uno rapido a temperatura ambiente e l'altro di 3 minuti a 50°C; poi lasciato asciugare all'aria. A questo punto il vetrino può essere utilizzato per la GISH o conservato +4°C (o a -20°C per periodi più lunghi) fino al momento dell'uso.

2.2.4.2 Tecnica per l'esame di cromosomi meiotici

Questa tecnica ha permesso di valutare il grado e il tipo di appaiamento dei cromosomi ricombinati alla metafase I del processo meiotico delle piante F1 derivanti dalle differenti strategie di incrocio.

- **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 reciso 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 meiotica. Il culmo reciso, quindi è stato tagliato con l'aiuto di una lancetta, così da raggiungere la spiga ed effettuarne il prelievo. La spiga può essere fissata in Carnoy per essere conservata o si può procedere subito all'estrazione delle antere ed in tal caso la spighetta viene posizionata in una capsula Petri aggiungendo acqua distillata. Con l'aiuto di ago e lancetta si provvede all'estrazione delle antere, 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. Da ogni spighetta si recuperano in genere tre 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.

- **Preparazione dei vetrini per l'ibridazione :** il protocollo di preparazione dei vetrini è identico a quello precedentemente descritto per gli apici radicali anche se la lavorazione dell'antere richiede una maggiore delicatezza nello schiacciamento per ottenere il giusto grado di spargimento dei meiociti e dei cromosomi in essi contenuti. Inoltre sono minori le probabilità di individuare le fasi di divisione cellulare desiderata (metafase I) aumentando il numero di campioni da esaminare e limitando spesso il numero di vetrini idonei per l'analisi di appaiamento in situ.

2.2.5.1 Preparazione delle sonde

- Frammentazione e marcatura 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 10 e le 12 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 o tenero il nucleotide modificato biotina-11-dUTP (cat#R0081, Fermentas) e per la marcatura del DNA genomico di *Th. ponticum* e la digossigenina-11-dUTP (cat#11093088910, 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. 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:

Tabella 7. Miscela per la marcatura con digossigenina e biotina tramite Nick Translation

Composto	Volume	Conc. Finale
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
DNA (10-12 Kbp)	µl variabili (1 µg)	20 ng/µl
H2O 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% circa 2-3 μ l della reazione di marcatura. La reazione viene terminata mediante denaturazione degli enzimi per 10' a 65°C o con l'aggiunta di 1 μ l di EDTA 0,5 M pH 8. Il DNA marcato viene purificato tramite apposite colonnine (NucleoSpin® Extract II, Macherey-Nagel) seguendo il protocollo del produttore oppure tramite precipitazione in etanolo a -20°C e Potassio acetato 3M e successiva sospensione in acqua del pellet del DNA sonda.

2.2.6.1 Protocollo di ibridazione genomica in situ

2.2.6.1.2 Pretrattamenti dei preparati citologici

Trattamento con RNAsi: si elimina, tramite digestione enzimatica, l'RNA cellulare che potrebbe funzionare da bersaglio aspecifico per le sonde marcate. 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 bollire 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 μ g/ml. 100 μ l di tale soluzione vengono posti su ciascun vetrino, coperto con copri oggetto di plastica ed incubato in camera umida poi per 30' a 37°C. Trascorso tale tempo, i vetrini sono lavati due volte per 2' in 2xSSC a 37°C ed una volta in 0.1XSSC a r.t. per 2 minuti;

fissazione con paraformaldeide: dopo i lavaggi i vetrini vengono trattati con una soluzione acquosa di paraformaldeide al 4% (w/v) che nel nostro caso otteniamo sciogliendo 2g di polvere in 50 ml di acqua distillata. Per consentire la solubilizzazione, la soluzione viene portata a 60°C e addizionata di 500 μ l di una soluzione di NaOH 4 N. Il pH viene poi portato alla neutralità con l'aggiunta di 500 μ l di 10xPBS (tampone fosfato salino, 1.3 M NaCl, 70 mM Na₂HPO₄, 30 mM NaH₂PO₄). 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;

trattamento con formammide (FA): solo in caso di Preanniling-GISH, i vetrini vengono immersi per 2' a 70°C in una soluzione al 70% di FA in 2XSSC preriscaldata;

disidratazione: si realizza sottoponendo i vetrini ad una serie di bagni in alcool etilico a concentrazione crescente (2 volte in alcool 70% per 2', 2' in alcool 90% e 2' in alcool al 100%), facendoli poi asciugare all'aria.

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

Quantità equivalenti di entrambe i DNA genomici totali, previamente preparati in qualità di sonde (vedi Nick Traslation), vengono aggiunte in provetta a specifici componenti della miscela di ibridazione atti a coadiuvare il processo di ibridazione; la composizione viene di seguito riportata:

Tabella 8: Miscela di ibridazione

Soluzione (Conc.iniziale)	Quantità/vetrino	Concentrazione Finale
Solfato di destrano 50%	8 µl	10%
20xSSC	4	2x
SDS (10% in acqua)	1 µl	0.25%
Sonda	100 ng (di ciascuna sonda)	
H ₂ O q.b.	-	-
Volume totale della mix	40 µl/vetrino	-

La miscela con le sonde viene denaturata 5' a 99°C e immediatamente dopo messa a 58°C per 30' (pre-annealing). Terminato il processo in provetta la miscela viene dispensata sui vetrini, coperta con coprioggetto in vetro ed i vetrini posti a 63°C per 2 ore, in condizioni di buona umida, per il processo di ibridazione.

2.2.6.1.4 Lavaggi post-ibridazione.

I lavaggi post-ibridazione permettono l'eliminazione dell'eccesso delle sonde non ibridate e la rottura di legami aspecifici tra sonde e DNA cromosomico. Dopo la rimozione del copri-oggetto, i preparati sono lavati due volte per 5' in 2xSSC alla stessa temperatura di ibridazione e poi incubati a 37°C per 20'. Infine sono lavati per 5' a 37°C in 4xSSCTween (0,2% di Tween in 4xSSC).

2.2.6.1.5 Rilevamento indiretto

Avendo effettuato una marcatura indiretta delle sonde (con nucleotidi marcati non direttamente legati a fluorocromi) per poterle visualizzare i vetrini vengono sottoposti ad un trattamento con specifici anticorpi coniugati a fluorocromi.

Sui vetrini vengono messi 100 µl di una soluzione saturante di BR (Blocking reagent) al 1% in 4xSSC/ Tween, per 5' a temperatura ambiente.

Rimossa la soluzione in eccesso si pone 50 µl di BR 1% in 4xSSC/Tween contenente 20µg/ml di "anti-digoxigenina-FITC" (Roche,code11207741910) e 2.5µg/ml di "Cy3-streptavidina" (Amersham, code PA43001). Si appone il copri-oggetto di vetro e si tiene a 37°C, in camera umida, per 1h. L'isotiocianato di fluoresceina, FITC, caratterizzato da una fluorescenza nel verde ($\lambda=525$ nm) rileverà la sonda marcata con digossigenina mentre l'avidina - Cy3 che

emette nel rosso ($\lambda=570$ nm) individuerà la sonda marcata con biotina. I vetrini al termine dell'incubazione sono sottoposti a tre lavaggi, da 5' l'uno, in 4xSSC /Tween a 37 °C.

Per la colorazione della cromatina “di fondo” (controcolorazione) è stato usato il DAPI (4',6-diamidino-2 fenilindolo), contraddistinto da fluorescenza blu ($\lambda=450$ nm). A tale scopo sono posti 25 μ l di Antifade (Vector H 1000 Vectashield), un composto che consente di preservare più a lungo la fluorescenza, in cui viene precedentemente disciolto 0,5 μ l di DAPI (200 μ g /ml; conservato a -20 °C).

I vetrini sono nuovamente chiusi con coprioggetto di vetro e messi al buio a -20 °C, prima dell'osservazione al microscopio ad epifluorescenza.

2.2.6.1.6 Microscopia ad epifluorescenza ed acquisizione computerizzata delle immagini

L'osservazione e lo studio dei vetrini ibridati vengono condotti su microscopio ad epifluorescenza (Leica DM5000).

I siti di ibridazione vengono visualizzati scegliendo gli opportuni filtri per epifluorescenza dedicati a ciascun fluoro cromo impiegato, utilizzando appositi obiettivi ad olio per immersione che non diano interferenze. La colorazione del materiale nucleotidico dovuta al DAPI, che si intercala alle basi adenina e timina, mette in evidenza tutto il materiale cromatinico permettendo, già a basso ingrandimento, l'individuazione delle cellule di interesse.

A causa della rapida perdita del segnale, dovuta all'esposizione alla luce di eccitazione, i preparati non sono studiati direttamente al microscopio. Le immagini delle cellule selezionate, infatti, sono captate tramite un sistema di acquisizione e analisi di immagini, composto da una telecamera raffreddata ad alta sensibilità e risoluzione SPOT collegata al microscopio, ed un computer per l'elaborazione e l'analisi delle immagini catturate dalla telecamera, procedure eseguibili in tempi successivi all'esperimento. L'acquisizione, l'elaborazione e l'archiviazione delle immagini sono state effettuate mediante vari software, rispettivamente tra cui ImageJ e Picasa, che funzionano in ambiente Windows.

2.2.7 Allevamento delle piante

I materiali vegetali oggetto del presente studio sono stati allevati, secondo le necessità in condizioni climatiche controllate in cella di crescita, in tunnel ed in serra.

L'allevamento in celle climatiche ha consentito di allevare almeno due generazioni per anno. Dopo la germinazione dei semi a 20-22° in germinatoio questi vengono messi in vasetti a circa 15-18°; dopo l'attecchimento le piantine vengono poste per almeno 15gg a 4°C per favorirne l'accestimento; poi vengono trapiantate ed allevate per circa un mese e mezzo 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, ed in seguito allevate, per 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.

2.2.8 Esecuzione degli incroci e autofecondazioni

Per prevenire l'autoimpollinazione in spighe destinate all'incrocio, si procede all'emasculazione delle spighe già fuoriuscite dalla foglia bandiera nel momento in cui le antere sono ancora verdi e gli stigmi immaturi ma con la piumetta già leggermente aperta. Di norma l'emasculazione viene eseguita sui primi tre fiori di ciascuna spighetta la cui epoca di fioritura è pressoché contemporanea come d'altra parte sicura la fertilità.

Per 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 polline viene applicato sugli stigmi delle piante precedentemente emasculate. Viceversa le autofecondazioni vengono assicurate, dato che la specie è quasi completamente cleistogama, incappucciando le spighe prima della maturazione delle antere.

2.2.9 Infezione e analisi della resistenza all’FHB

2.2.9.1 Preparazione dell’inoculo di *Fusarium* spp.

Il mix di ceppi di *Fusarium* spp., isolato in campo in val padana, è stato sub-culturato su piastre con SNA (Urbane et al., 2002), terreno contenente 0,1% KH₂PO₄, 0,1% KNO₃, 0,1% MgSO₄ · 7 H₂O, 0,05% KCl, 0,02% glucosio, 0,02% saccarosio, 2% bactoagar (Difco) e addizionato di 200 ppm di biotina e 200 ppm di tiamina. Altresì il mix di ceppi di *Fusarium* spp è stato sviluppato, in forma di micelio, su terreno colturale Potato Dextrose Agar (PDA, Fluka) contenente glucosio, estratto di patata ed agar eccellente per il mantenimento di *Fusarium* spp.

I conidi sono stati recuperati dalle piastre SNA di coltura (a circa un mese dall’inoculo) grattando la superficie con una spatola e il materiale risospeso in una quantità variabile (microlitri) di acqua distillata sterile. La concentrazione è stata stimata mediante l’ausilio di una camera di Thoma ed un microscopio ottico e la sospensione conidiale è stata portata alla concentrazione d’uso di 1000 conidi in 20 µl (50 conidi/ µl) (Bai et al., 2001). Per una migliore adesività dell’inoculo, alla sospensione viene aggiunto 0,05% di TWEEN 20.

2.2.9.2 Inoculazione e test di virulenza su spiga

I test di valutazione fenotipica del grado di resistenza alla fusariosi della spiga (tipo II = blocco della progressione della patologia in seguito ad infezione, vedi § 1.2.2), sono stati condotti sulle

piante progenie, di frumento tenero e duro, in cui sono stati infettati i genotipi ricombinanti portatori delle diverse forme alleliche (e_{l_1}/e_{l_2}) ai loci noti essere associati al QTL per resistenza a FHB, anche sulle varietà di controllo (cv. Blasco e CS per i teneri e Duilio per i duri) e sulle linee parentali di incrocio (KS24, T4, CS7E(7D), R112-4, R5-2-10). Per ogni genotipo sono stati infettati una media di 5 piante per linea (minimo 3). Le piante sono state inoculate nella fase di antesi (stadio Zadoks 6, Zadoks et al., 1974; vedi figura 11) iniettando la sospensione di conidi (20 μ l) con una micropipetta dentro il primo o secondo fiore delle opposte spighe medio centrali della spiga prescelta. È stata infettata solo una spiga per pianta, in genere quella corrispondente al culmo principale (Fig. 10).

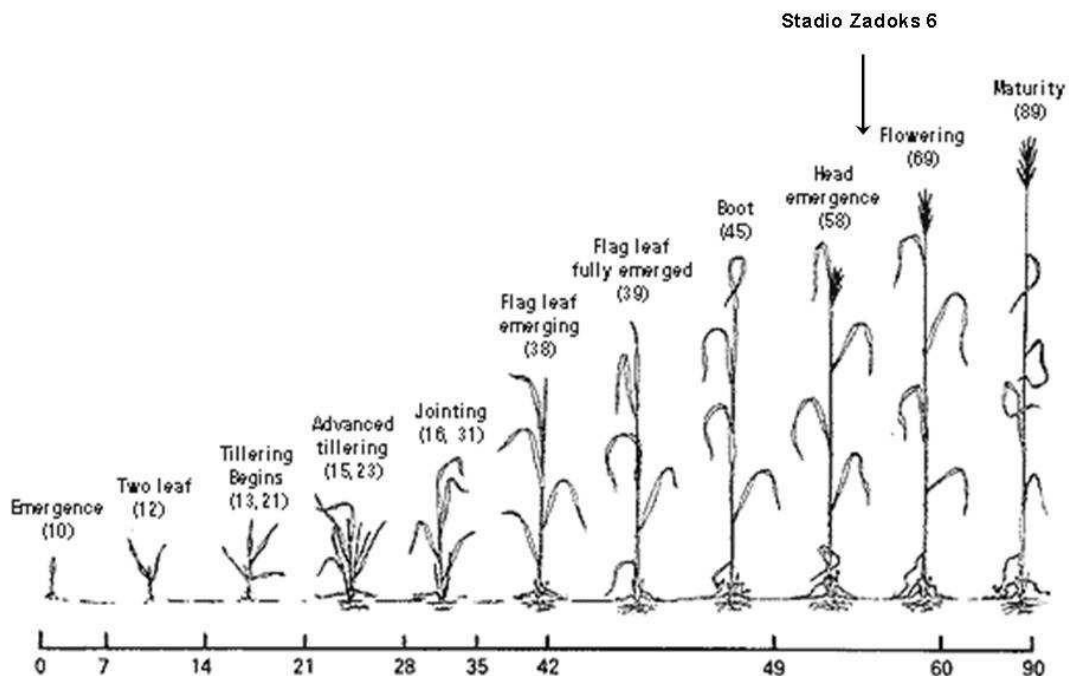
Figura 10 Inoculazione su spiga della sospensione conidica di *Fusarium* spp.



Dopo l'infezione le spighe sono state inumidite tramite nebulizzazione con acqua e racchiuse in un sacchetto di plastica bagnato all'interno (Fig.10), per mantenere un'elevata umidità e così favorire lo sviluppo del fungo. Il sacchetto è stato rimosso 48 ore dopo l'inoculo e le piante sono state mantenute per tutto il periodo in cella climatica a 22°C di giorno e 18°C di notte.

Il grado di virulenza è stato calcolato come percentuale di spighe infette in ogni spiga (NDS), determinato a cadenza settimanale fino a 21 giorni dalla data di inoculo.

Figura 11: Ciclo vegetativo del frumento, tra parentesi è indicato lo stadio vegetativo Zadoks sotto il tempo necessario per passare da uno stadio vegetativo all'altro. Tratta da: <http://www.extension.umn.edu/distribution/cropsystems/DC2548.html>. È indicata la fase fenologica in cui è stata condotta l'infezione.



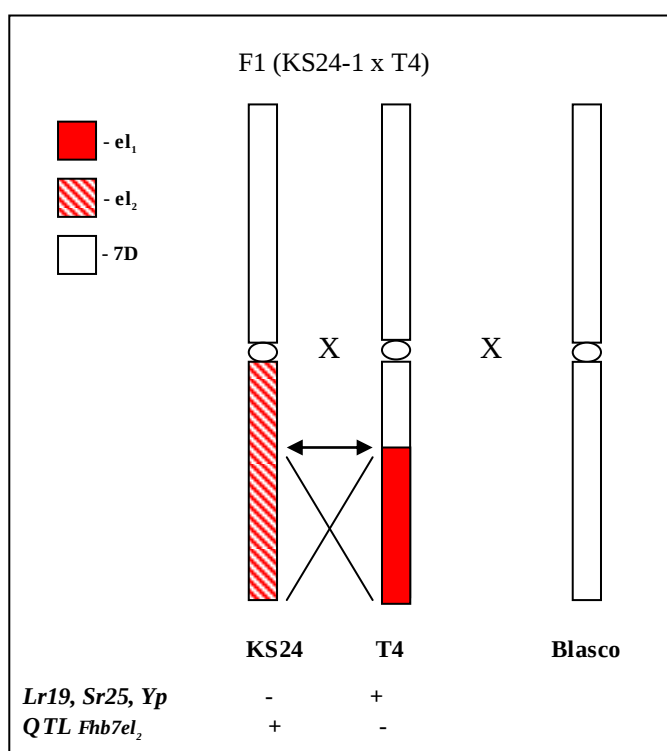
Risultati

3. Risultati

3.1 Selezione e caratterizzazione di ricombinanti 7el₁L+ 7el₂L in frumento tenero

Come detto in precedenza (§ 2), con l'obiettivo di piramidare i geni *Lr19*, *Sr25*, *Yp* e il QTL per la resistenza alla fusariosi, contenuti nelle porzioni più distali dei bracci lunghi dei cromosomi omologhi 7el₁ e 7el₂ di *Th. ponticum* (§ 1.5.1 e 2), le due linee di traslocazione di frumento tenero KS24-1 e T4 sono state incrociate per produrre piante F1 eterozigoti per i due cromosomi di interesse, rispettivamente 7DS.7el₂ e 7DS.7DL-7el₁ (Fig. 11).

Figura 11: Schema di incrocio di piante F1 (KS24 x T4) con la cv. Blasco, volto al *gene pyramiding* dei geni utili portati dalle accessioni el₁ ed el₂ del *Th. ponticum* in uno dei migliori frumenti teneri attualmente coltivati in Italia, cv. Blasco.



