

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DOTTORATO DI RICERCA IN

Biotecnologie Cellulari e Molecolari

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: 07/E1

Settore Scientifico disciplinare: AGR/07

**Mappaggio fine di un QTL principale per la resa in
granella sul cromosoma 3B di frumento duro**

Presentata da: **Dott.ssa MARTA GRAZIANI**

Coordinatore Dottorato:

Chiar.mo Prof. S.Mario Spampinato

Relatore:

Chiar.mo Prof. Roberto Tuberosa

Esame finale anno 2012

INDICE

CAPITOLO I INTRODUZIONE	1
1. IL FRUMENTO	3
1.1. Cenni sulla botanica e sulla biologia	3
1.2. Importanza economica del frumento	3
1.3. Fasi fenologiche del frumento	4
2. LA PRODUTTIVITA' IN FRUMENTO DURO	6
2.1. Produttività potenziale del frumento	6
2.2. Caratteri fisiologici correlati alla produttività	7
3. DISSEZIONE DEI CARATTERI QUANTITATIVI	11
3.1. QTL per la produttività nei cereali	12
4. CLONAGGIO POSIZIONALE	15
4.1. Materiale Genetico per il mappaggio fine	16
4.2. Genotipizzazione molecolare	17
4.3. Realizzazione della mappa fisica.....	22
5. GENOMICA FUNZIONALE	26
6. MAPPAGGIO PER ASSOCIAZIONE	28
7. GENOMICA COMPARATIVA	30
CAPITOLO II OBIETTIVI DELLA RICERCA	40
CAPITOLO III SATURAZIONE DELLA MAPPA GENETICA KOFA × SVEVO AI QTL PRINCIPALI SUI CROMOSOMI 2B E 3B	43
1. MATERIALI E METODI.....	45
1.1. Materiale vegetale	45
1.2. Caratterizzazione molecolare	45
1.3. Dati fenotipici.....	53
1.4. Studio di segregazione alla regione del QTL	53
1.5. Analisi QTL.....	54
2. RISULTATI	56
2.1. Arricchimento di marcatori nella regione limitrofa a <i>Qyld.idw-2B</i>	56

2.2.	Arricchimento di marcatori della regione limitrofa a <i>Qyld.idw-3B</i>	57
2.3.	Analisi QTL.....	58
3.	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	62
FIGURE	67
TABELLE	78
CAPITOLO IV VALUTAZIONE FENOTIPICA DELLE COPPIE NIL PER VALIDARE L'EFFETTO DI <i>QYLD.IDW-3B</i>		
95		
1.	MATERIALI E METODI.....	97
1.1.	Materiale vegetale	97
1.2.	Caratterizzazione molecolare delle coppie NIL	97
1.3.	Allestimento della prova sperimentale di campo	98
1.4.	Analisi del contenuto dei carboidrati.....	99
1.5.	Analisi statistica dei dati fenotipici	100
2.	RISULTATI	102
2.1.	Caratterizzazione molecolare	102
2.2.	Valutazione Fenotipica.....	102
2.3.	Analisi del contenuto dei carboidrati.....	105
2.4.	Analisi statistica dei gruppi aplotipici	105
3.	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	107
FIGURE	111
TABELLE	122
CAPITOLO V MAPPAGGIO FINE DEL QTL PER LA RESA IN GRANELLA SUL CROMOSOMA 3B.....		
128		
1.	MATERIALI E METODI.....	130
1.1.	Materiale vegetale	130
1.2.	Estrazione del DNA.....	130
1.3.	Caratterizzazione molecolare	131
1.4.	Allestimento della prova sperimentale di campo e rilievi fenotipici.....	133
1.5.	Studio di segregazione nella regione del QTL	134

1.6.	Analisi statistica dei dati fenotipici	135
1.7.	Analisi QTL.....	135
2.	RISULTATI	137
2.1.	Identificazione degli eventi di ricombinazione per la regione di <i>Qyld.idw-3B</i>	137
2.2.	Costruzione di una mappa ad alta risoluzione nella regione di <i>Qyld.idw-3B</i>	137
2.3.	Integrazione della mappa genetica di <i>Qyld.idw-3B</i> di frumento duro con la mappa fisica del cromosoma 3B di frumento tenero	138
2.4.	Analisi statistica dei dati fenotipici	139
2.5.	Analisi QTL.....	140
2.6.	Classificazione dei valori fenotipici per il mappaggio del QTL.....	142
3.	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	143
	FIGURE	147
	TABELLE	156
	CAPITOLO VI CONCLUSIONI E PROSPETTIVE.....	164
	BIBLIOGRAFIA.....	171

CAPITOLO I

INTRODUZIONE

1. IL FRUMENTO

1.1. Cenni sulla botanica e sulla biologia

Il frumento è un cereale appartenente alla famiglia delle Graminaceae o Poaceae. Tale famiglia comprende la tribù delle *Triticeae*, la sottotribù delle *Triticinae* a cui appartengono diversi generi e specie, tra le quali il frumento (*Triticum* spp.). Il genere *Triticum* è uno dei più complessi e ricchi di specie tra i quali possiamo distinguere le due specie maggiormente coltivate: il frumento tenero (*Triticum aestivum*) e il frumento duro (*Triticum turgidum*) che si differenziano l'un l'altro per il livello di ploidia, per le caratteristiche morfo-fisiologiche e per l'areale di diffusione.

I frumenti coltivati, quelli selvatici e le specie affini delle *Triticeae* sono intercompatibili tra loro per cui, anche se con diverso grado di difficoltà, è possibile il trasferimento genico a seguito d'incrocio (Blanco *et al.*, 1990; Monneveux *et al.*, 2000). I frumenti coltivati derivano da una serie di ibridazioni tra specie diverse e successivi raddoppiamenti cromosomici. I frumenti, dal punto di vista genetico, costituiscono infatti una serie allopoliploide entro la quale possono essere distinti tre gruppi principali:

- frumenti allodiploidi ($2n=2x$) con 14 cromosomi totali e formula genomica AA;
- frumenti allotetraploidi ($2n=4x$) con 28 cromosomi totali e formula genomica AABB (*Triticum dicoccoides*, *Triticum dicoccon* e *Triticum durum*) e AAGG (*Triticum timopheevi*);
- frumenti alloesaploidi ($2n=6x$) con 42 cromosomi totali e formula genomica AABBDD (*Triticum spelta* e *Triticum aestivum*).

Il genoma A, comune a tutte le specie, deriva dal frumento selvatico *Triticum urartu*, il genoma B da specie *Aegilops* della sezione *sitopsis*, comprendente *Aegilops speltoides*, e il genoma D da *Aegilops tauschii*. Mentre il genoma A sarebbe rimasto notevolmente conservato nel percorso evolutivo (genoma "pivot"), il genoma B risulta essere molto modificato rispetto a quelle delle specie selvatiche attualmente esistenti (genoma "differenziale", Zohary e Feldman, 1962; Talbert *et al.*, 1995).

Il più importante frumento della serie degli allotetraploidi è il frumento duro (*Triticum turgidum* ssp. *durum* Desf.), il cui genoma risulta omologo a quello delle specie ancestrali *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* (allotetraploide selvatico) e *T. turgidum* ssp. *dicoccon* (farro medio), specie interessanti soprattutto per reintrodurre nel frumento coltivato alleli utili. Invece per la serie alloesaploide, la specie più importante è quella del frumento tenero (*Triticum aestivum* ssp. *aestivum*) il cui genoma presenta analogie con altre specie esaploidi quali *T. aestivum* ssp. *spelta* (farro grande) e *T. aestivum* ssp. *sphaerococcum* (Slageren, 1994).

1.2. Importanza economica del frumento

Il frumento costituisce uno degli elementi base dell'alimentazione umana. A livello mondiale il frumento viene coltivato su una superficie di 216 milioni di ettari e fornisce una produzione di 627 milioni di

tonnellate all'anno. Dopo il mais e insieme al riso, rappresenta la seconda produzione più grande tra le colture dei cereali, e corrisponde al 27% della produzione totale (dati FAOSTAT, 2009).

Il frumento duro viene coltivato in un'area pari a meno del 10% (circa 20 milioni di ettari) rispetto a quella del frumento tenero e la sua produzione raggiunge il 5% (circa 30 milioni di tonnellate annue) di quella del frumento tenero (statistiche FAO, 2009). Ciò nonostante, l'importanza economica di questa coltura è molto superiore a quanto possono indicare questi dati. La produzione del frumento duro viene, infatti, quasi totalmente impiegata per il consumo umano, sotto forma di diversi prodotti pastari, couscous, bulgur, forme speciali di pane, ecc. Inoltre, benché il frumento duro sia coltivato in diverse regioni del mondo, attualmente la maggior parte della produzione è concentrata nel Bacino del Mediterraneo e nel Nord-America. Pertanto nei diversi paesi, tra cui l'Italia, interessati dalla coltura il frumento duro riveste un'importanza primaria per la produzione agricola e per l'industria agro-alimentare locale.

Dal punto di vista nutritivo è costituito da: 60-80% di carboidrati, principalmente amido; 8-16% di proteine; 1,5-2% di grassi; 1,5-2% di minerali; 2,2% di fibre; vitamina B e vitamina E (Peña, 2002).

Rispetto al frumento tenero, il frumento duro è meno resistente alle basse temperature e si adatta meglio ad ambienti caratterizzati da piovosità relativamente basse (tra 250 e 500 mm) e temperature elevate. La maggior parte degli ambienti dove viene coltivato il frumento duro vengono definiti semi-aridi, con piovosità inferiori o uguali a 350 mm annui (Bozzini, 1988). Nel bacino del Mediterraneo, l'areale di coltivazione più importante, il frumento duro è coltivato principalmente in condizioni non irrigue ed in ambienti molto diversificati ma in genere caratterizzati da una piovosità scarsa e molto variabile e, spesso, da temperature estreme; pertanto gli stress idrici, termici e biotici ricorrono molto frequentemente ed in diverse fasi del ciclo della coltura. Per quanto riguarda l'Italia, il frumento duro risulta per estensione la coltura più importante, localizzata soprattutto nelle regioni Meridionali ed Insulari. L'Italia è anche un notevole importatore di grano duro di qualità.

1.3. Fasi fenologiche del frumento

Lo sviluppo dei cereali è definito come la sequenza di eventi fenologici, controllati da fattori esterni, che determinano il cambiamento morfologico e funzionale di alcuni organi (Landserg, 1977). Le fasi di sviluppo descrivono la variazione di struttura della pianta attraverso l'identificazione di stadi ben definiti che esprimono l'evoluzione morfologica della pianta. Diverse scale sono state realizzate per meglio descrivere gli eventi di sviluppo e quella più comunemente utilizzata è basata sull'osservazione visiva dello stadio (Zadoks et al., 1974). Il ciclo di sviluppo del frumento può essere suddiviso in diverse fasi: germinazione, accostimento, levata, fioritura, antesi e maturazione. La durata di ciascuna fase è determinata dall'interazione tra fattori genetici e ambientali. Questi stadi marcano i cambiamenti nelle fasi di sviluppo della pianta e possono essere raggruppate in tre maggiori stadi:

- stadio vegetativo, durante il quale ha inizio l'emergenza del fusticino con la formazione delle prime foglie;
- stadio riproduttivo, durante il quale si ha la completa formazione dei culmi principali e secondari e si ha la differenziazione degli organi riproduttivi che porta alla formazione dei culmi fertili;
- stadio di maturità durante il quale si ha il completo riempimento della cariosside.

È noto che particolari fasi, durante lo sviluppo della pianta, influiscono sulle componenti produttive, determinando condizioni critiche o favorevoli per ottenere una più bassa o alta produttività della pianta (Figura 1). In questo senso una fase critica per la potenzialità produttiva di una pianta è stata individuata intorno ai 20-30 giorni prima dell'antesi, tra la formazione terminale di spighe e inizio antesi (Fischer, 1984, 2009; Siddique *et al.*, 1989; Slafer e Rawson, 1994; Kirby *et al.*, 1999), durante la quale si ha la determinazione di culmi fertili con lo sviluppo e la formazione delle spighe in concomitanza con il continuo accrescimento della pianta. Questo risulta essere uno stadio critico nella determinazione finale del numero dei semi per spiga.

Anche la fase che segue l'antesi, in cui si ha lo sviluppo della cariosside e il suo riempimento, risulta essere una fase critica nella determinazione del peso della granella e quindi nella potenziale produttività della pianta.

2. LA PRODUTTIVITA' IN FRUMENTO DURO

Visto l'interesse sui cereali, quali principali componenti nella dieta umana, la produttività di queste colture risulta essere uno dei più importanti caratteri studiati e manipolati fin dall'inizio dell'agricoltura. Un indice della produttività dei cereali è la resa in granella, un carattere quantitativo sotto il controllo multigenico caratterizzato da una bassa ereditabilità ed un'alta interazione genotipo-ambiente. Anche se la resa si concretizza nell'ultima fase di sviluppo, essa risulta influenzata da eventi che accadono durante l'intero ciclo vitale della pianta. Sono molti i geni che influenzano il grado di resa della granella, inclusi i geni che controllano la potenzialità produttiva e quelli che conferiscono un adattamento a condizioni di stress abiotico e biotico (Slafer, 2003).

Per quanto concerne il frumento, miglioramenti sostanziali sulla resa in granella sono stati ottenuti a partire dalla rivoluzione verde, intorno al 1960, grazie all'utilizzo di nuove e più sofisticate tecniche agricole ma soprattutto grazie all'impiego e allo sviluppo di tecniche di biologia molecolare che hanno permesso di studiare le basi genetiche che controllano determinati caratteri e di utilizzare tali conoscenze in programmi di miglioramento genetico per selezionare cultivar più produttive (Frederick e Bauer, 1999). Negli ultimi 40 anni è stato registrato un aumento della resa in granella, da 1,4 a 2,8 t ha⁻¹, con un conseguente aumento della produttività totale da 303 milioni di tonnellate nel 1966 fino a 606 milioni di tonnellate nel 2006 (Evenson e Gollin, 2003; Baenziger *et al.*, 2006).

L'aumento della resa in granella è stato ottenuto attraverso la selezione di importanti caratteri agronomici che conferiscono un più alto potenziale produttivo, intervenendo su quei fattori che controllano direttamente la resa in quanto tale, o attraverso la selezione di caratteri che conferiscono un adattamento, grazie ad esempio all'identificazione dei geni che permettono di rendere tollerante la pianta nei confronti di condizioni di stress abiotico o biotico (Slafer, 2003).

2.1. Produttività potenziale del frumento

Con il termine di produttività potenziale viene definita la produttività di un genotipo che cresce in un ambiente con adeguate condizioni di apporto nutrizionale e idrico in cui gli altri stress vengono controllati (Acevedo e Fereres, 1993). L'aumento della potenzialità produttiva è possibile tramite la redistribuzione della biomassa a favore degli organi riproduttivi e a discapito dello sviluppo di altri organi quali foglie, radici e culmi (Austin *et al.*, 1980).

Donald (1968) ha presentato una sorta di ideotipo di frumento con alta potenzialità produttiva rappresentato da un tipo di pianta di dimensioni piccole, composta da pochi culmi in grado di sopravvivere e competere in mezzo a piante con le stesse caratteristiche. Questo ideotipo di pianta dovrebbe investire limitate risorse nella struttura della pianta e massimizzare l'utilizzo dei fotosintetati per un maggiore sviluppo della granella portando quindi ad un aumento della produttività.

Successivamente altre caratteristiche sono state aggiunte all'ideotipo con l'obiettivo di selezionare piante con una produttività sempre più alta (Sedgley, 1991). Ad esempio intervenendo sulle fasi fenologiche dello sviluppo del frumento, aumentando la lunghezza del periodo di sviluppo riproduttivo e ritardando la senescenza fogliare. Inoltre mantenendo a lungo la colorazione verde delle foglie (carattere dello "stay green") con un conseguente rallentamento della senescenza durante la fase riproduttiva, si ha una più alta attività fotosintetica ed un maggiore accumulo dei fotosintetati permettendo una migliore redistribuzione degli assimilati per lo sviluppo e il riempimento della granella (Acevedo e Fereres, 1993).

Tuttavia cultivar caratterizzate da un'alta produttività potenziale in condizioni ambientali avverse hanno spesso riscontrato avere una bassa produttività. Ciò è dovuto alla scarsa abilità dei genotipi con alta potenzialità produttiva a competere con infestanti e patogeni e quindi a resistere a condizioni di stress abiotici e biotici, o più in generale alla forte influenza ambientale a cui il carattere è sottoposto (Acevedo e Fereres, 1993). La forte influenza ambientale a cui sono soggette le piante durante il loro sviluppo fa sì che le prestazioni di ogni cultivar varino a seconda delle regioni ambientali di coltivazione, fattore che complica lo studio delle basi genetiche che controllano la potenzialità produttiva di una pianta (Pfeiffer *et al.*, 2000). Per queste ragioni un miglioramento indiretto della produttività che riguardi la selezione di caratteri secondari ma comunque associati ad una alta potenzialità produttiva o che siano legati ad un aumento della produttività, anche in condizioni ambientali avverse, risulta essere una interessante strategia. Questo approccio, definito anche analitico, si basa sulle conoscenze fisiologiche della pianta (Araus *et al.*, 2008).

2.2. Caratteri fisiologici correlati alla produttività

Un carattere può essere considerato un buon elemento di selezione solo nel caso in cui questo sia fisiologicamente e funzionalmente collegato alla produttività. Su queste basi la resa in granella può essere suddivisa in "componenti numeriche" quali: il numero di piante nate per mq, il numero di spighe per pianta, il numero di cariossidi per spighe, il numero di semi per mq e il peso medio delle cariossidi (Slafer, 2003).

Dal punto di vista fisiologico la produttività (GY: Grain Yield), viene definita dalla quantità di biomassa in maturità (BY: Biomass Yield) e dalla percentuale di biomassa allocata nella granella definita Harvest Index (HI) come indicato dall'equazione di Hay e Walker (1989):

$$GY = BY \times HI$$

dove la biomassa in maturità è a sua volta determinata dalla quantità di radiazioni incidenti durante la crescita (Q), dalla frazione di questa radiazione intercettata dalla superficie fogliare delle piante (I) e dall'efficienza delle piante nel convertire energia radiante in materiale secco (RUE: Radiation Use Efficiency) da cui l'equazione:

$$GY = Q \times I \times RUE \times HI$$

Per un'analisi semplificata i due principali componenti della resa in granella che vengono comunemente considerati sono il numero di semi per mq (NG: Number of Grain) e il peso medio individuale della granella (IGW: Individual Grain Weight) (Slafer et al., 1999) da qui l'equazione:

$$GY = NG \times IGW$$

2.2.1. Numero dei semi

Il numero finale dei semi è determinato dal numero delle spighe dei culmi fertili e dal numero dei semi per spiga. Queste componenti contribuiscono al numero finale dei semi per mq compensandosi l'una con l'altra durante un lungo periodo di sviluppo della pianta che va dall'emergenza a poco prima dell'antesi (Slafer e Rawson, 1994).

Il momento preciso in cui si determina il potenziale numero di semi per spiga corrisponde alla fase di allungamento dei culmi ed è direttamente correlato alla partizione degli assimilati che avviene circa 20-30 giorni prima della fase di antesi, momento in cui si ha lo sviluppo della spiga (Fischer, 2009). In questa stessa fase avviene la formazione della foglia bandiera e della penultima foglia, che sono le due più importanti direttamente coinvolte nella produzione dei fotosintetati durante la fase di riempimento della granella. È proprio in questo stadio che l'allungamento dei culmi e lo sviluppo delle spighe entrano in competizione per l'utilizzo degli assimilati (Frederick e Bauer, 1999).

La scarsa disponibilità di assimilati nella fase che precede l'antesi porta solo i culmi più sviluppati a sopravvivere. È stato dimostrato che il 70-90% dell'azoto totale viene assimilato prima dell'antesi per cui una diminuzione di questo nutriente in fasi critiche potrebbe ridurre sia lo sviluppo vegetativo che la formazione di spighe fertili (Miralles e Slafer, 1999).

Data la forte correlazione tra peso secco delle spighe ad antesi e numero di semi per mq si può concludere che un miglioramento delle varietà per una più alta produttività può essere raggiunto tramite una maggiore riallocazione della biomassa nella spiga prima dell'antesi.

Per raggiungere questo obiettivo si può procedere con due strategie:

1. Aumentare la ripartizione della biomassa verso gli organi riproduttivi.
2. Ridurre la competizione tra tessuti attraverso l'aumento dell'attività fotosintetica durante i momenti più critici.

Per quanto concerne il primo punto questo è stato il grande risultato ottenuto dalla "rivoluzione verde" attraverso l'introggressione del gene *Rht* in frumento tenero (Richards, 1992a, 1992b). Il gene conferisce il carattere "dwarf" (a taglia ridotta) alla pianta determinando una diminuzione di altezza. Questo ha permesso di ottenere una maggiore ripartizione della biomassa verso gli organi riproduttivi a discapito

dello sviluppo dei fusti diminuendo quindi la competizione per gli assimilati durante la fase di pre-antesi. Studi successivi hanno permesso di identificare una soglia minima al di sotto della quale ad un'ulteriore riduzione dell'altezza della pianta ne risulta una diminuzione della resa. Infatti la correlazione tra resa e altezza della pianta ha un andamento parabolico. Le altezze delle piante in cultivar moderne sono comprese in un intervallo di 70-100 cm, all'interno del quale la produttività è ottimizzata (Richards, 1992a, 1992b).

Intervenendo sulla modificazione dello sviluppo di un determinato organo si potrebbe determinare sempre un maggior potenziale del numero dei semi e quindi della resa senza sacrificare troppo lo sviluppo della pianta. Per esempio riducendo la lunghezza del peduncolo che sorregge la spiga si potrebbe mantenere un più alto numero di foglie riducendo la competizione tra gli assimilati, in quanto è soprattutto il peduncolo che cresce rapidamente prima dell'antesi, fase in cui viene determinato il numero dei semi per spiga.

Inoltre per permettere una maggiore ripartizione degli assimilati per lo sviluppo della spiga nella fase di pre-antesi si potrebbe intervenire cercando di ottenere un maggior accumulo di fotosintetati allungando il periodo temporale di questa fase. La lunghezza della fase è stata manipolata utilizzando geni che controllano il fotoperiodo come il gene *Ppd* (Foulkes *et al.*, 2004). Per un miglioramento della produttività in frumento sono noti in letteratura anche altri geni che controllano la data di fioritura e rispondono alla vernalizzazione (*Vrn*: vernalization response), e geni che regolano la fioritura indipendentemente dai meccanismi di vernalizzazione e del fotoperiodo (*Eps*: earliness per se) (Yang *et al.*, 2003; Dubcovsky *et al.*, 2007). Questi ultimi sono in genere geni che rispondono all'accumulo termico e che sono autoregolati dalla pianta al raggiungimento di determinate fasi fenologiche, indipendentemente dal variare di fattori ambientali quali temperatura e luce. Manipolazioni genetiche riguardanti questi caratteri prevedono modificazioni della durata del ciclo vegetativo.

2.2.2. *Peso dei semi*

Diversamente dal numero dei semi, il peso medio dei semi è una componente della resa che varia in misura inferiore. Inoltre il peso dei semi ha una correlazione inferiore nei confronti della resa rispetto al numero dei semi (Slafer e Andrade, 1993).

La forte correlazione negativa tra il peso dei semi e il numero dei semi per spiga è prevalentemente dovuta ad una maggiore competizione per gli assimilati al crescere del numero di semi con una conseguente diminuzione nel rapporto di crescita dei semi stessi. Il prolungamento della fase di riempimento delle granella, con ritardo della fase di senescenza e un maggiore accumulo di fotosintetati aumentano la disponibilità di assimilati per la crescita dei semi, assicurando quindi cariossidi di maggiori dimensioni.

Sembrerebbe inoltre che l'attività fotosintetica delle foglie durante la fase di riempimento della granella giochi un ruolo importante nel determinare la crescita e il peso dei semi. Infatti dal 70 al 90% del peso secco della granella è determinato dall'utilizzo degli assimilati prodotti durante questa fase (Austin *et al.*,

1977) e per la maggior parte questi assimilati provengono dalla foglia bandiera mentre i restanti vengono forniti dalla spiga, dal culmo e dalla penultima foglia (Rawson *et al.*, 1983).

Il peso secco dei semi è correlato positivamente al numero di cellule dell'endosperma ed ha base genetica complessa (Brocklehurst, 1977; Simmons, 1987; Hunt *et al.*, 1991).

Durante le prime fasi del riempimento della carosside un aumento dell'attività fotosintetica è positivamente associato all'aumento del peso secco della stessa (Frederick e Camberato, 1995a, 1995b). È proprio l'aumento della concentrazione di carboidrati in questa fase che favorisce il rapido aumento del peso della cariosside (Kiniry, 1993). È noto che l'accumulo dei carboidrati idrosolubili nei culmi avviene principalmente durante la fase di elongazione degli internodi ed è nell'ultima fase di riempimento della granella che i carboidrati accumulati vengono rimobilizzati verso la spiga, contribuendo, in condizioni di crescita normale, fino al 20% della resa in granella (Blum *et al.*, 1998).

3. DISSEZIONE DEI CARATTERI QUANTITATIVI

La maggior parte dei caratteri di interesse agronomico risultano essere di tipo quantitativo e mostrano una variabilità fenotipica continua il cui controllo genetico è dato dall'influenza di numerosi geni e dall'interazione con l'ambiente. Le posizioni occupate da questi geni sui cromosomi sono chiamate loci e ognuno di questi loci viene comunemente indicato con l'acronimo QTL (Quantitative Trait Loci) dove alleli funzionalmente differenti segregano creando un effetto significativo sulla variabilità osservata per il carattere tra individui diversi (Geldermann, 1975).

Il mappaggio dei QTL è una pratica di base utilizzata nella genetica quantitativa che ha avuto inizio con l'avvento dei marcatori molecolari e la costruzione delle mappe genetiche permettendo di dissezionare e studiare numerosi caratteri di interesse agronomico.

Il numero di geni di un determinato carattere quantitativo, la loro posizione e il loro effetto, possono essere dedotti solamente con un'analisi statistica attraverso la combinazione di valori fenotipici con quelli molecolari permettendo di identificare i loci (QTL) la cui variazione allelica è correlata con il fenotipo (Geldermann, 1975). Nell'ambito di una popolazione segregante, la percentuale di variazione fenotipica ascrivibile ad uno specifico QTL è riconducibile al grado di complessità del controllo genetico del carattere, all'ereditabilità del carattere, all'importanza relativa del QTL nell'espressione del carattere e al grado di associazione con il marcatore molecolare che ci permette di individuarlo. A parità dei primi due fattori, se il QTL e il marcatore sono molto vicini, la differenza tra le due classi omozigoti è massima, ma tende a diminuire mano a mano che aumenta la distanza tra marcatore e QTL (aumenta infatti la probabilità di ricombinazione).

Per l'analisi QTL sono stati sviluppati software dedicati quali:

- MultipleQTL (<http://www.multipleqtl.com/>);
- MAPQTL (<http://www.kyazma.nl/index1.php>);
- QTL CARTOGRAPHER (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/index.php>)

e molti altri che consentono la gestione di una analisi genetica di mappe con centinaia di marcatori molecolari per la scansione dell'intero genoma alla ricerca delle regioni cromosomiche coinvolte nell'ereditarietà dei caratteri complessi. Ogni programma è in grado di svolgere un'elaborazione statistica dei dati attraverso l'utilizzo di diversi approcci statistici che variano in base al numero di marcatori utilizzati contemporaneamente per l'analisi. L'analisi a singolo marcatore (Single Marker Analysis) è basata sul metodo della regressione e permette di determinare l'associazione tra singolo marcatore molecolare e carattere quantitativo d'interesse. Questo tipo di analisi prevede una divisione degli individui della popolazione in gruppi in base alla loro composizione allelica ad un certo marcatore, e poi il calcolo della media dei valori del carattere fenotipico di ciascun gruppo.

L'applicazione di un test statistico (ANOVA, t di student o regressione lineare semplice) permette di valutare la significatività della differenza tra le medie. Se il test risulta essere significativo si parla di

associazione tra il carattere e il marcatore considerato, che indica la presenza di un QTL nella regione cromosomica individuata dal marcatore (Doerge, 2002). Con un'analisi di mappatura per intervallo (Interval Mapping) invece si saggia la probabilità, per ogni intervallo di mappa compreso tra due marcatori adiacenti, dell'ipotesi di presenza del QTL verso l'ipotesi di assenza dello stesso. Il metodo statistico su cui si basa è quello del valore del LOD (Logarithm of the Odds) utilizzando equazioni di massima verosimiglianza risolte con funzioni matematiche che tengono in considerazione la posizione del QTL, la media dei genotipi al QTL e la variazione fenotipica. Analisi di mappatura per intervallo più accurate sono possibili attraverso il cosiddetto "Composite Interval Mapping" (CIM) che combina il metodo del mappaggio per intervallo con quello della regressione multipla (Jansen, 1993; Jansen e Stam, 1994; Zeng, 1994), dove il mappaggio del QTL risulta essere meno influenzato (nei limiti di precisione dell'analisi) da altri QTL localizzati in intervalli presenti in posizioni diverse (cromosomi diversi) o adiacenti a dove si trova l'intervallo saggiato permettendo di definire in modo più preciso la localizzazione del QTL. Attraverso il metodo "Multiple Interval Mapping" (MIM), un utilizzo simultaneo di intervalli multipli di marcatori permette di costruire direttamente un modello di mappatura QTL basato su putativi QTL multipli; in questo caso è possibile saggiare anche l'esistenza di interazione (epistasi) tra le regioni sede di QTL e stimare il valore genotipico individuale e l'ereditabilità dei caratteri quantitativi. Numerosi esperimenti di analisi QTL sono stati effettuati sui cereali permettendo di identificare le basi genetiche di diversi caratteri quantitativi quali i caratteri coinvolti nell'architettura della pianta, nella resistenza a condizioni di stress abiotici e biotici (Tuberosa, Salvi, *et al.*, 2002; Tuberosa, Sanguineti, *et al.*, 2002; Giuliani *et al.*, 2005). Tali analisi hanno spesso evidenziato vari QTL per esperimento con una diversità degli effetti dei singoli QTL. I QTL caratterizzati da un elevato effetto genico sono indicati come QTL ad effetto principale.

Le informazioni ottenute dalle analisi QTL possono poi essere utilizzate nel miglioramento genetico attraverso approcci di selezione assistita da marcatori (MAS; Marker Assisted Selection) in cui i loci di marcatori strettamente associati al carattere quantitativo sono stati utilizzati per selezionare varietà migliorate. Inoltre con la crescente disponibilità di strumenti più avanzati nella genomica è nato anche l'interesse di andare oltre e capire in modo più accurato quali siano le basi molecolari dei QTL ad effetto maggiore aprendo la strada alle tecniche di clonaggio posizionale. Attraverso il clonaggio di un QTL è possibile investigare sulla biologia del carattere e sulle sue funzioni fisiologiche che regolano lo sviluppo complessivo permettendo di porre le basi per una più efficace valorizzazione della variabilità genetica (Salvi e Tuberosa, 2005).

3.1. QTL per la produttività nei cereali

Il carattere della produttività nei cereali è stato ampiamente studiato data la grande importanza agronomica che riveste, ma è anche uno dei caratteri più complessi, controllato da numerosi geni, con una bassa ereditabilità e forte influenza ambientale (Reynolds *et al.*, 2001).

Infatti QTL che risultano avere un effetto sulla produttività spesso non vengono confermati se la popolazione segregante analizzata viene valutata in diverse condizioni ambientali (Slafer, 2003; Collins *et al.*, 2008).

La produttività può essere suddivisa in diversi componenti (peso semi, numero semi e numero spighe per unità di superficie) anche questi controllati da numerosi geni che comunque risultano essere meno sensibili alle condizioni ambientali e presentano un più alta ereditabilità rispetto alla resa (Bezant *et al.*, 1997). Quindi un'analisi di questi caratteri che sembrano influenzare la produttività nei cereali può permettere di ottenere maggiori informazioni riguardanti le basi genetiche e la relazione tra la resa e i caratteri numerici associati.

Grazie agli strumenti molecolari attualmente disponibili e soprattutto allo sviluppo di nuovi programmi di analisi statistica, in grado di determinare in modo più accurato la posizione dei QTL, il loro effetto, e soprattutto di stimare l'interazione epistatica tra loci diversi e l'interazione ambientale, è stato possibile ottenere maggiori informazioni sull'architettura genetica dei QTL coinvolti nella produttività. Diversi studi hanno identificato QTL per la produttività in orzo (Cattivelli *et al.*, 2002), frumento (Gupta *et al.*, 1999, 2006; Maccaferri *et al.*, 2008), riso (Zeng *et al.*, 2006) e mais (Tuberosa, Salvi, *et al.*, 2002; Schaeffer *et al.*, 2006). Per ciascun cereale numerosi QTL sono stati identificati su diversi materiali genetici. Frequentemente la variabilità genetica spiegata per la produttività e per i caratteri correlati alla produttività risulta variare tra il 2 e il 10% della totale variabilità fenotipica. Raramente sono stati ottenuti QTL ad effetto maggiore con un coefficiente di determinazione (R^2) maggiore del 15% dalla valutazione di popolazioni segreganti derivanti da accessioni elite. Alla luce di ciò l'identificazione di QTL ad effetto principale che risultino avere un effetto additivo sufficientemente stabile in differenti condizioni ambientali e che risultino avere una bassa interazione tra genotipo e ambiente è un obiettivo indispensabile per poter migliorare la produttività e capire meglio le basi genetiche e fisiologiche che regolano il carattere della resa per poter poi procedere con il clonaggio delle sequenze responsabili dell'effetto del QTL (Tuberosa e Salvi, 2006). Pochi esempi che riguardano la scoperta di questi tipi di QTL sono stati riportati per la produttività e per i componenti della produttività in frumento tenero (Quarrie *et al.*, 2006), riso (Wan *et al.*, 2005, 2006), miglio (Yadav *et al.*, 2002) e mais (Landi *et al.*, 2007, 2010).

Nel frumento duro sono stati identificati due QTL ad effetto maggiore per la resa in granella e per i caratteri correlati in una popolazione di linee pure ricombinanti (RIL, Ricombinant Inbred Lines) valutata in diversi ambienti del Mediterraneo caratterizzati da un'ampia variazione di apporto idrico e di potenzialità produttiva (Maccaferri *et al.*, 2008). Inoltre le basi genetiche della resa in granella e di altri importanti caratteri agronomici, come l'altezza della pianta e la data di fioritura, risultano essere complicati dalle frequenti interazioni epistatiche tra più QTL e geni che controllano lo stesso carattere, come è stato dimostrato per il frumento duro (Maccaferri *et al.*, 2008) e per il riso (Li *et al.*, 1997, 2001, 2003).

Più di recente un'analisi Meta-QTL effettuata per la produttività del frumento tenero ha raccolto in letteratura i risultati ottenuti da esperimenti indipendenti di analisi QTL raggruppando un totale di 178 QTL per la resa distribuiti in tutti i cromosomi. Dall'analisi sono stati identificati 55 MQTLs per la resa e altri caratteri correlati di cui 12 sono risultati essere significativi e sono stati localizzati in 9 cromosomi diversi (1A, 1B, 2A, 2D, 3B, 4A, 4B, 4D e 5A) (Zhang *et al.*, 2010). Questi risultati hanno permesso di identificare alcuni QTL deputati al controllo della resa in determinate regioni cromosomiche che a loro volta sono state confermate da diverse analisi. Esperimenti effettuati hanno permesso di avvalorare la stabilità di questi QTL ponendo le basi per ulteriori studi volti all'identificazione dei geni coinvolti nella regolazione di questo carattere agronomico di grande importanza.

4. CLONAGGIO POSIZIONALE

Da una prima analisi QTL è possibile studiare una popolazione segregante, di solito composta da linee pure ricombinanti (RIL, Recombinant Inbred Lines) ed identificare un intervallo abbastanza ampio di 10-30 cM in cui localizzare il QTL. Questa è una regione genomica molto vasta a livello di dimensioni fisiche che potrebbe infatti comprendere varie centinaia di geni. Si stima ad esempio che 10 cM in *Arabidopsis* corrispondono a circa 2,1 Mb che potrebbero contenere 440 geni mentre in mais sono 12,4 Mb che comprendono circa 310 geni (Salvi e Tuberosa, 2005). Per poter procedere ad una identificazione più precisa del(i) gene(i) che controlla(no) il QTL si utilizza il clonaggio posizionale o clonaggio sulla base delle informazioni di mappa, che permette di identificare la sequenza di DNA (codificante o non codificante) responsabile del QTL.

La tecnica del clonaggio posizionale per QTL è sostanzialmente la stessa applicata per isolare geni mendeliani (Peters *et al.*, 2003). L'unica sostanziale differenza è rappresentata da un maggiore impiego di risorse, necessarie per una fenotipizzazione sufficientemente accurata su di un elevato numero di individui, in modo da garantire la caratterizzazione del QTL in esame. Una volta che un QTL ad effetto maggiore è stato identificato, la risoluzione della sua posizione di mappa deve essere adeguatamente migliorata per isolare una regione cromosomica sufficientemente piccola per essere sequenziata. Tale regione dovrebbe preferibilmente contenere un limitato numero di geni. I geni o le sequenze genomiche che presentano alleli alternativi e che sono completamente associati al QTL oggetto di studio, dovranno essere sottoposti a test funzionali scegliendo tra diversi approcci disponibili: ingegneria genetica, identificazione di “knock-outs”, complementazione di mutanti, identificazione di geni candidati in regioni cromosomiche ortologhe.

La strategia del clonaggio posizionale richiede diverse fasi che si susseguono per poter aumentare la risoluzione di mappa nella regione target dove è stato identificato il QTL ed identificare geni candidati che risultano essere coinvolti nell'effetto fenotipico del carattere quantitativo. Il mappaggio fine del QTL può essere diviso in tre fasi:

- ottenimento di una nuova popolazione segregante con maggiori eventi di ricombinazione;
- identificazione di nuovi marcatori molecolari per arricchire la regione del QTL;
- realizzazione di una mappa fisica e identificazione dei geni candidati.

L'identificazione di nuovi marcatori molecolari da aggiungere nell'intervallo del QTL permetterà di ottenere nella nuova popolazione segregante una maggiore risoluzione delimitando ulteriormente la regione del QTL, preferibilmente ad un intervallo inferiore ad 1 cM. Successivamente le informazioni di sequenza di questa ristretta regione saranno indispensabili per poter identificare i possibili geni candidati localizzati in tale regione (Figura 2). Secondo il paradigma generale, il mappaggio fine è portato a termine con il “chromosome landing” (Tanksley *et al.*, 1995), tecnica che consente di avvicinarsi il più possibile al gene candidato, identificando ad esempio il clone fisico contenente il gene, in modo da

ridurre o evitare, se possibile, la laboriosa procedura del “chromosome walking”. La tecnica del “chromosome landing” richiede un’adeguata dimensione della popolazione di mappa ed un elevato numero di marcatori, in modo da ottenere un’alta frequenza di ricombinazione per arrivare al mappaggio fine del QTL. Fattori come il rapporto tra distanza fisica e distanza genetica e la densità di geni devono essere attentamente presi in considerazione quando si pianifica la dimensione della popolazione. Qualsiasi stima deve essere considerata con cautela a causa della variabilità del rapporto kb/cM tra i diversi cromosomi (Wu *et al.*, 2003) e anche tra regioni diverse del medesimo cromosoma; ad esempio, in prossimità del centromero diminuisce la frequenza di ricombinazione.

Il clonaggio posizionale è una strategia usata da tempo che ha visto nel corso degli anni lo sviluppo di nuove tecniche molecolari e l’utilizzo di diversi approcci e strategie. I primi clonaggi di QTL in pianta sono stati ottenuti sul pomodoro: un QTL coinvolto nel peso della bacca (*Fw2.2*) (Alpert e Tanksley, 1996; Frary *et al.*, 2000) ed uno che invece determina il contenuto di zuccheri nella polpa (*Brix9-2-5*) (Fridman *et al.*, 2000). Nei cereali invece i primi QTL ad essere clonati sono stati quelli coinvolti nel fotoperiodo (*Hd1* e *Hd6*) in riso (Yano *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2001).

Per quanto riguarda il frumento recentemente sono stati clonati diversi geni coinvolti nella resistenza a malattie, risposte a vernalizzazione, contenuto proteico nella granella e tolleranza verso condizioni di stress abiotico attraverso l’approccio del clonaggio sulla base di informazioni di mappa. I primi ad essere isolati sono stati tre geni di resistenza alle malattie causate da funghi: ruggine (*Lr21*: Huang *et al.*, 2003; Huang e Röder, 2004; *Lr10*: Feuillet *et al.*, 2003) e oidio (*Pm3b*: Yahiaoui *et al.*, 2004). Un altro QTL clonato molto importante è stato quello per il carattere *Gpc-B1* associato all’aumento del contenuto proteico, di zinco e di ferro che le controlla le caratteristiche nutrizionali del frumento (Uauy *et al.*, 2006) (Tabella 1).

4.1. Materiale Genetico per il mappaggio fine

Completata l’analisi QTL primaria, una stima accurata della posizione del gene per il carattere quantitativo può essere ottenuta attraverso lo sviluppo di linee quasi isogeniche (NIL: Nearly Isogenic Line) che differiscono solo per la costituzione allelica della regione cromosomica sede del QTL (QTL-NILs) (Osborn *et al.*, 1987; Paterson *et al.*, 1991; Koester *et al.*, 1993). Generalmente è possibile sfruttare le NIL per produrre un incrocio secondario in modo da ottenere il mappaggio fine del QTL, eliminando gli effetti di disturbo di altri QTL co-segreganti. In questa nuova popolazione la regione target, dove è stato identificato il QTL, diventa la principale risorsa di variabilità genetica e di conseguenza il valore fenotipico del QTL caratterizzato dalle classi genotipiche +/+, -/- e se presente +/- può essere statisticamente differenziato e genotipicamente riconosciuto.

Il processo che permette di assegnare il genotipo di un QTL ad una popolazione segregante viene definito mendelizzazione del QTL (Alonso-Blanco e Koornneef, 2000). Generalmente la mendelizzazione comprende la produzione di NIL ed un appropriato schema sperimentale per un’accurata fenotipizzazione

delle linee isogeniche. Se il QTL ha un consistente effetto additivo, la genotipizzazione può essere effettuata in uno stadio precoce (F_2 o F_3) e può essere superfluo portare avanti successive sperimentazioni in generazioni avanzate. Alternativamente dovranno essere costituite e saggiate NIL segmentali al QTL con eventi di ricombinazione alla regione di interesse.

Partendo dalla stessa popolazione utilizzata per l'analisi QTL primaria, le NIL possono essere prodotte per:

- 1) introgressione (o sostituzione) attraverso reincrocio assistito da marcatori, nel recipiente genetico del genitore reciproco (BDL; Backcross Derived Line) (Kaepler, 1997),
- 2) attraverso autofecondazione per diverse generazioni di piante eterozigoti alla regione del QTL (RIL; Recombinant Inbred Line) (Tuinstra et al., 1997).

Linee quasi-isogeniche sono state realizzate per il frumento per studi sulla resistenza a oidio (Zhou *et al.*, 2005), per lo studio di resistenza a fusariosi (Pumphrey *et al.*, 2007) e molti altri caratteri. Alternativamente, linee isogeniche possono essere costituite attraverso la produzione di librerie di introgressione (IL: Introgression Library), ovvero di una serie di linee in cui ciascuna è isogenica alla linea parentale ad eccezione di un ridotto segmento cromosomico introgresso dal donatore (Zamir, 2001). In una collezione completa, tutto il genoma del donatore è rappresentato nelle diverse linee introgresse. Tali risorse sono state costituite per il pomodoro (Eshed e Zamir, 1994), per la *Brassica oleracea* (Ramsay *et al.*, 1996) e per il mais (Salvi *et al.*, 2011).

Linee isogeniche per il clonaggio posizionale possono essere prodotte attraverso il metodo del reincrocio avanzato del QTL (ABQA; Advanced Backcross QTL Analysis) che combina il reincrocio di segmenti di cromosomi tra accessioni selvatiche e linee elite (Tanksley e Nelson, 1996). Aspetti importanti da considerare sono il tempo e lo sforzo necessari per sviluppare queste collezioni di linee isogeniche e di reincrocio avanzato, così come la limitata variabilità genetica dovuta all'utilizzo di due sole linee parentali. Queste limitazioni potrebbero essere evitate attraverso l'utilizzo di una popolazione ottenuta da incrocio multi-parentale (Blanc *et al.*, 2006). Una popolazione multi-parentale è generata attraverso l'incrocio di un set di linee parentali selezionate in modo da ottenere la maggior variabilità possibile per la specie. Questo approccio dovrebbe aumentare l'efficienza del mappaggio del QTL in termini di identificazione e risoluzione genetica, grazie ai numerosi cicli di meiosi.

4.2. Genotipizzazione molecolare

Il primo passo in un clonaggio posizionale consiste nel sviluppare una mappa genetica ad alta risoluzione nella regione in cui è stato identificato il QTL dall'analisi primaria. Per aumentare la risoluzione genetica della regione sede del QTL deve essere saggiato un elevato numero di marcatori molecolari tra i due genotipi contrastanti la regione di interesse (ad esempio una coppia di NIL). Per le specie di cui sono disponibili numerose annotazioni di sequenze, la disponibilità di marcatori è elevata (ad esempio SSR) e

altri nuovi marcatori (SNP, InDels) possono essere facilmente identificati attraverso la comparazione di EST o sequenze genomiche di accessioni diverse (Schmidt, 2000; Jander *et al.*, 2002; Ware *et al.*, 2002). Il frumento, è una specie ancora non sequenziata a causa della sua complessità in dimensioni e poliploidia. Nel 1989 nacque l'ITMI (International Triticeae Mapping Initiative), nel tentativo di coordinare diversi gruppi coinvolti nella realizzazione di mappe genetiche per ciascun cromosoma di frumento, orzo e segale, con l'obiettivo finale di condividere più informazioni possibili riguardanti marcatori molecolari da rendere disponibili per il miglioramento genetico attraverso la selezione assistita da marcatori (MAS).

La densità delle mappe genetiche fu migliorata a partire dal 1998 attraverso lo sviluppo di marcatori microsatellitari (SSR; Single Sequence Repeat) che a differenza dei marcatori AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Barrett e Kidwell, 1998; Barrett *et al.*, 1998; Burkhamer *et al.*, 1998), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; Chao *et al.*, 1989; Heun *et al.*, 1991; Cadalen *et al.*, 1997) e RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA; Dweikat *et al.*, 1993; Cenci *et al.*, 1999), ampiamente utilizzati negli anni precedenti, risultano essere di più vasta applicazione e praticità basandosi su una semplice amplificazione con tecnica di PCR (Polymerase Chain Reaction).

I marcatori SSR presentano vari vantaggi: elevata riproducibilità, distribuzione nel genoma abbastanza uniforme (Röder *et al.*, 1998), elevata informatività e la capacità di rilevare un elevato numero di alleli.

Successivamente Somers *et al.* nel 2004 integrarono le mappe genetiche con nuovi SSR realizzando delle mappe consenso a più alta risoluzione. Attualmente per il frumento sono disponibili più di 3.000 SSR genomici. Più di recente lo sviluppo di marcatori DArT (Diversity Arrays Technology; Akbari *et al.*, 2006; Wenzl *et al.*, 2010), attraverso l'utilizzo della piattaforma microarray che permette la tipizzazione simultanea di migliaia di loci distribuiti in tutto il genoma senza la disponibilità di informazioni di sequenze a priori, ha permesso di saturare diverse mappe di associazione genetica (Crossa *et al.*, 2007; Mantovani *et al.*, 2008; Simmonds *et al.*, 2008).

Ciononostante le informazioni risultano ancora scarse e sono necessari numerosi marcatori molecolari per poter arricchire regioni cromosomiche di interesse agronomico. Viste le grandi ripetizioni di cui è costituito il genoma del frumento, circa l'80% (Paux *et al.*, 2006), sequenze di trasposoni sono state utilizzate per sviluppare nuovi marcatori molecolari. Ulteriori marcatori sviluppati su geni (GTM: Gene Target Markers) e denominati marcatori funzionali (FM: Functional Markers) sono stati sviluppati sfruttando le informazioni di EST (Expression Sequence Tag), dei quali attualmente più di 1.073.845 EST per il frumento sono pubblicamente disponibili (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST>) e sono stati utilizzati per costruire SSR-EST (Kantety *et al.*, 2002; Varshney *et al.*, 2002, 2005), SNP (Rafalski, 2002) o marcatori COS (Quraishi *et al.*, 2009).

4.2.1. *Marcatore sviluppati nelle regioni trasposoniche*

Dallo studio dell'organizzazione e della struttura genetica delle piante soprattutto per specie con genomi molto complessi, come nel caso del frumento, un'alta percentuale di sequenze risulta essere organizzata in blocchi discreti dispersi tra varie classi di DNA ripetuto, che a loro volta risultano rivestire ruoli fondamentali nell'evoluzione dei geni e dei genomi delle piante. A differenza delle regioni geniche, caratterizzate da un'elevata conservazione tra gruppi tassonomici, le regioni ripetute sono caratterizzate da un'estesa variabilità, che contribuisce alla generale variabilità genomica. I motivi ripetuti si possono classificare in diversi grandi gruppi, ciascuno dei quali organizzato in "famiglie", caratterizzate in genere da specifiche localizzazioni e organizzazioni genomiche (Lewin, 1997). Il gruppo più rappresentativo è quello dagli elementi trasponibili o trasposoni e risulta essere organizzato rispettivamente in elementi retrotrasponibili e trasponibili propriamente detti. Si tratta di sequenze di DNA dotate di mobilità e capaci di trasferirsi da una zona all'altra del genoma.

I retrotrasposoni sono organizzati in due grandi gruppi a seconda della presenza o meno della struttura LTR (Long Terminal Repeat). Gli LTR-retrotrasposoni si suddividono a loro volta in due gruppi: *Ty1-Copia* e *Ty3-gypsy*, mentre i non-LTR sono organizzati in *LINEs* e *SINEs*. Il gruppo *Ty1-Copia* comprende le famiglie più eterogenee, diffuse nel genoma e ad attività traspositiva elevata, quindi con maggior tasso di polimorfismo (Flavell *et al.*, 1992; Kumar *et al.*, 1997).

Una delle famiglie di retrotrasposoni più interessanti e più studiate, per le sue caratteristiche ottimali come marcatore molecolare, è la *BARE-1*. La famiglia *BARE-1* è stata utilizzata in studi di filogenesi nelle *Triticeae* (Gribbon *et al.*, 1999), in studi evolutivi di popolazioni naturali di orzo (Kalendar *et al.*, 2000) e per originare polimorfismi tra varietà (Kalendar *et al.*, 1999).

Tra gli elementi trasponibili è noto il gruppo dei MITE (Miniature Inverted-Repeat Transposable Elements), anch'essi utilizzati per lo sviluppo di marcatori molecolari: famiglie di MITE sono frequenti nel genoma dei cereali, dove a differenza dei retrotrasposoni sembrano preferenzialmente trasporre nelle regioni geniche (Bureau e Wessler, 1994a, 1994b; Mao *et al.*, 2000). Gran parte degli elementi trasposonici risultano essere quiescenti nel genoma ma possono essere attivati in risposta a stress abiotici o biotici. È stato infatti dimostrato che amplificazioni o perdite di famiglie *BARE-1* o retrotrasposoni-LTR manifestano una variazione genomica tra piante influenzate da fattori ambientali (Kalendar *et al.*, 2000). Nel frumento circa l'80% del genoma risulta essere costituito da elementi trasponibili che rivestono un ruolo indispensabile nella struttura e nell'evoluzione del genoma (Kumar *et al.*, 1997; Wicker *et al.*, 2001; Paux *et al.*, 2006).

Gli elementi trasponibili sono ubiquitari e caratterizzati da un alto numero di copie distribuite in modo casuale nel genoma sia nell'eterocromatina che nell'eucromatina e manifestano un ampio polimorfismo tra varietà di una stessa specie e tra specie diverse. Il loro meccanismo di trasposizione è replicativo (sono responsabili della espansione dei genomi) e le sequenze inserite sono in genere stabili nel genoma. Nel frumento è molto probabile che gli elementi trasponibili abbiano indirizzato l'evoluzione del genoma nei

processi di duplicazione del DNA. È stato inoltre ipotizzato un coinvolgimento degli elementi trasponibili negli eventi di diploidizzazione citologica e genetica dei genomi poliploidi dovuto ai continui riarrangiamenti genomici a cui vanno incontro (Levy e Feldman, 2002; Feldman e Levy, 2005). Queste caratteristiche genetiche hanno reso gli elementi trasponibili uno strumento valido per la realizzazione di marcatori molecolari come gli S-SAP (Sequence-Specific Amplification Polymorphisms: Flavell *et al.*, 1998), IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphisms: Kalendar *et al.*, 1999), REMAP (Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphisms: Kalendar *et al.*, 1999) e RBIP (Retrotransposon-Based Insertional Polymorphisms: Flavell *et al.*, 1998). Questi marcatori sono stati utilizzati con successo in diverse specie come orzo, riso e tabacco per analisi filogenetiche, studi di biodiversità e costruzione di mappe di associazione per caratteri agronomici importanti (Kenward *et al.*, 1999; Schulman *et al.*, 2004; Schulman, 2006).

Più di recente sono stati sviluppati nuovi marcatori molecolari disegnati sulle regioni di giunzione tra l'elemento trasponibile e le sequenze adiacenti denominate ISPB (Insertion Site-Based Polymorphism), utilizzando le informazioni di sequenza delle regioni terminali dei BAC ottenute durante la costruzione della mappa fisica del cromosoma 3B di Chinese Spring (Paux *et al.*, 2006, 2010). I marcatori ISBP risultano essere altamente genoma-specifici. Inoltre l'alta disponibilità di questi marcatori (un ISBP ogni 3 kb) ha permesso il loro ampio utilizzo per saturare mappe genetiche, negli studi di diversità genetica, negli studi di ricombinazione e analisi di linkage disequilibrium, nel mappaggio di associazione, nel clonaggio posizionale e come marcatori per la selezione assistita (Paux *et al.*, 2011).

4.2.2. Marcatori SNP

Gli SNP (Single Nucleotide Polimorphysm) sono causati da variazioni a singoli nucleotidi; essi comprendono la parte preponderante delle variazioni che si riscontrano nelle sequenze nucleotidiche tra individui della stessa specie, sia in regioni codificanti che in regioni non codificanti del genoma e sono presenti in numero elevatissimo (Brookes, 1999; Deschamps e Campbell, 2010).

Grazie alla disponibilità di informazioni di sequenza di database di EST (Expressed Sequence Tags, cioè parti di sequenze espresse, di solito di ridotta lunghezza, ottenute dal sequenziamento di cloni cDNA), geni clonati e anche, più raramente, lunghe sequenze di diversi cloni genomici concatenati, è stato possibile discriminare una più alta percentuale di SNP. Nei cereali sono attualmente disponibili piattaforme per la genotipizzazione di SNP che permettono di facilitare la dissezione genetica di caratteri agronomici. Inoltre con l'avvento delle nuove tecnologie di sequenziamento (NGS: New Generation Sequence) è stato possibile risequenziare specie modello come *Arabidopsis* (Zhang e Borevitz, 2009), riso (Yamamoto *et al.*, 2010) e mais (Yan *et al.*, 2010) permettendo la scoperta di migliaia di nuovi SNP. Per l'identificazione e la gestione di questi marcatori molecolari negli ultimi anni sono state sviluppate tecniche più rapide, accurate e con un'alta capacità di lavoro in grado di genotipizzare migliaia di SNP. Sono attualmente disponibili un numero elevato di piattaforme che permettono di genotipizzare un alto

numero di individui con uno fino ad un milione di SNP contemporaneamente. Queste tecnologie hanno avuto il loro primo impiego negli studi di genetica umana e attualmente sono ampiamente utilizzate anche in campo vegetale. Sono state sviluppate diverse metodiche per la genotipizzazione degli SNP come: sonde TaqMan (Livak *et al.*, 1995), identificazione attraverso polarizzazione fluorescente (FP-TDI; Chen *et al.*, 1999), Invader (Olivier, 2005), iPLEX (Wright *et al.*, 2008), PCR con primer specifici per alleli (KASPar, Nijman *et al.*, 2008), SNaPshot (Applied Biosystems; Sanchez *et al.*, 2003), Golden Gate (GG; Fan *et al.*, 2003) e Infinium (Gunderson, 2009; Illumina, San Diego, USA). Per la genotipizzazione degli SNP i saggi precedentemente elencati si basano sull'utilizzo di due oligonucleotidi alleli-specifici (ASO: Allelic Specific Nucleotide) che permettono la discriminazione delle due varianti alleliche. L'identificazione degli SNP è molto più complicata in genotipi poliploidi, come il frumento, a causa dell'alta difficoltà di discriminare geni omeologhi e geni paraloghi (Paux *et al.*, 2011). Per risolvere questa problematica Illumina GoldenGate ha sviluppato un saggio basato sull'utilizzo di più oligonucleotidi (OPAs: Oligonucleotide Pool Assay), approccio usato per l'identificazione di SNP in genomi complessi come l'orzo (Rostoks *et al.*, 2006) e il frumento (Akhunov *et al.*, 2009).

4.2.3. Marcatori sviluppati sulle sequenze conservate di regioni ortologhe

Genomi completamente sequenziati forniscono importanti informazioni sulle caratteristiche strutturali e funzionali all'interno della specie. Negli ultimi dieci anni i genomi delle più importanti piante coltivate sono stati ampiamente caratterizzati e sottoposti a confronto tra loro per poter identificare delle similitudini tra specie diverse sia per quanto riguarda la composizione genetica che per quanto concerne l'organizzazione lineare dei geni nei cromosomi (Salse *et al.*, 2008, 2009). Per anni il genoma del riso, primo tra i cereali ad essere stato sequenziato, è stato utilizzato come genoma modello di riferimento per tutte le altre specie (Goff *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002; International Rice Genome Sequencing Project, 2005). Attualmente, con lo sviluppo di nuove e più sofisticate tecniche di sequenziamento anche più a basso costo, altre specie quali il mais, il *Brachypodium* e il sorgo sono state completamente sequenziate (Wei *et al.*, 2007; Paterson *et al.*, 2009; The International Brachypodium Initiative, 2010), mentre per specie come il frumento e l'orzo sono disponibili solo sequenze di EST o di librerie genomiche.

Data l'alta conservazione delle sequenze codificanti, la disponibilità di sequenze genomiche per alcune specie può essere utilizzata per predire la presenza di geni in altre specie non attualmente sequenziate. Nonostante la grande divergenza evolutiva tra specie, come ad esempio tra riso e *Arabidopsis thaliana* di 200 milioni di anni fa, un gran numero di geni sono conservati anche in caso di una scarsa collinearità tra genomi (Salse *et al.*, 2002). L'identificazione dei geni ortologhi risulta essere molto complicata nelle piante, soprattutto in quelle poliploidi, dove il processo evolutivo è stato caratterizzato da eventi di duplicazione e riarrangiamenti. Di recente lo sviluppo di sofisticati sistemi statistici in grado di allineare e confrontare sequenze simili ha permesso di identificare in modo più preciso le relazioni tra geni ortologhi conservati. Grazie a ciò è stato possibile aumentare la risoluzione di mappe basate sull'analisi

comparativa, permettendo anche di applicare test statistici per identificare ulteriori riarrangiamenti dal confronto tra sequenze di riso e altre piante come ad esempio mais (Wei *et al.*, 2007), frumento (Salse *et al.*, 2008) e *Brachypodium* (The International Brachypodium Initiative, 2010).

Dall'allineamento degli EST con le sequenze di specie di riferimento come il riso e il *Brachypodium* è possibile identificare geni ortologi conservati utilizzati per lo sviluppo di nuovi marcatori molecolari definiti COS (Conserved Orthologous Sequence; Fulton *et al.*, 2002). I marcatori COS vengono disegnati nella regione bandiera tra esone ed introne con lo scopo di amplificare regioni non-codificanti (introni). L'interesse è quello di identificare dei polimorfismi su base nucleotidica (SNP) che risultano essere maggiorante frequenti in tali regioni (6,07 SNP/kb) rispetto alle regioni codificanti (3,00 SNP/kb) (Yu *et al.*, 2005). Marcatori COS sono stati intensamente studiati nelle dicotiledoni grazie anche alle informazioni di sequenza di *Arabidopsis* rilasciate nel 2000 (Fulton *et al.*, 2002; Gupta e Rustgi, 2004; Panjabi *et al.*, 2008). Più di 2.869 COS sono stati sviluppati dalle informazioni di sequenza di *Arabidopsis thaliana* (Wu *et al.*, 2006). Per i cereali i primi marcatori COS sono stati identificati dall'analisi di sintenia tra gli EST di miglio e il riso e sono stati saggiati attraverso la metodologia dell'SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) per identificare SNP (Bertin *et al.*, 2005). Per il frumento invece l'analisi di sintenia tra 5.000 EST e la sequenza di riferimento del riso ha permesso di identificare 695 geni ortologi conservati e distribuiti su tutti i cromosomi sui quali sono stati sviluppati altrettanti marcatori COS (Quraishi *et al.*, 2009). L'analisi di sintenia e lo sviluppo di marcatori su geni conservati risulta essere uno strumento potente per poter accelerare il mappaggio fine e il clonaggio posizionale di QTL, per studi di diversità allelica e nei programmi di miglioramento genetico. Soprattutto queste tecniche risultano essere molto utili per quelle specie in cui non si hanno molte informazioni di sequenza e presentano carenza di marcatori molecolari da poter mappare.

4.3. Realizzazione della mappa fisica

Raggiunta un'alta risoluzione di mappa che consenta di localizzare il QTL in una regione minore di 1-2 cM per procedere oltre è necessario costruire una mappa fisica per poter ottenere la sequenza nucleotidica della regione del QTL e identificare il/i gene/i candidato/i responsabile/i dell'effetto del QTL.

Un mappa fisica viene costruita a partire dal clonaggio del genoma di interesse in vettori BAC (Bacterial Artificial Chromosome). I cloni di DNA ottenuti dalla libreria BAC sono poi assemblati in "contig" in cui tutti i cloni vengono ordinati in modo contiguo sovrapponendosi parzialmente, consentendo quindi di identificare la sequenza nucleotidica della regione cromosomica di interesse (Staden, 1980; Coulson *et al.*, 1986). I contig possono essere a loro volta sovrapposti per costituire una completa mappa fisica. Sono state utilizzate diverse strategie per costruire dei BAC contig. Una strategia, che è quella maggiormente utilizzata all'interno dei progetti di sequenziamento genomico, consiste nel sequenziare le regioni terminali (BAC end) dei cloni BAC le cui sequenze si andranno a confrontare per identificare i punti di sovrapposizione che poi permettono di assemblare i cloni in contig (Venter *et al.*, 1996). Un'altra

strategia consiste nel digerire i cloni BAC con uno o più endonucleasi di restrizione ed usare il profilo ottenuto dalla restrizione per il fingerprinting dei cloni stessi. La ricerca e successiva identificazione delle coppie che si sovrappongono ottenute col fingerprinting saranno poi utilizzate per assemblare i contig (Soderlund *et al.*, 2000).

A causa delle grandi dimensioni del genoma del frumento e della sua complessità risulta molto costoso ottenere librerie genomiche per ciascuna varietà. Per ovviare a questo problema le prime librerie BAC costruite sono state quelle di due specie diploidi ancestrali: *Triticum monococcum* (Lijavetzky *et al.*, 1999), strettamente imparentato con il *Triticum urartu* donatore del genoma A del frumento, e *Aegilops tauschii*, linea AUS18913 (Moulet *et al.*, 1999) donatore del genoma D. Solo dopo qualche anno è stata costruita anche la libreria BAC del progenitore del genoma B del frumento, *Aegilops speltoides* (Akhunov *et al.*, 2005). La libreria BAC del *Triticum monococcum* è stata usata per isolare *Vrn1*, un gene che controlla la risposta di vernalizzazione in *Triticum monococcum* (Yan *et al.*, 2003) e per isolare un gene candidato per il locus Q (Faris *et al.*, 2003). Queste librerie BAC di specie diploidi non sono state utili per studiare il genoma del *Triticum aestivum* a causa della divergenza a cui le specie sono andate incontro negli anni e agli eventi di poliploidizzazione del frumento che hanno determinato perdite e riarrangiamenti del genoma (Akhunov *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2003; Wicker, Yahiaoui, *et al.*, 2003; Dvorak *et al.*, 2004; Kong *et al.*, 2004; Chantret *et al.*, 2005).

La prima libreria genomica di frumento tenero fu realizzata da Liu *et al.* nel 2000 per la cultivar Chinese Spring. Successivamente altre librerie BAC sono state realizzate per il frumento tenero anche per altre varietà (Ma *et al.*, 2000; Allouis *et al.*, 2003; Nilmalgoda e Cloutier, 2003). Per il frumento duro la prima libreria BAC è stata costruita nel 2003 da Cenci *et al.* per procedere al clonaggio posizionale di un gene coinvolto nell'alto contenuto proteico della granella (Tabella 2). Anche se numerosi sono stati i tentativi per cercare di automatizzare e semplificare il fingerprinting (Luo *et al.*, 2003) resta sempre molto complicato identificare e assemblare tutti i cloni ottenuti dalla libreria BAC, considerando anche il problema della poliploidia del genoma di frumento. Nasce quindi la necessità di migliorare la qualità e l'efficienza del clonaggio dei BAC per permettere di ottenere una più alta copertura. Il numero di cloni richiesti per poter ottenere la migliore copertura possibile (circa 1 milione di cloni per una copertura del 6X in frumento tenero) è molto alto e questo comporta un elevato costo di realizzazione e gestione del materiale; per questo motivo le librerie BAC non possono essere realizzate per ogni varietà genomica di frumento d'interesse. Un'alternativa ragionevole e più a basso costo consiste nella costruzione di un pool non-gridded di libreria BAC del genotipo (Ma *et al.*, 2000). Questa strategia è stata utilizzata in topo (Pierce *et al.*, 1992), in soia (Salimath e Bhattacharyya, 1999) e successivamente fu ampiamente utilizzata anche in frumento tenero (Liu *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2000) e in orzo (Isidore, Scherrer, Bellec, *et al.*, 2005).

