

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN**

**Scienze Agroambientali**

Ciclo XXV

**Settore Concorsuale di afferenza: 07/E1**

**Settore Scientifico disciplinare:AGR/07**

**Studio di caratteri correlati a stress idrico in una  
collezione di cultivar di frumento duro  
(*Triticum durum* Desf.)**

**Presentata da: Dott.ssa ROSSELLA FRANCIA**

**Coordinatore Dottorato :**

**Chiar.mo Prof. Giovanni Dinelli**

**Relatore:**

**Dott. Silvio Salvi**

**Correlatore:**

**Chiar.mo Prof. Roberto Tuberosa**

**Esame finale anno 2013**



*Alla nonna Leo...  
sempre nel mio cuore*



# INDICE

<b>CAPITOLO I INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
1. IL FRUMENTO	3
1.1. Cenni di botanica, biologia ed evoluzione	3
1.2. Importanza economica del frumento	6
1.3. Ciclo vegetativo e riproduttivo	8
2. AMBIENTE E PRODUTTIVITA'	11
2.1. Stress ambientali in uno scenario globale in cambiamento	11
2.2. Risposte delle piante a condizioni di stress idrico	12
2.3. Meccanismi di risposta a stress idrico	13
2.4. Produttività e caratteri correlati in frumento duro	16
2.5. Resa e sue componenti collegate alla produttività	19
2.5.1. Numero dei semi	20
2.5.2. Peso dei semi	22
2.6. Miglioramento dell'uso dell'acqua nella produzione delle colture	22
3. CARATTERIZZAZIONE GENOTIPICA: MARCATORI MOLECOLARI, MAPPE GENETICHE E ANALISI QTL	29
3.1. Marcatori molecolari	29
3.1.1 SSR: Simple Sequence Repeat (Ripetizioni di Sequenze Semplici o Microsatelliti)	31
3.1.2 DArT®: (Diversity Arrays Technology)	32
3.2. Mappe genetiche	33
3.3. Analisi QTL: dissezione dei caratteri quantitativi	35
3.3.1. Analisi di linkage	36
3.3.2. Mappaggio per associazione	39

<b>CAPITOLO II OBIETTIVI DELLA RICERCA</b>	<b>43</b>
<b>CAPITOLO III MATERIALI E METODI</b>	<b>47</b>
MATERIALE VEGETALE	49
1. ANALISI MOLECOLARE	58
1.1. Marcatori SSR	58
1.2 Marcatori DArT	60
1.3 Mappa genetica del materiale vegetale in valutazione	61
2. PROVA SPERIMENTALE IN AMBIENTE CONTROLLATO	62
2.1. Pre-germinazione	62
2.2 Preparazione dei vasi	62
2.3 Semina	63
2.4 Prima raccolta	63
2.5 Seconda raccolta	64
2.6 Analis ABA	65
2.6.1 Materiali e reagenti	65
2.6.2 Preparazione del materiale vegetale	65
2.6.3 Analisi del contenuto di ABA	66
3. PROVA PRELIMINARE IN CAMPO NELLA STAGIONE DI CRESCITA 2010/2011	68
3.1 Rilievo dei dati fenotipici	68
4. PROVE SPERIMENTALI DI CAMPO NELLA STAGIONE DI CRESCITA 2011/2012	71
4.1 Rilievo dei dati fenotipici	72
5. FATTORI AMBIENTALI	73
5.1 Caratterizzazione del suolo	73
5.1.1 Campionamento gravimetrico del suolo	73
5.2 Caratterizzazioni delle condizioni atmosferiche	73
6. ANALISI STATISTICA DEI DATI FENOTIPICI	75