Piante F1, prodotte precedentemente (Kuzmanovic et al., 2009), sono state allevate e su queste condotte analisi dell'appaiamento dei due cromosomi ricombinanti presenti nelle linee parentali, 7DS.7el₂ e 7DS.7DL-7el₁, alla metafase I meiotica. I preparati citologici (vetrini) ottenuti con le cellule madri del polline, sono stati analizzati con una particolare tecnica di ibridazione *in situ* genomica denominata Preannealing-GISH (§ 2.2.4.2 e 2.2.6.1). Tramite la visualizzazione al microscopio in epifluorescenza della cromatina della specie selvatica (in verde più intenso sulla Fig. 12) sono stati individuati i due cromosomi di interesse, ed è stata eseguita una verifica del tipo e del numero di appaiamenti della suddetta coppia cromosomica. Nel 100% dei casi (53

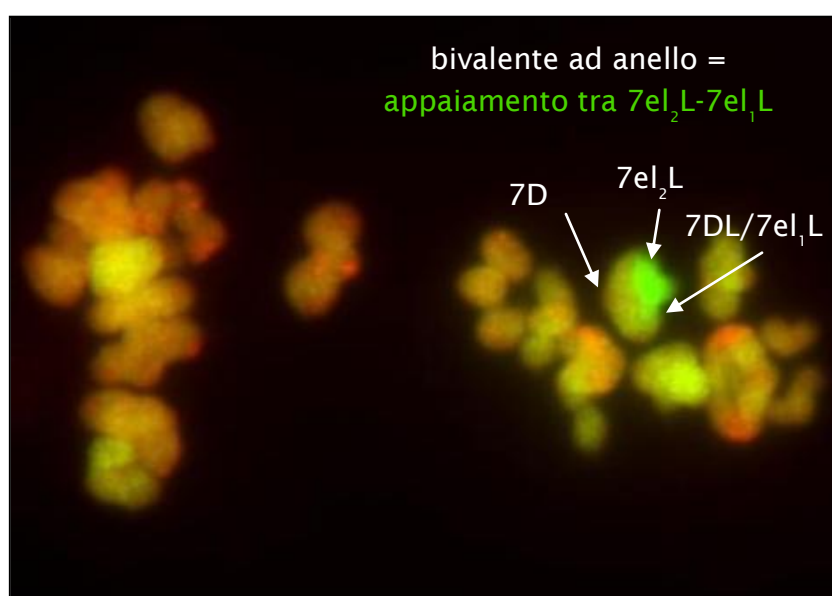
cellule totali) i due cromosomi si sono associati formando un bivalente ad anello (ring) (Tabella 9 e Fig. 12).

Tabella 9 Analisi dell'appaiamento alla metafase I meiotica di piante F1(KS24-1 x T4).

N° cellule	N° cellule con appaiamento 7el ₁ -7el ₂	% appaiamento 7el ₁ -7el ₂
53	51	96

Da tale frequenza di appaiamento ci si attende che il 50% della progenie derivante dall'F1 (KS24-1 x T4) sia costituita da individui prodotti di scambio tra porzioni cromosomiche del 7el₁ e 7el₂, tra cui un certo numero recanti ricombinazioni utili a cumulare nello stesso genotipo i geni di nostro interesse.

Figura 12. GISH di cromosomi alla metafase I meiotica di piante F1 (KS24-1 x T4) a 2n=42: DNA genomico di *Th. ponticum* rilevato con FITC (fluorescenza verde intenso); DNA genomico di frumento tenero rilevato con Cy3 (fluorescenza rossa): giallo-arancio-rosso genoma A e B, giallo-verde pallido genoma D).



Per identificare più facilmente gli individui ricombinanti e iniziare il processo di introduzione delle combinazioni geniche desiderate nel background di varietà adatte alla coltivazione, piante F1 (T4 x KS24) sono state incrociate con la cv. di frumento tenero Blasco, uno dei migliori frumenti teneri attualmente coltivati in Italia, e le 56 progenie così ottenute (Fig. 14), sono state genotipizzate con marcatori molecolari in grado di rivelare polimorfismi utili a discriminare gli alleli appartenenti ai diversi cromosomi del gruppo 7 (7el₁, 7el₂, 7D e 7A,) nelle regioni di

interesse. Oltre a quelli precedentemente mappati (Gennaro et al., 2010; Kuzmanovic, 2011), nel corso del presente lavoro sono stati individuati nuovi marcatori utili a rendere più precisa la selezione genotipica e la definizione di mappa (Tab. 10). I genotipi ricombinanti 7el1/7el2 così identificati sono stati ulteriormente caratterizzati tramite GISH. I marcatori molecolari, principalmente SSR, STS e EST (Tab. 5 e 10), sono stati tutti analizzati in reazioni di tipo PCR (§ 2.2.2).

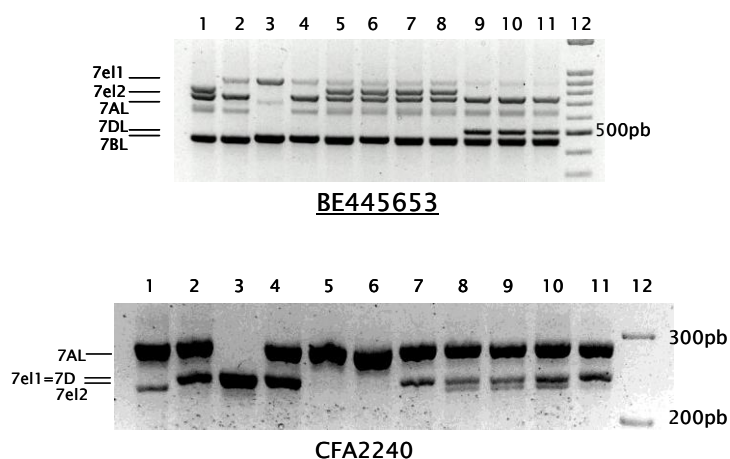
Tabella 10. Elenco marcatori saggiati ed effettivamente impiegati per la relativa specificità allelica. In rosso sono evidenziati quelli mappati nel corso della tesi di dottorato.

N° di marcatori saggiati	N° di marcatori usati	Specificità allelica	Marcatori
48	22	7el ₁	Mag1932, Ag15 ₁₈₄ , STSLr19, Psy1 _{F5/1-2R} , BARC76 , Ag15 ₆₀₀ , BF200943 , BARC172, WMC488, WMC221, BARC1075
		7el ₂	BG607810 , PSP680 , WMC273, CFE266 , WMS333 , BARC121
		7el ₁ /7el ₂	CFA2240, BE445653, PSR129caps , PSP3123

Mentre per i geni di resistenza alle ruggini, derivati da T4, si conosceva la precisa localizzazione di marcatori associati ormai validati, per il QTL di resistenza alla fusariosi (*FHBres-7el₂*) la conferma della localizzazione è stata oggetto del presente studio. Tra i vari marcatori, due in particolare, l'EST BE445653 e l'SSR CFA2240, localizzati nella zona più distale dei bracci 7DL, 7el1L (T4) e 7el2L (KS24), sono stati quelli utilizzati per selezionare i genotipi aventi *FHBres-7el₂* derivato da KS24 (Fig. 13).

Figura 13 Profilo di amplificazione di due importanti marcatori distali codominanti:

BE445653: 1) KS24; 2) T4; 3) R5-2-10; 4) F2OM+7el₁; 5,6,7,8) F2 ET7el₁/7el₂; 9,10,11) F2ET7el₁7DL; 12) DNA Marker 100pb; CFA2240: 1) KS24; 2) T4; 3) Blasco; 4) F2OM+7el₁; 5) Ariosto; 6) Simeto; 7) F2OM+7el₁; 8,9,10,11) F2 ET 7el₁7el₂; 12) DNA Marker 100pb.



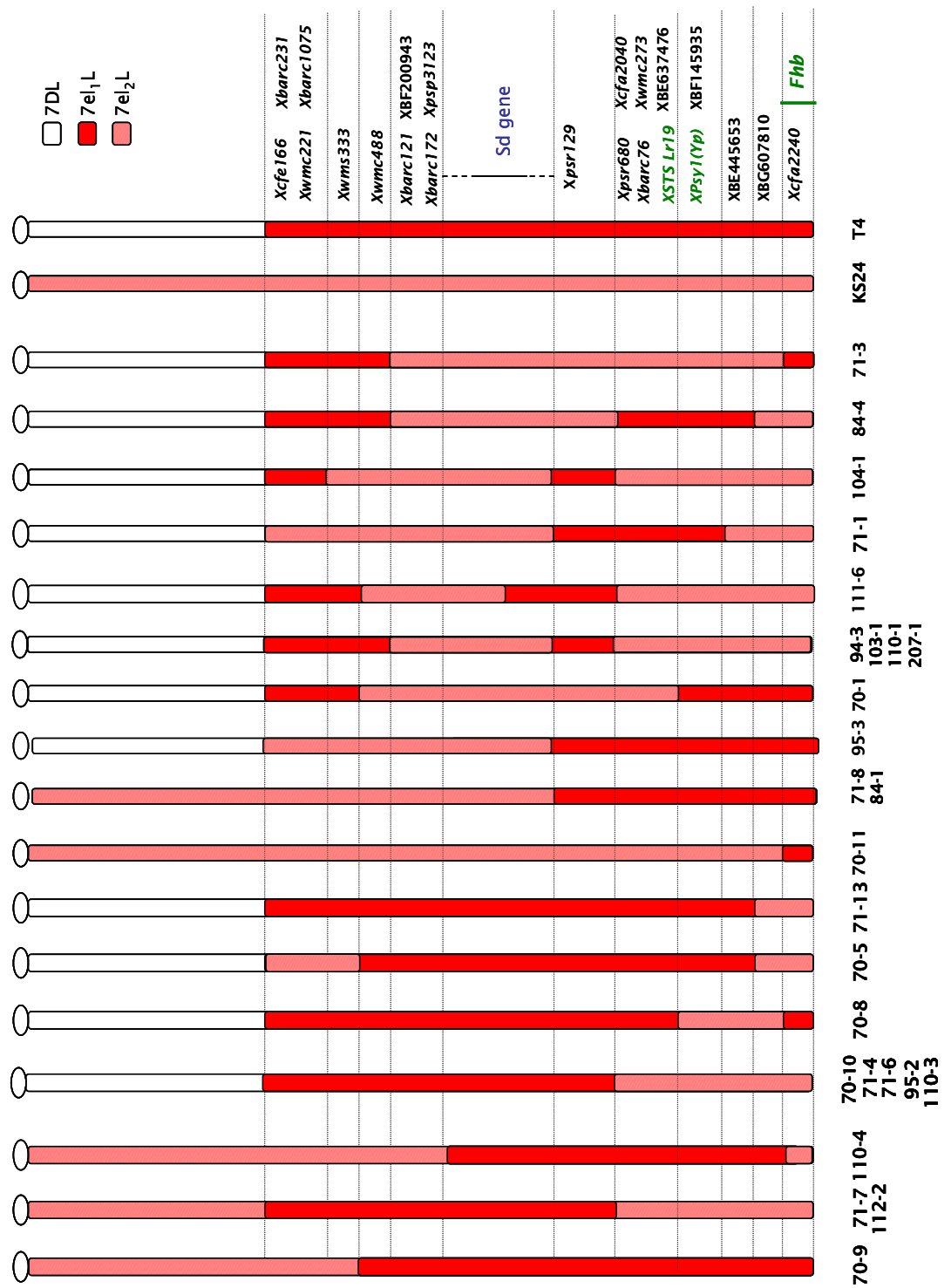
La prima indicazione sulla localizzazione del QTL *FHBres-7el₂* nell'intervallo compreso tra questi due marcatori, era stata data da Shen e Ohm nel 2007; più recentemente lo stesso gruppo di ricerca ha suggerito una localizzazione ancor più distale, in stretta associazione con il locus *Xcfa2240* (Zhang et al., 2011; vedi Fig. 14). Nel corso del presente lavoro è stato possibile verificare la bontà delle due ipotesi, sottoponendo ad infezione (§ 3.1.3) materiali di cui erano state precedentemente definite le forme alleliche ai loci in questione.

Le amplificazioni delle sequenze polimorfiche con i diversi marcatori PCR sono state eseguite sul DNA genomico estratto dalle foglie (vedi § 2.2.1) delle 56 progenie da [(T4 x KS24) x Blasco] e di opportuni controlli rappresentati dalle linee T4, KS24 e dalla cv. Blasco. Tutti gli individui portavano in eterozigosi, insieme al cromosoma 7D della varietà Blasco, uno dei due cromosomi 7D/7el “parentali” (alleli el1 o el2) oppure un cromosoma ricombinante (alleli el1 + el2).

Sono stati così identificati 26 individui ricombinanti 7el1L+7el2L che, in base al profilo di tutti i marcatori saggiati, sono stati raggruppati in 17 gruppi genotipici (Fig. 14).

L'elevato numero di individui ricombinanti (circa il 46% della popolazione caratterizzata) è in linea con l'evidenza di un appaiamento pressoché completo tra i bracci 7el1L e 7el2L alla metafase I di piante F1 (T4 x KS24) (Tab. 9). A tal proposito non ha sorpreso l'identificazione di numerosi genotipi derivanti da scambi multipli el1-el2 nella regione 7elL comune a T4 e KS24 (circa il 70% del braccio, Fig. 10 e 13): un doppio *crossing-over* ha coinvolto i cromosomi dei tipi 110-4, 70-1, 71-1, 70-5, 70-8 e 71-3, e addirittura un triplo *crossing-over* i cromosomi del tipo 94-3, 111-6, 104-1 e 84-4 (Fig. 14). Combinando queste evidenze con i dati di mappa, due sembrano le regioni cromosomiche a più elevata frequenza di ricombinazione (vedi mappa di riferimento Fig. 14): la porzione cromosomica più distale, compresa fra BF145935 e CFA2240, e la regione cromosomica più prossimale, compresa fra il BARC1075 e il PSR3123.

Figura 14. Mappa citogenetica del cromosoma 7D/7el, presente in linee ricombinanti di frumento tenero derivanti dall'incrocio (KS24-1 x T4), definita tramite marcatori SSR, STS, EST e analisi GISH



Tra le 26 linee ricombinanti identificate 5 recavano in combinazioni tutti i geni *target*, mentre sei linee portavano solo il QTL *FHBres-7el₂* (Tab. 11).

Tabella 11 Linee ricombinanti di frumento tenero in cui sono presenti i geni di interesse in combinazione multipla o solo il QTL per resistenza all’FHB.

Linea ricombinante	Geni/QTL presenti	Marcatori	Forma allelica
1) 110-4 2) 70-5 3) 84-4 4) 71-13 5) 71-1	<i>Lr19</i> , <i>Yp</i> <i>Sr25</i> <i>FHBres7el₂</i>	<i>STSLr19</i> , <i>STSPsy1</i> BF145935 CFA2240	el1 el2
1) 71-7 2) 94-3 3) 70-10 4) 110-3 5) 111-6 6) 104-1	 <i>FHBres7el₂</i> 	 CFA2240 	 el2

Per discriminare tra i tipi ricombinanti quelli recanti solo il 70% di cromatina 7el sostituita al braccio cromosomico 7DL, come T4, piuttosto che tutto il braccio lungo, come KS24 (Fig. 9), sono stati dapprima saggiati numerosi marcatori SSR e EST riportati avere una localizzazione piuttosto prossimale (Fig. 15); tuttavia, per nessuno è stata confermata la localizzazione nella zona d’interesse. Di conseguenza, non disponendo di marcatori molecolari ricadenti nel 30% prossimale che discrimina fisicamente il cromosoma 7D ricombinante della linea T4 da quello della KS24, è stata applicata la tecnica GISH. Dall’analisi GISH è risultato che i genotipi 70-9, 71-8, 110-4, 71-7 e 70-11 hanno, come la linea KS24, l’intero braccio lungo di *Th. ponticum* (7el2L), mentre i restanti 12 hanno un 7DL/7el con composizione equivalente a quella della linea T4 (Fig.16).

Anche le progenie F2 delle diverse linee ricombinanti (prodotte per autofecondazione dell’F1 [(KS24xT4) x Blasco]) sono state selezionate per ottenere piante omozigoti per il cromosoma ricombinato (OM+), eterozigoti ed omozigoti 7D (OM-), con il doppio scopo di identificare le piante utili all’infezioni con il *Fusarium* spp. (vedi § 3.1.3) e di verificare la trasmissibilità dei diversi tipi cromosomici ricombinanti. Per questo motivo è stata eseguita l’analisi della segregazione genotipica tramite il test del chi-quadro (Tab. 12). I risultati hanno mostrato che nell’ambito dei 17 gruppi genotipici (Fig. 14) 7 avevano una segregazione regolare del 7D/7el, mentre nei restanti 10 la segregazione era completamente sbilanciata (valori di P altamente significativi, cioè $P \geq 0.05$ o $P \geq 0.01$), sempre a favore del cromosoma ricombinato azzerando quasi completamente il numero di individui omozigoti per il cromosoma 7D (OM-) (Tab.12).

Questo conferma la presenza, sul braccio lungo dei cromosomi 7el di *Th. ponticum*, di geni *Sd* (*Segregation distortion*) che portano ad una segregazione distorta (SD), ovverosia ad una deviazione rispetto ai rapporti mendeliani attesi in una popolazione segregante. La zona cromosomica in cui sembra essere localizzato/i uno o più geni *Sd* è quella compresa tra i marcatori prossimali BF200943 e PSP3123 ed il marcatore distale PSR129 (Fig. 14). Quando in questa regione del cromosoma è presente cromatina 7el₂, nelle relative progenie la segregazione è distorta a favore del tipo cromosomico ricombinato (Tab. 12) (vedi anche Introduzione e Conclusioni).

Figura 15: Marcatori presunti avere una localizzazione prossimale sul 7DL (<http://wheat.pw.usda.gov/>) mappati sulle linee ricombinanti 7D/7el di frumento tenero. In grassetto sono riportati i marcatori polimorfici usati nella caratterizzazione genetica delle linee 7DS.7DL/7elL.

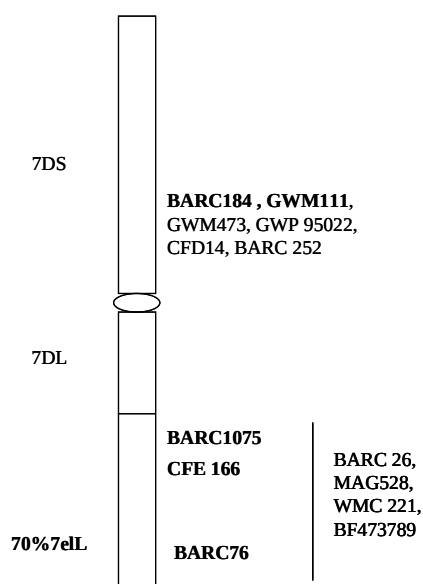


Figura16. Ibridazione *in situ* genomica (GISH) che evidenzia i due tipi di cromosomi 7DS.7DL/7elL presenti in linee di frumento tenero: a sinistra il 70% del 7DL sostituito da 7el₁L (T4); a destra il 100% del 7DL sostituito da 7el₂L (KS24).

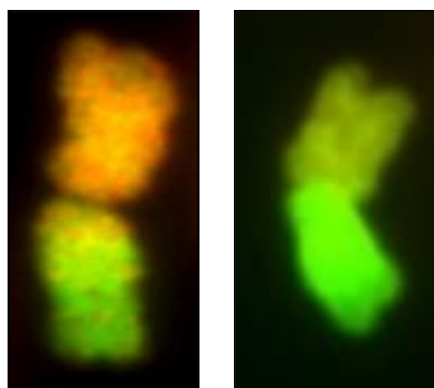


Tabella 12 Analisi della segregazione (test del χ^2) delle progenie F2 dei 17 gruppi genotipici di frumento tenero ricombinanti 7el1-7el2.