Recenti progressi nella citogenetica hanno permesso di ottenere, attraverso la tecnologia della citometria a flusso, la dissezione a livello fisico del genoma in piccoli segmenti. DNA ottenuto dall'isolamento di singoli cromosomi è stato utilizzato per costruire delle librerie BAC di cromosomi specifici o di bracci

cromosomici. Questa tecnica attualmente è stata utilizzata per la realizzazione di librerie BAC specifiche dei cromosomi 1D, 4D and 6D (Janda *et al.*, 2004) e del cromosoma 3B di Chinese Spring, cv di frumento tenero (Safár *et al.*, 2004). Questo ha permesso di procedere con successo al sequenziamento del cromosoma 3B e all'utilizzo delle informazioni di queste librerie BAC per il clonaggio posizionale di QTL localizzati in tali cromosomi. Più di recente si è puntato ad ottenere informazioni ancora più mirate ottenendo l'isolamento di singoli bracci cromosomici (Kubaláková *et al.*, 2002, 2005) permettendo quindi di costruire librerie BAC per ogni piccola porzione del genoma come nel caso del cromosoma 1BS (Janda *et al.*, 2006).

4.3.1. Citometria a flusso e sequenziamento del cromosoma 3B di frumento tenero

La conoscenza del corredo cromosomico di una specie è molto importante per poter studiare le caratteristiche fisiologiche e genetiche che regolano lo sviluppo di quella data specie. Nel caso del frumento la complessità del genoma rende impossibile l'analisi al microscopio dei cromosomi e la loro manipolazione. Fortunatamente la realizzazione di stock citogenetici aneuploidi che includono linee di delezione cromosomica (chromosome deletion line) (Endo e Gill, 1996) ha permesso di mappare SSR ed EST sulla mappa fisica (Röder *et al.*, 1998; Qi *et al.*, 2004) permettendo di localizzare geni e la loro struttura. Cromosomi individuali possono essere localizzati grazie alla loro lunghezza, alle caratteristiche dei bracci, alla presenza di strutture caratteristiche e al loro comportamento durante la meiosi (Dolezel *et al.*, 2007).

La tecnica della citometria a flusso ha fornito nuovi strumenti di indagine alla citogenetica classica garantendo uno studio più rapido e accurato dei cromosomi (Dolezel *et al.*, 2007). Fin dagli anni '70 questa tecnologia ha fatto luce sull'organizzazione genetica degli organismi viventi indagando sulle correlazioni esistenti tra aberrazioni genetiche e manifestazioni fenotipiche (Boschman *et al.*, 1992). Attualmente non esistono altre tecnologie in grado di isolare cromosomi integri ad alta purezza e con la stessa facilità e celerità della metodologia citofluorimetrica (Figura 3). Col tempo la tecnica ha subito una serie di miglioramenti che hanno reso l'isolamento dei cromosomi molto più accurato e preciso (Dolezel *et al.*, 1992).

Il primo isolamento nei cereali è stato effettuato sul frumento tenero (Wang *et al.*, 1992); successivamente anche cromosomi di orzo e mais sono stati isolati (Lee *et al.*, 1996; Lysák *et al.*, 1999). Per quanto riguarda il frumento tenero tutti e 21 i cromosomi risultano essere assegnati a quattro picchi del flusso del cariotipo. Il cromosoma più lungo (3B) forma da solo un discreto picco, mentre i rimanenti 20 cromosomi si raggruppano in tre picchi uno dei quali è composto dal 1D, 4D e 6D (Vrána *et al.*, 2000). Per il frumento duro, l'assenza del genoma D consente di identificare solo tre picchi: un picco che contiene il cromosoma 3B, un picco ridotto che contiene i cromosomi 1A e 6A e un picco più grande che contiene i restanti 11 cromosomi (Kubaláková *et al.*, 2005). L'utilizzo della citometria a flusso ha permesso di utilizzare singoli cromosomi isolati per la costruzione di una libreria genomica specifica del cromosoma.

Numerosi cromosomi sono stati isolati ma il successo ottenuto da questa strategia è reso evidente dalla costruzione della mappa fisica del cromosoma 3B di Chinese Spring, una cultivar di frumento tenero (Paux et al., 2008) la cui libreria genomica è stata realizzata a partire dal DNA del cromosoma 3B isolato attraverso questa metodologia (Safár *et al.*, 2004).

Un totale di 67.968 cloni BAC sono stati ottenuti dalla libreria genomica e sono stati assemblati per costruire la mappa fisica del cromosoma più lungo di tutto il genoma di frumento, di dimensione di circa 1 Gb, che corrisponde al doppio delle dimensioni di tutto il genoma di riso (370 Mb). Nella prima fase di assemblaggio sono stati generati 3.306 contig che sono stati utilizzati per selezionare i cloni delle sequenze distali dei BAC (BES; BAC end sequence per poter ricostruire la struttura cromosomica (Paux *et al.*, 2006). Sono stati sequenziati un totale di 10.752 cloni generando circa 11 Mb di sequenze sparse per tutto il cromosoma. Dall'analisi delle sequenze è poi risultato che l'86% corrisponde a elementi ripetuti, l'1,2% a sequenze codificanti (corrispondenti a 6.000 geni) e il 13% è composto da sequenze non conosciute. La realizzazione della mappa fisica del più esteso cromosoma del frumento tenero è il primo passo per giungere all'obiettivo di un completo sequenziamento del genoma (Paux et al., 2008). L'International Wheat Genome Sequence Consortium (IWGSC, www.wheatgenome.org) ha pianificato di costruire librerie genomiche di tutti i cromosomi della cultivar di Chinese Spring per poter sequenziare l'intero genoma. Inoltre la mappa fisica del cromosoma 3B, e future mappe fisiche per i restanti cromosomi, servono per accelerare l'identificazione dei geni e procedere verso il clonaggio posizionale di QTL e geni che siano stati mappati geneticamente (Gill *et al.*, 2004).

5. GENOMICA FUNZIONALE

Una volta identificati i geni candidati che risultano associati al QTL il clonaggio posizionale del QTL può essere portato a termine solo con una validazione di tali geni attraverso l'utilizzo di approcci di genetica funzionale (Salvi e Tuberosa, 2005). Le informazioni disponibili sui profili di trascrizione sono un valido supporto nel clonaggio di QTL in quanto permettono di definire funzione ed espressione dei geni. I geni che si posizionano nella medesima regione sede del QTL e con una diversa espressione allelica tra genotipi contrastanti al QTL possono essere selezionati come candidati (Wayne e McIntyre, 2002). Anche il livello di espressione di un gene può essere utilizzato nell'analisi QTL (Jansen e Nap, 2001; Tuberosa *et al.*, 2003); tuttavia, le differenze in espressione possono essere inferiori a quelle percepibili dalla tecnica impiegata (Doebley *et al.*, 1997); inoltre, la differenza di espressione in termini di distribuzione spaziale (organi e tessuti diversi) e/o temporale (Cong *et al.*, 2002), può essere tale da non rendere utilizzabili tecnologie come quella microarray. Altre piattaforme più evolute, come la MPSS (Massively Parallel Signature Sequencing) (Brenner *et al.*, 2000; Meyers *et al.*, 2004), sembrano più promettenti nell'analisi del trascritto. Di recente grazie ai vantaggi delle nuove tecniche di sequenziamento (NGS; Next Generation Sequencing) (Metzker, 2010) approcci di RNASeq hanno permesso di ottenere informazioni globali dell'espressione di tutti i geni presenti in un determinato genoma (Haas e Zody, 2010; Marguerat e Bähler, 2010); approccio limitato però dalle difficoltà nel discriminare geni omeologi e paraloghi nel caso di genomi poliploidi. Tramite la tecnologia "laser capture microscopy" (Nakazono *et al.*, 2003) è possibile limitare l'analisi del trascritto a poche cellule, facilitando l'identificazione di geni candidati ed ovviando al problema della distribuzione spaziale dell'espressione.

I loci che controllano l'espressione genica sono stati chiamati "Transcript Quantitative Loci" (TQLs) (Consoli *et al.*, 2002) o "expression QTLs" (eQTLs) (Schadt *et al.*, 2003). Oltre a queste analisi, approcci di genetica inversa possono essere molto utili per studiare la funzione di geni candidati attraverso l'utilizzo di tecniche di trasformazione genetica o di RNAi (RNA interference) che permettono di sovraesprimere o sottoesprimere il gene d'interesse (Bouchez e Hofte, 1998; Somerville, 1999; Francki e Appels, 2002; McGinnis, 2010). Tecniche di trasformazione genetica sono attualmente messe in pratica usando le tecnologie dell'*Agrobacterium tumefaciens* o tramite il processo biolistico (Sanford, 1990; Wright *et al.*, 2001; Bhalla *et al.*, 2006). La tecnologia dell'RNA interference (RNAi) trova un ampio utilizzo negli approcci di genetica inversa grazie alla sua applicazione universale che permette di ottenere un'alterazione stabile ed evidente della funzione del gene rispetto a quella osservata naturalmente. L'RNAi è stata utilizzata per dimostrare che una riduzione dei livelli trascrizionali di espressione di *Vrn1* e *Vrn2* ha causato rispettivamente il ritardo e l'accelerazione della fioritura nel frumento invernale (Yan *et al.*, 2004; Loukoianov *et al.*, 2005).

Una metodologia di ampio utilizzo nella genetica inversa è anche quella del TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) (McCallum *et al.*, 2000; Henikoff *et al.*, 2004). Il TILLING fu inizialmente

sviluppato per la specie modello *Arabidopsis thaliana* ma attualmente viene ampiamente utilizzato anche per specie con genomi molto più complessi come il frumento e l'orzo (Slade *et al.*, 2005; Talamè *et al.*, 2008).

6. MAPPAGGIO PER ASSOCIAZIONE

Per lo studio e la dissezione del controllo genetico di un carattere un'alternativa all'identificazione di geni candidati attraverso clonaggio posizionale è rappresentata dal mappaggio di associazione (Cardon e Bell, 2001; Morgante e Salamini, 2003) basato sull'associazione tra una specifica variante allelica al locus del marcatore o del gene candidato e il valore del carattere fenotipico oggetto di indagine "association mapping". L'analisi è generalmente condotta su un campione di individui di origine e struttura genetica diversa, come ad esempio popolazioni naturali o accessioni di germoplasma. Per il clonaggio di QTL, i vantaggi di tale tecnica sono rappresentati da:

- 1) la possibilità di trovare importanti regioni cromosomiche che controllano QTL senza la necessità di costituire popolazioni sperimentali,
- 2) l'opportunità di sfruttare la notevole risoluzione genetica determinata dall'elevato numero di eventi meiotici avvenuti durante le numerose generazioni passate,
- 3) la possibilità di identificare un elevato numero di alleli funzionali per locus.

Tale tecnica è già ampiamente adottata in genetica umana ed animale (Cardon e Bell, 2001; Andersson e Georges, 2004), dove la costituzione di ampie popolazioni sperimentali è impossibile o molto complessa. Il fattore principale da prendere in considerazione è il livello di "linkage disequilibrium" (LD) delle accessioni saggiate (Flint-Garcia *et al.*, 2003): un elevato valore di LD è in grado di rivelare un'associazione marcatore-carattere con un ragionevole numero di marcatori molecolari. In tale situazione la normale risoluzione di una mappa genetica è sufficiente esclusivamente per un mappaggio grossolano del QTL. Diversamente, quando si saggia una collezione di germoplasma con un basso LD, il potere diagnostico di ogni singolo marcatore è modesto ed è necessario un numero molto elevato di marcatori per ottenere la scansione dell'intero genoma. Generalmente, per un basso LD, il numero di marcatori richiesto per una analisi QTL primaria è troppo elevato. In queste situazioni, una volta individuato e posizionato un QTL usando una mappa genetica ottenuta da un incrocio, il mappaggio per associazione può essere usato in un secondo momento per mappare finemente tale regione. In questo modo l'elevata richiesta di marcatori è limitata esclusivamente alla regione oggetto di indagine (Breseghello e Sorrells, 2006; Ravel *et al.*, 2006; Ersoz *et al.*, 2008; Sorrells e Yu, 2009; Waugh *et al.*, 2009).

Una collezione di accessioni di germoplasma caratterizzate da livelli di LD medio-alti è adatta per ricercare a livello genomico regioni cromosomiche caratterizzate da varianti alleliche responsabili dell'espressione fenotipica di determinati caratteri. Attraverso le mappe per associazione è possibile effettuare una scansione generale di tutto il genoma solo con l'utilizzo di pochi marcatori, tecnica molto interessante per le specie attualmente sprovviste di mappe ad alta risoluzione, come nel caso del frumento (Chao *et al.*, 2007; Horvath *et al.*, 2009; Sorrells e Yu, 2009; Rafalski, 2010). Combinando le informazioni fenotipiche con la caratterizzazione molecolare di variazioni naturali presenti nella

collezione è possibile valutare la dissezione genetica di caratteri complessi. (Araus *et al.*, 2008; Alonso-Blanco *et al.*, 2009; Annicchiarico *et al.*, 2009; Habash *et al.*, 2009; Reynolds *et al.*, 2009; Tardieu e Tuberosa, 2010).

In frumento duro l'approccio della mappa di associazione è stato utilizzato maggiormente per studiare caratteri legati alla qualità della granella (Reimer *et al.*, 2008), alla resistenza a malattie (Maccaferri *et al.*, 2010) e nella dissezione di caratteri legati all'adattamento a condizioni irrigue diverse e resa in granella (Maccaferri *et al.*, 2011). In questo ultimo caso risultati scarsamente significativi sono stati ottenuti per quanto riguarda il carattere resa in granella molto probabilmente a causa della sua complessità e della forte interazione con le condizioni ambientali (Maccaferri *et al.*, 2011).

7. GENOMICA COMPARATIVA

La famiglia delle *Poaceae*, a cui appartiene il frumento, è la quarta famiglia più ampia tra le piante con fiore. In termine di organizzazione dei genomi, le specie appartenenti alla famiglia delle *Poaceae* sono molto diversificate con un numero di cromosomi che va da 4 a 266 e dimensioni del genoma da 400 Mb a 17 Gb (Feuillet e Keller, 2002). In questa famiglia possono essere distinte quattro sub-famiglie: *Panicoideae* (sorgo, mais, miglio), *Chloridoideae*, *Ehrhartoideae* (riso) e *Pooideae* (frumento, orzo e brachipodio). Studi filogenetici hanno stimato che i cereali sono andati incontro a una divergenza da un ancestrale comune intorno ai 50-70 milioni di anni fa (Kellogg, 2001; Gaut, 2002).

La genomica comparativa studia la relazione tra genomi di differenti specie con l'obiettivo di individuare quali sono le regioni che si sono conservate e quali invece no, per approfondire meglio le variazioni di struttura e determinare quanto siano evolutivamente differenti le diverse specie. A seconda di quali sono le informazioni a disposizione per le specie a confronto si possono effettuare valutazioni a livello di mappa genetica oppure a livello di sequenze genomiche. Si passa quindi da una valutazione a livello macro, o analisi macro-collineare, che prende in esame quali sono le differenze a livello più globale tra le varie specie, prendendo come riferimento le informazioni sui marcatori molecolari e studiando quanto l'ordine di questi marcatori sia conservato o meno tra le diverse specie, ad una analisi di micro-collinearità, basata su un confronto a livello di sequenze che negli ultimi 10 anni sono state ottenute grazie al sequenziamento su larga scala di specie come il riso e il *Brachypodium* e grazie alla realizzazione di collezioni di EST e librerie BAC per specie non ancora sequenziate (Salse e Feuillet, 2007).

I primi studi comparativi sono stati effettuati usando le informazioni di isoenzimi, solo dopo l'avvento dei marcatori molecolari si è passati ad una valutazione più accurata (Devos and Gale, 1997). Confrontando i genomi attraverso l'utilizzo degli RFLP si confermò che l'ordine lineare dei marcatori sui cromosomi è conservato tra le diverse specie appartenenti alla famiglia delle *Poaceae* anche rispetto agli ancestrali, nonostante una distanza evolutiva di 50-70 milioni di anni (Moore *et al.*, 1995; Devos e Gale, 1997). Solo successivamente studi più accurati hanno dimostrato che la probabilità di trovare marcatori fiancheggiati nella stessa regione colineare tra le diverse specie non è molto alta, circa il 50%, anche in specie vicine, confermando la presenza di un esteso riarrangiamento tra le specie (Gaut, 2002). Con lo sviluppo dei marcatori basati su informazioni di sequenze di espressione (EST) è stato possibile realizzare dei confronti in silico paragonando le sequenze di questi marcatori EST mappati nei diversi genomi dei cereali tra loro e con le specie già sequenziate. Questo ha permesso di aumentare le informazioni sulle mappe comparative e di aumentare la loro risoluzione ottenendo maggiori informazioni sul grado di conservazione di regioni ortologhe. Grazie a queste mappe comparative oggi siamo a conoscenza di tutte le omologie presenti tra le diverse specie e sappiamo ad esempio che rispetto al genoma di riso il cromosoma 3 del frumento è quello più conservato mentre il cromosoma 5 è quello meno conservato (La

Rota e Sorrells, 2004). Incrementi nelle risoluzioni delle mappe e migliori test statistici hanno permesso di studiare in modo più approfondito la collinearità tra regioni permettendo di rilevare maggiori informazioni su nuovi riarrangiamenti tra riso e le altre specie dei cereali rispetto alle prime analisi basate solo sulle informazioni dei marcatori RFLP (Bennetzen e Ma, 2003; Wicker *et al.*, 2011). Questo ha portato alla realizzazione di un nuovo modello di ciclo concentrico dei cereali (Devos, 2005) (Figura 4). Confrontando specie appartenenti a diverse sub-famiglie sono stati identificati molti riarrangiamenti, ma anche casi di delezione o inserzioni di singoli o geni multipli o anche casi di duplicazione in tandem o traslocazioni (Bennetzen e Ramakrishna, 2002; Feuillet e Keller, 2002; Devos, 2005). Tutti questi eventi sono avvenuti durante l'evoluzione dei genomi dei cereali e le forti differenze dipendono molto dalla localizzazione nei cromosomi ma anche dal tipo di locus (Salse e Feuillet, 2007).

Se ne ricava che lo studio della comparazione genomica è uno strumento molto utile per identificare i meccanismi coinvolti nei riarrangiamenti genotipici che hanno portato alla formazione dei genomi dei cereali durante l'evoluzione. È evidente che gli elementi trasponibili sono risultati avere un ruolo principale nell'espansione dei genomi di frumento, mais e orzo attraverso inserzioni consecutive, e che allo stesso tempo numerose delezioni causate da una ineguale ricombinazione omologa e ricombinazione illegittima hanno limitato questa espansione (Bennetzen *et al.*, 2005). Anche a livello interspecifico si sono riscontrate molte differenze tra i cromosomi omologhi (Chantret *et al.*, 2005; Isidore, Scherrer, Chalhouh, *et al.*, 2005). Studi di genomica comparata hanno permesso di aumentare le conoscenze sul livello di conservazione tra i genomi dei cereali e hanno permesso di ottenere un valido strumento genomico per gli studi genetici e l'isolamento di geni d'interesse soprattutto per specie non ancora sequenziate.

La conservazione delle sequenze delle regioni ortologhe tra due genomi potrebbe rappresentare una conservazione del gene con una funzione simile tra specie. Dai primi confronti tramite l'utilizzo di RFLP è stato possibile identificare regioni conservate per geni e caratteri quali altezza della pianta, la vernalizzazione, la data di fioritura ed altri (Lin *et al.*, 1995; Paterson *et al.*, 1995; Bailey *et al.*, 1999). Il sequenziamento su larga scala del riso nel 2002 e più di recente del *Brachypodium* ha permesso di ottenere informazioni sulla collinearità tra queste specie e gli altri cereali non ancora sequenziati aprendo la possibilità di usare le informazioni di sequenza delle specie già sequenziate come informazioni per procedere ad un mappaggio posizionale basato sulle informazioni di comparazione genica (Kilian *et al.*, 1997). Il *Brachypodium* è stata considerata la nuova specie modello (Draper *et al.*, 2001; Vogel *et al.*, 2006) per il frumento e l'orzo, specie evolutivamente più vicine. Le informazioni di sequenza di genomi modello sono state utilizzate per isolare geni come ad esempio *Vrn1* in frumento (Yan *et al.*, 2003) e *Ppd-H1* in orzo (Turner *et al.*, 2005).

FIGURE

Figura 1: Fasi fenologiche dello sviluppo del frumento.

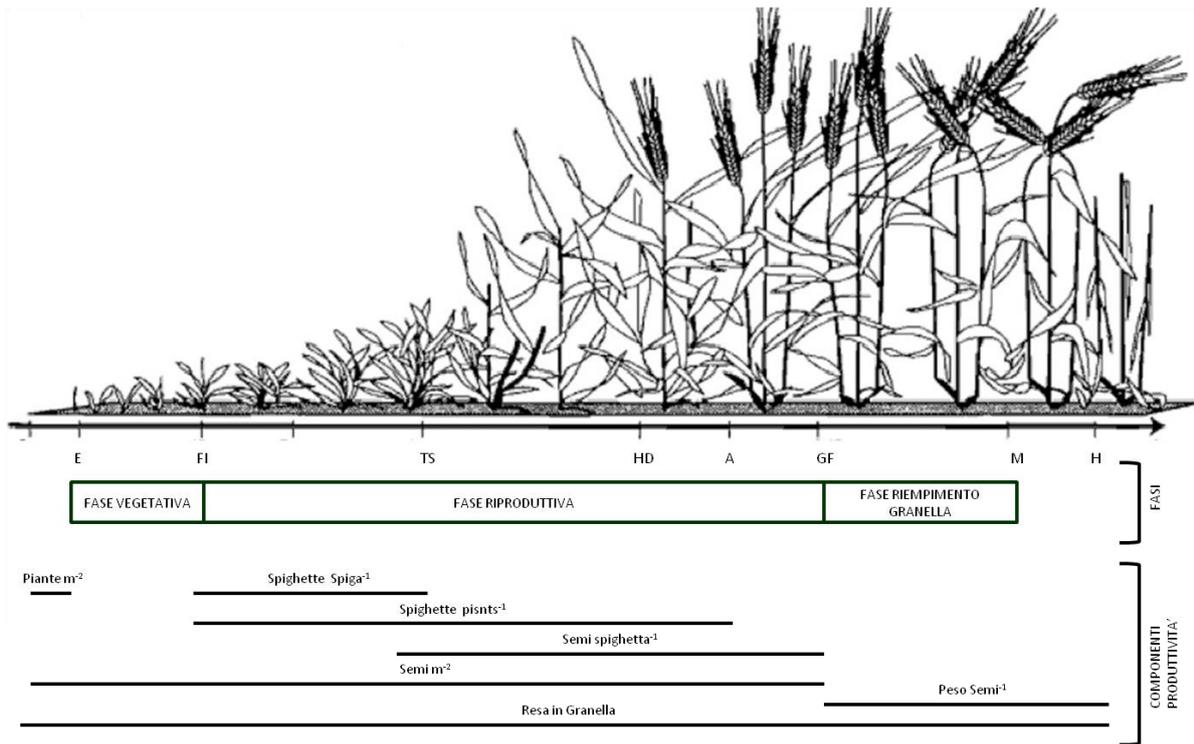


Figura 2: Rappresentazione schematica delle stadi del clonaggio posizionale.

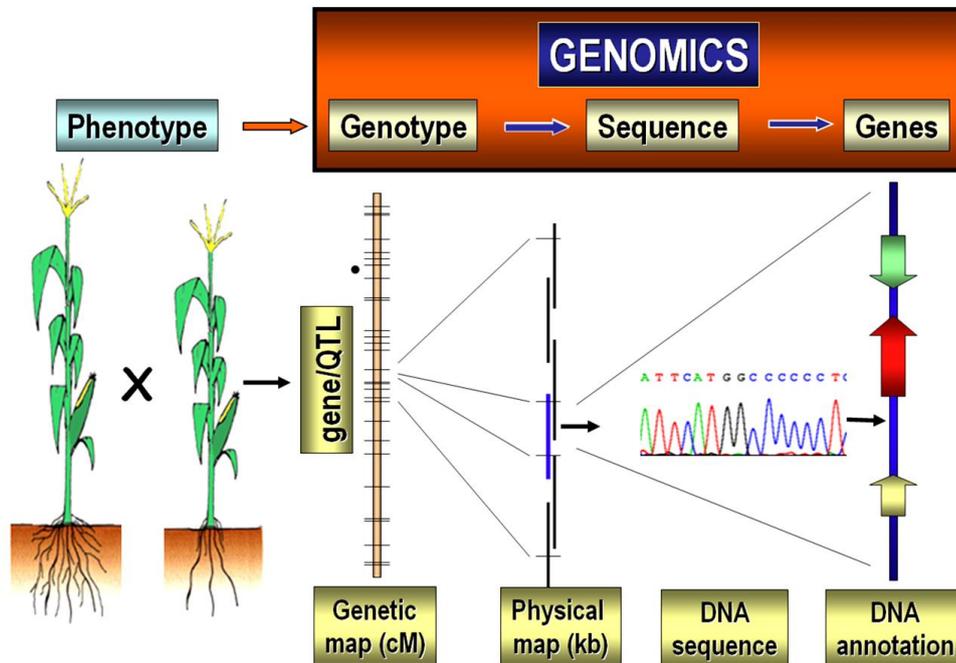


Figura 3: Schema rappresentativo del citometro a flusso ottenuto per l'isolamento dei cromosomi.

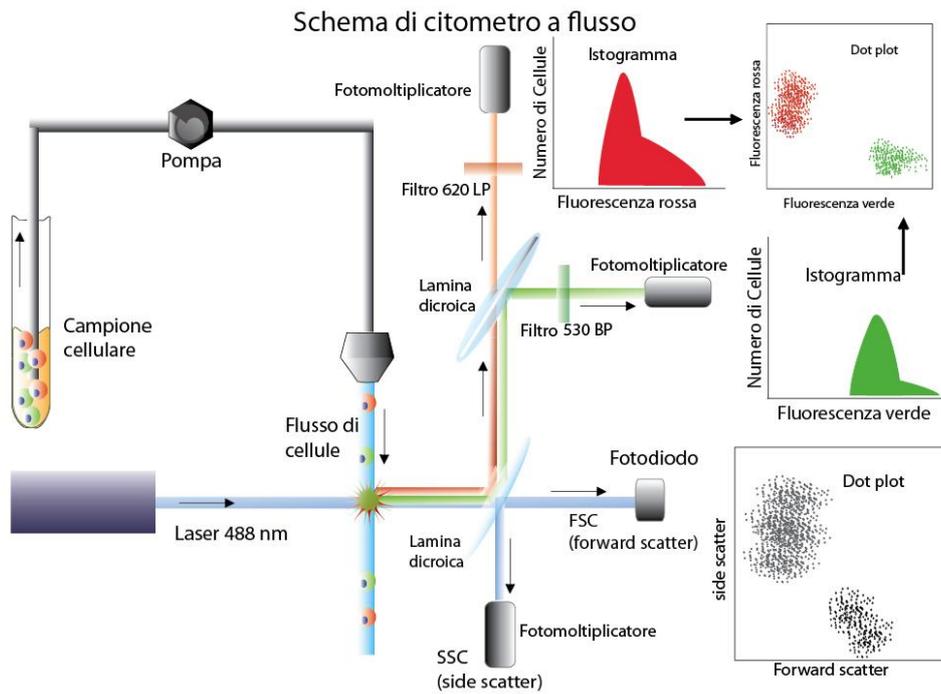
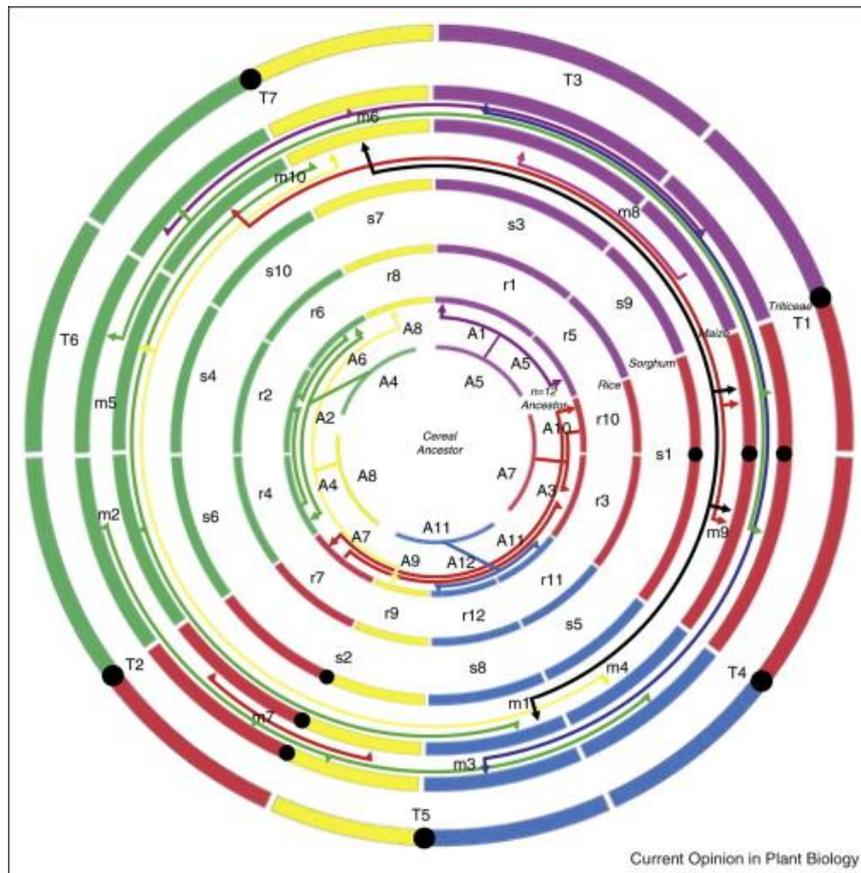


Figura 4: Nuovo modello di ciclo concentrico dei cereali proposto da Devo et al., 2005



TABELLE

Tabella 1: Elenco dei geni e QTL clonati in frumento duro

Gene/QTL	Caratteristica	Riferimenti
<i>Lr1</i>	Resistenza alla ruggine della foglia	H.-Q. Ling <i>et al.</i> 2003, S. Cloutier <i>et al.</i> 2007
<i>Lr10</i>	Resistenza alla ruggine della foglia	C. Feuillet <i>et al.</i> 2003
<i>Lr21</i>	Resistenza alla ruggine della foglia	L. Huang <i>et al.</i> 2003
<i>VRN1</i>	Risposta alla vernalizzazione	L. Yan <i>et al.</i> 2003
<i>VRN2</i>	Risposta alla vernalizzazione	L. Yan <i>et al.</i> 2004
<i>VRN3</i>	Risposta alla vernalizzazione	L. Yan <i>et al.</i> 2006
<i>Q</i>	Carattere di libera trebbiatura	K. J. Simons <i>et al.</i> 2006, J. D. Faris <i>et al.</i> 2003
<i>Pm3b</i>	Resistenza all'oidio	N. Yahiaoui <i>et al.</i> 2004, S. Brunner <i>et al.</i> 2005
<i>GPC-B1</i>	Elevato contenuto di proteine nel grano	C. Uauy <i>et al.</i> 2006, A. Distelfeld <i>et al.</i> 2004
<i>Qfhs.Ndsu-3bs</i>	Resistenza al fusario	S. Liu <i>et al.</i> 2005
<i>Yr5</i>	Resistenza alla ruggine	P. Ling <i>et al.</i> 2005
<i>B</i>	Resistenza al boro	T. Schnurbusch <i>et al.</i>
<i>Fr2</i>	Resistenza al gelo	http://www.agronomy.ucdavis.edu/Dubcovsky
<i>EPS-1</i>	Data di fioritura	http://www.agronomy.ucdavis.edu/Dubcovsky
<i>Tsn1</i>	Host-selective toxin Ptr ToxA	H.-J. Lu <i>et al.</i> 2006
<i>Ph1</i>	Chromosome pairing locus	S. Griffiths <i>et al.</i> 2006
<i>Sr2</i>	Resistenza alla ruggine del culmo	R. S. Kota <i>et al.</i> 2006

Tabella 2: Elenco delle librerie genomiche sviluppate in frumento

Specie (collocazione)	Copertura	N. di cloni (dimensione cloni in kb)	Curatore
T. monococcum (DV92)	5.6 X	276.000 (115)	J. Dubcovsky
T. dicoccoides (Langdon)	5.0 X	516.000 (130)	J. Dubcovsky
T. urartu (G1812)	4.9 X	163.200 (110)	J. Dvorak
Ae. tauschii (AL8/78)	2.2 X	54.000 (167)	H.B. Zhang
Ae. tauschii (AL8/78)	2.2 X	59.000 (189)	H.B. Zhang
Ae. tauschii (AL8/78)	3.2 X	52.000 (190)	H.B. Zhang
Ae. tauschii (AL8/78)	2.8 X	59.000 (149)	H.B. Zhang
Ae. tauschii (AL8/78)	2.4 X	76.000 (174)	H.B. Zhang
Ae. tauschii (Aus 18913)	4.2 X	144.000 (120)	E. Lagudah
Ae. tauschii (AS75)	4.1 X	181.248 (115)	J. Dvorak
Ae. speltoides (2-12-4-8-1-1-1)	5.4 X	237.312 (115)	J. Dvorak
T. aestivum (Glenlea)	3.1 X	656.640 (80)	S. Cloutier
T. aestivum (Renan)	3.2 X	478.840 (150)	B. Chalhoub
T. aestivum (Renan)	2.2 X	285.312 (132)	B. Chalhoub
T. aestivum (Renan)	1.5 X	236.160 (122)	B. Chalhoub
T. aestivum (Chinese Spring)		950.000 (54)	Y. Ogihara
T. aestivum (Chinese Spring)	< 4%	>12.000 (45)	K. Willars
T. aestivum (Chinese Spring) 3B	6.2 X	67.968 (103)	J. Dolezel & B. Chalhoub
T. aestivum, (Chinese Spring) 1D, 4D & 6D	3.4 X	87.168 (85)	J. Dolezel & B. Chalhoub
T. aestivum (Pavon) 1BS	14.5 X	65.280 (82)	J. Dolezel & B. Chalhoub
T. aestivum (AVS-Yr5)	3.6 X	422.400 (140)	X.M. Chen
T. aestivum (Norstar)	5.5 X	1.200.000 (75)	R. Chibbar

CAPITOLO II

OBIETTIVI DELLA RICERCA

Il frumento duro è uno dei più importanti cereali alla base della dieta umana e il 75% della sua produzione avviene nelle regioni del Mediterraneo.

In uno scenario generale dove le fluttuazioni delle precipitazioni, legate ai cambiamenti climatici, sono diventate uno dei più gravi fattori abiotici che mettono a rischio la produttività dei cereali, lo studio delle basi genetiche che riguardano il controllo dei caratteri agronomici legati alla potenzialità produttiva della pianta in risposta a diverse condizioni ambientali è al centro dei maggiori interessi nel campo della ricerca e del miglioramento genetico.

Grazie agli strumenti molecolari che permettono di costruire mappe genetiche e di individuare geni o cluster di geni coinvolti nel controllo dei caratteri in oggetto di indagine è possibile migliorare geneticamente le piante coltivate. Un carattere di interesse agronomico di grande importanza è quello della resa in granella.

Di recente due QTL ad effetto principale per la resa in granella sono stati identificati sul braccio lungo del cromosoma 2B e sul braccio corto del cromosoma 3B in una popolazione di 249 linee ricombinanti ottenuta dall'incrocio di Kofa × Svevo, due cultivar elite di *Triticum durum* che si adattano bene alle condizioni climatiche delle regioni del Mediterraneo (Maccaferri *et al.*, 2008). Dalla valutazione della popolazione Kofa × Svevo in 16 diversi ambienti del Mediterraneo, caratterizzati da un diverso apporto idrico e una diversa potenzialità produttiva, sono stati identificati i due QTL ad effetto principale per la resa in granella. Questi due QTL sono caratterizzati da una forte interazione epistatica e risultano influenzare anche altri caratteri morfo-fisiologici correlati alla resa in granella come il peso medio dei semi, l'altezza della pianta, la lunghezza del peduncolo e la colorazione verde della foglia, ma non la data di fioritura (Maccaferri *et al.*, 2008; Maccaferri *et al.*, non pubblicato). La stabilità e l'importanza di questi due QTL hanno aperto l'interesse di procedere con il mappaggio fine e l'eventuale clonaggio posizionale di *Qyld.idw-2B* e *Qyld.idw-3B*.

L'attività di ricerca è stata concentrata sul QTL identificato nel cromosoma 3B con l'obiettivo finale di identificare il gene coinvolto nella determinazione della produttività del frumento duro, ponendo anche l'attenzione alla forte interazione epistatica fornita dall'altro QTL identificato nel cromosoma 2B.

Sulla base di tali premesse, il lavoro svolto durante l'attività del dottorato di ricerca ha avuto come obiettivi i seguenti punti:

- 1) Sviluppo di nuovi marcatori molecolari (SSR, ISBP e COS) sfruttando le informazioni di sequenza di BAC e EST disponibili in letteratura per *T. aestivum* o sequenze di geni ortologhi ottenuti dall'analisi di sintenia tra specie diverse (riso, *Brachypodium* e sorgo), con lo scopo di identificare nuovi polimorfismi e saturare nella mappa genetica della popolazione Kofa × Svevo le due regioni in cui sono stati identificati *Qyld.idw-2B* e *Qyld.idw-3B* (Capitolo 2)
- 2) Sviluppo di coppie di linee quasi-isogeniche (NIL) a partire da famiglie eterogenee (HIF) ottenute da linee ricombinanti residuali (RHL) selezionate tra le 249 RIL della popolazione Kofa × Svevo con lo scopo di isogenizzare *Qyld.idw-3B*. Le coppie NIL sono state valutate fenotipicamente in diverse prove sperimentali con lo scopo di validare l'effetto di *QYld.idw-3B* (Capitolo 3).

3) Sviluppo di una popolazione ampia segregante dall'incrocio di coppie NIL che differiscono per la sola regione di *Qyld.idw-3B* con l'obiettivo di identificare un numero maggiore di eventi di ricombinazione attraverso la MAS utilizzando i due marcatori fiancheggiatori la regione di *Qyld.idw-3B*. Le linee segmentali in omozigosi per entrambi i marcatori fiancheggiatori *Qyld.idw-3B* sono state caratterizzate fenotipicamente e genotipicamente per poter ottenere una mappa ad alta risoluzione e restringere la regione di *Qyld.idw-3B* (Capitolo 4)

È opportuno sottolineare che l'attività di ricerca si è articolata nell'ambito del progetto UE "TRITICEAEGENOME" (Genomics for Triticeae improvement) coordinato dalla Dott.ssa Catherine Feuillet, al quale il Laboratorio di Genetica del DiSTA del Prof. Roberto Tuberosa ha preso parte in qualità di partner italiano.

Il progetto prevede la collaborazione di diversi gruppi di ricerca ed è volto all'utilizzo di tecnologie molecolari per poter ottenere significativi progressi nella genomica delle Triticeae al fine di favorire lo sviluppo di varietà migliorate.

CAPITOLO III

SATURAZIONE DELLA MAPPA GENETICA KOFA × SVEVO AI QTL PRINCIPALI SUI CROMOSOMI 2B E 3B

1. MATERIALI E METODI

1.1. Materiale vegetale

Le 249 linee ricombinanti utilizzate in Maccaferri *et al.*, 2008 sono state oggetto di studio per saturare le regioni del braccio lungo del cromosoma 2B e del braccio corto del cromosoma 3B dove sono stati localizzati due QTL ad effetto principale per la resa in granella (*Qyld.idw-2B* e *Qyld.idw-3B*).

La popolazione di linee ricombinanti è stata ottenuta a partire dall'incrocio di due cultivar elite di frumento duro (*Triticum durum* Desf.): Kofa e Svevo.

Kofa è una cultivar tipica del Sud-Ovest degli Stati Uniti rilasciata da Western Plant Breeders (Arizona) ottenuta da una popolazione multi-parentale (dicocum alpha pop-85 S-1) e germoplasma selezionato dal CIMMYT (International Maize and Wheat Improvement Center).

Svevo è una cultivar italiana ottenuta da Società Produttori Sementi di Bologna derivata dall'incrocio tra una linea selezionata dal CIMMYT (pedigree rock/fg/ /stil/3/dur1/4/sapi/teal//hui) e la cultivar Zenit; quest'ultima originata dall'incrocio tra le accessioni Valriccardo e Vic rispettivamente italiana e americana. Entrambe le linee parentali si adattano bene alle condizioni climatiche tipiche del Mediterraneo e sono state classificate come genotipi a fioritura precoce.

La popolazione di linee pure ricombinanti è stata sviluppata dalla ditta Società Produttori Sementi di Bologna (PSB; Argelato, BO, Italia) in collaborazione con il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA; Bologna, Italia) mediante metodo per discendenza da singolo seme dalla generazione F₂ alla F₆ (SSD, Single Seed Descent). Tale schema ha previsto lo sviluppo delle RIL per autofecondazione a partire dalla popolazione F₂ scegliendo, in ciascuna generazione, un solo individuo ad originare la generazione successiva. Ad ogni generazione di autofecondazione l'eterozigosi media del genoma decresce al ritmo di $1/2^n$, dove n è il numero di generazioni. Nella generazione F₆ il numero di eterozigoti sarà quindi molto basso per cui si otterrà un livello di omozigosi pari ca. al 98% e ciascuna linea avrà fissato gli alleli in brevi blocchi di associazione risultando, a seguito degli eventi di ricombinazione accumulati, in una costruzione genomica a mosaico rispetto a quella dei parentali della popolazione Kofa e Svevo. A partire dalla F₇, si è quindi proceduto all'allevamento delle rispettive progenie (pianta-fila): le progenie ottenute dall'autofecondazione di un individuo pressoché omozigote saranno geneticamente omogenee e ciascuna famiglia avrà fissata una combinazione allelica diversa.

1.2. Caratterizzazione molecolare

1.2.1. Identificazione di nuovi marcatori molecolari per arricchire la regione sede del QTL sul cromosoma 2B

Per saturare la regione limitrofa al picco di *Qyld.idw-2B* un totale di 93 marcatori sono stati saggiati per l'identificazione di polimorfismi tra le due linee parentali Kofa e Svevo. Tra questi, 40 marcatori sono microsatelliti genomici in parte forniti dalla Dott.ssa Röder (IPK, Gatersleben, Germania) in parte disponibili pubblicamente da GrainGene; i restanti 53 marcatori sono disegnati sui geni ortologi conservati ottenuti attraverso analisi di sintenia tra EST di frumento e genomi di riso, sorgo e *Brachypodium* presenti in letteratura e forniti dal Dott. J. Salse (INRA, Clermont-Ferrand, Francia).

1.2.1.1. *Microsatelliti genomici*

Per i 40 SSR genomici un primo screening è stato effettuato per verificare l'effettiva specificità genomica dei marcatori e per identificare polimorfismi tra i parentali. L'analisi è stata realizzata mediante elettroforesi verticale utilizzando un sequenziatore di tipo LI-COR DNA Analysis 4200 Gene Read IR2 (LI-COR, Lincoln, NE, USA).

Per le reazioni PCR è stato utilizzato il protocollo dell'M13. In base a questo protocollo la sequenza standard ed universale del primer M13 composta da 19 bp (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3') è stata aggiunta, durante la sintesi, all'estremità 5' del primer forward. L'amplificazione dei marcatori è stata effettuata con tre primer: primer forward con coda M13 ("primer tail"), il primer reverse e il primer M13 marcato nell'estremità 5' da un fluorocromo. Due diversi fluorocromi, DY-682 e DY-782 (MWG-Biotech, Ebersberg, Germania), a spettro di lunghezza d'onda di emissione non sovrapposto, sono stati utilizzati per analizzare simultaneamente diversi marcatori microsatelliti ciascuno marcato con uno dei due fluorocromi.

La reazione di amplificazione è stata effettuata in volumi finali di 20 µl in termociclatori per piastre da 96 pozzetti Perkin-Elmer 9600 (Norwalk, CT) seguendo le seguenti condizioni:

- 1X di buffer;
- 2,5 mM di MgCl₂;
- 0,2 mM di dNTPs;
- 0,2 µM di primer forward;
- 0,6 µM di primer M13;
- 0,6 µM di primer reverse;
- 0,5 U di Taq Polimerasi (GoTaq, Promega);
- 100 ng di DNA.

Il programma di amplificazione consiste in:

- denaturazione iniziale del DNA a 95 °C per 5 minuti;
- primi 20 cicli:
 - denaturazione del DNA a 95 °C per 30 secondi;
 - appaiamento dei primer da 61 a 51 °C per 30 secondi (con una riduzione di 0,5 °C per ogni ciclo);

- estensione a 72 °C per 45 secondi;
- successivi 20 cicli:
 - denaturazione del DNA a 95 °C per 30 secondi;
 - appaiamento dei primer a 51 °C per 30 secondi;
 - estensione a 72 °C per 45 secondi;
- completa estensione dei prodotti di PCR a 72 °C per 7 minuti.

Gli amplificati sono stati miscelati con un rapporto di diluizione 1:30, con il blu denaturante e vengono inizialmente denaturati a 95 °C per 5 minuti per poi essere caricati su gel di poliacrilamide (5%) di 25 cm di lunghezza e immersi in tampone TBE 1X. L'individuazione degli alleli in tempo reale viene effettuata grazie al sistema a doppio laser dell'apparato LI-COR.

1.2.1.2. Marcatori molecolari su sequenze di geni ortologi

Date le scarse informazioni di sequenze a disposizione per il cromosoma 2B, l'identificazione di nuovi marcatori molecolari è stata effettuata tramite analisi di macro-collinearità con regioni conservate. Sfruttando le informazioni di sequenza di EST mappati in frumento ne risulta che la regione terminale del cromosoma 2B è collineare con le regioni terminali del cromosoma 4 di riso e del cromosoma 5 di *Brachypodium* (Figura 1) (Huo *et al.*, 2009; Quraishi *et al.*, 2009). Marcatori molecolari definiti COS (Conserved Orthologous Sequence) sviluppati sui geni ortologi conservati sono stati utilizzati per saturare la regione del QTL.

Da Quraishi *et al.* (2009), un totale di 26 marcatori COS, sugli 89 che definiscono la sintonia tra il cromosoma 4 di riso e il cromosoma 2B di frumento, sono stati selezionati per saturare la regione terminale del cromosoma 2B dove è stato localizzato *Qyld.idw-2B* (Tabella 1). Ulteriori 16 COS, derivati da geni ortologi conservati tra riso, *Brachypodium* e sorgo sono stati forniti dal Dott. J. Salse (INRA, Clermont-Ferrand, Francia) (Tabella 2). Altri 11 marcatori COS, identificati con la sigla UBW2B sono stati sviluppati da altri 11 geni ortologi conservati che definiscono la sintonia tra i tre genomi modello (Tabella 3).

Per lo sviluppo di questi ultimi marcatori gli EST di frumento collineari con i geni ortologi sono stati identificati attraverso il programma WhETS (http://www.rothamsted.ac.uk/whets/cgi-bin/whets1.3/whets_home.pl). Gli EST selezionati sono stati quelli con identità maggiore del 85% ed una copertura quasi completa del gene. Per predire le regioni introniche di frumento gli EST selezionati sono stati utilizzati nell'analisi Blast in CoGeBLAST (<http://genomevolution.org/CoGe/>) contro il database "MSU-Rice Genome Annotation v.6.1" permettendo di controllare sia la significatività di similarità ottenuta dall'analisi di sintonia sia l'assenza di eventuali geni paraloghi.

Primer specifici in grado di appaiarsi alle regioni esoniche (sequenza EST) e di amplificare le regioni introniche predette sono stati sviluppati attraverso l'utilizzo del programma Primer 3.0 impostando i

parametri di dimensione primer 22-24 bp, dimensione amplificato 80-1.000 bp, temperatura di melting di 60-64 °C e percentuale di GC pari al 50-60%.

Per tutti i marcatori COS e UBW2B la reazione di amplificazione è stata effettuata in volumi finali di 20 µl su termociclatori Perkin-Elmer 9600 (Norwalk, CT, USA) seguendo le condizioni:

- 1X di buffer;
- 2,5 mM di MgCl₂;
- 0,2 mM di dNTPs;
- 0,6 µM di primer forward e primer reverse;
- 0,5 U di Taq Polimerasi (GoTaq, Promega);
- 100 ng di DNA.

Il programma di amplificazione consiste in:

- denaturazione iniziale del DNA a 95 °C per 5 minuti;
- 35 cicli:
 - denaturazione del DNA a 95 °C per 30 secondi;
 - appaiamento di primer alla temperatura di appaiamento specifica della coppia dei primer per 30 secondi;
 - estensione a 72 °C per 90 secondi;
- completa estensione dei prodotti di PCR a 72 °C per 7 minuti.

L'amplificazione dei marcatori COS e UBW2B ha interessato entrambi i geni omeologhi. Per cercare di identificare le due forme omeologhe ed eventuali polimorfismi varietali specifici per il solo genoma B diverse metodologie sono state utilizzate. Solo i marcatori risultati polimorfici tra le due linee parentali e genoma-specifici sono stati saggiati sulle 249 RIL della popolazione Kofa × Svevo.

1.2.1.2.1. Clonaggio dei marcatori COS e sequenziamento diretto dei cloni

Un totale di 9 marcatori COS sono stati analizzati tramite clonaggio. A seguito di amplificazione sul parentale Kofa, gli amplificati sono stati purificati (Wizard[®] SV Gel & PCR clean-up Start-Up Kit – Promega, WI, USA) e poi sottoposti ad una reazione di ligazione con il vettore plasmidico pGEM easy vector (Promega). Il prodotto della ligazione è stato successivamente utilizzato per la trasformazione, attraverso lo shock termico, di *E. coli* competenti (JM109-Promega). Dopo la crescita a 37 °C su substrato di coltura LB arricchito con X-GAL (bromo-cloro-indol-galattopiranoside), IPTG (Isopropyl β-D-1-tiogalattopiranoside) ed antibiotico ampicillina, le colonie trasformate sono state selezionate e controllate attraverso una semplice reazione di PCR (PCR-Colony) con i due primer specifici dell'inserto. Per ciascun campione dai 6 agli 8 cloni sono stati sequenziati attraverso il capillare ABI PRISM 3730XL (Applied Biosystem) presso il Parco Tecnologico Padano (Lodi). Le sequenze ottenute sono state analizzate con il software ChromasPro v.1.5 (Technelysium Pty Ltd) poi allineate e messe a confronto con il programma DNAMAN (Lynnon

Corporation) per discriminare i due cluster di sequenze, uno appartenente al genoma A e l'altro appartenente al genoma B. Per facilitare l'identificazione dei cluster corrispondenti ai due genomi è stato costruito un albero filogenetico utilizzando l'algoritmo Maximum Likelihood e un valore di bootstrap superiore a 1.000 per stimare le distanze. Primer specifici per il genoma e per il parentale Kofa sono stati disegnati nelle regioni che risultano essere differenti (per indel e/o SNP) tra i due cluster; tali primer sono stati utilizzati per amplificare il parentale Svevo ed identificare polimorfismi tra i due parentali.

1.2.1.2.2. Utilizzo di accessioni ancestrali per saggi di PCR

Le specie ancestrali, *Triticum urartu* e *Aegilops speltoides*, rispettivamente donatori del genoma A e del genoma B di frumento, sono stati utilizzati per discriminare i due geni omeologhi. Un totale di 5 marcatori COS sono stati amplificati in 3 accessioni di *T. urartu* (MG29422-1558, MG29406-1551, MG27001-1545) e 3 accessioni di *A. speltoides* (AE383, AE348, AE349). Gli amplificati ottenuti, preventivamente controllati in gel di agarosio al 2%, sono stati purificati attraverso colonnine e poi sequenziati con ABI PRISM 3730XL (Applied Biosystem). Le sequenze ottenute sono state allineate con il programma DNAMAN e dalle differenze in sequenza ottenute tra le due specie, primer specifici del genoma B sono stati sviluppati usando come riferimento la sequenza delle accessioni di *A. speltoides* poi utilizzati per amplificare le due linee parentali Kofa e Svevo.

1.2.1.2.3. Utilizzo del DNA isolato dai bracci cromosomici del 2AL e 2BL di Chinese Spring per saggi di PCR

Il DNA del braccio lungo dei due cromosomi omeologhi 2A e 2B di Chinese Spring sono stati ottenuti tramite "chromosome sorting", cioè l'isolamento dei cromosomi con la metodologia della citometria a flusso (*sorting*) (Dolezel *et al.*, 2007) presso il laboratorio di citogenetica molecolare del Dott. Jarislav Doležel (Sokolovská, Repubblica Ceca). I due DNA sono stati utilizzati per discriminare le due varianti omeologhe di 33 marcatori COS. I prodotti di amplificazione ottenuti sono stati controllati su gel di agarosio al 2% e solo quei marcatori che sono risultati avere banda singola sono stati direttamente purificati mentre per quelli che hanno presentato più bande (massimo due) il DNA è stato preventivamente estratto dal gel e poi purificato (Wizard[®] SV Gel & PCR clean-up Start-Up Kit – Promega). Gli ampliconi sono stati sequenziati presso il Parco Tecnologico Padano (Lodi). Dall'allineamento delle sequenze è stato possibile discriminare differenze tra i due genomi. Primer specifici per il genoma B sono stati ottenuti facendo riferimento alla sequenze del 2BL *sorting* di Chinese Spring. I primer ottenuti sono stati poi utilizzati per amplificare Kofa e Svevo. Solo gli amplificati che hanno presentato una banda specifica sul genoma B sono stati sequenziati per l'identificazione di polimorfismi tra i due parentali.

1.2.1.2.4. Separazione degli amplificati dei marcatori COS tramite elettroforesi verticale

Gli 11 marcatori UBW2B sono stati inizialmente sottoposti ad un pre-screening per valutarne l'effettiva amplificazione in un gel di agarosio al 2%. Solo quei marcatori che sono risultati avere una banda singola sono stati poi separati in gel di poliacrilamide (5%) mediante elettroforesi verticale effettuata in un apparato S4S (OWL) dotato di lastre di vetro di 38 x 50 cm. La corsa elettroforetica è stata condotta in tampone TBE 1X a potenza costante di 110 W per un periodo di circa 2 h. La visualizzazione degli amplificati è stata effettuata mediante colorazione con nitrato d'argento secondo il protocollo descritto da Bassam *et al.* (1991). Le due forme omeologhe sono state discriminate utilizzando come controllo i due DNA *sorting* (2AL e 2BL), i nulli-tetrasomici o le accessioni di *T. urartu* e *A. speltoides*.

1.2.2. Identificazione di nuovi marcatori molecolari per arricchire la regione sede del QTL sul cromosoma 3B

Per ottenere il maggior numero possibile di marcatori molecolari da aggiungere alla regione di *Qyld.idw-3B* sono state utilizzate le informazioni di sequenza ottenute durante la realizzazione della mappa fisica del cromosoma 3B della cultivar Chinese Spring di frumento tenero realizzata presso il laboratorio della Dott.ssa Catherine Feuillet (INRA, Clermont-Ferrand, Francia).

I due marcatori molecolari *gwm1034* e *gwm493*, che in Maccaferri *et al.* (2008) fiancheggiano la regione di *Qyld.idw-3B*, hanno permesso di identificare i due bin di delezione a cui è assegnata la regione del QTL delimitando la selezione dei marcatori da saggiare tra 3BS8-0.78-0.87 e 3BS3-0.87-1.00 (Sourdille *et al.*, 2004).

Un totale di 357 marcatori sono stati inizialmente saggiati tra Kofa e Svevo. Per controllare l'effettiva specificità genomica dei marcatori molecolari durante il saggio molecolare sono stati utilizzati campioni di DNA dei nulli-tetrasomici del cromosoma 3A (N3AT3D), 3B (N3BT3A) e 3D (N3DT3B) di frumento tenero. I marcatori poliformici risultati essere genoma B-specifici sono stati poi utilizzati per saggiare le 249 RIL.

1.2.2.1. Marcatori molecolari microsatelliti derivati da sequenze BAC-end

Durante la costruzione della mappa fisica del cromosoma 3B del frumento tenero le sequenze terminali dei cloni BAC (BES: BAC-End-Sequence), ottenuti dalla libreria di cloni BAC (Bacterial Artificial Chromosome) specifica del cromosoma 3B, sono state utilizzate per ricavare marcatori molecolari specifici del genoma B (Paux *et al.*, 2006).

Un totale di 140 microsatelliti derivati da BES, identificati dalla sigla CFT e CFB, localizzati nella regione telomerica del braccio corto del cromosoma 3B, sono stati saggiati per identificare i polimorfismi tra Kofa e Svevo. Le sequenze dei primer di questi marcatori sono state fornite dalla Dott.ssa Catherine Feuillet (INRA; Clermont-Ferrand, Francia).

La reazione di amplificazione è stata effettuata in volumi finali di 20 µl in termociclatori per piastre da 96

pozzetti Perkin-Elmer 9600 (Norwalk, CT, USA) seguendo le condizioni:

- 1X di buffer;
- 2,5 mM di MgCl₂;
- 0,2 mM di dNTP;
- 0,6 μM di primer forward e reverse;
- 0,5 U di Taq Polimerasi (GoTaq, Promega);
- 100 ng di DNA.

Il programma di amplificazione consiste in:

- denaturazione iniziale del DNA a 95 °C per 5 minuti;
- primi 16 cicli:
 - denaturazione del DNA a 95 °C per 30 secondi;
 - appaiamento dei primer da 63 a 55 °C per 30 secondi (con una riduzione di 0,5 °C per ogni ciclo);
 - estensione a 72 °C per 45 secondi;
- successivi 20 cicli:
 - denaturazione del DNA a 95 °C per 30 secondi;
 - appaiamento dei primer a 55 °C per 30 secondi;
 - estensione a 72 °C per 45 secondi;
- infine si ha un ultimo ciclo per la completa estensione dei prodotti di PCR a 72 °C per 7 minuti.

I marcatori molecolari sono stati analizzati mediante elettroforesi orizzontale su gel di agarosio ed elettroforesi verticale utilizzando il protocollo di amplificazione con M13 e visualizzazione degli amplificati attraverso il sistema automatizzato del Li-COR come descritto precedentemente.

1.2.2.2. Marcatori molecolari derivati da elementi trasponibili

Dall'analisi delle sequenze dei BES del cromosoma 3B di Chinese Spring è risultato che il 84% delle sequenze sono composte da elementi trasponibili (TE: Transposable elements) (Paux *et al.*, 2006). A partire da queste sequenze sono stati sviluppati dei marcatori ISBP (Insertion Site-Based Polymorphism) disegnati sulle giunzioni tra il trasposone e la sequenza fiancheggiante e sviluppati con il programma "ISBP Finder" (Paux *et al.*, 2007). In totale, 80 ISBP pubblicamente disponibili ed identificati dalla sigla CFT sono stati saggiati su Kofa e Svevo per identificarne i polimorfismi.

La reazione di amplificazione è stata effettuata in volumi finali di 20 μl in base alle seguenti condizioni:

- 1X di buffer;
- 3 mM di MgCl₂;
- 0,2 mM di dNTPs;
- 0,6 μM di primers forward e reverse;
- 0,5 U di Taq Polimerasi (GoTaq, Promega);

- 100 ng di DNA.

Il programma di amplificazione ha previsto:

- denaturazione iniziale del DNA a 95 °C per 5 minuti;
- primi 7 cicli:
 - denaturazione del DNA a 95 °C per 30 secondi;
 - appaiamento dei primer da 63 a 55 °C per 30 secondi (con una riduzione di 1 °C per ogni ciclo);
 - estensione a 72 °C per 30 secondi;
- successivi 32 cicli:
 - denaturazione del DNA a 95 °C per 30 secondi;
 - appaiamento dei primer a 55 °C per 30 secondi;
 - estensione a 72 °C per 30 secondi;
- successivi 11 cicli:
 - denaturazione del DNA a 95 °C per 30 secondi;
 - appaiamento dei primer a 56 °C per 30 secondi;
 - estensione a 72 °C per 30 secondi;
- un ultimo ciclo con una completa estensione dei prodotti di PCR a 72 °C per 7 minuti.

Gli amplificati sono stati valutati su gel di agarosio al 2,5-3,0% o tramite sistema LI-COR. Per quei marcatori che da un primo screening sono risultati essere monomorfici, gli amplificati dei due parentali Kofa e Svevo sono stati sequenziati per identificarne una differenza a livello di singolo nucleotide (SNP, Single Nucleotide Polymorphism).

Le sequenze ottenute sono state analizzate attraverso il software ChromasPro v.1.5 (Technelysium Pty Ltd) poi allineate con DNAMAN (Lynnon Corporation). Tra i due parentali, Kofa e Svevo, è stato possibile identificare degli SNP varietali poi validati attraverso il taglio enzimatico della regione polimorfica tramite la metodologia CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence).

1.2.2.3. Microsatelliti genomici

Ulteriori marcatori molecolari sono stati sviluppati sfruttando la completa sequenza genomica dei BAC utilizzati per assemblare i contig della mappa fisica di Chinese Spring .

Un totale di 114 marcatori molecolari microsatelliti genomici identificati sempre con la sigla CFB, sono stati saggiati. I primer di questi marcatori sono stati costruiti utilizzando le informazioni di sequenza dei loci dei marcatori disponibili pubblicamente sul browser di Wheat 3B FPC physical map v2.4 (http://urgi.versailles.inra.fr/cgi-bin/gbrowse/wheat_FPC).

Per il disegno dei primer è stato utilizzato il software Primer 3.0 impostando i seguenti parametri: dimensione primer 22 bp, dimensione amplicone 150-230 bp, temperatura di melting di 64 °C, GC clamp

2 e percentuale di GC pari al 50%. Le condizioni di amplificazione utilizzate per questi marcatori sono state le stesse utilizzate per i marcatori microsatelliti precedentemente descritti.

Altri 20 marcatori SSR genomici disponibili pubblicamente su GrainGene (identificati con la sigla BARC e GPW) sono stati saggiati per l'identificazione di nuovi polimorfismi.

Inoltre considerata l'identificazione nella regione distale del 3BS di *Qfhs.ndsu-3BS*, un QTL ad effetto principale per la resistenza a fusariosi (Waldron *et al.*, 1999), tre marcatori molecolari (*sts3b-32*, *sts3b-80* e *umn10*) associati al locus di resistenza al *Fusarium* (*Fhb1*) (Liu *et al.*, 2008) sono stati saggiati per identificare polimorfismi tra Kofa e Svevo. Per quest'ultimi marcatori STS il saggio è stato effettuato utilizzando come controlli due genotipi di riferimento Chinese Spring e Sumai3, la cultivar di *T. aestivum* portatrice dell'allele di resistenza (*Fhb1*).

1.3. Dati fenotipici

La valutazione fenotipica delle 249 RIL Kofa × Svevo è stata effettuata precedentemente al mio dottorato all'interno di un progetto europeo IDuWUE (Improving Durum wheat for Water Use Efficiency) che aveva l'obiettivo di identificare QTL per la stabilità produttiva in diversi paesi del Mediterraneo caratterizzati da diverse condizioni climatiche e un diverso apporto idrico.

In totale, sedici prove di campo sono state condotte in sei diverse località del Mediterraneo: Italia (Ita), Spagna (Spa1: Granada e Spa2: Leida), Marocco (Mar), Tunisia (Tun), Siria (Sir) e Libano (Lib). Otto prove sono state effettuate nell'anno 2004 (indicate con 04) e otto nell'anno 2005 (indicate con 05). Due condizioni di irrigazione sono state valutate: prove irrigate (indicate con "i": irrigated) e prove non irrigate (indicate con "r":rainfall).

I caratteri che sono stati utilizzati per la valutazione dei due QTL ad effetto principale durante questo lavoro sono:

- altezza della pianta (PH: Plant Height) espressa in cm;
- lunghezza del peduncolo (PedL: Peduncle Length) espressa in cm;
- Peso medio dei semi (TKW: Thousand Kernel Weight) espresso in g;
- Resa in granella (GY, Grain Yield) ad umidità costante (ca. 14%) espressa in q ha⁻¹;
- Indice di verde (SPAD) espresso in unità.

I dati fenotipici medi della popolazione per ciascun ambiente e carattere sono stati riportati nella tabella 4.

1.4. Studio di segregazione alla regione del QTL

A seguito della lettura dei profili dei marcatori molecolari saggiati sulle 249 RIL costituenti la popolazione di mappa Kofa × Svevo, è stata realizzata una matrice di codici A e B a seconda, rispettivamente, della presenza dell'allele Kofa o Svevo; i genotipi eterozigoti sono stati registrati come dati mancanti (-). La matrice di dati (A,B,-) è stata utilizzata per valutare la segregazione dei marcatori

molecolari e loro distanza genetica attraverso l'utilizzo del programma JoinMap v.4 (Van Ooijen, 2006). L'analisi di raggruppamento "grouping" dei marcatori significativamente associati tra loro è stata effettuata utilizzando un'analisi statistica del LOD score indipendente (Logarithm of Odds) che determina la probabilità di ricombinazione tra i diversi marcatori. Per il mappaggio multiplo si è utilizzato l'algoritmo di mappa ML (Maximum Likelihood). Tutti i marcatori che non sono rientrati nello stesso gruppo dei marcatori già mappati e specifici del cromosoma 2B e 3B sono stati eliminati. Per fissare la posizione dei marcatori noti si è utilizzata la funzione "Fix". Inoltre l'ordine dei marcatori sul cromosoma e la distanza tra marcatori espressa in cM è stata calcolata con la funzione di Haldane.

1.5. Analisi QTL

L'analisi QTL per i caratteri resa in granello, peso medio dei semi, altezza della pianta, lunghezza del peduncolo e indice di verde è stata effettuata:

- sulle medie di tutte le 16 prove di campo condotte nei diversi ambienti del Mediterraneo (Italia, Spagna, Marocco, Tunisia, Siria e Libano) effettuate nel 2004 e nel 2005;
- sulle medie delle prove sperimentali effettuate nel 2004 e sulle medie di quelle effettuate nel 2005;
- sugli 8 ambienti (per il 2004: Ita_r, Spa1_r, Tun_r, Sir_r, Sir_i; per il 2005: Ita_r, Sir_i, Lib_i) nei quali sono stati identificati i QTL ad effetto principale sul cromosoma 2BL e 3BS (Maccaferri et al., 2008).