<b>CAPITOLO IV RISULTATI</b>	<b>77</b>
1. COSTRUZIONE DELLA MAPPA MOLECOLARE	79
2. VALUTAZIONE DELLA WUE IN UN SUBSET DI 100 ACCESSIONI DI FRUMENTO DURO	81
3. VALUTAZIONE FENOTIPICA DI UN SUBSET DI 100 ACCESSIONI DI FRUMENTO DURO PER CARATTERI AGRONOMICI	84
3.1 Resa di granella e sue componenti	84
3.2 Altezza della pianta e lunghezza del peduncolo	85
3.3 Data di spigatura, di fioritura e di maturità	85
3.4 Indice di verde e biomassa verde	86
4. CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA DEL PANEL COMPLETO DI 188 ACCESSIONI DI FRUMENTO DURO, IN PROVE REPLICATE IN 3 AMBIENTI (ITALIA, UNGHERIA E TURCHIA), IN CONDIZIONI DI DIFFERENTI DI REGIMI IRRIGUI (IRRIGATO E NON IRRIGATO) PER IMPORTANTI CARATTERI AGRONOMICI	87
4.1 Resa di granella e sue componenti	87
4.2 Altezza della pianta e lunghezza del peduncolo	93
4.3 Data di spigatura, di fioritura e di maturità	98
4.4 Vigore precoce e senescenza	102
4.5 Indice di verde e biomassa verde	104
<b>CAPITOLO V DISCUSSIONE</b>	<b>109</b>
1. VALUTAZIONI RELATIVE ALLA MAPPA GENETICA SVILUPPATA NEL PRESENTE STUDIO	111
2. VALUTAZIONI DELLA WUE IN UN SUBSET DI 100 ACCESSIONI DI FRUMENTO DURO	112
3. VALUTAZIONI DEL SUBPANEL DI 100 ACCESSIONI E DEL PANEL COMPLETO DI 188 ACCESSIONI IN PROVE DI CAMPO	113
<b>CAPITOLO VI CONCLUSIONI E PROSPETTIVE</b>	<b>119</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>125</b>





**CAPITOLO I**  
**INTRODUZIONE**



## 1. IL FRUMENTO

### 1.1. Cenni di botanica, biologia ed evoluzione

Il frumento (*Triticum* spp.) è un cereale che, a livello filogenetico e tassonomico, appartiene all'ordine delle *Poales*, famiglia *Poaceae*, sottofamiglia *Pooideae*, tribù *Triticeae*, subtribù *Triticinae*, che comprende anche altri importanti cereali come l'orzo (*Hordeum vulgare* L.) e la segale (*Secale cereale* L.).

Il centro di origine e differenziazione di questo cereale è stato individuato in Medio Oriente in quella che viene definita la Mezzaluna Fertile, compresa tra la pianura del Tigri e dell'Eufrate e la costa del Mediterraneo (Fuller *et al.*, 2012); nella stessa regione ha avuto luogo la prima "Rivoluzione Neolitica" (Childe, 1935). E' appunto in questo periodo, attorno a 10.000 anni fa, che ebbe inizio gran parte della differenziazione critica del genere *Triticum*, ottenuta attraverso i processi di domesticazione a partire da progenitori diploidi (Runemark & Heneine, 1968; Sakamoto, 1973; Feldman & Levy, 2012).

Sono state compiute numerose indagini citogenetiche, genetiche e di biologia molecolare per analizzare la struttura dei genomi e l'origine ed evoluzione dei frumenti selvatici, di quelli coltivati e delle loro specie affini, così come per chiarire e sfruttare i meccanismi genetici alla base dell'ibridazione tra essi (Blanco *et al.*, 1990; Martinez-Perez *et al.*, 2001; Feldman *et al.*, 1995; Chantret *et al.*, 2005; Feldman & Levy, 2005, 2009, 2012).

L'alloploidia, ossia la presenza di più di due corredi cromosomici, ha giocato un ruolo fondamentale nei processi di speciazione ed evoluzione dei frumenti, attraverso fenomeni di ibridazione interspecifica seguiti da raddoppiamenti cromosomici che consentirono la formazione di ibridi fertili. Attraverso i lavori di Kihara (1919) e Sax (1922) è stato possibile avvalorare l'appartenenza di tutte le *Triticinae* ad un ampio gruppo avente numero cromosomico di base  $x=7$ , per lo più in forma diploide. Alla luce di tali risultati, le *Triticinae* sono state suddivise, in base al diverso livello di ploidia, in tre gruppi principali:

- frumenti diploidi ( $2n=2x$ ) con 14 cromosomi totali e formula genomica AA (*Triticum monococcum*)
- 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*).