N° gruppo	Linea ricominante	N° F2 analizzate	OM+	ET	OM-	χ^2 (1:2:1)	P (%)
1	70-5	35	9	19	7	0,48	70 $\geq$ p $\leq$ 80
2	71-13	16	4	7	5	0,37	80 $\geq$ p $\leq$ 90
3	110-4	24	7	12	5	0,34	80 $\geq$ p $\leq$ 90
4	71-7	26	5	11	10	2,33	30 $\geq$ p $\leq$ 50
5	70-8	43	6	24	13	1,21	50 $\geq$ p $\leq$ 70
6	70-9	19	6	10	3	1,22	50 $\geq$ p $\leq$ 70
7	71-6	12	3	8	1	2,01	30 $\geq$ p $\leq$ 50
	110-3	11	3	4	4	0,98	50 $\geq$ p $\leq$ 70
	95-2	12	4	7	1	1,82	30 $\geq$ p $\leq$ 50
	71-4	10	2	7	1	1,72	30 $\geq$ p $\leq$ 50
	70-10	12	2	8	2	1,32	50 $\geq$ p $\leq$ 70
8	71-7	26	5	11	10	2,33	30 $\geq$ p $\leq$ 50
9	84-4	34	21	13	0	15,33	p $\geq$ 1
10	71-1	19	8	11	0	13,6	p $\geq$ 1
11	84-1	19	9	9	1	6,8	p $\geq$ 5
	71-8	16	8	8	0	8	p $\geq$ 5
12	70-1	19	6	14	0	7,2	p $\geq$ 1
13	70-11	22	9	13	0	8,08	p $\geq$ 1
14	71-3	24	8	16	0	8	p $\geq$ 1
15	111-6	29	16	10	3	5,05	p $\geq$ 5
16	94-3	11	4	7	0	9,1	p $\geq$ 1
	103-1	16	5	11	0	5,4	p $\geq$ 5
	110-1	18	10	8	0	11,3	p $\geq$ 1
	95-3	10	5	5	0	5	p $\geq$ 5
17	104-1	19	5	11	0	5	p $\geq$ 5

3.2 Isolamento e caratterizzazione di ricombinanti 7el₁L/7el₂L in frumento duro

L'aspetto più innovativo del lavoro di *pyramiding* dei geni di resistenza tra le due accessioni di *Th. ponticum* è proprio quello che prevedeva il trasferimento del QTL *FHBres-7el₂* dalla linea ricombinante di frumento tenero KS24-1 in due differenti linee di frumento duro, R5-2-10 ed R23-1, recanti rispettivamente il 13% ed il 40% del 7el₁L sul 7AL (Fig. 8 e 18). Nelle progenie di incrocio tenero x duro e nelle prime generazioni di reincrocio [(tenero x duro) x duro] era attesa una certa instabilità cromosomica ed una bassa fertilità. Inoltre, a causa del fatto che le regioni omologhe 7el₁L e 7el₂L si trovano su cromosomi omeologhi (7A e 7D rispettivamente), la frequenza di appaiamento e ricombinazione 7el₁-7el₂ potevano essere ridotte rispetto a

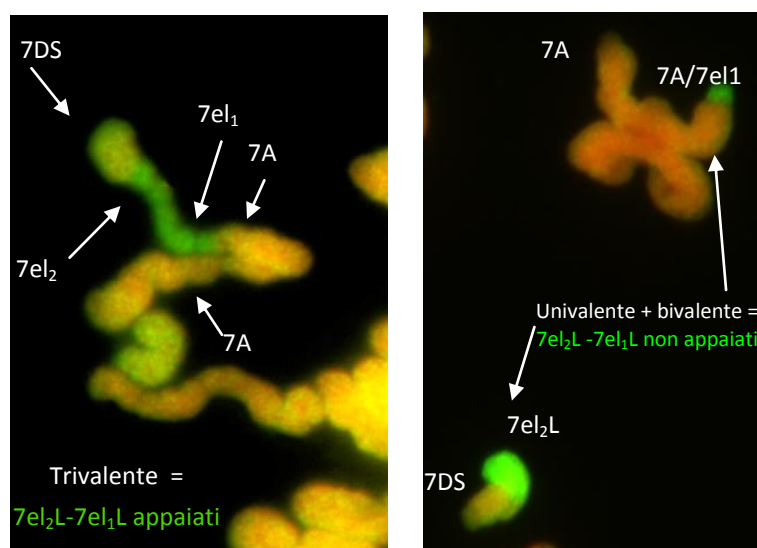
quanto osservato in tenero. Infatti, analisi GISH dell'appaiamento meiotico in cellule madri del polline in entrambe le progenie F1 hanno evidenziato che l'appaiamento 7el₁-7el₂ avveniva nel 37% dei casi (su 72 cellule totali), con formazione di un'associazione trivalente, coinvolgente i cromosomi 7DS.7el₂L (KS24-1), 7AS.7AL-7el₁ (R5-2-10 o R23-1) e 7AS.7AL (Tab. 13 e Fig. 17).

Tabella 13 Studio dell'appaiamento dei cromosomi ricombinanti 7D/7el₂ e 7A/7el₁ alla metafase I meiotica di piante F1 (KS24-1 x R23-1/R5-2-10).

N° cellule	N° cellule con appaiamento 7el ₁ -7el ₂	N° cellule senza appaiamento 7el ₁ -7el ₂	% di cellule con appaiamento 7el ₁ -7el ₂
72	28	44	37

Da circa 70 progenie di incroci iniziali [(KS24 x R23-1/R5-2-10) x varietà di duro], tramite MAS con marcatori molecolari impiegati anche nella ricerca dei ricombinanti di frumento tenero (vedi § 3.1.1) sono stati isolati 14 ricombinanti (frequenza totale del 20%, in linea con il 37% di appaiamento).

Figura 17 GISH di cromosomi alla metafase I meiotica di piante F1 (KS24-1 x R23-1/R5-2-10) (2n=35): a sinistra, la formazione di un trivalente tra i cromosomi parentali, 7DS.7el₂L, 7AS.7AL-7el₁ e 7AS.7AL; a destra, assenza di appaiamento dei cromosomi 7DS.7el₂L e 7AS.7AL-7el₁. DNA genomico di *Th. ponticum* rilevato con FITC (fluorescenza verde intenso); DNA genomico di frumento duro rilevato con Cy3 (fluorescenza giallo-arancio).



Tra questi, tuttavia, solo uno, denominato R85, può considerarsi un ricombinante utile, in quanto recante la ricombinazione desiderata (porzioni 7e1L-7e2L) sul braccio lungo del cromosoma 7A (vedi Tab. 14 e Fig.18), mentre i restanti 13 ricombinanti avevano un 7D ricombinato, non risultava interessante per la combinazione multipla di geni in frumento duro.

Tabella 14. Progenie ottenute dagli incroci [(KS24 x R5/R112/R23) x cv. frumento duro]: numero di semi e piante ottenute e relativa selezione genotipica con indicate le percentuali di piante ricombinanti determinate

N° semi di incrocio	N° piante analizzate	Linee ricombinanti sul 7A (%)	Linee ricombinanti sul 7D (%)	Totale linee ricombinanti (%)
153	73	1 (1.4)	13 (17.8)	14 (19.2)

Tale ricombinante R85, con una struttura del 7AL-7e₁L del tipo R23-1 (verificata tramite GISH) (Fig. 18), presentava una leggera instabilità nella trasmissibilità nelle progenie autofecondate BC1F2 (R85 x cv. Ariosto).

Il risultato della selezione, illustrato nella Tabella 14, evidenzia un lieve effetto di sulla distorsione della segregazione del cromosoma R85, in questo caso a sfavore del cromosoma che reca nella zona di presunta localizzazione di un gene *Sd* cromatina 7e₁ (vedi § 1.5.1 effetto *Sd* e Conclusioni); difatti, sebbene la deviazione rispetto alla segregazione normale di 1:2:1 non sia significativa, sono stati individuati solo 9 genotipi OM⁺ per il cromosoma R85, contro i 15 attesi in caso di una segregazione regolare.

Tabella 15 Risultati della selezione genotipica, con il marcatore codominante CFA2240, della progenie F2 da (R85 x cv. Ariosto)

N° piante F2	OM ⁺	ET	OM ⁻	Stat
61	9	31	21	$\chi^2 = 4.74$ 0.10 < P _{1:2:1} < 0.25
attesi	15.25	30.5	15.25	

Allo scopo di poter isolare ulteriori ricombinanti con un segmento cromosomico 7e₁L di minore entità rispetto all'R85, sono stati genotipizzati 18 individui F2 ottenuti da progenie dell'incrocio (KS24 x R5-2-10) x cv. Ariosto.

Sul totale esaminato sono risultate 4 le piante ricombinanti (frequenza 22.2%), 2 sul 7AL e 2 sul 7DL. I marcatori molecolari hanno evidenziato che entrambi i cromosomi 7A ricombinati, entrambi presenti nella stessa pianta progenie, presentano la porzione 7e₁L contenente i geni

Lr19 e *Yp* ed anche la porzione più distale derivante dal 7eL2L e contenente il QTL per la resistenza alla fusariosi della spiga (Fig. 18).

Figura18. Mappa citogenetica dei ricombinanti “primari” 7A di frumento duro e relativi parentali di incrocio con alcuni dei marcatori utilizzati.

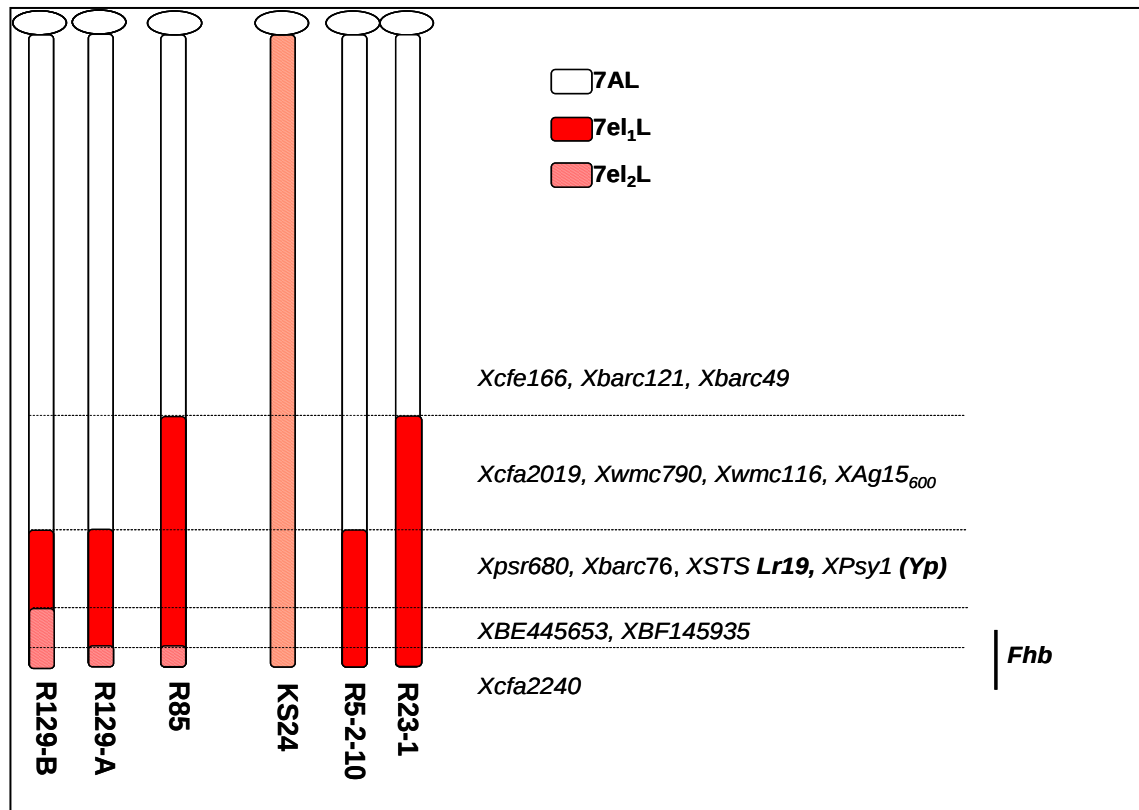
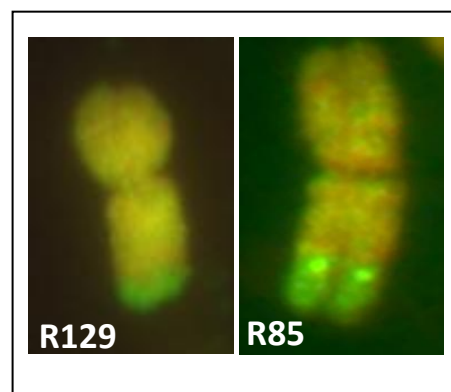


Figura19. GISH dei cromosomi ricombinanti 7AS.7AL/7eL delle linee R129 e R85: DNA genomico di *Th. ponticum* rilevato con FITC (fluorescenza verde intenso); DNA genomico di frumento duro rilevato con Cy3 (giallo-arancio).



Tuttavia, a parità di cromatina totale 7eL, i due cromosomi 7A della coppia ricombinata mostrano una differenza nel contenuto relativo 7e1L/7e2L. Dall'analisi di amplificazione, i due cromosomi (denominati R129A e R129B, Fig. 18) sono eteroallelici ai loci *XBE445653* e *XBG607810*, mentre sono omoallelici per il locus *Xcfa2240* (vedi Tab.16; Fig. 18 e 19).

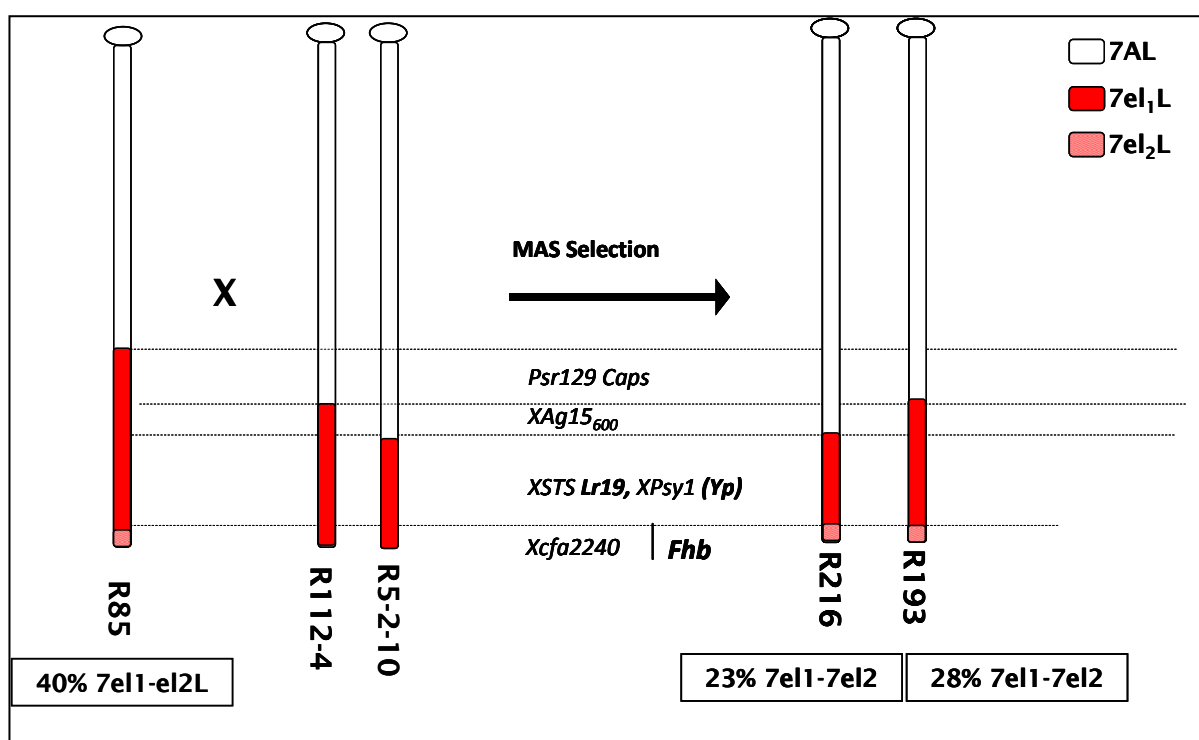
Entrambi i ricombinanti R85 ed R129 sono stati allevati e reincrociati per una varietà di frumento duro (BC2 per il tipo R85, BC1 per R129) e portati in autofecondazione.

Tabella 16: Forme alleliche dei vari marcatori molecolari saggiati sulle linee ricombinanti el₁+el₂ di frumento duro, sia di tipo R5-2-10 (R129) che di tipo R23-1 (R85).

Linea	CFA2240 el1/ el2	BG607810 el1/ el2	BE445653 el1/ el2	BF145935 el1/ el2	PSY1 el1/ -	STSLr19 el1/ -	Barc76 el1/ el2	PSR680 el1/ el2	Ag15 ₆₀₀ el1
R85	el2	el1	el1	el1	el1	el1	el1	el1	el1
R129									
- A	el2	el2	el1	el1	el1	el1	el1	el1	7A
- B	el2	el2	el2	el1	el1	el1	el1	el1	7A

Ulteriori tipologie cromosomiche ricombinanti el₁+el₂ di frumento duro, che possiamo considerare ricombinanti “secondari”, sono i genotipi ottenuti dall'incrocio del ricombinante “primario” R85 (40% del 7AL sostituito da 7e1-el2L) con R112-4 o R5-2-10, allo scopo di trasferire nei più brevi segmenti di 7e1L di questi ultimi (28% e 23% del 7AL, rispettivamente) la porzione 7e2 presente in R85 (Fig. 20).

Figura 20 Schema di produzione di ricombinanti “secondari” utili per la *breeding*.



Le piante F1 (R85 x R112-4 o R5-2-10) ottenute sono state incrociate con diverse varietà di frumento duro, suscettibili a FHB ed alla ruggine bruna, ed anche autofecondate. Su queste specifiche progenie F2 è stata effettuata la selezione dei ricombinanti “secondari”, tramite MAS, utilizzando sia i marcatori nella regione dell'*FHBres-7el₂* (CFA2240), che quelli che permettono di distinguere nella porzione 7el₁ prossimale l'R23-1 dall'R112-4 e dall'R5-2-10 (Ag15₆₀₀, PSR129caps, vedi Fig. 17). Sono stati così isolati due nuovi ricombinanti “secondari”: R216, con 23% di cromatina 7el1-el2 sul 7AL (come il tipo R129A; Fig. 19) ed R193, con 28% di cromatina 7el1-el2 sul 7AL (Fig. 20). I dati della selezioni, con i risultati della segregazione genotipica per il locus associato all'*FHBres-7el₂* (*Xcfa2240*) delle due progenie da cui sono stati isolati i ricombinanti “secondari”, sono riportati in Tabella 17. Come risulta evidente dal test del chi-quadro la segregazione risulta regolare.

Tabella 17 Genotipizzazione con il marcatore CFA2240 delle progenie F2 delle linee di ricombinanti “secondari” di frumento duro (derivati di R85, ricombinante primario) e relativa combinazione cromosomica determinata con i marcatori Ag15₆₀₀, PSR129 e WMC790.