La metodologia di cui ci si è avvalsi è stata quella della mappatura per intervallo di confidenza (CIM: Composite-Interval Mapping) (Jansen, 1993; Jansen e Stam, 1994; Zeng, 1994) e della mappatura per intervallo multiplo (MIM: Multiple-Interval Mapping) (Kao *et al.*, 1999; Zeng *et al.*, 1999) effettuate tramite il programma Windows QTL-Cartographer versione 2.5 (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>) (Basten *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005).

Con l'analisi CIM solo i valori medi di ciascun carattere sono stati analizzati per identificare l'intervallo di confidenza con LOD-1. Per l'analisi è stato utilizzato il "model 6 standard analysis" utilizzando i seguenti parametri:

- un intervallo ("walking step") di 2 cM,
- i marcatori-controllo o cofattori sono stati scelti sulla base di una analisi di regressione, utilizzando fino a 10 marcatori-controllo,
- i marcatori-controllo sono stati esclusi dalla analisi CIM quando si trovavano entro un intervallo ("window") di 10 cM per parte (20 cM in totale) centrato sulla posizione sottoposta ad analisi.

Vista la forte interazione epistatica manifestata dai QTL identificati sul cromosoma 2BL e 3BS (Maccaferri et al., 2008) l'analisi MIM ha permesso di ottenere migliori informazioni sulle posizioni del QTL e più in particolare è in grado di stimare gli effetti di interazione epistatica tra i diversi QTL. I principali effetti additivi e le loro interazioni epistatiche sono stati saggiati per determinarne la

significatività tramite un criterio Bayesiano (indicato con BIC: Bayesian information criterion) con una funzione di penalità ottenuta tramite la seguente formula:

$$c(n) = \log(n)$$

dove $n = 249$ (numerosità della popolazione). Successivamente sono stati stimati i valori dell'effetto additivo e dell'effetto epistatico del QTL, le componenti della varianza e i valori di R^2 .

Il coefficiente di determinazione genetica (R^2) per valutare la quota di varianza fenotipica spiegata dall'effetto associato al marcatore considerato è stato stimato in base alla seguente formula:

$$R^2 = \text{varianza dovuta al marcatore considerato} / \text{varianza fenotipica totale}$$

La soglia LOD utilizzata per dichiarare un QTL significativo per ogni combinazione carattere-ambiente è stata pari a 2,5. Il valore dell'effetto additivo di ciascun QTL è stato calcolato come metà della differenza tra le medie dei valori fenotipici dei due gruppi di RIL, che, basandosi sulle informazioni dei marcatori fiancheggianti, sono stati assunti essere omozigoti per uno o l'altro allele parentale alla regione del QTL. In particolare, l'effetto additivo (a) del QTL è stato definito come $\frac{1}{2}(\text{Svevo} - \text{Kofa})$; così che a risulta essere positivo quando Kofa presenta un valore più basso.

2. RISULTATI

2.1. Arricchimento di marcatori nella regione limitrofa a *Qyld.idw-2B*

Solo 15 marcatori, che corrispondono al 16,1% del totale di marcatori saggiati tra SSR e COS, sono risultati polimorfici tra i due parentali e sono stati quindi mappati sul cromosoma 2B della popolazione RIL Kofa × Svevo. Nell'ambito dei microsatelliti sono risultati polimorfici un totale di 10 marcatori (25% del totale di SSR), identificati con la sigla GWM e GPW. Gran parte di questi marcatori microsatelliti (85%) sono risultati essere a singolo locus e presentano profili in grado di discriminare le due varianti alleliche; i restanti marcatori polimorfici hanno amplificato da uno a tre loci addizionali polimorfici, che sono stati contrassegnati da una numerazione successiva (es. *gwm4828.1*).

Per quanto riguarda i marcatori COS, solo 5 (9,4% del totale) hanno presentato un polimorfismo varietale specifico per il 2B e sono stati mappati. Di seguito si riportano ulteriori dettagli in merito:

- A seguito del clonaggio dei 9 marcatori COS solo per 6 è stato possibile discriminare differenze a livello dei due omeologhi. L'analisi delle sequenze di sei cloni selezionati per ciascun marcatore ha permesso di discriminare i due cluster di sequenze specifiche per i due omeologhi con una proporzione di 3:3 o 2:4 (Figura 2). Le differenze osservate tra i due omeologhi sono state in lunghezza (da 1 a 10 bp) e di SNP a livello della sequenza con una frequenza di 1 ogni 100 bp. Tra questi solo un marcatore, BG313362, è risultato essere polimorfico tra i due parentali per il genoma B ed è stato mappato nella popolazione di RIL Kofa × Svevo attraverso lo sviluppo di un primer specifico per il genoma B e l'altro specifico per l'allele di Kofa (Figura 3a).
- Dall'analisi dei 33 marcatori COS saggiati con i "DNA sorting" del 2AL e 2BL di Chinese Spring è stato possibile identificare differenze tra i due omeologhi per il 90% dei marcatori. Tra questi sono state ottenute differenze genomiche a livello di inserzioni/delezioni e di SNP. Per quelle in cui il disegno di primer genoma-specifici ha avuto successo, solo due marcatori BF474250 e AK333482 sono risultati essere polimorfici tra Kofa e Svevo e sono stati mappati sul cromosoma 2B (Figura 3b).
- Dall'analisi dei 11 marcatori COS identificati con la sigla UBW2B solo 2 marcatori (*ubw2B.2* e *ubw2B.13*) sono risultati polimorfici. I polimorfismi varietali sono stati identificati su elettroforesi verticale e l'effettiva specificità genomica è stata confermata dall'utilizzo di campioni di controllo come il nulli-tetrasomico del 2B e accessioni di *A. speltoides* e *T. urartu*. Tra i due parentali sono state rilevate differenze in lunghezza di circa 3-6 bp (Figura 4).

Nella tabella 5 è stata riportata la lista dei marcatori molecolari polimorfici tra i due parentali specifici del genoma B con i loro valori di peso molecolare, temperature di appaiamento e sequenza dei primer sviluppati. I 15 marcatori molecolari che sono risultati polimorfici sono stati mappati lungo tutto il cromosoma 2B, tra questi solo 6 marcatori sono stati posizionati nella regione distale del cromosoma 2B,

dove è localizzato *Qyld.idw-2B*, permettendo di ottenere in tale regione una risoluzione di un marcatore ogni 2,8 cM (Figura 5). Dall'analisi della composizione aplo-tipica della popolazione di mappa Kofa × Svevo, tra tutte le RIL è stato possibile identificare 44 linee ricombinanti informative ai fini dell'analisi della segregazione del QTL (Figura 6).

2.2. Arricchimento di marcatori della regione limitrofa a *Qyld.idw-3B*

Da uno screening preliminare effettuato sui DNA dei nulli-tetrasomici di Chinese Spring, circa il 95% dei marcatori sono risultati specifici del genoma B. Tra questi solo il 12,6% sono polimorfici tra le due linee parentali, Kofa e Svevo, e sono stati saggiati sulle 249 RIL della popolazione.

Più in dettaglio tra tutti i microsatelliti, sia genomici che derivati da BES, 37 sono stati mappati sul cromosoma 3B (Tabella 6). Il 76% sono risultati essere marcatori a singolo locus che hanno amplificato il prodotto PCR di peso molecolare atteso mentre i restanti saggi hanno prodotto uno o più bande addizionali monomorfe.

In base al profilo ottenuto, il 40% dei marcatori polimorfici sono risultati dominanti (banda presente in un parentale ed assente nell'altro), mentre i restanti marcatori sono risultati co-dominanti presentando delle piccole variazioni di lunghezza comprese tra 3 e 10 bp causate dalle variazioni nel numero delle ripetizioni del motivo di base del microsatellite (Figura 7).

Tra gli 80 ISBP analizzati solo 7 (identificati con la sigla CFP) sono risultati essere polimorfici e sono stati mappati nella regione sede del QTL. Tra questi:

- *cfp5080* e *cfp5078* risultano polimorfici per inserzione/delezione (indel) di pochi bp;
- *cfp 5075.2* e *cfp78* risultano dominanti;
- *cfp3236*, *cfp132* e *cfp60* invece presentano differenze a livello di singolo nucleotide (SNP, Single Nucleotide Polymorphism).

Il saggio per l'identificazione degli SNP sulla popolazione è stato effettuato attraverso la metodologia CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) grazie all'identificazione di siti di restrizione enzimatici a livello della sequenza dove è stato identificato lo SNP per uno dei due parentali (Figura 8). Per il taglio enzimatico sono stati utilizzati enzimi con sito di riconoscimento a 4 e 6 basi, come riportato nella tabella 7.

Dallo screening dei tre marcatori STS (Simple Tag Sequence) associati al gene della resistenza a fusariosi (*Fh1*) solo l'*umn10* è risultato essere polimorfico tra le linee parentali. Dal profilo ottenuto risulta che l'allele è assente in Kofa e presente in Svevo con un peso molecolare di 256 bp, che è lo stesso valore riportato per le linee suscettibili (Liu *et al.*, 2008). La banda ottenuta per Svevo risulta avere una differenza di 3 bp da quella di Sumai3 che corrisponde all'allele resistente (Figura 9).

In totale, 45 marcatori polimorfici tra Kofa e Svevo sono stati mappati sul cromosoma 3B, di cui 43 sono stati posizionanti nell'intervallo delimitato dai marcatori microsatelliti *gwm389* e *gwm493* e sede di *Qyld.idw-3B* (Figura 10).

La lista di tutti i marcatori molecolari mappati sul cromosoma 3B è riportata nella tabella 8.

Dall'analisi di associazione dei marcatori e dal calcolo delle frequenze di ricombinazione sono stati osservati gruppi di marcatori co-segreganti composti da 2 fino a 11 marcatori; la co-segregazione è dovuta alla bassa risoluzione della popolazione RIL relativamente alla densità dei marcatori mappati.

Utilizzando solo un marcatore rappresentativo per ogni gruppo di marcatori co-segreganti risulta che un totale di 19 marcatori molecolari sono informativi per saturare la regione sede del QTL nella popolazione di mappa Kofa × Svevo ottenendo una risoluzione media di un marcatore ogni 0,6 cM (Figura 10).

Dall'analisi della composizione aploipica delle 249 RIL è stato possibile osservare che circa il 16% delle linee sono caratterizzate da sub-regioni eterogenee (non fissate in inbreeding) e quindi ancora in eterozigosi a livello della regione del QTL. Tra tutte le 249 RIL, 30 sono risultate effettivamente ricombinanti per il QTL (Figura 11), in omozigosi per un parentale al marcatore *gwm1034* e per l'altro parentale al marcatore *gwm493*.

Tutti i marcatori mappati nel cromosoma 3BS della popolazione di mappa Kofa × Svevo sono stati ancorati alla mappa fisica di Chinese Spring (Paux *et al.*, 2008). La regione dal marcatore *gwm389* al *cfp132* è localizzata nel bin di delezione 3B3-0.87-1.00 mentre la regione dal marcatore *gwm1034* al *gwm493* si trova nel bin di delezione 3B8-0.78-0.87 (Figura 12) e per ciascun marcatore è stato identificato il corrispondente contig della mappa fisica (Wheat 3B FPC physical map v2.4: http://urgi.versailles.inra.fr/cgi-bin/gbrowse/wheat_FPC/). Sono stati individuati un totale di 7 contig di cui i tre principali corrispondenti al ctg11, ctg954 e ctg918 che coprono una regione rispettivamente di circa 1,3, 3,0 e 1,8 cM della mappa genetica del cromosoma 3BS di Kofa × Svevo (Tabella 7).

2.3. Analisi QTL

Per l'analisi QTL sono state utilizzate un numero ridotto di RIL (217 in totale) eliminando tutte quelle linee in eterozigosi per la regione del 3BS che avrebbero potuto risultare di disturbo per un'analisi accurata. Una prima analisi è stata effettuata sui valori fenotipici medi dei caratteri agronomici utilizzando l'approccio della mappatura per intervallo composto (CIM). Da questa analisi è risultato che in generale per gran parte dei caratteri considerati l'intervallo di confidenza con LOD-1 è stato definito in una regione di 15 cM (tra *gwm1399* e *gwm4828.1*) per i QTL sul cromosoma 2BL e 6 cM (tra *barc133* e *wms493*) per i QTL sul cromosoma 3BS (Figura 13, Tabella 10). Per il QTL che influenza il carattere peso medio dei semi è stato identificato un intervallo più ristretto sul cromosoma 3B (*Qtkw.idw-3B*), localizzato in un intervallo di 4 cM fiancheggiato dai marcatori *cfb6127* e *cfp60*. Anche i QTL identificati per la lunghezza del peduncolo e l'indice di verde sia nel cromosoma 2BL che nel cromosoma 3BS sono stati identificati in un intervallo più ristretto che, come per il *Qtkw.idw-3B*, risultano essere compresi nelle stesse regioni identificate per gli altri caratteri.

Vista la forte interazione epistatica manifestata dai due QTL (Maccaferri *et al.*, 2008), un'analisi QTL attraverso la metodologia della mappatura per intervallo multiplo (MIM) risulta essere più precisa

nell'identificare la posizione corretta del picco del QTL. Un'analisi MIM è stata svolta sui valori fenotipici medi di ogni carattere e sui valori fenotipici individuali degli otto ambienti per i quali originariamente erano stati identificati i QTL ad effetto principale per la resa. I risultati dell'analisi per ciascun carattere vengono riportati nella tabella 11 e sono descritti in dettaglio di seguito.

2.3.1. QTL per la resa in granella (*Qyld.idw-2B* e *Qyld.idw-3B*)

Dai dati fenotipici medi (ottenuti da prove condotte in sedici ambienti diversi) risulta che *Qyld.idw-2B* ha un picco a 184 cM dove è localizzato il marcatore *gwm4828.1* caratterizzato da un LOD di 5,8. L'effetto additivo senza considerare l'effetto epistatico del *Qyld.idw-2B* è di 0,47 q ha⁻¹ con un valore medio fenotipico della popolazione di 35,9 q ha⁻¹ mentre il valore di R^2 è di 16,8%.

Il picco del *Qyld.idw-3B* viene identificato a 9,8 cM a livello del marcatore *cfb6043* con un LOD di 4,5, valore di R^2 pari a 12,8% e un valore dell'effetto additivo di -0,37 q ha⁻¹.

I QTL con valore LOD maggiore di 2,5 sono stati confermati in quattro ambienti sia per il *Qyld.idw-2B* che per il *Qyld.idw-3B* con un valore di R^2 rispettivamente compresi tra 8,2-14,2% e 6,1-18,6%. Per tutti gli ambienti l'allele favorevole all'incremento del carattere sul 2BL è contribuito dal parentale Svevo con una variazione dell'effetto additivo da 1,09 a 1,78 q ha⁻¹, mentre per il 3BS l'allele favorevole è contribuito dal parentale Kofa con un effetto additivo compreso tra -1,38 e -1,78 q ha⁻¹. Tutti questi ambienti sono caratterizzati da condizioni climatiche diverse e da una media produttiva variabile tra 29,6 e 57,3 q ha⁻¹.

2.3.2. QTL per il peso mille semi (*Qtkw.idw-2B* e *Qtkw.idw-3B*)

In Maccaferri *et al.* (2008) i due QTL ad effetto principale per la resa in granella sul 2BL e 3BS risultano influenzare anche il carattere peso medio dei semi, componente importante della produttività in frumento. Dall'analisi MIM dei singoli ambienti i QTL identificati per il peso medio dei semi risultano sovrapporsi a *Qyld.idw-2B* e *Qyld.idw-3B* in quattro ambienti con picchi di LOD significativi maggiori di 2,7.

Sul cromosoma 2BL il *Qtkw.idw-2B* è caratterizzato da valori di R^2 compresi tra 9,5 e 15,8% e valori di effetto additivo tra 1,01 e 1,90 g, mentre il *Qtkw.idw-3B* presenta dei valori più alti di R^2 tra 11,8-19,0% e valori di effetto additivo compresi tra e - 0,50 e - 2,18 g.

Dai valori fenotipici medi di tutti gli ambienti risulta che *Qtkw.idw-2B* e *Qtkw.idw-3B* presentano un picco rispettivamente a 182 e 10 cM, con valori R^2 di 10,2 e 16,9% e valore additivi rispettivamente di 0,61 e -0,71 g su un valore medio della popolazione di 40,7 g.

2.3.3. QTL per l'altezza della pianta (*QPht.idw-2B* e *QPht.idw-3B*) e la lunghezza del peduncolo (*QPedL.idw-2B* e *QPedL.idw-3B*)

Negli otto ambienti sono stati identificati QTL che risultano influenzare l'altezza della pianta e la lunghezza del peduncolo con valori di LOD significativi nella stessa posizione in cui sono stati identificati i QTL per la resa. Dai risultati dell'analisi MIM dei valori fenotipici medi per entrambe i caratteri il picco del QTL è posizionato a 181 cM sul 2BL mentre a 9,7 e 10 cM sul 3BS rispettivamente per l'altezza della pianta e la lunghezza del peduncolo.

Risultati molto interessanti sono stati ottenuti per i QTL che influenzano il carattere lunghezza del peduncolo, caratterizzati da picchi di LOD maggiori di 11 in entrambi i cromosomi. Sono stati ottenuti valori medi di R^2 di 20,2% per *QPedL.idw-2B* e di 22,1% per *QPedL.idw-3B* e valori di effetto additivo rispettivamente di 0,55 e -0,53 cm. Per ogni singolo ambiente *QPedL.idw-2B* manifesta valori di R^2 compresi tra 3,6 e 23,4% e valori di effetto additivo tra 0,29 e 1,57 cm; invece *QPedL.idw-3B* risulta essere caratterizzato da valori di R^2 che variano da 7,5 a 18,8% con valori di effetto additivo compreso tra -0,34 e -1,53 cm rispetto a un valore medio fenotipico della popolazione di 15,8 cm.

Valori significativi sono stati ottenuti anche per l'altezza della pianta: in base all'analisi MIM il *QPhT.idw-2B* ha un valore di R^2 di 13,1 e un effetto additivo di 1,23 cm mentre il *QPhT.idw-3B* ha un valore R^2 di 11,9%, e un effetto additivo di -1,14 cm con un valore fenotipico medio della popolazione di 75,8 cm.

Sia per l'altezza della pianta che per la lunghezza del peduncolo gli effetti additivi presentano lo stesso segno di quelli per la resa in granella dove l'allele *plus* risulta essere contribuito dal parentale Svevo nel 2BL e dal parentale Kofa nel 3BS.

2.3.4. QTL per l'indice di verde (*QSpad.idw-2B* e *QSpad.idw-3B*)

I due QTL ad effetto principale identificati sul cromosoma 2BL e 3BS risultano anche influenzare il carattere associato alla colorazione verde delle foglie, che viene identificato come SPAD. I risultati ottenuti di LOD e R^2 sono molto simili a quelli del carattere lunghezza del peduncolo. Sui valori medi il *QSpad.idw-2B* è stato caratterizzato da un LOD di 8,5, un valore R^2 di 19,7 e un effetto additivo di 1,12 unità mentre il *QSpad.idw-3B* risulta avere un LOD di 11,1, un R^2 di 24,9% e un effetto additivo di -1,23 unità.

Dai dati fenotipici disponibili è stato possibile identificare QTL con LOD significativi su tre ambienti che si sovrappongono perfettamente con quelli identificati per la resa in granella. Sono stati ottenuti valori di R^2 compresi tra 7,6-22,6% e 8,54-10,1% rispettivamente per il *QSpad.idw-2B* e il *QSpad.idw-3B*. Per il *QSpad.idw-2B* i valori di effetto additivo sono compresi tra 1,27 e 4,25 unità mentre per il *QSpad.idw-3B* tra -2,04 e -4,66 unità con un valore fenotipico medio della popolazione di 49,2.

2.3.5. Interazione epistatica ai principali QTL nei cromosomi 2BL e 3BS

Attraverso l'analisi MIM è stato possibile stimare l'interazione epistatica tra le due regioni cromosomiche, che risulta influenzare la resa e tutti gli altri caratteri morfo-fisiologici analizzati correlati alla produttività della pianta.

Per ciascun carattere e ciascun ambiente, QTL caratterizzati da un LOD significativo per entrambi i cromosomi hanno mostrato un'interazione epistatica significativa di simile valore rispetto al valore additivo del carattere.

Dall'analisi MIM valori medi dell'interazione epistatica sono stati ottenuti per:

- la resa con LOD di 3,86, valore R^2 del 10,9% ed effetto di 0,36 q ha⁻¹;
- il peso medio dei semi con LOD di 7,1, valore R^2 del 14,8% ed effetto di 0,70 g;
- l'altezza della pianta con LOD di 6,9, valore R^2 del 12% ed effetto di 1,28 cm;
- la lunghezza del peduncolo con LOD di 9,1, valore di R^2 del 14,2% ed effetto di 0,46 cm;
- lo SPAD con LOD di 7,02, valore di R^2 del 13,1% ed effetto di 0,98.

3. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Anche se in letteratura sono presenti molti lavori riguardanti analisi QTL per svariati caratteri agronomici in frumento (Li *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2003; Elouafi e Nachit, 2004; Huang *et al.*, 2004, 2006; Quarrie *et al.*, 2005, 2006; McCartney *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2006; Marza *et al.*, 2006; Narasimhamoorthy *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2007; McIntyre *et al.*, 2010; Heidari *et al.*, 2011), si hanno poche informazioni sui due QTL principali identificati sul cromosoma 2BL e 3BS.

Il QTL principale sul cromosoma 2BL non è mai stato individuato con precisione nei precedenti lavori. In Börner *et al.* (2002), QTL per la resa della granella e altezza della pianta sono stati individuati nella regione prossimale del 2BL, mentre Marza *et al.* (2006) hanno individuato QTL per resa, peso medio dei semi e numero di semi per spiga nel cromosoma 2AL.

Alcuni studi di mappatura di QTL eseguiti da Verma *et al.* (2004) e da Snape *et al.* (2006) sulla popolazione di frumento tenero Beaver × Soisson hanno poi evidenziato la presenza di un QTL principale per la durata della fotosintesi nella foglia bandiera durante la fase di riempimento della granella e hanno evidenziato la presenza di un secondo QTL principale nella porzione distale del cromosoma 2DS. Questo QTL, che influenza la resa, potrebbe essere allelico al QTL identificato nelle 249 RIL della popolazione Kofa × Svevo.

Campbell *et al.* (2003) e Dilbirligi *et al.* (2006), lavorando con la popolazione di mappa ottenuta da Cheyenne (Wichita 3A) × Cheyenne, hanno evidenziato la presenza di un QTL importante per resa e vari caratteri correlati posizionato proprio sulla regione omeologa (3AS distale) a *Qyld.idw-3B*.

Solo più di recente da studi sul contenuto proteico della granella, QTL per la resa localizzati nella regione distale del cromosoma 3BS sono stati identificati in due distinte popolazioni di T. *durum* UC1113 × Kofa (Conti *et al.*, 2011) e Ciccio × Svevo (Blanco *et al.*, 2011).

In Maccaferri *et al.* (2008) i due QTL ad effetto principale per la resa, localizzati sul cromosoma 2BL e 3BS, risultano essere molto stabili in quanto identificati in vari ambienti con caratteristiche ambientali molto diversificate, caratterizzati da una diversa disponibilità idrica e potenzialità produttiva. Entrambi i QTL risultano influenzare anche altri caratteri agronomici correlati alle resa ma non il carattere della data di fioritura. Questo permette di avvalorare le caratteristiche dei due QTL che risultano essere caratterizzati da basi genetiche “*per se*” del carattere resa il cui effetto non risulta essere determinato da variazioni per la data di fioritura, un meccanismo di adattamento ben noto che influenza la produttività di cultivar di frumento nelle regioni tipiche del Mediterraneo (Reynolds e Tuberosa, 2008).

Data l'importanza dei due QTL ad effetto principale identificati sui cromosomi 2BL e 3BS, si è proceduto alla saturazione della mappa nelle regioni sede dei QTL per cercare di studiare più in dettaglio le basi molecolari che regolano l'espressione di questi caratteri di grande importanza agronomica per una loro migliore caratterizzazione ed un eventuale clonaggio.

L'arricchimento delle due regioni cromosomiche è stato effettuato attraverso due differenti approcci in base alle diverse disponibilità di informazioni utili per lo sviluppo e l'identificazione di nuovi marcatori polimorfici da aggiungere alla regione.

Per quanto riguarda *Qyld.idw-2B*, la mancanza di informazioni di sequenze di librerie genomiche ha reso più difficile e laboriosa l'identificazione di nuovi marcatori da aggiungere nell'intervallo del QTL. La strategia utilizzata è stata quella dell'identificazione dei geni ortologhi ottenuti da un'analisi di collinearità con specie modello già sequenziate utili per lo sviluppo di marcatori molecolari chiamati COS.

Già dai primi studi di genetica comparativa si è dimostrato che diversi geni e QTL per caratteri coinvolti nello sviluppo della pianta e nell'addomesticamento, come ad esempio altezza della pianta (Lin *et al.*, 1995), vernalizzazione (Bailey *et al.*, 1999) e data di fioritura (Paterson *et al.*, 1995) sono presenti in posizioni conservate tra cereali. Più di recente, il clonaggio posizionale di geni in orzo, frumento e mais ha confermato la conservazione di regioni ortologhe (*Vrn1*, (Yan *et al.*, 2003); *PPD-H1* (Turner *et al.*, 2005)). Tra frumento e riso sono stati identificati anche casi di scarsa collinearità dovuti ai riarrangiamenti genomici come nel caso dei geni di resistenza *Lr21* (Huang *et al.*, 2003), *Lr10* (Feuillet *et al.*, 2003) e *Pm3b* (Yahiaoui *et al.*, 2004).

La costruzione di mappe comparative ad alta risoluzione di genomi sequenziati come riso, sorgo, mais e *Brachypodium* verso genomi non sequenziati hanno fornito la prospettiva di utilizzare genomi modello come riferimento per identificare geni ortologhi e procedere con il clonaggio posizionale attraverso un nuovo approccio chiamato “*cross-genome map-based cloning*” (Salse *et al.*, 2009). Sfruttando le informazioni di sintenia tra EST di frumento e genomi di riso e *Brachypodium* sono state ottenute mappe ad alta risoluzione per il mappaggio fine del gene di resistenza all'oidio (*Pm6* (Qin *et al.*, 2011)) e per il QTL coinvolto nella caratteristica reologica del glutine dovuta alla presenza dei pentosani (viscosità) (Quraishi *et al.*, 2009).

Una problematica comune nello studio delle specie poliploidi è quella di riuscire a discriminare i due geni ortologhi per poter sviluppare marcatori molecolari che garantiscano la specificità genomica. Inoltre i polimorfismi varietali più frequenti sono a livello di mutazioni puntiformi (SNP), differenze difficilmente rilevabili con le comuni tecnologie di elettroforesi utilizzate in tutti i laboratori.

Diversi approcci sono stati utilizzati con l'obiettivo di cercare di genotipizzare i marcatori COS e discriminare sia differenze genomiche che varietali. La tecnologia dell'SSCP-SNP (Single-Strand Conformational Polymorphism–Single Nucleotide Polymorphism) è stata la prima sviluppata per l'identificazione indiretta e genotipizzazione di SNP (Yu *et al.*, 2005). La tecnologia SSCP (Orita *et al.*, 1989) è stata utilizzata in miglio (Bertin *et al.*, 2005) e più di recente in frumento attraverso una modificazione del protocollo adattato per un saggio con sequenziatori capillari (Quraishi *et al.*, 2009). Altre metodologie sono state utilizzate come ad esempio gel di poliacrilamide ad alta risoluzione non-denaturante (Liu e Anderson, 2003; Qin *et al.*, 2011) o metodologia CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) in grado di identificare frammenti polimorfici ottenuti da tagli enzimatici

(Ishikawa *et al.*, 2007). SNP possono essere identificati anche attraverso la tecnica dell'HRM (High-Resolution Melting curve analysis) (Ririe *et al.*, 1997; Dong *et al.*, 2009) dove le temperature di melting (T_m) di separazione degli ampliconi è determinata dalla composizione nucleotidica del filamento.

Per arricchire la regione *Qyld.idw-2B* sono stati utilizzati marcatori COS sviluppati su geni ortologi identificati tra gli EST localizzati sul bin di delezione 2B6-0.89-1.00 e i genomi di riso, *Brachypodium* e sorgo. Una strategia utilizzata è stata quella del clonaggio degli ampliconi di uno o entrambe i parentali e il successivo sequenziamento di più cloni che hanno permesso di identificare in modo diretto differenze a livello genomico e differenze tra varietà. Questa strategia è risultata molto valida, ma visti i costi elevati e i lunghi tempi del clonaggio, sono state adottate altre strategie per cercare di discriminare in modo veloce ed efficiente le due forme omeologhe.

L'utilizzo di accessioni degli ancestrali *T. urartu* e *A. speltoides*, in quanto donatori rispettivamente del genoma A e del genoma B in frumento, come sequenza di riferimento per discriminare le due varianti genomiche è risultata una tecnica con bassa applicazione. Non è stato ottenuto nessun risultato a causa delle differenze a livello di SNP e di inserzioni e delezioni tra le sequenze delle diverse accessioni di *A. speltoides* con il genoma B di frumento, che hanno impedito l'identificazione di regioni valide per il disegno di primer genoma B specifici, a differenza delle accessioni *T. urartu* che invece sono risultate essere più conservate con il genoma A di frumento. Questo avvalorava l'ipotesi che molto probabilmente *A. speltoides* non è il donatore del genoma B di frumento (Nevo *et al.*, 2002). Infatti attualmente sono ambigue le informazioni che si hanno su un'ipotetica discendenza del genoma B del *T. aestivum* da *A. speltoides*, vi sono anche dei sospetti che il donatore del genoma B sia andato perduto durante l'evoluzione (Gupta *et al.*, 2008).

Con l'utilizzo dei DNA isolati da bracci cromosomici 2AL e 2BL di Chinese Spring si è potuto subito discriminare la specificità genomica e disegnare primer specifici per il genoma B. L'utilizzo dei DNA isolati da bracci cromosomici attraverso citometria a flusso è una strategia utile per saggiare la specificità genomica dei marcatori prima del loro mappaggio (Dolezel *et al.*, 2007).

Attraverso un saggio effettuato su gel di poliacrilamide al 5% è stato possibile identificare polimorfismi di lunghezza tra i due parentali associandoli ad uno dei due genomi utilizzando campioni di controllo per discriminare la specificità genomica (ad esempio "DNA sorting", nulli-tetrasomici o ancestrali).

Dal totale dei COS saggiati solo l'9,4% sono stati mappati sul cromosoma 2B, una percentuale molto più bassa rispetto a quella ottenuta in popolazioni di frumento tenero (Quraishi *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2011); tuttavia la stessa percentuale è stata osservata dalla valutazione di altre popolazioni elite di frumento duro effettuata presso il laboratorio di Genetica agraria del DiSTA di Bologna.

Tra i due genomi omeologhi sono risultati molto frequenti i polimorfismi dovuti a variazioni di lunghezza (indel) e mutazioni puntiformi (SNP) che hanno facilitato la realizzazione di primer specifici per il genoma. Purtroppo i polimorfismi tra le due varietà sono risultati essere molto scarsi: dall'analisi di tutte le sequenze ottenute la frequenza di polimorfismo risulta essere di 1 SNP ogni 1.500 bp, stessi valori

ottenuti anche su altre popolazioni di frumento duro e circa i valori presentati in letteratura per genomi di frumento allotetraploidi di 1 SNP/Kb (Saintenac *et al.*, 2011).

Tra i COS, UBW e SSR mappati solo 6 marcatori risultano essere localizzati nella regione del QTL, permettendo di ottenere una risoluzione di un marcatore ogni 2,8 cM. La risoluzione ottenuta nella regione *Qyld.idw-2B* è insufficiente per un mappaggio fine ed un eventuale clonaggio posizionale del QTL; in ogni caso l'aggiunta di questi marcatori ci ha permesso di definire meglio la regione del QTL. Originariamente il *Qyld.idw-2B* è stato mappato in un intervallo di 19 cM, mentre ora è stato possibile ridurre la regione in un intervallo di confidenza LOD-1 di 15 cM. Inoltre il mappaggio di due COS nella regione *Qyld.idw-2B* ha permesso di definire la sintenia tra frumento e *Brachypodium*, specie modello attualmente più utilizzata nelle analisi di genomica comparativa per il frumento in quanto ad esso più affine. I COS identificati con il nome BG313362 e AK333482 risultano essere disegnati su EST sintenici con due geni di *Brachypodium* rispettivamente Bradi5g26820 e Bradi5g27590 che delimitano una regione di circa 670 Kb sul cromosoma 5L di *Brachypodium*. Da questa regione è stato possibile identificare una lista di 54 geni che risultano essere conservati anche in riso e sorgo (selezionati da <http://mips.helmholtz-muenchen.de/plant/triticeae/genomes/index.jsp> (Mayer *et al.*, 2011)) e che potrebbero essere utilizzati per un nuovo sviluppo di marcatori COS o come risorsa di geni candidati coinvolti nell'effetto del QTL (tabella 12).

Per quanto riguarda la saturazione della regione di *Qyld.idw-3B* sono stati mappati nuovi marcatori molecolari tra SSR e ISBP grazie alle informazioni di sequenza ottenute durante la realizzazione della mappa fisica del cromosoma 3B di *T. aestivum* ottenuta dal gruppo della Dott.ssa Feuillet presso l'istituto INRA di Clermont-Ferrand (INRA, Francia). La grande disponibilità di marcatori molecolari ci ha permesso di identificare un sufficiente numero di polimorfismi e di ottenere una distanza media tra marcatori di 0,6 cM. Tale livello di risoluzione sarebbe stato difficile da ottenere in assenza delle informazioni di sequenza della mappa fisica di frumento tenero, come è stato dimostrato per il *Qyld.idw-2B*. Infatti le metodologie tradizionali usate fino ad oggi si basavano sulla costruzione diretta di librerie genomiche e più di recente su approcci di genomica comparata per le quali lo sviluppo di nuovi marcatori molecolari richiede ingenti risorse e tempi più lunghi. Il complessivo livello di polimorfismo ottenuto tra SSR e gli ISBP risulta essere uguale rispettivamente a 14,2 e 9,0%; valore simile a quanto riportato per marcatori SSR e ISBP genomici saggiati in accessioni di germoplasma elite di frumento, avente un livello di polimorfismo molto più basso rispetto a quello osservato per il frumento tenero (Paux *et al.*, 2010).

L'ordine dei marcatori ottenuto per i genotipi delle RIL Kofa × Svevo è lo stesso di quello riportato per la mappa fisica di Chinese Spring. Questa osservazione basata sui loci genomici indica un'alta conservazione della sequenza cromosomica di questa regione tra di *T. aestivum* e *T. durum*.

Originariamente il *Qyld.idw-3B* è stato localizzato in un intervallo di 11 cM; con l'arricchimento della regione è stato possibile restringere l'intervallo a 6 cM permettendo di localizzare il picco del QTL tra i marcatori *cfb6018* e *cfb6021* in base ai dati ottenuti dall'analisi MIM. Dall'integrazione della mappa

genetica della popolazione Kofa × Svevo con la mappa fisica di Chinese Spring è stato possibile identificare il contig associato al picco del QTL che corrisponde al ctg954.

Il contig 954, di 3.156 kb, è stato completamente sequenziato e annotato in frumento tenero (Choulet *et al.*, 2010) e risulta essere assemblato da un totale di 26 BACs che includono 42 geni, 8 pseudogeni e 4 frammenti di geni, con una densità di 15.8 genes/Mb (Tabella 13). Questo ci può permettere di identificare dei geni candidati coinvolti nell'effetto di *QYld.idw-3B*, i quali potrebbero essere anche utilizzati per sviluppare nuovi marcatori molecolari utili nel mappaggio fine di *QYld.idw-3B*.

Il marcatore STS *umn10*, strettamente associato al QTL ad effetto principale per la resistenza a fusariosi (*Fhb1* (Liu *et al.*, 2008)), è stato mappato nella popolazione Kofa × Svevo nel contig 954 a distanza di circa 1 cM dalla posizione di *QYld.idw-3B*. Sebbene la variazione allelica al QTL per la resa e per tutti gli altri caratteri correlati sia stata studiata in esperimenti di campo non soggetti ad infezioni da fusariosi (Maccaferri *et al.*, non pubblicato), una recente valutazione di linee isogeniche per il *QYld.idw-3B* ha manifestato un effetto significativo alla risposta a fusariosi molto probabilmente dovuto a differenza in suscettibilità indotte dal differente vigore vegetativi degli alleli al QTL (Maccaferri *et al.*, non pubblicato). Con l'arricchimento delle due regioni è stato possibile delimitare il QTL in intervalli più ristretti permettendoci di avere delle informazioni più precise sugli ipotetici geni candidati a partire dalle informazioni di geni orologi identificati in *Brachypodium* per *QYld.idw-2B* e nel *T. aestivum* per *QYld.idw-3B*.

I risultati ottenuti dall'analisi QTL hanno confermato l'effetto dei due QTL per la resa che risulta influenzare anche il peso medio dei semi e altri caratteri morfo-fisiologici come l'altezza della pianta, la lunghezza del peduncolo e l'indice di verde. Per tutti i caratteri l'intervallo identificato dall'analisi CIM e MIM risulta essere coincidente sia per quanto riguarda i QTL identificati sul cromosoma 2BL che su quelli del cromosoma 3BS. Questo permette di ipotizzare la presenza di uno o più geni pleiotropici che potrebbero determinare gli effetti di tutti questi caratteri agronomici tra loro correlati. Inoltre è interessante osservare che per tutti i caratteri l'effetto additivo risulta avere la stessa direzione, ne deriva che alle piante con un più alto valore di produttività e un maggior peso medio dei semi saranno associati anche più alti valori fenotipici di altezza della pianta, lunghezza del peduncolo e indice di verde. Questo faciliterà il clonaggio del QTL per la resa permettendo di effettuare rilievi fenotipici su valori più facilmente misurabili come l'altezza della pianta e la lunghezza del peduncolo rispetto al più laborioso rilievo della resa.

FIGURE

Figura 1: Rappresentazione schematica delle regioni ortologhe identificate dall'analisi di collinearità tra EST mappati di frumento tenero (*Triticum aestivum*) e i due genomi modello *Oryza sativa* (a; immagine modificata da Salse *et al.*, (2008)) e *Brachypodium distachyon* (b; immagine modificata da International Brachypodium Initiative, (2010)). Nell'immagine sono rappresentati i blocchi sintenici identificati tra i 7 cromosomi di *Triticum aestivum* e rispettivamente: a) i 12 cromosomi di *Oryza sativa*; b) i 5 cromosomi di *Brachypodium distachyon*.

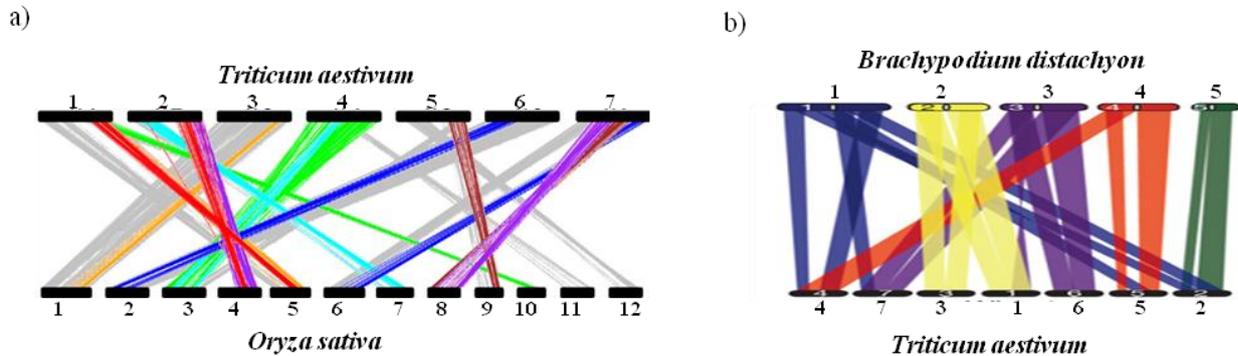


Figura 2: Struttura dell'albero filogenetico e profilo di allineamento di sequenze nucleotidiche rappresentative di sei cloni dell'amplicone BG313362 di Kofa. L'albero filogenetico e l'allineamento sono stati ottenuti con il programma DNAMAN.

a) Albero filogenetico con la distinzione dei cluster rappresentativi dei due genomi. Sequenze specifiche del genoma A sono quelle appartenenti ai cloni 1, 2 e 5 mentre per il genoma B sono quelle dei cloni 3,4 e 6.
 b) Allineamento delle sequenze nucleotidiche. In nero sono evidenziate le regioni identiche mentre in celeste le regioni che presentano differenze. Nell'immagine sono riportate variazioni a livello di SNP e InDel presenti tra le due forme omeologhe del gene.

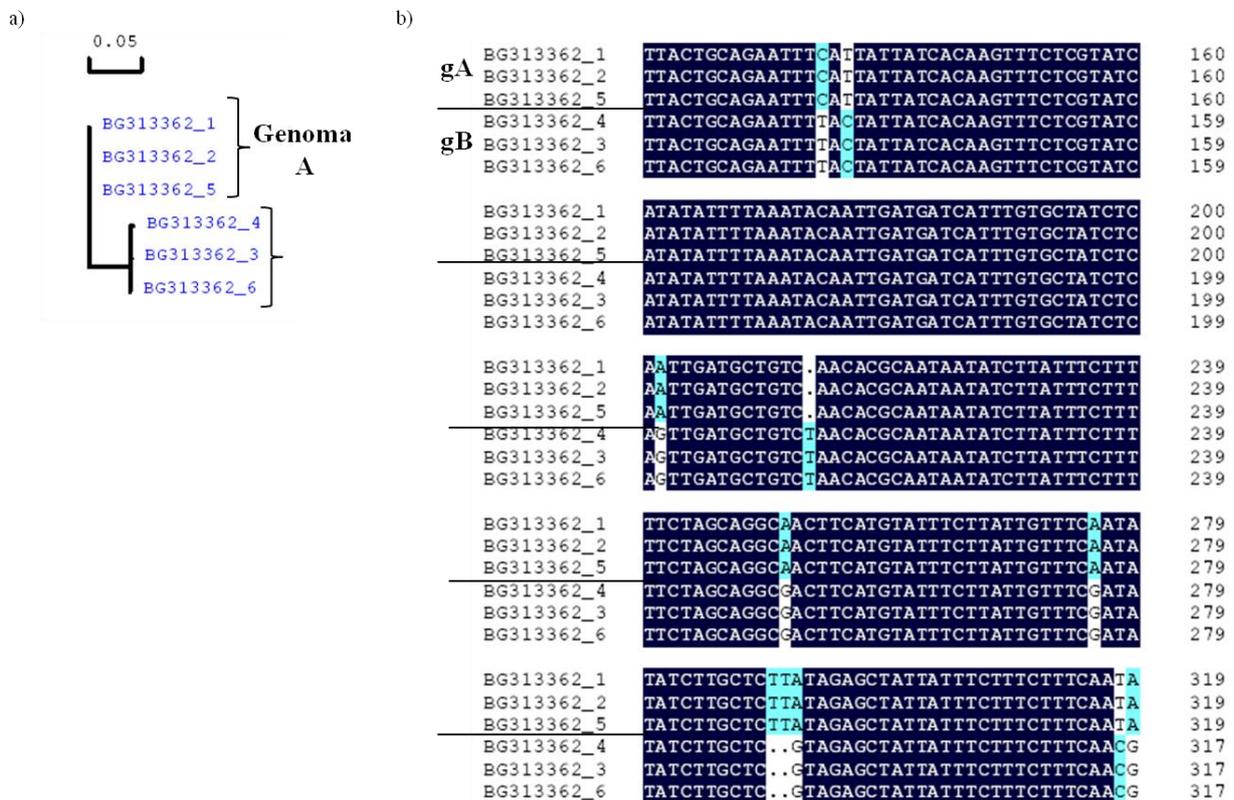


Figura 3: Profili di amplificazione di due marcatori COS.

a) Polimorfismo di BG313362 per i campioni Kofa, Svevo e il N2B (nulli-tetrasomico del 2B utilizzato come controllo negativo). I primer genoma specifici utilizzati per amplificare BG313362 sono stati disegnati sulle informazioni di sequenza ottenute dal clonaggio degli ampliconi.

b) Polimorfismo di BF474250 per i campioni Kofa e Svevo. I primer genoma specifici utilizzati per amplificare BF474250 sono stati disegnati sulle informazioni di sequenza dei bracci cromosomici isolati di 2AL e 2BL (sorting DNA).

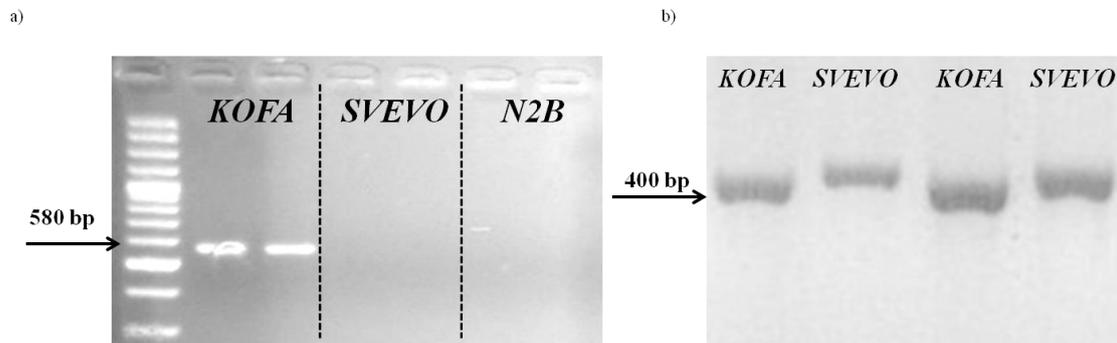


Figura 4: Profilo di amplificazione del marcatore polimorfico *ubw2b.13* ottenuto attraverso separazione delle bande su gel di poliaccrilammide. Nell'immagine sono riportati gli ampliconi dei due parentali (Kofa e Svevo) e dei campioni di controllo (N2B; *Aegilops speltoides* e *Triticum urartu*). In Kofa e Svevo la banda specifica del genoma A è dello stesso peso molecolare di quella ottenuta in *Triticum urartu* (circa 795 bp) mentre quella specifica per il genoma B risulta essere assente nel campione N2B e avere un diverso peso molecolare tra Kofa (circa 800 bp) e Svevo (circa 805 bp).

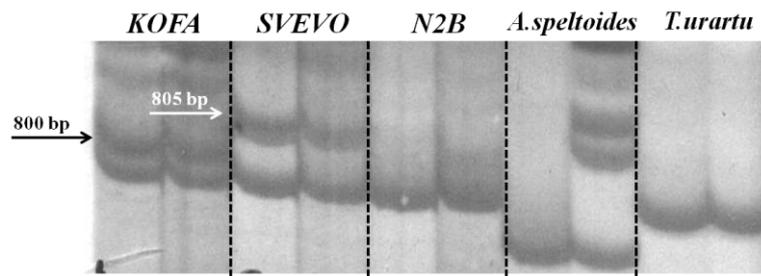


Figura 5: Mappa genetica del cromosoma 2B della popolazione Kofa × Svevo. In nero sono riportati i marcatori originariamente mappati sul cromosoma (Maccaferri *et al.*, 2008), in blu sono identificati i nuovi marcatori microsatelliti mentre in rosso i marcatori derivati da geni ortologi conservati. In dettaglio è stata riportata la mappa del braccio lungo del cromosoma 2B dove è stato localizzato *Qyld.idw-2B* nell'intervallo delimitato dai marcatori *wmc361* e *gwm846*.

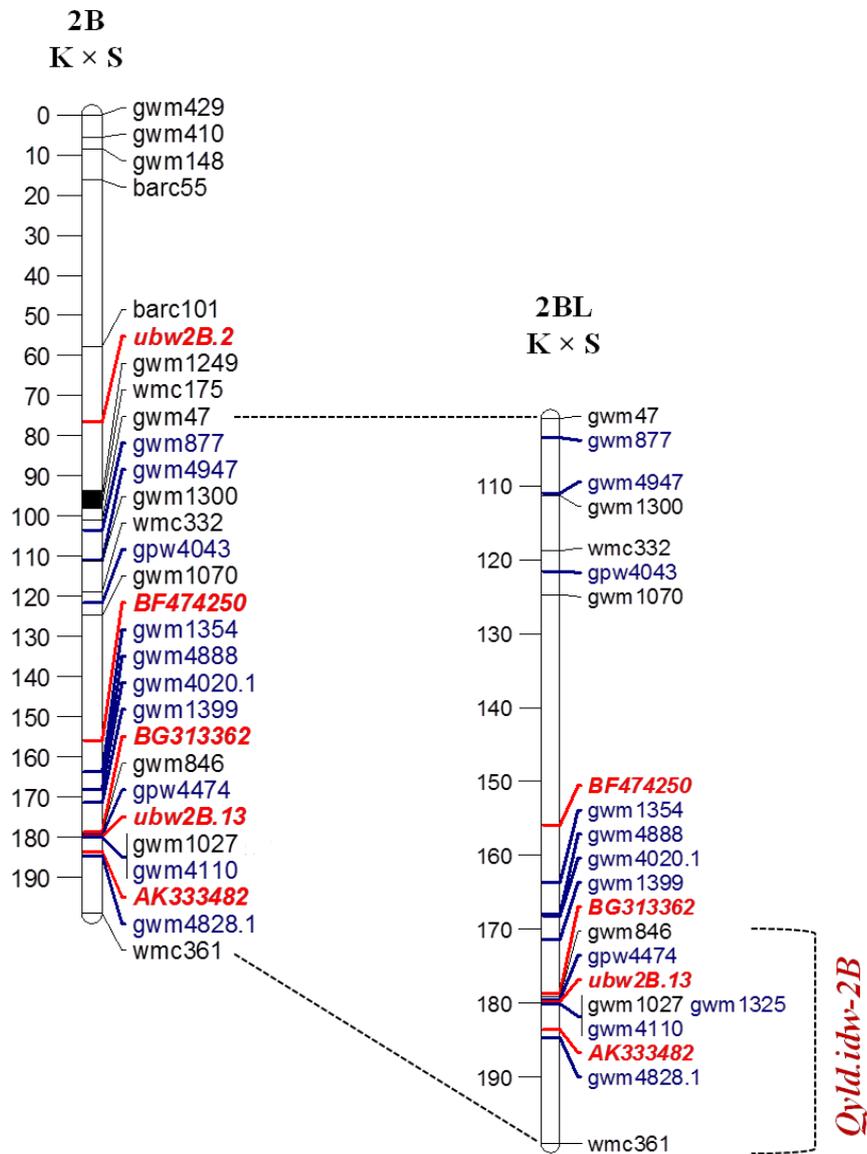


Figura 6: Aplotipo della regione sede di *Qyld.idw-2B*, intervallo delimitato dai marcatori *wmc361* e *gwm846*. Nell'immagine sono riportate le 44 RIL ricombinanti per la regione del QTL. In rosso è stato riportato l'allele Kofa (indicato con a) mentre in verde l'allele Svevo (indicato con b).

Locus	cM	KS70	KS115	KS56	KS57	KS170	KS211	KS193	KS6	KS80	KS223	KS251	KS55	KS63	KS69	KS74	KS32	KS35	KS36	KS252	KS2	KS153	KS13	KS18	KS3	KS78	KS167	KS40	KS10	KS206	KS123	KS20	KS23	KS104	KS111	KS105	KS87	KS94	KS255	KS16	KS230	KS38	KS225	KS203	KS186					
<i>gwm846</i>	179,1	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	
<i>gpw4474</i>	179,5	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>ubw2B.13</i>	179,8	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>gwm1027</i>	180,1	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>gwm1325</i>	180,1	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>gwm4110</i>	180,1	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
AK333482	183,6	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>gwm4828.1</i>	184,7	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>wmc361</i>	199,1	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b

Figura 7: Profilo di amplificazione di due marcatori microsatelliti specifici del cromosoma 3BS risultati polimorfici tra Kofa e Svevo e loro segregazione su un numero limitato di RIL.

a) Marcatore tipo codominante *cfb6045*.

b) Marcatore tipo dominante *cfb6134*.

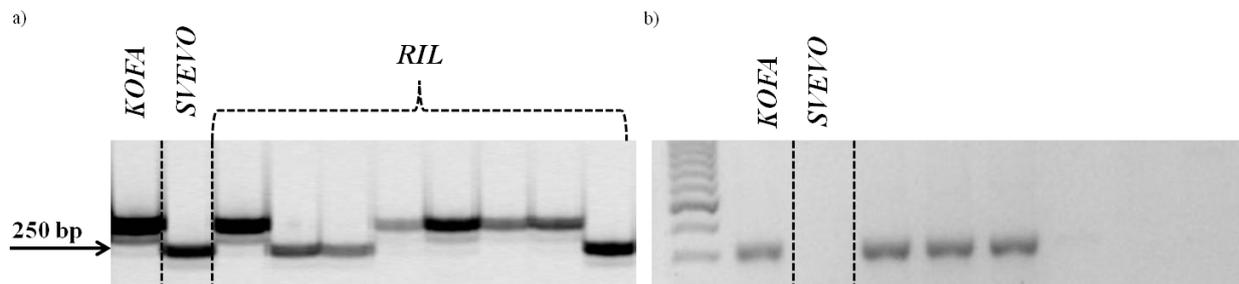


Figura 8: Esempio di due marcatori ISBP specifici del cromosoma 3BS il cui profilo è stato ottenuto da taglio enzimatico.

a) *cfp60*.

b) *cfp3236*.

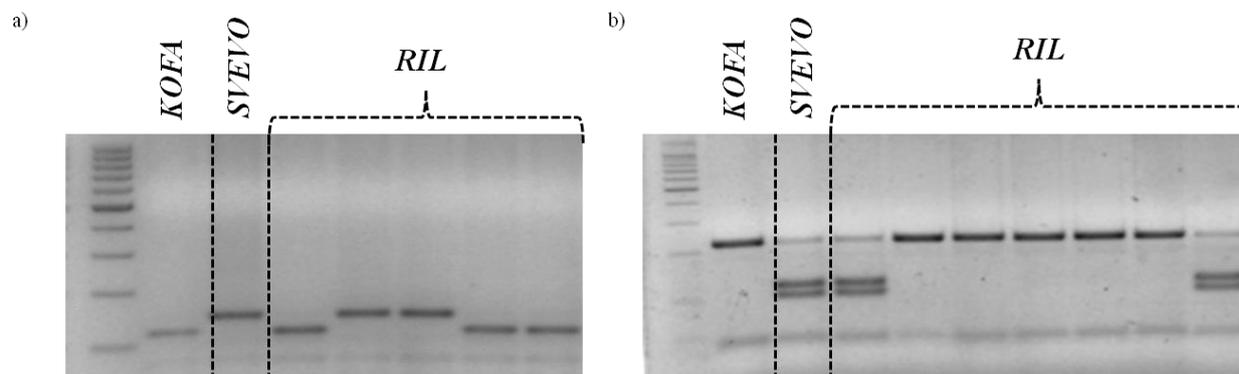


Figura 9: Profilo di amplificazione del marcatore STS *umn10* associato al gene *Fh1* responsabile della resistenza a fusariosi. I campioni amplificati sono rispettivamente: Kofa, Svevo, Chinese Spring (CS), Sumai3 (S3), nulli-tetrasomico 3A (N3A) e nulli-tetrasomico 3B (N3B). La banda che risulta amplificare nel solo parentale Svevo, specifica del genoma B, appare essere più bassa di circa 3 bp rispetto all'allele della varietà Sumai3 di *Triticum aestivum* che è portatrice della resistenza per il fungo.

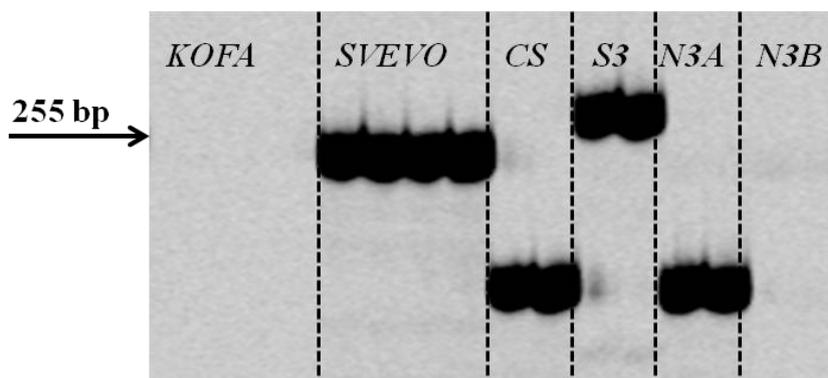


Figura 10: Mappa genetica del cromosoma 3BS della popolazione Kofa × Svevo. In rosso sono riportati i tre marcatori molecolari originariamente mappati che delimitano la regione del *Qyld.idw-3B*. In blu vengono riportati tutti i marcatori microsatelliti risultati polimorfici mentre in verde sono riportati i marcatori ISBP. In dettaglio è stata riportata una mappa genetica specifica della regione *Qyld.idw-3B* in cui viene riportato un solo marcatore rappresentativo di ciascun gruppo di marcatori co-segreganti.

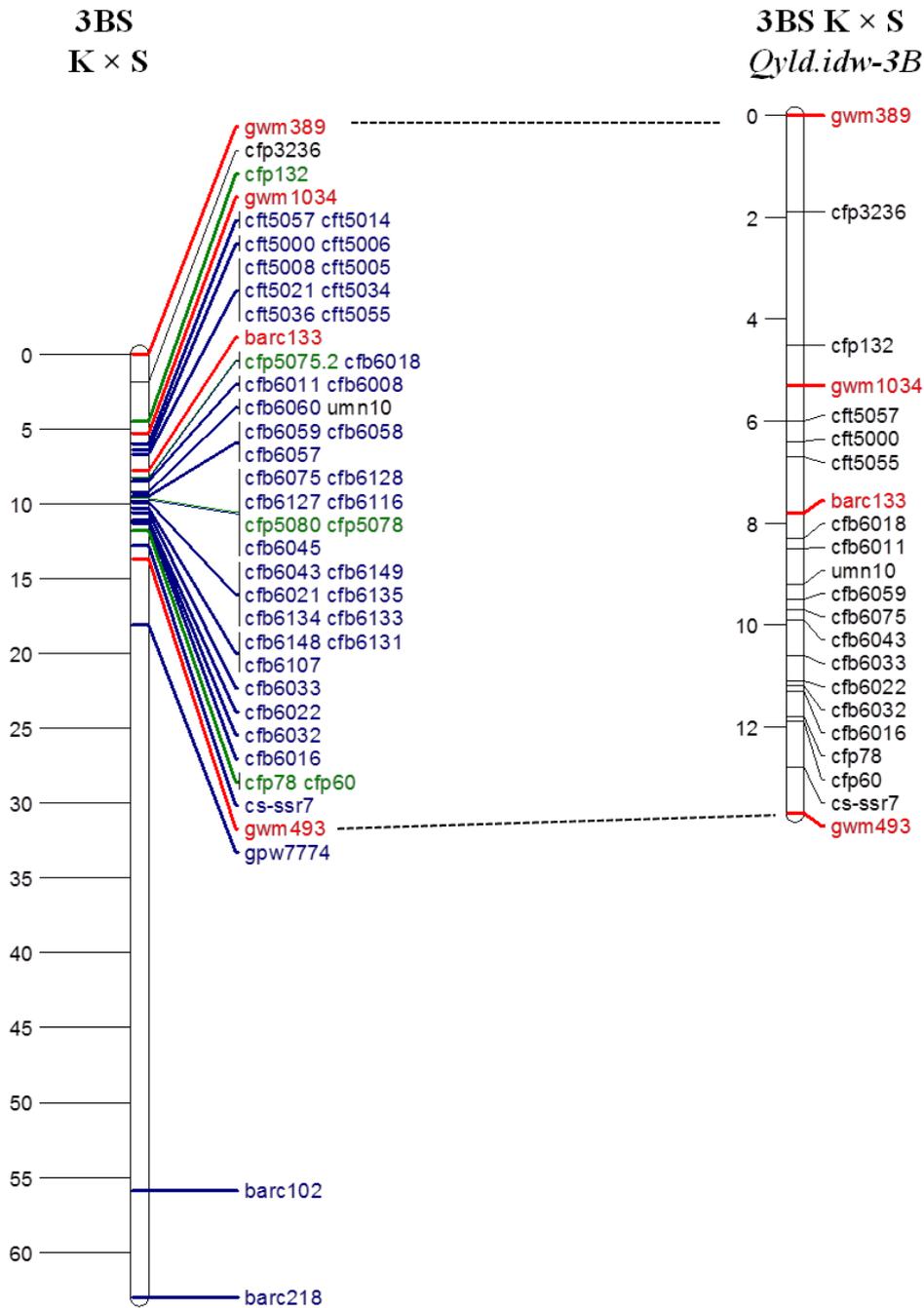


Figura 11: Aplotipo della regione sede del *Qyld.idw-3B*. Nelle immagine sono riportate le 30 RIL ricombinanti per la regione del QTL. In rosso è stato riportato l'allele Kofa (indicato con a) mentre in verde l'allele Svevo (indicato con b).

Locus	cM	KS159	KS186	KS044	KS086	KS043	KS012	KS170	KS122	KS024	KS096	KS204	KS199	KS088	KS098	KS184	KS243	KS202	KS002	KS129	KS048	KS097	KS105	KS131	KS246	KS145	KS050	KS209	KS033	KS188	KS251
<i>gwm389</i>	0	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>cfp3236</i>	1,9	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>cfp132</i>	4,5	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>gwm1034</i>	5,3	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>cfi5057</i>	5,9	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>cfi5000</i>	6,4	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>cfi5055</i>	6,6	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>barc133</i>	7,8	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>cfb6018</i>	8,3	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>cfb6011</i>	8,5	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>umn10</i>	9,2	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>cfb6059</i>	9,4	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>cfb6075</i>	9,7	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>cfb6043</i>	9,9	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>cfb6033</i>	9,9	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a
<i>cfb6022</i>	11,1	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>cfb6032</i>	11,2	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a
<i>cfb6016</i>	11,3	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a
<i>cfp78</i>	11,8	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a
<i>cfp60</i>	11,9	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a
<i>cs-ssr7</i>	12,7	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a
<i>gwm493</i>	13,7	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b

Figura 12: Integrazione della mappa genetica del cromosoma 3B della popolazione Kofa × Svevo di *Triticum durum* con la mappa fisica di Chinese Spring cv di *Triticum aestivum*.

- a) Mappa fisica in cui vengono riportati i bin di delezione della regione distale del 3BS.
 b) Mappa genetica Kofa × Svevo.
 c) Contig della mappa fisica a cui sono ancorati i marcatori mappati.

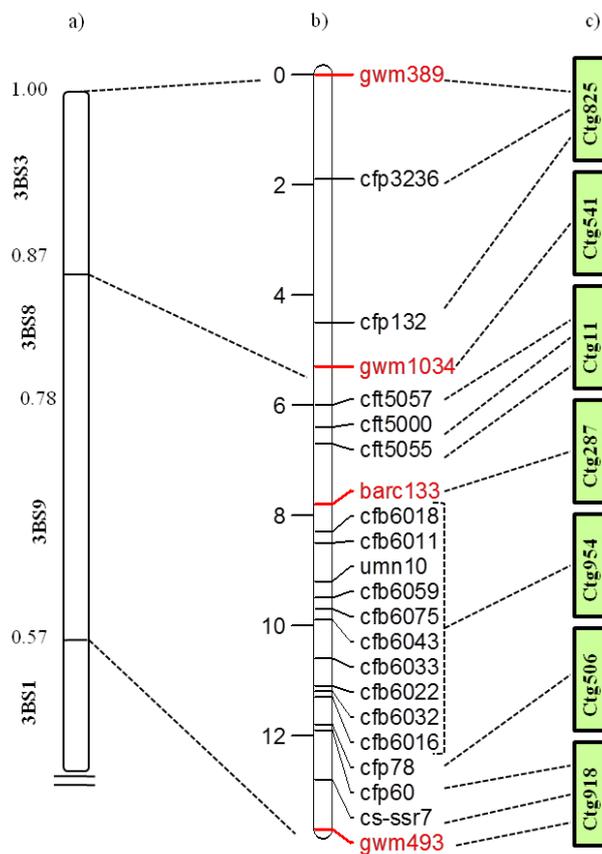
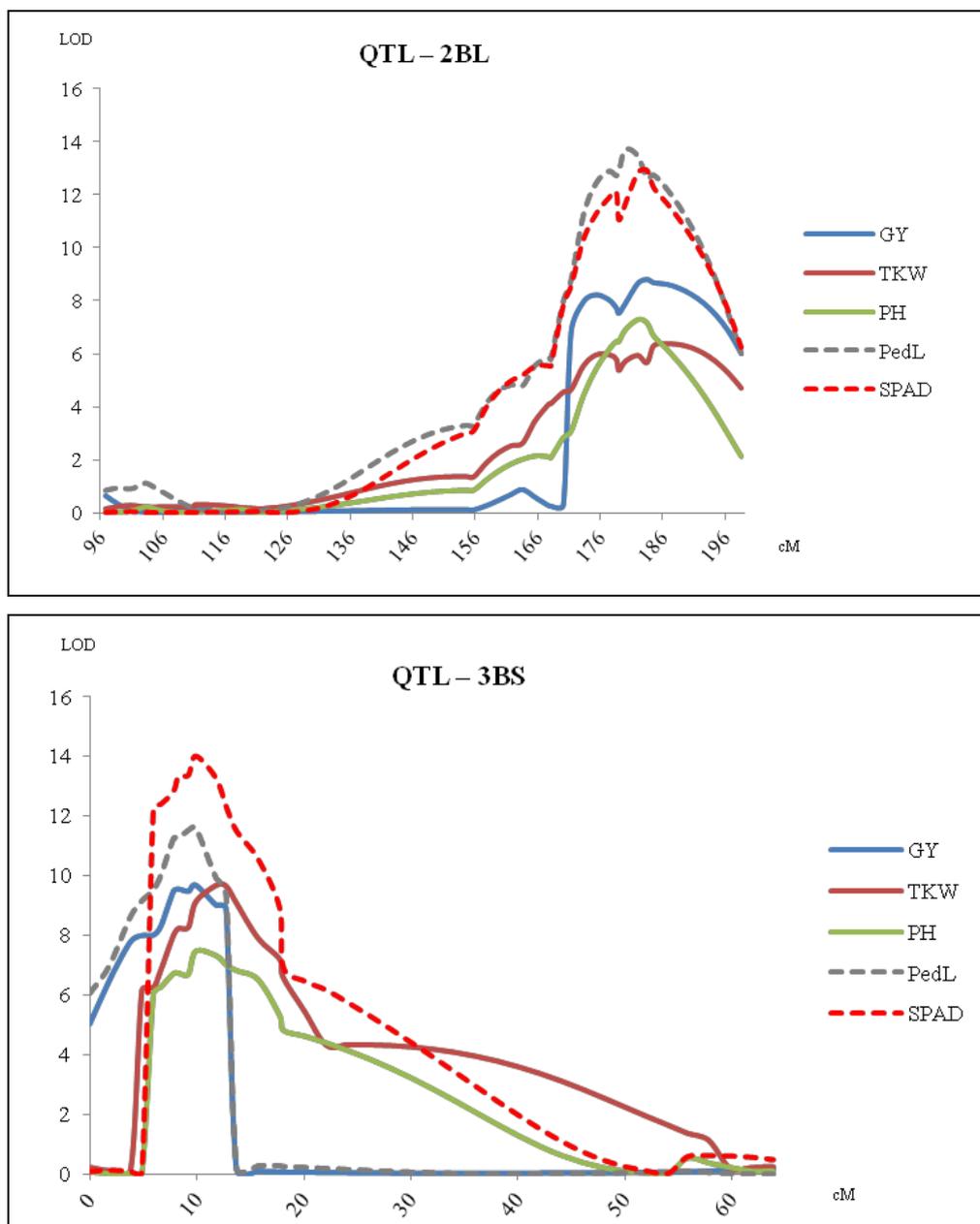


Figura 13: Profili LOD, ottenuti dall'analisi CIM sui valori medi fenotipici, per i QTL identificati sui due cromosomi 2BL e 3BS. Nel grafico viene riportato il profilo di ciascun carattere GY, TKW; PH, PedL, SPAD.