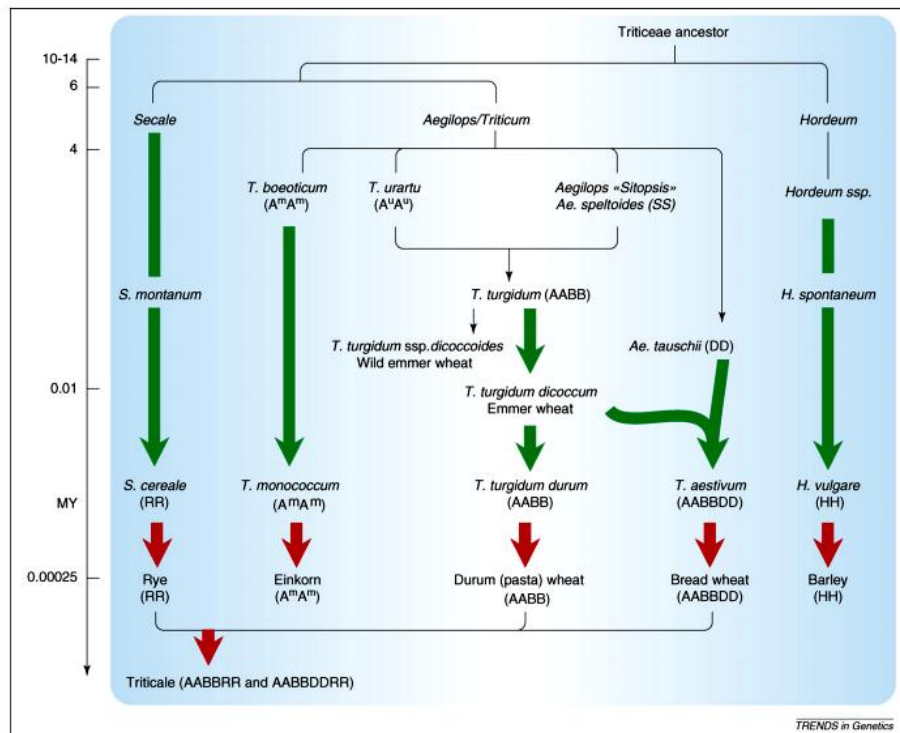
Per quanto riguarda il genoma A, comune a tutte le specie, la sua origine è stata individuata nella specie selvatica *Triticum urartu* (Dvorak *et al.*, 1988; Gulbitti-Onarici *et al.*, 2007). Il donatore del genoma B è stato il più controverso da identificare (Haider, 2012). Diversi studi hanno dimostrato che il genoma B in *T. turgidum* e *T. aestivum* è molto simile

al genoma S di diverse specie *Aegilops* della sezione *sitopsis* (Huang *et al.*, 2010); in particolar modo le prove più consistenti sono state raccolte riguardo alla specie *Aegilops speltoides* (Gill & Chen 1987; Salina *et al.*, 2006). Il progenitore del genoma D di *T. aestivum* è identificato nella specie *Aegilops tauschii* Coss. (Rayburn & Gill 1986; Petersen *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008).

I molteplici studi mirati a collocare a livello temporale l'evento di speciazione dei frumenti, utilizzando dati molecolari, suggeriscono che i progenitori diploidi del grano allopoliploide si discostarono da un progenitore comune all'incirca tra i 2,5 e i 4,5 milioni d'anni fa (Huang *et al.*, 2002).