N° F2 R193 (R85 x R112-4)	Genotipo			$\chi^2_{(1:2:1)}$	p
	OM+el2	ET el1/el2	OM+ el1		
57	18	25	14	1,42	30<p<50
Combinazione cromosomica					
OM+ 28%7el	8 R112/ R112	12 R112/ R112	7 R112/ R112		
OM+ 40%7el	2 R85/ R85	4 R85/ R23	3R23/ R23		
ET 40%/ 28%7el	8 R85/ R112	9R85/ R112	4 R23/ R112		
N° F2 R216 (R85 x R5-2-10)	Genotipo			$\chi^2_{(1:2:1)}$	p
	OM+el2	ET el1/el2	OM+ el1		
52	11	25	16	1,04	50<p<70
Combinazione cromosomica					
OM+ 23%7el	6 R5/ R5	5 R5/ R5	3 R5/ R5		
OM+ 40%7el	2 R85/ R85	2 R85/ R23	4R23/ R23		
ET 40%-23%7el	3 R85/ R5	18 R85/ R5	9 R23/ R5		

3.3 Valutazione della resistenza al *Fusarium* spp. delle linee ricombinanti 7DL-7eL di frumento tenero

A verifica della l'efficacia del QTL *FHBres-7eL₂* verso forme del patogeno diffuse nei nostri ambienti e per valutare il/i marcatore/i effettivamente più strettamente associato al QTL, sono stati condotti esperimenti di infezione con il *Fusarium* spp. Sono stati presi in esame 15 genotipi ricombinanti dei 17 identificati all'interno della popolazione F2, derivante dall'autofecondazione della F1 [(T4 x KS24) x cv. Blasco)], selezionando gli omozigoti per il cromosoma ricombinante. Come controlli suscettibili sono state utilizzate la linea T4 e la cultivar Blasco mentre la KS24 ha rappresentato il controllo resistente. Non sono stati inclusi nei controlli piante OM- dei vari genotipi ricombinanti, completamente assenti in circa metà delle popolazioni F2 (Tabella 12). Tale assenza è probabilmente causata dalla trasmissione pressoché esclusiva del cromosoma 7D/7eL, a svantaggio del normale 7D, apparentemente in coincidenza con la presenza di forme alleliche di tipo eL2 nella regione del 7eL prossimale al locus *Xpsr129* (Fig. 14).

Per lo studio di associazione genotipo/fenotipo i genotipi ricombinanti sono stati divisi in quattro gruppi in base alla forma allelica presentata ai loci *XBE445653* e *Xcfa2240* (vedi Tab. 18)

Per gli esperimenti di infezione sono stati utilizzati 1000 conidi in 20µl di soluzione (50 conidi/µl), per inoculare due spighe centrali opposte (vedi § 2.2.9.2). Gli inoculi sono stati effettuati sulle linee ricombinanti e sui controlli resistenti/suscettibili (cv. Blasco, T4, KS24) allo stadio di crescita Zadoks 6 (Bai, 2001) (vedi § 2.2.9.2). Nell'infezione effettuata sui genotipi riportati in Tab. 18, sono state utilizzate 3-5 piante OM+ (in omozigosi per il 7DL/7eL ricombinante) per ogni genotipo ricombinante e 4-5 individui rappresentanti le linee di controllo, per un totale di circa 90 piante analizzate.

Le piante utilizzate sono state allevate in vaso in ambiente controllato (cella climatizzata), avendo cura di sospendere qualsiasi trattamento anticrittogamico (anche di tipo preventivo) almeno 15-20 giorni dalla fase di spigatura, in modo da evitare qualsiasi alterazione nella risposta data da queste all'infezione con *Fusarium* spp.

La sintomatologia causata dall'infezione si manifesta, nei genotipi suscettibili, con il precoce ingiallimento della spiga a partire dal punto d'inoculo e con la presenza di fruttificazioni fungine alla base delle glume; la diffusione avviene progressivamente, in maniera sistemica, all'interno della spiga e porta al disseccamento della stessa (Figura 21).

Tabella 18: Genotipi dei ricombinanti 7DL/7eL e delle linee controllo ai loci *XBE445653* e *Xcfa2240*; (la risposta attesa all’FHB è basata su dati di letteratura, vedi testo Shen & Ohm, 2007 e Zhang et al., 2011).

Linea/Genotipo	Gruppi	BE445653	CFA2240	Fenotipo FHB atteso
KS24	A	el2	el2	R
T4	B	el1	el1	S
Blasco	C	7D	7D	S
70-5, 84-4, 110-4	D	el1	el2	R?
70-10, 71-1, 71-6, 71-7, 95-2, 103-1, 110-1, 110-3, 111-6	E	el2	el2	R
70-1, 70-9, 71-8, 84-1, 95-3	F	el1	el1	S
70-11, 71-3, 70-8	G	el2	el1	S?

Figura 21: Sintomatologia causate dal *Fusarium* spp.: confronto fra una spiga inoculata e una non sottoposta a infezione appartenenti allo stesso genotipo suscettibile di una linea ricombinante di frumento tenero.



I sintomi sono stati rilevati a 7, 14 e 21 giorni dalla data di inoculazione (= d.p.i. = *days post inoculation*) e misurati come percentuale di spighe infette sulle spighe totali della spiga (NDS = number of diseased spikelets).

La comparsa dei primi sintomi, sia nelle piante per le quali era atteso un fenotipo resistente che in quelle suscettibili, è stata rilevata già dopo 2-3 giorni dall'inoculazione; tuttavia, anche a 7 d.p.i. le differenze tra i genotipi (pur altamente significative, come dimostrato dall'ANOVA SYSTAT TEXT, Tab. 19) non sono risultate in tutti i casi indicative della loro effettiva risposta all'infezione (resistenza/suscettibilità), probabilmente anche per il ridotto numero di spighe infette riscontrato a quel “*time point*” (vedi grafico Fig. 23 e Tab. 20).

Comunque, il Tukey's Honestly-Significant-Difference Test (*post hoc* test), eseguito dopo l'ANOVA per evidenziare quali tra i gruppi determinavano la disparità, ha mostrato differenze significative ($P < 0,05$) tra il gruppo di ricombinanti aventi l'allele *el2* per il CFA2240 (gruppi D e E) e i ricombinanti del gruppo G (caratterizzati dalla forma allelica *el1* al medesimo locus) già a 7 d.p.i., e ciò potrebbe essere interpretato come un effetto iniziale del gene *FHBres-7el₂* (Tab. 20), almeno nel *background* dei genotipi in esame.

Tabella 19: Analisi della varianza (ANOVA) dei gruppi di genotipi ricombinanti e loro controlli analizzati a 7, 14 e 21 d.p.i.

7 d.p.i.					
	Devianza	Gradi di libertà	Varianza	F	P
Genotipi	0,21	6	0,04	3,62	0,004
Errore	0,65	67	0,01		
14 d.p.i.					
	Devianza	Gradi di libertà	Varianza	F	P
Genotipi	5,36	6	0,89	17,19	0.000
Errore	3,48	67	0,05		
21 d.p.i.					
	Devianza	Gradi di libertà	Varianza	F	P
Genotipi	8,17	6	1,36	26,86	0.000
Errore	3,40	67	0,05		

Tuttavia, a distanza di una settimana (14 d.p.i.), le differenze fra i genotipi sono risultate altamente significative ($P < 0,001$; Tab. 19 e 20); a questo stadio è stato inoltre evidente che gli individui aventi l'allele *el2* al locus *Xcfa2240* (gruppi D ed E), indipendentemente dalla forma allelica all'altro locus di riferimento associato al QTL *FHBres-7el₂* (*XBE445653*), mostravano un fenotipo decisamente resistente, con una percentuale di spighe infette pari all'11% (Tab. 21). Al contrario, la progressione dei sintomi causati dall'FHB sui controlli Blasco e T4 è stata molto rapida, tanto da colpire circa il 50% delle spighe sul totale della spiga inoculata (Fig. 23 e Tab. 20 e 21). Un livello di suscettibilità analogo (pari al 54% e al 73%) è stato rilevato

rispettivamente nei genotipi aventi l'allele el1 per entrambi i marcatori di riferimento o la forma allelica el1 per il CFA2240 ed el2 per il BE445653 (Tab. 20 e 21 e Fig. 23).

Tabella 20 Prospetto riassuntivo del Tukey test condotto sui valori di NDS rilevati sui vari gruppi genotipici a 7, 14 e 21 d.p.i.; i valori di P in rosso indicano un valore significativo ($P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$). Per la denominazione dei gruppi vedi Tab. 13 (A, D ed E sono gli attesi resistenti -R/R?- e tutti gli altri i suscettibili -S/S?- a FHB).

Coppie Genotipi	P		
	7 d.p.i.	14 d.p.i.	21 d.p.i.
A vs. B	1,000	0,014	0,001
A vs. C	0,692	0,066	0,000
A vs. D	1,000	0,693	1,000
A vs. E	1,000	0,692	1,000
A vs. F	0,559	0,043	0,000
A vs. G	0,117	0,000	0,000
B vs. C	1,000	0,693	0,683
B vs. D	1,000	0,001	0,000
B vs. E	0,690	0,000	0,000
B vs. F	0,680	0,574	1,000
B vs. G	0,342	1,000	0,691
C vs. D	0,692	0,005	0,000
C vs. E	0,666	0,002	0,000
C vs. F	0,692	0,690	0,608
C vs. G	0,465	0,678	1,000
D vs. E	0,694	1,000	0,693
D vs. F	0,456	0,000	0,000
D vs. G	0,047	0,000	0,000
E vs. F	0,111	0,000	0,000
E vs. G	0,001	0,000	0,000
F vs. G	0,456	0,148	0,572

I rilievi effettuati a 21 d.p.i. non hanno di fatto modificato le conclusioni a cui si pervenuti a 14 d.p.i. (Tab. 20). I genotipi 110-4, 84-4, 70-5 (gruppo D), con *Xcfa2240-el2* e *XBE445653-el1* hanno mostrato un blocco della progressione della malattia (pari al 22%), non significativamente diverso da quello del controllo resistente KS24 (Tab. 21). A ulteriore conferma dell'assenza di stretta associazione tra il QTL *FHBres-7el2* ed il locus *XBE445653*, una risposta fenotipica analoga è stata rilevata nei rappresentanti del gruppo avente l'allele el2 ad entrambi i loci di riferimento; questi hanno manifestato una suscettibilità del 27% (Tab. 21) e, come gli altri genotipi resistenti, una riduzione della velocità di propagazione del sintomo lungo la spiga (Fig.22).

Figura 22: Fenotipo delle spighe infettate con *Fusarium* spp. al 21° giorno post inoculo; a sinistra: genotipo ricombinante portatore del QTL *FHBres-7el₂*; a destra: genotipo ricombinante, senza il QTL *FHBres-7el₂*, completamente suscettibile.

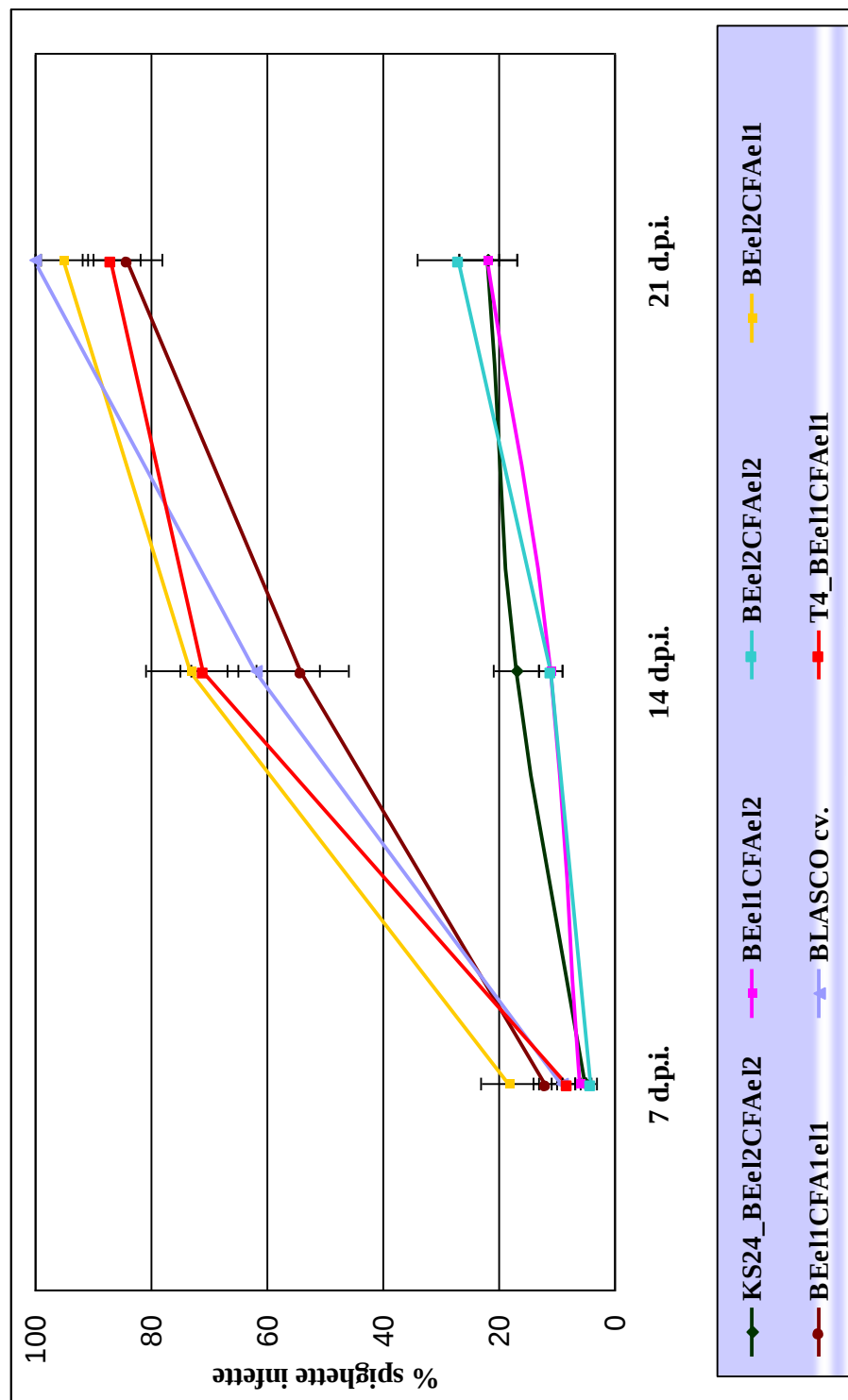


Tabella 21: Media (%) $\pm$ errore standard (ES) del numero di spighe infette (NDS) a 7, 14 e 21 giorni dopo infezione con *Fusarium* spp.

Gruppi = Genotipi (<i>XBE445653/ XCfa2240</i>)	Media (%) $\pm$ ES (%)		
	7 d.p.i.	14 d.p.i.	21 d.p.i.
A = (KS24 - <i>el₂</i> / <i>el₂</i>)	5 $\pm$ 1	17 $\pm$ 4	22 $\pm$ 5
B = (T4- <i>el₁</i> / <i>el₁</i>)	8 $\pm$ 0	71 $\pm$ 2	87 $\pm$ 3
C = (Blasco-7D/ 7D)	9 $\pm$ 2	62 $\pm$ 11	100 $\pm$ 0
D = (<i>el₁</i> / <i>el₂</i>)	6 $\pm$ 1	11 $\pm$ 2	22 $\pm$ 5
E = (<i>el₂</i> / <i>el₂</i>)	4 $\pm$ 1	11 $\pm$ 2	27 $\pm$ 7
F = (<i>el₁</i> / <i>el₁</i>)	12 $\pm$ 2	54 $\pm$ 8	84 $\pm$ 6
G = (<i>el₂</i> / <i>el₁</i>)	18 $\pm$ 5	73 $\pm$ 8	95 $\pm$ 4

Dal confronto della risposta all'infezione dei 4 gruppi genotipici ricombinanti 7DL/7elL e delle piante di controllo (cv. Blasco, T4 e KS24) si può affermare che gli individui aventi nella porzione distale del 7DL/7elL cromatina 7el2 (gruppi D ed E), presentano nel complesso una riduzione di oltre il 70% delle spighe infette rispetto al controllo suscettibile Blasco e del 65% a paragone dei genotipi caratterizzati dalla presenza di cromatina 7el1 nella medesima regione (compresa la linea T4).

Figura 23: Risposta dei quattro gruppi ricombinanti 7DL/7eL e delle linee di controllo all'infezione con *Fusarium* spp.: percentuali delle spighe infette a 7, 14 e 21 giorni dopo l'inoculazione (d.p.i.).



I risultati ottenuti hanno quindi confermato l'effetto positivo conferito dal QTL *FHBres-7el₂* alle linee di frumento tenero; queste hanno manifestato una tipica resistenza di Tipo II, ovvero con un'evidente riduzione dei sintomi e con un blocco della progressione della patologia.

La prova di infezione ha definitivamente confermato l'associazione stretta del QTL derivato dalla linea KS24 (el2) con il marcatore CFA2240.

3.4 Valutazione della resistenza al *Fusarium* spp. delle linee ricombinanti 7AL-7elL di frumento duro

Per quanto riguarda l'effetto del QTL *FHBres-7el₂* in frumento duro, finora mai studiato perché il QTL derivante da *Th.ponticum* non era stato ancora trasferito in questa specie, sono stati ottenuti i primi risultati infettando individui omozigoti per il cromosoma ricombinante “primario” R85 e per i due ricombinanti “secondari” R193 ed R216”, derivati da R85 (vedi § 3.1.2). In tutti i ricombinanti il breve segmento 7el₂L contiene solo il locus *Xcfa2240* (Fig. 17), per cui con il marcatore CFA2240 sono stati selezionati genotipi omozigoti (OM+ = *Xcfa2240-el2* ed OM- = *Xcfa2240-el1*) per il cromosoma ricombinante, utili al test di infezione con FHB, nell'ambito della diverse progenie di autofecondazione: BC1F2 per R85 ed F2 per R193 ed R216.

L'infezione con *Fusarium* spp. è stata condotta seguendo la medesima procedura impiegata per i materiali di frumento tenero (vedi § 2.2.9 e § 3.2), utilizzando diversi controlli suscettibili: la cultivar Duilio di frumento duro, le progenie segreganti omozigoti 7el1L e le linee R5-2-10 (R5) ed R112-4 (R112), sempre omozigoti 7el1L ma nel *background* quasi-isogenico della cv. Simeto (Tab. 22). Nell'infezione, per le progenie segreganti sono state inoculate circa 15 piante, mentre 10 per le linee controllo.

Tabella 22: Genotipi omozigoti dei ricombinanti 7AL/7elL e delle linee controllo al locus *Xcfa2240*.

Linea	Genealogia	CFA2240	Fenotipo FHB (atteso)	Gruppi
R216 R193 R85	KS24/ R5-2-10/ Ariosto/ Simeto KS24/ R112-4/ Ariosto/ Simeto KS24/ R23-1/ Ariosto ²	el2	R	A
R216 R193 R85	“ “ “	el1	S	B
R5 R112	R5-2-10/ Simeto ⁵ R112-4/ Simeto ⁵	el1/ Simeto	S	C
Duilio		7A	S	D

Come per i frumenti teneri, anche per i duri la risposta alle infezioni, espressa come numero di spighe infette (NDS), è stata analizzata tramite ANOVA SYSTAT TEXT. Tale analisi ha rivelato differenze significative tra i genotipi a 14 (d.p.i.) ed a 21 d.p.i. (Tab. 23).

Tabella 23: Analisi della varianza (ANOVA) dei gruppi di genotipi ricombinanti e loro controlli analizzati a 7, 14 e 21 d.p.i.