TABELLE

Tabella 1: Lista dei 24 geni ortologhi identificati dall'analisi di sintenia effettuata tra gli EST mappati di frumento e il genoma di *Oryza sativa* selezionati in Quraishi *et al.*(2009). Per ciascun gene di *Oryza sativa* sono stati riportati anche i rispettivi geni ortologhi di *Brachypodium distachyon* e *Sorghum bicolor* identificati in Mayer *et al.* (2011). Nella tabella sono stati riportate le sequenze dei primer forward e reverse e l'introne amplificato da ciascun marcatore COS.

EST o mRNA <i>Triticum aestivum</i>	GENE ORTOLOGO <i>Oryza Sativa</i>	GENE ORTOLOGO <i>Brachypodium distachyon</i>	GENE ORTOLOGO <i>Sorghum bicolor</i>	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE	INTRONE
BG274019	Os04g42330	Bradi5g14800	Sb06g021710	CACGAGCTCAACTCTTCTCC	AAAGACTTGGATCCGGGC	I1
BE490763	Os04g43916	Bradi5g15930		TTGTACTGGTATCAAGCGGC	CGAGAACAGGGAAACATAGG	I1
AY704447	Os04g49510	Bradi5g19430	Sb06g026530	CTACGAGGACCAGCTCTACG	TCCATACATCAGCTTCTGGC	I1
CJ656904	Os04g48210			TTGTAGAAACTACGGACGGC	GGTACCAGCTCTGGAACAGC	I1
CJ800384	Os04g48170			TTGTAGAAACTACGGACGGC	GGTACCAGCTCTGGAACAGC	I1
BF474250	Os04g52100	Bradi5g21260	Sb06g028100	AAGATACACTGCTCCGATGG	CACCTGATCTCTTTGCTTGG	I1
BF484270	Os04g52340			AGGAGCCCAGGAAGATGG	CAAAAGAGTGCCAGAGAAGC	I1
CJ893957	Os04g52690	Bradi5g21890	Sb06g028670	GTGAGGATTCTGATTGTGG	ACGGTTAACACGAAGAATCG	I1
BE498730	Os04g53690	Bradi5g22720	Sb06g029430	AACCTTCTGTTTGGAGGTC	TGGTAAAAAGCCAGCTTC	I5
BE498458	Os04g54870			CACGGTGAAGTACTAACC	CAGTTTCCAAGGCATAGGG	I1
BE4266205	Os04g55050	Bradi5g23670	Sb06g030390	TGTGGTGGGGAAGACTAACC	ATGAAGCATAAGCCATGAGG	I1
CJ955729	Os04g55180	Bradi5g23790	Sb06g030510	CGAACAACTTATCCACCG	GAGAAAATCGTGATGGATGG	I1
CA626013	Os04g55720	Bradi5g24220	Sb06g030920	AGGGATGAATGTGATAAGATGG	CAAGGTCCATGATCTTCAGG	I1
CA743352	Os04g56140	Bradi5g24730	Sb06g031220	GTTGGTGGTTGAAAAGATGG	AGTATGCACCTTCGATTGTC	I3
CV778144	Os04g56740	Bradi5g25090	Sb06g031840	TGACGAAGAAGATCGAAAGG	AAGAATGTTTCAGCAACAGCC	I1
AK333917	Os04g57300	Bradi5g25500	Sb06g032160	GATGGTGACATTATCGGAGC	TTCAGGGACATCTCAAAGC	I1
BE591763	Os04g57440	Bradi5g25640	Sb06g032360	AAGGGGTTTCATGGATAAAGG	ACAGACAGAGCTTGTGAGCG	I3
BJ226050	Os04g57590	Bradi5g25750	Sb06g032470	GATTGCTTTGTCGTTTGTCC	TCATTGACTCAAGCATCTGG	I2
BM136927	Os04g58110	Bradi5g26140	Sb06g032940	TCCTCGATAGCTATTGTCCG	TGAGTAGCCCAGTAGCATCC	I2
BF478929	Os04g58470	Bradi5g26450	Sb06g033190	ACCCTTTCATTTACACACCG	ACAAGTACCTACCGCTCTCG	I1
BE499251	Os04g58560	Bradi5g26480	Sb06g033260	GAAGGAGGAGGAGACATGGT	CTTCTGCTCGTGGCTGCG	I1
BG313362	Os04g58620	Bradi5g26820	Sb06g033310	GTGCTGCTGCCATTACTTTAG	AGCAGCAGCCAATTGAAG	I10
BE404151	Os04g59160	Bradi5g27170	Sb06g033846	CTGCAGCTCATCGAGTCC	ACTTGATGTGAACACGTCC	I1
CK163614	Os04g59550	Bradi5g27550	Sb06g034090	G TTCAGCTACTAACTGCGGC	AGAGCATATGAAGTGGACGC	I1

Tabella 2: Lista dei 16 COS sviluppati su ulteriori geni ortologhi che definiscono la sintenia tra la regione *Qyld.idw-2B*, *Oryza sativa*, *Brachypodium distachyon* e *Sorghum bicolor* forniti da Dott. J.Salse (INRA, Clermont-Ferrand, Francia). Nella tabella sono stati riportate le sequenze dei primer forward e reverse di ciascun marcatore COS.

EST o mRNA <i>Triticum aestivum</i>	GENE ORTOLOGO <i>Oryza Sativa</i>	GENE ORTOLOGO <i>Brachypodium distachyon</i>	GENE ORTOLOGO <i>Sorghum bicolor</i>	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE
DR741762	Os04g35240	Bradi5g10300	Sb06g016960	AACACTCTGCTGGACGGC	CGTCCAACCGTCGACTT
CK162873	Os04g51580	Bradi5g20880	Sb06g027760	GTTGTACTTGACCATCCTGGG	ATTTCAACCAGCTGACGAGG
CJ779664	Os04g51880	Bradi5g21040	Sb06g027910	TGGAGTGAATGGACTTGACAGT	GGTGATAAGACCAGATCATTACATTT
CV763914	Os04g51970	Bradi5g21100		TCTGTTCCGCTCTCCTCTCT	ACAGGCTTGAGTTGTTCCGAG
CK197820	Os04g52020	Bradi5g21160	Sb06g028060	TGGGAGAACACATCGCTCT	CACAATTGATGCAAATCGCT
AK330666	Os04g52040	Bradi5g21200		AGGAGAACAAGGATGTTATGTGG	GAGGATCTCGATCAGCAAGG
BF474250	Os04g52100	Bradi5g21260	Sb06g028100	TTAGGGGCATATCATCCTGC	CAAATTGCTCCACGACACC
CA603083	Os04g52120	Bradi5g21300	Sb06g028130	GGCTTTATTCTGCTCTTCCG	TGAGTGTAACATAGACCGTGGC
CA646679	Os04g58620	Bradi5g26820	Sb06g033310	TTCTTCTCCTCAAATCGG	GTGGTTATGCCTGGCTGC
CV763717	Os04g58830		Sb03g003790	TGGAAGCGGACTTATGGC	TTCTTCTCTCCCTTCTTTGAGC
BJ227575	Os04g58880		Sb06g033600	GAACAGTTCATCCTTTGACAAGC	TCAGAACCTGATCCATCTTCC
AK334117	Os04g58960	Bradi5g26870	Sb06g033680	AGCTGGAGACCATCGTGC	GAGGTCTCGTTGGTCTCTGG
CJ729932	Os04g59160	Bradi5g27170	Sb06g033846	TCATGCGCAGACATCACC	GGAAGACGTCGATGAGCG
CK194609	Os04g59480		Sb06g034020	GTCTACAGCAGCACCTCCG	TTCCCGACCAGACATTAC
AK333482	Os04g59590	Bradi5g27590	Sb06g034130	TTACTTTGTGTGGTCTGCTACTCC	CACTTTATTGACCACATTCCAGC
CF133622	Os04g59624	Bradi5g27610	Sb06g034160	AAGCTTTTCTGAACAGTGATCTTG	CATGCCTTCCATGCCTTC

Tabella 3: Lista degli 11 UBW2B sviluppati su ulteriori geni ortologi che definiscono la sintenia tra la regione *Qyld.idw-2B*, *Oryza sativa*, *Brachypodium distachyon* e *Sorghum bicolor*. Nella tabella sono stati riportate le sequenze dei primer forward e reverse e l'introne amplificato da ciascun marcatore.

EST o mRNA <i>Triticum aestivum</i>	GENE ORTOLOGO <i>Oryza Sativa</i>	GENE ORTOLOGO <i>Brachypodium distachyon</i>	GENE ORTOLOGO <i>Sorghum bicolor</i>	NOME MARCATORE	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE	INTRONE
CA603083	Os04g52120	Bradi5g21300	Sb06g028130	<i>ubw2B.2</i>	TTGGGCACTGTTGGTCTTTG	AGGTTCGAGTGTGGGATGCT	12
CA620201	Os04g58504	Bradi5g26450	Sb06g033190	<i>ubw2B.15</i>	GCAGCATGAAGGTGGTTTATTTC	TTGCTGGGATGCCATGGGTAAC	15
FJ750847	Os04g58560	Bradi5g26480	Sb06g033260	<i>ubw2B.10</i>	AATCTGCCACTCGTCTTCTCC	GCATCTGATAAAGTGGAGGCGG	11-12
BT009577	Os04g58570	Bradi5g26490	Sb06g033270	<i>ubw2B.12</i>	GGCCTCGACGACTCCGATTTCTTC	GGTGAGGATCACGTACGGGTCCAT	11
CK198561	Os04g58580	Bradi5g26500	Sb06g033280	<i>ubw2B.14</i>	AGGGTGGCAATGATCATGAGATA	GCACAGTGTATTGGGGCTGGTAA	110
DR740027	Os04g58640	Bradi5g26810	Sb06g033360	<i>ubw2B.13</i>	CACCAAACAGCAACACACTCACC	TGTGCAGCAAAGTGCAGTGAAC	13
CJ578849	Os04g58700	Bradi5g26770	Sb06g033400	<i>ubw2B.16</i>	ACGGGCTAACCGGAACATAACC	TGGAGGCAGTTCCTGAAAAC	11
CV763717	Os04g58830		Sb06g033550	<i>ubw2B.11</i>	GGCAGAGCACCAATTTTGCAGC	GCATGGGACGAGCAAAGTAAATTC	11
BJ227575	Os04g58880	Bradi5g26590	Sb06g033600	<i>ubw2B.9</i>	CCAGGCGCTTTGCTGTTCTCGA	CAGATCCTTCCAAAACGCTTCG	11
CV771313	Os04g59494	Bradi5g27500	Sb06g034050	<i>ubw2B.6</i>	TGGGTATATCCCCACCTTC	ACCATTGGATGGCCAAGGCTC	14
BE489901	Os04g59550	Bradi5g27550	Sb06g034090	<i>ubw2B.7</i>	CAAGCAACATTGCTGGTAGAGC	GAAGAGGATCTTCCCATGTCC	13

Tabella 4: Elenco dei 16 ambienti dove è stata valutata la popolazione Kofa × Svevo (Maccaferri *et al.* 2008). Ciascun ambiente viene indicato con il nome della località: Ita (Italia), Spa1 (Granada_Spagna), Sir (Siria), Spa2 (x_Spagna), Tun (Tunisia), Lib (Libano) e Mar (Marocco). Le condizioni idriche della prova vengono indicate con “r” (rainfull, non irrigato) e “i”(irrigato) mentre l’anno della prova viene indicato con 04 (2004) e 05 (2005). Per ciascun ambiente viene riportata la media fenotipica della popolazione dei caratteri resa in granella (GY), peso medio dei semi (TKW), altezza della pianta (PH), lunghezza del peduncolo (PedL) e indice di verde (SPAD) . I dati nella tabella sono ordinati in base ai valori fenotipici decrescenti della resa in granella.

	GY	TKW	PH	PedL	SPAD
	q ha ⁻¹	g	cm	cm	unità
Lib_i05	58,7	50,6	78,7	16,7	
Sir_i04	57,4		81,2	17,9	52,9
Ita_r04	57,3	50,4	82,6	19,9	45,4
Sir_i05	56,7	44,2	89,5	17,6	54,9
Ita_r05	54,0	41,3	83,3	14,4	45,1
Sir_r05	43,1	42,8	82,4	13,4	56,2
Sir_r04	41,7	43,2	77,9	17,9	51,6
Spa1_r04	34,8	43,6	85,1	20,5	47,4
Mar_i05	30,9	41,1	84,4	7,3	50,2
Tun_i04	29,6	43,2	88,9	18,4	
Lib_r05	28,1	37,1	67,3	13,8	
Lib_i04	26,5	40,6	56,7	14,1	49,8
Tun_r04	17,6	33,3	86,5	37,6	
Lib_r04	16,7	34,8	53,5	7,0	48,9
Spa2_r05	15,3	38,2	53,6	9,9	39,3
Mar_r05	5,5	26,1	64,0	6,0	
Media anno 2004	35,2	41,3	76,6	19,2	49,3
Media anno 2005	36,6	40,2	75,4	12,4	49,1
Media genale	35,9	40,7	76,0	15,8	49,2

Tabella 5: Lista dei marcatori SSR e COS polimorfici aggiunti sul cromosoma 2B della popolazione Kofa × Svevo. Per ciascun marcatore sono riportate le sequenze dei primer forward e reverse, il range della temperatura di appaiamento (Ta) espressa in °C e il range del peso molecolare dell'allele espresso in bp.

NOME MARCATORE	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE	Ta (°C)	ALLELE (bp)
<i>gwm877</i>	n.d.	n.d.	62 - 51	200-230
<i>gwm4947</i>	n.d.	n.d.	62 -51	150
<i>gpw4043</i>	ACATATGCACGCACGCAC	CATTGACACCCCTGACACTC	62-51	158-162
<i>gwm1354</i>	n.d.	n.d.	62-51	178
<i>gwm4888</i>	n.d.	n.d.	62-51	120-150
<i>gwm4020</i>	n.d.	n.d.	62-51	157-170
<i>gwm1399</i>	n.d.	n.d.	62-51	200
<i>gpw4474</i>	AGATGCGCCGTCTACTGG	CAGATAACGCCGTCCAATTT	62-51	186-200
<i>gwm1325</i>	n.d.	n.d.	62-51	210
<i>gwm4110</i>	n.d.	n.d.	62-51	130
<i>gwm4828</i>	n.d.	n.d.	62-51	145-155
BG313362	CATGGAGTCATCGACATACGCG	CCTAATATCAAAGAGACTGCTGGG	67 - 60	580
BF474250	AAGATACTGCTCCGATGG	CACCTGATCTCTTTGCTTGG	62	400 - 410
AK333482	TTACTTTGTGTGGTCTGCTACTCC	CACTTTATTGACCACATTCCAGC	63 - 60	280
<i>ubw2B.2</i>	TTGGGCACTGTTGGTCTTTG	AGGTTTCGAGTGTGGGATGCT	63 - 60	850 - 860
<i>unw2B.13</i>	CACCAAACAGCAACACTCACC	TGTGCAGCAAACCTGCAGTGAAC	65 - 58	800 - 805

Tabella 6: Nella tabella vengono presentati le tipologie di marcatori molecolari saggiati per saturare la regione *Qyld.idw-3B*. Per ciascuna tipologia è stato indicato il numero totale dei marcatori saggiati e il numero di polimorfismi identificati.

SIGLA MARCATORE	TIPO	TOTALE SAGGI	POLIMORFISMI
CFT	SSR_BACend	50	10
CFB	SSR_BACend	90	7
CFB	SSRg	114	19
CFP	ISBP	80	7
BARC	SSRg	6	0
GPW	SSRg	14	1
STS	STS	3	1
<i>totale</i>		357	45

Tabella 7: Marcatori ISBP saggiati attraverso la metodologia CAPS per l'identificazione di SNP. Per ciascun marcatore viene riportato il tipo di SNP identificato, l'enzima endonucleasi utilizzata per il taglio e il sito di restrizione identificato nella sequenza.

NOME MARCATORE	SNP	ENDONUCLEASI	SITO DI RESTRIZIONE
<i>cfp3236</i>	A/C e A/G	<i>HaeII</i>	5'..GG/CC..3'
<i>cfp132</i>	T/C	<i>MseI</i>	5'..T/TAA..3'
<i>cfp60</i>	C/T	<i>BsrI</i>	5'..ACTGGN/..3'

Tabella 8: Lista dei marcatori SSR e ISBP polimorfici aggiunti sul cromosoma 3BS della popolazione Kofa × Svevo. Per ciascun marcatore sono riportate le sequenze dei primer forward e reverse, il range della temperatura di appaiamento (Ta) espressa in °C e il range del peso molecolare dell'allele espresso in bp.

NOME MARCATORE	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE	Ta (°C)	ALLELE (bp)
<i>cft5000</i>	ATCCCCATCCCTCCTCCC	AGTCATTCATCCCGTTGCC	61 - 51	230 - 232
<i>cft5005</i>	ACTGAGAGACGACTTTGACC	CAGCATGAACATCTGCTCC	61 - 51	198 - 200
<i>cft5006</i>	ATCGGCGAGAAGTCACGG	GAGTGGAGGTGGGTGGAG	61 - 51	162 - 166
<i>cft5008</i>	GTCTTGGGTCAATCCGTTTG	TGTGTGTGTGTGGGGG	61 - 51	174
<i>cft5014</i>	CGTCCACTCCATTTACAGCAC	TGGAGCAGGGAGAGGAGG	61 - 51	220
<i>cft5021</i>	GCGCTAGATTTTTAGTGACC	CACAAATATCATAGTGCCTCC	61 - 51	170
<i>cft5034</i>	TGGCCGGGCTAGTAGTAAAA	TGAACCAGTCAAGCAAAGCA	61 - 51	194 - 194
<i>cft5036</i>	GAAGAAAGGCATGACGATCC	ATTTACCATGAAGGCGCAAC	61 - 51	162 - 166
<i>cft5055</i>	CCGAGGGCGTGAAACTATT	GTTTGCCTGGTTCAAGATGG	58	248 - 250
<i>cft5057</i>	GGACCACCGTGTCTAGCG	ACAAGTGAGGAAGGAGCAGCAG	61 - 51	132
<i>cfb6008</i>	CTAGCTCCTGCTCAGGTCG	CTGCCAAGCTCAGGACCTAC	60	189
<i>cfb6032</i>	TTTTCCACATGGACAAAAGTGAA	AAAGAATCAAAGGTCCGCAA	62	174 - 180
<i>cfb6045</i>	ACATCTGCGAAAGGCTCTGT	GCAGGTTCTTTTCATTGGGAA	61 - 51	250 - 255
<i>cfb6058</i>	AGTCACCGAATTGAACGGAG	GACGTGAGCCGACTTGAAAC	61 - 51	255 - 270
<i>cfb6059</i>	GGTGCACGAGAGACAGATGA	CGTCGCTAAACCGAAACAAT	62	238 - 242
<i>cfb6060</i>	CACATTCACGCATTTACATC	TAAAAACGGACGGTCGAAAAAC	61 - 51	245
<i>cfb6148</i>	CCTTCCCCTGCATAGTTTGA	TTTTCCGATTCTGATGAGGC	61 - 51	280
<i>cfb6011</i>	TTCGTCTCTTTTGTACCC	GAAAAAGGGAGGAGGTGTCC	62	232 - 240
<i>cfb6016</i>	GGCACAATAAAGCTTCAGGC	GAGGAGATCACTCGGGAACA	62	241 - 247
<i>cfb6018</i>	TACAACCAATCCGACGTTGA	ACGTGTTCCGGGAGAGAGAGA	61 - 51	260 - 270
<i>cfb6021</i>	ATGGGCTCACATGCAATTTT	TATAGGGGCTGCTGTGATCC	61 - 51	250
<i>cfb6022</i>	CCATTTTGTACACGAGGAA	TTGGCATGATTTTGATAAGTGC	61 - 51	203
<i>cfb6033</i>	CACAGTGATTTGTTGGTGCC	TGCTAAAGCAGTGACTCGGC	61 - 51	175
<i>cfb6043</i>	TTGATATTCTCCCCACCGCTTT	GCTGGGGGACCTTTTATAGGTGT	60	190
<i>cfb6057</i>	ATATCCTGGCTTCAAGGGCT	TGGCATCATGTGCTGCTTAT	61 - 51	265 - 270
<i>cfb6075</i>	CTAAGACATGCAAGCCCTCC	TCTGCTGCCTACACACAACAAA	61 - 51	244 - 250
<i>cfb6107</i>	TTGCCCTCCTGTTTGAAG	AAAACACCCCGTATCGACTG	61 - 51	210 - 214
<i>cfb6116</i>	GGGCAAGAAACCCGAAAATA	GAGCTCTGCCACTCATCACA	61 - 51	180
<i>cfb6127</i>	CTTTACACGCTCAGCTCAC	CCCCTTGCTCTGTCTGACTC	62	240 - 245
<i>cfb6128</i>	CTGGACACCACGTCTCTTG	CCAAAGTCACACTCCCTTGG	61 - 51	205
<i>cfb6131</i>	CACAGATCGGGACCCCTACC	TTCTATCTGCACCCCACTCC	61 - 51	300

<i>cfb6133</i>	TGAAACTCAAACCACCATTCC	TGCCACCAATACCACAACAT	61 - 51	247
<i>cfb6134</i>	AACCGCTTCGAAAACATCAG	ACTCCACACATAAAAACCGCC	61 - 51	272
NOME MARCATORE	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE	Ta (°C)	ALLELE (bp)
<i>cfb6135</i>	GCATAGGTGTCCTCATCGCT	TCGATATAGATTCCGACGGC	60	219
<i>cfb6149</i>	CTACCAGAGGGCGAATGGAGG	ACAGCCCTGTTCTTTTCC	60	288
<i>cs-ssr7</i>	GATGTGTCGCTCCCATTAGT	GCCAAACTGCCTCACTCAA	60	210 - 214
<i>cfp60</i>	ACGTAGGGTTTTACCTCCATC	TTTTCAATCAAGGAATCTACGCG	60	120 - 150
<i>cfp78</i>	GCCTAAAACCTCGCTGCTG	GCTTGCTTCTCCGCCTCC	62	255
<i>cfp132</i>	CGTAGTCCTCCCTCGCCC	CGTTCATGTAACGCTTCCCCATC	62	100 - 210
<i>cfp3236</i>	AACAATACGCCACAAGCAGCACC	TTTGCGAGCATCGCTCCCC	62	110 - 240
<i>cfp5075.2</i>	GACCTCCTGTGACAAACACG	GCTAGCATGAGGGGGAAAG	61 - 51	310
<i>cfp5078</i>	CCGTCTGAAGGGGGTTTTAT	ATGTGGTGAACTCTTCCCG	61 - 51	240
<i>cfp5080</i>	GCAATTGGCATATCACGTTG	CCTGTTACCATCCGCCTAGA	61 - 51	200
<i>gpw7774</i>	GGCAACAACAACAACCAGG	GGCAACAACAACAACCAGG	61 - 51	116 - 222
<i>umn10</i>	CGTGGTCCACGTCTCTTA	TGAAGTTCATGCCACGCATA	61 - 51	255

Tabella 9: Contig della mappa fisica di Chinese Spring a cui sono ancorati i marcatori molecolari mappati sul cromosoma 3BS della popolazione Kofa × Svevo. Per ciascun contig vengono riportati i marcatori molecolari rappresentativi della regione e la dimensione del contig espressa in kb (Paux *et al.*, 2008).

CONTIG	MARCATORI FINACHEGGIANTI	DIMENSIONE CONTIG (kb)
825	gwm389 - cfp132	413
541	gwm1034	980
11	cft5057- cft5055	1.552
287	barc133	973
954	cfp5075.2 - cfb6016	3.156
506	cfp78	1250
918	cfp60-gwm493	629

Tabella 10: Risultati ottenuti dall'analisi QTL effettuata attraverso le metodologie CIM (Mappaggio per Intervallo Composto) e MIM (Mappaggio per Intervallo Multiplo) sulla media dei valori fenotipici rilevati nei diversi ambienti. I QTL riportati sono: *Qyld.idw-2B* e *Qyld.idw-3B* per la resa in granella; *Qtkw.idw-2B* e *Qtkw.idw-3B* per il peso medio dei semi; *QPh.idw-2B* e *QPh.idw-3B* per l'altezza della pianta; *QPedL.idw-2B* e *QPedL.idw-3B* per la lunghezza del peduncolo; *QSPAD.idw-2B* e *QSPAD.idw-3B* per l'indice di verde. Per ogni carattere viene riportato il valore LOD del picco del QTL, l'intervallo di confidenza LOD-1 e il nome dei marcatori fiancheggianti l'intervallo ottenuto dall'analisi CIM. In aggiunta viene riportata la posizione del picco del QTL identificato dall'analisi MIM con il nome del marcatore associato a tale posizione.

	ANALISI CIM			ANALISI MIM		
	LOD	INTERVALLO LOD-1 (cM)	MARCATORI FIANCHEGGIANTI	PICCO	POSIZIONE	MARCATORE
<i>Qyld.idw-2B</i>	8,8	16	gwm1399 - gwm4828.1	25	184,7	<i>gwm4828.1</i>
<i>Qyld.idw-3B</i>	9,6	6	barc133 - gwm493	15	9,7	<i>cfb6127</i>
<i>Qtkw.idw-2B</i>	6,4	16	gwm1399 - gwm4828.1	23	182,1	<i>gwm1027</i>
<i>Qtkw.idw-3B</i>	9,7	4	cfb6127 - cfp60	17	10,0	<i>cfb6021</i>
<i>QPh.idw-2B</i>	7,3	14	BG313362 - gwm4828.1	23	182,1	<i>gwm1027</i>
<i>QPh.idw-3B</i>	7,5	6	barc133 - gwm493	15	9,7	<i>cfb6127</i>
<i>QPedL.idw-2B</i>	13,6	8	gwm1399 - gwm4828.1	23	182,1	<i>gwm1027</i>
<i>QPedL.idw-3B</i>	11,6	2	barc133 - cfb6021	17	10,0	<i>cfb6021</i>
<i>QSPAD.idw-2B</i>	12,9	6	BG313362 - gwm4828.1	23	182,1	<i>gwm1027</i>
<i>QSPAD.idw-3B</i>	14,3	2	barc133 - cfb6021	10	8,3	<i>cfb6018</i>

Tabella 11: Risultati dell'analisi MIM effettuata per GY, TKW, PH, PedL e SPAD rilevati sui singoli ambienti per i quali in Maccaferri *et al.*, (2008) erano stati identificati QTL significativi per la resa in granella sia sul cromosoma 2BL che sul cromosoma 3BS (Italia non irrigato 2004 (Ita_r_04); Granada non irrigata 2004 (Spa1_r_04); Tunisia irrigata e non irrigata 2004 (Tun_i_04 e Tun_r_04); Siria non irrigata 2004 (Sir_r_04); Italia non irrigata 2005 (Ita_r_05); Siria non irrigata 2005 (Sir_r_05) e Libano irrigata 2005 (Lib_i_2005)). Nella tabella sono riportati anche i dati ottenuti dall'analisi effettuata sui valori medi dell'anno 2004, sui valori medi dell'anno 2005 e sui valori della media generale. Per ciascun ambiente e ciascun carattere sono stati riportati i valori LOD, R^2 , effetto additivo (a), posizione del picco e marcatore associato al picco. Nella tabella sono presenti anche i valori dell'effetto epistatico determinato dall'interazione dei due QTL e i valori percentuali dell'effetto additivo e dell'effetto epistatico sui valori medi fenotipici della popolazione. Con * vengono indicati i QTL significativi con $LOD \geq 2,5$.

		Ita_r04	Spa1_r04	Tun_i04	Tun_r04	Sir_r04	Ita_r05	Sir_i05	Lib_i05	media04	media05	mediaGen
Resa in granella (GY; q ha⁻¹)												
<i>Qyld.idw-2B</i>	LOD	5,3	4,5	4,7	0,9	2,0	2,1	3,2	2,3	6,7	4,7	5,8
	R²	13,2	14,2	13,9	3,4	6,5	7,6	8,2	8,9	16,6	14,9	16,8
	posizione	178,7	182,1	174,4	182,1	176,4	184,7	182,1	176,4	182,1	184,7	184,7
	marcatore	21	23	20	23	20	25	23	20	23	25	25
	a	1,8	1,8	1,1	0,5	0,5	0,8	1,3	0,5	0,9	0,4	0,5
	a %	3,1	3,9	3,4	2,2	1,0	2,3	4,1	0,9	3,0	1,2	1,3
<i>Qyld.idw-3B</i>	LOD	4,1	3,1	3,0	0,8	1,5	0,7	6,0	0,9	4,3	3,8	4,5
	R²	11,1	8,9	6,1	3,0	5,1	2,3	18,6	3,5	10,9	12,1	12,8
	posizione	9,5	9,7	11,8	7,8	9,5	9,8	9,4	9,2	12,8	9,5	9,8
	marcatore	15	17	18	8	15	16	13	12	19	15	16
	a	-1,5	-1,4	-0,3	-0,5	-0,4	-0,4	-1,8	-0,3	-0,7	-0,4	-0,4
	a %	2,7	0,6	0,8	2,0	0,8	1,1	5,7	0,5	2,3	1,0	1,0
<i>Qyld.idw-2B</i> × <i>Qyld.idw-3B</i>	LOD	5,6	1,3			2,4	1,4	2,3	1,2	6,0	3,7	3,9
	R²	14,2	3,2			8,1	5,6	5,1	3,7	0,9	11,5	10,9
	$a \times a$	1,8	0,9			0,5	0,6	1,1	0,3	14,2	0,4	0,4
	$a \times a$ %	3,2	2,1			1,1	1,8	3,4	0,6	44,9	1,1	1,0

		Ita_r04	Spa1_r04	Tun_i04	Tun_r04	Sir_r04	Ita_r05	Sir_i05	Lib_i05	media04	medie05	medieGen
Peso mille semi (TKW; g)												
<i>Qtkw.idw-2B</i>	LOD	6,7	3,7	3,7	0,8				6,3	9,9	2,0	5,6
	R²	11,6	10,0	9,5	2,7				14,3	15,8	10,1	10,2
	posizione	182,1	183,6	182,1	184,7				182,1	182,1	182,1	182,1
	marcatore	23	24	23	25				23	23	23	23
	a	1,9	1,1	1,0	0,3				1,9	1,0	0,3	0,6
	a %	3,7	2,3	2,3	0,7				4,1	2,6	0,8	1,5
<i>Qtkw.idw-3B</i>	LOD	8,8	2,7	4,5	1,7				5,4	6,5	4,3	7,2
	R²	19,0	8,5	13,5	6,9				13,6	15,0	11,8	16,9
	posizione	9,4	11,8	9,9	7,8				9,4	9,4	10,0	10,0
	marcatore	13	18	16	8				13	13	17	17
	a	-2,2	-0,9	-1,1	-0,4				-1,8	-0,8	-0,5	-0,7
	a %	4,3	1,9	2,6	1,1				3,7	2,0	1,2	1,8
<i>Qtkw.idw-2B</i> × <i>Qtkw.idw-3B</i>	LOD	10,2	3,4	3,7					6,5	9,7	3,7	7,1
	R²	21,5	9,0	9,4					15,3	18,6	9,6	14,8
	a × a	2,4	1,0	1,0					2,0	1,0	0,5	0,7
	a × a %	4,8	2,2	2,3					4,2	2,5	1,2	1,7

		Ita_r04	Spa1_r04	Tun_i04	Tun_r04	Sir_r04	Ita_r05	Sir_i05	Lib_i05	media04	media05	mediaGen
Altezza della pianta (PH; cm)												
<i>QPh.idw-2B</i>	LOD	6,0	2,6	5,1	7,4	4,0	2,6	3,0	3,2	8,0	3,9	6,5
	R²	14,2	7,3	13,9	16,9	11,8	6,4	9,7	10,2	18,0	8,2	13,1
	posizione	182,1	179,1	182,1	182,1	182,1	183,6	169,2	176,4	182,1	179,1	182,1
	marcatore	23	22	23	23	23	24	19	20	23	22	23
	a	2,3	2,1	2,2	2,6	1,6	1,8	1,5	1,6	1,7	0,9	1,2
	a %	2,8	2,5	2,5	3,0	2,0	2,7	2,0	2,0	2,3	1,2	1,6
<i>QPh.idw-3B</i>	LOD	4,8	2,4	3,4	6,1	2,2	3,5	1,8	1,9	5,6	4,2	5,9
	R²	12,5	8,1	8,4	15,0	6,6	9,3	6,4	6,3	12,9	9,2	11,9
	posizione	11,8	10,0	9,4	9,8	10,0	9,7	7,8	8,3	9,4	9,7	9,7
	marcatore	18	17	13	16	17	15	8	10	13	15	15
	a	-2,0	-2,0	-1,7	-2,3	-1,2	-2,2	-1,2	-1,2	-1,3	-1,0	-1,1
	a %	2,4	2,4	2,0	2,6	1,5	3,2	1,5	1,4	1,9	1,3	1,5
<i>QPh.idw-2B</i> × <i>QPh.idw-3B</i>	LOD	5,7	1,9	4,2	5,2	2,6		1,3	2,3	6,1	5,3	7,0
	R²	13,5	4,8	9,7	11,0	6,7		3,8	7,0	12,7	9,7	12,0
	a × a	2,2	1,7	1,9	2,1	1,3		1,0	1,3	1,4	1,1	1,3
	a × a %	2,7	2,1	2,2	2,4	1,6		1,3	1,7	2,0	1,5	1,7

		Ita_r04	Spa1_r04	Tun_i04	Tun_r04	Sir_r04	Ita_r05	Sir_i05	Lib_i05	imedia04	medie05	medieGen
Lunghezza peduncolo (PedL; cm)												
<i>QPedL.idw-2B</i>	LOD	4,3	2,4	6,5	8,2	1,6	1,4	9,2	2,4	11,1	8,3	11,8
	R²	9,1	7,1	17,9	17,3	4,3	3,6	23,4	7,1	19,1	18,6	20,3
	posizione	183,6	180,1	179,1	182,1	178,7	182,1	182,1	179,1	182,1	185,7	182,1
	marcatore	24	23	20	23	21	23	23	20	23	25	23
	a	0,8	0,7	1,3	1,6	0,3	0,3	1,4	0,5	0,7	0,4	0,6
	a %	4,1	3,4	6,8	5,6	1,6	3,2	12,0	3,5	4,1	2,7	3,9
<i>QPedL.idw-3B</i>	LOD	6,9	3,0	2,2	8,0	2,2	2,6	6,2	2,9	11,8	6,5	11,5
	R²	18,8	9,7	81,2	18,8	7,5	9,5	15,2	9,5	23,3	15,0	22,1
	posizione	9,7	10,0	10,0	10,0	9,4	0,0	9,8	8,3	10,0	10,0	10,0
	marcatore	15	17	17	17	13	1	16	10	17	17	17
	a	-1,1	-0,8	-6,2	-1,5	-0,3	-0,5	-1,1	-0,6	-0,7	-0,4	-0,5
	a %	5,3	3,8	32,0	5,5	1,9	4,6	9,5	3,7	4,2	2,3	3,8
<i>QPedL.idw-2B</i> × <i>QPedL.idw-3B</i>	LOD	5,6	1,6	3,5	6,2	1,3	1,7	4,2	3,2	8,6	6,6	9,1
	R²	13,5	3,5	7,3	12,0	3,6	5,2	7,6	10,0	13,5	14,2	14,2
	a × a	0,9	0,6	0,9	1,3	0,3	0,4	0,9	0,6	0,6	0,4	0,5
	a × a %	4,7	2,7	4,7	4,8	1,4	3,6	7,7	4,1	3,5	2,4	3,3

		Ita_r04	Spa1_r04	Tun_i04	Tun_r04	Sir_r04	Ita_r05	Sir_i05	Lib_i05	media04	medie05	medieGen
Indice di verde (SPAD; unità)												
<i>QSPAD.idw-2B</i>	LOD	10,1	7,4			0,5	1,8	3,7		10,4	2,4	8,5
	R²	22,6	17,6			1,5	6,2	7,8		22,2	7,8	19,7
	posizione	179,1	182,1			179,1	179,1	180,1		182,1	179,1	182,1
	marcatore	20	23			20	20	22		23	20	23
	a	2,6	4,5			0,5	0,7	1,3		1,6	0,6	1,1
	a %	5,7	9,6			1,0	1,6	2,4		3,0	1,3	2,3
<i>QSPAD.idw-3B</i>	LOD	10,0	8,6			0,7	1,8	8,5		11,2	4,2	11,1
	R²	22,3	19,8			2,4	6,3	24,4		24,0	14,7	24,9
	posizione	10,0	9,7			4,5	9,7	10,0		9,9	10,0	8,3
	marcatore	17	15			3	15	17		16	10	10
	a	-2,4	-4,7			-0,6	-0,7	-2,0		-1,6	-0,8	-1,2
	a %	5,4	10,0			1,1	1,5	3,9		3,0	1,7	2,5
<i>QSPAD.idw-2B</i> × <i>QSPAD.idw-3B</i>	LOD	7,3	7,1			0,9	1,4	4,2		8,7	1,1	7,0
	R²	12,9	14,9			3,2	4,2	9,0		15,9	2,7	13,1
	a × a	2,1	4,3			0,7	0,6	1,4		1,4	0,4	1,0
	a × a %	4,7	9,2			1,4	1,4	2,6		2,7	0,8	2,0

Tabella 12: Lista dei 54 geni ortologhi di *Brachypodium dystachyon* identificati nell'intervallo delimitato dai marcatori COS (BG313362 e AK333482) mappati nella regione *Qyld.idw-2B*. Tali geni potrebbero essere utilizzati per lo sviluppo di ulteriori marcatori COS o come risorsa di geni candidati coinvolti nell'effetto del QTL. Nella tabella vengono riportati anche i nomi dei geni conservati in *Oryza sativa* e *Sorghum bicolor* identificati in Mayer *et al.*, 2011.

GENE <i>Brachypodium dystachyon</i>	GENE <i>Oryza Sativa</i>	GENE <i>Sorghum bicolor</i>	FUNZIONE
Bradi5g26867.1	Os04g58960.1	Sb06g033680.1	regolatore della condensazione cromosomica
Bradi5g26880.1	Os04g58970.1	Sb06g033690.1	ACR non caratterizzata, famiglia YggU COG1872
Bradi5g26890.1	-	Sb06g033720.1	isocitrato deidrogenasi
Bradi5g26900.1	Os04g58980.1	Sb06g033730.1	ACR non caratterizzata, famiglia YggU COG1872
Bradi5g26907.2	Os04g58990.1	-	CAMK smile a ULKh_APGy.3
Bradi5g26917.1	Os04g59000.1	Sb06g033740.1	proteina chinasi
Bradi5g26930.1	Os04g59010.1	Sb06g033750.1	F-Box
Bradi5g27030.1	Os04g59040.1	Sb06g033780.1	pirofosfatasi solubile inorganica
Bradi5g27040.1	Os04g59040.2	Sb06g033790.1	proteina espressa
Bradi5g27050.2	Os04g59040.3	Sb06g033800.1	DnaJ
Bradi5g27057.1	Os04g59120.1	Sb06g033770.1	5NG4 proteina auxina indotta
Bradi5g27080.1	-	-	
Bradi5g27090.1	-	-	F-Box
Bradi5g27100.1	-	-	
Bradi5g27110.2	Os04g59130.1	-	F-Box
Bradi5g27130.1	Os04g59150.1	Sb06g033840.1	precursore peroxidasi
Bradi5g27140.1	-	-	F-Box
Bradi5g27150.1	-	-	
Bradi5g27160.1	-	-	
Bradi5g27170.1	-	-	
Bradi5g27180.1	-	-	
Bradi5g27190.1	-	-	proteina simporto di membrana
Bradi5g27200.1	-	Sb06g033850.1	
Bradi5g27210.1	Os04g59260.1	Sb06g033870.1	precursore peroxidasi
Bradi5g27220.1	Os04g59260.1	-	precursore peroxidasi
Bradi5g27230.1	Os04g59310.1	Sb06g033880.1	endopeptidasi
Bradi5g27240.1	Os04g59320.1	Sb06g033890.1	proteina chinasi, subfamiglia URK-I
Bradi5g27250.1	-	-	
Bradi5g27260.1	Os04g59330.1	-	proteina espressa
Bradi5g27310.1	-	-	
Bradi5g27367.2	Os04g59394.2	Sb06g033950.1	proteina espressa
Bradi5g27377.2	Os04g59400.1	-	proteina espressa
Bradi5g27390.1	Os04g59420.1	-	proteina espressa
Bradi5g27400.2	Os04g59430.1	-	fattore di trascrizione (ARF)
Bradi5g27410.1	-	-	
Bradi5g27430.1	Os04g59450.1	Sb06g033990.1	CAMK
Bradi5g27460.1	Os04g59460.1	Sb06g034000.1	proteina chinasi tipo serina/treonina
Bradi5g27467.1	-	Sb06g034010.1	
Bradi5g27480.1	-	-	RING, subfamiglia zinc finger
Bradi5g27490.1	-	-	idrolasi
Bradi5g27500.1	-	Sb06g034050.1	
Bradi5g27517.2	-	Sb06g034065.1	
Bradi5g27530.1	Os04g59520.1	Sb06g034070.1	fosfolipasi
Bradi5g27540.1	-	Sb06g034080.1	proteina chinasi
Bradi5g27550.1	Os04g59550.1	Sb06g034090.1	trasportatore transmembrana
Bradi5g27560.1	Os04g59560.1	Sb06g034100.1	proteina espressa
Bradi5g27580.1	Os04g59580.1	-	RING, subfamiglia zinc finger
Bradi5g27596.1	Os04g59600.1	Sb06g034140.1	
Bradi5g27610.1	Os04g59624.2	Sb06g034160.1	ATPasi
Bradi5g27617.1	Os04g59630.1	Sb06g034170.1	
Bradi5g27640.1	-	Sb06g034190.1	
Bradi5g27670.1	-	-	GTPasi
Bradi5g27687.1	-	-	

Tabella 13: Elenco dei 42 geni, 8 pseudo-geni e 4 frammenti di geni annotati sul conti954 di Chinese Spring e loro rispettiva funzione. Fonte Choulet *et al.* 2010.

GENE ID	PSEUDO O FRAMMENTO	FUNZIONE
ctg0954b.00010.1		xyloglucano galattosil transferasi KATAMARI 1
ctg0954b.00020.1		fruttosio-bifosfato aldolasi
ctg0954b.00030.1	pseudo	xyloglucano galattosil transferasi KATAMARI 1
ctg0954b.00040.1		ipotetica proteina conservata
ctg0954b.00050.1		glutathione S-transferase
ctg0954b.00060.1		proteina ATP bind
ctg0954b.00070.1		ipotetica proteina conservata
ctg0954b.00080.1		fosfatidilserina sintetasi
ctg0954b.00090.1		proteina chinasi
ctg0954b.00100.1	pseudo	proteina ribosomiale S24
ctg0954b.00110.1	frammento	Ciclina A1
ctg0954b.00120.1	frammento	proteina chinasi
ctg0954b.00122.1	pseudo	proteina chinasi
ctg0954b.00125.1	pseudo	proteina chinasi
ctg0954b.00130.1		proteina chinasi
ctg0954b.00140.1		glicosiltransferasi
ctg0954b.00150.1	pseudo	glicosiltransferasi
ctg0954b.00160.1		glicosiltransferasi
ctg0954b.00170.1		ipotetica proteina conservata
ctg0954b.00170.1		ipotetica proteina conservata
ctg0954b.00180.1		ipotetica proteina conservata
ctg0954b.00200.1		glutammato decarbossilasi
ctg0954b.00210.1		ipotetica proteina conservata
ctg0954b.00215.1		ipotetica proteina conservata
ctg0954b.00216.1	pseudo	dominio PAN
ctg0954b.00217.1	frammento	tirosin chinasi
ctg0954b.00220.1		ipotetica proteina conservata
ctg0954b.00230.1		glicosiltransferasi
ctg0954b.00240.1		glicosiltransferasi
ctg0954b.00250.1		glicosiltransferasi
ctg0954b.00260.1		scambio sodio/idrogeno
ctg0954b.00270.1		ipotetica proteina conservata
ctg0954b.00280.1		glicosiltransferasi
ctg0954b.00290.1		leucil-tRNA sintetasi
ctg0954b.00300.1		esonucleasi
ctg0954b.00310.1		alanil-tRNA sintetasi
ctg0954b.00320.1		ipotetica proteina conservata
ctg0954b.00330.1		dominio PAP fibrillina
ctg0954b.00340.1		guanina - N(1) - metiltransferasi
ctg0954b.00350.1	pseudo	UDP - glucosio - 6 deidrogenasi
ctg0954b.00360.1		precursore poligalatturonasi
ctg0954b.00370.1		ossidoreduttasi
ctg0954b.00380.1		terpene sintasi
ctg0954b.00390.1		ipotetica proteina conservata
ctg0954b.00400.1	frammento	ipotetica proteina conservata
ctg0954b.00410.1	pseudo	ipotetica proteina conservata
ctg0954b.00420.1		ipotetica proteina conservata
ctg0954b.00430.1		ipotetica proteina conservata
ctg0954b.00440.1		metiltrasfersai dominio
ctg0954b.00450.1		RING, subfamiglia zinc finger
ctg0954b.00460.1		citocromo P450
ctg0954b.00470.1		dominio NB - ARC
ctg0954b.00480.1		F - box
ctg0954b.00490.1		ipotetica proteina conservata

CAPITOLO IV

VALUTAZIONE FENOTIPICA DELLE COPPIE NIL PER VALIDARE L'EFFETTO DI *QYLD.IDW-3B*

1. MATERIALI E METODI

1.1. Materiale vegetale

Diciotto coppie di linee quasi isogeniche (NIL: Nearly Isogenic Lines) che differiscono per la sola regione sede di *Qyld.idw-3B*, sono state sviluppate attraverso il metodo di analisi delle famiglie ricombinanti eterogenee (HIF: Heterogeneous Inbred Family) (Tuinstra *et al.* 1997).

Le RIL in generazione F₅ della popolazione Kofa × Svevo, definite anche linee eterozigoti residuali (RHL: Residual Heterozygous Lines) in quanto in media solo il 6,25% dei loci all'interno di ciascuna linea risultano essere ancora in eterozigosi, sono state valutate con i marcatori caratterizzanti la regione di *Qyld.idw-3B* (*gwm389*, *gwm1034*, *barc133* e *gwm493*) per selezionare le linee eterozigoti da utilizzare per lo sviluppo delle HIF.

La selezione delle RHL per la regione *Qyld.idw-3B* è avvenuta tendendo anche in considerazione la composizione allelica della regione del QTL per la resa localizzato nel braccio lungo del cromosoma 2B (*Qyld.idw-2B*).

Data la forte interazione epistatica identificata tra *Qyld.idw-2B* e *Qyld.idw-3B*, che risulta essere positiva per le due classi parentali non ricombinanti (es. $KK_{2BL}KK_{3BS}$ e $SS_{2BL}SS_{3BS}$) e negativa per i genotipi ricombinanti (es. $KK_{2BL}SS_{3BS}$ e $SS_{2BL}KK_{3BS}$) (Maccaferri *et al.* 2008), le RHL selezionate sono state quelle fissate nella regione *Qyld.idw-2B* per l'allele Kofa che risulta avere un effetto negativo per il QTL della resa sul cromosoma 2BL.

In totale sono state selezionate 4 RHL (KS23, KS77, KS151 e KS215), eterozigoti per la regione *Qyld.idw-3B* e fissate per la regione *Qyld.idw-2B*.

Per ciascuna delle quattro RHL solo 15 semi, risultati essere in eterozigosi dall'analisi assistita da marcatore, sono stati avanzati alla generazione successiva. La progenie F_{5,6} è stata ulteriormente sottoposta ad analisi con i marcatori fiancheggianti *Qyld.idw-3B*. Le HIF autofecondate (F_{6,7}) sono state poi analizzate ottenendo così coppie di NIL con un livello di ricombinazione di una F₇, fissate in omozigosi per l'uno o l'altro degli alleli parentali alla regione contenente *Qyld.idw-3B*.

1.2. Caratterizzazione molecolare delle coppie NIL

Le 18 coppie NIL sono state genotipizzate con ulteriori 9 marcatori mappati nella regione *Qyld.idw-3B* della popolazione di mappa Kofa × Svevo. L'amplificazione del DNA è stata effettuata direttamente su campioni fogliari attraverso l'utilizzo del kit Phire[®] Plant Direct PCR Kit (Finnzymes). Le condizioni di amplificazione sono le stesse presentate nel capitolo precedente. In base al tipo di marcatore molecolare, l'amplicone è stato separato attraverso elettroforesi orizzontale su gel d'agarosio al 2-2,5% o attraverso

elettroforesi verticale su gel di poliacrilamide al 5% con l'utilizzo del sistema Li-COR.

1.3. Allestimento della prova sperimentale di campo

Le 18 coppie NIL (36 linee in totale) sono state analizzate fenotipicamente in tre prove sperimentali, due allestite nel 2009/2010 ed una nel 2010/2011, presso l'Azienda Sperimentale di Cadriano dell'Università di Bologna. Le prove di campo sono state condotte secondo uno schema sperimentale a blocchi randomizzati completi (RCB: Randomized Complete Block) con tre repliche. L'unità sperimentale era costituita da parcelle di quattro filette, lunghe 2,5 m e poste 0,20 m l'una dall'altra, distanziate 0,60 m dalle parcelle adiacenti.

Nell'anno 2009/2010 sono state condotte due prove sperimentali a due diverse densità di semina: una a bassa densità con 200 semi m⁻² (LD: Low Density) e l'altra ad alta densità di semina con 400 semi m⁻² (HD: High Density). Nell'anno 2010/2011 è stata allestita solo una prova sperimentale a bassa densità di semina. Prima della semina il campo è stato fertilizzato con 2 q ha⁻¹ di urea. Nel corso dell'inverno ed all'inizio della primavera è stata somministrata una quantità pari a 150 kg ha⁻¹ di N a tre diversi stadi di crescita corrispondenti agli stadi 13, 20 e 31 della scala Zadocks (Zadocks *et al.*, 1974), ovvero dallo stadio di terza foglia espansa fino a quello di formazione del primo nodo.

Il materiale è stato seminato il 29 ottobre 2009 e il 16 dicembre 2010 e per garantire uno sviluppo ottimale della coltura sono state applicate le pratiche agronomiche standard per il controllo di infestanti e parassiti.

I caratteri agronomici rilevati nelle prove sperimentali sono stati i seguenti:

- Resa in granella (GY: Grain Yield), espressa in q ha⁻¹ e aggiustata al 14% di umidità.
- Peso medio dei semi (TKW: Thousand Kernel Weight), espresso in grammi e stimato sulla base media del peso di due campioni di 50 semi.
- Numero di semi m⁻² (Kpsm: Kernel per square meter).
- Data di spigatura (HD: Heading Date), espressa come numero di giorni dall'emergenza a quando il 50% dell'infiorescenza è emersa (stadio 55 nella scala di Zadoks).
- Altezza della pianta (PH: Plant Height), espressa in cm e misurata come distanza dalla base della pianta fino alla fine della spiga senza considerare le reste. Il dato è la media di 10 campioni rappresentativi prelevati nelle due filette centrali della parcella. Le misurazioni sono state effettuate sui culmi principali in due stadi fenologici distinti: antesi e maturità.
- Lunghezza del peduncolo (PedL: Peduncle Length), espressa in cm e misurata come distanza dalla foglia bandiera alla base della spiga di ogni culmo principale e rilevata sugli stessi campioni sui quali è stata misurata l'altezza.

- Peso secco della foglia (DwL: Dry Weight of the Leaf), del culmo (DwStem: Dry Weight of the Stem) e della spiga (DwSpike: Dry Weight of the Spike), espresso in grammi e misurato sia all'antesi che a maturità come media di 10 culmi principali campionati nelle filette centrali della parcella.
- Indice di verde (SPAD) espresso in unità e misurato come media di dieci foglie bandiera rappresentative della parcella attraverso il misuratore di clorofilla (SPAD-502; Minolta). I rilevamenti sono stati effettuati in tre stadi: botticella, antesi e riempimento granella. Nella prova del 2011 sono stati effettuati rilevamenti solo negli ultimi due stadi.
- Biomassa verde (NDVI: Normalized Difference Vegetation Index), stimata attraverso l'utilizzo dello spettroradiometro portatile (Green seeker Hand Held TM optical sensor unit; modello 505, Ntech Industries CA, USA). Nelle prove del 2010 è stato effettuato un solo rilevamento in fase vegetativa, mentre nella prova del 2011 sono stati effettuati tre rilevamenti il primo in fase vegetativa mentre gli altri a distanza di 15 giorni l'uno dall'altro.

Solamente nelle due prove sperimentali dell'anno 2009/2010 sono stati rilevati anche i caratteri:

- Harvest Index (HI), espresso in %.
- Numero di culmi fertili m⁻² (FTpsm: Fertile Tillers per square meter), derivato dal conteggio a maturità del numero di culmi fertili in un metro lineare delle due filette centrali della particella.
- Numero di semi per culmi fertili (KFTpsm: Kernal of Fertle Tillers per square meter).

1.4. Analisi del contenuto dei carboidrati

L'analisi del contenuto dei carboidrati solubili in acqua (WSC: Water Soluble Carbohydrates) è stata effettuata su tre coppie NIL caratterizzate da composizione allelica contrastante in tutta la regione del QTL. Le coppie selezionate sono state:

- 23(-/-) e 24(+/+);
- 29 (-/-) e 30 (+/+);
- 34 (-/-) e 42 (+/+).

L'analisi è stata effettuata solo per i campioni della prova sperimentale dell'anno 2010/2011. Tre repliche sono state analizzate per ciascun campione. L'analisi è stata effettuata sul penultimo e ultimo internodo (peduncolo) in un numero rappresentativo di 8 culmi principali. I campionamenti sono stati effettuati in tre stadi diversi: ad antesi, riempimento della granella ed a maturità.

I carboidrati sono stati estratti seguendo il protocollo modificato di Wardlaw e Willenbrink (1994). I campioni sono stati preventivamente macinati insieme a del ghiaccio secco con un tritatutto. Successivamente una quantità di 0,1 g di materiale tritato è stato fatto bollire con 40 ml di acqua deionizzata per circa 40 min e successivamente il prodotto è stato filtrato e utilizzato per l'analisi colorimetrica attraverso l'utilizzo del reagente antrone (C₁₄H₁₀O). Le letture sono state effettuate con lo

spettrofotometro (LG-721) ad una lunghezza d'onda di 620 nm. Una soluzione di fruttosio a diverse concentrazioni è stata utilizzata come riferimento per stimare la concentrazione di WSC espressa in milligrammi su grammi di peso secco del tessuto ($\text{mg g}^{-1} \text{dw}$).

1.5. Analisi statistica dei dati fenotipici

I valori fenotipici ottenuti dall'analisi delle 18 coppie NIL sono stati utilizzati per l'analisi della varianza (ANOVA: ANalysis Of VAriance), condotta sui valori delle singole unità sperimentali secondo uno schema a blocchi randomizzati. L'analisi è stata effettuata utilizzando il software Minitab® v.15 (Minitab Ltd, Coventry, Inghilterra; Ryan *et al.*, 1985). La scomposizione della varianza totale per ciascuna densità di semina è stata effettuata come segue:

Fonti di Varianza	G.L.	Composizione
totale	111	
blocchi	2	
genotipi	35	$\sigma^2_E + \sigma^2_G$
errore	74	σ^2_E

dove σ^2_E è la varianza dell'errore e σ^2_G è la varianza genotipica.

Un'ulteriore scomposizione è stata effettuata per analizzare la varianza significativa tra ed entro coppia.

La scomposizione in questo caso è stata effettuata come segue:

Fonti di Varianza	G.L.	Composizione
totale	144	
genotipi	35	$\sigma^2_E + \sigma^2_G$
tra coppie	17	
K vs. S	1	
coppie x (K vs. S)	17	
errore	74	σ^2_E

Le coppie NIL sono state organizzate in gruppi in base alla loro composizione aploipica. Un totale di quattro gruppi, tutti costituiti da un numero rappresentativo di coppie, sono stati valutati attraverso l'analisi della varianza per stimare una differenza significativa tra le diverse composizioni aploipiche.

I caratteri analizzati per ciascuna prova sono stati: l'altezza della pianta e la lunghezza del peduncolo a maturità, la resa in granella, il peso medio dei semi, la data di spigatura e l'indice di verde rilevato ad antesi.

La scomposizione della varianza è stata effettuata come segue:

Fonti di Varianza	G.L.	Composizione
totale	112	
genotipi	31	
tra gruppi	3	$\sigma^2_E + \sigma^2_G$
entro gruppi	12	
K vs. S	1	
tra gruppi x (K vs. S)	3	
errore	62	σ^2_E

Dall'analisi sono state escluse due coppie NIL in quanto caratterizzate da una composizione allelica unica e quindi non sufficientemente rappresentative.

Per valutare la significatività della differenza tra le linee con l'allele Kofa (+/+) e quelle con l'allele Svevo (-/-) è stato effettuato il calcolo della LSD (Least Significant Difference) in base all'equazione che segue:

$$LSD = t_{G.L.E} \sqrt{2\sigma^2_E / r}$$

dove $t_{G.L.E}$ è il coefficiente calcolato in base ai gradi di libertà dell'errore, σ^2_E è la varianza dell'errore e r è il numero di repliche.

2. RISULTATI

2.1. Caratterizzazione molecolare

Dalla genotipizzazione delle 36 linee NIL risulta che le 18 coppie NIL sono caratterizzate da una diversa composizione allelica nella regione *Qyld.idw-3B* entro la coppia e tra le coppie. Sette di queste coppie NIL sono composte da una linea che in tutta la regione del QTL corrisponde a Kofa, il parentale che contribuisce all'incremento del carattere (+/+), mentre l'altra linea corrisponde a Svevo, il parentale che contribuisce al decremento del carattere (-/-); le restanti 11 coppie presentano una composizione allelica contrastante solo per intervalli più ristretti all'interno della regione *Qyld.idw-3B* (Figura 1).

2.2. Valutazione Fenotipica

Dall'analisi ANOVA dei dati fenotipici rilevati nelle diverse prove sperimentali condotte nell'anno 2010 e 2011 sono state osservate differenze significative per gran parte dei caratteri tra le 36 linee, tra le 18 coppie e soprattutto tra le linee con l'allele +/+ (Kofa) e l'allele -/- (Svevo).

Nella tabella 1 vengono riportati i dati fenotipici dei caratteri rilevati nella prova a bassa densità di semina dell'anno 2010 (LD_2010), nella tabella 2 vengono riportati i dati fenotipici dei caratteri rilevati nella prova ad alta densità di semina dell'anno 2010 (HD_2010) mentre nella tabella 3 sono riportati i dati fenotipici rilevati nella prova di campo dell'anno 2011 (LD_2011). Le differenze dei valori fenotipici medi tra le linee +/+ e -/- sono riportate nella tabella 4 per i dati del 2010 e nella tabella 5 per i dati del 2011. I risultati dell'ANOVA per ciascun carattere sono descritti in dettaglio di seguito.

2.2.1. Resa in granella e sue componenti

Dall'analisi ANOVA dei dati fenotipici rilevati per i caratteri indice di raccolta (HI: Harvest Index), resa in granella (GY) e sue componenti (TKW: peso dei semi, DwL: peso secco della foglia, DwStem: peso secco del culmo, DwSpike: peso secco della spiga, Kpsm: numero dei semi per m² FTpsm: numero dei culmi fertili per m², KFTpsm: numero dei semi dei culmi fertili per m²) è possibile osservare, per gran parte di questi caratteri, una differenza significativa con valori di P equivalenti a 0,001 tra i valori medi fenotipici delle linee +/+ e quelli delle linee -/-.

Più in dettaglio, per quanto riguarda la prova LD_2010 i valori fenotipici per GY sono risultati compresi tra 73,8 e 39,0 q ha⁻¹ e la differenza media tra i valori fenotipici delle linee +/+ e quelli dalle linee -/- è risultata essere di 10,5 q ha⁻¹. Per quanto riguarda HI i valori fenotipici sono compresi tra 33,3 e 51,9% con una differenza tra linee +/+ e linee -/- di 3,7% (tabella 1a e 4a).

Valori più alti sono stati ottenuti nella prova HD_2010: in questo caso i valori fenotipici per GY sono compresi tra 81,5 e 41,7 q ha⁻¹ (tabella 2a), mentre la fenotipica differenza media tra linee +/+ e linee -/- risulta essere di 12,2 q ha⁻¹. La differenza per HI risulta essere di 4,8% (tabella 4a).

Per quanto riguarda la prova LD_2011 i risultati ottenuti per GY confermano quelli ottenuti nell'anno precedente. Una differenza significativa di 7,8 q ha⁻¹ è stata osservata tra linee +/+ e linee -/- su un valore medio fenotipico di 58,7 q ha⁻¹ (tabella 3a e 5a).

Per quanto riguarda gli altri caratteri correlati direttamente alla resa solo il TKW, il peso secco della spiga (DwSpike), il peso secco del culmo (DwStem) e il peso secco della foglia (DwL) sono risultati avere una differenza significativa tra linee +/+ e linee -/- sia per i dati ottenuti nel 2010 che per quelli del 2011. Come per il carattere della resa in granella, anche per i caratteri TKW, DwSpike, e DwStem sono stati osservati valori più alti per le linee +/+ e più bassi per le linee -/-.

Per quanto riguarda TKW una differenza significativa di 4,6 g è stata osservata per i dati rilevati nella prova LD_2010 ed una differenza di 5,0 g per i dati rilevati nella prova HD_2010.

Per DwStem rilevato nell'anno 2010 differenze significative sono state osservate per entrambe le prove e gli stadi fenologici. Ad antesi differenze significative per DwStem sono risultate essere di 0,16 g sia per LD_2010 che per HD_2010 mentre a maturità di 0,14 g e 0,11 g rispettivamente per LD_2010 e HD_2010.

Per quanto riguarda DwSpike differenze tra linee +/+ e linee -/- sono risultate essere significative solo nella fase di maturità con valori di 0,38 g per la prova LD_2010 e 0,25 g per la prova HD_2010.

Diversamente da DwStem e DwSpike valori significativi di DwL sono stati osservati solo per LD_2010 con valori più alti per le linee -/- rispetto alle linee +/+ e una differenza minima di 0,01 g.

I dati rilevati nell'anno 2011 hanno ampiamente confermato i risultati ottenuti nel 2010 con valori di additività risultati significativi ed equivalenti a 5,9 g per TKW, 0,06 g per DwSpike e 0,45 g per DwStem rilevati ad antesi e 0,58 g per DwSpike e 0,30 g per DWStem rilevati a maturità.

Anche in questo caso un andamento opposto è stato osservato per DwL con una differenza significativa di 0,02 g per il solo dato rilevato ad antesi.

Nessuna differenza significativa è stata osservata per FTpsm mentre solo nella prova LD_2010 e HD_2010 differenze significative sono state osservate per KFTpsm con valori rispettivamente di 2,4 e 2,2, nonché per Kpsm con valori rispettivamente di 1041 e 1374.

Confrontando i valori percentuali delle differenze fenotipiche di ciascun carattere è possibile osservare un effetto molto rilevante per GY rispetto agli altri caratteri. Tra le due prove sperimentali dell'anno 2010 valori percentuali più alti sono stati osservati per la prova HD_2010 con valori per GY di 21,7% rispetto a 19,8% della LD_2010 (figura 2). Nell'anno 2011 è stata osservata una differenza del 18,0% per GY (figura 3). Variazioni interessanti sono state rilevate anche per:

- TKW con valori di 11,7, 12,7 e 10,7% rispettivamente per LD_2010, HD_2010 e LD_2011;
- DwStem rilevato a maturità con valori di 13,3, 10,7 e 17% rispettivamente per LD_2010, HD_2010 e LD_2011;

- DWSpike rilevato a maturità con valori di 20,1, 14,2 e 25,1% rispettivamente per LD_2010, HD_2010 e LD_2011;
- FTpsm con valori di 11,6 e 8,7 % rispettivamente per LD_2010, HD_2010;
- Kpsm con valori di 11,1 e 13,2 % rispettivamente per LD_2010, HD_2010.