Il primo evento evolutivo che ha portato alla formazione dei frumenti diploidi è rappresentato da una ibridazione avvenuta all'incirca 0,5-3,0 milioni di anni fa, tra il donatore diploide del genoma A (*T. monococcum* ssp *urartu*, 2n=14 e costituzione genomica AA) e la specie appartenente alla sezione *Sitopsis* (vicino a *Ae. speltoides*), donatore del genoma B (2n=14, costituzione genomica BB) (Feldman *et al.*, 1995; Blake *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2002; Feuillet *et al.*, 2008). A seguito di raddoppiamento cromosomico, fu possibile generare un ibrido fertile tetraploide (AABB) che divenne una specie a sé stante nota come farro selvatico tetraploide [*Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* (körn.) Thell] , dando origine alla linea che ha portato alla formazione del frumento duro *T. turgidum* ssp. *durum* (Feuillet *et al.*, 2008; Matsuoka, 2011; Feldman & Levy, 2012). Il farro selvatico tetraploide rappresenta il progenitore dal quale ebbe inizio, più di 10.000 anni fa, il processo di domesticazione che ha portato alla diversificazione dei frumenti esaploidi (*Triticum* spp.) (Peleg *et al.*, 2011).

Un secondo evento evolutivo si verificò tra 9500 e 7000 anni fa attraverso l'ibridazione tra il farro domesticato tetraploide (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccum*), che deriva dal farro selvatico, ed il donatore diploide del genoma D, la specie selvatica *Ae. tauschii* (2n = 14, costituzione genomica DD). Anche in questo caso, un evento di raddoppiamento cromosomico diede luogo ad una specie fertile esaploide con genoma AABBDD nota come *T. aestivum* o frumento tenero. La filogenesi del frumento (*Triticum* spp.) è illustrata nella Figura 1.1.1



**Fig.1.1.1.** La filogenesi del frumento (da Feuillet *et al.*, 2008).

L'evoluzione e la variabilità genomica dei frumenti sono state quindi generate da fenomeni naturali e del tutto casuali che hanno provocato talune mutazioni a livello cromosomico quali inversioni e traslocazioni, la completa duplicazione del genoma e mutazioni a livello proteico e del DNA (Kashkush *et al.*, 2002; Feuillet *et al.*, 2008). Tali condizioni hanno portato allo sviluppo di nuove funzioni, consentendo alle specie di adattarsi, rispetto ai relativi progenitori ancestrali, ad una maggiore varietà di habitat caratterizzati da condizioni ambientali diverse (Chantret *et al.*, 2005; Feuillet *et al.*, 2008; Feldman & Levy, 2012).

Per questa ragione, anche se le condizioni ottimali di crescita risultano essere a latitudini comprese tra i 30° e 60° N e i 27° e 40° S, è stata possibile la sua diffusione in areali di distribuzione molto ampi e diversificati.

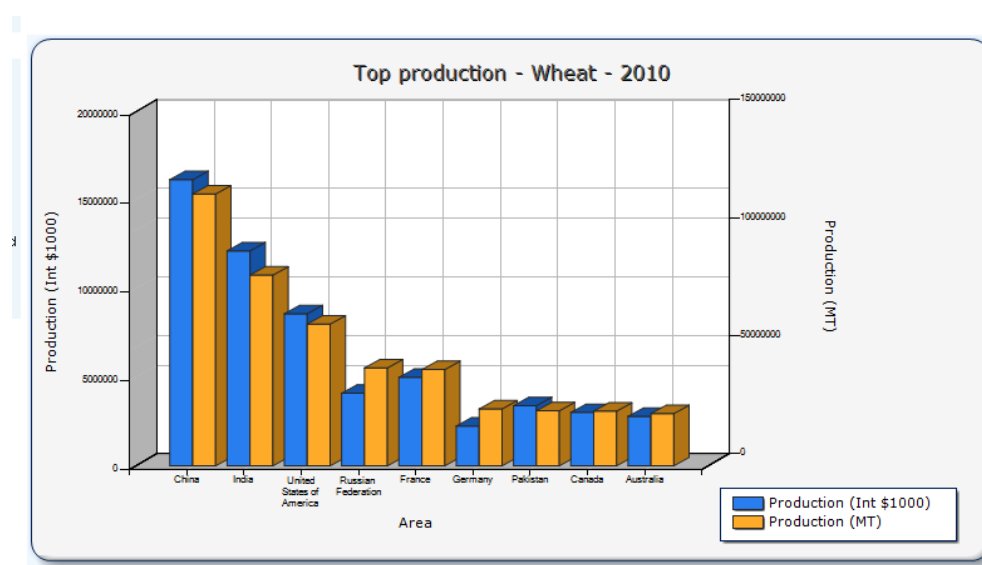
Nei lavori di Blanco e colleghi (1990), così come in Monneveux e collaboratori (2000) viene sottolineata l'importante possibilità di trasferimento genico a seguito d'incrocio tra i frumenti coltivati, quelli selvatici e le specie affini delle *Triticeae* poichè risultano essere per lo più confrontabili fra loro. La grande variabilità genetica presente all'interno di questo gruppo può essere perciò utilizzata in programmi mirati di miglioramento genetico, basati essenzialmente sulla ibridazione intraspecifica e successiva selezione.