7 d.p.i.					
	Devianza	Gradi di libertà	Varianza	F	P
Genotipi	77,8	3	25,9	1,265	0,298
Errore	881,8	43	20,5		
14 d.p.i.					
	Devianza	Gradi di libertà	Varianza	F	P
Genotipi	12613,3	3	4204,4	12,79	0,000
Errore	14135	43	328,7		
21 d.p.i.					
	Devianza	Gradi di libertà	Varianza	F	P
Genotipi	43742,7	3	14580,9	73,583	0,000
Errore	8520,7	43	198,1		

Il successivo Tukey Test ha messo in evidenza quali fossero le coppie genotipiche, tra i 4 gruppi analizzati (A, B, C e D), che avevano valori significativamente diversi, rivelando notevoli differenze ($P < 0,001$) tra il gruppo A (*Xcfa2240-el₂*) e tutti i rimanenti gruppi (con *Xcfa2240-el₁*), indipendentemente dai background genetici (Tab. 24), mentre nessuna differenza è emersa dai confronti all'interno dei gruppi B, C e D (con *Xcfa2240-el₁*).

Tabella 24. Prospetto riassuntivo del Tukey H.S.D test (Post Hoc ANOVA) condotto sui valori di NDS rilevati sui vari gruppi genotipici a 14 e 21 d.p.i.; i valori di P in rosso indicano un valore significativo ($P < 0,001$). Per la denominazione dei gruppi vedi Tab. 22

coppie genotipi	P	
	14 d.p.i	21 d.p.i
A vs. B	0,000	0,000
A vs. C	0,000	0,000
A vs. D	0,000	0,000
B vs. C	0,786	0,128
B vs. D	0,998	0,365
C vs. D	0,89	0,905

Le linee ricombinanti R85, R216 e R193 (genotipi segreganti con *Xcfa2240-el₂* in F2 R85 x R5-2-10 o R112-4) mostravano, a 21 d.p.i, solo il 23% di spighe infette contro un valore del 78% rilevato nelle linee sorelle R216, R193 e R85 (genotipi segreganti in F2 R85 x R5-2-10 o R112-4 ma con *Xcfa2240-el₁*) e un 85-90% dei controlli R5 e R112 (*Xcfa2240-el₁* nel *background* di Simeto) (Tab. 25 e Fig. 24 e 25).

Tabella 25: Media (%) $\pm$ errore (%) standard del numero di spighe infette (NDS) a 7, 14 e 21 giorni dopo infezione con *Fusarium* spp.

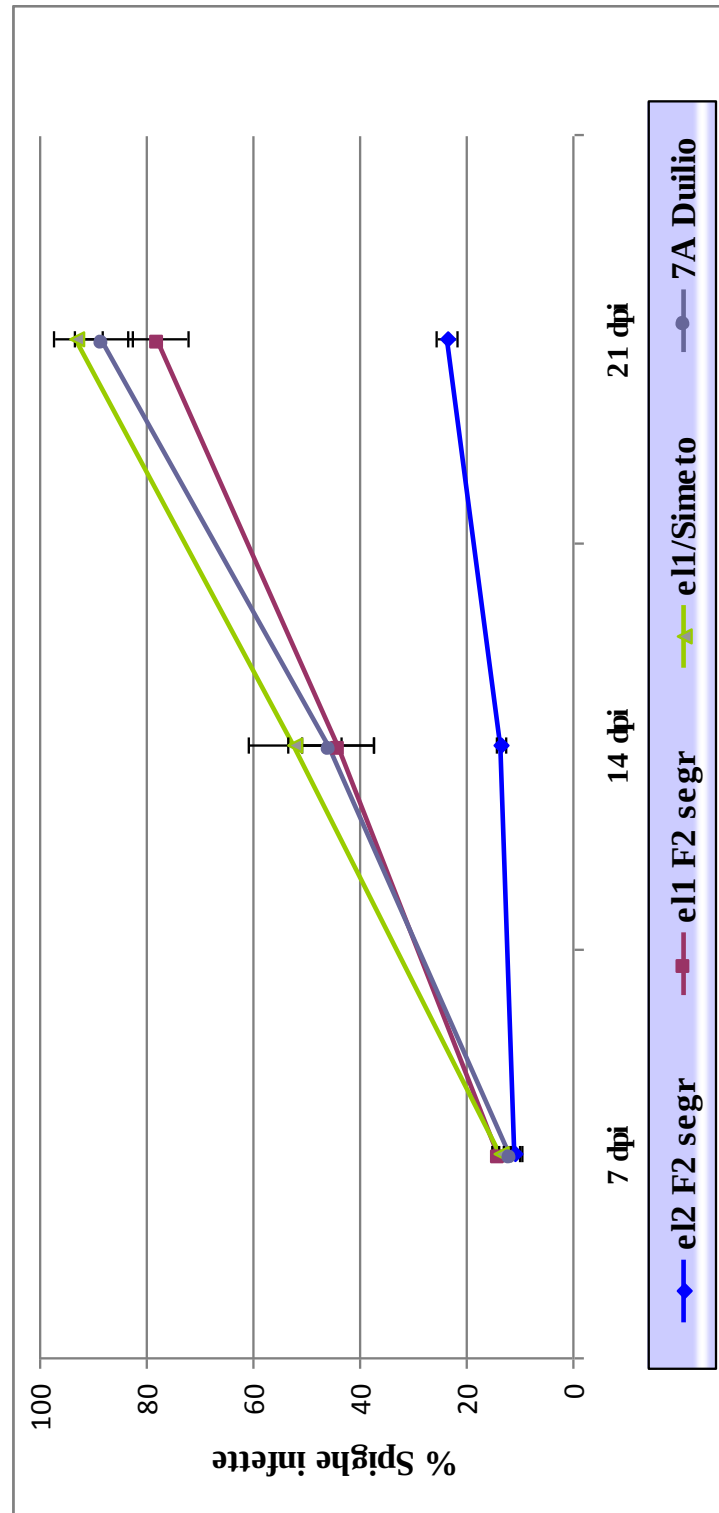
Genotipo	Allele	Media (%) $\pm$ SE(%)		
		7 dpi	14 dpi	21 dpi
A	<i>el₂</i> F2 segr.	10 $\pm$ 1.	13 $\pm$ 1	23 $\pm$ 2
B	<i>el₁</i> F2 segr.	14 $\pm$ 1	44 $\pm$ 7	78 $\pm$ 6
C	<i>el₁</i> / Simeto	13 $\pm$ 1	52 $\pm$ 9	93 $\pm$ 5
D	7A Duilio	12 $\pm$ 2	45 $\pm$ 8	88 $\pm$ 6

Risulta evidente che anche nel frumento duro, come nel tenero, la risposta di resistenza alla fusariosi della spiga (Tipo II) è conferito dal QTL *FHBres-7el₂* di *Th. ponticum* derivante dalla linea di traslocazione centrica KS24, confermando di nuovo l'associazione stretta del QTL con il marcatore CFA2240.

Figura 24 Fenotipo di alcune linee di frumento duro inoculate con *Fusarium* spp. al 21d.p.i.; R85 (OM+ QTL*Fhb*) resistente, R112-4 ed R85 (OM- QTL*Fhb*) suscettibili.



Figura 25 Risposta dei due gruppi ricombinanti 7AL/7eL e delle due linee di controllo all'infezione con *Fusarium* spp.: percentuali delle spighette infette a 7, 14 e 21 giorni dopo l'inoculazione (d.p.i.).

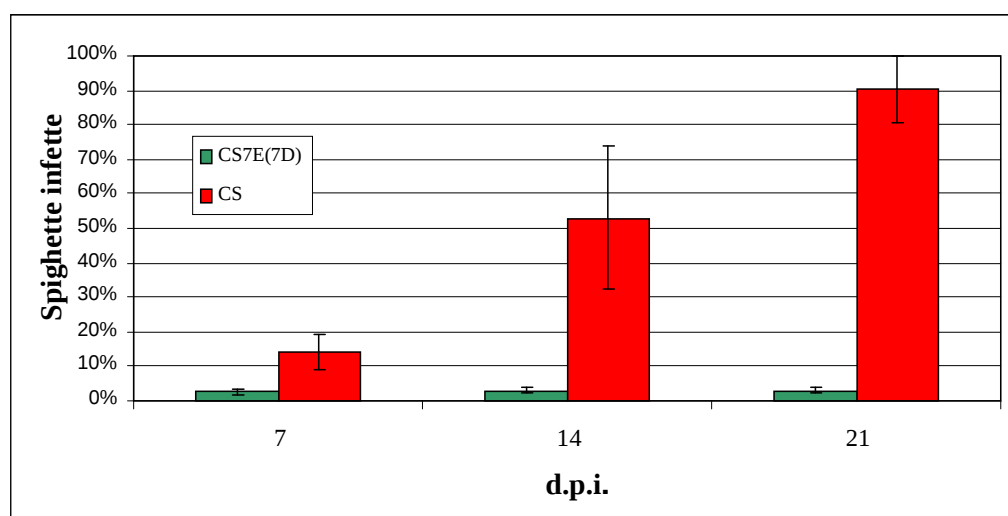


4.1 Selezione e caratterizzazione di ricombinanti 7e₁L+ 7E in frumento tenero

Per il programma di *pyramiding* in frumento tenero dei geni di resistenza derivanti dalle specie selvatiche *Thinopyrum ponticum* (*Lr19*, *Sr25*, *Yp*), decaploide, e *Th. elongatum* (QTL *Fhbres-7E*), diploide, si sono scelte come linee parentali rispettivamente la linea di traslocazione T4 e la linea di sostituzione CS7E(7D), entrambe esaploidi (§ 1.5e 2.1.1).

Come indagine preliminare e per la validazione dell'effetto di resistenza del QTL *Fhbres-7E* verso patotipi italiani di *Fusarium* spp. sono state inoculate (vedi § 2) 5 piante per ciascuna linea parentale. Come evidenzia il grafico in Figura 26 a 21 d.p.i. la linea CS7E(7D) mostrava una quasi totale resistenza, limitando lo sviluppo del patogeno ai soli fiori centrali inoculati (3% NDS), mentre la varietà CS mostrava una media del 90% di spighe malate. Appare chiaro che, in tale background genetico, l'effetto di questo gene/QTL del *Th. elongatum* è molto efficace nel contrastare il patogeno.

Figura 26. Risposta all'infezione con *Fusarium* spp. delle linee di tenero CS7E(7D), con il QTL *Fhbres-7E*, e la relativa varietà di controllo suscettibile CS a 7, 14 e 21 d.p.i..

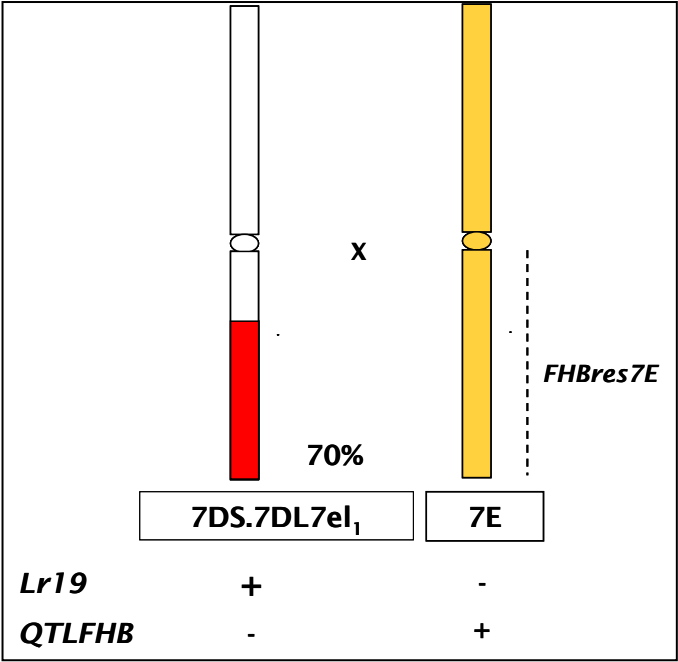


La prima evidenza della possibilità di ottenere piante ricombinanti dall'incrocio tra le due linee (Fig. 27) deriva da studi della frequenza di appaiamento tra le porzioni dei cromosomi, presumibilmente omeologhi, 7E (di *Th. elongatum*) e 7e₁ o 7Ag (*Th. ponticum*), presenti, rispettivamente, in sostituzione dell'intero 7D o del 70% del suo braccio lungo (7DL) delle linee parentali. Tali studi (Dvorak, 1975, vedi § 1.5) riportavano bassa frequenza di appaiamento (circa 13%) tra i due cromosomi 7DS.7DL/7e₁ e 7ES./7EL.

Inizialmente, per ovviare a questa bassa aspettativa di recupero di individui ricombinanti, si è pensato di adottare una strategia di ingegneria cromosomica basata sull'uso della linea mutante *CSph2a*, in grado di indurre un grado "intermedio" di appaiamento tra cromosomi omeologhi,

meno forte di quello generato dall'assenza del gene *Ph1* (vedi § 1.4), probabilmente sufficiente al caso in questione, in cui i cromosomi 7E e 7el1 sembrano omeologhi “affini”. Per portare la mutazione *ph2a* in omozigosi, ciascuna linea parentale, CS7E(7D) e T4, è stata incrociata con il mutante *CSph2a* (vedi § 5), con l'idea di effettuare un successivo incrocio tra le diverse F1 e selezionare la condizione recessiva *ph2a/ph2a* con opportuno marcatore (Whitford et al, 2007).

Fig. 27 Schema di incrocio per il *gene pyramiding* del QTL *Fhbres.7E* di *Th elongatum* e i geni *Lr19*, *Sr25* e *Yp* di *Th. ponticum* (7el₁).

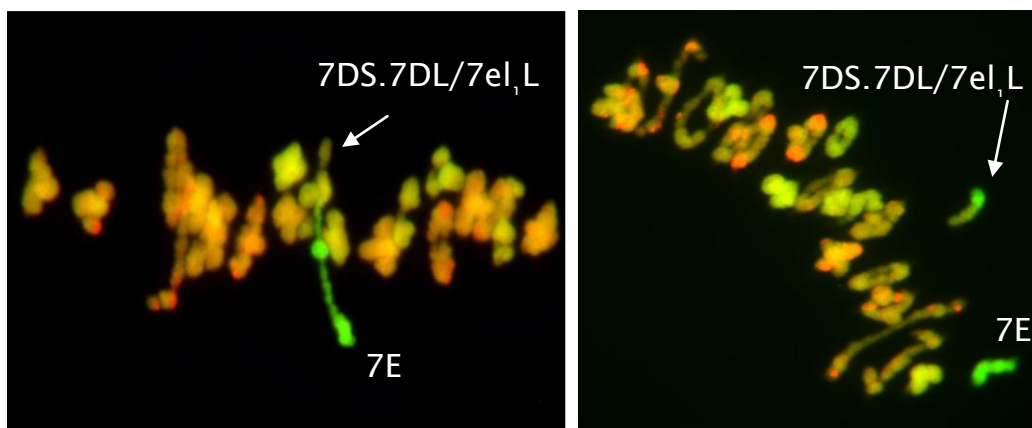


Nel frattempo, analisi GISH alla metafase I meiotica (MI) di cellule madri del polline prelevate da piante F1 [CS7E(7D) x T4], senza alcuna variazione ai loci *Ph1* o *Ph2*, hanno mostrato una frequenza di appaiamento del 21% tra le regioni omeologhe 7EL e 7el₁L (Tab. 27 e Fig. 28).

Tabella 26. Studio di appaiamento dei cromosomi ricombinanti alla metafase I meiotica di piante F1 [(CS7E(7D) x T4)].

N° cellule	N° cellule con appaiamento 7el ₁ -7E	N° cellule con 7el ₁ e 7E non appaiati (univalenti)	% di cellule con appaiamento 7el ₁ -7E
102	22	90	21

Figura 28. GISH di cromosomi meiotici di piante F1CS7E(7D) x T4: a sinistra, appaiamento bivalente aperto (ROD) tra le porzioni omeologhe dei cromosomi 7DS.7DL/7el₁ e 7ES./7EL; a destra gli stessi cromosomi non appaiati (univalenti). DNA genomico di *Th. ponticum* / *elongatum* rilevato con FITC (verde brillante); DNA genomico di frumento tenero rilevato con Cy3 (gialloarancio genoma A e B, verde pallido genoma D).



Quindi, la selezione per genotipi ricombinanti è iniziata già nelle progenie di incrocio di piante F1 (CS7E(7D) x T4) con la cv. di frumento tenero Blasco.

Per identificare ricombinanti 7E/7el₁ in un background *Ph2* normale o eventualmente mutato, sono stati testati diversi marcatori molecolari di tipo EST ed SSR. Si è proceduto testando quelli già polimorfici tra le due accessione del decaploide (7el₁ e 7el₂), mappati precedentemente dal nostro gruppo e durante il corso del dottorato (Gennaro et al., 2010; Kuzmanovic, 2011; Ceoloni et al., 2013), e quelli noti in letteratura (Mullan et al., 2005; Shen e Ohm, 2006) (Tab. 27 e Fig. 29).

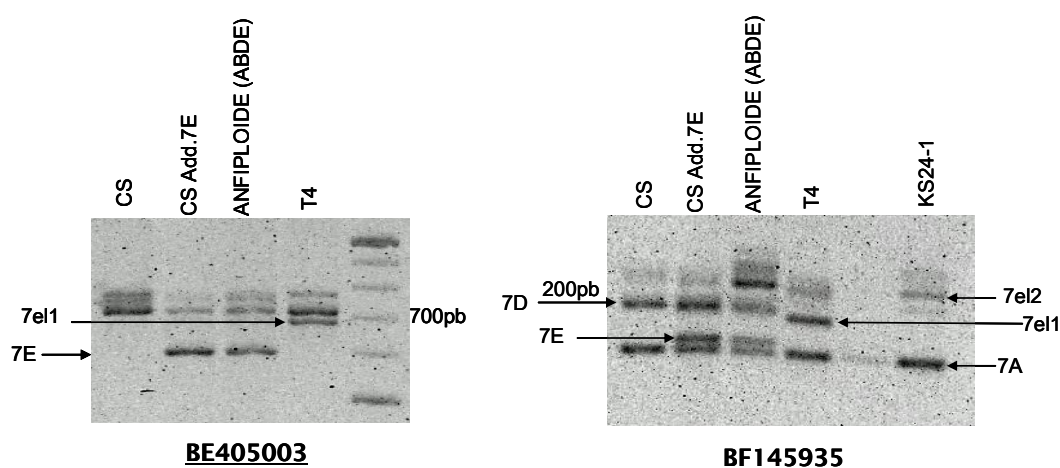
Non essendo nota la posizione del QTL *Fhbres-7E* sul braccio lungo del 7E (vedi Introduzione), sono stati inizialmente ricercati eventuali polimorfismi per marcatori localizzati nella zona telomerica del 7el₂L, dove è localizzato il QTL *FHBres-7el₂* di *Th. ponticum*, per poi continuare lungo tutto il braccio lungo del cromosoma 7E. Questo è sembrato un approccio logico, vista la generale sintenia e colinearità che mostrano cromosomi omeologhi di varie Triticeae e di specie di *Thinopyrum* in particolare (vedi Introduzione § 1.5.1 e Ceoloni et al., 2013).

Anche per questo gruppo di materiali si è fatto ricorso all'ibridazione *in situ* genomica per la caratterizzazione delle entità fisica dei segmenti 7el₁/7E nelle progenie selezionate come ricombinanti sulla base dei dati di mappa genetica.

Tabella 27. Elenco marcatori saggiati ed effettivamente impiegati per la relativa specificità allelica, In rosso sono evidenziati quelli mappati nel corso della tesi di dottorato.