2.2.2. Altezza della pianta, lunghezza del peduncolo e lunghezza della spiga

Dai dati ottenuti dalla prova sperimentale a bassa densità di semina nell'anno 2010 (LD_2010) è stato possibile osservare che per l'altezza della pianta (PH) e per la lunghezza del peduncolo (PedL) tutte le linee ++ risultano essere caratterizzate da un valore fenotipico significativamente più alto rispetto a tutte le linee --, a differenza da quanto osservato per il carattere lunghezza della spiga (tabella 1).

I valori medi fenotipici delle linee ++ e delle linee -- sono risultati significativamente diversi (P 0,01) sia all'antesi sia per quelli registrati a maturità con valori rispettivamente di 8,7 e 9,4 cm per PH e di 5,4 e 5,6 cm per PedL (tabella 4b). Per quanto riguarda SL rilevato a maturità una differenza significativa tra le due linee è stata osservata con un valore P equivalente a 0,05 ed una differenza fenotipica molto bassa equivalente a 0,1 cm.

Risultati analoghi sono stati ottenuti per i caratteri rilevati nella prova HD_2010 (tabella 2): in questa prova per tutti i caratteri, anche per SL, le linee ++ risultano avere un valore fenotipico significativamente più alto rispetto alle linee --. Sono state osservate differenze tra le medie fenotipiche delle due diverse linee di 9,2 e 7,9 cm per PH, 5,7 e 5,1 cm per PedL, rilevati rispettivamente ad antesi e maturità, e una differenza di 0,2 cm per SL (tabella 4b).

Per quanto riguarda i dati rilevati nella prova LD_2011 i risultati ottenuti dall'analisi della varianza confermano quelli osservati nell'anno precedente (tabella 3). La differenza fenotipica tra le linee ++ e -- risulta essere di 10,2 cm per PH e 5,9 cm per PedL osservati ad antesi; invece per i dati registrati a maturità si hanno valori di 8,5 cm per PH e 5,4 cm per PedL (tabella 5b).

Confrontando i valori percentuali delle differenze fenotipiche tra linee ++ e linee -- è possibile osservare un effetto molto rilevante per PedL rispetto ai valori per PH.

In riferimento ai dati rilevati allo stadio di maturità i valori percentuali risultano essere equivalenti al 40 e al 14% rispettivamente per PedL_LD_2010 e PH_LD_2010, mentre risultano pari al 34 e 12% rispettivamente per PedL_HD_2010 e PH_HD_2010 (figura 2).

La varianza espressa in percentuale risulta avere valori più alti nella prova LD_2010 rispetto a quelli di HD_2011.

Per quanto riguarda invece la prova LD_2011 la differenza media tra le coppie isogeniche è risultata pari a 33,7% per PedL e 12% per PH (figura 4).

2.2.3. Data di spigatura

Con lo scopo di analizzare l'effetto del QTL in relazione allo sviluppo della pianta la data di spigatura (HD) è stata rilevata in tutte le prove sperimentali. Sono state osservate variazioni fenotipiche significative tra i valori medi delle linee *+/+* e i valori medi delle linee *-/-* con una differenza di circa 1,1 giorni per le prove LD e HD del 2010 (tabella 4b); mentre per la prova LD del 2011 è stata osservata una differenza di 1,8 giorni (tabella 5b). In entrambe le prove le linee più precoci risultano essere quelle caratterizzate dall'allele *+/+*.

2.2.4. *Indice di verde e biomassa verde*

Dall'analisi dell'indice di verde (SPAD) in quattro diversi stadi fenologici non sono state osservate differenze significative tra linee *+/+* e linee *-/-* per i dati delle prove agronomiche del 2010.

Diversamente, nella prova allestita nell'anno 2011 era ben visibile una differente colorazione delle foglie tra le linee *+/+* e le linee *-/-* (figura 4); queste differenze sono risultate significative con valori di additività di 3,2 e 9,6 unità di SPAD rispettivamente per il rilievo effettuato ad antesi e per quello effettuato a riempimento della granella.

In nessuna prova è stata osservata una differenza significativa per i dati NDVI.

2.3. Analisi del contenuto dei carboidrati

Dall'analisi del contenuto dei carboidrati solubili in acqua (WSC), effettuata sui tessuti dell'ultimo e penultimo internodo di tre coppie NIL (6 linee in totale), nella fase di antesi è stato rilevato un contenuto di WSC compreso tra 20 e 28 mg g⁻¹ dw.

Dai dati ottenuti sui campioni prelevati allo stadio di riempimento della granella è stato possibile osservare un aumento significativo del contenuto di WSC, che raggiunge valori compresi tra 27 e 36 mg g⁻¹ dw, mentre tali valori diminuiscono drasticamente nella fase di maturazione durante la quale il contenuto di WSC è risultato essere compreso tra 0,2 e 4,0 mg g⁻¹ dw (figura 5).

Solo per le coppie 29-30 e 34-42 i valori delle linee *+/+* (30 e 42) risultano essere significativamente più alti rispetto a quelli delle linee *-/-* (29 e 34) in tutte gli stadi analizzati, con una differenza di:

- 2,1 e 7,2 mg g⁻¹ dw rispettivamente per le coppie 29-30 e 34-42 analizzate all'antesi;
- 6,8 e 6,0 mg g⁻¹ dw rispettivamente per le coppie 29-30 e 34-42 analizzate a riempimento della granella;
- 1,7 e 2,6 mg g⁻¹ dw rispettivamente per le coppie 29-30 e 34-42 analizzate nello stadio di maturità.

Per quanto riguarda la coppia 23-24 solo ad antesi è stata osservata una differenza significativa tra le linee *+/+* e *-/-* con un valore equivalente a 2,1 mg g⁻¹ dw, mentre negli altri stadi sono stati ottenuti valori non significativi di 0,9 e 0,6 mg g⁻¹ dw.

2.4. Analisi statistica dei gruppi aploipici

Le 18 coppie NIL sono state suddivise in un totale di 6 gruppi in base alle loro composizioni aploipiche (figura 6). In dettaglio i gruppi risultano essere:

- gruppo 1: composto da 7 coppie di NIL; 5 coppie derivano dalla RIL215, mentre 2 coppie dalla RIL151;
- gruppo 2: composto da 2 coppie NIL derivate dalla RIL77;
- gruppo 3: composto da 3 coppie NIL derivate dalla RIL 77;
- gruppo 4: composto da 4 coppie derivate dalla RIL23;
- gruppo 5: composto da una sola coppia derivata dalla RIL77;
- gruppo 6: composto da una sola coppia derivata dalla RIL151.

Dall'ANOVA effettuata sui primi quattro gruppi aploipici caratterizzati da un numero di coppie rappresentative della composizione allelica è stato possibile osservare differenze significative tra le linee +/+ e -/- sia per PH che per PedL (figura 7). La differenza è risultata essere significativa per ciascun gruppo e nelle diverse prove sperimentali. In dettaglio, per i dati ottenuti nell'anno 2010 i risultati per la prova a bassa densità di semina risultano essere molto simili a quelli ottenuti per l'alta densità di semina. Per la prova HD_2010 differenze fenotipiche con valori più alti sono stati osservati nel gruppo 3 per PH con un valore equivalente a 9,9 cm mentre nel gruppo 1 per PedL con un valore di 5,8 cm. Per la prova LD_2010 valori più alti sono stati registrati nel gruppo 3 sia per PH che per PedL, con differenze rispettivamente di 11,5 e 6,7 cm. Gli stessi risultati sono stati poi confermati nell'anno 2011.

Differenze significative sono state osservate anche per GY e TKW, ma diversamente da quanto visto per PH e PedL non sono distribuite in modo omogeneo tra i gruppi e tra le prove. Per TKW le maggiori differenze tra linee +/+ e -/- sono state osservate nel gruppo 3 con valori di: 6,0 g per la prova HD_2010, 5,9 g per la prova LD_2010 e 9,5 g per la prova LD_2011. Per quanto riguarda GY, le principali differenze fenotipiche sono state osservate per il gruppo 2 nel caso dei dati rilevati nelle prove HD_2010 e LD_2011 con valori rispettivamente di 22,8 e 18,4 q ha⁻¹. Per la prova LD_2010 valori di differenze più alte sono state registrate nel gruppo 3 con un valore di 16,2 q ha⁻¹. Nel gruppo 4 solo per LD_2010 è stata osservata una differenza significativa (P 0,05) di 6,6 q ha⁻¹.

Valori significativi per l'indice di verde sono stati osservati solo nella prova dell'anno 2011, con una differenza significativamente più alta osservata nel gruppo 3 ed equivalente a 11,2 unità.

Per quanto riguarda HD, differenze significative con bassi livelli di probabilità (P 0,05), sono state ottenute per i gruppi 1, 2 e 3. Le maggiori differenze sono state osservate nel gruppo 1 con valori fenotipici di 1,6, 1,5 e 1,2 giorni rispettivamente per HD_2010, LD_2010 e LD_2011.

3. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La produttività è uno dei caratteri più studiati e ampiamente manipolati attraverso approcci di miglioramento genetico, con l'obiettivo di ottenere varietà con una potenzialità produttiva maggiore anche in condizioni climatiche avverse (Slafer 2003).

In letteratura, sono molteplici i lavori che presentano risultati riguardanti la dissezione del carattere resa in granella e delle sue componenti per studiare e approfondire la conoscenza delle basi genetiche di questi caratteri di grande importanza agronomica, anche in diverse condizioni ambientali (Li *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2003; Elouafi e Nachit, 2004; Huang *et al.*, 2004; McCartney *et al.*, 2005; Quarrie *et al.* 2005; Quarrie *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2006; Marza *et al.*, 2006; Narasimhamoorthy *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2007; Maccaferri *et al.*, 2008; McIntyre *et al.*, 2010; Heidari *et al.*, 2011).

L'identificazione di QTL che influenzano caratteri quantitativi, quali resa in granella e sue componenti, in popolazioni segreganti è un passo indispensabile ma non sufficiente per poter studiare e meglio caratterizzare questi caratteri (Pumphrey *et al.*, 2006). Maggiori approfondimenti sono stati resi possibili grazie allo sviluppo di un nuovo materiale vegetale isogenico, che risulta differire per la sola regione sede del QTL, in grado di mendelizzare il carattere in esame (Salvi *et al.*, 2002).

Lo sviluppo di linee quasi isogeniche è un approccio ampiamente utilizzato in campo vegetale per validare e localizzare con maggior precisione le posizioni dei QTL (Paterson *et al.*, 1990; Kaepler *et al.*, 1993; Tuinstra *et al.*, 1997; Salvi *et al.*, 2002). Diversi sono stati gli approcci utilizzati per poter ottenere linee isogeniche, come ad esempio il reincrocio assistito da marcatori (BDL: Backcross Derived Line) (Kaepler, 1997), o la produzione di librerie di introgressione (IL: Introgression Library) (Zamir, 2001; Salvi *et al.*, 2011).

L'approccio più utilizzato, grazie ai bassi costi di realizzazione, è quello basato sullo sviluppo di famiglie ricombinanti eterogenee (HIF) (Tuinstra *et al.*, 1997), metodologia presentata in questo capitolo nella descrizione dello sviluppo di coppie NIL che differiscono per la sola regione *Qyld.idw-3B*.

Le 18 coppie NIL ottenute sono risultate essere caratterizzate da una composizione aploipica contrastante per tutta la regione di *Qyld.idw-3B*, permettendo quindi di validare l'effetto del QTL stesso.

Dai dati fenotipici ottenuti nelle diverse prove è stato possibile confermare l'effetto di *Qyld.idw-3B* per gran parte dei caratteri studiati. In tutti gli ambienti e in gran parte delle coppie NIL, le linee con l'allele +/+, contribuito dal parentale Kofa, risultano avere valori significativamente più alti rispetto alle linee con l'allele -/-, contribuito dal parentale Svevo. Questo risultato è stato osservato per i caratteri più rilevanti come GY, TKW, PedL, PH e SPAD che hanno presentato una differenza media fenotipica rispettivamente di 10,2 q ha⁻¹, 5,8 g, 5,6 cm, 9,1 cm e 9,8 unità. Differenze significative di 1,3 giorni sono state osservate anche per HD ma con valori di probabilità più bassi rispetto agli altri caratteri.

Dai risultati ottenuti dai rilievi fenotipici effettuati per la resa in granella e sue componenti è possibile confermare che tutte le linee che presentano maggiori valori di resa sono caratterizzate anche da valori fenotipici più alti per DwSpike, DwStem, TKW, Kpsm e FTpsm.

Differenze significative più ampie sono state osservate per DwSpike rilevato a maturità, in cui le linee +/+ risultano avere valori fenotipici più alti rispetto alle linee -/-, a differenza dei dati rilevati nella fase di antesi in cui le differenze tra le linee non risultano essere significative. Sono state osservate differenze significative anche per DwStem, ma con valori più alti rilevati ad antesi rispetto alla fase di maturità. Questo ci permette di confermare un accumulo maggiore di assimilati per le linee +/+ rispetto alle linee -/- a livello dei culmi, condizione che consente una maggiore rimobilizzazione delle sostanze nutritive verso la spiga (Slafer *et al.*, 1999). È proprio durante la fase di riempimento della granella che si ha lo sviluppo della cariosside e l'accumulo della sostanza secca nei semi (Egli *et al.*, 1994).

Questo risultato è conforme anche con i dati ottenuti dalle prove del 2010 e da quella del 2011 in cui le linee +/+ risultano presentare valori di TKW significativamente più alti rispetto alle linee -/-.

Il TKW è una importante componente della resa in granella; in letteratura questo carattere risulta avere un effetto più limitato nei confronti della resa rispetto a quello apportato dalla variazione del numero dei semi per spiga ma risulta essere di più facile selezione per la sua maggiore ereditabilità (Slafer *et al.*, 1993). Il rapporto di crescita del peso medio dei semi è sotto controllo genetico (Hunt, 1991) e il numero di cellule dell'endosperma risulta avere un effetto positivo su questo carattere (Brocklehurst, 1977).

La mancata differenza osservata per la lunghezza della spiga, che risulta appunto avere le stesse dimensioni tra le linee +/+ e le linee -/-, non implica il coinvolgimento delle caratteristiche morfologiche della spiga o del seme stesso nel controllo del carattere TKW.

Il tasso di crescita dei semi risulta essere controllato da caratteristiche fisiologiche della spiga e dei semi (Thornley *et al.*, 1981) e probabilmente anche da una diversa disponibilità dei carboidrati (Frederick *et al.*, 1999).

I risultati ottenuti per TKW confermano in parte quanto osservato dall'analisi QTL della popolazione RIL Kofa × Svevo.

Nonostante la forte influenza che TKW risulta avere sull'effetto di *Qyld.idw-3B*, la variazione spiegata dai valori medi percentuali risulta notevolmente inferiore, con valori di 12,7, 11,7 e 10,6% rispetto ai valori di 21,7, 19,8 e 18,0% per GY rispettivamente per le prove HD_2010, LD_2010 e LD_2011. Questo ci permette di ipotizzare l'influenza anche di altre componenti della resa come ad esempio il numero dei semi m^{-1} , che tuttavia è risultato essere significativamente diverso tra le coppie per i soli dati del 2010. Nessuna differenza significativa invece è stata osservata per il numero di spighe fertili analizzate sul metro lineare di ogni singola unità sperimentale. Per Kpsm e FTpsm è stata osservata una differenza media percentuale per LD_2010 e HD_2010 con valori rispettivamente di 8,7 e 11,6% per Kpsm e 13,2 e 11,1% per FTpsm.

Questi risultati sono inattesi rispetto ai dati ottenuti dallo studio della popolazione RIL in cui il QTL identificato sul 3BS per la resa in granella non risulta influenzare in modo significativo né il numero dei

semi per mq né il numero di semi per spiga fertile (Maccaferri *et al.*, non pubblicato). Inoltre, diversamente da quanto atteso non è stata osservata nessuna differenza significativa per DwSpike in fase di antesi, momento in cui il numero di semi per spiga dovrebbe essere già determinato. E' infatti 20-30 giorni prima dell'avvenuta antesi il momento in cui si determina il numero finale di semi per mq ed è proprio ad antesi che è stata identificata un'alta correlazione tra il numero dei semi e il peso secco della spiga (Fisher 1985, Savin e Slafer 1991). Il carattere numero dei semi per mq è fortemente influenzato da altre componenti come il numero di spighe, il numero di spighette per spiga e il numero di semi per spighetta, che contribuiscono in modo diverso durante tutta la fase di sviluppo fino a qualche giorno prima dell' antesi (Slafer e Rawson 1994). Quanto osservato potrebbe essere dovuto all'aborto florale a ridosso dell'antesi, fase critica durante la quale l'accumulo di assimilati non è sufficiente per soddisfare lo sviluppo di tutti gli organi causando una forte competizione, in particolare tra culmi e spighe (Fischer e Stockman, 1986).

Per quanto riguarda i caratteri morfologici rilevati, come l'altezza della pianta e la lunghezza del peduncolo, sono state osservate differenze significative tra le linee ++ e quelle --, dove le linee che presentano una maggiore resa in granella risultano avere valori di altezza della pianta e lunghezza del peduncolo maggiori rispetto alle linee con valori di resa più bassi. In generale è noto che le piante più alte investono più risorse per il loro sviluppo strutturale a discapito dello sviluppo della cariosside e quindi risultano avere una produttività più bassa (Slafer, 1999).

La riduzione dell'altezza della pianta è stato il fattore determinante della "rivoluzione verde" nel miglioramento genetico dei cereali per poter ottenere varietà con più alta produttività. Infatti grazie all'introgresione del gene *Rht* è stato possibile ridurre la competizione delle sostanze nutritive tra gli organi riproduttivi della pianta e la composizione strutturale della lunghezza dei culmi e degli internodi (Richards,1992). Questo ha permesso un maggior numero di culmi fertili ed anche l'aumento del numero di semi per spiga, seppur di dimensioni più ridotte (Miralles *et al.*1998, Rebetzke e Richard, 2000).

Le cultivar moderne di frumento sono tutte caratterizzate da una statura più ridotta rispetto alle cultivar meno recenti, con dimensioni che risultano essere comprese in un intervallo ottimale tra 70 e 100 cm (Richards, 1992; Millers e Slafer 1995). Ulteriori riduzioni dell'altezza non risultano portare un vantaggio alla produttività poiché una drastica diminuzione della superficie vegetativa porta ad una diminuzione dell'efficiente utilizzo delle radiazione (RUE) e quindi ad una drastica diminuzione della biomassa e dell'attività fotosintetica della pianta (Calderini *et al.*,1999).

Le linee ++ risultano avere dei valori medi fenotipici di PH di 72,6 cm rispetto alle linee -- che invece hanno valori medi equivalenti a 62,5 cm.

Apparentemente differenze in altezze sono risultate essere significative a partire dall'emergenza della spiga, molto probabilmente legate ad una differenza più evidente in elongazione del peduncolo (figura 8). In questa fase sono state osservate anche differenze nella colorazione fogliare per la sola prova del 2011. Dai dati ottenuti è risultato che le linee caratterizzate da valori più bassi di resa entrano in senescenza prima delle altre linee, permettendo di ipotizzare un forte coinvolgimento di questo carattere nel

coinvolgimento dello sviluppo della pianta e nella sua produttività. Per l'indice di verde si ipotizza il coinvolgimento di geni che vengono autoregolati dalla pianta secondo meccanismi di risposta a condizioni di stress biotico (Duvick *et al.*, 1992) o meccanismi di resistenza a malattie .

Confrontando i valori fenotipici ottenuti dalle due prove a bassa ed alta densità di semina dell'anno 2010 sono state osservate differenze significative per tutti i caratteri in entrambe le densità di semina confermando la stabilità dell'effetto del QTL anche in condizioni di diversa competizione tra le piante e quindi diversa produttività, sebbene i valori per GY e TKW ottenuti siano risultati essere maggiori nella prova a densità di semina più alta mentre i valori DwSpike, DwStem, PH e PedL sono risultati essere più alti nella prova a bassa densità di semina.

Per cercare di individuare i meccanismi che sono alla base dell'effetto del QTL è stato interessante analizzare anche la concentrazione dei carboidrati idrosolubili (WSC) presenti nei tessuti dell'ultimo e penultimo internodo, che risultano essere un'importante risorsa per il riempimento della granella in condizioni di scarso apporto idrico (Bonnet e Incoll, 1992; Schnyder, 1993). L'accumulo dei carboidrati nei culmi avviene principalmente durante la fase di elongazione degli internodi ed è nell'ultima fase di riempimento della granella che i carboidrati accumulati vengono rimobilizzati verso la spiga, contribuendo, in condizioni di crescita normale, fino al 20% della resa in granella (Blum *et al.*, 1998).

I dati ottenuti dall'analisi effettuata sulle 3 coppie di linee NIL confermano quanto presentato in letteratura. L'accumulo di WSC è stato infatti osservato per tutte le linee tra la fase di antesi e quella di riempimento della granella ed è solo dopo, nella fase di maturazione, che se ne è riscontrata una riduzione drastica, a conferma della rimobilizzazione quasi totale del contenuto dei carboidrati. Tra le 6 linee analizzate è stato possibile osservare che quelle +/+ , con valori di GY più alti, risultano avere valori di WSC maggiori rispetto alle linee -/-. Valori risultati significativi per le coppie 29-30 e 34-42.

Soprattutto in caso di stress idrico numerosi lavori dimostrano una relazione positiva tra la concentrazione di carboidrati accumulati nel culmo (ultimo e penultimo internodo) e la resa in granella durante la fase di antesi (Foulkes *et al.*, 2007). Le concentrazioni ottenute per le 6 linee risultano avere valori simili a quelle identificate in letteratura e rilevate con la stessa metodologia; dall'analisi di una popolazione DHL di *T. aestivum* sono stati riportati valori compresi tra 24-10 e 0,23-7,4 mg g⁻¹dw, rispettivamente durante la fase di riempimento della granella e maturità.

Confrontando le differenze medie fenotipiche di ciascun carattere è stato possibile osservare un effetto molto ampio sia per PedL che per PH. Data la stabile ed evidente differenza di questi caratteri, la loro associazione con il carattere resa in granella, nonché il loro più semplice rilevamento è possibile utilizzare PedL e PH in sostituzione di GY per studiare l'effetto di *Qyld.idw-3B*.

FIGURE

Figura 1: Composizione aplotipica delle 18 coppie NIL (36 linee in totale) genotipizzate con 14 marcatori molecolari mappati sul cromosoma 3BS della popolazione Kofa × Svevo. Nell'aplotipo è stato indicato in rosso l'allele Kofa (a), allele che contribuisce all'incremento dei caratteri (+/+) mentre in verde l'allele Svevo (b), allele che contribuisce al decremento dei caratteri (-/-). Nell'immagine è riportata la distanza genetica dei marcatori molecolari espressa in cM ottenuta nella popolazione Kofa × Svevo.

cM	0,0 gwm389	5,3 gwm1034	6,4 cft5000	6,7 cft5005	6,7 cft5034	7,8 barc133	8,3 cfb6018	9,2 cfb6060	9,5 cfb6128	9,7 cfb6043	9,9 cfb6021	11,8 cfp78	11,8 cfp60	13,7 gwm493
215-331-11 K	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
215-331-10 S	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
215-381-5 K	h	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
215-381-9 S	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
215-386-5 K	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
215-386-11 S	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
215-386-6 K	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
215-386-7 S	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
215-424-8 K	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
215-424-7 S	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
151-269-7 K	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
151-269-2 S	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	h
151-269-5 K	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
151-269-4 S	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
151-270-4 K	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b
151-270-3 S	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
23-23-3 K	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
23-23-4 S	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b
23-53-1 K	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
23-53-2 S	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b
23-84-8 K	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
23-84-3 S	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b
23-88-5 K	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
23-88-9 S	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b
77-175-8 K	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
77-175-9 S	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
77-216-6 K	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
77-216-9 S	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
77-186-8 K	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
77-186-9 S	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
77-157-3 K	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
77-157-4 S	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
77-157-14 K	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
77-157-15 S	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
77-159-2 K	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a
77-159-3 S	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b

Figura 2: Istogramma delle differenze percentuali dei caratteri rilevati nella prova a bassa densità di semina (LD) ed alta densità di semina (HD) dell'anno 2010. Per ciascun carattere il valore percentuale è stato calcolato come differenza tra tutte le linee ++ e linee -/- sul valore medio generale. I caratteri riportati sono: resa in granella (GY), Harvest Index (HI), peso medio dei semi (TKW), numero di semi mq (Kpsm), numero di semi per spiga fertile (FTpsm), peso secco della foglia (DwL), peso secco del culmo (DwStem), peso secco della spiga (DwSpike), altezza della pianta (PH), lunghezza del peduncolo (PedL) e data di fioritura (HD). I pesi secchi e le altezze fanno riferimento ai dati rilevati nella fase di maturità. Sotto a ciascun carattere sono stati riportati i valori relativi delle differenze (K - S) e la rispettiva significatività. Con ** è stato indicato un valore P= 5% mentre con *** un valore P = 1%.

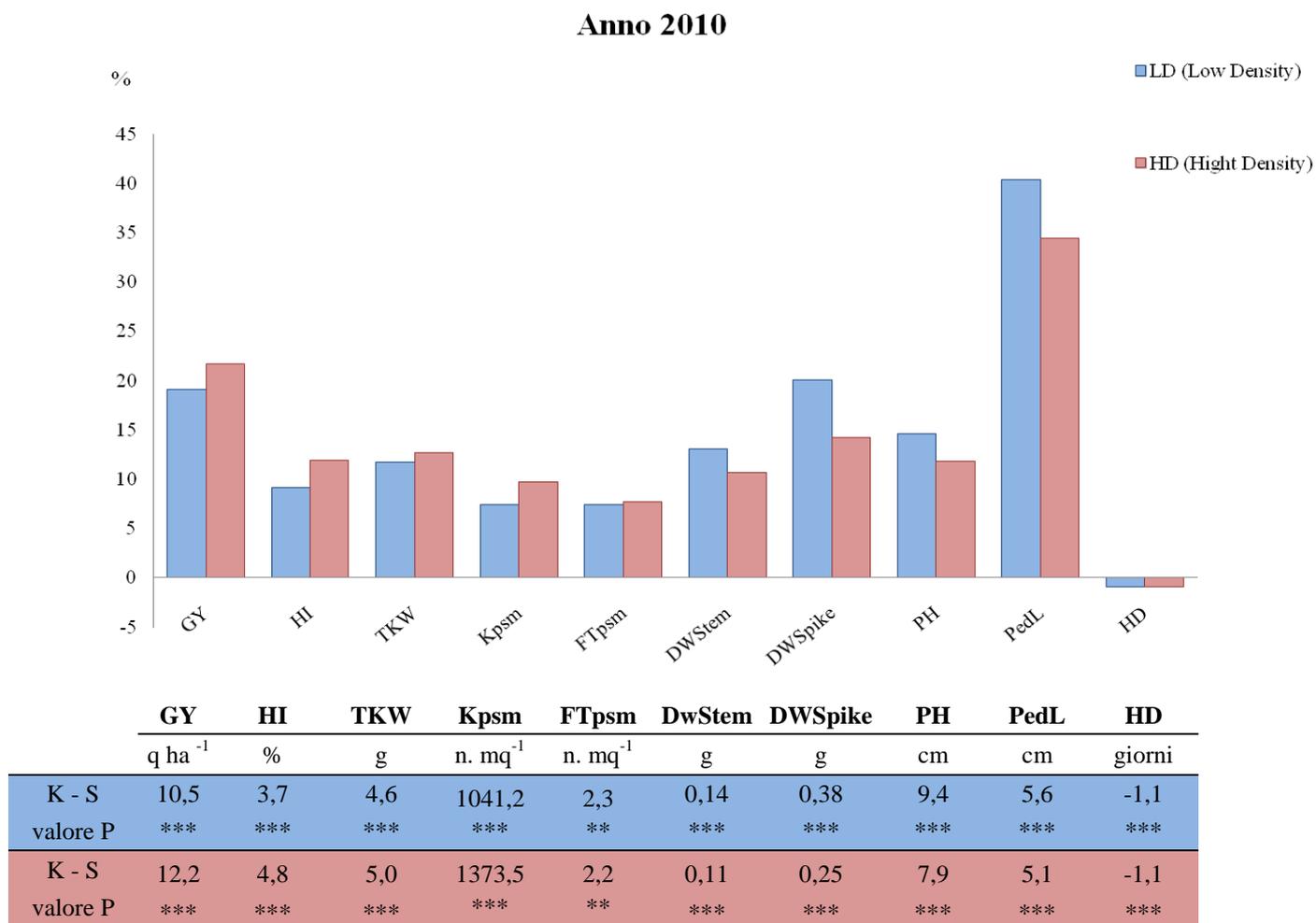
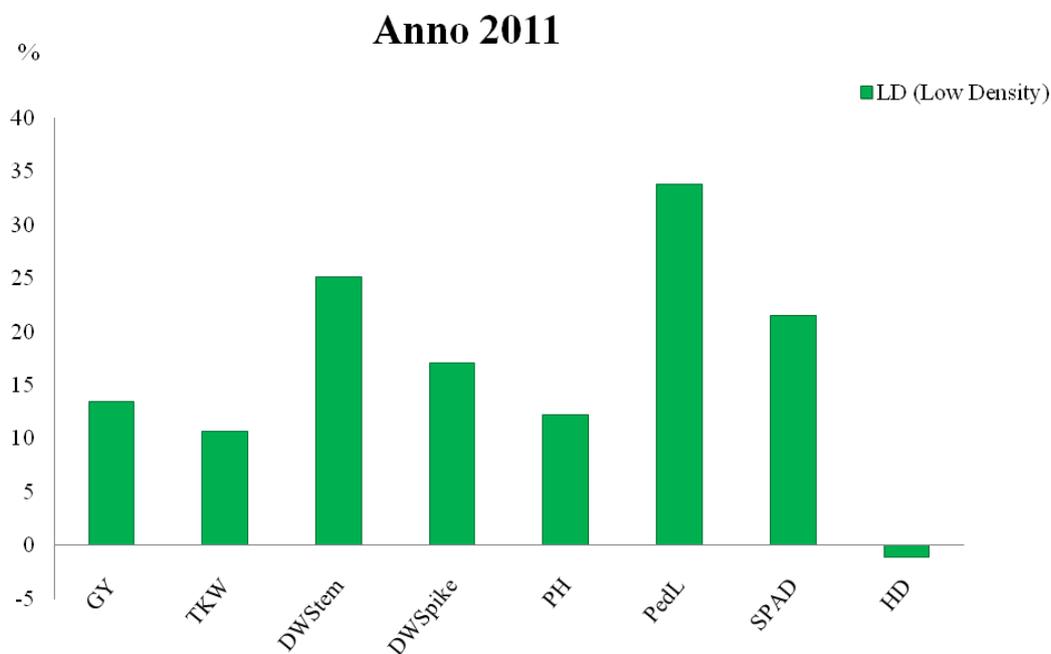


Figura 3: Istogramma delle differenze percentuali dei caratteri rilevati nella prova a bassa densità di semina (LD) dell'anno 2011. Per ciascun carattere il valore percentuale è stato calcolato come differenza tra tutte le linee +/+ e linee -/- sul valore medio generale. I caratteri riportati sono: resa in granella (GY), peso medio dei semi (TKW), peso secco della foglia (DwL), peso secco del culmo (DwStem), peso secco della spiga (DwSpike), altezza della pianta (PH), lunghezza del peduncolo (PedL), SPAD e data di fioritura (HD). I pesi secchi e le altezze fanno riferimento ai dati rilevati nella fase di maturità mentre i valori di SPAD fanno riferimento a quelli rilevati durante la fase di riempimento della granella. Sotto a ciascun carattere sono stati riportati i valori relativi delle differenze (K (+/+) – S (-/-)) e la rispettiva significatività. Con *** è stato indicato un valore P = 1%.



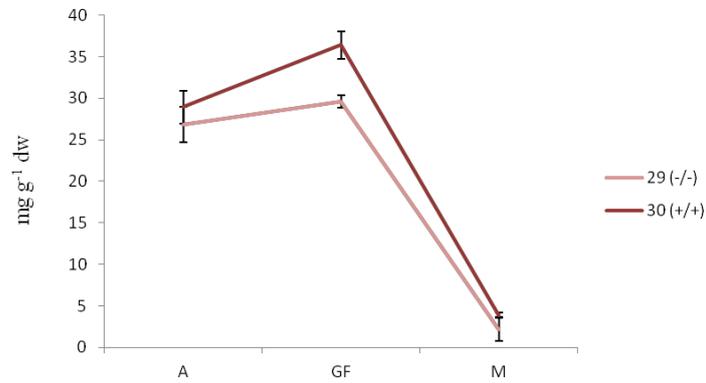
	GY	TKW	DwStem	DwSpike	PH	PedL	SPAD	HD
	q ha ⁻¹	g	g	g	cm	cm	unità	giorni
K - S	7,80	5,90	0,30	0,58	8,5	5,6	9,8	-1,4
valore P	***	***	***	***	***	***	***	***

Figura 4: Foto delle foglie bandiera appartenenti rispettivamente alla coppia -/- e +/+ due settimane dopo antesi. Nella foto è possibile osservare la diversa colorazione fogliare tra le due linee.

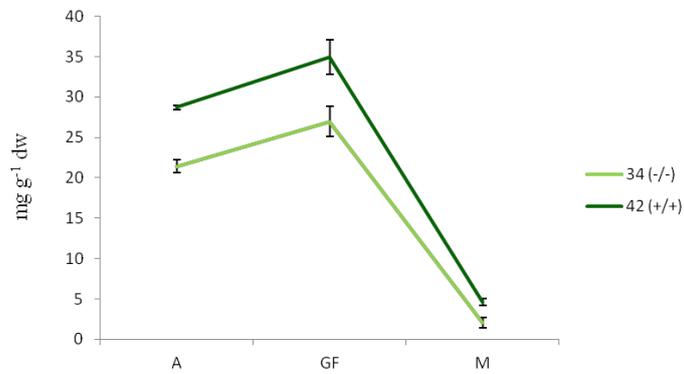


Figura 5: Concentrazione WSC rilevata in tre coppie NIL 29-30, 34-42, 23-24 in tre stadi fenologici diversi: antesi (A), riempimento della granella (GF) e maturità (M).

a) WSC rilevata nella coppia 29-30 dove 30 rappresenta la linea $+/+$ mentre 29 rappresenta la linee $-/-$.



b) WSC rilevata nella coppia 34-42 dove 42 rappresenta la linea $+/+$ mentre 34 rappresenta la linee $-/-$.



c) WSC rilevata nella coppia 23-24 dove 24 rappresenta la linea $+/+$ mentre 23 rappresenta la linee $-/-$.

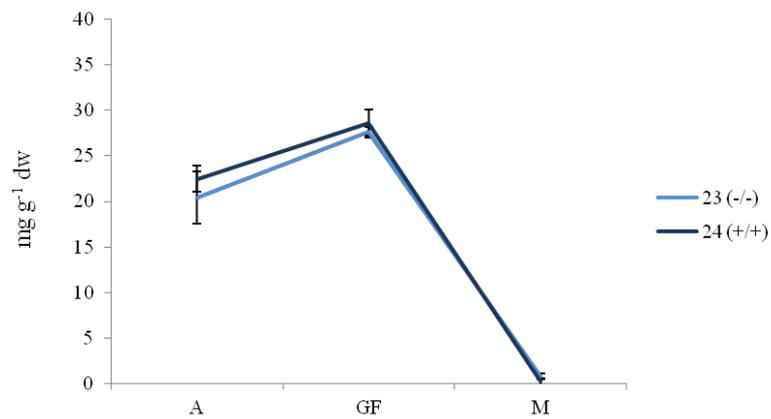
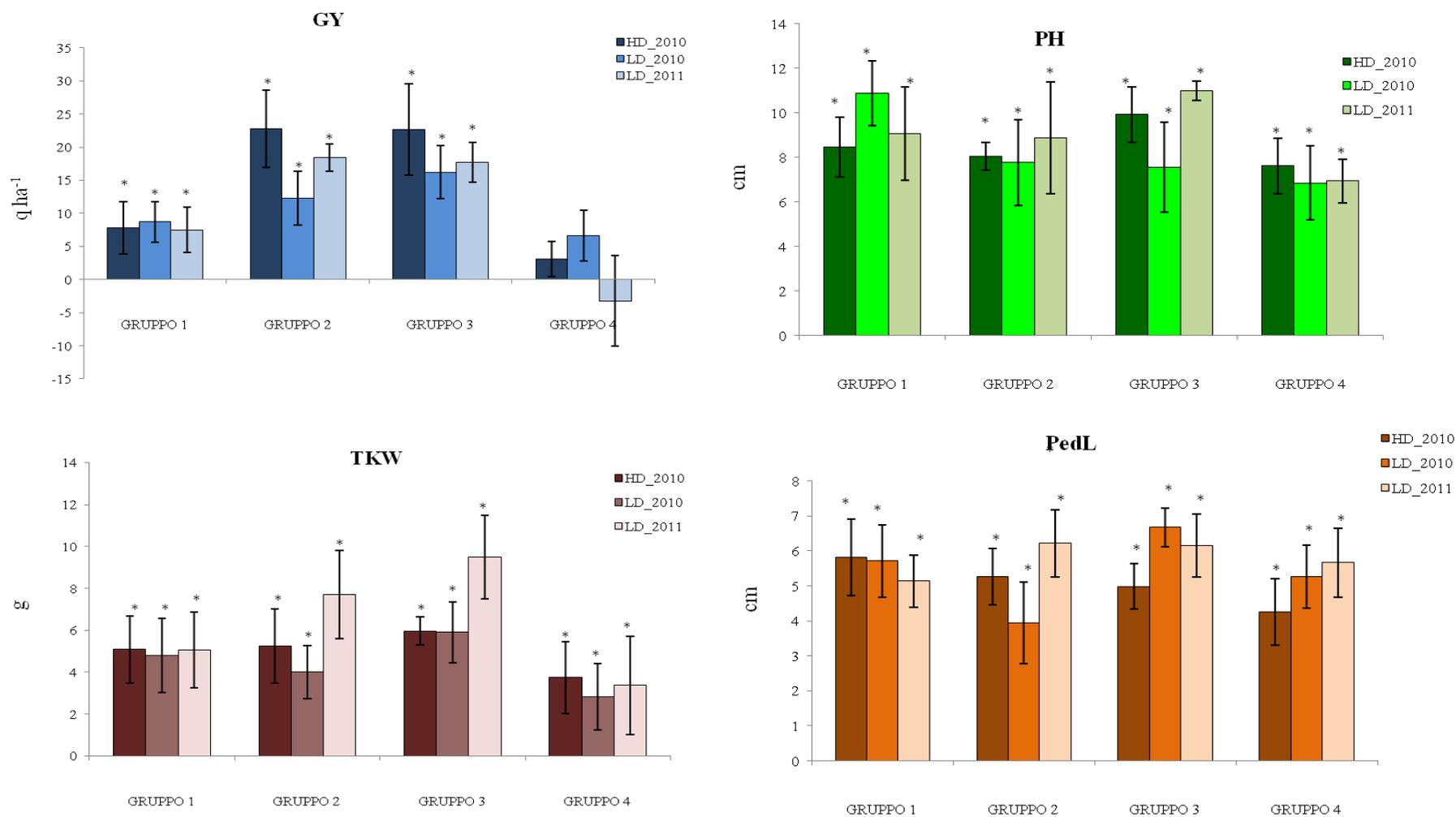


Figura 6: Aplotipo dei sei gruppi caratterizzati da coppie NIL con la stessa composizione allelica. Nell'aplotipo in rosso viene riportato l'allele Kofa (a), allele che contribuisce all'incremento dei caratteri (+/+) mentre in verde viene riportato l'allele Svevo (b), allele che contribuisce al decremento dei caratteri (-/-). Nell'immagine è riportata la distanza genetica dei marcatori molecolari espressa in cM ottenuta nella popolazione Kofa × Svevo.

		gwm389	gwm1034	cft5000	cft5005	cft5034	barc133	cfb6018	cfb6060	cfb6043	cfb6128	cfb6021	cfp78	cfp60	gwm493
	cM	0,0	5,3	6,4	6,7	6,7	7,8	8,3	9,2	9,5	9,7	9,9	11,8	11,8	13,7
1		a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
		b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
2		b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
		b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
3		b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
		b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
4		a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
		a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b
5		b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a
		b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
6		b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
		a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b

Figura 7: Grafico delle medie delle differenze fenotipiche tra linee ++ e linee -/- appartenenti allo stesso gruppo aplotipico. Nell'immagine viene riportato l'aplotipo dei gruppi 1, 2, 3 e 4 con i dati delle prove: HD_2010 (alta densità di semina 2010), LD_2010 (bassa densità di semina 2010) e LD_2011 (bassa densità di semina 2011). Per ciascun carattere vengono riportati i valori di l.s.d. al 5% e 1%.



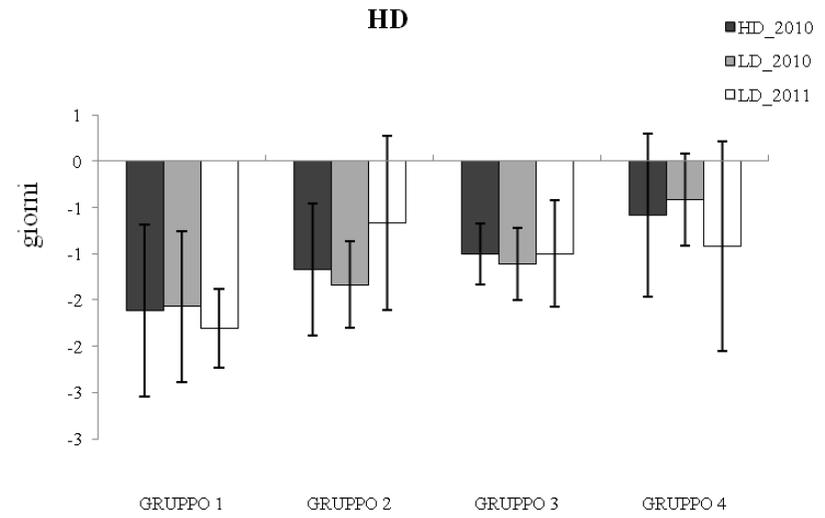
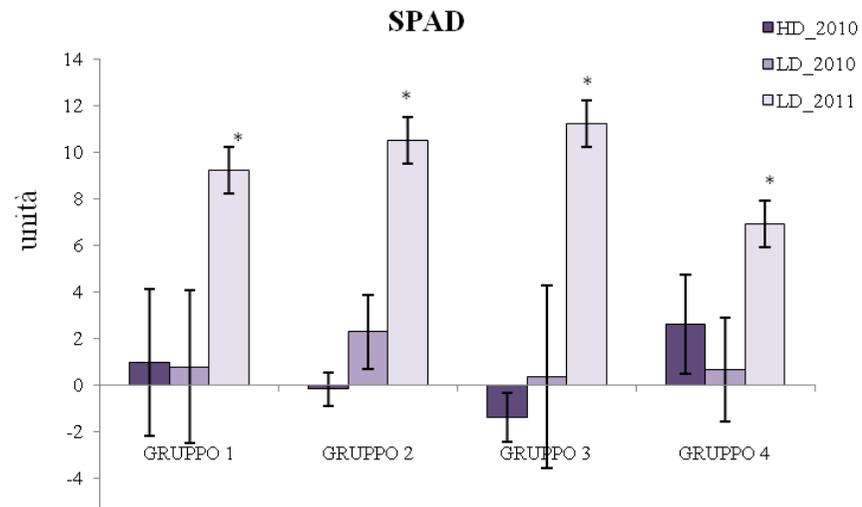
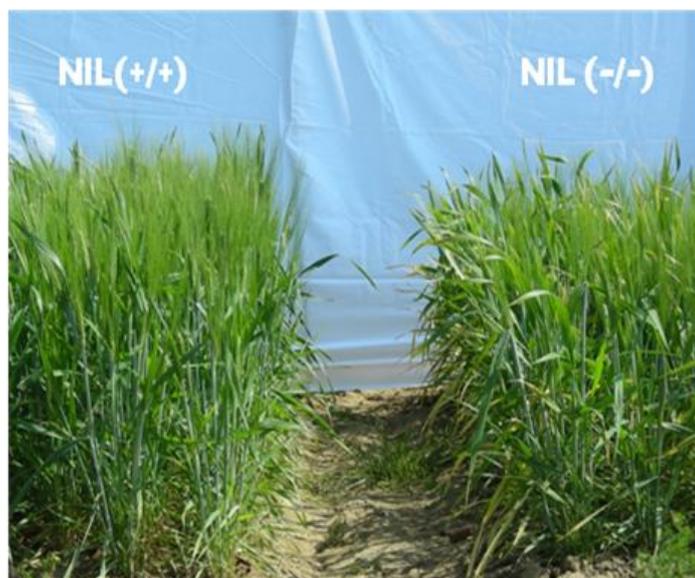


Figura 8: Coppia di NIL fotografata in campo in fase di antesi. Dalla foto è possibile osservare la differenza in altezza tra la linea $+/+$ e la linea $-/-$.



TABELLE

Tabella 1: Dati fenotipici dei caratteri rilevati nella prova a bassa densità di semina dell'anno 2010 (LD_2010). Per ciascuna linea sono stati riportati i caratteri: resa in granella (GY), Harvest Index (HI), peso medio dei semi (TKW), numero culmi fertili (FT), numero semi al mq (Kpsm), numero semi per culmi fertili (Fpsm), peso medio della foglia rilevato ad antesi e maturità (DwL_1 e DwL_2), peso medio del culmo rilevato ad antesi e maturità (DwStem_1 e DwStem_2), peso medio della spiga rilevato ad antesi e maturità (DwSpike_1 e DwSpike_2), altezza della pianta rilevata ad antesi e maturità (PH_1 e PH_2), lunghezza del peduncolo rilevata ad antesi e maturità (PedL_1 e PedL_2), lunghezza della spiga rilevata a maturità (SL), indice di verde rilevato prima dell'antesi, ad antesi e riempimento granella (SPAD_1, SPAD_2 e SPAD_3), data di fioritura (HD), indice di biomassa verde (NDVI). Per ciascun carattere è stata riportata la media generale.

		GY	HI	TKW	FT	Kpsm	Fpsm	DwL_1	DwStem_1	DwSpike_1	DwL_2	DwStem_2	DwSpike_2	PH_1	PedL_1	PH_2	PedL_2	SL_2	HD	SPAD_1	SPAD_2	SPAD_3	NDVI	
	Coppie NIL	allele	q ha ⁻¹	%	g	n. mq ⁻¹	n. mq ⁻¹	n. mq ⁻¹	g	g	g	g	g	cm	cm	cm	cm	cm	g	unità	unità	unità	unità	
1	23-23-3 K	+/+	52,5	37,3	40,8	425,0	12947,2	31,0	0,20	1,60	0,72	0,13	1,37	2,09	78,1	18,6	76,0	17,7	7,0	120,3	44,4	43,6	34,3	0,7
	23-23-4 S	-/-	39,0	33,3	40,0	444,2	9747,8	22,0	0,20	1,37	0,74	0,14	1,25	1,81	73,1	12,9	71,8	13,5	7,0	120,3	43,7	39,0	32,4	0,7
2	23-53-1 K	+/+	56,8	41,8	44,9	420,0	12650,1	31,1	0,18	1,45	0,72	0,14	1,40	2,39	79,0	18,5	77,4	17,6	7,1	119,3	45,3	47,3	36,2	0,7
	23-53-2 S	-/-	45,1	34,2	40,2	412,5	11203,8	27,2	0,21	1,39	0,79	0,14	1,22	1,84	70,0	11,8	66,0	11,8	7,6	120,3	45,3	43,2	34,3	0,7
3	23-84-8 K	+/+	51,7	41,5	44,8	363,3	11517,5	31,5	0,20	1,75	0,84	0,12	1,41	2,62	79,4	18,2	78,5	20,2	7,3	119,0	44,8	44,4	30,5	0,7
	23-84-3 S	-/-	55,4	35,8	41,9	428,3	13216,5	31,2	0,20	1,43	0,73	0,15	1,19	2,14	72,1	13,0	69,4	13,5	7,3	119,0	44,0	41,5	32,3	0,7
4	23-88-5 K	+/+	56,4	37,2	45,4	443,3	12406,4	28,8	0,21	1,72	0,78	0,13	1,45	2,59	79,3	18,4	78,9	18,8	7,0	119,3	44,6	45,8	34,6	0,7
	23-88-9 S	-/-	51,2	36,7	42,5	446,7	12040,4	27,0	0,20	1,42	0,74	0,14	1,29	2,25	73,1	14,4	71,2	14,4	7,6	120,0	46,0	48,3	35,3	0,7
5	77-157-3 K	+/+	73,8	43,4	39,4	527,5	18617,9	36,4	0,19	1,13	0,60	0,12	1,05	2,35	61,3	12,6	68,1	17,0	6,8	120,7	45,8	35,6	26,3	0,7
	77-157-4 S	-/-	55,3	38,1	34,7	492,5	15912,6	32,5	0,19	0,99	0,56	0,11	0,93	1,53	55,8	7,1	54,8	8,6	7,0	121,3	44,4	35,6	26,2	0,7
6	77-157-14 K	+/+	57,5	45,5	38,5	485,8	14923,1	30,9	0,18	1,22	0,65	0,11	1,04	2,22	63,9	11,2	63,9	12,7	6,7	120,3	44,6	36,4	28,2	0,7
	77-157-15 S	-/-	45,9	34,9	33,0	493,3	13932,5	28,3	0,19	1,02	0,59	0,12	0,93	1,73	54,4	7,3	52,8	7,2	6,8	121,7	45,8	41,2	31,0	0,7
7	77-159-2 K	+/+	56,3	40,7	34,7	501,7	16271,2	32,3	0,18	1,11	0,60	0,11	0,94	1,83	62,4	10,1	62,6	13,0	6,6	121,7	44,8	31,5	24,1	0,7
	77-159-3 S	-/-	45,5	36,7	30,6	436,7	14925,3	34,8	0,18	0,98	0,53	0,11	0,86	1,49	56,0	6,8	55,2	8,8	6,5	122,7	43,3	36,6	26,5	0,7
8	77-175-8 K	+/+	60,7	43,2	38,6	487,5	15802,0	32,3	0,20	1,29	0,68	0,12	1,04	2,00	61,6	10,8	57,9	9,9	6,8	120,7	41,9	35,1	26,9	0,7
	77-175-9 S	-/-	45,5	51,1	33,7	454,2	13665,9	30,2	0,19	1,18	0,65	0,13	1,02	1,77	56,6	6,5	52,5	6,1	6,9	121,7	43,6	37,5	27,1	0,7
9	77-186-8 K	+/+	64,3	45,1	38,3	543,3	16764,1	31,0	0,19	1,17	0,41	0,11	0,91	1,89	63,8	11,8	63,2	14,6	6,6	121,0	44,6	33,7	23,7	0,7
	77-186-9 S	-/-	45,8	41,4	30,8	459,2	14811,4	32,2	0,19	1,05	0,59	0,12	0,85	1,53	56,2	8,1	53,3	8,4	6,9	122,3	46,2	35,7	25,2	0,7
10	77-216-6 K	+/+	55,7	40,2	35,5	440,0	15674,5	36,1	0,18	1,11	0,61	0,10	0,87	1,76	64,8	11,8	61,7	11,5	6,5	121,3	45,0	29,0	20,9	0,7
	77-216-9 S	-/-	46,3	35,9	32,4	475,0	14327,4	30,9	0,20	1,02	0,59	0,12	0,90	1,50	54,3	6,5	52,7	7,4	6,7	123,0	45,2	37,6	28,3	0,7
11	151-269-7 K	+/+	56,5	45,8	40,2	500,8	14097,6	29,3	0,13	1,29	0,69	0,09	0,89	1,88	69,4	17,2	65,6	18,1	6,5	118,0	45,5	38,1	30,2	0,6
	151-269-2 S	-/-	48,7	40,1	34,7	449,2	14045,9	32,7	0,16	1,13	0,71	0,10	0,76	1,36	59,5	11,3	54,0	10,3	6,2	118,0	46,4	33,4	27,4	0,6
12	151-269-5 K	+/+	57,0	45,7	42,0	422,5	13673,0	33,3	0,13	1,23	0,66	0,09	0,90	1,90	67,3	17,5	66,5	17,8	6,4	117,3	45,5	37,0	30,0	0,6
	151-269-4 S	-/-	42,1	40,7	34,1	485,8	12406,6	28,7	0,15	1,12	0,64	0,09	0,85	1,63	58,6	11,4	56,8	11,6	6,4	118,3	44,8	34,1	28,2	0,6
13	151-270-4 K	+/+	61,2	46,4	42,3	440,0	14515,0	34,4	0,12	1,17	0,62	0,09	0,92	1,80	71,6	18,1	68,3	18,1	6,2	118,0	45,6	34,2	25,7	0,6
	151-270-3 S	-/-	46,6	37,1	35,7	530,0	13084,7	25,3	0,17	1,10	0,67	0,10	0,76	1,45	62,6	12,0	57,8	12,0	6,3	118,3	46,4	34,9	28,0	0,6
14	215-331-11 K	+/+	62,5	45,2	43,9	475,0	14261,6	30,7	0,19	1,49	0,75	0,12	1,17	2,12	77,8	19,8	69,0	17,3	6,3	117,3	46,8	45,9	33,2	0,6
	215-331-10 S	-/-	55,8	40,4	39,1	443,3	14250,8	32,5	0,21	1,34	0,80	0,13	0,96	1,68	64,6	12,9	60,4	12,7	6,5	119,0	48,9	49,7	36,3	0,7
15	215-381-5 K	+/+	64,2	42,7	44,6	480,8	14427,1	30,8	0,19	1,52	0,72	0,12	1,10	1,98	74,1	19,8	70,5	18,9	6,0	117,7	48,9	45,9	33,7	0,7
	215-381-9 S	-/-	54,0	42,5	38,9	557,5	13870,9	24,7	0,21	1,24	0,72	0,12	0,91	1,61	62,8	12,6	57,9	11,8	6,2	119,7	48,5	44,6	35,5	0,7
16	215-386-5 K	+/+	59,7	41,4	42,8	494,2	13917,2	28,3	0,20	1,52	0,77	0,13	1,26	2,15	75,9	20,2	73,9	18,3	6,5	117,0	49,9	47,8	34,7	0,7
	215-386-11 S	-/-	53,8	42,6	39,8	491,7	13542,9	29,3	0,19	1,29	0,74	0,13	0,95	1,85	63,8	12,9	61,4	12,7	6,3	119,0	49,5	43,8	30,4	0,6
17	215-386-6 K	+/+	66,6	41,0	46,1	475,0	14460,4	31,1	0,17	1,43	0,72	0,12	1,25	2,24	74,6	19,1	69,9	17,1	6,4	116,0	49,6	46,4	35,7	0,7
	215-386-7 S	-/-	58,9	41,3	42,9	503,3	13761,2	27,7	0,18	1,24	0,69	0,13	1,04	1,99	64,0	13,7	64,0	13,5	6,1	118,3	48,5	49,4	38,1	0,7
18	215-424-8 K	+/+	61,8	40,8	45,8	416,7	13477,4	33,5	0,17	1,46	0,71	0,11	1,09	2,04	72,7	17,7	68,4	17,5	5,8	115,7	46,3	44,2	33,6	0,6
	215-424-7 S	-/-	54,2	35,6	42,3	314,2	12668,5	40,8	0,18	1,35	0,80	0,12	0,95	1,78	62,3	12,9	57,9	12,4	6,2	117,7	46,8	42,3	32,4	0,6
	media NIL		54,56	40,64	39,33	462,78	13939,40	30,86	0,18	1,29	0,68	0,12	1,05	1,91	66,57	13,48	64,17	13,69	6,63	119,48	45,87	40,28	30,49	0,68

Tabella 2: Dati fenotipici dei caratteri rilevati nella prova ad alta densità di semina dell'anno 2010 (HD_2010). Per ciascuna linea sono stati riportati i caratteri: resa in granella (GY), Harvest Index (HI), peso medio dei semi (TKW), numero culmi fertili (FT), numero semi al mq (Kpsm), numero semi per culmi fertili (Fpsm), peso medio della foglia rilevato ad antesi e maturità (DwL_1 e DwL_2), peso medio del culmo rilevato ad antesi e maturità (DwStem_1 e DwStem_2), peso medio della spiga rilevato ad antesi e maturità (DwSpike_1 e DwSpike_2), altezza della pianta rilevata ad antesi e maturità (PH_1 e PH_2), lunghezza del peduncolo rilevata ad antesi e maturità (PedL_1 e PedL_2), lunghezza della spiga rilevata a maturità (SL), indice di verde rilevato prima dell'antesi, ad antesi e riempimento granella (SPAD_1, SPAD_2 e SPAD_3), data di fioritura (HD), indice di biomassa verde (NDVI). Per ciascun carattere è stata riportata la media generale.

Coppie NIL	allele	GY	HI	TKW	FT	Kpsm	Fpsm	DwL_1	DwStem_1	DwSpike_1	DwL_2	DwStem_2	DwSpike_2	PH_1	PedL_1	PH_2	PedL_2	SL_2	HD	SPAD_1	SPAD_2	SPAD_3	NDVI	
		q ha ⁻¹	%	g	n. mq ⁻¹	n. mq ⁻¹	n. mq ⁻¹	g	g	g	g	g	g	g	cm	cm	cm	cm	cm	g	unità	unità	unità	unità
1	23-23-3 K	+/+	54,87	31,71	44,10	403,33	12363,90	30,70	0,19	1,78	0,74	0,11	1,28	1,80	84,62	18,26	79,33	16,94	7,66	118,33	42,40	40,80	29,80	0,73
	23-23-4 S	-/-	51,26	30,07	40,80	475,83	12465,70	26,30	0,20	1,44	0,73	0,12	1,12	1,63	76,83	14,17	71,54	13,02	7,25	119,67	42,60	40,13	28,87	0,73
2	23-53-1 K	+/+	56,56	36,84	46,70	439,17	12084,60	27,50	0,18	1,65	0,73	0,12	1,39	1,95	82,10	18,32	76,80	16,54	6,99	119,00	43,73	43,90	28,23	0,71
	23-53-2 S	-/-	50,34	32,51	40,60	440,00	12352,70	28,30	0,20	1,44	0,74	0,13	1,21	1,85	73,54	12,86	70,99	12,63	7,10	120,00	43,20	41,93	27,63	0,69
3	23-84-8 K	+/+	49,22	38,30	43,70	470,00	11250,50	24,10	0,18	1,57	0,66	0,12	1,21	1,79	83,06	20,82	79,89	20,53	7,36	119,33	40,00	43,30	32,20	0,70
	23-84-3 S	-/-	49,47	36,68	40,10	459,17	12339,40	27,10	0,19	1,48	0,74	0,10	1,16	1,77	76,19	15,65	71,60	14,88	7,31	118,67	42,53	41,23	29,37	0,72
4	23-88-5 K	+/+	49,12	37,14	43,20	402,50	11352,30	28,70	0,19	1,60	0,71	0,12	1,43	2,16	83,40	21,08	82,45	19,53	7,51	119,33	41,53	42,90	32,03	0,71
	23-88-9 S	-/-	46,23	38,94	41,20	440,00	11231,30	25,90	0,19	1,47	0,72	0,13	1,14	2,03	75,80	15,98	73,84	15,99	7,00	120,00	42,43	37,27	31,23	0,68
5	77-157-3 K	+/+	77,10	46,49	41,70	500,00	18431,90	37,00	0,16	1,09	0,56	0,10	0,97	2,04	67,70	16,02	64,77	14,90	6,68	120,67	41,40	33,23	25,13	0,72
	77-157-4 S	-/-	46,89	37,71	35,40	459,17	13273,80	29,00	0,17	1,06	0,57	0,11	0,83	1,47	55,43	7,90	53,41	8,40	6,51	121,67	41,17	34,03	25,33	0,66
6	77-157-14 K	+/+	62,62	50,10	37,50	462,50	16689,90	36,10	0,17	1,15	0,58	0,11	1,03	2,15	65,02	12,60	66,44	14,94	6,90	121,33	42,20	37,23	23,77	0,70
	77-157-15 S	-/-	41,66	38,10	31,10	474,17	13449,60	28,60	0,16	0,99	0,54	0,12	0,96	1,55	56,27	7,94	57,43	9,72	6,20	122,00	40,90	38,07	25,57	0,69
7	77-159-2 K	+/+	64,21	43,15	36,80	553,33	17646,50	31,90	0,16	1,01	0,60	0,11	0,97	1,91	66,21	13,75	64,92	14,30	6,91	121,00	43,60	32,13	21,23	0,71
	77-159-3 S	-/-	46,60	35,61	33,10	551,67	14365,40	26,00	0,15	0,97	0,51	0,09	0,86	1,49	57,95	8,33	58,34	9,20	6,41	122,00	42,23	29,93	20,40	0,69
8	77-175-8 K	+/+	81,48	47,77	40,10	585,00	20326,30	34,80	0,16	1,05	0,58	0,11	1,01	1,98	65,08	14,18	65,55	15,22	6,62	121,00	43,53	36,17	27,13	0,74
	77-175-9 S	-/-	54,61	41,23	36,10	468,33	15140,90	32,30	0,18	1,03	0,55	0,11	1,00	1,66	57,70	8,97	57,94	9,81	6,53	121,67	42,57	35,87	25,70	0,72
9	77-186-8 K	+/+	58,37	41,15	36,90	547,50	15924,90	29,10	0,17	1,10	0,57	0,10	0,95	1,80	65,55	11,98	64,83	12,84	7,32	121,67	44,47	29,03	20,67	0,72
	77-186-9 S	-/-	41,66	33,86	31,70	479,17	13143,80	29,30	0,17	0,94	0,51	0,12	0,85	1,45	56,80	7,87	55,40	9,60	6,49	123,00	42,50	31,67	23,43	0,66
10	77-216-6 K	+/+	64,56	45,68	38,00	555,00	17042,00	30,70	0,16	1,10	0,57	0,10	1,00	2,10	65,23	13,09	66,50	15,02	6,70	121,33	42,66	33,17	24,93	0,70
	77-216-9 S	-/-	45,89	33,20	31,50	490,83	14503,70	29,30	0,17	1,02	0,56	0,10	0,90	1,62	55,44	6,43	58,02	9,89	6,64	123,00	45,10	33,87	24,77	0,67
11	151-269-7 K	+/+	62,08	46,42	43,20	584,17	14551,90	24,80	0,12	1,19	0,53	0,08	0,79	1,60	73,88	19,61	67,62	17,95	6,28	118,00	43,06	34,67	22,60	0,65
	151-269-2 S	-/-	49,38	40,28	34,90	578,33	14178,30	25,20	0,13	0,94	0,55	0,09	0,76	1,47	61,68	12,43	59,51	12,40	6,36	118,33	41,27	29,80	22,73	0,66
12	151-269-5 K	+/+	64,79	49,96	42,00	450,83	15392,00	33,70	0,12	1,28	0,64	0,09	0,90	1,79	72,00	19,37	68,02	19,54	6,14	117,00	41,67	36,73	25,00	0,64
	151-269-4 S	-/-	53,73	42,41	37,30	550,00	14265,30	26,00	0,13	1,12	0,59	0,09	0,82	1,58	62,03	12,92	59,30	12,08	5,91	117,67	42,00	35,03	25,47	0,67
13	151-270-4 K	+/+	63,08	47,52	44,40	545,00	14210,60	26,20	0,13	1,28	0,60	0,10	0,97	1,74	72,80	20,03	68,72	18,82	6,02	118,00	39,57	38,07	28,40	0,66
	151-270-3 S	-/-	50,01	42,06	38,90	467,50	12817,90	27,30	0,14	1,07	0,61	0,09	0,84	1,51	63,71	13,62	62,75	13,24	6,13	118,33	41,13	32,67	25,90	0,61
14	215-331-11 K	+/+	65,09	41,91	44,90	500,83	14505,80	28,80	0,16	1,49	0,73	0,11	1,14	2,07	79,37	20,08	73,15	19,70	6,43	113,67	45,97	44,80	29,83	0,72
	215-331-10 S	-/-	59,74	43,02	40,70	538,33	14570,40	27,10	0,17	1,26	0,74	0,14	0,94	1,88	67,28	14,23	64,55	14,39	6,51	116,00	44,37	41,30	27,53	0,70
15	215-381-5 K	+/+	58,25	42,39	44,60	474,17	13089,60	27,80	0,17	1,52	0,72	0,11	1,11	1,88	74,82	19,97	71,82	18,85	6,72	115,00	45,70	41,93	29,67	0,70
	215-381-9 S	-/-	54,45	37,24	39,80	518,33	13696,80	26,70	0,18	1,30	0,70	0,13	1,02	1,87	65,29	14,46	62,56	13,15	6,51	116,67	43,77	42,33	34,37	0,68
16	215-386-5 K	+/+	58,09	38,44	44,30	481,67	13134,30	27,90	0,16	1,48	0,73	0,10	1,10	1,87	74,71	20,09	72,30	18,03	6,31	115,33	45,03	38,97	25,23	0,68
	215-386-11 S	-/-	54,18	35,79	40,30	441,67	13421,80	30,40	0,16	1,27	0,72	0,11	1,02	1,78	66,22	14,73	66,23	14,77	6,22	117,33	44,67	43,07	28,03	0,66
18	215-424-8 K	+/+	62,60	40,55	44,60	477,50	14050,00	29,90	0,17	1,49	0,71	0,11	1,15	1,98	77,95	20,74	73,77	21,03	6,55	115,00	43,87	39,53	27,10	0,72
	215-424-7 S	-/-	52,53	39,85	40,10	540,00	13091,00	24,20	0,18	1,34	0,76	0,11	1,04	1,75	64,70	14,12	63,77	13,40	6,50	117,67	44,66	39,37	29,27	0,68
	media NIL		55,90	40,12	39,71	494,26	14128,08	28,79	0,17	1,26	0,64	0,11	1,03	1,79	69,01	14,78	66,88	14,74	6,67	119,08	42,87	37,47	26,72	0,69

Tabella 3: Dati fenotipici rilevati nella prova di campo dell'anno 2011 (LD_2011). Per ciascuna linea sono stati riportati i caratteri: resa in granella (GY), peso medio dei semi (TKW), peso medio della foglia rilevato ad antesi e maturità (DwL_1 e DwL_2), peso medio del culmo rilevato ad antesi e maturità (DwStem_1 e DwStem_2), peso medio della spiga rilevato ad antesi e maturità (DwSpike_1 e DwSpike_2), altezza della pianta rilevata ad antesi e maturità (PH_1 e PH_2), lunghezza del peduncolo rilevata ad antesi e maturità (PedL_1 e PedL_2), lunghezza della spiga rilevata a maturità (SL), indice di verde rilevato prima dell'antesi, ad antesi e riempimento granella (SPAD_1, SPAD_2 e SPAD_3), data di fioritura (HD), indice di biomassa verde rilevato prima dell'antesi, ad antesi e riempimento granella (NDVI). Per ciascun carattere è stata riportata la media generale.