In questo modo, a partire dalla "Rivoluzione Neolitica" il frumento divenne uno dei protagonisti delle "Rivoluzioni verdi", a cominciare dall'opera di Nazareno Strampelli nei primi del 1900 (Worland, 1999), passando attraverso la nota "Green Revolution" di Norman Borlaug e collaboratori del CYMMIT (Borlaug, 1968) fino alla "Gene Revolution" dei giorni d'oggi (Tuberosa *et al.*, 2003).

## **1.2. Importanza economica del frumento**

Nato nella “culla dell’agricoltura” (Lev-Yadun *et al.*, 2000), attualmente il frumento è coltivato in tutto il mondo e costituisce uno degli elementi base dell’alimentazione umana (Ashraf, 2010).

Nel 2010 la produzione mondiale di frumento è risultata essere pari a 654 milioni di tonnellate (Figura 1.2.1), rendendo questa specie il terzo cereale più prodotto al mondo dopo mais (840 milioni di tonnellate) e riso (696 milioni di tonnellate) (dati FAOSTAT, 2010). Nel 2009, la produzione mondiale di frumento è stata pari a 686 milioni di tonnellate, facendo così del frumento il secondo cereale più prodotto tra mais (819 milioni di tonnellate) e riso (684 milioni di tonnellate) (dati FAO, 2009).