N° di marcatori PCR saggiati	N° di marcatori PCR usati	Specificità allelica	Marcatori
28	14	7el ₁	STSLr19, BE445653, BARC1075
		7E	GWM344, GWM282, GWM333, EDM16, EDM105, WMS471, WMS573
		7el ₁ /7E	Mag1932, BF145935, BE405003, Psy1F5/1-2(56°).

Figura 29 Profilo di amplificazione di due marcatori telomerici codominanti, mappati nel corso del dottorato ed utilizzati per la selezione genotipica.



La caratterizzazione citogenetica delle 65 piante derivanti dall'incrocio delle F1 (CS7E(7D) x T4) con la cv. Blasco o con la linea mutante CS ϕ h2a (ma la mutazione in eterozigosi, quindi non attiva) ha permesso di isolare individui ricombinanti spontanei con varie combinazioni di marcatori 7E/7el₁.

In Tabella 28 vengono schematizzati i risultati della selezione genotipica con i marcatori molecolari e della caratterizzazione fisica con ibridazione *in situ* genomica.

Come atteso dalla frequenza di appaiamento del 20%, il numero di ricombinanti 7E/7el₁ è risultato pari all'11% della progenie; delle 7 linee ricombinanti, 5 erano del tipo desiderato 7DS.7DL/7el₁L-7EL, in cui la combinazione di porzioni cromosomiche omeologhe è avvenuta sul cromosoma che recava meno cromatina estranea (70% del braccio lungo del 7DL, come la linea parentale T4). Tra queste cinque linee la quantità relativa di cromatina 7el₁ verso 7E cambia, come rivelato dalle diverse combinazioni di geni e marcatori (Fig. 25); d'altra parte, con i marcatori a disposizione i due ricombinanti sul cromosoma 7E (7ES.7EL/7el₁L) sembrano identici (Fig. 25).

Entro i cromosomi ricombinanti, può essere verificata la presenza dei geni derivanti da *Th ponticum* (Lr19, Yp e Sr25), di cui è nota la localizzazione fisica (Ceoloni et al., 2005, 2013),

mentre non è possibile al momento stabilire la presenza o meno del QTL *FHBres* di *Th. elongatum*. Ciò sarà possibile quando questi ed eventuali ulteriori ricombinanti saranno portati in omozigosi ed inoculati con FHB, quindi con un riscontro genotipo-fenotipo.

Tabella 28 Selezione degli individui eterozigoti derivanti dall'incrocio (CS7E(7D) x T4) x c.v. Blasco/CSph2a; sono rappresentati il numero di individui per ciascun genotipo e la relativa percentuale sul totale della progenie esaminata

F1	Parentale 7el ₁	Parentale 7E	Ric. 7D/7el ₁	Ric. su 7E	Rottura e fusione centrica 7E / 7D	Aneuploidi (2n=41) 7D	Copresenza 7D, 7el ₁ e 7E
65	16	18	5	2	5	14	5
%	25	27	8	3	8	21	8
			11				

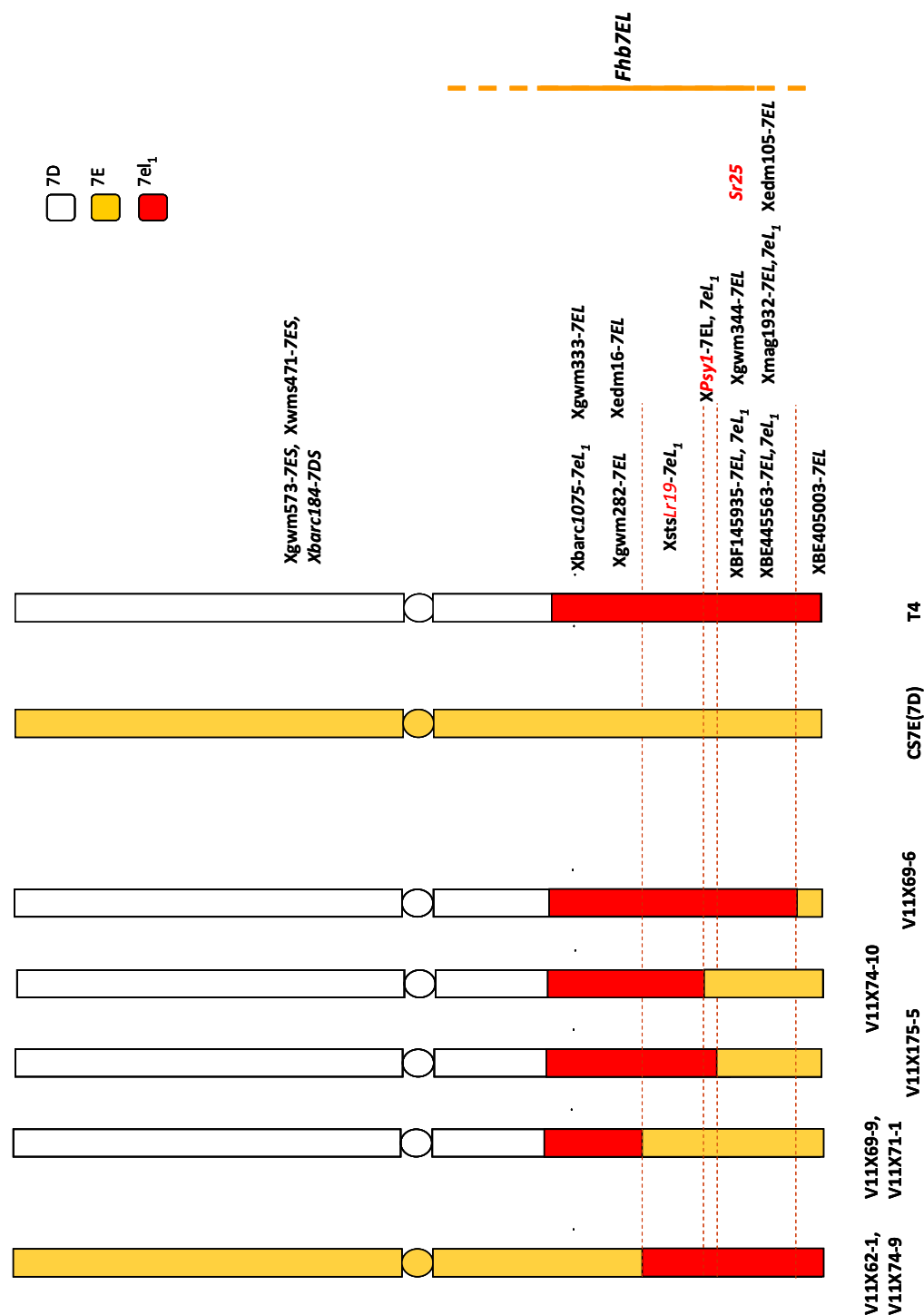
Oltre ai ricombinanti descritti (Fig. 25), nelle progenie di [(CS7E(7D) x T4) x cv. Blasco o x CSph2a] sono state rinvenuti altre genotipi, probabilmente generatisi da meiociti delle piante F1 in cui i cromosomi 7E e 7el₁ non si sono appaiati. In quanto univalenti (Fig. 28), i cromosomi 7E e 7el₁ in un certo numero di cellule hanno avuto una segregazione irregolare, dando luogo a gameti con entrambe o nessuno dei due; questi, dopo fecondazione con gameti di Blasco o CSph2a, hanno prodotto piante con copresenza dei cromosomi 7E, 7el₁ e 7D, oppure piante a 2n = 41 con un unico cromosoma del gruppo 7, cioè il 7D (Tab. 28).

Inoltre, sempre per la condizione univalente, i suddetti cromosomi sono andati anche incontro a fenomeni di rottura e fusione centrica, generando tipi cromosomici che recano un braccio 7E, a volte il braccio corto (7ES) a volte quello lungo (7EL), su di altro cromosoma che le indagini GISH finora condotte indicano essere l'omeologo 7D.

Progenie di reinrocio (BC1) sono state ottenute per le linee ricombinanti potenzialmente utili e per una in particolare (V11x74-10) sono già state raccolte le progenie BC1F2. Tale linea è risultata interessante perché durante la selezione genotipica è emersa una dissociazione tra il gene *Lr19* e il gene *Yp-7el₁*, piuttosto inattesa, data la stretta associazione tra *Lr19* e *Yp*, a favore di una nuova forma di associazione tra il gene *Lr19* e il gene *Yp-7E* ancora da monitorare per gli effetti che potrebbe apportare sulla colorazione delle farine.

Sui ricombinanti omozigoti già isolati o in corso di selezione saranno condotte indagini, con infezioni in condizioni controllate, per la verifica del fenotipo di resistenza/suscettibilità, sia verso FHB che, per ulteriore validazione del “*gene pyramiding*” desiderato, verso le altre fitopatie per le quali i geni derivanti dal *Th. ponticum* (*Lr19* e *Sr25*) rappresentano finora valide fonti di resistenza.

Figura 30 Mappa citogenetica delle linee parentali e dei ricombinanti selezionati nella generazione di incrocio F1(CS7E(7D) x T4) x varietà di tenero e/o la linea mutante CSph2a.



BIBLIOGRAFIA

- Adom KK, Sorrells ME, Hai LR (2003) Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties. *J Agric Food Chem* 51: 7825-7834.
- Ainsworth Elizabeth A. and Donald R. Ort (2010). How Do We Improve Crop Production in a Warming World? *Plant Physiology*, October 2010, Vol. 154, pp. 526–530.
- Ayala-Navarette, L., Bariana, H.S., Singh, R.P., Gibson, J.M., Mechanicos, A.A. Larkin, P.J. 2007. Trigenomic chromosomes by recombination of *Thinopyrum intermedium* and *Th. ponticum* translocations in wheat. *Theor Appl Genet*, 116: 63-75.
- Akinsanmi OA, Mitter V, Simpfendorfer S, Backhouse D, Chakraborty S, 2004. Identity and pathogenicity of *Fusarium* spp. isolated from wheat fields in Queensland and northern NewSouthWales. *Australian Journal of Agricultural Research* 55, 97–107.
- Akhunov, E.D., Goodyear, A.W., Geng, S., Qi, L-L., Echaliier, B., Gill, B., Miftahudin, Gustafson, J.P., Lazo, G., Chao, S., Anderson, O.D., Linkiewicz, A.M., Dubcovsky, J., La Rota, M., Sorrells, M.E., Zhang, D., Nguyen, H.T., Kalavacharla., V., Hossain., K., Kianian., S.F., Peng, J., Lapitan, N.L.V., Gonzalez-Hernandez, J.L., Anderson, J.A., Choi, D-W., Close, T.J., Dilbirligi, M., Gill, K.S., Walker- Simmons, M.K., Steber, C., McGuire, P.E., Qualset, C.O., Dvorak, J. The organization and rate of evolution of wheat genomes are correlated with recombination rates along chromosome arms. *Genome Research*, 13: 753-763.
- [Akhunova](#) A. R, [Macmil](#) S. L, [Qu](#) C. , [Wang](#) P., [Wiley](#) G. B., [Kenton](#) S., [Roe](#) B. A., [Akhunov](#) E. D.. 2009. SNP Discovery In Polyploid Wheat Using 454 Sequencing Technology. Plant & Animal Genomes XVII Conference January 10-14, 2009Town & Country Convention Center San Diego, CA.
- Anamthawat-Jónsson 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.
- Anamthawat-Jonsson, K. and Reader M.S., 1995. Pre-annealing of total genomic DNA for simultaneous genomic *in situ* hybridization. *Genome* 38: 814-816.

- Anderson, J.A., S. Chao, and S. Liu. 2007. Molecular breeding using a major QTL for Fusarium head blight resistance in wheat. *Crop Science* 47 (S3):S112–S119. doi:10.2135/cropsci2006.05.0359
- Amita Mohan, Aakash Goyal, Ravinder Singh, Harindra S. Balyan, and Pushpendra K. Gupta, (2007). Physical Mapping of Wheat and Rye Expressed Sequence Tag–Simple Sequence Repeats on Wheat Chromosomes. *The Plant Genome [A Supplement to Crop Science]* January 2007 No. 1. doi:10.2135/cropsci2006-06-0376tpg
- Badea A, Eudes F, Graf RJ, Laroche A, Gaudet DA, Sadasivaiah RS (2008) Phenotypic and marker-assisted evaluation of spring and winter wheat germplasm for resistance to fusarium head blight. *Euphytica* 164: 803–819.
- Balmas V, Santori A, Corazza L (2000) Le specie di *Fusarium* più comuni in Italia: suggerimenti per il loro riconoscimento. *Petria* 10, suppl 1: 1-60.
- Bai GH (2001) Deoxivalenol- nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia* 153: 91–98.
- Ban T. (2001). Studies on the genetics of resistance to Fusarium head blight caused by *F. graminearum* Schwabe in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Bull. Kyushu Natl. Agric. Exp. Stn*, 38: 27–78.
- Ban T (2000) Review studies on the genetics of resistance to Fusarium head blight caused by *Fusarium graminearum* in wheat. In *Proceedings of the International Symposium on Wheat Improvement for Scab Resistance*, Suzhou and Nanching, China, 5–11 May 84 2000. Edited by J. Raupp, Z. Ma, P. Chen, and D. Liu. Kansas State University Printing, Manhattan, Kans pp. 82–93.
- Borlaug 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.

- Brenchley R, Spannagl M, Pfeifer M., Barker G.L.A, D'Amore R., Allen A. M, McKenzie N., Kramer M., Kerhornou A., Bolser D., Kay S., Waite D., Trick M., Bancroft I, Gu Y., Huo N., Luo M.C., Sehgal S., Gill B., Kianian S, Anderson O., Kersey P., Dvorak J., McCombie W., Hall A., Mayer K. F. X, Edwards K. J., M. W. Bevan & N. Hall. Analysis of the breadwheat genome using whole-genome shotgun sequencing 2012. Nature, volume 491, pp 705-710. doi:10.1038/nature11650
- Bournival B, Obanni M, Abad A, Ohm H, Mackenzie S (1994) Isolation of a new species-specific repetitive sequence from *Thynopyrum elongatum* and its use in studies of alien translocations. Genome 37: 97-104.
- Buerstmayr H, Lemmens M, Hartl L, Doldi L, Steiner B, Stierschneider M, Ruckenbauer P (2002) Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (type II resistance). Theor Appl Genet 104: 84-91.
- Buerstmayr H, Steiner B, Hartl L, Griesser M, Angerer N, Lengauer D, Miedaner T, Schneider B, Lemmens M (2003a) Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. II. Resistance to fungal penetration and spread. Theor, Appl Genet 107: 503-508.
- Buerstmayr H, Ban T, Anderson JA (2009) QTL mapping and marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat: a review. Plant Breeding 128: 1-26.
- Cai J., 2012. Mapping Qtl For *Fusarium* Head Blight Resistance In Chinese Wheat Landraces. B.S., Xuzhou Normal University, China, 2008. A Thesis-submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree - Master Of Science- Department of Agronomy College of Agriculture, Kansas State University, Manhattan, Kansas 2012
- Cai X, Chen PD, Xu SS, Oliver RE and Chen X (2005) Utilization of alien genes to enhance *Fusarium* head blight resistance in wheat – A review. Euphy 142: 309-318.
- Campagna C, Haidukowski M, Pancaldi D, Pascale M, Ravaglia S, Silvestri M, Visconti A (2005) Fonti di rischio e gestione delle micotossine nel frumento. L'Informatore Agrario 2005
- Ceoloni C (1987) Current methods of chromosome engineering in wheat. In: EWAC (European Wheat Aneuploid Cooperative) News 1987: 95-109.

- Ceoloni C, Biagetti M, Ciaffi M, Forte P, Pasquini M (1996) Wheat chromosome engineering at the 4x level: the potential of different alien gene transfers into durum wheat. *Euph* 89: 87-97.
- Ceoloni C, Vitellozzi F, Forte P, Basili F, Biagetti M, Bitti A, Delre V (1998) Wheat chromosome engineering in the light of advanced genetic and cytogenetic marker-mediated approaches. In: *Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement*, ed. T. Lele, WUV-Universitätsverlag, pp: 43-53.
- Ceoloni C, Forte P, Gennaro A, Micali S, Carozza R, Bitti A (2005a) Recent developments in durum wheat chromosome engineering. *Cytogenet Genome Res* 109: 328-334.
- Ceoloni C, Pasquini M, Simeone R (2005b) The cytogenetic contribution to the analysis and manipulation of the durum wheat genome. In: *Durum wheat breeding: current approaches and future strategies*, Royo C, Nachit MM, Di Fonzo N, Araus J-L, Pfeiffer WH, Slafer GA (eds.). The Haworth Press, New York, USA.
- Ceoloni C, Jauhar PP (2006) Chromosome engineering of the durum wheat genome: Strategies and applications of potential breeding value. In: *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement*.
- Ceoloni C, Kuzmanović L, Gennaro A, Forte P, Giorgi D, Grossi MR, Bitti A (2013) Genomes, chromosomes and genes of perennial Triticeae of the genus *Thinopyrum*: the value of their transfer into wheat for gains in cytogenomic knowledge and 'precision' breeding. In: *Advances in Genomics of Plant Genetic Resources*. Tuberosa R, Graner A, Frison E (Eds.), Springer (in stampa)
- Chakraborty S, Luck J, Hollaway G, Fitzgerald G, White N, 2010. Rust-proofing wheat for a changing climate. BGRI 2010 Technical Workshop, 30–31 May 2010, St. Petersburg, Russia. [<http://www.globalrust.org/db/attachments/bgriwc/21/2/10-Chakraborty-A4-ca-embargo.pdf>].
- Chakraborty S, Luck J, Hollaway G, Fitzgerald G, White N, 2011. Rust-proofing wheat for a changing climate. *Euphytica* 179:19–32.
- Chakraborty S. and A. C. Newton, 2011. Climate change, plant diseases and food security: an overview. *Plant Pathology* 60:2-14.

- Chao S, Zhang W, Akhunov E, Sherman J, Ma Y, Luo MC, Dubcovsky J (2009) Analysis of gene-derived SNP marker polymorphism in US wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Molecular Breeding* 23: 23-33.
- Chen HM, Li LZ, Wei XY, Li SS, Lei TD, Hu HZ, Wang HG, Zhang XS (2005) Development, chromosome location and genetic mapping of EST-SSR markers in wheat. *Chin Sci Bull* 50:2328–2336
- Chen P.D., Liu W, Yuan J, Wang X, Zhou B, Wang S, Zhang S, Feng Y, Yang B, Liu G, Liu D, Qi L, ZhangP, Friebe B, and Gill BS (2005b) Development and characterization of wheat-*Leymus racemosus* translocation lines with resistance to Fusarium HeadBlight. *Theor Appl Genet* 111: 941-948
- Chen Q, Conner RL, Laroche A, Thomas JB (1998) Genome analysis of *Thinopyrum intermedium* and *Thinopyrum ponticum* using genomic in situ hybridization. *Genome* 41: 580-586.
- Chen Q (2005) Detection of alien chromatin introgression from *Thinopyrum* into wheat using S genomic DNA probe – a landmark approach for *Thinopyrum* genome research. *Cytogenet Genome Res* 109: 350-359.
- Colmer TD, Flowers TJ, Munns R (2006) Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *J Exp Bot* 57:1059-1078.
- Cox, T.S., 1998. Deepening the wheat gene pool. *J. Crop Prod.* 1, 1–25.
- Cuadrado A, Vitellozzi F, Jouve N, Ceoloni C (1997) Fluorescence in situ hybridization with multiple repeated DNA probes applied to the analysis of wheat/rye chromosome pairing. *Theor Appl Genet* 94: 347-355.
- Curtis BC, Rajaram S, Go´mezMacpherson H, eds, 2002. Bread Wheat Improvement and Production. Rome, Italy: FAO: Plant Production and Protection Series.
- D'Egidio MG, Desiderio E (2006). Qualità e sicurezza nel grano duro. Supplemento a L'informatore Agrario n.1 al numero del 17/23 marzo 2006, 9-11.