			GY	TKW	DwL_1	DwStem_1	DwSpike_1	DwL_2	DwStem_2	DwSpike_2	PH_1	PedL_1	PH_2	PedL_2	SL_2	HD	SPAD_1	SPAD_2	NDVI_1	NDVI_2	NDVI_3
Coppie NIL	allele	q ha ⁻¹	g	g	g	g	g	g	g	g	cm	cm	cm	cm	cm	g	unità	unità	unità	unità	unità
1	23-23-3 K	+/+	49,75	47,77	0,14	2,00	0,92	0,12	3,38	1,34	79,57	22,05	80,67	20,89	8,00	124,00	49,00	50,93	0,48	0,63	0,65
	23-23-4 S	-/-	46,83	47,11	0,17	1,82	1,01	0,13	3,58	1,29	71,93	15,60	74,11	14,89	7,78	125,00	46,83	43,03	0,52	0,64	0,53
2	23-53-1 K	+/+	52,61	49,86	0,14	2,03	0,96	0,11	3,38	1,53	80,89	22,26	80,67	22,56	6,89	125,33	49,47	53,60	0,55	0,69	0,60
	23-53-2 S	-/-	54,22	43,92	0,16	1,51	0,99	0,12	3,08	1,23	67,30	14,69	72,44	15,67	6,67	124,67	48,60	42,93	0,54	0,69	0,55
3	23-84-8 K	+/+	53,68	47,60	0,16	2,09	0,96	0,13	3,69	1,63	82,05	22,42	81,44	21,78	7,11	125,00	51,60	52,37	0,61	0,68	0,48
	23-84-3 S	-/-	54,92	45,25	0,15	1,78	0,90	0,13	3,55	1,38	73,85	16,51	74,33	17,11	7,22	126,33	47,53	48,80	0,57	0,68	0,69
4	23-88-5 K	+/+	39,67	48,52	0,14	2,15	1,02	0,12	3,71	1,62	80,88	22,35	80,11	22,00	7,44	124,00	50,60	51,70	0,48	0,60	0,57
	23-88-9 S	-/-	52,62	44,01	0,16	1,78	1,01	0,11	3,01	1,22	73,79	17,07	74,22	16,89	7,11	126,00	49,67	46,27	0,50	0,64	0,57
5	77-157-3 K	+/+	77,94	48,68	0,14	1,77	0,82	0,13	3,93	1,30	71,55	16,89	72,00	15,33	7,89	129,33	44,07	46,07	0,54	0,72	0,68
	77-157-4 S	-/-	63,66	41,43	0,16	1,23	0,68	0,13	3,30	1,05	58,59	10,17	61,44	9,33	7,00	129,67	41,60	36,67	0,52	0,71	0,64
6	77-157-14 K	+/+	78,46	48,41	0,13	1,80	0,86	0,13	3,95	1,38	71,46	16,26	73,67	16,78	7,00	128,67	45,07	45,90	0,59	0,77	0,72
	77-157-15 S	-/-	58,75	38,19	0,18	1,32	0,79	0,12	3,00	1,02	58,55	9,01	62,67	9,67	7,44	130,00	41,43	32,93	0,51	0,64	0,37
7	77-159-2 K	+/+	70,46	48,79	0,15	1,83	0,88	0,14	4,36	1,50	70,24	16,71	71,11	16,89	6,89	129,00	43,73	46,07	0,48	0,66	0,60
	77-159-3 S	-/-	65,11	42,40	0,18	1,32	0,77	0,12	3,00	0,94	60,09	11,03	62,67	10,78	6,89	130,00	41,10	38,67	0,52	0,71	0,66
8	77-175-8 K	+/+	74,04	49,77	0,16	1,84	0,88	0,14	3,93	1,38	70,21	16,23	70,44	16,56	6,44	130,33	44,07	46,27	0,52	0,70	0,70
	77-175-9 S	-/-	57,08	43,55	0,18	1,42	0,79	0,13	3,50	1,15	60,97	10,59	63,33	10,44	7,00	130,33	40,80	34,83	0,43	0,60	0,54
9	77-186-8 K	+/+	67,93	49,15	0,16	1,71	0,83	0,16	4,68	1,48	70,50	17,15	72,33	15,78	7,56	129,33	46,00	47,20	0,49	0,68	0,70
	77-186-9 S	-/-	48,67	38,12	0,22	1,37	0,88	0,14	3,24	1,05	59,31	9,94	60,89	10,44	7,00	130,67	42,70	35,90	0,46	0,64	0,55
10	77-216-6 K	+/+	77,60	48,72	0,14	1,82	0,84	0,12	3,85	1,31	71,03	16,60	73,67	16,78	6,67	129,33	43,73	44,70	0,52	0,69	0,65
	77-216-9 S	-/-	57,72	39,53	0,16	1,22	0,71	0,11	2,85	0,91	60,36	10,53	63,00	10,44	6,78	130,67	40,00	35,13	0,55	0,70	0,60
11	151-269-7 K	+/+	54,69	47,54	0,12	2,00	1,16	0,08	3,58	1,25	71,90	18,09	71,00	18,00	7,11	123,33	49,80	51,20	0,35	0,50	0,42
	151-269-2 S	-/-	50,52	41,88	0,11	1,33	0,95	0,09	3,01	0,93	61,97	12,22	62,56	12,33	6,67	124,67	45,07	36,27	0,40	0,57	0,52
12	151-269-5 K	+/+	67,32	48,14	0,10	1,58	0,89	0,09	3,31	1,13	70,41	18,02	70,33	17,67	7,56	122,33	50,77	48,87	0,45	0,53	0,42
	151-269-4 S	-/-	54,45	43,12	0,13	1,36	0,96	0,09	2,87	0,92	61,12	12,52	62,56	12,44	7,44	124,00	46,77	37,63	0,39	0,59	0,50
13	151-270-4 K	+/+	63,79	48,56	0,10	1,69	0,96	0,07	2,91	1,07	71,77	18,35	72,78	17,67	6,89	122,00	49,10	48,50	0,53	0,64	0,48
	151-270-3 S	-/-	41,80	41,56	0,13	1,34	0,95	0,08	2,88	0,99	64,17	12,28	67,56	16,11	6,78	125,00	45,07	33,63	0,39	0,53	0,45
14	215-331-11 K	+/+	51,80	50,43	0,15	2,05	1,05	0,12	3,58	1,33	73,33	19,89	73,33	17,44	7,22	123,67	51,20	54,47	0,40	0,62	0,44
	215-331-10 S	-/-	54,97	47,26	0,17	1,35	0,87	0,12	2,95	0,99	62,22	14,34	63,33	12,56	7,22	125,67	47,80	46,60	0,48	0,66	0,51
15	215-381-5 K	+/+	63,20	50,50	0,15	1,96	0,93	0,12	3,57	1,34	73,95	19,04	74,89	19,56	6,67	123,67	50,33	54,33	0,47	0,65	0,65
	215-381-9 S	-/-	54,00	42,27	0,18	1,44	0,92	0,12	2,97	1,03	61,09	14,18	63,00	13,56	6,44	126,00	48,33	47,20	0,47	0,62	0,53
16	215-386-5 K	+/+	53,12	52,05	0,15	2,02	1,00	0,11	3,45	1,32	72,78	18,88	73,33	19,33	6,11	124,00	49,93	54,10	0,37	0,58	0,59
	215-386-11 S	-/-	46,62	46,82	0,18	1,51	0,91	0,12	3,29	1,06	61,78	13,98	64,67	15,67	6,56	125,67	47,33	46,13	0,33	0,52	0,49
17	215-386-6 K	+/+	66,80	51,56	0,14	1,92	0,97	0,11	3,72	1,36	72,37	19,46	72,56	19,00	6,56	124,33	50,23	54,60	0,40	0,56	0,51
	215-386-7 S	-/-	49,87	48,83	0,18	1,63	0,97	0,12	3,35	1,07	65,12	14,43	66,89	13,89	7,44	125,67	47,73	48,93	0,37	0,60	0,49
18	215-424-8 K	+/+	59,81	50,80	0,16	2,02	1,04	0,11	3,46	1,30	72,83	19,30	74,44	19,56	6,56	123,67	52,33	54,83	0,49	0,65	0,55
	215-424-7 S	-/-	65,85	45,40	0,18	1,38	0,85	0,11	2,79	0,90	61,86	14,05	63,44	14,22	7,11	125,33	47,70	45,20	0,52	0,75	0,68
	media NIL		58,34	46,32	0,15	1,68	0,91	0,12	3,41	1,21	68,66	15,92	70,05	15,83	7,03	126,30	46,86	45,62	0,48	0,64	0,56

Tabella 4: Differenze tra le linee +/+ e linee -/- per i dati del 2010. Nella tabella vengono riportati tutti i caratteri rilevati sia nella prova a bassa densità di semina sia nella prova ad alta densità di semina. Per ciascun carattere sono stati riportati i dati medi delle linee +/+, i dati medi delle linee -/-, i valore fenotipici delle differenze tra linee, valori F e valori P. Con n.s. vengono indicati i valori non significativi, *** significatività al 1% e ** significatività al 5%.

	GY	HI	TKW	FT	Kpsm	FTpsm	DWL_1	DwStem_1	DWSpike_1	DWL_2	DwStem_2	DWSpike_2	PH_1	PedL_1	PH_2	PedL_2	SL	HD	SPAD_1	SPAD_2	SPAD_3	NDVI	
	q ha ⁻¹	%	g	n. mq ⁻¹	n. mq ⁻¹	n. mq ⁻¹	g	g	g	g	g	g	cm	cm	cm	cm	cm	g	unità	unità	unità	unità	
Bassa Densità	NIL (+/+)	60,2	42,7	41,7	460,4	14538,2	32,2	0,18	1,36	0,68	0,11	1,11	2,10	70,8	16,2	68,8	16,6	6,6	118,9	45,7	39,9	30,0	0,7
	NIL (-/-)	49,7	39,0	37,1	464,1	13497,0	29,9	0,19	1,20	0,68	0,12	0,97	1,71	62,1	10,9	59,5	11,0	6,7	120,0	45,9	40,1	30,7	0,7
	NIL (+/+) - NIL (-/-)	10,5	3,7	4,6	-3,7	1041,2	2,3	-0,01	0,16	0,00	-0,01	0,14	0,38	8,7	5,4	9,4	5,6	-0,1	-1,1	-0,2	-0,2	-0,7	0,0
	Valore di F	72,4	18,3	153,7	288,4	4,2	12,2	10,57	71,22	0,02	7,37	55,96	126,60	596,2	831,7	577,4	637,0	4,6	41,3	0,4	0,1	1,2	0,0
	P	***	***	***	n.s.	***	**	***	***	n.s.	***	***	***	***	***	***	***	**	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Alta Densità	NIL (+/+)	62,2	42,6	42,2	500,0	14868,8	29,9	0,16	1,33	0,64	0,11	1,07	1,91	73,6	17,7	70,9	17,4	6,7	118,5	43,0	37,8	26,5	0,7
	NIL (-/-)	50,1	37,8	37,2	494,0	13495,3	27,7	0,17	1,18	0,64	0,11	0,96	1,66	64,4	12,1	62,9	12,3	6,6	119,6	42,8	36,6	26,6	0,7
	NIL (+/+) - NIL (-/-)	12,2	4,8	5,0	5,9	1373,5	2,2	-0,01	0,16	0,01	0,00	0,11	0,25	9,2	5,7	7,9	5,1	0,2	-1,1	0,2	1,2	-0,1	0,0
	Valore di F	77,0	26,2	128,4	0,2	16,5	7,2	3,90	52,00	0,57	1,68	36,18	32,87	533,6	462,6	282,3	283,6	4,7	36,8	0,3	2,5	0,0	7,7
	P	***	***	***	n.s.	***	**	n.s.	***	n.s.	n.s.	***	***	***	***	***	***	**	***	n.s.	n.s.	n.s.	***

Tabella 5: Differenze tra le linee +/+ e linee -/- per i dati del 2011. Nella tabella vengono riportati tutti i caratteri rilevati sia nella prova a bassa densità di semina sia nella prova ad alta densità di semina. Per ciascun carattere sono stati riportati i dati medi delle linee +/+, i dati medi delle linee -/-, i valore fenotipici delle differenze tra linee, valori F e valori P. Con n.s. vengono indicati i valori non significativi, *** significatività al 1% e ** significatività al 5%.

	GY	TKW	DWL_1	Dwstem_1	DWL_1	DwStem_1	DWSpike_1	DWL_2	DwStem_2	DWSpike_2	PH_2	PedL_2	SL	HD	SPAD_1	SPAD_2	NDVI_1	NDVI_2	NDVI_3
	q ha ⁻¹	g	g	g	g	g	g	g	g	g	cm	cm	cm	g	unità	unità	unità	unità	unità
NIL (+/+)	62,09	59,22	0,14	1,89	0,94	0,11	1,35	3,67	73,66	18,85	74,26	18,52	7,05	125,46	48,44	50,22	0,48	0,64	0,58
NIL (-/-)	54,25	53,23	0,16	1,44	0,88	0,11	1,05	3,10	63,50	12,98	65,74	13,17	7,01	126,84	45,19	40,47	0,46	0,64	0,54
NIL (+/+) - NIL (-/-)	7,84	5,99	-0,02	0,45	0,06	0,00	0,30	0,58	10,15	5,86	8,52	5,35	0,04	-1,39	3,24	9,75	0,02	0,00	0,03
Valore di F	22,89	289,17	44,95	318,88	15,09	0,03	258,71	103,23	713,24	1401,40	471,31	390,64	0,05	63,60	63,07	383,29	1,50	0,02	3,60
P	***	***	***	***	***	n.s.	***	***	***	***	***	***	n.s.	***	***	***	n.s.	n.s.	n.s.

CAPITOLO V

MAPPAGGIO FINE DEL QTL PER LA RESA IN GRANELLA SUL CROMOSOMA 3B

1. MATERIALI E METODI

1.1. Materiale vegetale

Tre coppie di linee quasi isogeniche (NIL), identificate dai codici numerici 23-24, 29-30 e 34-42, sono state incrociate per lo sviluppo di una popolazione sufficientemente ampia per consentire un'elevata risoluzione genetica alla regione di *Qyld.idw-3B*.

Tra le 18 coppie isogeniche originariamente sviluppate, per l'incrocio ne sono state selezionate tre specifiche, in quanto caratterizzate da una composizione allelica contrastante per tutta la regione del *Qyld.idw-3B* delimitata dai marcatori *gwm389* e *gwm493*. Più in dettaglio:

- le linee 24, 30 e 42 sono portatrici dell'allele *plus* (+/+) ereditato dal parentale Kofa che determina l'incremento dei caratteri;
- le linee 23, 29 e 34 sono portatrici dell'allele *minus* (-/-) ereditato dal parentale Svevo che contribuisce al decremento dei caratteri.

La coppia 23-24 deriva dalla famiglia eterogenea (HIF) identificata con il codice 151-269 sviluppata dalla linea RIL151 della popolazione di mappa Kofa × Svevo mentre le coppie 29-30 e 34-42 derivano rispettivamente dalle famiglie eterogenee 215-331 e 215-386 sviluppate dalla linea RIL215 della popolazione Kofa × Svevo.

Dall'incrocio delle tre coppie NIL è stata sviluppata un'ampia popolazione segregante (7.500 piante F₂) per *Qyld.idw-3B* in collaborazione con la ditta Società Produttori Sementi di Bologna (PSB: Argelato, BO, Italia). Nel novembre 2009 i 7.500 semi F₂ sono stati seminati presso l'Azienda Sperimentale di Cadriano dell'Università di Bologna; per l'analisi molecolare si è proceduto a prelevare un campione fogliare da 4.282 piante F₂. Un saggio PCR per i due marcatori fiancheggianti la regione di *Qyld.idw-3B* (*cft5055* e *gwm493*) ha permesso di identificare un totale di 479 piante con eventi di ricombinazione. Da queste piante è stato possibile ottenere seme F_{2,3} poi utilizzato per identificare ricombinanti omozigoti. A tal fine, per 270 linee ricombinanti, 8-12 semi F_{2,3} sono stati analizzati con i due marcatori fiancheggianti la regione del QTL. I semi sono stati tagliati in due parti di cui una contenente l'embrione. Tutti i mezzi-semi senza embrione sono stati saggiati con i marcatori molecolari *cft5055* e *gwm493*; solo per i semi che sono risultati essere ricombinanti in omozigosi per la regione del QTL i corrispondenti semi con embrione sono stati seminati in vaso e fatti crescere in serra presso la ditta Produttori Sementi di Bologna.

Sfortunatamente la scarsa qualità dei semi e la bassa resa di alcune linee F_{2,3} hanno consentito di ottenere seme F_{3,4} solo per 233 linee segmentali ricombinanti in omozigosi per i due marcatori delimitanti il *Qyld.idw-3B*.

1.2. Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA è stata effettuata sui 4.282 campioni fogliari e su 3.000 mezzi-semi F_{2,3} utilizzando una procedura standard valida per entrambi i tessuti con buoni risultati sulla resa. L'estrazione da tessuto fogliare è stata effettuata su materiale precedentemente liofilizzato e poi macinato con il Tissue Lyser (Quiagen), mentre i semi sono stati schiacciati con una pinza meccanica e successivamente macinati. Lo sfarinato ottenuto in seguito a macinazione è stato poi utilizzato per estrarre il DNA seguendo il protocollo di estrazione tramite C-TAB (tampone di estrazione: bromuro di esadeciltrimetilammonio, C₁₆H₃₃N(CH₃)Br), cloroformio e flocculazione in isopropanolo, come indicato in Saghai-Marooft *et al.* (1984). Il DNA precipitato, dopo depurazione in etanolo 70% per una notte, è stato risospeso in 1X-TE pH 8 (10mM TrisHCl 8 + 1,0 mM EDTA pH 8) e quantificato visivamente attraverso elettroforesi in gel di agarosio tramite comparazione con uno standard di λ -DNA a quantità nota. Il DNA è stato quindi diluito ad una concentrazione finale pari a 20 ng/ μ l e conservato a -20 °C fino al momento delle analisi.

1.3. Caratterizzazione molecolare

Per il mappaggio fine della regione *Qyld.idw-3B* le 233 linee segmentali ottenute dall'incrocio delle coppie NIL sono state utilizzate per la genotipizzazione.

Venti marcatori molecolari, precedentemente mappati sulle 249 RIL Kofa \times Svevo, sono stati saggiati.

In dettaglio:

- tre marcatori SSR (*barc133*, *cs-ssr7* e *gwm493*) sono marcatori genomici derivati da informazioni pubbliche;
- un marcatore ISBP (*cfp60*) e 3 marcatori SSR (*cf15034*, *cfb6148* e *cfb6032*) derivano dalle informazioni di sequenza delle regioni terminali dei cloni BAC (BES: BAC-end sequence) della mappa fisica di Chinese Spring;
- tredici marcatori SSR derivano dalle informazioni di sequenza ottenute dall'intero sequenziamento dei cloni BAC della mappa fisica di Chinese Spring.

L'amplificazione è stata effettuata seguendo le condizioni presentate nel capitolo I. Per l'analisi è stata utilizzata elettroforesi verticale o orizzontale a seconda delle caratteristiche del profilo del marcatore molecolare.

Il marcatore *cfp60* è stato saggiato attraverso la metodologia HRM (High Resolution Melt) con lo strumento 7.500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystem) effettuando una reazione di amplificazione in 10 μ l seguendo le condizioni di: 1X della miscela di reazione MeltDoctor (Applied Biosystem) e 20 ng di DNA.

Per il mappaggio fine sono stati sviluppati altri 13 marcatori molecolari, identificati con la sigla UBW3B, utilizzando le informazioni di sequenza di geni annotati nel contig 954 della mappa fisica di frumento tenero (tabella 1).

Per discriminare le due forme omeologhe del gene sono stati adottati due diversi approcci descritti in dettaglio di seguito.

1.3.1. Clonaggio degli ampliconi

Per 9 geni sono state disegnate coppie di primer in regioni conservate (esoni) con l'obiettivo di amplificare un introne o più introni a secondo delle loro dimensioni.

Coppie di primer sono state disegnate anche sulle regioni 3'UTR e 5'UTR considerando circa 2 kb a monte e a valle del gene ed escludendo le regioni ripetute identificate tramite il programma TREP v.10 (<http://wheat.pw.usda.gov/ITMI/Repeats/blastrepeats3.html>).

I primer sono stati disegnati con l'utilizzo del software Primer3 v.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) sulla base dei seguenti parametri: dimensioni primer da 22 a 24 bp, dimensioni amplificate da 1.000-1.300 bp, temperatura di melting (T_m) da 62 a 64 °C, GC clamp 2 e percentuale di GC tra 50 e 60%.

Sulle coppie di primer ottenute è stato effettuato un pre-screening amplificando le due linee parentali Kofa e Svevo e i nulli-tetrasomici del 3A (N3AT3D), 3B (3BT3D) e 3D (N3DT3B) per valutare la qualità e la specificità degli amplificati. La reazione di amplificazione è stata effettuata in volumi finali di 20 µl in termociclatori per piastre da 96 pozzetti Perkin-Elmer 9600 (Norwalk, CT) seguendo le seguenti condizioni:

- 1X di buffer;
- 2 mM di MgCl₂;
- 0,2 mM di dNTPs;
- 0,6 µM di primer forward e reverse;
- 0,5 U di Taq Polimerasi (GoTaq, Promega);
- 100 ng di DNA.

Il programma di amplificazione consiste in:

- denaturazione iniziale del DNA a 95 °C per 5 minuti;
- primi 35 cicli:
 - denaturazione del DNA a 95 °C per 30 secondi;
 - appaiamento dei primer alla temperatura caratteristica della coppia dei primer per 30 secondi;
 - estensione a 72 °C per 45 secondi;
- completa estensione dei prodotti di PCR a 72 °C per 7 minuti.

Gli amplificati sono stati separati su gel di agarosio al 1,5% in tampone TBE 0,5X con l'aggiunta di bromuro di etidio (2 µl/100 µl); un volume di 10-12 µl di ciascun campione (a cui è stato precedentemente aggiunto blu di bromofenolo) è stato separato su gel a 200 Volt per 30 minuti. I gel sono stati infine fotografati sotto luce UV a 312 nm.

Gli ampliconi che sono risultati essere caratterizzati da una banda singola, sono stati clonati per entrambe le linee parentali Kofa e Svevo con lo scopo d'identificare le due forme omeologhe del gene, appartenenti al genoma A e al genoma B. La metodologia utilizzata per il clonaggio è la stessa descritta nel capitolo I. Per ciascun parentale sono state purificate (ZYMO-DNA Clean-up Kit) dalle 8 alle 12 colonie rappresentative dell'amplificato d'interesse; successivamente il materiale così ottenuto è stato sequenziato presso la ditta Macrogen (Repubblica di Corea). Le sequenze sono state analizzate con il software ChromasPro v.1.5 (Technelysium Pty Ltd) ed il loro allineamento è stato valutato mediante il programma DNAMAN (Lynnon Corporation) per identificare differenze tra i due genomi A e B, utilizzando come riferimento del genoma B la sequenza 3B specifica del gene annotato in Chinese Spring ed identificare variazioni tra le due linee parentali per il solo genoma B.

1.3.2. Utilizzazione delle sequenze 454 disponibili pubblicamente per discriminare i due geni omeologhi

Per 4 geni la sequenza della regione codificata specifica del 3B di Chinese Spring è stata allineata in "CerealsDB" (http://www.cerealsdb.uk.net/CerealsDB/Documents/DOC_search_reads.php) per identificare sequenze di 454 simili al gene di riferimento utilizzando un valore di "cutoff" equivalente a e^{-5} . Tutti i "match" ottenuti sono stati assemblati in contig attraverso il programma CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>). I contig così ottenuti sono stati utilizzati per costruire un albero filogenetico in DNAMAN utilizzando l'algoritmo della maximum likelihood e un valore di bootstrap pari a 1.000 con l'obiettivo di discriminare la distanza significativa tra i contig. I contig raggruppati in uno stesso cluster insieme al gene di riferimento di Chinese Spring sono stati considerati specifici del genoma B, i restanti cluster sono stati considerati geni appartenenti al genoma A o D di *T. aestivum* o diversi dal gene preso in esame; i contig risultati troppo diversi sono stati eliminati. Dall'allineamento della sequenza del gene di riferimento di Chinese Spring (specifico del 3B) con i diversi contig selezionati è stato possibile discriminare le differenze tra genomi a livello di indel e SNP sui quali sono stati disegnati primer specifici del solo genoma B. I primer disegnati in tali regioni sono stati poi utilizzati per identificare polimorfismi tra le due linee parentali Kofa e Svevo. L'effettiva specificità genomica è stata poi anche controllata dall'amplificazione dei nulli-tetrasomici. I marcatori risultati polimorfici e genoma specifici sono stati poi utilizzati per amplificare sia le coppie NIL utilizzate per l'incrocio, sia la popolazione di linee segmentali. Le condizioni di amplificazione dei marcatori sviluppati sono le stesse presentate precedentemente.

1.4. Allestimento della prova sperimentale di campo e rilievi fenotipici

Le linee segmentali della nuova popolazione segregante per *Qyld.idw-3B* sono state valutate fenotipicamente in due prove sperimentali con randomizzazione completa, differenziate per la data di

semina (prima semina indicata con 1s e seconda semina indicata con 2s) e per il numero e tipo di linee valutate.

La prova 1s è stata seminata il 3 marzo mentre la prova 2s è stata seminata 2 settimane dopo, entrambe presso l'Azienda Sperimentale di Cadriano dell'Università di Bologna.

Per la prova 1s sono state valutate un totale di 196 linee segmentali, mentre per la prova 2s sono state analizzate 121 linee segmentali. Ottantacinque linee sono state utilizzate in entrambe le prove in quanto derivate da una stessa famiglia, mentre le restanti sono linee distinte.

La semina tardiva delle linee segmentali e l'allestimento delle due diverse prove sono state scelte condizionate dai tempi tecnici di sviluppo del materiale vegetale presso la ditta Produttori Sementi di Bologna: il seme in generazione F_4 che è stato utilizzato per le due prove sperimentali ci è stato fornito non prima di marzo ed in due momenti distinti. Tuttavia operando in questo modo è stato possibile valutare l'effetto del QTL anche in condizioni di semina tardiva considerando due condizioni di crescita diverse.

I rilievi fenotipici sono stati effettuati allo stadio di maturità per i seguenti caratteri:

- altezza della pianta (PH: Plant Height), espressa in cm e misurata come distanza dal terreno dell'apice della spiga (escluse le reste);
- lunghezza del peduncolo (PedL: Peduncle Length) espressa in cm e misurata come distanza dalla foglia bandiera alla base della spiga.

I dati presentati per questi caratteri fanno riferimento al valore medio di otto culmi principali.

1.5. Studio di segregazione nella regione del QTL

La valutazione dei profili ottenuti per gli SSR, ISBP e UBW3B ha permesso di ottenere una matrice (A, B) dove, come per la popolazione di mappa Kofa \times Svevo, A e B corrispondono all'allele Kofa (+/+) e all'allele Svevo (-/-) per il QTL sul 3BS, rispettivamente.

La distanza genetica tra i marcatori *cft5055* e *gwm493* dei genotipi F_2 è stata calcolata in base alle frequenze osservate (Allard, 1957) considerando la funzione di mappa di Haldane (1919):

$$\omega = -1/2 \ln(1-2r)$$

dove r è la frequenza di ricombinazione data da:

$$r = n. \text{ ricombinanti} / n. \text{ individui totali}$$

La distanza relativa in cM tra i marcatori aggiunti è stata calcolata come proporzione tra il numero di ricombinazioni ottenute tra i due marcatori e il numero di ricombinazioni totali ottenute tra le 233 linee segmentali saggiate, considerando come distanza tra *cft5055* e *gwm493* quella stimata dai genotipi F_2 .

Come ordine dei marcatori è stato utilizzato quello ottenuto dalla mappa genetica del 3BS delle 249 RIL Kofa \times Svevo.

1.6. Analisi statistica dei dati fenotipici

I valori fenotipici ricavati da entrambe le prove sperimentali sono stati utilizzati per l'analisi della varianza (ANOVA: ANalysis Of VAriance) condotta sui singoli valori delle unità sperimentali secondo uno schema di randomizzazione completa. L'analisi è stata effettuata attraverso l'utilizzo del programma Minitab® v.16 (Minitab Ltd, Coventry, Inghilterra; Ryan *et al.*, 1985)

Con lo stesso programma è stata effettuata un'analisi di correlazione tra i due caratteri fenotipici registrati nelle due prove sperimentali tramite il calcolo del coefficiente di correlazione di Pearson (r). Il coefficiente r è stato calcolato anche per verificare la correlazione tra le due diverse prove sperimentali.

Infine, per entrambe le prove, tutte le linee segmentali sono state suddivise in 27 gruppi distinti in base alla loro composizione aploipica. Sui dati medi fenotipici di ciascun gruppo aploipico è stata effettuata l'analisi della varianza per stimare le differenze significative tra gruppi.

I valori di ereditabilità (h^2) su base media sono stati calcolati seguendo la formula:

$$h^2 = \sigma_g / \sigma_p$$

dove σ_g è la varianza genotipica e la σ_p è la varianza fenotipica stimata come $\sigma_g + \sigma_{er}$.

1.7. Analisi QTL

L'analisi QTL è stata condotta sui caratteri altezza della pianta (PH) e lunghezza del peduncolo (PedL) rilevati nelle due prove sperimentali di campo allestite nell'anno 2011 (1s e 2s).

Una prima analisi QTL è stata effettuata applicando l'ANOVA per stimare l'associazione tra i singoli marcatori e i valori fenotipici.

Per l'analisi solo il marcatore *ubw3B.55* è stato considerato come rappresentativo della regione co-segregante.

L'analisi della varianza è stata effettuata utilizzando il software Minitab v.16 ed i valori di F (test di Fisher) sono stati calcolati sia per intervalli di marcatori ("sliding windows") che per ogni singolo locus mappato nella regione del QTL. Per dichiarare un marcatore strettamente associato al QTL si è scelta una soglia di $P = 0,0001$.

Per l'analisi delle *sliding windows* sono stati analizzati intervalli di due marcatori, permettendo di stimare la differenza fenotipica per quattro classi genotipiche caratterizzanti l'intervallo identificate come aa (+/+), bb (-/-), ab (+/-) e ba (-/+).

Invece, per quanto riguarda l'analisi della varianza per i singoli marcatori, la differenza fenotipica è stata stimata tra tutte le linee che presentavano l'allele a (+/+) e quelle che presentavano l'allele b (-/-) per quel dato locus.

Per ogni singolo locus è stato calcolato l'effetto additivo (a) associato al carattere definito come la differenza delle medie delle linee con l'allele Svevo (bb) e quelle con l'allele Kofa (aa) ($a = \frac{1}{2} (bb - aa)$).

In base ai dati ottenuti dall'analisi della varianza sono stati calcolati i valori di R^2 .

L'analisi QTL è stata anche effettuata utilizzando il metodo di mappatura a singolo intervallo ("single marker analysis") tramite il programma Windows QTL-Cartographer v. 2.5. La mappatura a singolo marcatore si basa su un test statistico di regressione lineare utilizzando il rapporto di likelihood che permette di ottenere informazioni più precise riguardanti un'associazione significativa tra marcatore e carattere. Il profilo LOD è stato tracciato per ciascun carattere a partire dai valori ottenuti dall'analisi di regressione.

Per meglio caratterizzare la posizione del QTL è stata effettuata un'ulteriore analisi statistica tra i 19 gruppi aplotipici aventi la ricombinazione nell'intervallo *cfb6011-cfb6016* (marcatori che delimitano la regione del contig 954 nella mappa genetica) e i due gruppi aplotipici di controllo (+/+) e (-/-) che non presentano nessuna ricombinazione. Per effettuare l'analisi statistica si è utilizzato il test di Dunnett calcolato come:

$$Q \cdot \sqrt{\sigma_E^2 \cdot (1/N_c + 1/N_i)}$$

dove il valore Q è determinato da numero dei campioni messi a confronto e dal grado di libertà dell'errore, σ_E^2 è la varianza dell'errore mentre N_c e N_i corrispondono rispettivamente a numero di repliche per trattamenti e per controlli. Tramite questa statistica è stato possibile stimare la differenza significativa dei 19 diversi gruppi rispetto ai due gruppi aplotipici di controllo. La classificazione dei 19 gruppi aplotipici ha permesso di stimare la posizione del QTL nel modo seguente:

- a ciascun gruppo risultato essere significativamente diverso dall'aplotipo di controllo (-/-) e allo stesso tempo non significativamente diverso dall'aplotipo di contrella (+/+) è stato assegnato il valore (+/+),
- a ciascun gruppo aplotipico risultato essere significativamente diverso dall'aplotipo di controllo (+/+) e allo stesso tempo non significativamente diverso dall'aplotipo di contrella (-/-) è stato assegnato il valore (-/-).

2. RISULTATI

2.1. Identificazione degli eventi di ricombinazione per la regione di *Qyld.idw-3B*

Per aumentare la risoluzione di mappa nella regione sede di *Qyld.idw-3B* ed identificare nuovi eventi di ricombinazione è stata valutata una popolazione ampia di 4.282 piante in generazione F₂, sviluppata dall'incrocio di tre coppie NIL. A tal fine sono stati utilizzati i marcatori SSR *cft5055* e *gwm493*, che nella mappa genetica della popolazione RIL Kofa × Svevo delimitavano la regione del QTL in un intervallo di 7 cM.

Dall'analisi delle piante F₂ sono stati identificati 479 eventi di ricombinazione nella regione di interesse, corrispondenti all'11,2% del totale delle piante analizzate; tra questi solo l'1% presenta una ricombinazione in omozigosi per entrambi i marcatori, mentre i restanti erano in eterozigosi per un marcatore ed in omozigosi per l'altro.

Grazie al calcolo della frequenza di ricombinazione tra i due marcatori codominanti *cft5055* e *gwm493* è stato possibile stimare una nuova distanza genetica di 6,48 (± 0,5) cM che si differenzia di pochi cM da quella stimata nella popolazione RIL.

L'analisi dei singoli semi F₃ ha permesso di identificare, da 1 a 4 eventi di ricombinazione all'interno di una stessa famiglia per ciascuna linea selezionata, e di ottenere un numero complessivo di 233 linee ricombinanti F_{4,5} in omozigosi per entrambi i marcatori e caratterizzate da eventi di ricombinazioni indipendenti. Queste linee segmentali sono state poi utilizzate per la valutazione genotipica e fenotipica.

2.2. Costruzione di una mappa ad alta risoluzione nella regione di *Qyld.idw-3B*

Un totale di 28 marcatori molecolari tra SSR, ISBP e UBW3B sono stati mappati nell'intervallo delimitato dai marcatori fiancheggianti la regione di *Qyld.idw-3B* (*cft5055* e *wms493*) (Figura 1).

Venti di questi marcatori (19 SSR e 1 ISBP) sono stati precedentemente saggiati e mappati nella mappa genetica del 3BS della popolazione RIL. Il 56% degli SSR risulta essere caratterizzato da un profilo dominante che conferma quanto osservato nella popolazione RIL. Per gran parte di questi marcatori (83%) l'allele risulta essere presente in Kofa ed assente in Svevo.

Dall'analisi dei 13 marcatori molecolari sviluppati sui geni annotati del contig 954 di Chinese Spring solo per 8 UBW3B è stato possibile identificare polimorfismi tra le due forme omeologhe del gene e le due linee parentali Kofa e Svevo. Tali polimorfismi sono stati confermati anche sulle tre coppie NIL utilizzate per l'incrocio e successivamente mappati, nell'intervallo delimitato dai marcatori *cfb6011* e *cfb6016*, sulla popolazione delle 233 linee isogeniche segmentali (Tabella 2).

Più in dettaglio per 4 marcatori mappati (*ubw3B.50*, *ubw3B.53*, *ubw3B.54* e *ubw3B.55*) i polimorfismi tra i due genomi (A e B) e polimorfismi varietali sono stati identificati attraverso il confronto e l'analisi delle

sequenze dei cloni ottenuti dalla trasformazione in *E. coli* competenti.

Le maggiori differenze osservate tra le due forme omeologhe sono dovute a variazioni puntiformi, con il risultato di circa 1 SNP ogni 80 bp identificati dall'analisi delle sequenze ottenute. Anche la presenza di indel è risultata essere frequente con differenze in lunghezza che vanno da 1 a 10 bp.

Per quanto riguarda i polimorfismi tra le due linee parentali sono stati identificati solo SNP a livello delle regioni introniche con una frequenza di circa 1/kb. Per questi marcatori molecolari è stato sviluppato un saggio ASO (Allelic Specific Oligonucleotide), con primer specifici per il genoma B e per i due alleli.

Per i due marcatori *ubw3B.51* e *ubw3B.52* è stato invece possibile identificare direttamente dei polimorfismi di presenza/assenza disegnando il primer reverse nella regione 3'UTR del gene, regione che è risultata essere non solo altamente specifica per il genoma ma anche specifica per il parentale Kofa. Infine per i marcatori *ubw3B.57* e *ubw3B.58* sono stati sviluppati primer genoma specifici identificando polimorfismi attraverso il confronto di contig ottenuti dall'assemblaggio dei "reads" di sequenze 454 pubblicamente disponibili.

In "CerealDB" è stato possibile identificare dai 300 ai 500 *reads* per ciascun gene. Assemblando tutti i *reads* con il programma CAP3 sono stati ottenuti un numero di contig variabile tra 8 e 24. Solo pochi di questi, in media 5, sono stati selezionati in quanto non troppo diversi dalla sequenza di riferimento del gene in esame specifica del cromosoma 3B di Chinese Spring, ed utilizzati per l'identificazione di indel o SNP presenti tra le due ipotetiche forme omeologhe del gene. Principalmente sono state identificate differenze a livello di SNP o piccole differenze in lunghezza di 3-4 bp. Primer sviluppati come specifici del genoma B per i marcatori *ubw3B.57* e *ubw3B.58* sono stati confermati dal controllo con i nulli-tetrasomici e sono stati poi mappati come presenza (per l'allele Kofa) e assenza (per l'allele Svevo). Anche dal saggio degli 8 marcatori UBW3B mappati nell'intervallo di *Qyld.idw-3B* il 50% di questi sono risultati essere dominanti ed, analogamente agli altri SSR, avere l'allele presente in Kofa ed assente in Svevo.

Con l'arricchimento della regione di *Qyld.idw-3B* è stato quindi possibile costruire una mappa ad alta risoluzione con una densità di marcatori di 0,36 cM.

Tra tutti i marcatori saggiati sono stati identificati 11 marcatori tra SSR e UBW3B che non risultano presentare alcuna ricombinazione e vengono localizzati a 4,27 cM; ad eccezione di *cfb6107* gli altri 10 marcatori risultano essere marcatori dominanti ed avere l'allele in Kofa (+/+) ma non in Svevo (-/-).

2.3. Integrazione della mappa genetica di *Qyld.idw-3B* di frumento duro con la mappa fisica del cromosoma 3B di frumento tenero

Tutti i marcatori molecolari mappati sulle linee segmentali risultano essere ancorati alla mappa fisica del 3B di Chinese Spring. Dall'analisi QTL della popolazione di mappa RIL Kofa × Svevo saturata con nuovi marcatori ai due QTL 3BS e 2BL per la resa in granella, è stato possibile identificare il picco di *Qyld.idw-*

3B in corrispondenza del contig 954 della mappa fisica del 3B di Chinese Spring. L'interesse è stato quello di mappare più marcatori possibili ancorati in tale regione per cercare di restringere il più possibile la posizione di *Qyld.idw-3B* ed ottenere una mappa ad alta risoluzione nella regione di interesse.

Sulle linee segmentali segreganti per *Qyld.idw-3B* sono stati mappati in totale 22 marcatori ancorati al contig 954. Questo ha permesso di definire una regione di 2,37 cM fiancheggiata dai marcatori *cfb6011-cfb6016* con una densità media di un marcatore ogni 0,24 cM (Figura 2). La regione delimitata dai marcatori *cfb6011-cfb6016* risulta coprire 2,6 Mb del contig954 che corrisponde all'83,9% della sua lunghezza completa. La regione priva di eventi di ricombinazione localizzata sul contig 954, risulta delimitare una regione nella mappa fisica di 595 kb fiancheggiata da *ubw3B.55* a *cfb6017*, all'interno della quale vi sono marcatori dominanti che delimitano una regione di 473 kb fiancheggiati da *ubw3B.55* e *ubw3B.58* (Figura 2). Dall'informazione della posizione dei marcatori sulla mappa fisica è stato possibile stimare un rapporto tra distanza fisica e molecolare di 1,31 cM/Mb (Figura 4).

2.4. Analisi statistica dei dati fenotipici

Dall'analisi dei dati fenotipici ottenuti dalle prove sperimentali della 1° semina (1s) e della 2° semina (2s) è stato possibile stimare una differenza altamente significativa tra le 196 linee appartenenti alla prova 1s e le 121 linee della prova 2s con valori di $P \leq 0,0001$ sia per il carattere altezza della pianta (PH) che per il carattere lunghezza del peduncolo (PedL).

Confrontando le 85 linee comuni analizzate in entrambe le prove è stato possibile osservare delle piccole differenze, i dati ottenuti dalla prova sperimentale 2s risultano avere valori fenotipici più bassi rispetto a quelli della 1s. Questo risultato era atteso, in quanto la semina tardiva della prova 2s ha comportato un minor sviluppo vegetativo delle piante rispetto a quelle della prova 1s. Nonostante tutto i valori di correlazione (r) tra i dati fenotipici delle due epoche di semina risultano essere altamente significativi con valori pari a 0,65 per PH e 0,68 per PedL (Tabella 3). Per quanto riguarda la correlazione tra PH e PedL, anche in questo caso i dati sono risultati essere altamente significativi ($P \leq 0,0001$), con valori di 0,72 per la prova 1s e 0,51 per la prova 2s (Tabella 3).

Analizzando la composizione aplotipica nella regione delimitata da *cft5055* e *gwm493* sede di *Qyld.idw-3B* è possibile suddividere le 233 linee in 27 gruppi aplotipici tutti caratterizzati da una diversa composizione aplotipica con l'evento di ricombinazione localizzato in diverse posizioni lungo tutta la regione di interesse. Dall'analisi ANOVA risulta che sia nella prova 1s che nella prova 2s la differenza fenotipica tra i diversi gruppi risulta essere altamente significativa ($P \leq 0,0001$) per entrambi i caratteri. Dai dati ottenuti dalla prova 1s si ricava che i valori fenotipici più bassi sia per PH che per PedL sono stati registrati per le linee appartenenti al gruppo aplotipico 27 con valori medi fenotipici rispettivamente di 58,9 e 9,2 cm. I valori più alti per PedL sono stati ottenuti per il gruppo aplotipico 2 con un valore medio fenotipico di 16, 2 cm, mentre per il carattere PH i valori più alti sono stati osservati nel gruppo 1

con un valore medio fenotipico di 70,9 cm, che comunque non si discosta molto dal valore medio ottenuto per il gruppo aplotipico 2 (70,3 cm) (Figura 4).

Per quanto riguarda invece i dati ottenuti dalla prova 2s, per entrambi i caratteri i valori fenotipici medi più alti sono stati osservati nel gruppo 9 con un valore di 68,3 cm per PH e 15,0 cm per PedL, mentre i valori fenotipici medi più bassi sono stati osservati nel gruppo aplotipico 13 con 50,5 cm per PH e 5,5 cm per PedL (Figura 4).

Un grafico dei soli valori PH e PedL rilevati nella prova 1s messo a confronto con la composizione aplotipica dei diversi gruppi è stato riportato nella figura 6. Dall'immagine è possibile osservare, soprattutto per PedL, che le linee 11-22 e 14-24 presentano differenze fenotipiche molto evidenti.

Per entrambi i caratteri sono stati calcolati valori medi di ereditabilità molto alti e pari a 0,86 per la prova 1s, mentre valori più bassi si sono registrati per la prova 2s (0,80 e 0,67 rispettivamente per PH e PedL).

2.5. Analisi QTL

2.5.1. Analisi della varianza per la mappatura del QTL in intervalli "sliding windows"

Dall'analisi ANOVA effettuata sulle *sliding windows* (intervalli tra 2 marcatori per tutta la regione di *Qyld.idw-3B*) è stato possibile osservare che per entrambi i caratteri ed entrambe le prove sperimentali tutti gli intervalli sono risultati essere altamente significativi con valori di P equivalenti a 0,0 ad eccezione degli intervalli tra i marcatori *cft5055-cft5034*, *cfb5034-barc133* e *barc133-cfb6011* che per la lunghezza del peduncolo nella prova 2s sono risultati avere dei livelli di significatività $\leq 0,01$ (tabella 4).

Analizzando i valori di F ottenuti dall'analisi della varianza per ciascuna *sliding windows*, risulta che i valori tendono ad aumentare dai marcatori *cft5055-cft5034* fino a raggiungere il picco più alto nella *sliding window* composta da *ubw3B.55-cfb6033* che risulta avere per l'altezza della pianta valori di F equivalenti a 248,42 e 65,52 mentre per la lunghezza del peduncolo valori di 306,73 e 31,44 rispettivamente per i dati ottenuti dalla prova 1s e 2s. Dopo il picco i valori di F tendono a diminuire come illustrato nella tabella 4.

Nella tabella 5a sono stati riportati i valori medi fenotipici delle quattro classi genotipiche analizzate, caratteristiche dell'intervallo e composte da "aa" (+/+), "bb" (-/-), "ab" (+/-) e "ba" (-/+) dove "a" corrisponde all'allele *plus* mentre "b" corrisponde all'allele *minus*. Dai dati fenotipici ottenuti dalla prova 1s è possibile osservare che per ciascuna *sliding windows* la classe genotipica composta dall'allele *plus* (+/+) risulta avere valori più alti rispetto alla classe genotipica composta dall'allele *minus* (-/-), ad eccezione dell'intervallo compreso tra *cft5055-cft5034* per il quale i valori registrati per la classe genotipica +/+ risultano essere più bassi rispetto a quelli della classe genotipica -/-.

Più interessante è osservare che le classi genotipiche ricombinanti composte dagli alleli +/- risultano avere valori fenotipici più bassi rispetto alle classi genotipiche composte dagli alleli -/+ per tutti gli intervalli considerati tra *cft5055* e *cfb6033*, a differenza dell'intervallo *cfb6033* e *gwm493* per il quale

invece è possibile osservare un'inversione di tendenza, ovvero che le classi genotipiche composte dall'allele +/- risultano avere valori più alti rispetto alle classi genotipiche composte dall'allele -/+. In base al risultato ottenuto dai dati statistici è possibile stimare con un'alta probabilità che i QTL *QPh.idw-3B* e *QPedL.idw-3B* sono posizionati prima dell'intervallo *cfb6033-cfb6022* e molto probabilmente in corrispondenza all'intervallo *ubw3B.55-cfb6033*.

Un risultato simile è stato ottenuto per i valori fenotipici medi della seconda semina (Tabella 5b).

2.5.2. Analisi della varianza per mappatura del QTL a singolo marcatore

I risultati ottenuti dall'analisi della varianza per i singoli marcatori sono molto simili a quelli ottenuti per l'analisi effettuata con le *sliding windows*. Anche in questo caso la maggior parte dei marcatori è risultata avere differenze fenotipiche altamente significative con $P = 0$ con l'eccezione di due marcatori (*cft5034* e *barc133*) nella prova 1s e tre marcatori (*cft5034*, *barc133* e *cfb6011*) nella prova 2s che sono risultati avere valori di $P \leq 0,01$ o non significativi (Tabella 6).

I valori F ottenuti dall'analisi della varianza sono stati riportati nella tabella 6 insieme a tutti i rispettivi valori di R^2 e dell'effetto additivo calcolato come $\frac{1}{2}(bb-aa)$. Come osservato precedentemente anche in questa analisi è possibile osservare un picco dei valori di F in corrispondenza di *ubw3B.55* posizionato a 4,27 cM e di *cfb6033* localizzato a 4,49 cM. Più in dettaglio:

- PedL (1s) per *ubw3B.55* presenta valori di F di 594,64, valori medi di R^2 di 58,42% e valori medi di effetto additivo di -2,10 cm;
- PH (1s) per *cfb6033* presenta valori di F di 488,05, valori medi di R^2 di 53,76% e valori medi di effetto additivo di -3,69;
- PedL (2s) per *cfb6033* presenta valori di F di 60,86, valori medi di R^2 di 22,7% e valori medi di effetto additivo di -1,23 cm;
- PH (2s) per *ubw3B.55* presenta valori di F di 128,12, valori medi di R^2 di 36,83% e valori medi di effetto additivo di -2,81 cm.

2.5.3. Analisi di regressione lineare per il mappatura a singolo marcatore

L'analisi QTL dei dati fenotipici medi di PH e PdL nelle due diverse prove sperimentali è stata effettuata anche con la metodologia di mappatura a marcatore singolo (Single Marker Analysis) attraverso il programma WinQTL.

Un test statistico di regressione lineare basato sul rapporto likelihood, molto più stringente di quello utilizzato nell'analisi della varianza con il software Minitab, ha permesso di confermare i dati ottenuti precedentemente per entrambe le prove sperimentali ed entrambi i caratteri. Per quanto riguarda la prova della 1s il picco del QTL per il carattere PH è stato identificato a 4,49 cM in corrispondenza del

marcatore *cfb6033* mentre il picco del QTL per il PedL a 4,27 cM in corrispondenza del marcatore *ubw3B.55* con valori di LOD rispettivamente di 46,96 e 57,23 e un valore di R^2 rispettivamente di 59,91 e 66,94% (figura 7 e tabella 7).

Per quanto riguarda i dati ottenuti dalla prova 2s i valori di LOD e di R^2 sono risultati essere più bassi rispetto a quelli della prova 1s, che conferma comunque quanto osservato nelle precedenti analisi. Il picco del QTL per il carattere PH e PedL è stato identificato in corrispondenza del marcatore *ubw3B.55* con un valore di LOD 10,2 e un R^2 del 25,28% per PedL mentre valori di LOD di 18,03 e valori R^2 del 40,22% per PH (figura 7 e tabella 7).

2.6. Classificazione dei valori fenotipici per il mappaggio del QTL

Data l'alta ereditabilità ottenuta per entrambi i caratteri si è cercato di mappare il QTL come un locus mendeliano. A questo scopo a 19 classi aplotipiche caratterizzate da eventi di ricombinazione tra *cfb6011* e *cfb6016* sono stati assegnati valori di aa (+/+) se caratterizzati da valori di altezza della pianta e lunghezza del peduncolo alti o bb (-/-) se caratterizzati invece da valori bassi per i due caratteri. La classificazione è stata effettuata stimando una differenza significativa dei diversi gruppi aplotipici ricombinanti rispetto ai gruppi aplotipici di controllo. I valori medi dei due gruppi aplotipici di controllo +/+ e -/- sono indicati nella figura 8 e per entrambi i caratteri (altezza della pianta e lunghezza del peduncolo) le linee con l'allele a (+/+), risultano avere valori significativamente più alti rispetto alle linee che invece presentano l'allele b (-/-).

Dall'analisi statistica effettuata attraverso il test di Dunnet i 19 gruppi aplotipici non hanno manifestato risultati ambigui: tutti quelli che sono risultati essere significativamente diversi per un aplotipo di controllo sono risultati essere non significativi per l'altro permettendo di attribuire un valore ben preciso. Basandosi sull'analisi statistica dei gruppi aplotipici aventi la ricombinazione nell'intervallo *cfb6011-cfb6016* è stato possibile mappare e confermare la posizione dei QTL tra i marcatori *cfb6017* (marcatore delimitante la regione non-segregante nella mappa genetica) e *cfb6033*.

3. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La realizzazione di una mappa ad alta risoluzione è il passo principale per poter procedere al clonaggio posizionale di un QTL (Krattinger *et al.*, 2009). Il mappaggio fine di un QTL si ottiene attraverso la genotipizzazione e la fenotipizzazione di una nuova popolazione di linee quasi isogeniche (NIL) che risultano differire per la sola costituzione allelica della regione cromosomica sede del QTL, e la cui caratterizzazione permette di mendelizzare il QTL (Salvi e Tuberosa, 2005).

In letteratura sono presenti diversi lavori che riportano risultati del mappaggio fine di QTL di importanza agronomica per il frumento. La maggior parte di questi lavori riguardano caratteri di resistenza a malattie come resistenza a fusariosi (*Fhb1*; Liu *et al.*, 2008), resistenza a ruggine (*Lr21*, Huang *et al.*, 2003; *Lr 10*, Feuillet *et al.*, 2003) e resistenza ad oidio (*Pm3b*, Yahiaoui *et al.*, 2004). Analoghi risultati sono stati ottenuti anche per l'isolamento di geni per il contenuto proteico della granella (*Gpc-B1*; Distelfeld *et al.*, 2006) e per il controllo della data di fioritura (*Vrn1*; Yan *et al.*, 2003). Molto scarse invece sono le informazioni su mappaggi fini riguardanti QTL per la resa in granella o caratteri ad essa correlati. Un mappaggio fine di un QTL sul cromosoma 7D di frumento tenero per il peso della cariosside (*QTgw.ipk-7D*) è stato effettuato da Röder *et al.*, (2008). Più recentemente è stato realizzato il mappaggio fine di QTL che influenzano il numero di culmi e il numero delle spighe per culmo (*QSn.sdau-4B*; Deng *et al.*, 2011).

Fino ad oggi lo sviluppo di mappe ad alta risoluzione per il frumento è risultato essere un obiettivo di difficile attuazione a causa delle scarse informazioni di sequenza disponibili per lo sviluppo di nuovi marcatori molecolari e soprattutto per l'identificazione di geni candidati. La gran parte delle informazioni di sequenza disponibili sono state ottenute durante la realizzazione di librerie BAC costruite per il clonaggio posizionale di mappa di caratteri d'interesse. Lo sviluppo di queste librerie e l'assemblaggio dei numerosi cloni ottenuti è risultato molto difficile causa la complessità del genoma di frumento (Allouis *et al.*, 2003).

Più di recente i progressi raggiunti nella citogenetica hanno permesso di ottenere, attraverso la tecnologia della citometria a flusso, la dissezione a livello fisico del genoma in piccoli segmenti. Il DNA ottenuto dall'isolamento di cromosomi è stato utilizzato per costruire librerie BAC di singoli cromosomi specifici o di bracci cromosomici. Questa tecnica è stata utilizzata per i cromosomi 1D, 4D e 6D (Janda *et al.*, 2004) e per il cromosoma 3B di Chinese Spring, cv. di frumento tenero (Safár *et al.*, 2004). Ciò ha permesso di procedere con grande successo al sequenziamento del cromosoma 3B e all'utilizzo delle informazioni delle librerie BAC così ottenute per il clonaggio posizionale di QTL localizzati in tali cromosomi.

E' stata proprio la disponibilità di ampie informazioni di sequenza prodotte durante la realizzazione della mappa fisica del cromosoma 3B di *T. aestivum* (Paux *et al.*, 2008) a facilitare il mappaggio fine del QTL per la resa in granella, identificato sul braccio corto del cromosoma 3B di *T. durum*, ed anche il

mappaggio fine di altri geni localizzati in tale cromosoma, come i geni di resistenza a ruggine (*Sr7*, *Lr17*; Mago *et al.*, 2011).

Per il mappaggio fine di *Qyld.idw-3B* è stata sviluppata una ampia popolazione segregante per il QTL dall'incrocio di tre coppie NIL, dalla quale sono state selezionate 233 linee segmentali F_{3,4} con eventi di ricombinazione nella regione di interesse e quindi utilizzate per il presente studio.

Nell'intervallo di *Qyld.idw-3B* sono stati mappati un totale di 28 marcatori, permettendo di ottenere una densità di un marcatore ogni 0,36 cM e quindi una risoluzione di mappa molto più alta rispetto a quella ottenuta con le RIL, grazie alla presenza di un numero maggiore di eventi di ricombinazione.

Poiché *Qyld.idw-3B* risulta influenzare anche altri caratteri correlati come peso medio dei semi, altezza della pianta, lunghezza del peduncolo e indice di verde (Maccaferri *et al.*, 2008), sovrapposizione dei QTL confermata anche dai risultati ottenuti con l'arricchimento della mappa genetica della popolazione di mappa RIL, i caratteri altezza della pianta e lunghezza del peduncolo sono stati utilizzati per la caratterizzazione fenotipica delle linee isogeniche.

Originariamente *Qyld.idw-3B* era stato mappato in un intervallo di 11 cM delimitato dai marcatori *gwm1034-gwm493* (Maccaferri *et al.*, 2008). Grazie alla saturazione della mappa genetica Kofa × Svevo resa possibile dal presente studio l'intervallo è stato ristretto a 6 cM, tra i marcatori *barc133-gwm493*.

Nella popolazione di linee segmentali, in seguito all'analisi QTL effettuata sia attraverso ANOVA sia con regressione lineare, il picco del QTL per entrambi i caratteri (PH e PedL) è stato assegnato ad un intervallo di circa 0,22 cM delimitato da *ubw3B.55* e *cfb6033*. L'analisi dei gruppi aploipici ricombinanti per la regione del QTL ha permesso di confermare la localizzazione del QTL tra i *ubw3B.55* e *cfb6033*, entrambi ancorati al contig 954.

Per entrambi i caratteri Kofa, contribuisce l'allele che determina l'incremento del carattere, mentre quello contribuito da Svevo ne determina la diminuzione. Questo effetto dell'allele Kofa è stato confermato anche da recenti studi sul contenuto proteico della granella e componenti della resa che sono stati effettuati sulla popolazione di mappa UC1113 × Kofa (Conti *et al.*, 2011) in cui un QTL per la resa in granella e peso medio dei semi è stato localizzato sul braccio corto del cromosoma 3B e risulta essere determinato dall'allele Kofa. In letteratura non è stata invece riportata alcuna informazione riguardo all'effetto di questo locus nella varietà Svevo. Inoltre da uno studio sulla popolazione di mappa Ciccio × Svevo (Blanco *et al.*, 2011) un QTL identificato per la resa sul 3BS risulta avere l'allele favorevole contribuito da Ciccio e non da Svevo.

Grazie alle informazioni disponibili sulla mappa fisica dei marcatori mappati nella regione del QTL è stato possibile confermare la posizione del picco del QTL in corrispondenza del contig 954. Il rapporto tra mappa genetica e fisica è risultato pari a 1,31 cM per Mb, valore molto più alto rispetto a quello ottenuto in due popolazioni di F₂ per le stesse regioni, rispettivamente di 0,32 e 0,82 cM/Mb (Saintenac *et al.*, 2011). Nonostante ciò questo risultato è di buon auspicio per il clonaggio finale del QTL.

E' interessante notare che nella regione più strettamente associata al picco del QTL non sono stati identificati eventi di ricombinazione (*ubw3B.55* e *cfb6107*) dovuto al fatto che 10 degli 11 marcatori

molecolari mappati in questa regione sono risultati essere caratterizzati da un polimorfismo presenza/assenza: l'allele è risultato essere presente in Kofa e assente in Svevo per tutti i marcatori molecolari.

Da questi dati è possibile concludere che molto probabilmente la mancanza di ricombinazione è dovuta ad una delezione di tale regione per il parentale Svevo, che risulta avere una diversa composizione genotipica rispetto a Kofa e alla stessa cultivar di riferimento Chinese Spring. All'interno di questa regione, oltre ai marcatori SSR saggiati, sono risultati essere assenti in Svevo anche due geni, uno pseudogene ed un frammento genico, identificati nella stessa regione nella mappa fisica di Chinese Spring.

La spiegazione di una diversa composizione nucleotidica tra Kofa e Svevo potrebbe essere determinata da una inserzione (in Kofa) o delezione (in Svevo) dell'intervallo *ubw3B.55-cfb6107* probabilmente causata dall'attività di elementi trasponibili.

È stato dimostrato che regioni intergeniche e non codificanti dei geni vengono riarrangiate dall'inserzione e dalla delezione di elementi trasponibili (Devos et al., 2002; SanMiguel et al., 2002; Wicker, Yahiaoui, et al., 2003).

In particolare per quanto riguarda l'organizzazione dei geni è stato dimostrato che la mancata collinearità tra sequenze genomiche appartenenti a linee incrociate della stessa specie o di specie diverse molto probabilmente va attribuita all'inserzione di elementi trasponibili che causano una diversa presenza di geni e frammenti genici (Brunner *et al.*, 2005). Diversi studi hanno mostrato che alcuni elementi trasponibili sono in grado di catturare piccoli frammenti di sequenze geniche e muoverli all'interno del genoma. Questo meccanismo è stato descritto per elementi delle subfamiglie *Mutator* (Jiang *et al.*, 2004), *Helitron* (Morgante *et al.*, 2005), *CACTA* (Wicker, Guyot, *et al.*, 2003; Paterson *et al.*, 2009), *Harbinger* (The International Brachypodium Initiative 2010) e LTR retrotrasposoni (Jin e Bennetzen, 1994). L'attività degli elementi trasponibili ha permesso di fornire una spiegazione anche alla differente organizzazione dei geni in regioni risultate collineari tra i diversi genomi delle graminacee permettendo anche di giustificare le numerose duplicazioni e le grandi dimensioni genomiche del frumento (Wicker *et al.*, 2010, 2011).

In Choulet *et al.* (2010) il sequenziamento di 18 Mb di 13 contig selezionati tra quelli assemblati per il cromosoma 3B di *T. aestivum* ci ha permesso di ottenere informazioni dettagliate sull'annotazione del contig 954. Oltre alle informazioni dei geni annotati è stato possibile identificare un'alta percentuale di elementi trasponibili localizzati in questo contig che risultano essere il 63,2% (sui 18 Mb analizzati in totale). Nonostante la bassa percentuale di elementi trasponibili rispetto ad altri contig, gli elementi trasponibili in questa regione mostrano un'attività molto più recente (circa 1,0-1,4 milioni di anni fa), risultato che conferma la bassa collinearità del contig con i genomi di riso e *Brachypodium* e l'alta percentuale di pseudogeni e frammenti genici da cui è caratterizzato. Un'ulteriore conferma della frequenza di eventi di duplicazione e traslocazione intergenica in tale regione è data dall'identificazione

di geni non collineari ma comunque risultati essere simili ad altri geni localizzati in diverse regioni di riso e *Brachypodium*.

Nel caso del cromosoma 3B di *T. durum*, il mappaggio dei due QTL per l'altezza della pianta e per la lunghezza del peduncolo nella regione delimitata dai marcatori *cfb6149* e *cfb6133* ci fa ipotizzare una localizzazione di *Qyld.idw-3B* nella stessa posizione. Inoltre l'identificazione all'interno di questo intervallo di una regione di 473 kb che risulta essere presente in Kofa (allele che contribuisce all'incremento del carattere) e assente in Svevo ci permette di concludere che molto probabilmente i geni annotati in tale regione sulla mappa fisica di Chinese Spring potrebbero essere dei buoni candidati per il QTL. Anche se le due specie *T. durum* e *T. aestivum* risultano essere conservate tra loro, la realizzazione di librerie BAC specifiche del genoma B sviluppate per le cultivar Kofa e Svevo è un passo indispensabile per confermare i geni candidati identificati dalle sequenze di *T. aestivum* e soprattutto per capire meglio quali siano i meccanismi che regolano la diversa composizione allelica che caratterizza Kofa e Svevo alla regione di interesse.

FIGURE

Figura 1: Mappa genetica ottenuta dalla genotipizzazione delle 233 linee segmentali segreganti per *Qyld.idw-3B*. In rosso sono indicati i due marcatori fiancheggianti il QTL utilizzati per la selezione degli eventi di ricombinazione. Nel dettaglio è stata riportata la mappa genetica dell'intervallo delimitato dai marcatori *cfb6011* e *cfb6016*, regione ancorata al contig 954 della mappa fisica di *Triticum aestivum*, cv. Chinese Spring.