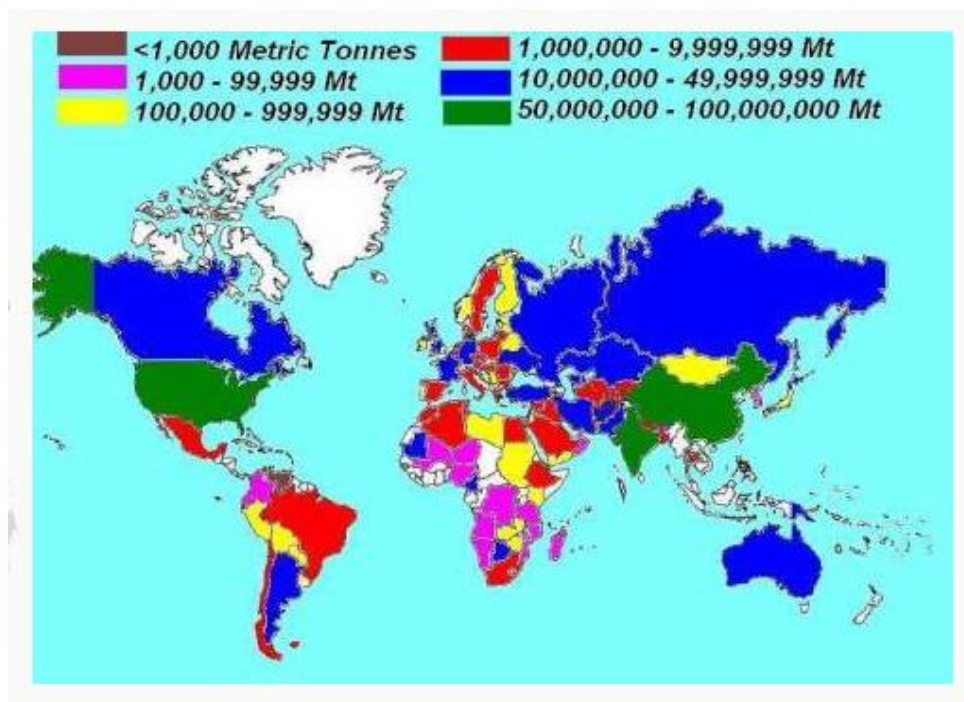


**Fig.1.2.1.** Produzione mondiale di frumento (FAO, 2010)

A livello globale, il grano è la fonte principale di proteine vegetali per l'alimentazione umana, con un contenuto proteico superiore rispetto sia a mais che a riso. In termini di quantità totale utilizzata per la produzione di cibo, attualmente il frumento si colloca al secondo posto dopo riso come coltura principale dell’ alimentazione umana e davanti a mais, tenuto conto dell’uso più ampio di quest’ultimo per la produzione di mangimi animali.

Come riportato nell’USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2006), il frumento a livello nutritivo è costituito principalmente da carboidrati (65-80%), soprattutto amido; proteine (10-16%) quali albumine, globuline, gliadine e glutenine; grassi (1,5-2%); fibre (2,2%); alcune importanti proteine quali la niacina (vitamina B3), la biotina (vitamina B8), gli acidi folico (vitamina B9) e pantotenico (vitamina B5) la vitamina B6, il betacarotene, la vitamina E; contiene inoltre diversi minerali (1,5-2%) quali il ferro, il magnesio, il calcio, lo iodio ed il selenio.

In generale, il frumento viene impiegato nella produzione delle farine per la panificazione, per paste alimentari, biscotti, dolci, ecc.; è inoltre utilizzato, previa fermentazione, per la produzione di birra e di altre bevande alcoliche (Palmer, 2001) ed anche biocarburanti (NDSU Agriculture Communication, 2007). In particolare, il grano tenero viene impiegato per la produzione di pane e altri prodotti da forno, mentre il frumento duro viene utilizzato per realizzare paste alimentari, previa speciale macinazione che porta alla produzione della semola, anziché di farina, e diversi prodotti pastari quali bulgur, couscous e forme speciali di pane.



**Fig 1.2.2.** Produzione annuale di frumento a livello mondiale (FAO 2010)

Secondo le statistiche FAO del 2009 e 2010, a livello mondiale il frumento viene coltivato su una superficie di 217 milioni di ettari (Figura 1.2.2); di questi, il frumento duro occupa un areale di circa 20 milioni di ettari, pressappoco il 10% in meno rispetto a quello del frumento tenero, e la produzione di frumento duro raggiunge approssimativamente i 30 milioni di tonnellate annue, all'incirca il 5% di quella del frumento tenero (International Grains Council, 2012).

Il Nord-America ed il Bacino del Mediterraneo rappresentano le aree in cui il frumento duro è maggiormente coltivato. Il frumento duro, rispetto a quello tenero, è più adatto a quegli ambienti definiti semi-aridi, vale a dire caratterizzati da clima relativamente secco, con giornate calde e notti fresche durante la stagione di crescita, e con piovosità relativamente basse (tra 250 e 500 mm), aspetti peculiari del clima mediterraneo e temperato (Bozzini, 1988). L'areale di coltivazione più importante del frumento duro risulta essere, infatti, il bacino del Mediterraneo (soprattutto Spagna, Italia, Grecia ed anche Turchia),