- Dellaporta S.L., Wood J. and Hicks J.B., 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Report* 1 (4): 19-21.
- Devos, K.M., Gale, M.D. 2000. Genome relationships: the grass model in current research. *The Plant Cell*, 12: 637-646.
- Devos, K.M. 2010. Grass genome organization and evolution. *Current Opinion in Plant Biology*, 13: 139-145.
- Dewey DR (1984) The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial Triticeae. In: Gustafson JP (ed.) *Gene manipulation in plant improvement*. Plenum Publ Corp, New York pp: 209-279
- Dvorak, J. and Knott, D. R. 1974. Disomic and ditelosomic addition of diploid *Agropyron elongatum* chromosome to *Triticum aestivum*. *Can. J Genet Cytol* 16: 399-417.
- Dvorak, J., 1975. Meiotic pairing between single chromosomes of diploid *Agropyron elongatum* and decaploid *A. elongatum* in *Triticum aestivum*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 17: 329-336.
- Dvorak J., Knott DR., 1977. Homoeologous chromatin exchange in radiation – induced gene transfer. *Can. J Genet Cytol* 19:125-131
- Dvorak J. 1980: Homology between *Agropyron elongatum* chromosome and *Triticum aestivum* chromosomes. *Can. J Genet Citol* 22: 237-259.
- Eizenga GC (1987) Locating the Agropyron segment in wheat-Agropyron 'transfer No.12'. *Genome* 29: 365-366.
- Ejaz M., Iqbal M., Shahzad A., Rehman A., Ahmed I., and Ghulam M. A. 2012. Genetic Variation for Markers Linked to Stem Rust Resistance Genes in Pakistani Wheat Varieties. *Crop Science*, Vol. 52, 2638- 2648.
- Edgerton M. D., 2009: Increasing Crop Productivity to Meet Global Needs for Feed, Food, and Fuel. *Plant Physiology*, January Vol. 149, pp. 7–13.
- FAO World Food Situation (2013). <http://www.fao.org/worldfoodsituation>; Release date: 07/03/2013

- Faris J.D., Laddomada B., Gill B.S. 1998. Molecular Mapping of Segregation Distortion Loci in *Aegilops tauschii*. *Genetics* 149: 319–327.
- Friebe B, Jiang J, D.R. Knott and B.S. Gill, (1996). Compensation indices of radiation-induced wheat-*Agropyron elongatum* translocations conferring resistance to leaf and stem rust. *Crop Sci.* 34: 400-404.
- Friebe B, Jiang J, Raupp WJ, McIntosh RA and Gill BS (1996) Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to disease and pests: current status. *Euphy* 91: 59-87.
- Feldman M, Sears ER (1981) The wild gene resources of wheat. *Sci Am* 244: 98-109.
- Feldman M, Lupton FGH and Miller TE (1995) Wheats. *In Evolution of crop plants*, ed. J. Smartt and N.W. Simmonds: Longman Group London 184-192.
- Fernandes JM, Cunha GR, Del Ponte E et al., 2004. Modelling fusarium head blight in wheat under climate change using linked process-based models. In: Canty SM, Boring T, Wardwell J, Ward RW, eds. 2nd International Symposium on Fusarium Head Blight; Incorporating the 8th European Fusarium Seminar; 2004, 11–15 December; Orlando, FL, USA. 441–4.
- Forte P, Kuzmanovic L, Gennaro A, Bitti A, Ceoloni C (2011) Using wild species of *Thinopyrum* genus in breeding wheat resistant to Fusarium head blight. *Proceedings of the Joint Meeting AGI-SIBV-SIGA*. Assisi, Italy, abstract 6A.21. ISBN 978-88-904570-2-9
- Francki M, Carter M, Ryan K, Hunter A, Bellgard M, Appels R (2004) Comparative organization of wheat homeologous group 3S and 7L using wheat-rice synteny and identification of potential markers for genes controlling xanthophyll content in wheat. *Genomics* 4: 118-130.
- Fuentes RG, Mickelson HR, Busch RH, Dill-Macky R, Evans CK, Thompson WG, Wiersma JV, Xie W, Dong Y, Anderson JA (2005) Resource allocation and cultivar stability in breeding for Fusarium head blight resistance in spring wheat. *Crop Sci* 45: 1965-1972.
- Gall JG, Pardue ML (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 63: 378-383.

- Gadaleta A, Giancaspro A, Giove SL, Zacheo S, Blanco A (2009) Genetic and physical mapping of new EST-derived SSRs on the A and B chromosomes of wheat. *Theor Appl Genet* 188: 1015-1025.
- Gennaro, A. 2006. Caratterizzazione citogenetica e molecolare di linee ricombinanti frumento duro - *Thinopyrum ponticum*. Tesi di dottorato in Biotecnologie Vegetali, Università della Tuscia, Viterbo, Italia.
- Gennaro A., Forte, P., Carozza R., Savo Sardaro, M.L., Ferri, D. , Bitti, A., Borrelli, G.M., D'Egidio, M.G, Ceoloni, C. 2007. Pyramiding different alien chromosome segments in durum wheat: feasibility and breeding potential. "Israel Journal of Plant Sciences" 55(3-4):267-276
- Gennaro A, Koebner RMD, Ceoloni C., (2009). A candidate for *Lr19*, an exotic gene conditioning leaf rust resistance in wheat. *Funct Integr Genomics* 9: 325-334.
- Gennaro, A., Kuzmanovic, L., Forte, P., Lattanzi, G., Grossi, R., Bitti, A., Giorgi, D., Quarrie, S.A., Ceoloni, C. 2010. Genetic and cytogenetic maps of durum wheat- *Thinopyrum ponticum* recombinant chromosomes: a tool to finely describe triticeae 7L arms and to target alien traits. Proc. 54th Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress, Matera, Italy – 27/30 September, 2010, ISBN 978-88-904570-0-5
- Gennaro A, Forte P, Panichi D, Lafiandra D, Pagnotta MA, D'Egidio MG, Ceoloni C (2012) Stacking small segments of the 1D chromosome of bread wheat containing major gluten quality genes into durum wheat: transfer strategy and breeding prospects. *Mol Breed* 30: 149–167
- Gervais L, Dedryver F, Morlais JY, Bodusseau V, Negre S, Bilous M, Groos C, Trottet M (2003) Mapping of quantitative trait loci for field resistance to *Fusarium* head blight in an European winter wheat. *Theor Appl Genet* 106: 961-970.
- 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 JZ, Fourie M, Marais AS, Marais GF (2005) Extension and use of a physical map of the *Thinopyrum*-derived *Lr19* translocation. *Theor Appl Genet* 112: 131-138.

- Grossi MR (2010) (In Italian) Trasferimento di geni da specie selvatiche a frumento tramite ingegneria cromosomica: potenzialita di questa strategia ed eventuali ostacoli. PhD thesis. University of Tuscia, Viterbo, Italy.
- Gupta P.K., Balyan H.S., Edwards K.J., Isaac P., Korzun V., Röder M., Gautier M-F., Joudrier P., Schlatter A.R., Dubcovsky J., De la Pena R.C., Khairallah M., Penner G., Hayden M.J., Sharp P., Keller B., Wang R.C.C., Hardouin J.P., Jack P. and Leroy P., 2002. Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat. *Theor Appl Genet* 105: 413-422.
- Haile J. K., Nachit M. M., Hammer K., Badebo A., Roder Marion S., 2012. QTL mapping of resistance to race Ug99 of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Mol Breeding* 30:1479–1493
- Hajjar R. and. Hodgkin T., (2007). The use of wild relatives in crop improvement: A survey of developments over the last 20 years. *Euphytica* 156:1–13
DOI 10.1007/s10681-007-9363-0
- Harcz P, Tangni EK, Wilmart O et al., 2007. Intake of ochratoxin A and deoxynivalenol through beer consumption in Belgium. *Food Additives & Contaminants: Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* 24, 910–6.
- Hohmann U, Graner A, Endo TR, Gill BS (1995) Comparison of wheat physical maps with barley linkage maps for group 7 chromosomes. *Theor Appl Genet* 91: 618-626.
- Hoisington D, Khairallah M, Reeves T, Ribaut JM, Skovmand B, Taba S, Warburton M (1999) Plant genetic resources: what they can contribute toward increased crop productivity? *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 96: 5937-5943.
- Hossain KG, Kalavacharla V, Lazo GR, Hegstad J, Wentz MJ, Kianian PMA, Simons K, Gehlhar S, Rust JL, Syamala RR, Obeori K, Bhamidimarri S, Karunadharma P, Chao S, Anderson OD, Qi LL, Echalié B, Gill BS, Linkiewicz AM, Ratnasiri A, Dubcovsky J, Akhunov ED, Dvor J, Miftahudin, Ross K, Gustafson JP, Radhawa HS, Dilbirligi M, Gill KS, Peng JH, Lapitan NLV, Greene RA, Bermudez-Kandianis CE, Sorrells ME, Feril O, Pathan MS, Nguyen HT, Gonzalez-Hernandez JL, Conley EJ, Anderson JA, Choi DW, Fenton D, Close TJ, McGuire PE, Qualset CO, Kianian SF (2004) A Chromosome Bin Map of 2148 Expressed Sequence Tag Loci of Wheat Homoeologous Group 7.

- Hu L.J., Liu C. Zeng·Z.X., Li G.R., Song X.J., Yang Z.J., (2012) Genomic rearrangement between wheat and *Thinopyrum elongatum* revealed by mapped functional molecular markers. *Genes & Genomics* 34: 67-75
- Huang YJ, Evans N, Li Z. Q et al., 2006. Temperature and leaf wetness duration affect phenotypic expression of Rlm6-mediated resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist* 170, 129–41.
- Huang, S., Sirikhachornkit, A., Faris, J.D., Su, X., Gill, B.S., Haselkorn, R., Gornicki, P., 2002b. Phylogenetic analysis of the acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase loci in wheat and other grasses. *Plant Mol. Biol.* 48, 805–820.
- Hurst LD (1993) A model for the mechanism of transmission ratio distortion and for associated hybrid sterility. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 253: 83-91.
- Ittu M, Saulescu NN, Hagima I, Ittu G, Mustatea P (2000) Association of fusarium head blight resistance with gliadin loci in a winter wheat cross. *Crop Sci* 40: 62-67.
- Kibirige-Sebunya I, Knott DR (1983) Transfer of stem rust resistance from an *Agropyron* chromosome having a gametocidal effect. *Can J Genet Cytol* 25: 215-221.
- Kihara H (1919) Über cytologische Studien bei einige Getreidearten I. Spezies-Bastarde des Weizens und Weizenroggen-Bastarde *Bot Mag* 32: 17-38.
- Kihara H., (1924). Cytologishe und genetische Studien bei wichtigen Getreidearten. I. Spezies-Bastarde des Weizens und Weizenroggen-Bastarde. *Bot. Mag.* 32: 17-38.
- Kim NS, Armstrong K, Knott DR (1993) Molecular detection of *Lophopyrum* chromatin in wheat-*Lophopyrum* recombinants and their use in physical mapping of chromosome 7D. *Theor Appl Genet* 85:561-567.
- Knott DR (1961) The inheritance of rust resistance VI. The transfer of stem rust resistance from *Agropyron elongatum* to common wheat. *Can J Plant Sci* 41: 109–123.
- Knott DR (1971) The transfer of genes for disease resistance from alien species to wheat by induced translocations. In: *Mutation breeding for disease resistance*. IAEA, Vienna: 67-77.

- Knott, D.R., Dvorak, J, and Nanda, J.S. 1977. The transfer to wheat and homoeology of an *Agropyron elongatum* chromosome carrying resistance to stem rust. Can, J. Genet. Cytol., 19: 75-79.
- Knott DR (1980) Mutation of a gene for yellow pigment linked to Lr19 in wheat. Can J Genet Cytol 22: 651-654.
- Knott DR (1989) The wheat rusts – breeding for resistance. Theoretical and Applied Genetics Monograph No. 12. Springer, Berlin, Germany
- Koebner R.M.D. 2005. Molecular markers in wheat: what is possible and what is plausible. In: Atti del Convegno *Approcci innovativi di miglioramento genetico dei frumenti coltivati basati sull'uso di germoplasma affine e tecniche di analisi molecolare*. Viterbo, 5-6 Dicembre 2005, Ed. C. Ceoloni e A. Gennaro, p. 13.
- 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.
- Kuzmanovic L (2011) Cytogenetic, physiological and agronomic characterization of wheat-*Thinopyrum ponticum* recombinant lines carrying relevant breeding traits. PhD Thesis, Department of Agriculture, Forestry, Nature and Energy (DAFNE), University of Tuscia, Viterbo, Italy.
- Kuzmanovic L, Gennaro A, Benedettelli S, Lattanzi G, Quarrie SA, Ceoloni C (2012) Effects on yield-related traits from introgression of *Thinopyrum ponticum* chromosomal segments onto the 7AL arm of durum wheat. In: Börner A, Kobijlski B (eds) Proceedings of the 15th Intern EWAC Conference, Novi Sad, Serbia. European Cereals Genetics Co-operative News 2012: 47-51.
- Jauhar PP (1990) Multidisciplinary approach to genome analysis in the diploid species, *Thinopyrum bessarabicum* and *Th. elongatum* (*Lophopyrum elongatum*) of the Triticeae. Theor Appl Genet 80:523-536 Jauhar PP (1990)
- Jauhar, P. P., T. S. Peterson And S. S. Xu, 2009 Cytogenetic and molecular characterization of a durum alien disomic addition line with enhanced tolerance to Fusarium head blight. Genome 52: 467-483.

- Jennings P, Coates ME, Walsh K, Turner JA, Nicholson P, 2004. Determination of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat crops in England and Wales. *Plant Pathology* 53, 643-652.
- Jain, S. K.; Prashar, M.; Bhardwaj, S. C.; Singh, S. B.; Sharma, Y. P., 2009. Emergence of virulence to *Sr25* of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* on wheat in India. *Plant Disease* Vol. 93 No. 8 pp. 840
- Jin Y, Singh RP, Ward RW, Wanyera R, Kinyua MG, Njau P, Fetch T Jr, Pretorius ZA, Yahyaoui A (2007) Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic *Sr* gene lines to race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Dis* 91:1096–1099
- Jin Y, Szabo LJ, Pretorius ZA, Singh RP, Ward R, Fetch T Jr (2008) Detection of virulence to resistance gene *Sr24* within race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Dis* 92:923–926
- Jin Y, Szabo LJ, Rouse MN, Fetch T Jr, Pretorius ZA, Wanyera R, Njau P (2009) Detection of virulence to resistance gene *Sr36* within the TTKS race lineage of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Dis* 93:367–370
- John HA, Birnstiel ML, Jones KW (1969) RNA-DNA Hybrids at the Cytological Level *Nature* 223: 582–587.
- Joppa LR, Klindworth DL, Hareland GA (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.
- J Song QJ et al. (2005) Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat *Theoretical and Applied Genetics* 110:550-560.
- Leitch AR, Schwarzacher T, Jackson D, Leitch IJ (1994) *In situ* Hybridization: a practical guide. Royal Microscop. Soc., Microscopy Handbooks 27, BIOS Scient Publ Ltd Oxford UK
- Li H, Wang X (2009) *Thinopyrum ponticum* and *Thinopyrum intermedium*: the promising source of resistance to fungal and viral diseases of wheat. *J Genet Genomics* 36: 557- 565.

- Liu Z, Li D, Zhang X (2007) Genetic relationships among five basic genomes St, E, A, B and D in Triticeae revealed by genomic southern and in situ hybridization. *J Integr Plant Biol* 49: 1080-1086
- Liu S, Gao X, Xia G (2008) Characterizing HMW-GS alleles of decaploid *Agropyron elongatum* in relation to evolution and wheat breeding. *Theor Appl Genet* 116:325–334.
- Liu, S., M.D. Hall, C.A. Griffey, and A.L. McKendry. 2009. Meta-analysis of QTL associated with *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Crop Sci.* 49:1955–1968. doi:10.2135/cropsci2009.03.0115
- Liu, S., Yu, L.X., Singh R.P., Jin, Y., Sorrels, M. E., Anderson, J. A. 2010. Diagnostic and co-dominant PCR markers for wheat stem rust resistance genes *Sr25* and *Sr26*. *Theor Appl Genet* 120:691–697
- Lops R, Pascale M, Pancaldi D, Visconti A (1998) Infezioni fungine e presenza di deossinivalenolo in cariossidi di frumento prodotte in diverse regioni italiane. *Inf Fitopatol* 48, 60-66.
- Luck J., Spackman M., Freeman A., Trębicki P., Griffiths W., Finlay K. and S. Chakraborty (2011). Climate change and diseases of food crops. *Plant Pathology* 60, 113–121
- Lukaszewski AJ (1995) Physical distribution of translocation breakpoints in homoeologous recombinants induced by the absence of the *Ph1* gene in wheat and triticale. *Theor Appl Genet* 90: 714-719.
- McIntosh RA, Wellings CR, Park RF (1995) Wheat rusts: An atlas of resistance genes. CSIRO Publications, East Melbourne, Australia.
- McIntosh RA, Yamazaki Y, Dubcovsky J, Rogers WJ, Morris CF, Somers D, Appels R, Devos KM (2008) Catalogue of gene symbols for wheat. *Gene Symbols*. In: McIntosh RA (ed). [http://wheat.pw.usda.gov/GG2/Triticum/wgc/Gene Symbol.pdf](http://wheat.pw.usda.gov/GG2/Triticum/wgc/Gene%20Symbol.pdf)
- Mahwish Ejaz, Muhammad Iqbal, Armghan Shahzad, Atiq-ur-Rehman, Iftikhar Ahmed, and Ghulam M. Ali. Genetic Variation for Markers Linked to Stem Rust Resistance Genes in Pakistani Wheat Varieties. *Crop Sci.* 52:2638–2648 (2012). doi: 10.2135/cropsci2012.01.0040

- Madgwick JW, West JS, White RP et al., 2011. Impacts of climate change on wheat anthesis and fusarium ear blight in the UK. *Eur. J. Plant Pathology* 130, 117–131
- Magan N, Medina A, Aldred D, 2011. Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food pre- and postharvest. *Plant Pathology* 60, 150–63.
- 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 GF (1992b) Gamma-irradiation induced deletions in an alien chromosome segment of the wheat ‘Indis’ and their use in gene mapping. *Genome* 35: 225-229.
- 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.
- Mentewab A, Rezanoor HN, Gosman N, Worland AJ, Nicholson P (2000) Chromosomal location of Fusarium head blight of Wheat and Barley. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota: 165-183.
- Mesterhazy A, Bartok T, Kaszonyi G, Varga M, Toth B, Varga J (2005) Common resistance to different *Fusarium* spp. causing Fusarium head blight in wheat. *Eur J Plant Pathol* 112: 267-281.
- Mesterhazy A. (1995). Types and components of resistance to Fusarium head blight of wheat. *Plant Breeding*, 114: 377-386.
- 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) 179–184.
- Miedaner T, Cumagun CJR, Chakraborty S, 2008. Population genetics of three important head blight pathogens *Fusarium graminearum*, *F. pseudograminearum* and *F. culmorum*. *Journal of Phytopathology* 156, 129–39.