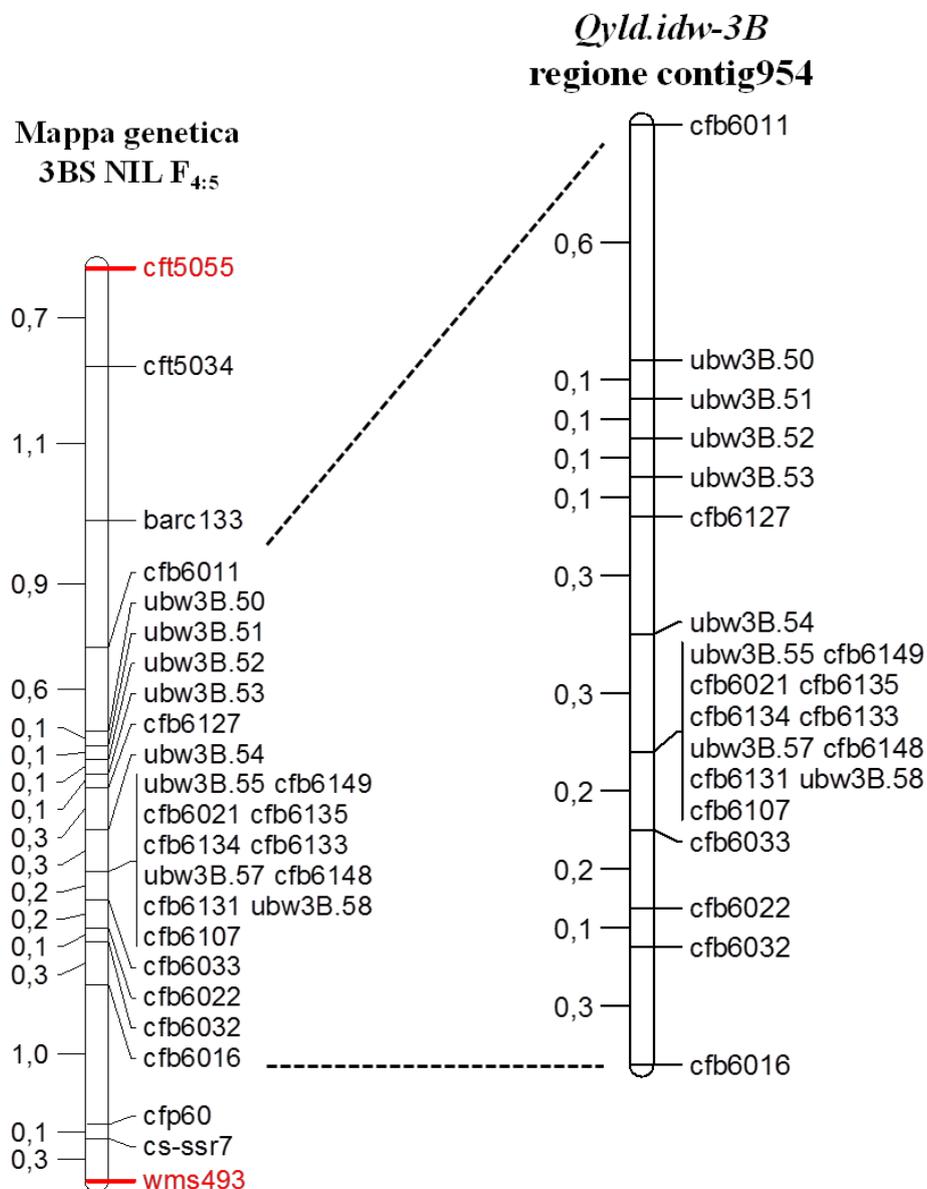


Figura 2: Nell'immagine viene riportata l'integrazione della mappa genetica delle linee segmentali con la mappa fisica di Chinese Spring.

a) Mappa genetica delle linee segmentali relativa alla sola regione associata al contig 954. Sono stati indicati: in rosso i marcatori dominanti con l'allele presente in Kofa e assente in Svevo, in verde i marcatori dominanti con l'allele presente in Svevo e assente in Kofa, in nero i marcatori co-dominanti.

b) Mappa fisica di Chinese Spring in cui sono stati ancorati i marcatori molecolari mappati nella mappa genetica. La mappa fisica è stata rappresentata in scala di 200 kb.

c) Regione della mappa fisica di Chinese Spring relativa all'intervallo delimitato dai marcatori *ubw3B.55* e *cfb6033* in cui è stato identificato *QPh.idw-3B* e *QPedL.idw-3B*. Sulla mappa fisica sono stati presentati tutti i geni annotati in Chinese Spring. I geni *ctg954b* che sono stati mappati sulle linee isogeniche di Kofa × Svevo sono stati indicati con *. La mappa fisica è stata rappresentata in scala di 100 kb.

Sulla mappa fisica è stata evidenziata in rosa la delezione (Svevo) / inserzione (Kofa).

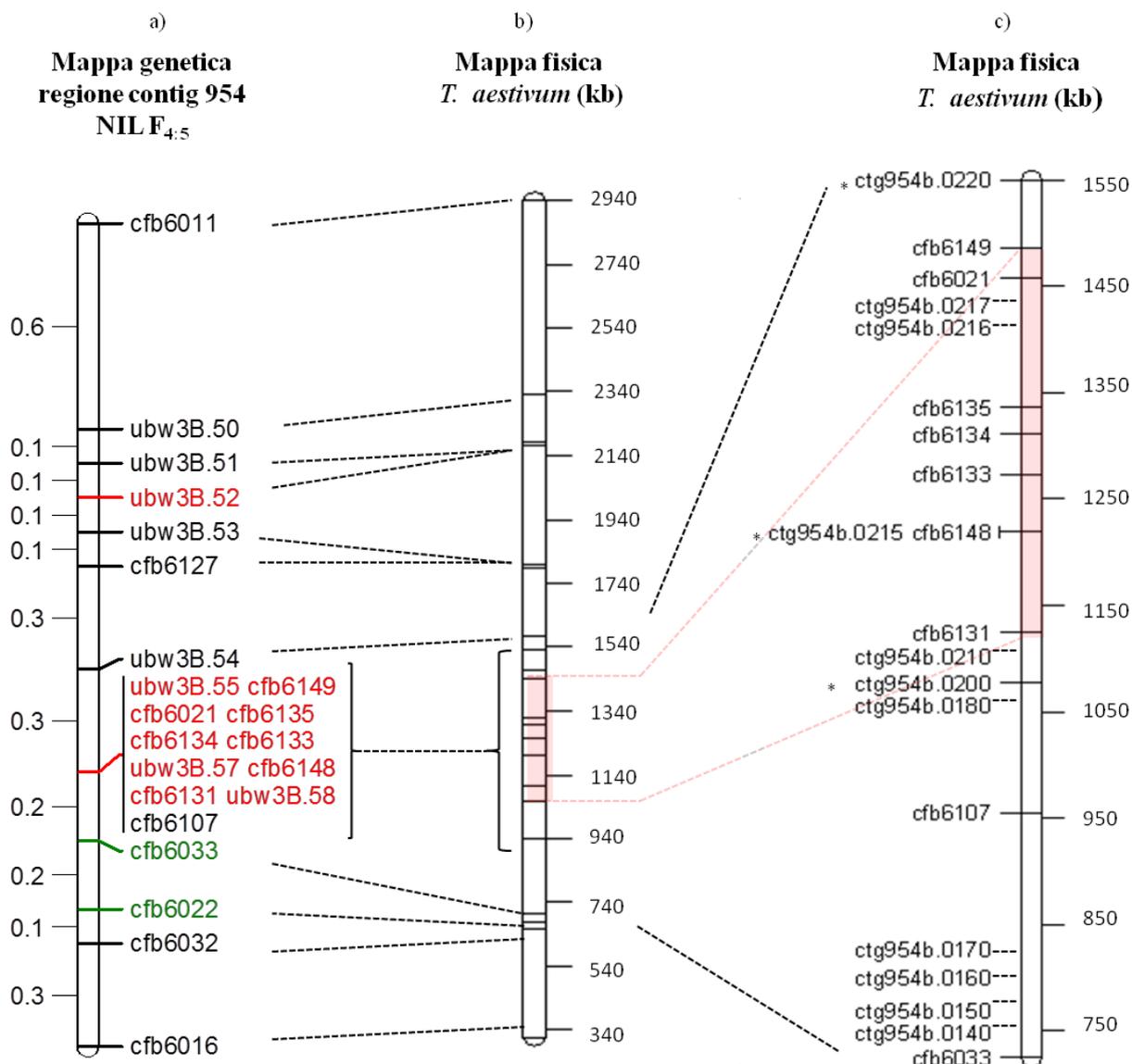


Figura 3: La frequenza di ricombinazione delle linee segmentali (Kofa × Svevo) di *T. durum* lungo il contig954. Nel grafico sono riportati i rapporti della distanza fisica e molecolare di ciascun marcatore (in blu). La linea tratteggiata in rosso sta ad indicare il valore della mediana di tutti i rapporti.

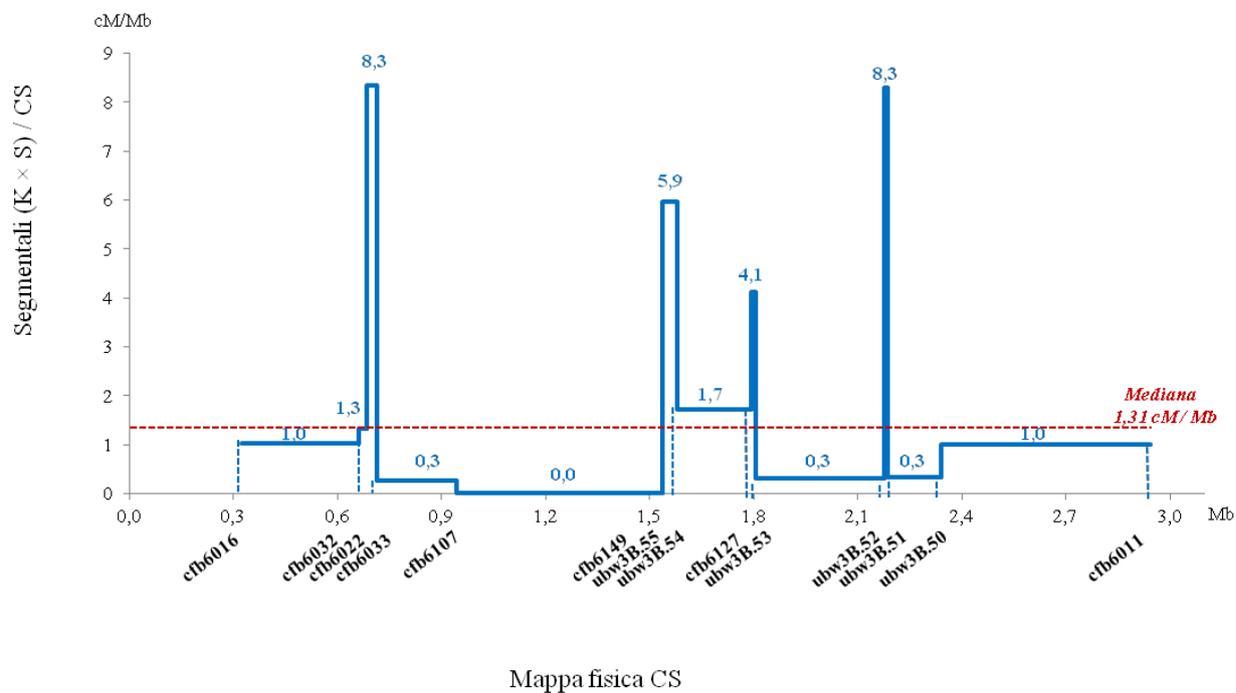


Figura 5: Nella figura vengono riportati i grafici dei valori medi fenotipici di PH e PedL ottenuti nella prova 1s messi a confronto con l'aplotipo rappresentativo dei 27 gruppi. Nell'aplotipo è stata evidenziata la regione che risulta essere più associata ai caratteri.

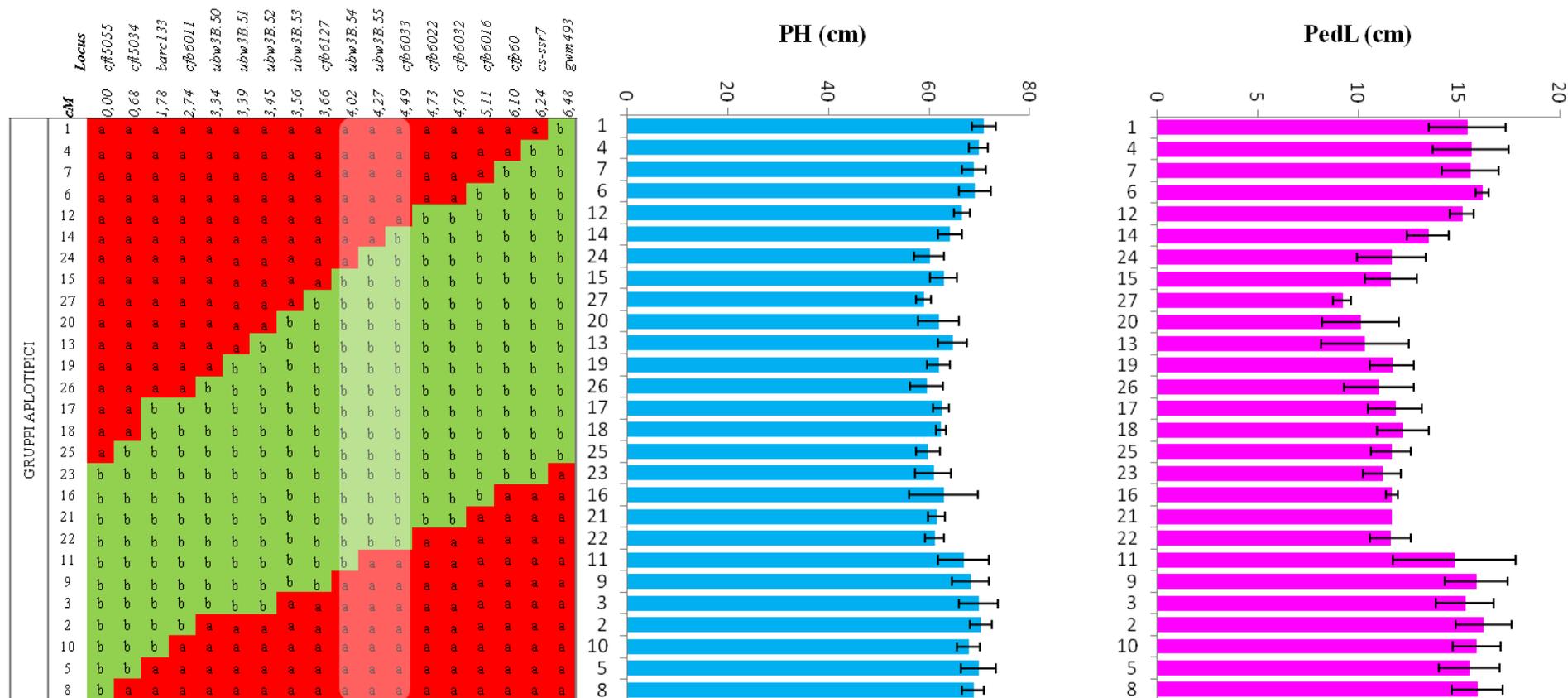


Figura 6: Profili LOD di *QPh.idw-3B* e *QPedL.idw-3B* ottenuti tramite mappatura a singolo marcatore dei valori fenotipici rilevati sulla popolazione di linee isogeniche. Il grafico sulla sinistra fa riferimento ai dati rilevati nella prova 1s mentre nel grafico sulla destra sono riportati i dati rilevati in 2s. Sull'asse delle ordinate i triangoli neri rappresentano i marcatori mappati.

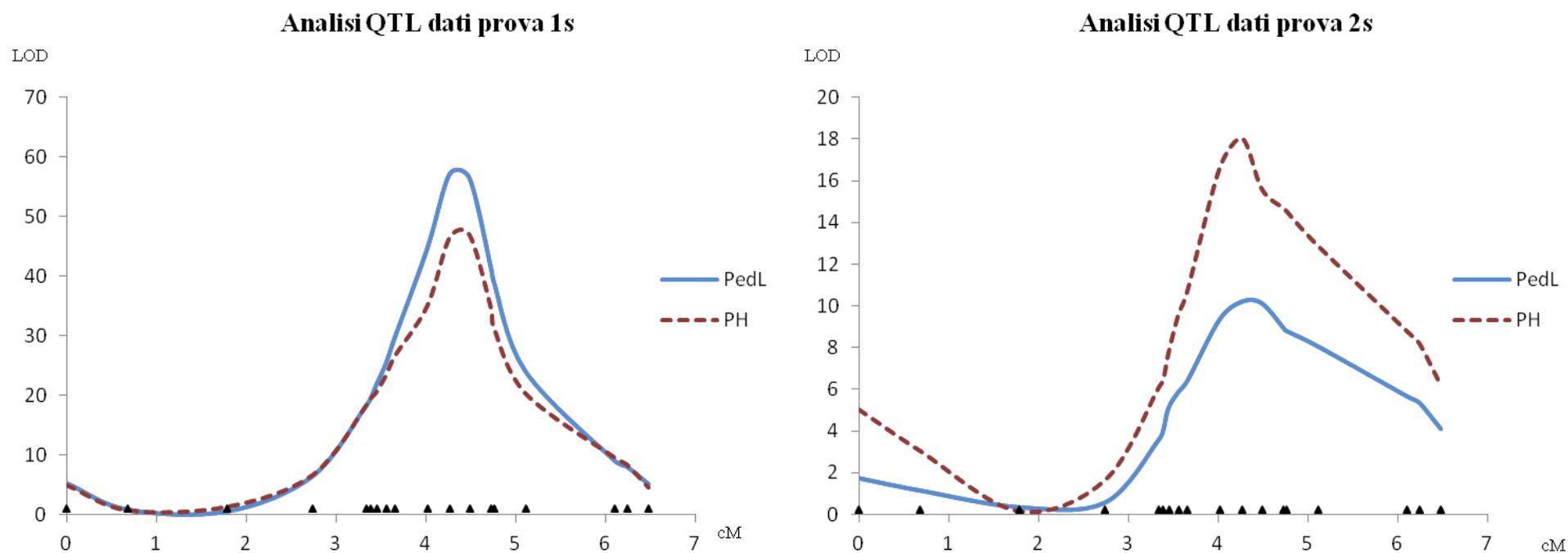


Figura 7: Classificazione delle diverse classi genotipiche che caratterizzano l'intervallo del QTL e mappaggio di *QPH.idw-3B* e *QPedL.idw-3B*.

	Locus	cM	Linee ricombinanti																	PH (cm)	PedL (cm)	P					
			cfb6011	ubw3B.50	ubw3B.51	ubw3B.52	ubw3B.53	cfb6127	ubw3B.54	ubw3B.55	cfb6149	cfb6021	cfb6135	cfb6134	cfb6133	ubw3B.57	cfb6148	cfb6131	ubw3B.58				cfb6107	cfb6033	cfb6022	cfb6032	cfb6016
		2,74	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	69,04	16,16	*****
		3,34	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	66,50	15,15	*****	
		3,39	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	64,15	13,46	*****	
		3,45	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	60,03	11,62	*****	
		3,56	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	62,93	11,60	*****	
		3,66	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	58,85	9,19	*****	
		4,02	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	61,85	10,08	*****	
		4,27	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	64,58	10,32	*****	
		4,27	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	61,89	11,67	*****	
		4,27	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	59,55	11,01	*****	
		4,27	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	61,50	11,62	*****	
		4,27	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	59,71	10,29	*****	
		4,27	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	61,02	11,58	*****	
		4,27	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	66,86	14,76	*****	
		4,27	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	68,22	15,86	*****	
		4,27	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	69,83	15,29	*****	
		4,27	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	70,29	16,22	*****	
(+/+)			a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	68,89	15,69		
(-/-)			b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	61,93	11,76		

TABELLE

Tabella 1: Lista dei 13 geni di Chinese Spring utilizzati per disegnare nuovi primer 3B specifici.

NOME MARCATORE	N. ESONI	LUNCHEZZA (bp)	GENE <i>Oryza Sativa</i>	GENE ORTOLOGO <i>Brachypodium dystachyon</i>
ctg0954b.00090.1	6	688	Os10g17960.1	Bradi1g25600.1
ctg0954b.00200.1	7	487	Os08g36320.3	Bradi3g37830.1
ctg0954b.00215.1	8	1035	Os11g40590.3	Bradi4g13280.1
ctg0954b.00220.1	5	226	Os03g13220.1	Bradi1g68880.2
ctg0954b.00230.1	5	524	Os01g02930.1	Bradi2g01420.1
ctg0954b.00240.1	5	526	Os01g02930.1	Bradi2g01420.1
ctg0954b.00290.1	19	965	Os01g03020.1	Bradi2g01500.1
ctg0954b.00300.1	1	283	Os05g01200.1	Bradi2g40020.1
ctg0954b.00310.1	8	256	Os01g03030.1	Bradi2g01510.1
ctg0954b.00320.1	3	271	Os01g03040.1	Bradi2g01520.1
ctg0954b.00350.1	2	238	Os12g25700.3	Bradi1g08120.2
ctg0954b.00360.1	7	443	Os05g46520.1	Bradi2g18040.1
ctg0954b.00370.1	5	279	Os01g03050.1	Bradi2g01530.1

Tabella 2: Coppie di primer UWB3B mappati nella regione del QTL.

NOME MARCATORE	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE	Ta (°C)	ALLELE (bp)
<i>ubw3B.55</i>	CTGAGCGAAAAGGCAGCGTATC	GGGAGGGGAGGAAGCAGAGGAG	62	500
<i>ubw3B.57</i>	CTCTCCTTTGAGAGGTGGTTTG	GTTACAGCAGAGAACTTCACC	60	600
<i>ubw3B.58</i>	GCCATTGAAATGGTGGATGAGA	CTTACCTGGCTGACTACCTTTG	60	800
<i>ubw3B.50</i>	TGGATGTATTGTGGAACTGCCTT CTGCAAGTGTTTGGGCCGTA	GCAGGTTCCGGTTGAGCGACTG	64	670-778
<i>ubw3B.51</i>	ACCGTCCTCTCCCTCCACCAG	CAGTTCGTTCCGCTCCTTTTCC	60	900
<i>ubw3B.52</i>	CAACATTGACCACTTCCGCACAC	GTAGGCCGGTTCTGTTGTGGAG	60	761
<i>ubw3B.53</i>	GCTGCGGCCCAACAGTTA GGAGGGCTCCAATGCGG	AGGTTACCAAGCGATCCAAGG	62	288-773
<i>ubw3B.54</i>	AGGTGAGGAATTTCGATCCATGT GAGGGTCGAGTTGAGGAGAAGT	AGAAGGCACGAGTATACTACTCCTA	62	280-150

Tabella 3: Analisi di correlazione tra i valori fenotipici medi dei due caratteri altezza della pianta e lunghezza del peduncolo relative ad ogni singola prova ed analisi di correlazione di ciascun carattere tra le due prove sperimentali. I caratteri rilevati vengono identificati con la sigla PH per altezza della pianta e PedL per la lunghezza del peduncolo. Le due prove sperimentali vengono indicate con la sigla 1s e 2s. Nella tabella oltre ai valori del coefficienti di correlazione di Pearson (r) viene anche indicata la significatività del test in cui *** sta ad indicare un $P < 0,0001$.

Correlazione	r	P
PH_1s vs PedL_1s	0,72	***
PH_2s vs PedL_2s	0,51	***
PH_1s vs PH_2s	0,65	***
PedL_1s vs PedL_2s	0,68	***

Tabella 4: Analisi della varianza effettuata sulle “*sliding windows*” dei diversi marcatori mappati nell’intervallo per analizzare l’associazione tra i caratteri (PH e PedL) e l’aplotipo. Per *QPh.idw-3B* e *QPedL.idw-3B* sono stati riportati i valori F e P ottenuti in ciascuna prova sperimentale. Il livello di significatività viene indicato con *** per $P < 0,0001$; ** per $P < 0,001$ e * per $P < 0,001$.

	<i>QPh.idw-3B</i>				<i>QPedL.idw-3B</i>			
	<i>prova 1s</i>		<i>prova 2s</i>		<i>prova 1s</i>		<i>prova 2s</i>	
	F	P	F	P	F	P	F	P
<i>cft5055-cft5034</i>	20,9	***	10,6	***	17,9	***	8,3	**
<i>cft5034-barc133</i>	16,9	***	11,3	***	11,8	***	4,8	*
<i>barc133-cfb6011</i>	18,0	***	9,1	***	23,5	***	5,8	**
<i>cfb6011-ubw3B.50</i>	65,7	***	19,7	***	58,2	***	12,4	***
<i>ubw3B.50-ubw3B.51</i>	92,1	***	26,4	***	86,3	***	15,8	***
<i>ubw3B.51-ubw3B.52</i>	93,7	***	32,6	***	98,5	***	20,4	***
<i>ubw3B.52-ubw3B.53</i>	72,0	***	24,9	***	80,6	***	15,4	***
<i>ubw3B.53-cfb6127</i>	132,8	***	40,5	***	158,6	***	23,4	***
<i>cfb6127-ubw3B.54</i>	114,5	***	42,9	***	151,1	***	22,2	***
<i>ubw3B.54-ubw3B.55</i>	160,9	***	43,9	***	198,3	***	21,3	***
<i>ubw3B.55-cfb6033</i>	248,4	***	65,5	***	306,7	***	31,4	***
<i>cfb6033-cfb6022</i>	159,7	***	42,1	***	187,3	***	19,8	***
<i>cfb6022-cfb6032</i>	173,5	***	50,1	***	201,2	***	37,7	***
<i>cfb6032-cfb6016</i>	103,8	***	41,3	***	121,3	***	20,8	***
<i>cfb6016-cfp60</i>	60,9	***	45,4	***	65,2	***	19,6	***
<i>cfp60-cs-ssr7</i>	28,6	***	26,5	***	25,2	***	16,0	***
<i>cs-ssr7-gwm493</i>	24,6	***	18,4	***	22,0	***	10,7	***

Tabella 5: Valori fenotipici medi dei caratteri altezza della pianta (PH) e lunghezza del peduncolo (PedL). I dati fanno riferimento alle quattro classi genotipiche utilizzate per l'analisi della varianza di ciascun "sliding windows". Le classi genotipiche sono caratterizzate dalla composizione allelica aa (+/+), bb (-/-), ab (+/-) e ba (-/+).

a) Valori fenotipici relativi alla prova sperimentale 1s.

	PH_1s (cm)				PedL_1s (cm)			
	(+/+)	(-/-)	(+/-)	(-/+)	(+/+)	(-/-)	(+/-)	(-/+)
<i>cft5055-cft5034</i>	64,1	66,4	59,8	68,8	12,9	14,3	11,6	15,9
<i>cft5034-barc133</i>	65,0	64,9	62,4	69,8	13,5	13,7	11,8	15,5
<i>barc133-cfb6011</i>	66,4	63,6	62,4	67,8	14,2	12,7	12,4	15,8
<i>cfb6011-ubw3B.50</i>	67,4	62,6	59,6	70,3	14,8	12,2	11,0	16,2
<i>ubw3B.50-ubw3B.51</i>	67,8	62,2	61,9		15,0	12,0	11,7	
<i>ubw3B.51-ubw3B.52</i>	67,8	62,2	64,6		15,1	12,0	10,3	
<i>ubw3B.52-ubw3B.53</i>	68,0	62,2	61,9	69,8	15,2	12,0	10,1	15,3
<i>ubw3B.53-cfb6127</i>	68,2	62,1	58,9		15,4	11,9	9,2	
<i>cfb6127-ubw3B.54</i>	68,4	61,6	62,9	68,0	15,5	11,6	11,6	15,9
<i>ubw3B.54-ubw3B.55</i>	68,8	61,6	60,0	66,9	15,7	11,5	11,6	14,8
<i>ubw3B.55-cfb6033</i>	68,9	61,5	64,1		15,7	11,5	13,5	
<i>cfb6033-cfb6022</i>	68,9	61,6	66,5	60,5	15,7	11,5	15,2	11,6
<i>cfb6022-cfb6032</i>	68,5	61,8		59,7	15,5	11,7		10,3
<i>cfb6032-cfb6016</i>	68,4	61,9	68,3	61,5	15,5	11,8	15,9	11,6
<i>cfb6016-cfp60</i>	67,7	62,1	68,5	63,4	15,1	12,1	15,4	11,7
<i>cfp60-cs-ssr7</i>	67,0	63,1	69,8	59,7	14,6	12,5	15,6	10,3
<i>cs-ssr7-gwm493</i>	66,9	63,4	70,9	60,9	14,6	12,7	15,4	11,2

b) Valori fenotipici relativi alla prova sperimentale 2s.

	PH_2s (cm)				PedL_2s (cm)			
	(+/+)	(-/-)	(+/-)	(-/+)	(+/+)	(-/-)	(+/-)	(-/+)
<i>cft5055-cft5034</i>	59,5	62,7			10,6	12,2		
<i>cft5034-barc133</i>	59,5	62,6	59,5	64,0	10,7	12,1	9,9	12,8
<i>barc133-cfb6011</i>	59,9	61,4	60,6	66,4	10,9	11,6	10,9	13,3
<i>cfb6011-ubw3B.50</i>	61,4	60,2	58,6	66,1	11,5	11,1	9,7	13,4
<i>ubw3B.50-ubw3B.51</i>	63,0	59,6	57,1	63,7	12,3	10,8	9,3	12,1
<i>ubw3B.51-ubw3B.52</i>	63,2	59,1	59,9		12,4	10,5	10,0	
<i>ubw3B.52-ubw3B.53</i>	63,3	59,1	50,5		12,4	10,5	5,5	
<i>ubw3B.53-cfb6127</i>	63,4	58,9	58,3	65,2	12,5	10,5	8,3	10,3
<i>cfb6127-ubw3B.54</i>	63,6	58,9	54,8		12,5	10,4	7,1	
<i>ubw3B.54-ubw3B.55</i>	63,9	58,6	57,3	68,3	12,7	10,3	10,1	15,0
<i>ubw3B.55-cfb6033</i>	64,1	58,4	58,8	61,4	12,8	10,2	11,3	10,9
<i>cfb6033-cfb6022</i>	64,1	58,4	61,6		12,7	10,3	10,9	
<i>cfb6022-cfb6032</i>	64,0	58,4	64,6	65,8	12,7	10,3	9,0	10,8
<i>cfb6032-cfb6016</i>	64,0	58,5			12,7	10,3		
<i>cfb6016-cfp60</i>	64,0	58,4	63,2	60,5	12,6	10,2	13,9	12,0
<i>cfp60-cs-ssr7</i>	64,7	58,6	61,0	58,5	12,6	10,1	12,4	11,4
<i>cs-ssr7-gwm493</i>	63,1	59,1	63,3		12,3	10,5	12,8	

Tabella 6: Risultati dell'analisi della varianza svolta per ogni singolo marcatore. Nella tabella ad ogni marcatore viene associato il valore F, il valore P, il valore R^2 , il valore dell'effetto additivo calcolato come $\frac{1}{2}(bb-aa)$ e la media dei valori fenotipici delle classi genotipiche aa (+/+) e bb (-/-).

a) Analisi della varianza a singolo marcatore per *QPh.idw-3B* e *QPedL.idw-3B* i cui caratteri fenotipici sono stati rilevati nella prova 1s

	<i>QPh.idw-3B</i>						<i>QPedL.idw-3B</i>					
	F	P	R^2	<i>a</i>	(+/+)	(-/-)	F	P	R^2	<i>a</i>	(+/+)	(-/-)
			%	cm	cm	cm			%	cm	cm	cm
<i>cft5055</i>	40,8	***	8,6	1,5	63,6	66,6	39,4	***	8,3	0,8	12,8	14,4
<i>cft5034</i>	7,8	*	1,6	0,7	64,6	66,0	9,8	*	2,1	0,4	13,3	14,1
<i>barc133</i>	6,8	*	1,4	-0,6	66,0	64,7	2,6	ns	0,4	-0,2	13,9	13,5
<i>cfb6011</i>	49,4	***	10,2	-1,6	66,7	63,5	53,0	***	10,9	-0,9	14,5	12,6
<i>ubw3B.50</i>	171,0	***	28,6	-2,7	67,6	62,2	159,1	***	27,2	-1,4	14,9	12,0
<i>ubw3B.51</i>	181,9	***	30,2	-2,8	67,8	62,2	169,5	***	28,7	-1,5	15,0	12,0
<i>ubw3B.52</i>	204,8	***	32,8	-2,9	68,0	62,3	202,7	***	32,5	-1,6	15,2	12,0
<i>ubw3B.53</i>	216,0	***	33,6	-2,9	68,0	62,1	237,5	***	35,8	-1,6	15,2	11,9
<i>cfb6127</i>	264,3	***	38,4	-3,1	68,2	62,0	305,7	***	41,9	-1,8	15,4	11,8
<i>ubw3B.54</i>	334,8	***	44,3	-3,3	68,4	61,7	447,2	***	51,6	-2,0	15,5	11,6
<i>ubw3B.55</i>	477,3	***	53,0	-3,7	68,8	61,5	594,6	***	58,4	-2,1	15,7	11,5
<i>cfb6033</i>	488,1	***	53,8	-3,7	68,9	61,5	587,8	***	58,3	-2,1	15,7	11,5
<i>cfb6022</i>	317,9	***	46,7	-3,3	68,5	61,9	364,5	***	47,1	-1,8	15,5	11,8
<i>cfb6032</i>	333,0	***	44,1	-3,3	68,4	61,8	384,4	***	47,7	-1,9	15,5	11,7
<i>cfb6016</i>	174,6	***	29,7	-2,7	67,9	62,4	192,8	***	31,9	-1,6	15,2	12,0
<i>cfp60</i>	80,2	***	16,5	-2,0	67,1	63,1	70,5	***	14,8	-1,1	14,7	12,5
<i>cs-ssr7</i>	62,5	***	13,1	-1,8	67,0	63,3	57,8	***	12,2	-1,0	14,6	12,6
<i>gwm493</i>	39,3	***	8,3	-1,5	66,6	63,7	39,5	***	8,4	-0,8	14,4	12,8

b) Analisi della varianza a singolo marcatore per QTL *QPh.idw-3B* e *QPedL.idw-3B* i cui caratteri fenotipici sono stati rilevati nella prova 2s.

	<i>QPH.idw-3B</i>						<i>QPedL.idw-3B</i>					
	F	P	R ²	a	(+/+)	(-/-)	F	P	R ²	a	(+/+)	(-/-)
			%	cm	cm	cm			%	cm	cm	cm
<i>cft5055</i>	30,8	***	12,0	1,6	59,5	62,7	23,0	***	9,1	0,8	10,6	12,2
<i>cft5034</i>	15,1	***	6,1	1,2	60,0	62,3	8,7	*	3,4	0,5	10,9	11,9
<i>barc133</i>	1,7	ns	0,3	0,4	60,8	61,6	1,1	ns	0,0	0,2	11,2	11,6
<i>cfb6011</i>	10,8	***	4,3	-1,0	61,9	59,9	5,5	***	2,0	-0,4	11,8	10,9
<i>ubw3B.50</i>	51,6	***	18,8	-2,0	63,1	59,1	29,5	***	12,5	-0,9	12,3	10,5
<i>ubw3B.51</i>	51,8	***	19,0	-2,0	63,2	59,1	30,8	***	12,1	-0,9	12,4	10,5
<i>ubw3B.52</i>	59,0	***	21,0	-2,1	63,3	59,0	35,0	***	13,5	-1,0	12,4	10,5
<i>ubw3B.53</i>	74,6	***	25,2	-2,3	63,5	58,9	40,9	***	15,4	-1,0	12,5	10,4
<i>cfb6127</i>	78,5	***	26,2	-2,4	63,6	58,8	45,3	***	16,9	-1,1	12,6	10,4
<i>ubw3B.54</i>	122,3	***	35,7	-2,8	64,0	58,5	63,2	***	22,1	-1,2	12,7	10,3
<i>ubw3B.55</i>	128,1	***	36,8	-2,8	64,0	58,4	59,5	***	21,2	-1,2	12,7	10,3
<i>cfb6033</i>	126,6	***	36,8	-2,8	64,1	58,5	60,9	***	22,7	-1,2	12,7	10,3
<i>cfb6022</i>	115,5	***	34,9	-2,7	64,0	58,6	53,7	***	19,8	-1,2	12,7	10,3
<i>cfb6032</i>	121,1	***	35,5	-2,7	64,0	58,5	57,7	***	20,6	-1,2	12,7	10,3
<i>cfb6016</i>	108,5	***	33,0	-2,6	63,9	58,6	49,8	***	18,3	-1,1	12,6	10,3
<i>cfp60</i>	55,1	***	20,3	-2,1	63,3	59,1	29,4	***	11,8	-0,9	12,4	10,6
<i>cs-ssr7</i>	54,7	***	19,9	-2,1	63,3	59,1	31,1	***	12,2	-0,9	12,4	10,5
<i>gwm493</i>	31,2	***	12,2	-1,6	62,7	59,5	23,6	***	9,4	-0,8	12,2	10,6

Tabella 7: Valori di LOD e di R^2 ottenuti dall'analisi di mappaggio a singolo marcatore effettuata con il programma WinChart.

	<i>QPH.idw-3B</i>				<i>QPedL.idw-3B</i>			
	PH_1s		PH_2s		PedL_1s		PedL_2s	
	LOD	R^2	LOD	R^2	LOD	R^2	LOD	R^2
<i>cft5055</i>	4,9	9,5	5,0	17,1	5,3	10,1	1,7	13,8
<i>cft5034</i>	0,6	1,5	3,0	9,9	0,9	2,1	1,2	7,2
<i>barc133</i>	1,2	1,8	0,1	1,0	0,6	0,6	0,4	1,5
<i>cfb6011</i>	6,6	12,5	1,6	4,6	6,5	12,3	0,6	1,5
<i>ubw3B.50</i>	18,3	30,7	6,1	16,5	18,4	30,8	3,6	9,9
<i>ubw3B.51</i>	19,5	32,3	6,4	17,0	19,6	32,2	4,0	11,1
<i>ubw3B.52</i>	20,5	34,7	7,7	20,5	21,8	35,9	5,1	13,8
<i>ubw3B.53</i>	23,4	37,3	9,6	25,7	25,5	39,8	5,9	16,7
<i>cfb6127</i>	26,7	41,7	10,7	26,8	29,9	45,5	6,4	18,3
<i>ubw3B.54</i>	35,1	50,9	16,6	39,7	44,8	59,1	9,4	24,6
<i>ubw3B.55</i>	46,6	59,7	18,0	40,2	57,2	66,9	10,2	25,3
<i>cfb6033</i>	47,0	59,9	15,6	36,9	56,4	66,1	10,1	26,1
<i>cfb6022</i>	34,5	47,4	14,7	33,1	41,2	50,8	8,9	23,9
<i>cfb6032</i>	31,4	45,1	14,6	34,1	39,1	52,1	8,8	26,9
<i>cfb6016</i>	20,3	31,0	12,9	31,5	24,1	36,5	8,1	23,6
<i>cfp60</i>	9,5	17,8	8,8	25,4	9,2	17,0	5,7	17,0
<i>cs-ssr7</i>	8,3	15,4	8,2	23,6	8,1	15,0	5,4	18,0
<i>gwm493</i>	4,5	8,8	6,2	17,5	5,2	10,1	4,1	14,8

CAPITOLO VI

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Il clonaggio posizionale dei QTL per la resa in granella identificati sui cromosomi 2BL e 3BS permetterà di studiare e di comprendere i meccanismi molecolari responsabili della potenzialità produttiva del frumento, aprendo nuove prospettive ed opportunità nel miglioramento genetico di cultivar di frumento in grado di avere una più alta resa anche in condizioni ambientali diverse.

Le attività di ricerca del dottorato hanno consentito di ottenere importanti risultati per il mappaggio fine dei QTL, particolarmente per il QTL localizzato nella regione distale del braccio corto del cromosoma 3B. A causa delle diverse informazioni di sequenza disponibili per i due cromosomi, si sono utilizzati approcci diversi per sviluppare nuovi marcatori molecolari e saturare le due regioni QTL sui cromosomi 2BL e 3BS.

Per il 2BL sono state utilizzate le informazioni di sequenza di geni ortologi ottenuti da un'analisi di macro-collinearità effettuata tra frumento e genomi di specie modello già sequenziate come riso, *Brachypodium* e sorgo (Sorrells *et al.*, 2003; Ilic *et al.* 2003, Bennetzen e Ma, 2003; Keller e Feuillet 2000; Paterson *et al.*, 2009). La regione sede del QTL, localizzata nel bin di delezione 2B6-0.89-1.00, è risultata essere sintenica al cromosoma 4 di riso, 5 di *Brachypodium* e 6 di sorgo ed i geni ortologi identificati sono stati utilizzati per sviluppare marcatori COS (Huo *et al.*, 2009; Quraishi *et al.*, 2009). Dal saggio dei marcatori COS e di ulteriori microsatelliti è stato possibile ottenere una risoluzione di un marcatore ogni 2,5 cM nella regione del QTL della popolazione di mappa Kofa × Svevo originariamente utilizzata da Maccaferri *et al.* (2008).

Per il 3BS, grazie alle informazioni di sequenze di BAC e BES generate durante la costruzione della mappa fisica di Chinese Spring (Paux *et al.*, 2006, 2008) è stato possibile individuare numerosi marcatori molecolari SSR e ISBP che hanno permesso di ottenere una risoluzione di un marcatore ogni 0,6 cM nella regione del QTL della popolazione di Kofa × Svevo.

I risultati ottenuti in seguito all'arricchimento delle due regioni QTL hanno permesso di ottenere una buona risoluzione di mappa nella popolazione segregante Kofa × Svevo nel caso della regione 3BS, mentre per la regione 2BL non si è riusciti ad ottenere sufficienti marcatori polimorfici in grado di saturare la regione. Il livello di risoluzione raggiunto per *Qyld.idw-3B* è stato reso possibile dalle informazioni di sequenza della mappa fisica di frumento tenero, informazioni indispensabili che hanno permesso di arricchire la regione cromosomica anche di altri QTL localizzati sullo stesso cromosoma 3B (Mago *et al.*, 2011).

Le metodologie tradizionali usate fino ad oggi si sono basate sulla costruzione diretta di librerie genomiche (Liu *et al.*, 2000; Allouis *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2000; Nilmalgoda *et al.*, 2003 Cenci *et al.*, 2003) e più di recente su approcci di genomica comparata (Salse *et al.*, 2009; Quraishi *et al.*, 2009, 2011; Qin *et al.*, 2011). Un esempio di approccio di genomica comparata è quello utilizzato per *Qyld.idw-2B*, per il quale lo sviluppo di nuovi marcatori molecolari richiede ingenti risorse e tempi lunghi dovuti alle complessità, alle dimensioni e alla poliploidia del genoma, che rendono più laboriosi i meccanismi di sviluppo di marcatori molecolari unici e genoma specifici.

Il cromosoma 3B di frumento tenero è il più grande cromosoma di tutto il genoma di frumento e risulta pari a 995 Mb, vale a dire due volte l'intero genoma di riso (Paux *et al.*, 2008; Itoh *et al.*, 2007). Il cromosoma 3B è stato il primo cromosoma di frumento ad essere interamente sequenziato, la sua libreria genomica è stata realizzata grazie all'isolamento del solo cromosoma 3B (Safar *et al.*, 2004) ottenuto attraverso la metodologia della citometria a flusso, che negli ultimi anni è di ampio utilizzo per lo sviluppo di librerie genomiche specifiche di singoli cromosomi o di bracci cromosomici (Kubalaková *et al.*, 2002, 2005; Janda *et al.*, 2004, 2006). Grazie a questo approccio è stato possibile risolvere le problematiche delle comuni metodologie di assemblaggio delle librerie BAC garantendo un'alta specificità genomica (Dolzel *et al.*, 1992).

La saturazione sul 3B nella popolazione Kofa × Svevo ha permesso di ridurre l'intervallo di confidenza da 11 cM (LOD-1) a 6 cM fiancheggiato dai marcatori *barc133* e *gwm493*; nonostante la buona risoluzione ottenuta gli eventi di ricombinazione non sono sufficienti per ottenere una mappa ad alta risoluzione in grado di identificare un intervallo più ristretto per identificare i possibili migliori geni candidati. A questo scopo sono state sviluppate coppie NIL che differiscono per la sola regione *Qyld.idw-3B*, tali coppie sono state poi utilizzate per ottenere una popolazione ampia segregante con molteplici eventi di ricombinazione. Sono state selezionate e valutate genotipicamente con i marcatori mappati nella regione 3BS un totale di 233 linee segmentali F_{4.5} in omozigosi per i marcatori fiancheggianti *Qyld.idw-3B*. In seguito alla caratterizzazione molecolare delle linee segmentali è stato possibile ottenere una mappa ad alta risoluzione con una densità media di un marcatore ogni 0,36 cM. Dai risultati ottenuti è stato possibile concludere che le linee segmentali caratterizzate da una diversa composizione allelica nella sola regione *Qyld.idw-3B* risultano essere caratterizzate da diversi eventi di ricombinazione distribuiti in modo eterogeneo lungo tutta la regione, come osservato anche in altre popolazioni di *T. aestivum* (Saintenac *et al.*, 2011), sufficienti per localizzare con elevata accuratezza il QTL.

I risultati ottenuti dalla fenotipizzazione delle coppie NIL hanno confermato quanto osservato dall'originaria analisi QTL (Maccaferri *et al.*, 2008) ed è stato possibile concludere che l'effetto del QTL influenza significativamente tutti i caratteri, in particolare l'altezza della pianta e lunghezza del peduncolo, caratteri che in tutte le 18 coppie NIL analizzate sono risultati significativamente diversi tra linee +/+ e linee -/-.

Diversamente da quanto osservato nella popolazione Kofa × Svevo, la differenza media fenotipica osservata per il carattere peso medio dei semi nelle coppie NIL risulta spiegare solo circa il 50% della variazione osservata per la resa in granella, il che porta ad ipotizzare un'influenza anche di altri caratteri correlati come ad esempio il numero dei semi mq, risultato essere significativo per i soli dati del 2010.

Dai risultati ottenuti dalla popolazione Kofa × Svevo e dalle coppie NIL è stato possibile confermare la sovrapposizione dei QTL per il carattere resa in granella e vari caratteri morfo-fisiologici correlati in una stessa regione cromosomica, che porta ad ipotizzare un effetto pleiotropico di uno o più geni responsabili dell'espressione di tutti questi caratteri, fenomeno molto comune che è stato osservato anche per altri QTL (Snape 1985; Hilton *et al.*, 1999; Rebetzke *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2011).

Come nel caso delle RIL della popolazione Kofa × Svevo, anche per le coppie NIL gli eventi di ricombinazione sono insufficienti per il mappaggio fine di *Qyld.idw-3B*. Per raggiungere l'obiettivo finale del mappaggio fine di *Qyld.idw-3B* è indispensabile una caratterizzazione fenotipica su linee con quanti più possibili eventi di ricombinazione nella regione di *Qyld.idw-3B*.

Visto il rilevante effetto osservato per i caratteri altezza della pianta e lunghezza del peduncolo e vista la loro più semplice misurazione rispetto al carattere resa in granella, le linee segmentali sono state valutate per questi caratteri. Dalla valutazione fenotipica delle linee segmentali è stato possibile confermare la localizzazione del QTL nella stessa regione dove è stato localizzato *Qyld.idw-3B* nella popolazione Kofa × Svevo, ovvero in corrispondenza del contig 954 della mappa fisica di *T. aestivum*. Grazie alla maggiore risoluzione delle linee segmentali è stato possibile restringere l'intervallo di *Qyld.idw-3B* ad una regione di 0,4 cM.

La regione risulta essere caratterizzata in gran parte da marcatori dominanti localizzati in una stessa regione di 362 kb in *T. aestivum*, tutti caratterizzati dall'allele presente in Kofa (allele che contribuisce all'incremento del carattere) e assente in Svevo. Questo ha permesso di ipotizzare che tutta la regione non risulta essere presente in Svevo, e ciò si può spiegare ipotizzando o una delezione in Svevo o molto più probabilmente un'inserzione in Kofa, come è stato osservato anche in altre popolazioni di *T. aestivum* (Chinese Spring × Renan e Chinese Spring × Courtot) per le quali nella stessa regione sono stati identificati SSR tutti dominanti che risultano avere l'allele presente in Chinese Spring ed assente in Renan e Courtot (Saintenac *et al.*, 2011). Questa ipotesi ci permette di spiegare anche la mancanza di eventi di ricombinazione in questo intervallo per le linee segmentali analizzate, concludendo che la cultivar Kofa risulta essere filogeneticamente più simile a Chinese Spring mentre la cultivar Svevo risulta essere più simile a Renan e Courtot. Da tutto ciò si può ipotizzare anche un'origine polifiletica delle cultivar di *T. durum* e delle cultivar di *T. aestivum* (Zohary 1998).

La presenza di un elevato numero di elementi mobili CACTA nella regione di inserzione, identificati in seguito all'annotazione del contig 954 di Chinese Spring (Choulet *et al.* 2010), ci permette di ipotizzare che molto probabilmente sono questi elementi trasponibili i responsabili dell'inserzione dell'intera regione in Chinese Spring e allo stesso modo in Kofa. Sono proprio gli elementi CACTA che risultano essere responsabili del movimento di geni tra regioni cromosomiche (Wicker *et al.* 2003; Paterson *et al.*, 2009), come è stato osservato anche per altri elementi trasponibili della superfamiglia di *Mutator* (Jiang *et al.* 2004), *Helitron* (Li *et al.*, 2005; Morgante *et al.*, 2005), e *Harbinger* (International Brachypodium Initiative 2010).

Dall'annotazione del contig 954 di Chinese Spring (Choulet *et al.* 2010) è possibile identificare geni candidati che molto probabilmente risultano essere coinvolti nell'espressione dei caratteri; la regione ancorata alla mappa fisica che risulta avere i più alti valori di significatività associata ai caratteri è la regione delimitata dai marcatori *ubw3B55* e *cfb6033*, regione che comprende i 362 kb di intervallo presente solo in Kofa e assente in Svevo, che risulta essere caratterizzata in *T. aestivum* da 11 geni:

- ctg954b.00140, ctg954b.00150, ctg954b.00160: glicosil trasferasi simili a HGA;

- ctg954b.00170, ctg954b.00180, ctg954b.00210, ctg954b.00215, ctg954b.00215: ipotetiche proteine conservate;
- ctg954b.00216: pseudo-gene omologo ad una sequenza di dominio PAN;
- ctg954b.00217: frammento genico della proteina tirosin chinasi;
- ctg954b.00200: glutammato decarbossilasi.

Dalle informazioni presenti in letteratura la localizzazione del QTL coinvolto nella resistenza a fusariosi risulta essere localizzato in una regione diversa rispetto a quella dove è stato localizzato *Qyld.idw-3B* (Liu *et al.*, 2008) distante circa 1 cM, ma comunque identificata nello stesso contig. QTL di resistenza a fusariosi sono stati localizzati in corrispondenza del contig 954 in seguito alla valutazione fenotipica della popolazione Kofa × Svevo inoculata con il fungo (Maccaferri *et al.*, non pubblicato), effetto che è stato anche osservato nella valutazione delle coppie NIL nelle prove 2010 in seguito ad un'infezione non indotta, in cui le linee +/+ e le linee -/- hanno manifestato un effetto significativo alla risposta a fusariosi. Questi risultati e soprattutto la presenza dei geni per glicosil trasferasi nell'intervallo di *Qyld.idw-3B* inducono ad ipotizzare una possibile influenza della resistenza a fusariosi sul carattere resa in granello, visto che queste proteine sono direttamente coinvolte nella detossificazione del DON (trichothecene mycotoxin deoxynivalenol), micotossine prodotte in seguito all'infezione fungina (Lulin *et al.*, 2009; Snijders *et al.*, 2004; Poppenberger *et al.*, 2003). Va tuttavia sottolineato che *Qyld.idw-3B* si manifesta in condizioni ambientali diverse (Maccaferri *et al.*, 2008) sia in presenza che in assenza di infezioni da fusariosi (Maccaferri *et al.*, non pubblicato).

Il tentativo intrapreso per studiare e capire meglio quali siano le basi genetiche che risultano influenzare *Qyld.idw-3B* è stato quello di caratterizzare in modo dettagliato le 18 coppie NIL nelle tre diverse prove sperimentali. Dai risultati ottenuti è possibile concludere che la più ampia manifestazione dell'effetto di *Qyld.idw-3B* risulta essere associata alle caratteristiche strutturali della pianta: altezza della pianta e lunghezza del peduncolo. Le differenze tra linee +/+ e linee -/- si sono manifestate durante la fase di emergenza della spiga, momento in cui nella prova 2011 è stato anche possibile osservare una diversa colorazione fogliare; queste differenze molto probabilmente non sono dovute al diverso vigore delle linee ma piuttosto a diversi processi metabolici che vengono autoregolati dalla pianta durante il suo sviluppo ed anche in risposta a stress (Duvick *et al.*, 1992).

La forte differenza di produttività tra le NIL molto probabilmente è determinata da un diverso accumulo delle sostanze nutritive delle linee +/+ rispetto alle linee -/-, soprattutto nei momenti più critici dello sviluppo legati al contemporaneo utilizzo delle risorse sia per un accrescimento strutturale (altezza della pianta e lunghezza del peduncolo) sia per lo sviluppo degli organi riproduttivi (Frederick *et al.*, 1999). Questo è spiegato anche dal maggior accumulo di carboidrati (WSC) osservato per tutte le linee +/+ e da valori più alti di DwStem e DwSpike che vengono registrati sia ad antesi che a maturità rispetto alle piante -/- (Bonnet e Incoll, 1992; Schnyder, 1993; Slafer *et al.*, 1999).

Lo stesso gene glutammato decarbossilasi identificato nella regione sede di *Qyld.idw-3B* potrebbe essere a sua volta un importante gene candidato in quanto risulta essere coinvolto nella sintesi dell'acido γ -amminobutirrico (GABA). Questa molecola ha diverse funzioni nella regolazione del pH, nell'accumulo e riserva di azoto, nei processi di sviluppo e difesa della pianta e viene utilizzata anche come via metabolica alternativa per l'utilizzo di glutammato (Bown *et al.*, 1997; Satyanarayan *et al.*, 1990; Barry *et al.*, 1999).

È opportuno concludere che per chiarire e meglio caratterizzare l'effetto di *Qyld.idw-3B* è necessario:

- Sviluppare librerie genomiche specifiche per il cromosoma 3B sia per la cultivar Kofa che per la cultivar Svevo, per permettere di confermare i geni candidati identificati in *T. aestivum* o identificarne di nuovi e capire la diversa composizione genomica delle due varietà e i meccanismi che potrebbero essere alla base delle inserzioni o delezioni di vaste regioni.
- Confermare i dati fenotipici ottenuti dall'esperimento effettuato sulle linee segmentali nel 2011 in una nuova prova sperimentale allestita nel 2011/2012, con l'obiettivo non solo di validare quanto osservato nella prova precedente ma anche di valutare tutti gli altri caratteri (resa in granello, peso medio dei semi e SPAD) per confermare la stessa localizzazione genomica dei QTL come osservato dai risultati ottenuti sulla popolazione Kofa \times Svevo.
- Studiare meglio l'effetto della resistenza a fusariosi sul QTL attraverso un'analisi fenotipica indotta delle 18 coppie NIL e attraverso una valutazione molecolare dei geni responsabili dell'espressione delle glicosil trasferasi.
- Validare geni candidati identificati mediante una valutazione di espressione genica attraverso RT-PCR su diversi tessuti campionati a diversi stadi, per meglio studiare il diverso profilo di espressione di questi geni. Una volta studiata l'espressione genetica dei geni candidati, per meglio studiare le basi fisiologiche e molecolari di *Qyld.idw-3B* è necessario procedere con approcci di genomica inversa come la valutazione di una popolazione TILLING di frumento duro per identificare eventuali mutazioni dei geni, o attraverso approcci di trasformazione genetica che permetteranno di ottenere un'informazione più chiara di come questi geni candidati siano in grado di influenzare *QYld.idw-3B*.

BIBLIOGRAFIA

- Acevedo, E., Fereres, E., 1993. Resistance to abiotic stress, in: Hayward, M.D., Bosemark, N.O., Romagoza, I. (Eds.), *Plant Breeding Principles and Prospects*. London, Chapman & Hall, pp. 406-421.
- Akbari, M., Wenzl, P., Caig, V., Carling, J., Xia, L., Yang, S., Uszynski, G., Mohler, V., Lehmensiek, A., Kuchel, H., Hayden, M.J., Howes, N., Sharp, P., Vaughan, P., Rathmell, B., Huttner, E., Kilian, A., 2006. Diversity arrays technology (DART) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 113, 1409-20.
- Akhunov, E., Nicolet, C., Dvorak, J., 2009. Single nucleotide polymorphism genotyping in polyploid wheat with the Illumina GoldenGate assay. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 119, 507-17.
- Akhunov, E.D., Akhunova, A.R., Dvorák, J., 2005. BAC libraries of *Triticum urartu*, *Aegilops speltoides* and *Ae. tauschii*, the diploid ancestors of polyploid wheat. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 111, 1617-22.
- Akhunov, E.D., Akhunova, A.R., Linkiewicz, A.M., Dubcovsky, J., Hummel, D., Lazo, G., Chao, S., Anderson, O.D., David, J., Qi, L., Echalié, B., Gill, B.S., Miftahudin, Gustafson, J.P., La Rota, M., Sorrells, M.E., Zhang, D., Nguyen, H.T., Kalavacharla, V., Hossain, K., Kianian, S.F., Peng, J., Lapitan, N.L.V., Wennerlind, E.J., Nduati, V., Anderson, J.A., Sidhu, D., Gill, K.S., McGuire, P.E., Qualset, C.O., Dvorak, J., 2003. Synteny perturbations between wheat homoeologous chromosomes caused by locus duplications and deletions correlate with recombination rates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 10836-10841.
- Allouis, S., Moore, G., Bellec, A., Sharp, R., Faivre Rampant, P., Mortimer, K., Pateyron, S., Foote, T.N., Griffiths, S., Cabouche, M., Chalhoub, B., 2003. Construction and characterisation of a hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) BAC library from the reference germplasm "Chinese Spring". *Cereal research Communications* 31, 331-338.
- Alonso-Blanco, C., Aarts, M.G.M., Bentsink, L., Keurentjes, J.J.B., Reymond, M., Vreugdenhil, D., Koornneef, M., 2009. What Has Natural Variation Taught Us about Plant Development, Physiology, and Adaptation? *The Plant Cell* 21, 1877-1896.
- Alonso-Blanco, C., Koornneef, M., 2000. Naturally occurring variation in *Arabidopsis*: an underexploited resource for plant genetics. *Trends in Plant Science* 5, 22-29.
- Alpert, K.B., Tanksley, S.D., 1996. High-resolution mapping and isolation of a yeast artificial chromosome contig containing fw2.2: A major fruit weight quantitative trait locus in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 15503-15507.
- Anderson, O.D., Rausch, C., Moullet, O., Lagudah, E.S., 2003. The wheat D-genome HMW-glutenin locus: BAC sequencing, gene distribution, and retrotransposon clusters. *Functional integrative genomics* 3, 56-68.
- Andersson, L., Georges, M., 2004. Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits. *Nature Reviews Genetics* 5, 202-212.
- Annicchiarico, P., Royo, C., Bellah, F., Moragues, M., 2009. Relationships among adaptation patterns, morphophysiological traits and molecular markers in durum wheat. *Plant Breeding* 128, 164-171.

- Araus, J.L., Slafer, G. a., Royo, C., Serret, M.D., 2008. Breeding for Yield Potential and Stress Adaptation in Cereals. *Critical Reviews in Plant Sciences* 27, 377-412.
- Austin, R.B., Bingham, J., Blackwell, R.D., Evans, L.T., Ford, M.A., Morgan, C.L., Taylor, M., 1980. Genetic improvements in winter wheat yields since 1900 and associated physiological changes. *Journal of Agricultural Science* 94, 675-689.
- Austin, R.B., Edrich, J.A., Ford, M.A., Blackwell, R.D., 1977. The Fate of the Dry Matter, Carbohydrates and 14C Lost from the Leaves and Stems of Wheat during Grain Filling. *Ann. Bot.* 41, 1309-1321.
- Baenziger, P.S., Russell, W.K., Graef, G.L., Campbell, B.T., 2006. Improving Lives: 50 Years of Crop Breeding, Genetics, and Cytology (C-1). *Crop Science* 46, 2230-2244.
- Bailey, P.C., McKibbin, R.S., Lenton, J.R., Holdsworth, M.J., Flintham, J.E., Gale, M.D., 1999. Genetic map locations for orthologous *Vp1* genes in wheat and rice. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 98, 281-284.
- Barrett, B.A., Kidwell, K.K., 1998. AFLP-Based Genetic Diversity Assessment among Wheat Cultivars from the Pacific Northwest. *Crop Science* 38, 1261-1271.
- Barrett, B.A., Kidwell, K.K., Fox, P.N., 1998. CELL BIOLOGY & MOLECULAR GENETICS- Comparison of AFLP and Pedigree-Based Genetic Diversity Assessment Methods Using Wheat Cultivars from the Pacific Northwest. *Crop Science* 38, 1271-1277.
- Bassam, B.J., Caetano, A.G., Gresshoff, P.M., 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *AnalBiochem* 196, 80-83.
- Basten, C.J., Weir, B.S., Zeng, Z.-B., 2005. QTL Cartographer. North Carolina State University, Raleigh, NC. <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/>.
- Bennetzen, J.L., Ma, J., 2003. The genetic colinearity of rice and other cereals on the basis of genomic sequence analysis. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 128-133.
- Bennetzen, J.L., Ma, J., Devos, K.M., 2005. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. *Annals of Botany* 95, 127-32.
- Bennetzen, J.L., Ramakrishna, W., 2002. Numerous small rearrangements of gene content, order and orientation differentiate grass genomes. *Plant Molecular Biology* 48, 821-827.
- Bertin, I., Zhu, J.H., Gale, M.D., 2005. SSCP-SNP in pearl millet--a new marker system for comparative genetics. *Tag Theoretical And Applied Genetics Theoretische Und Angewandte Genetik* 110, 1467-1472.
- Bezant, J., Laurie, D., Pratchett, N., Chojecki, J., Kearsey, M., 1997. Mapping QTL controlling yield and yield components in a spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cross using marker regression. *Molecular Breeding* 29-38.
- Bhalla, P.L., Ottenhof, H.H., Singh, M.B., 2006. Wheat transformation – an update of recent progress. *Euphytica* 149, 353-366.
- Blanc, G., Charcosset, a, Mangin, B., Gallais, a, Moreau, L., 2006. Connected populations for detecting quantitative trait loci and testing for epistasis: an application in maize. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 113, 206-24.

- Blanco, a., Mangini, G., Giancaspro, a., Giove, S., Colasuonno, P., Simeone, R., Signorile, a., Vita, P., Mastrangelo, a. M., Cattivelli, L., Gadaleta, a., 2011. Relationships between grain protein content and grain yield components through quantitative trait locus analyses in a recombinant inbred line population derived from two elite durum wheat cultivars. *Molecular Breeding*.
- Blanco, A., Giorgi, B., Perrino, R., Simeone, R., 1990. Risorse genetiche e miglioramento della qualità del frumento duro. *Agricoltura Ricerca* 114, 41–58.
- Boschman, G.A., Manders, E.M., Rens, W., Slater, R., Aten, J.A., 1992. Semi-automated detection of aberrant chromosomes in bivariate flow karyotypes. *Cytometry* 13, 469-477.
- Bouchez, D., Hofte, H., 1998. Functional Genomics in Plants. *Plant Physiology* 118, 725-732.
- Bozzini, A., 1988. Origin, distribution, and production of durum wheat in the world., in: Fabriani, C., Lintas, C. (Eds.), *Durum Wheat: Chemistry and Technology*. Saint Paul. Minnesota. USA.
- Brenner, S., Johnson, M., Bridgham, J., Golda, G., Lloyd, D.H., Johnson, D., Luo, S., McCurdy, S., Foy, M., Ewan, M., Roth, R., George, D., Eletr, S., Albrecht, G., Vermaas, E., Williams, S.R., Moon, K., Burcham, T., Pallas, M., DuBridgde, R.B., Kirchner, J., Fearon, K., Mao, J., Corcoran, K., 2000. Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nature Biotechnology* 18, 630-634.
- Breseghele, F., Sorrells, M.E., 2006. Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Genetics* 172, 1165-1177.
- Brocklehurst, P.A., 1977. Factors controlling grain weight in wheat. *Nature* 26, 348-349.
- Brookes, A.J., 1999. The essence of SNPs. *Gene* 234, 177-186.
- Brunner, S., Pea, G., Rafalski, A., 2005. Origins, genetic organization and transcription of a family of non-autonomous helitron elements in maize. *The Plant Journal* 43, 799-810.
- Bureau, T.E., Wessler, S.R., 1994a. Mobile inverted-repeat elements of the Tourist family are associated with the genes of many cereal grasses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 1411-1415.
- Bureau, T.E., Wessler, S.R., 1994b. Stowaway: a new family of inverted repeat elements associated with the genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants. *The Plant Cell* 6, 907-916.
- Burkhamer, R.L., Lanning, S.P., Martens, R.J., Martin, J.M., Talbert, L.E., Lew, F., Lew, G., Amidon, L., 1998. Predicting Progeny Variance from Parental Divergence in Hard Red Spring Wheat. *Genome* 38, 243-248.
- Börner, a., Schumann, E., Fürste, a., Cöster, H., Leithold, B., Röder, S., Weber, E., 2002. Mapping of quantitative trait loci determining agronomic important characters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 105, 921-936.
- Cadalen, T., Boeuf, C., Bernard, S., Bernard, M., 1997. An intervarietal molecular marker map in *Triticum aestivum* L. Em. Thell. and comparison with a map from a wide cross. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 94, 367-377.

- Campbell, B.T., Baenziger, P.S., Gill, K.S., Eskridge, K.M., Budak, H., Erayman, M., Dweikat, I., Yen, Y., 2003. Identification of QTLs and Environmental Interactions Associated with Agronomic Traits on Chromosome 3A of Wheat. *Crop Sci.* 43, 1493-1505.
- Cardon, L.R., Bell, J.I., 2001. Association study designs for complex diseases. *Nature Reviews Genetics* 2, 91-99.
- Cattivelli, L., Baldi, P., Crosatti, C., Grossi, M., Vale', G., Stanca, A.M., 2002. Genetic bases of barley physiological responses to stressful conditions., in: Slafer, G.A., Molina-Cano, J.L., Savin, R., Araus, J.L., Romagosa, I. (Eds.), *Barley Science: Recent Advances from Molecular Biology to Agronomy of Yield and Quality*. Food Product Press, New York-USA., pp. 307-360.
- Cenci, a, Chantret, N., Kong, X., Gu, Y., Anderson, O.D., Fahima, T., Distelfeld, a, Dubcovsky, J., 2003. Construction and characterization of a half million clone BAC library of durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. durum). *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 107, 931-9.
- Cenci, A., D'Ovidio, R., Tanzarella, O.A., Ceoloni, C., Porceddu, E., 1999. Identification of molecular markers linked to Pm13 , an *Aegilops longissima* gene conferring resistance to powdery mildew in wheat. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 98, 448-454.
- Chantret, N., Salse, J., Sabot, F., Rahman, S., Bellec, A., Laubin, B., Dubois, I., Dossat, C., Sourdille, P., Joudrier, P., Gautier, M.-F., Cattolico, L., Beckert, M., Aubourg, S., Weissenbach, J., Caboche, M., Bernard, M., Leroy, P., Chalhoub, B., 2005. Molecular Basis of Evolutionary Events That Shaped the Hardness Locus in Diploid and Polyploid Wheat Species (*Triticum* and *Aegilops*). *The Plant Cell* 17, 1033-1045.
- Chao, S., Sharp, P.J., Worland, A.J., Warham, E.J., Koebner, R.M.D., Gale, M.D., 1989. RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics* 78, 495-504.
- Chao, S., Zhang, W., Dubcovsky, J., Sorrells, M., 2007. Evaluation of Genetic Diversity and Genome-wide Linkage Disequilibrium among U.S. Wheat (*L.*) Germplasm Representing Different Market Classes. *Crop Science* 47, 1018-1030.
- Chen, X., Levine, L., Kwok, P.-Y., 1999. Fluorescence Polarization in Homogeneous Nucleic Acid Analysis. *Genome Research* 9, 492-498.
- Choulet, F., Wicker, T., Rustenholz, C., Paux, E., Salse, J., Leroy, P., Schlub, S., Le Paslier, M.-C., Magdelenat, G., Gonthier, C., Couloux, A., Budak, H., Breen, J., Pumphrey, M., Liu, S., Kong, X., Jia, J., Gut, M., Brunel, D., Anderson, J. a, Gill, B.S., Appels, R., Keller, B., Feuillet, C., 2010. Megabase level sequencing reveals contrasted organization and evolution patterns of the wheat gene and transposable element spaces. *The Plant cell* 22, 1686-701.
- Collins, N.C., Tardieu, F., Tuberosa, R., 2008. Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: where do we stand? *Plant physiology* 147, 469-86.
- Cong, B., Liu, J., Tanksley, S.D., 2002. Natural alleles at a tomato fruit size quantitative trait locus differ by heterochronic regulatory mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 13606-13611.

- Consoli, L., Lefèvre, A., Zivy, M., De Vienne, D., Damerval, C., 2002. QTL analysis of proteome and transcriptome variations for dissecting the genetic architecture of complex traits in maize. *Plant Molecular Biology* 48, 575-81.
- Conti, V., Roncallo, P.F., Beaufort, V., Cervigni, G.L., Miranda, R., Jensen, C. a, Echenique, V.C., 2011. Mapping of main and epistatic effect QTLs associated to grain protein and gluten strength using a RIL population of durum wheat. *Journal of applied genetics* 52, 287-98.
- Coulson, A., Sulston, J., Brenner, S., Karn, J., 1986. Toward a physical map of the genome of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 7821-7825.
- Crossa, J., Burgueño, J., Dreisigacker, S., Vargas, M., Herrera-Foessel, S. a, Lillemo, M., Singh, R.P., Trethowan, R., Warburton, M., Franco, J., Reynolds, M., Crouch, J.H., Ortiz, R., 2007. Association analysis of historical bread wheat germplasm using additive genetic covariance of relatives and population structure. *Genetics* 177, 1889-913.
- Deng, S., Wu, X., Wu, Y., Zhou, R., Wang, H., Jia, J., Liu, S., 2011. Characterization and precise mapping of a QTL increasing spike number with pleiotropic effects in wheat. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 122, 281-9.
- Deschamps, S., Campbell, M.A., 2010. Utilization of next-generation sequencing platforms in plant genomics and genetic variant discovery *Molecular Breeding* 25, 553–570.
- Devos, K.M., 2005. Updating the “crop circle”. *Current opinion in plant biology* 8, 155-62.
- Devos, K.M., Brown, J.K.M., Bennetzen, J.L., 2002. Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in *Arabidopsis*. *Genome Research* 12, 1075-1079.
- Devos, K.M., Gale, M.D., 1997. Comparative genetics in the grasses. *Plant molecular biology* 35, 3-15.
- Dilbirligi, M., Erayman, M., Campbell, B.T., Randhawa, H.S., Baenziger, P.S., Dweikat, I., Gill, K.S., 2006. High-density mapping and comparative analysis of agronomically important traits on wheat chromosome 3A. *Genomics* 88, 74-87.
- Distelfeld, A., Uauy, C., Fahima, T., Dubcovsky, J., 2006. Physical map of the wheat high-grain protein content gene *Gpc-B1* and development of a high-throughput molecular marker. *The New phytologist* 169, 753-63.
- Doebley, J., Stec, A., Hubbard, L., 1997. The evolution of apical dominance in maize. *Nature* 386, 485-488.
- Doerge, R.W., 2002. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nature reviews. Genetics* 3, 43-52.
- Dolezel, J., Ciháľková, J., Lucretti, S., 1992. A high-yield Procedure for Isolation of Metaphase Chromosomes from Root Tips of *Vicia faba* L. *Planta* 188, 93-98.
- Dolezel, J., Kubaláková, M., Paux, E., Bartos, J., Feuillet, C., 2007. Chromosome-based genomics in the cereals. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 15, 51-66.
- Donald, C.M., 1968. The breeding of crop ideotypes. *Euphytica* 17, 385-403.

- Dong, C., Vincent, K., Sharp, P., 2009. Simultaneous mutation detection of three homoeologous genes in wheat by High Resolution Melting analysis and Mutation Surveyor. *BMC Plant Biology* 9, 143.
- Draper, J., Mur, L.A.J., Jenkins, G., Ghosh-Biswas, G.C., Bablak, P., Hasterok, R., Routledge, A.P.M., 2001. *Brachypodium distachyon*. A New Model System for Functional Genomics in Grasses I. *Plant Physiology* 127, 1539-1555.
- Dubcovsky, J., Loukoianov, A., Bonafede, M.D., 2007. Regulation of flowering time in wheat. *Production* 659-665.
- Dvorak, J., Yang, Z.-L., You, F.M., Luo, M.-C., 2004. Deletion polymorphism in wheat chromosome regions with contrasting recombination rates. *Genetics* 168, 1665-1675.
- Dweikat, I., Mackenzie, S., Levy, M., Ohm, H., 1993. Pedigree assessment using RAPD-DGGE in cereal crop species. *Theoretical and Applied Genetics* 85, 497-505.
- Elouafi, I., Nachit, M.M., 2004. A genetic linkage map of the Durum x *Triticum dicoccoides* backcross population based on SSRs and AFLP markers, and QTL analysis for milling traits. TAG. *Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 108, 401-13.
- Endo, T.R., Gill, B.S., 1996. The Deletion Stocks of Common Wheat. *Journal of Heredity* 87, 295-307.
- Ersoz, E., Yu, J., Buckler, E., 2008. Applications of linkage disequilibrium and association mapping., in: Varshney, R., Tuberosa, R. (Eds.), *Genomics-assisted Crop Improvement*, Vol. 1. *Genomics Approaches and Platforms*. Dordrecht: Springer, pp. 97-120.
- Eshed, Y., Zamir, D., 1994. A genomic library of *Lycopersicon pennellii* in *L. esculentum*: A tool for fine mapping of genes. *Euphytica* 79, 175-179.
- Evenson, R.E., Gollin, D., 2003. Assessing the Impact of the Green Revolution, 1960 to 2000. *Science* 300, 758-762.
- FAOSTAT, 2009. . URL <http://faostat.fao.org>
- Fan, J.B., Oliphant, A., Shen, R., Kermani, B.G., Garcia, F., Gunderson, K.L., Hansen, M., Steemers, F., Butler, S.L., Deloukas, P., Galver, L., Hunt, S., McBride, C., Bibikova, M., Rubano, T., Chen, J., Wickham, E., Doucet, D., Chang, W., Campbell, D., Zhang, B., Kruglyak, S., Bentley, D., Haas, J., Rigault, P., Zhou, L., Stuelpnagel, J., Chee, M.S., 2003. Highly parallel SNP genotyping. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 68, 69-78.
- Faris, J.D., Fellers, J.P., Brooks, S.A., Gill, B.S., 2003. A bacterial artificial chromosome contig spanning the major domestication locus Q in wheat and identification of a candidate gene. *Genetics* 164, 311-21.
- Feldman, M., Levy, A.A., 2005. Allopolyploidy--a shaping force in the evolution of wheat genomes. *Cytogenetic and Genome Research* 109, 250-258.
- Feuillet, C., Keller, B., 2002. Comparative genomics in the grass family: molecular characterization of grass genome structure and evolution. *Annals of Botany* 89, 3-10.

- Feuillet, C., Travella, S., Stein, N., Albar, L., Nublát, A., Keller, B., 2003. Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene Lr10 from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 15253-15258.
- Fischer, R.A., 1984. Wheat., in: Smith, W.H., Banta, S.J. (Eds.), *Symposium on Potential Productivity of Field Crops Under Different Environments*. IRRI: Los Baños, pp. 129-153.
- Fischer, R.A., 2009. Number of kernels in wheat crops and the influence of solar radiation and temperature. *The Journal of Agricultural Science* 105, 447.
- Flavell, A.J., Knox, M.R., Pearce, S.R., Ellis, T.H., 1998. Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis. *The Plant Journal* 16, 643-650.
- Flavell, A.J., Smith, D.B., Kumar, A., 1992. Extreme heterogeneity of *Ty1-copia* group retrotransposons in plants, *Molecular and General Genetics MGG*. Springer Berlin / Heidelberg.
- Flint-Garcia, S.A., Thornsberry, J.M., Buckler, E.S., 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annual Review of Plant Biology* 54, 357-374.
- Foulkes, M.J., Sylvester-Bradley, R., Worland, A.J., Snape, J.W., 2004. Effects of a photoperiod-response gene *Ppd-D1* on yield potential and drought resistance in UK winter wheat. *Euphytica* 135, 63-73.
- Francki, M., Appels, R., 2002. Minireview Wheat functional genomics and engineering crop improvement. *Euphytica* 1-5.
- Frary, A., Nesbitt, T.C., Grandillo, S., Knaap, E., Cong, B., Liu, J., Meller, J., Elber, R., Alpert, K.B., Tanksley, S.D., 2000. *fw2.2*: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* 289, 85-88.
- Frederick, J.R., Bauer, P.J., 1999. Physiological and numerical components of wheat yield. *Wheat Ecology and Physiology of Yield Determination* 45-65.
- Frederick, J.R., Camberato, J.J., 1995a. Water and Nitrogen Effects on Winter Wheat in the Southeastern Coastal Plain: I. Grain Yield and Kernel Traits. *Agronomy Journal* 87, 521-526.
- Frederick, J.R., Camberato, J.J., 1995b. Water and Nitrogen Effects on Winter Wheat in the Southeastern Coastal Plain: II. Physiological Responses. *Agronomy Journal* 87, 527-533.
- Fridman, E., Pleban, T., Zamir, D., 2000. A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 4718-4723.
- Fulton, T.M., Hoeven, R.V.D., Eannetta, N.T., Tanksley, S.D., 2002. Identification, Analysis, and Utilization of Conserved Ortholog Set Markers for Comparative Genomics in Higher Plants. *Society* 14, 1457-1467.
- Gaut, B.S., 2002. Evolutionary dynamics of grass genomes. *New Phytologist* 15-28.
- Geldermann, H., 1975. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. *Theoretical and Applied Genetics* 46, 319-330.

- Gill, B.S., Appels, R., Botha-Oberholster, A.-M., Buell, C.R., Bennetzen, J.L., Chalhoub, B., Chumley, F., Dvořák, J., Iwanaga, M., Keller, B., Li, W., McCombie, W.R., Ogihara, Y., Quetier, F., Sasaki, T., 2004. A workshop report on wheat genome sequencing: International Genome Research on Wheat Consortium. Genetics.
- Giuliani, S., Sanguineti, M.C., Tuberosa, R., Bellotti, M., Salvi, S., Landi, P., 2005. *Root-ABAI*, a major constitutive QTL, affects maize root architecture and leaf *ABA* concentration at different water regimes. *Journal of Experimental Botany* 56, 3061-3070.
- Goff, S.A., Ricke, D., Lan, T.-H., Presting, G., Wang, R., et al., 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science (New York, N.Y.)* 296, 92-100.
- Gibbon, B.M., Pearce, S.R., Kalendar, R., Schulman, A.H., Paulin, L., Jack, P., Kumar, A., Flavell, A.J., 1999. Phylogeny and transpositional activity of *Ty1-copia* group retrotransposons in cereal genomes. *Molecular general genetics MGG* 261, 883-891.
- Gunderson, K.L., 2009. Whole-genome genotyping on bead arrays. *Methods In Molecular Biology Clifton Nj* 529, 197-213.
- Gupta, P.K., Mir, R.R., Mohan, a, Kumar, J., 2008. Wheat genomics: present status and future prospects. *International journal of plant genomics* 2008, 896451.
- Gupta, P.K., Rustgi, S., 2004. Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. *Functional Integrative Genomics* 4, 139-162.
- Gupta, P.K., Rustgi, S., Kumar, N., 2006. Genetic and molecular basis of grain size and grain number and its relevance to grain productivity in higher plants. *Genome* 571, 565-571.
- Gupta, P.K., Varshney, R.K., Sharma, P.C., Ramesh, B., 1999. Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breeding* 118, 369-390.
- Haas, B.J., Zody, M.C., 2010. Advancing RNA-Seq analysis. *Nature biotechnology* 28, 421-3.
- Habash, D.Z., Kehel, Z., Nachit, M., 2009. Genomic approaches for designing durum wheat ready for climate change with a focus on drought. *Journal of Experimental Botany* 60, 2805-2815.
- Haldane, J., 1919. The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. *J Genet* 8, 299 - 309.
- Hay, R.K.M., Walker, A.J., 1989. An introduction to the physiology of crop yield. Longman Scientific & Technical - Science.
- Henikoff, S., Till, B.J., Comai, L., 2004. TILLING. Traditional Mutagenesis Meets Functional Genomics. *Plant Physiology* 135, 630-636.
- Heun, M., Kennedy, A.E., Anderson, J.A., Lapitan, N.L.V., Sorrells, M.E., Tanksley, S.D., 1991. Construction of a restriction fragment length polymorphism map for barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* 34, 437-447.
- Horvath, A., Didier, A., Koenig, J., Exbrayat, F., Charmet, G., Balfourier, F., 2009. Analysis of diversity and linkage disequilibrium along chromosome 3B of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Tag Theoretical And Applied Genetics Theoretische Und Angewandte Genetik* 119, 1523-1537.

- Huang, L., Brooks, S.A., Li, W., Fellers, J.P., Trick, H.N., Gill, B.S., 2003. Map-based cloning of leaf rust resistance gene *Lr21* from the large and polyploid genome of bread wheat. *Genetics* 164, 655-664.
- Huang, X.-Q., Röder, M.S., 2004. Molecular mapping of powdery mildew resistance genes in wheat: A review. *Euphytica* 137, 203-223.
- Huang, X.Q., Cloutier, S., Lycar, L., Radovanovic, N., Humphreys, D.G., Noll, J.S., Somers, D.J., Brown, P.D., 2006. Molecular detection of QTLs for agronomic and quality traits in a doubled haploid population derived from two Canadian wheats (*Triticum aestivum* L.). *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 113, 753-66.
- Huang, X.Q., Kempf, H., Ganai, M.W., Röder, M.S., 2004. Advanced backcross QTL analysis in progenies derived from a cross between a German elite winter wheat variety and a synthetic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Tag Theoretical And Applied Genetics Theoretische Und Angewandte Genetik* 109, 933-943.
- Hunt, L.A., Poorten, G. van der, Pararajasingham, S., 1991. Postanthesis temperature effects on duration and rate of grain filling in some winter and spring wheats. *Canadian Journal of Plant Science* 71, 609-617.
- Huo, N., Vogel, J.P., Lazo, G.R., You, F.M., Ma, Y., McMahon, S., Dvorak, J., Anderson, O.D., Luo, M.-C., Gu, Y.Q., 2009. Structural characterization of *Brachypodium* genome and its syntenic relationship with rice and wheat. *Plant molecular biology* 70, 47-61.
- International Rice Genome Sequencing Project, 2005. The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436, 793-800.
- Isidore, E., Scherrer, B., Bellec, A., Budin, K., Faivre-Rampant, P., Waugh, R., Keller, B., Caboche, M., Feuillet, C., Chalhoub, B., 2005. Direct targeting and rapid isolation of BAC clones spanning a defined chromosome region. *Functional & integrative genomics* 5, 97-103.
- Isidore, E., Scherrer, B., Chalhoub, B., Feuillet, C., Keller, B., 2005. Ancient haplotypes resulting from extensive molecular rearrangements in the wheat A genome have been maintained in species of three different ploidy levels. *Genome Research* 15, 526-536.
- Janda, J., Bartos, J., Safár, J., Kubaláková, M., Valárik, M., Cíhalíková, J., Simková, H., Caboche, M., Sourdille, P., Bernard, M., Chalhoub, B., Dolezel, J., 2004. Construction of a subgenomic BAC library specific for chromosomes 1D, 4D and 6D of hexaploid wheat. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 109, 1337-45.
- Janda, J., Safár, J., Kubaláková, M., Bartos, J., Kovárová, P., Suchánková, P., Pateyron, S., Cíhalíková, J., Sourdille, P., Simková, H., Faivre-Rampant, P., Hribová, E., Bernard, M., Lukaszewski, A., Dolezel, J., Chalhoub, B., 2006. Advanced resources for plant genomics: a BAC library specific for the short arm of wheat chromosome 1B. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 47, 977-86.
- Jander, G., Norris, S.R., Rounsley, S.D., Bush, D.F., Levin, I.M., Last, R.L., 2002. *Arabidopsis* Map-Based Cloning in the Post-Genome Era. *Plant Physiology* 129, 440-450.
- Jansen, R.C., 1993. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 135, 205-11.

- Jansen, R.C., Nap, J.P., 2001. Genetical genomics: the added value from segregation. *Trends in Genetics* 17, 388-391.
- Jansen, R.C., Stam, P., 1994. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics* 136, 1447-1455.
- Jiang, N., Bao, Z., Zhang, X., Eddy, S.R., Wessler, S.R., 2004. *Pack-MULE* transposable elements mediate gene evolution in plants. *Nature* 431, 569-573.
- Jin, Y.K., Bennetzen, J.L., 1994. Integration and nonrandom mutation of a plasma membrane proton *ATPase* gene fragment within the *Bs1* retroelement of maize. *The Plant Cell* 6, 1177-1186.
- Kaeppler, S.M., 1997. Quantitative trait locus mapping using sets of near-isogenic lines: relative power comparisons and technical considerations. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 95, 384-392.
- Kalendar, R., Grob, T., Regina, M., Suoniemi, A., Schulman, A., 1999. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 98, 704-711.
- Kalendar, R., Tanskanen, J., Immonen, S., Nevo, E., Schulman, A.H., 2000. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by *BARE-1* retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 6603-6607.
- Kantety, R.V., La Rota, M., Matthews, D.E., Sorrells, M.E., 2002. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Molecular Biology* 48, 501-510.
- Kao, C.H., Zeng, Z.B., Teasdale, R.D., 1999. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 152, 1203-16.
- Kellogg, E. a, 2001. Evolutionary history of the grasses. *Plant physiology* 125, 1198-205.
- Kenward, K.D., Bai, D., Ban, M.R., Brandle, J.E., 1999. Isolation and characterization of *Tnd-1*, a retrotransposon marker linked to black root rot resistance in tobacco. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 98, 387-395.
- Kilian, A., Chen, J., Han, F., Steffenson, B., Kleinhofs, A., 1997. Towards map-based cloning of the barley stem rust resistance genes *Rpg1* and *Rpg4* using rice as an intergenomic cloning vehicle. *Plant Molecular Biology* 35, 187-195.
- Kiniry, J.R., 1993. Nonstructural Carbohydrate Utilization by Wheat Shaded during Grain Growth. *Agronomy Journal* 85, 844.
- Kirby, E.J.M., Spink, J.H., Frost, D.L., Sylvester-Bradley, R., Scott, R.K., Foulkes, M.J., Clare, R.W., Evans, E.J., 1999. A study of wheat development in the field: analysis by phases. *European Journal of Agronomy* 11, 63-82.
- Koester, R.P., Sisco, P.H., Stuber, C.W., 1993. Identification of Quantitative Trait Loci Controlling Days to Flowering and Plant Height in Two Near Isogenic Lines of Maize. *Crop Science* 33, 1209.

- Kong, X.-Y., Gu, Y.Q., You, F.M., Dubcovsky, J., Anderson, O.D., 2004. Dynamics of the evolution of orthologous and paralogous portions of a complex locus region in two genomes of allopolyploid wheat. *Plant Molecular Biology* 54, 55-69.
- Krattinger, S., Wicker, T., Keller, B., Muehlbauer, G.J., Feuillet, C., 2009. *Genetics and Genomics of the Triticeae*. Springer New York, New York, NY.
- Kubaláková, M., Kovárová, P., Suchánková, P., Cíhalíková, J., Bartos, J., Lucretti, S., Watanabe, N., Kianian, S.F., Dolezel, J., 2005. Chromosome sorting in tetraploid wheat and its potential for genome analysis. *Genetics* 170, 823-9.
- Kubaláková, M., Vrána, J., Cíhalíková, J., Simková, H., Dolezel, J., 2002. Flow karyotyping and chromosome sorting in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 104, 1362-1372.
- Kumar, A., Pearce, S.R., McLean, K., Harrison, G., Heslop-Harrison, J.S., Waugh, R., Flavell, A.J., 1997. The *Ty1-copia* group of retrotransposons in plants: genomic organisation, evolution, and use as molecular markers. *Genetica* 100, 205-17.
- Kumar, N., Kulwal, P.L., Balyan, H.S., Gupta, P.K., 2006. QTL mapping for yield and yield contributing traits in two mapping populations of bread wheat. *Molecular Breeding* 19, 163-177.
- Landi, P., Giuliani, S., Salvi, S., Ferri, M., Tuberosa, R., Sanguineti, M.C., 2010. Characterization of *root-yield-1.06*, a major constitutive QTL for root and agronomic traits in maize across water regimes. *Journal of experimental botany* 61, 3553-62.
- Landi, P., Sanguineti, M.C., Liu, C., Li, Y., Wang, T.Y., Giuliani, S., Bellotti, M., Salvi, S., Tuberosa, R., 2007. *Root-ABA1* QTL affects root lodging, grain yield, and other agronomic traits in maize grown under well-watered and water-stressed conditions. *Journal of experimental botany* 58, 319-26.
- Landsberg, J.J., 1977. Effects of weather on plant development, in: Landsberg, J., Cutting, C.V. (Eds.), *Environmental Effect on Crop Physiology*. Academic Press London, pp. 289-307.
- Lee, J.H., Arumuganathan, K., Kaeppler, S.M., Papa, C.M., Kaeppler, H.F., 1996. Cell synchronization and isolation of metaphase chromosomes from maize (*Zea mays* L.) root tips for flow cytometric analysis and sorting. *Genome National Research Council Canada Genome Conseil national de recherches Canada* 39, 697-703.
- Levy, A.A., Feldman, M., 2002. The Impact of Polyploidy on Grass Genome Evolution. *Plant Physiology* 130, 1587-1593.
- Lewin, B., 1997. *Genes VI*. Oxford University Press.
- Li, W.L., Nelson, J.C., Chu, C.Y., Shi, L.H., Huang, S.H., Liu, D.J., 2002. Chromosomal locations and genetic relationships of tiller and spike characters in wheat, *Euphytica*. Springer Netherlands.
- Li, X., Qian, Q., Fu, Z., Wang, Y., Xiong, G., Zeng, D., Wang, X., Liu, X., Teng, S., Hiroshi, F., Yuan, M., Luo, D., Han, B., Li, J., 2003. Control of tillering in rice. *Nature* 422, 618-621.
- Li, Z., Pinson, S., Park, W.D., Paterson, A.H., Stansel, J.W., 1997. Epistasis for Three Grain Yield Components in Rice (*Oryza Sativa* L.). *Genetics* 145, 453-465.

- Li, Z.K., Luo, L.J., Mei, H.W., Wang, D.L., Shu, Q.Y., Tabien, R., Zhong, D.B., Ying, C.S., Stansel, J.W., Khush, G.S., Paterson, A.H., 2001. Overdominant epistatic loci are the primary genetic basis of inbreeding depression and heterosis in rice. I. Biomass and grain yield. *Genetics* 158, 1737-1753.
- Lijavetzky, D., Muzzi, G., Wicker, T., Keller, B., Wing, R., Dubcovsky, J., 1999. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome (BAC) library for the A genome of wheat. *Genome* 42, 1176-1182.
- Lin, Y.R., Schertz, K.F., Paterson, A.H., 1995. Comparative analysis of QTLs affecting plant height and maturity across the *Poaceae*, in reference to an interspecific sorghum population. *Genetics* 141, 391-411.
- Liu, S., Anderson, J.A., 2003. Targeted molecular mapping of a major wheat QTL for *Fusarium* head blight resistance using wheat ESTs and synteny with rice. *Genome / National Research Council Canada = Génome / Conseil national de recherches Canada* 46, 817-23.
- Liu, S., Pumphrey, M.O., Gill, B.S., Trick, H.N., Zhang, J.X., Dolezel, J., Chalhoub, B., Anderson, J. a., 2008. Toward positional cloning of *Fhb1*, a major QTL for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Cereal Research Communications* 36, 195-201.
- Liu, Y.G., Nagaki, K., Fujita, M., Kawaura, K., Uozumi, M., Ogihara, Y., 2000. Development of an efficient maintenance and screening system for large-insert genomic DNA libraries of hexaploid wheat in a transformation-competent artificial chromosome (TAC) vector. *The Plant Journal* 23, 687-695.
- Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K., 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4, 357-362.
- Loukoianov, A., Yan, L., Blechl, A., Sanchez, A., Dubcovsky, J., Regional, W., 2005. Regulation of *VRN-1* Vernalization Genes in Normal and Transgenic Polyploid Wheat 1. *Regulation* 138, 2364-2373.
- Luo, M.-C., Thomas, C., You, F.M., Hsiao, J., Ouyang, S., Buell, C.R., Malandro, M., McGuire, P.E., Anderson, O.D., Dvorak, J., 2003. High-throughput fingerprinting of bacterial artificial chromosomes using the snapshot labeling kit and sizing of restriction fragments by capillary electrophoresis. *Genomics* 82, 378-389.
- Lysák, M.A., Cíhalíková, J., Kubaláková, M., Simková, H., Künzel, G., Dolezel, J., 1999. Flow karyotyping and sorting of mitotic chromosomes of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Chromosome research an international journal on the molecular supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 7, 431-444.
- Ma, Z., Weining, S., Sharp, P.J., Liu, C., 2000. Non-gridded library: a new approach for BAC (bacterial artificial chromosome) exploitation in hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). *Nucleic Acids Research* 28, e106.
- Ma, Z., Zhao, D., Zhang, C., Zhang, Z., Xue, S., Lin, F., Kong, Z., Tian, D., Luo, Q., 2007. Molecular genetic analysis of five spike-related traits in wheat using RIL and immortalized F2 populations. *Molecular genetics and genomics MGG* 277, 31-42.

- Maccaferri, M., Sanguineti, M.C., Corneti, S., Ortega, J.L.A., Salem, M.B., Bort, J., DeAmbrogio, E., del Moral, L.F.G., Demontis, A., El-Ahmed, A., Maalouf, F., Machlab, H., Martos, V., Moragues, M., Motawaj, J., Nachit, M., Nserallah, N., Ouabbou, H., Royo, C., Slama, A., Tuberosa, R., 2008. Quantitative trait loci for grain yield and adaptation of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) across a wide range of water availability. *Genetics* 178, 489-511.
- Maccaferri, M., Sanguineti, M.C., Demontis, A., El-Ahmed, A., Garcia del Moral, L., Maalouf, F., Nachit, M., Nserallah, N., Ouabbou, H., Rhouma, S., Royo, C., Villegas, D., Tuberosa, R., 2011. Association mapping in durum wheat grown across a broad range of water regimes. *Journal of experimental botany* 62, 409-38.
- Maccaferri, M., Sanguineti, M.C., Mantovani, P., Demontis, A., Massi, A., Ammar, K., Kolmer, J.A., Czembor, J.H., Ezrati, S., Tuberosa, R., 2010. Association mapping of leaf rust response in durum wheat. *Molecular Breeding* 26, 189-228.
- Mago, R., Tabe, L., McIntosh, R. a, Pretorius, Z., Kota, R., Paux, E., Wicker, T., Breen, J., Lagudah, E.S., Ellis, J.G., Spielmeier, W., 2011. A multiple resistance locus on chromosome arm 3BS in wheat confers resistance to stem rust (*Sr2*), leaf rust (*Lr27*) and powdery mildew. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 123, 615-23.
- Mantovani, P., Maccaferri, M., Sanguineti, M.C., Tuberosa, R., Catizone, I., Wenzl, P., Thomson, B., Carling, J., Huttner, E., DeAmbrogio, E., Kilian, A., 2008. An integrated DArT-SSR linkage map of durum wheat. *Molecular Breeding* 22, 629-648.
- Mao, L., Wood, T.C., Yu, Y., Budiman, M.A., Tomkins, J., Woo, S.-sick, Sasinowski, M., Presting, G., Frisch, D., Goff, S., Dean, R.A., Wing, R.A., 2000. Rice Transposable Elements: A Survey of 73,000 Sequence-Tagged-Connectors. *Genome Research* 10, 982-990.
- Marguerat, S., Bähler, J., 2010. RNA-seq: from technology to biology. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67, 569-79.
- Marza, F., Bai, G.-H., Carver, B.F., Zhou, W.-C., 2006. Quantitative trait loci for yield and related traits in the wheat population Ning7840 x Clark. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 112, 688-98.
- Mayer, K.F.X., Martis, M., Hedley, P.E., Simková, H., Liu, H., Morris, J. a, Steuernagel, B., Taudien, S., Roessner, S., Gundlach, H., Kubaláková, M., Suchánková, P., Murat, F., Felder, M., Nussbaumer, T., Graner, A., Salse, J., Endo, T., Sakai, H., Tanaka, T., Itoh, T., Sato, K., Platzer, M., Matsumoto, T., Scholz, U., Dolezel, J., Waugh, R., Stein, N., 2011. Unlocking the barley genome by chromosomal and comparative genomics. *The Plant cell* 23, 1249-63.
- McCallum, C.M., Comai, L., Greene, E.A., Henikoff, S., 2000. Targeted screening for induced mutations. *Nature Biotechnology* 18, 455-457.
- McGinnis, K.M., 2010. RNAi for functional genomics in plants. *Briefings in functional genomics* 9, 111-117.
- Mccartney, C.A., Somers, D.J., Humphreys, D.G., Lukow, O., Ames, N., Noll, J., Cloutier, S., 2005. Mapping quantitative trait loci controlling agronomic traits in the spring wheat cross RL4452 × “AC Domain”. *Environments* 883, 870-883.
- Metzker, M.L., 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nature reviews. Genetics* 11, 31-46.

- Meyers, B.C., Vu, T.H., Tej, S.S., Ghazal, H., Matvienko, M., Agrawal, V., Ning, J., Haudenschild, C.D., 2004. Analysis of the transcriptional complexity of *Arabidopsis thaliana* by massively parallel signature sequencing. *Nature Biotechnology* 22, 1006-1011.
- Miralles, D.J., Slafer, G.A., 1999. Wheat development, in: Satorre, E.H., Slafer, G.A. (Eds.), *Wheat: Ecology and Physiology of Yield Determination*. Food Production Press.
- Monneveux, P., Zaharieva, M., Rekika, D., 2000. The utilisation of *Triticum* and *Aegilops* species for the improvement of durum wheat, in: Royo, C., Nachit, M.M., Di Fonzo, N., Araus, J.L. (Eds.), *Durum Wheat Improvement in the Mediterranean Region: New Challenges*. CIHEAM, Centre UdI-IRTA, ICARDA, CIMMYT, Zaragoza. *Options Méditerranéennes, Series A*, 40: 71-83.
- Moore, G., Devos, K.M., Wang, Z., Gale, M.D., 1995. Cereal genome evolution. Grasses, line up and form a circle. *Current Biology* 5, 737-739.
- Morgante, M., Brunner, S., Pea, G., Fengler, K., Zuccolo, A., Rafalski, A., 2005. Gene duplication and exon shuffling by helitron-like transposons generate intraspecies diversity in maize. *Nature genetics* 37, 997-1002.
- Morgante, M., Salamini, F., 2003. From plant genomics to breeding practice. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 214-219.
- Moulet, O., Zhang, H.-B., Lagudah, E.S., 1999. Construction and characterisation of a large DNA insert library from the D genome of wheat. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 99, 305-313.
- Nakazono, M., Qiu, F., Borsuk, L.A., Schnable, P.S., 2003. Laser-capture microdissection, a tool for the global analysis of gene expression in specific plant cell types: identification of genes expressed differentially in epidermal cells or vascular tissues of maize. *The Plant Cell* 15, 583-596.
- Narasimhamoorthy, B., Gill, B.S., Fritz, a K., Nelson, J.C., Brown-Guedira, G.L., 2006. Advanced backcross QTL analysis of a hard winter wheat x synthetic wheat population. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 112, 787-96.
- Nijman, I.J., Kuipers, S., Verheul, M., Guryev, V., Cuppen, E., 2008. A genome-wide SNP panel for mapping and association studies in the rat. *BMC Genomics* 9, 95.
- Nilmalgoda, S., Cloutier, S., 2003. characterization of a bacterial artificial chromosome (BAC) library of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) and validation of genome coverage using locus-specific. *Genome* 878, 870-878.
- Olivier, M., 2005. The Invader assay for SNP genotyping. *Mutation research* 573, 103-10.
- Van Ooijen, J.W., 2006. JoinMap 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma BV Wageningen Netherlands.
- Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K., 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphism using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5, 874-879.
- Osborn, T.C., Alexander, D.C., Fobes, J.F., 1987. Identification of restriction fragment length polymorphisms linked to genes controlling soluble solids content in tomato fruit. *Theoretical and Applied Genetics* 73, 350-356.

- Panjabi, P., Jagannath, A., Bisht, N.C., Padmaja, K.L., Sharma, S., Gupta, V., Pradhan, A.K., Pental, D., 2008. Comparative mapping of *Brassica juncea* and *Arabidopsis thaliana* using Intron Polymorphism (IP) markers: homoeologous relationships, diversification and evolution of the A, B and C *Brassica* genomes. *BMC genomics* 9, 113.
- Paterson, A.H., Bowers, J.E., Bruggmann, R., Dubchak, I., Grimwood, J., Gundlach, H., Haberer, G., Hellsten, U., Mitros, T., Poliakov, A., Schmutz, J., Spannagl, M., Tang, H., Wang, X., Wicker, T., Bharti, A.K., Chapman, J., Feltus, F.A., Gowik, U., Grigoriev, I.V., Lyons, E., Maher, C.A., Martis, M., Narechania, A., Otiillar, R.P., Penning, B.W., Salamov, A.A., Wang, Y., Zhang, L., Carpita, N.C., Freeling, M., Gingle, A.R., Hash, C.T., Keller, B., Klein, P., Kresovich, S., McCann, M.C., Ming, R., Peterson, D.G., Mehboob-ur-Rahman, Ware, D., Westhoff, P., Mayer, K.F.X., Messing, J., Rokhsar, D.S., 2009. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature* 457, 551-556.
- Paterson, A.H., Damon, S., Hewitt, J.D., Zamir, D., Rabinowitch, H.D., Lincoln, S.E., Lander, E.S., Tanksley, S.D., 1991. Mendelian Factors Underlying Quantitative Traits in Tomato: Comparison across Species, Generations, and Environments. *Genetics* 127, 181-197.
- Paterson, A.H., Lin, Y.R., Li, Z., Schertz, K.F., Doebley, J.F., Pinson, S.R., Liu, S.C., Stansel, J.W., Irvine, J.E., 1995. Convergent domestication of cereal crops by independent mutations at corresponding genetic Loci. *Science (New York, N.Y.)* 269, 1714-8.
- Paux, E., Faure, S., Choulet, F., Roger, D., Gauthier, V., Martinant, J.-P., Sourdille, P., Balfourier, F., Le Paslier, M.-C., Chauveau, A., Cakir, M., Gandon, B., Feuillet, C., 2010. Insertion site-based polymorphism markers open new perspectives for genome saturation and marker-assisted selection in wheat. *Plant Biotechnology Journal* 8, 196-210.
- Paux, E., Gao, L., Faure, S., Choulet, F., Roger, D., Chevalier, K., Balfourier, F., Paux, K., Cakir, M., Brunel, D., Paslier, M.-christine L., Krugman, T., Gandon, B., Nevo, E., Bernard, M., Sourdille, P., Feuillet, C., 2007. Insertion site-based polymorphism : A Swiss army knife for wheat genomics. *Genome* 4-6.
- Paux, E., Roger, D., Badaeva, E., Gay, G., Bernard, M., Sourdille, P., Feuillet, C., 2006. Characterizing the composition and evolution of homoeologous genomes in hexaploid wheat through BAC-end sequencing on chromosome 3B. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 48, 463-74.
- Paux, E., Sourdille, P., Mackay, I., Feuillet, C., 2011. Sequence-based marker development in wheat: Advances and applications to breeding. *Biotechnology advances*.
- Paux, E., Sourdille, P., Salse, J., Saintenac, C., Choulet, F., Leroy, P., Korol, A., Michalak, M., Kianian, S., Spielmeier, W., Lagudah, E., Somers, D., Kilian, A., Alaux, M., Vautrin, S., Bergès, H., Eversole, K., Appels, R., Safar, J., Simkova, H., Dolezel, J., Bernard, M., Feuillet, C., 2008. A physical map of the 1-gigabase bread wheat chromosome 3B. *Science (New York, N.Y.)* 322, 101-4.
- Peng, J., Ronin, Y., Fahima, T., Röder, M.S., Li, Y., Nevo, E., Korol, A., 2003. Domestication quantitative trait loci in *Triticum dicoccoides*, the progenitor of wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 2489-94.
- Peters, J.L., Cnudde, F., Gerats, T., 2003. Forward genetics and map-based cloning approaches. *Trends in Plant Science* 8, 484-491.

- Peña, R.J., 2002. Wheat for bread and other foods, in: Curtis, B.C., Rajaram, S., Macpherson, H.G. (Eds.), Bread Wheat: Improvement and Production. FAO, Rome.
- Pfeiffer, W.H., Sayre, M.P., Reynolds, K.D., 2000. Enhancing genetic grain yield potential and yield stability in durum wheat., in: Royo, C., Nachit, M.M., Di Fonzo, N., Araus, J.L. (Eds.), Durum Wheat Improvement in the Mediterranean Region: New Challenges. Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens ; n. 40, CIHEAM-IAMZ Zaragoza, pp. 83-93.
- Pierce, J.C., Sternberg, N., Sauer, B., 1992. A mouse genomic library in the bacteriophage P1 cloning system: organization and characterization. Mammalian genome official journal of the International Mammalian Genome Society 3, 550-558.
- Pumphrey, M.O., Bernardo, R., Anderson, J. a., 2007. Validating the QTL for *Fusarium* Head Blight Resistance in Near-Isogenic Wheat Lines Developed from Breeding Populations. Crop Science 47, 200.
- Qi, L.L., Echalié, B., Chao, S., Lazo, G.R., Butler, G.E., Anderson, O.D., Akhunov, E.D., Dvořák, J., Linkiewicz, a M., Ratnasiri, a, Dubcovsky, J., Bermudez-Kandianis, C.E., Greene, R. a, Kantety, R., La Rota, C.M., Munkvold, J.D., Sorrells, S.F., Sorrells, M.E., Dilbirligi, M., Sidhu, D., Erayman, M., Randhawa, H.S., Sandhu, D., Bondareva, S.N., Gill, K.S., Mahmoud, a a, Ma, X.-F., Miftahudin, Gustafson, J.P., Conley, E.J., Nduati, V., Gonzalez-Hernandez, J.L., Anderson, J. a, Peng, J.H., Lapitan, N.L.V., Hossain, K.G., Kalavacharla, V., Kianian, S.F., Pathan, M.S., Zhang, D.S., Nguyen, H.T., Choi, D.-W., Fenton, R.D., Close, T.J., McGuire, P.E., Qualset, C.O., Gill, B.S., 2004. A chromosome bin map of 16,000 expressed sequence tag loci and distribution of genes among the three genomes of polyploid wheat. Genetics 168, 701-12.
- Qin, B., Cao, A., Wang, H., Chen, T., You, F.M., Liu, Y., Ji, J., Liu, D., Chen, P., Wang, X.-e, 2011. Collinearity-based marker mining for the fine mapping of *Pm6*, a powdery mildew resistance gene in wheat. TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik 123, 207-18.
- Quarrie, S. a, Steed, a, Calestani, C., Semikhodskii, a, Lebreton, C., Chinoy, C., Steele, N., Pljevljakusić, D., Waterman, E., Weyen, J., Schondelmaier, J., Habash, D.Z., Farmer, P., Saker, L., Clarkson, D.T., Abugalieva, a, Yessimbekova, M., Turuspekov, Y., Abugalieva, S., Tuberosa, R., Sanguineti, M.-C., Hollington, P. a, Aragués, R., Royo, a, Dodig, D., 2005. A high-density genetic map of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) from the cross Chinese Spring x SQ1 and its use to compare QTLs for grain yield across a range of environments. TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik 110, 865-80.
- Quarrie, S., Pekic Quarrie, S., Radosevic, R., Rancic, D., Kaminska, a, Barnes, J.D., Leverington, M., Ceoloni, C., Dodig, D., 2006. Dissecting a wheat QTL for yield present in a range of environments: from the QTL to candidate genes. Journal of experimental botany 57, 2627-37.
- Quraishi, U.M., Abrouk, M., Bolot, S., Pont, C., Throude, M., Guilhot, N., Confolent, C., Bortolini, F., Praud, S., Murigneux, A., Charmet, G., Salse, J., 2009. Genomics in cereals: from genome-wide conserved orthologous set (COS) sequences to candidate genes for trait dissection. Functional & integrative genomics 9, 473-84.
- Rafalski, A., 2002. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. Current opinion in plant biology 5, 94-100.
- Rafalski, J.A., 2010. Association genetics in crop improvement. Current Opinion in Plant Biology 13, 174-180.

- Ramsay, L.D., Jennings, D.E., Kearsey, M.J., Marshall, D.F., Bohuon, E.J., Arthur, A.E., Lydiate, D.J., 1996. The construction of a substitution library of recombinant backcross lines in *Brassica oleracea* for the precision mapping of quantitative trait loci. *Genome National Research Council Canada Genome Conseil national de recherches Canada* 39, 558-567.
- Ravel, C., Praud, S., Murigneux, A., Linossier, L., Dardevet, M., Balfourier, F., Dufour, P., Brunel, D., Charmet, G., 2006. Identification of *Glu-B1-1* as a candidate gene for the quantity of high-molecular-weight glutenin in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) by means of an association study. *Tag Theoretical And Applied Genetics Theoretische Und Angewandte Genetik* 112, 738-743.
- Rawson, H., Hindmarsh, J., Fischer, R., Stockman, Y., 1983. Changes in Leaf Photosynthesis With Plant Ontogeny and Relationships With Yield Per Ear in Wheat Cultivars and 120 Progeny. *Australian Journal of Plant Physiology* 10, 503.
- Reimer, S., Pozniak, C.J., Clarke, F.R., Clarke, J.M., Somers, D.J., Knox, R.E., Singh, A.K., 2008. Association mapping of yellow pigment in an elite collection of durum wheat cultivars and breeding lines. *Genome National Research Council Canada Genome Conseil national de recherches Canada* 51, 1016-1025.
- Reynolds, M., Manes, Y., Izanloo, A., Langridge, P., 2009. Phenotyping approaches for physiological breeding and gene discovery in wheat. *Annals of Applied Biology* 155, 309-320.
- Reynolds, M., Ortiz-Monasterio, J., McNab, A., 2001. Application of Physiology in Wheat Breeding, *Physiology*. Cimmyt.
- Reynolds, M., Tuberosa, R., 2008. Translational research impacting on crop productivity in drought-prone environments. *Current opinion in plant biology* 11, 171-9.
- Richards, R.A., 1992a. The Effect of Dwarfing Genes in Spring Wheat in Dry Environments . I . *Agronomic Characteristics*. Springer.
- Richards, R.A., 1992b. The Effect of Dwarfing Genes in Spring Wheat in Dry Environments . II . * *Growth , Water Use and Water-use Efficiency*. Water.
- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T., 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry* 245, 154-60.
- Rostoks, N., Ramsay, L., MacKenzie, K., Cardle, L., Bhat, P.R., Roose, M.L., Svensson, J.T., Stein, N., Varshney, R.K., Marshall, D.F., Graner, A., Close, T.J., Waugh, R., 2006. Recent history of artificial outcrossing facilitates whole-genome association mapping in elite inbred crop varieties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 18656-18661.
- La Rota, M., Sorrells, M.E., 2004. Comparative DNA sequence analysis of mapped wheat ESTs reveals the complexity of genome relationships between rice and wheat. *Functional integrative genomics* 4, 34-46.
- Ryan, B.F., Joiner, B.L., Ryan, T.A., 1985. *Minitab Handbook*, Ed. 2. PWS Publishers, Boston.
- Röder, M.S., Huang, X.-Q., Börner, A., 2008. Fine mapping of the region on wheat chromosome 7D controlling grain weight. *Functional integrative genomics* 8, 79-86.

- Röder, M.S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M.H., Leroy, P., Ganal, M.W., 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149, 2007-2023.
- Safár, J., Bartos, J., Janda, J., Bellec, A., Kubaláková, M., Valárik, M., Pateyron, S., Weiserová, J., Tusková, R., Cíhalíková, J., Vrána, J., Simková, H., Faivre-Rampant, P., Sourdille, P., Caboche, M., Bernard, M., Dolezel, J., Chalhou, B., 2004. Dissecting large and complex genomes: flow sorting and BAC cloning of individual chromosomes from bread wheat. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 39, 960-8.
- Saintenac, C., Faure, S., Remay, A., Choulet, F., Ravel, C., Paux, E., Balfourier, F., Feuillet, C., Sourdille, P., 2011. Variation in crossover rates across a 3-Mb contig of bread wheat (*Triticum aestivum*) reveals the presence of a meiotic recombination hotspot. *Chromosoma* 120, 185-98.
- Salimath, S.S., Bhattacharyya, M.K., 1999. Generation of a soybean BAC library, and identification of DNA sequences tightly linked to the *Rps1-k* disease resistance gene. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 98, 712-720.
- Salse, J., Abrouk, M., Murat, F., Quraishi, U.M., Feuillet, C., 2009. Improved criteria and comparative genomics tool provide new insights into grass paleogenomics. *Briefings in Bioinformatics* 10, 619-630.
- Salse, J., Bolot, S., Throude, M., Jouffe, V., Piegu, B., Quraishi, U.M., Calcagno, T., Cooke, R., Delseny, M., Feuillet, C., 2008. Identification and characterization of shared duplications between rice and wheat provide new insight into grass genome evolution. *The Plant cell* 20, 11-24.
- Salse, J., Feuillet, C., 2007. Comparative genomics of cereals, in: Varshney, R.K., Tuberosa, R. (Eds.), *Genomics-Assisted Crop Improvement*, Vol. 1. Springer, pp. 177-205.
- Salse, J., Piégu, B., Cooke, R., Delseny, M., 2002. Synteny between *Arabidopsis thaliana* and rice at the genome level: a tool to identify conservation in the ongoing rice genome sequencing project. *Nucleic Acids Research* 30, 2316-2328.
- Salvi, S., Corneti, S., Bellotti, M., Carraro, N., Sanguineti, M.C., Castelletti, S., Tuberosa, R., 2011. Genetic dissection of maize phenology using an intraspecific introgression library. *BMC Plant Biology* 11, 4.
- Salvi, S., Tuberosa, R., 2005. To clone or not to clone plant QTLs: present and future challenges. *Trends in plant science* 10, 297-304.
- SanMiguel, P.J., Ramakrishna, W., Bennetzen, J.L., Busso, C.S., Dubcovsky, J., 2002. Transposable elements, genes and recombination in a 215-kb contig from wheat chromosome 5A(m). *Functional integrative genomics* 2, 70-80.
- Sanchez, J.J., Børsting, C., Hallenberg, C., Buchard, A., Hernandez, A., Morling, N., 2003. Multiplex PCR and minisequencing of SNPs--a model with 35 Y chromosome SNPs. *Forensic Science International* 137, 74-84.
- Sanford, J.C., 1990. Biolistic plant transformation. *Physiologia Plantarum* 79, 206-209.
- Schadt, E.E., Monks, S.A., Drake, T.A., Lusk, A.J., Che, N., Colinayo, V., Ruff, T.G., Milligan, S.B., Lamb, J.R., Cavet, G., Linsley, P.S., Mao, M., Stoughton, R.B., Friend, S.H., 2003. Genetics of gene expression surveyed in maize, mouse and man. *Nature* 422, 297-302.

- Schaeffer, M., Byrne, P., Coe, E.H., 2006. Consensus quantitative trait maps in maize: A database strategy. *Maydica* 51, 357-367 ST - Consensus quantitative trait maps in.
- Schmidt, R., 2000. Synteny: recent advances and future prospects. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 97-102.
- Schulman, A.H., 2006. Molecular markers to assess genetic diversity. *Euphytica* 158, 313-321.
- Schulman, A.H., Flavell, A.J., Ellis, T.H.N., 2004. The application of *LTR* retrotransposons as molecular markers in plants. *Methods In Molecular Biology Clifton Nj* 260, 145-173.
- Sedgley, R.H., 1991. An Appraisal of the Donald Ideotype after 21 Years. *Field Crops Research* 26, 93-112.
- Siddique, K.H., Kirby, E.J.M., Perry, M.W., 1989. Ear stem ratio in old and modern wheat varieties: relationship with improvement in number of grains per ear and yield. *Field Crops Research* 21, 59-78.
- Simmonds, J.R., Fish, L.J., Leverington-Waite, M.A., Wang, Y., Howell, P., Snape, J.W., 2008. Mapping of a gene (*Vir*) for a non-glaucous, viridescent phenotype in bread wheat derived from *Triticum dicoccoides*, and its association with yield variation. *Euphytica* 159, 333-341.
- Simmons, S., 1987. Growth, development, and physiology., in: Heyne, E.G. (Ed.), *Wheat and Wheat Improvement* 2nd Edition. Agronomy No. 13, ASA-CSSA-SSSA Publishers, Madison, Wisconsin., pp. 77-114.
- Slade, A.J., Fuerstenberg, S.I., Loeffler, D., Steine, M.N., Facciotti, D., 2005. A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. *Nature biotechnology* 23, 75-81.
- Slafer, G.A., 2003. Genetic basis of yield as viewed from a crop physiologist's perspective. *Annals of Applied Biology* 142, 117-128.
- Slafer, G.A., Andrade, F.H., 1993. Physiological attributes related to the generation of grain yield in bread wheat cultivars released at different eras. *Field Crops Research* 31, 351-367.
- Slafer, G.A., Araus, J.L., Richards, R.A., 1999. Physiological traits that increase the yield potential of wheat, in: *Wheat Ecology and Physiology of Yield Determination 1999* 379-415. New York USA: Haworth Press Inc..
- Slafer, G.A., Rawson, H.M., 1994. Sensitivity of Wheat Phasic Development to Major Environmental Factors: a Re-Examination of Some Assumptions Made by Physiologists and Modellers. *Australian Journal of Plant Physiology* 21, 393-426.
- Slageren, M., 1994. Wild wheats: a monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. & Spach) Eig (*Poaceae*). ICARDA / Wageningen Agricultural University Papers 94(7): i-xiv, 1-512.
- Snape, J.W., Foulkes, M.J., Simmonds, J., Leverington, M., Fish, L.J., Wang, Y., Ciavarrella, M., 2006. Dissecting gene \times environmental effects on wheat yields via QTL and physiological analysis. *Euphytica* 154, 401-408.
- Soderlund, C., Humphray, S., Dunham, A., French, L., 2000. Contigs Built with Fingerprints, Markers, and FPC V4.7. *Genome Research* 10, 1772-1787.

- Somers, D.J., Isaac, P., Edwards, K., 2004. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik 109, 1105-14.
- Somerville, C., 1999. Plant Functional Genomics. Science 285, 380-383.
- Sorrells, M., Yu, J., 2009. Linkage disequilibrium and association mapping in the *Triticeae*, in: Feuillet, C., Muehlbauer, G. (Eds.), Genetics and Genomics of the *Triticeae*. Springer, New York, pp. 655–683.
- Sourdille, P., Singh, S., Cadalen, T., Brown-Guedira, G.L., Gay, G., Qi, L., Gill, B.S., 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.
- Staden, R., 1980. A new computer method for the storage and manipulation of DNA gel reading data. Nucleic Acids Research 8, 3673-3694.
- Takahashi, Y., Shomura, A., Sasaki, T., Yano, M., 2001. *Hd6*, a rice quantitative trait locus involved in photoperiod sensitivity, encodes the α subunit of protein kinase *CK2*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 7922-7927.
- Talamè, V., Bovina, R., Sanguineti, M.C., Tuberosa, R., Lundqvist, U., Salvi, S., 2008. TILLMore, a resource for the discovery of chemically induced mutants in barley. Plant biotechnology journal 6, 477-85.
- Talbert, L.E., Blake, N.K., Storlie, E.W., Lavin, M., 1995. Variability in wheat based on low-copy DNA sequence comparisons. Genome National Research Council Canada Genome Conseil national de recherches Canada 38, 951-957.
- Tanksley, S.D., Ganal, M.W., Martin, G.B., 1995. Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. Trends in Genetics 11, 63-68.
- Tanksley, S.D., Nelson, J.C., 1996. Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. Theoretical and Applied Genetics 92, 191-203.
- Tardieu, F., Tuberosa, R., 2010. Dissection and modelling of abiotic stress tolerance in plants. Current Opinion in Plant Biology 13, 206-212.
- The International Brachypodium Initiative, 2010. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. Nature 463, 763-8.
- Tuberosa, R., Salvi, S., 2006. Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. Trends in Plant Science 11, 405-412.
- Tuberosa, R., Salvi, S., Sanguineti, M.C., Landi, P., Maccaferri, M., Conti, S., 2002. Mapping QTLs regulating morpho-physiological traits and yield: case studies, shortcomings and perspectives in drought-stressed maize. Annals of Botany 89 Spec No, 941-963.
- Tuberosa, R., Salvi, S., Sanguineti, M.C., Maccaferri, M., Giuliani, S., Landi, P., 2003. Searching for quantitative trait loci controlling root traits in maize: a critical appraisal. Plant and Soil 255, 35-54.

- Tuberosa, R., Sanguineti, M.C., Landi, P., Giuliani, M.M., Salvi, S., Conti, S., 2002. Identification of QTLs for root characteristics in maize grown in hydroponics and analysis of their overlap with QTLs for grain yield in the field at two water regimes. *Plant Molecular Biology* 48, 697-712.
- Tuinstra, M.R., Ejeta, G., Goldsbrough, P.B., 1997. Heterogeneous inbred family (HIF) analysis: a method for developing near-isogenic lines that differ at quantitative trait loci. *Theoretical and Applied Genetics (TAG)* 1005-1011.
- Turner, A., Beales, J., Faure, S., Dunford, R.P., Laurie, D.A., 2005. The pseudo-response regulator *Ppd-H1* provides adaptation to photoperiod in barley. *Science (New York, N.Y.)* 310, 1031-4.
- Uauy, C., Distelfeld, A., Fahima, T., Blechl, A., Dubcovsky, J., 2006. A NAC Gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science (New York, N.Y.)* 314, 1298-301.
- Varshney, R., Sigmund, R., Borner, A., Korzun, V., Stein, N., Sorrells, M., Langridge, P., Graner, A., 2005. Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice. *Plant Science* 168, 195-202.
- Varshney, R.K., Thiel, T., Stein, N., Langridge, P., Graner, A., 2002. In silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. *Cellular molecular biology letters* 7, 537-546.
- Venter, J.C., Smith, H.O., Hood, L., 1996. A new strategy for genome sequencing. *Nature* 381, 364-366.
- Verma, V., Foulkes, M.J., Worland, A.J., Snape, J.W., 2004. Mapping quantitative trait loci for flag leaf senescence as a yield determinant in winter wheat under optimal and drought-stressed environments. *Beaver* 255-263.
- Vogel, J.P., Gu, Y.Q., Twigg, P., Lazo, G.R., Laudencia-Chingcuanco, D., Hayden, D.M., Donze, T.J., Vivian, L.A., Stamova, B., Coleman-Derr, D., 2006. EST sequencing and phylogenetic analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Tag Theoretical And Applied Genetics Theoretische Und Angewandte Genetik* 113, 186-195.
- Vrána, J., Kubaláková, M., Simková, H., Cíhalíková, J., Lysák, M.A., Doležel, J., 2000. Flow sorting of mitotic chromosomes in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetics* 156, 2033-2041.
- Waldron, B.L., Moreno-Sevilla, B., Anderson, J.A., Stack, R.W., Frohberg, R.C., 1999. RFLP Mapping of QTL for *Fusarium* Head Blight Resistance in Wheat. *Crop Sci* 39, 805-811.
- Wan, X.Y., Wan, J.M., Jiang, L., Wang, J.K., Zhai, H.Q., Weng, J.F., Wang, H.L., Lei, C.L., Wang, J.L., Zhang, X., Cheng, Z.J., Guo, X.P., 2006. QTL analysis for rice grain length and fine mapping of an identified QTL with stable and major effects. *Tag Theoretical And Applied Genetics Theoretische Und Angewandte Genetik* 112, 1258-1270.
- Wan, X.Y., Wan, J.M., Weng, J.F., Jiang, L., Bi, J.C., Wang, C.M., Zhai, H.Q., 2005. Stability of QTLs for rice grain dimension and endosperm chalkiness characteristics across eight environments. *Tag Theoretical And Applied Genetics Theoretische Und Angewandte Genetik* 110, 1334-1346.
- Wang, M.L., Leitch, A.R., Schwarzacher, T., Heslop-Harrison, J.S., Moore, G., 1992. Construction of a chromosome-enriched HpaII library from flow-sorted wheat chromosomes. *Nucleic Acids Research* 20, 1897-1901.

- Wang, S., Basten, C.J., Gaffney, P., Zeng, Z.B., 2005. WindowsQTL Cartographer 2.5. WindowsQTL Cartographer 2.5. North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Ware, D., Jaiswal, P., Ni, J., Pan, X., Chang, K., Clark, K., Teytelman, L., Schmidt, S., Zhao, W., Cartinhour, S., McCouch, S., Stein, L., 2002. Gramene: a resource for comparative grass genomics. *Nucleic Acids Research* 30, 103-105.
- Waugh, R., Jannink, J.-L., Muehlbauer, G.J., Ramsay, L., 2009. The emergence of whole genome association scans in barley. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 218-222.
- Wayne, M.L., McIntyre, L.M., 2002. Combining mapping and arraying: An approach to candidate gene identification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 14903-14906.
- Wei, F., Coe, E., Nelson, W., Bharti, A.K., Engler, F., Butler, E., Kim, H., Goicoechea, J.L., Chen, M., Lee, S., Fuks, G., Sanchez-Villeda, H., Schroeder, S., Fang, Z., McMullen, M., Davis, G., Bowers, J.E., Paterson, A.H., Schaeffer, M., Gardiner, J., Cone, K., Messing, J., Soderlund, C., Wing, R. a., 2007. Physical and genetic structure of the maize genome reflects its complex evolutionary history. *PLoS genetics* 3, e123.
- Wenzl, P., Suchánková, P., Carling, J., Simková, H., Huttner, E., Kubaláková, M., Sourdille, P., Paul, E., Feuillet, C., Kilian, A., Dolezel, J., 2010. Isolated chromosomes as a new and efficient source of DArT markers for the saturation of genetic maps. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 121, 465-74.
- Wicker, T., Buchmann, J.P., Keller, B., 2010. Patching gaps in plant genomes results in gene movement and erosion of colinearity. *Genome Research* 20, 1229-1237.
- Wicker, T., Guyot, R., Yahiaoui, N., Keller, B., 2003. CACTA transposons in *Triticeae*. A diverse family of high-copy repetitive elements. *Plant Physiology* 132, 52-63.
- Wicker, T., Mayer, K.F.X., Gundlach, H., Martis, M., Steuernagel, B., Scholz, U., Simková, H., Kubaláková, M., Choulet, F., Taudien, S., Platzer, M., Feuillet, C., Fahima, T., Budak, H., Dolezel, J., Keller, B., Stein, N., 2011. Frequent gene movement and pseudogene evolution is common to the large and complex genomes of wheat, barley, and their relatives. *The Plant cell* 23, 1706-18.
- Wicker, T., Stein, N., Albar, L., Feuillet, C., Schlagenhauf, E., Keller, B., 2001. Analysis of a contiguous 211 kb sequence in diploid wheat (*Triticum monococcum* L.) reveals multiple mechanisms of genome evolution. *The Plant Journal* 26, 307-316.
- Wicker, T., Yahiaoui, N., Guyot, R., Schlagenhauf, E., Liu, Z.-D., Dubcovsky, J., Keller, B., 2003. Rapid Genome Divergence at Orthologous Low Molecular Weight Glutenin Loci of the A and Am Genomes of Wheat. *The Plant Cell* 15, 1186-1197.
- Wright, M., Dawson, J., Dunder, E., Suttie, J., Reed, J., Kramer, C., Chang, Y., Novitzky, R., Wang, H., Artim-Moore, L., 2001. Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the selectable marker. *Plant Cell Reports* 20, 429-436.
- Wright, W.T., Heggarty, S.V., Young, I.S., Nicholls, D.P., Whittall, R., Humphries, S.E., Graham, C.A., 2008. Multiplex MassARRAY spectrometry (iPLEX) produces a fast and economical test for 56 familial hypercholesterolaemia-causing mutations. *Clinical Genetics* 74, 463-468.

- Wu, J., Mizuno, H., Hayashi-Tsugane, M., Ito, Y., Chiden, Y., Fujisawa, M., Katagiri, S., Saji, S., Yoshiki, S., Karasawa, W., Yoshihara, R., Hayashi, A., Kobayashi, H., Ito, K., Hamada, M., Okamoto, M., Ikeno, M., Ichikawa, Y., Katayose, Y., Yano, M., Matsumoto, T., Sasaki, T., 2003. Physical maps and recombination frequency of six rice chromosomes. *The Plant Journal* 36, 720-730.
- Wu, M.-F., Tian, Q., Reed, J.W., 2006. *Arabidopsis* microRNA167 controls patterns of *ARF6* and *ARF8* expression, and regulates both female and male reproduction. *Development* Cambridge England 133, 4211-8.
- Yadav, R.S., Hash, C.T., Bidinger, F.R., Cavan, G.P., Howarth, C.J., 2002. Quantitative trait loci associated with traits determining grain and stover yield in pearl millet under terminal drought-stress conditions. *Theoretical and Applied Genetics* TAG 104, 67-83.
- Yahiaoui, N., Srichumpa, P., Dudler, R., Keller, B., 2004. Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene *Pm3b* from hexaploid wheat. *The Plant Journal* 37, 528-538.
- Yamamoto, T., Nagasaki, H., Yonemaru, J., Ebana, K., Nakajima, M., Shibaya, T., Yano, M., 2010. Fine definition of the pedigree haplotypes of closely related rice cultivars by means of genome-wide discovery of single-nucleotide polymorphisms. *BMC Genomics* 11, 267.
- Yan, J., Yang, X., Shah, T., Sánchez-Villeda, H., Li, J., Warburton, M., Zhou, Y., Crouch, J.H., Xu, Y., 2010. High-throughput SNP genotyping with the GoldenGate assay in maize. *Molecular Breeding* 25, 441-451.
- Yan, L., Helguera, M., Kato, K., Fukuyama, S., Sherman, J., Dubcovsky, J., 2004. Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploid wheat. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 109, 1677-86.
- Yan, L., Loukoianov, a, Tranquilli, G., Helguera, M., Fahima, T., Dubcovsky, J., 2003. Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 6263-8.
- Yang, J., Zhang, J., Wang, Z., Liu, L., Zhu, Q., 2003. Postanthesis Water Deficits Enhance Grain Filling in Two-Line Hybrid Rice. *Crop Science* 2108, 2099-2108.
- Yano, M., Katayose, Y., Ashikari, M., Yamanouchi, U., Monna, L., Fuse, T., Baba, T., Yamamoto, K., Umehara, Y., Nagamura, Y., Sasaki, T., 2000. *Hdl*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. *The Plant Cell* 12, 2473-2484.
- Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G.K.-S., Li, S., et al., 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Science (New York, N.Y.)* 296, 79-92.
- Yu, J., Wang, J., Lin, W., Li, S., Li, H., et al., 2005. The Genomes of *Oryza sativa*: a history of duplications. *PLoS Biology* 3, e38.
- Zadoks, J.C., Chang, T.T., Konzak, C.F., 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14, 415-421.
- Zamir, D., 2001. Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nature Reviews Genetics* 2, 983-989.

- Zeng, H., Zhong, Y., Luo, L., 2006. Drought tolerance genes in rice. *Funct Integr Genomics* 6, 52230528-52230528.
- Zeng, Z.B., 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136, 1457-68.
- Zeng, Z.B., Kao, C.H., Basten, C.J., 1999. Estimating the genetic architecture of quantitative traits. *Genetical research* 74, 279-89.
- Zhang, L.-Y., Liu, D.-C., Guo, X.-L., Yang, W.-L., Sun, J.-Z., Wang, D.-W., Zhang, A., 2010. Genomic distribution of quantitative trait loci for yield and yield-related traits in common wheat. *Journal of integrative plant biology* 52, 996-1007.
- Zhang, X., Borevitz, J.O., 2009. Global Analysis of Allele-Specific Expression in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 182, 943-954.
- Zhou, R., Zhu, Z., Kong, X., Huo, N., Tian, Q., Li, P., Jin, C., Dong, Y., Jia, J., 2005. Development of wheat near-isogenic lines for powdery mildew resistance. *Tag Theoretical And Applied Genetics Theoretische Und Angewandte Genetik* 110, 640-648.
- Zohary, D., Feldman, M., 1962. Hybridization between amphidiploids and the evolution of polyploids in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *Evolution* 16, 44-61.