- Miller SS, Watson EM, Lazebnik J, Gulden S, Balcerzak M, Fedak G, Ouellet T (2011). Characterization of an alien source of resistance to *Fusarium* head blight transferred to Chinese Spring wheat. *Botany* 89:301-311.
- Milus, E. A., Kristensen, K., and Hovmøller, M. S. 2009. Evidence for increased aggressiveness in a recent widespread strain of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* causing stripe rust of wheat. *Phytopathology* 99:89-94.
- Miraglia M, Marvin HJP, Kleter GA et al., 2009. Climate change and food safety: an emerging issue with special focus on Europe. *Food and Chemical Toxicology* 47, 1009–21.
- Moretti A, Corazza L, Balmas V, Santori A, Ritieni A (2002) Funghi tossigeni e micotossine: filiera cerealicola. *Informatore fitopatologico* 12: 17-22.
- Monneveux P, Reynolds MP, Gonzalez Aguilar J, Singh RP (2003) Effects of the 7DL.7Ag translocation from *Lophopyrum elongatum* on wheat yield and related morphophysiological traits under different environments. *Plant Breeding* 122: 379-384.
- Mullan D.J., Platteter A., Teakle N. L., Appels R., Colmer T. D., Anderson J. M., Francki M. G. 2005. EST-derived SSR markers from defined regions of the wheat genome to identify *Lophopyrum elongatum* specific loci. *Genome* 48: 811-822.
- Mullis KB, Faloona FA, Scharf SJ, Saiki RK, Horn GT, Erlich HA (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51: 263-273.
- Niu Z., Klindworth D. L., Friesen T. L., Chao S., Jin Y., Cai X., Xu S.S. 2011. Targeted introgression of a wheat stem rust resistance gene by DNA marker-assisted chromosome engineering. Published online before print January 17, 2011, doi: 10.1534/genetics.110.123588
- Nocente F., Sereni L., Matere A., Pasquini M. 2011. Recent occurrence of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Italy: pathogen virulence composition and seedling resistance, of durum and common wheat. *Cereal Research Communications* 39(1): 77–87.
- Oerke EC, 2006. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science* 144, 31–43
- Oliver RE, Cai X, Xu SS, Chen X, Stack RW (2005) Wheat-alien species derivatives: A novel source of resistance to *Fusarium* head blight in wheat. *Crop Sci* 45: 1353-1360

- Paillard S, Schnurbusch T, Tiwari R, Messmer M, Winzeler M, Keller B, Schachermayr G (2004) QTL analysis of resistance to *Fusarium* head blight in Swiss winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 109: 323-332.
- Pancaldi D, Grazzi G, Alberti I (1996) La fusariosi della spiga di frumento in Emilia Romagna nel 1995. *Informatore Fitopatologico* 46: 16-20.
- Pancaldi D, Tonti S, Prodi A, Salomoni D, Dal Prà M, Nipoti P, Alberti I, Pisi A (2010). Survey of the main causal agents of fusarium head blight of durum wheat around Bologna, northern Italy. *Phyto Mediterranea* 49(2): 258-266.
- Pascale M, De Girolamo A, Visconti A, Pancaldi D (2000). Indagine sulla presenza di deossinivalenolo in cereali prodotti in alcune aree del Nord Italia nel 1998. *L'Informatore Agrario*. 10: 68–73.
- Pascale M, Pancaldi D, Visconti A, Perrone G, Bottalico A (2001) *Fusarium* ear blight, deoxynivalenol and toxigenic *Fusarium* species in selected wheat cultivars assayed all over Italy, in 2000. In: *Proceedings of 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union*, 17–20 September 2001 University of Evora, Portugal 123– 125.
- Pasquini M., Iori A., Matere A., Sereni L., Casini F., L'Aurora A., Cacciatori P., Chierico M., Nocente F., Siniscalco A., Codianni P., Paone S., Preiti G., Mameli L., Raimondo I., Randazzo B., Licciardello S., Viola P., Bersani E., Padovan S., Notario, T. 2008. Sui frumenti più septoriosi e fusariosi della spiga. *L'Informatore Agrario* 46:48–52.
- Parry DW, Jenkinson P, McLeod L (1995) *Fusarium* ear blight (scab) in small grains – a review. *Plant Pathol* 44: 207–238.
- Paterson R.R.M., Lima N., 2010. How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Research International* 43, 1902–14.
- Petersen G., Seberg O., Yde M, Berthelsen K. 2006. Phylogenetic relationships of *Triticum* and *Aegilops* and evidence for the origin of the **A**, **B**, and **D** genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 70–82.

- Pretorius ZA, Singh RP, Wagoire WW, Payne TS (2000) Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene Sr31 in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Uganda. *Phytopathology* 84:203
- 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, Marais GF (1998) An extended deletion map of the *Lr19* translocation and modified forms. *Euph* 103:95–102
- Prins R, Marais GF (1999) A genetic study of the gametocidal effect of the Lr19 translocation of common wheat. *SAJ Plant Soil* 16: 10-14.
- Prins R., Groenewald J.Z., Marais G.F. , Snape J.W., Koebner R.M.D. 2001. AFLP and STS tagging of Lr19, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat. *Theor Appl Genetic*, 103:618–624.
- Pumphrey, M.O., R. Bernardo, and J.A. Anderson. 2007. Validating the QTL for Fusarium head blight resistance in near-isogenic wheat lines developed from breeding populations. *Crop Sci.* 47:200–206. doi:10.2135/cropsci2006.03.0206
- Pumphrey, M.O., R. Bernardo, and J.A. Anderson. 2007. Validating the QTL for Fusarium head blight resistance in near-isogenic wheat lines developed from breeding populations. *Crop Sci.* 47:200–206. doi:10.2135/cropsci2006.03.0206
- Qi LL, Friebe B, Zhang P, Gill BS (2007) Homoeologous recombination, chromosome engineering and crop improvement. *Chrom Res* 15:3–19
- Rajeev K. Varshney, Spurthi N. Nayak, Gregory D. May and Scott A. Jackson (2009). Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Cell Press Review*, doi:10.1016/j.tibtech.2009.05.006
- Ravel C., Dardevet M., Leenhardt F., Bordes J., Joseph J. L., Perretant M. R., Exbrayat F., Poncet C., Balfourier F., Chanliaud E., Charmet G., 2013. Improving the yellow pigment content of bread wheat flour by selecting the three homoeologous copies of *Psy1*. *Mol Breeding* 31:87–99

- Reynolds MP, Calderini DF, Condon AG, Rajaram S (2001) Physiological basis of yield gains in wheat associated with the *Lr19* translocation from *Agropyron elongatum*. Euph 119: 137-141.
- ReynoldsMP, Hobbs P, Ortiz R, Pietragalla J, Braun H-J, 2008. International wheat improvement: highlights from an expert symposium. In: Reynolds MP, Pietragalla J, Braun H-J, eds. International Symposium onWheat Yield Potential: Challenges to InternationalWheat Breeding. 1–7.
- Riley R, Chapman V (1958) Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. Nature 182: 713-715.
- Roder MS, Plaschke J, Konig SU, Borner A, Sorrels ME, Tanksley SD, Ganal MW (1995) Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. Mol General Genet 246: 327-333
- Roder, M.S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M. E., Leroy P. and Ganal, M.W. 1998. A microsatellite map of wheat. Genetics, 149: 2007-2023.
- Ruckenbauer P, Buerstmayr H, Lemmens M (2001) Present strategies in resistance breeding against scab (*Fusarium* spp). Euph 119:121–127
- Rudd JC, Horsley RD, McKendry AL, Elias EM (2001) Host plant resistance genes for *Fusarium* head blight: I. Sources, mechanisms, and utility in conventional breeding systems. Crop Sci 41: 620-627.
- Saintenac C, Falque M, Martin O, Paux E, Feuillet C, SourdilleP (2009) Detailed recombination studies along chromosome 3B provide new insights on crossover distribution in wheat (*T. aestivum* L). Genetics 181:393–404
- Sax K (1922) Sterility in wheat hybrids II. Chromosome behaviour in partially sterile hybrids Genetics 7: 513-522.
- Schaafsma AW, Hooker DC, 2007. Climatic models to predict occurrence of *Fusarium* toxins in wheat and maize. International Journal of Food Microbiology 119, 116–25.
- Scherm H, Yang XB (1995) Interannual variations in wheat rust development in China and the United States in relation to the El Niño/Southern Oscillation. Phytopathology 85:970-976.

- Schwarzacher T., Ananthawat-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 GJ, Kibirge-Sebunya IN (1983) Preferential abortion of gametes in wheat induced by an *Agropyron* chromosome. *Can J Genet Cytol* 25: 1-6.
- Shan DA, Pucci N, Infantino A (2005) Regional and varietal differences in the risk of wheat seed infection by fungal species associated with Fusarium head blight in Italy. *Eur J Plant Pathol* 112: 13-21.
- Sharma D, Knott DR (1966) The transfer of leaf rust resistance from *Agropyron* to *Triticum* by irradiation. *Can J Genet Cytol* 8: 137-143.
- Singh RP, 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.
- Sears E.R. (1952) Homoeologous chromosome in *Triticum aestivum*. *Genetics* 37: 624.
- Sears ER (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. and Okamoto M. (1958) Intergenomic chromosome relationship in hexaploid wheat. In *Proc X Intl Congr Genet* 2: 258-259.
- Sears E.R. (1966) Nullisomic-tetrasomic combinations in hexaploid wheat. In *Chromosome manipulations and plants genetics*, ed. Riley R. and Lewis K.R. vol. 20: Oliver and Boyd Edimburgh 29-45.
- Sears E.R. (1972) Chromosome engineering in wheat. *Proc Stadler Genet Symp* 4: 23-38.
- Sears ER (1973) *Agropyron*-wheat transfers obtained by homoeologous pairing. In *Proc. 4th Wheat Genet. Symp.*, Colombia, Missouri, ed. Sears ER and Sears LMS 191-199.
- Sears E.R., (1976) Genetic control of chromosome pairing in wheat. *Ann Rev Genet* 10: 31-51.

- Sears E.R., 1977. An induced mutant with homoeologous pairing in common wheat. *Can. J. Genet. Cytol.* 19: 585-593.
- Sears ER (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., (1982). A wheat mutant conditioning an intermediate level of homoeologous chromosome pairing. *Can. J. Genet. Cytol.* 24: 715-719.
- Shen XR, Ittu M, Ohm HW (2003) Quantitative trait loci conditioning resistance to Fusarium head blight in wheat line F201R. *Crop Sci* 43: 850-857.
- Sears ER (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 5-12.
- Sharma D, Knott DR (1966) The transfer of leaf rust resistance from *Agropyron* to *Triticum* by irradiation. *Can J Genet Cytol* 8: 137-143.
- Shen, X., Kong, L., Ohm, H., 2004. Fusarium Head Blight resistance in hexaploid wheat (*Triticum aestivum*)-*Lophopyrum* genetic lines and tagging of the alien chromatin by PCR markers. *Theor Appl Genet*, 108: 808-813.
- Shen, X. and Ohm, H. 2006. Fusarium head blight resistance derived from *Lophopyrum elongatum* chromosome 7E and its augmentation with *Fhb1* in wheat. *Plant breeding* 125: 425-429.
- Shen, X., Ohm, H. 2007. Molecular mapping of *Thinopyrum*-derived Fusarium head blight resistance in common wheat. *Mol Breeding*, 20: 131-140.
- Singh RP, Ma H, Rajaram S (1995) Genetic analysis of resistance to scab in spring wheat cultivar Frontana. *Plant Disease* 79 (3): 238-240.
- Singh RP, 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.

- Singh RP, Hodson DP, Jin Y, Huerta-Espino J, Kinyua MG, Wanyera R, Njau P, Ward RW (2006) Current status, likely migration and strategies to mitigate the threat to wheat production from race Ug99 (TTKS) of stem rust pathogen. CAB Rev Perspect Agric Vet Sci Nutr Nat Resour 1(054):13.
- Singh, R.P., D.P. Hodson, J.H. Espino, Y. Jin, P. Njau, R. Wanyera, S.A. Herrera-Foessel, and R.W. Ward. 2008. Will stem rust destroy the world's wheat crop? Adv. Agron. 98:271–309. doi:10.1016/S0065-2113(08)00205-8
- Somers D.J., Isaac P., Edwards K., 2004. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor Appl Genet 109: 1105-1114
- 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, final abstracts guide. Applied Biosystems Press, Foster City, Calif., p 167
- Sourdille P, CAdalen T, Brown-Guedira G, Gay G, Qi L, Gill BS, Dufour P, Murigneux A, Bernard M., 2004. Microsatellite-based deletion bin system for the establishment of genetic-physical map relationships in wheat (*Triticum aestivum* L.). Functional & Integrative Genomics, 4: 12-25.
- Stack RW (1999) Return of an old problem: Fusarium head blight of small grains. APSnetPlant Pathology Online <http://www.apsnet.org/online/feature/FHB/Top.html>.
- Stanca M (2008) Nuova ruggine nera minaccia il grano. L'Informatore Agrario, 2008.
- Stephenson P., Bryan G., Kirby J., Collins A., Devos K., Busso C. and Gale M., 1998. Fifty new microsatellite loci for the wheat genetic map. Theor. Appl. Genet. 97: 946-949.
- Strange RN, Scott PR, 2005. Plant disease: a threat to global food security. Annual Review of Phytopathology 43, 83–116.
- 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.
- Taylor DR, Ingvarsson PK., 2003. Common features of segregation distortion in plants and animals. Genetica 117: 27-35

- Urban U, Daniels S, Mott E, Hammond-Kosack K (2002) Arabidopsis is susceptible to the cereal ear blight fungal pathogens *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *Plant J* 32:961-973.
- Vurro M, Bonciani B, Vannacci G, 2010. Emerging infectious diseases of crop plants in developing countries: impact on agriculture and socio-economic consequences. *Food Security* 2, 113–32.
- Waalwijk C, Kastelein P, de Vries I et al., 2003. Major changes in *Fusarium* spp. in wheat in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology* 109, 743–54.
- Wang Y, Yang L, Xu H, Li Q, Ma Z, Chu C (2005) Differential proteomic analysis of proteins in wheat spikes induced by *Fusarium graminearum*. *Proteomics* 5: 4496- 4503.
- Wang H.J., Huang X.Q., Röder M.S. and Börner A., 2002. Genetic mapping of loci determining long glumes in the genus *Triticum*. *Euphytica* 123: 287-293.
- Wang RR-C (2011) *Agropyron* and *Psathyrostachys*. In: Kole C (ed.) *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Cereals*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp 77-108.
- Wang, R.R.-C., Bothmer, R. von, Dvorak, J., Fedak, G., Linde-Laursen, I., Muramatsu, M., 1996. Genome symbols in the Triticeae (Poaceae). In: Wang, R.R.-C., Jensen, K.B., Jaussi, C. (Eds.), *Proc. 2nd Int. Triticeae Symp.*. Utah State Univ., Logan, pp. 29–34.
- Wiik, L. and Ewaldz, T. 2009. Impact of temperature and precipitation on yield and plant diseases of winter wheat in southern Sweden 1983-2007. *Crop protection*. 28:1, 952-962.
- Whitford R., Baumann U., Sutton T., Gumaelius L., Wolters P., Tingey S., Able J. A., Landridge P. 2007. Identification of transposons, retroelements, and gene family predominant expressed in floral tissues in chromosome 3DS of hexaploid wheat progenitor *Aegilops tauschii*. *Funct. Integr. Genomics* 7: 37-52
- Worland A.J. 1999. The importance of Italian wheats to worldwide varietal improvement. *J. Genet. & Breed.*, 53: 165-173.

- Xu X, Nicholson P, 2009. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annual Review of Phytopathology* 47, 83–103.
- Xu S. S.(a), Jin Y., Klindworth D. L., Wang R. R.-C., and X. Cai, 2009. Evaluation and Characterization of Seedling Resistances to Stem Rust Ug99 Races in Wheat–Alien Species Derivatives
- Xue S et al. (2008) A high-density intervarietal map of the wheat genome enriched with markers derived from expressed sequence tags. *Theoretical and Applied Genetics* 117:181-189.
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF (1974) A decimal code for the growth stages of cereal. *Weed Research* 14: 415-421.
- Zeller FJ (1973) 1B/1R wheat-rye chromosome substitution and translocations. *Proc 4th Intern. Wheat Genet. Symp. Missouri Agric Exper Station Coloumbia*: 209- 221.
- Zhang HB and Dvorak J (1990) Characterization and distribution of an interspersed repeated nucleotide sequence from *Lophopyrum elongatum* and mapping of segregation distortion factor with it. *Genome* 33: 927-936.
- Zhang X, Dong Y, Wang RR-C (1996) Characterization of genomes and chromosomes in partial amphidiploids of the hybrid *Triticum aestivum* x *Thinopyrum ponticum* by in situ hybridization, isozyme analysis, and RAPD. *Genome* 39: 1062-1071.
- Zhang W, Qu LJ, Gu H, Gao W, Liu M, Chen J, Chen Z (2002) Studies on the origin and evolution of tetraploid wheat based on the internal transcribed spacer (ITS) sequences of nuclear ribosomal DNA. *Theor Appl Genet* 104: 1099-1106.
- Zhang W, Gianibelli MC, Ma W, Rampling L, Gale KR (2003) Identification of SNPs and development of allele-specific PCR markers from γ -gliadin alleles in *Triticum aestivum*. *Theor Appl Genet* 107: 130–138.
- Zhang L. Y., Bernard M., Leroy P., Feuillet C., Sourdille P., 2005. High transferability of bread wheat EST-derived SSRs to other cereals . *Theoretical and Applied Genetics* 111:677-687.

Zhang X. L., Shen X. R., Hao Y. F., Cai J. J., Ohm H. W. and Kong L. 2011. A genetic map of *Lophopyrum ponticum* chromosome 7E, harboring resistance genes to Fusarium head blight and leaf rust. Theor. Appl.Genet. 122, 263–270.

Zhou WC, Kolb FL, Bai GH, Shaner G, Domier LL (2002) Genetic analysis of scab resistance QTL in wheat with microsatellite and AFLP markers. Genome 45: 719-727.

RINGRAZIAMENTI

Il primo ringraziamento va alla Professoressa Carla Ceoloni, mio mentore da lungo tempo, che mi ha accompagnato, indicandomi la strada, anche in questo importante “viaggio” di formazione. Ringrazio la Professoressa Stefania Masci per l’incoraggiamento che mi ha dato e la fiducia che mi ha riposto.

Ringrazio di cuore, per l’aiuto quotidiano e la condivisione del lavoro, gli amici del Laboratorio di Citogenetica vegetale: Sandra Bitti, insostituibile compagna; Andrea Gennaro per il rigore nel metodo di lavoro e la curiosità scientifica; Ljiljana Kuzmanovic, di poche ma importanti parole; Maria Elena Virili sempre gentile e volenterosa.

Un grazie va anche a Michela Janni per l’aiuto ed i consigli riguardo alle tecniche di infezioni con il *Fusarium* spp..

Il grazie più grande è per la mia famiglia che ha sopportato le mie assenze fisiche e mentali dovute al mio lavoro di ricerca..... spero che possa essere di esempio per i miei figli per un domani in cui anche loro potranno impegnarsi nel costruire qualcosa con i propri pensieri.