contraddistinto da piovosità scarsa e variabile, in cui viene coltivato generalmente in condizioni non irrigue, esponendo in tal modo la coltura al rischio di stress idrici, termici e biotici, ma a favore di un minore impatto ambientale e costo di coltivazione, premesse le condizioni particolarmente vocate alla coltura. Per quanto riguarda il nostro Paese, con circa 600.000 ettari coltivati a grano tenero e 1.300.000 ettari coltivati a grano duro (Syngenta, 2012), il frumento duro in Italia riveste un'importanza primaria per la produzione agricola e per l'industria agro-alimentare locale, la cui coltura è principalmente localizzata nelle regioni Meridionali ed Insulari. La legislazione italiana (Legge n. 580 del 1967), infatti, prevede che la pasta secca debba essere fabbricata solo ed esclusivamente con semola di grano duro; qualsiasi aggiunta anche parziale di grano tenero costituisce, di fatto, una frode.

### **1.3. Ciclo vegetativo e riproduttivo**

Il ciclo di sviluppo dei cereali è schematicamente suddiviso fasi fenologiche, regolate da fattori endogeni ed esogeni, che determinano modificazioni a livello morfologico e funzionale di alcuni organi (Landsberg, 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. La scala fenologica più comunemente utilizzata per descrivere gli eventi di sviluppo in frumento rimane quella di Zadoks e collaboratori (1974), basata essenzialmente sull'osservazione visiva dello stadio. Secondo tale scala, il ciclo vegetativo e riproduttivo del frumento può essere suddiviso nei seguenti eventi fenologici (Figura 1.3.1.):

**Germinazione.** In condizioni di temperatura di poco superiore a zero gradi, sono infatti sufficienti 3-4°C, ha inizio la germinazione. La cariosside assorbe acqua e si rigonfia. L'imbibizione di acqua da parte del seme secco innesca una serie di eventi molecolari che determinano il passaggio dalla fase quiescente ad una fase di crescita attiva, attraverso la sintesi di proteine, di DNA e dei tre tipi di RNA (Mory *et al.*, 1972; Marcus *et al.*, 1966; Holdsworth *et al.*, 2008; Nonogaki *et al.*, 2010).

La rottura degli involucri di rivestimento del granello a livello dell'embrione determina l'emissione della prima piumetta ancora avvolta dal coleoptile, e poco dopo fuoriesce la radichetta primaria avvolta dalla coleorizza. Si sviluppano successivamente altre radici seminali fino ad un massimo di 6-8 radichette e si allunga il fusticino fino a raggiungere la superficie del terreno; la piumetta esce dal coleoptile e compare la prima foglia. Quando la piantina si trova allo stadio di 3-4 foglie, a circa 1 cm di profondità si forma un ingrossamento o nodo dal quale prendono origine le radici avventizie. La fase di germinazione dura all'incirca 15-20 giorni.

**Accestimento.** L'accestimento è una fase caratterizzata dalla massima resistenza al freddo durante la quale si verifica lo sviluppo dell'apparato radicale secondario e l'emissione



di culmi secondari, nonché l'accumulo di sostanze organiche per le successive fasi di sviluppo (Miralles & Richards, 2000; Borràs-Gelonch *et al.*, 2012). L'accestimento ha inizio con l'emissione di nuovi germogli, o culmi secondari, situati a livello dell'ascella della prima foglia, per cui da una pianta generata da un seme si sviluppa un insieme di culmi di accestimento che porterà alla formazione di più spighe. L'accestimento, ovvero il numero di nuovi germogli prodotti dalla pianta madre, è influenzato da fattori genetici, ambientali e colturali. In particolare influenzano l'indice di accestimento la densità, l'epoca di semina e la fertilità del terreno: più bassa è la densità di semina, più precoce è la semina, più elevata è la fertilità e maggiore sarà l'accestimento. Non tutti i culmi originati danno vita alla spiga: se l'accestimento è troppo intenso, alcuni culmi disseccheranno in primavera con dispendio inutile di energie. Alla fine dell'accestimento l'investimento può risultare di circa 400-600 piante per metro quadro. Rispetto al grano duro, il grano tenero ha generalmente una capacità di accestimento inferiore. L'accestimento inizia in autunno, si arresta temporaneamente in inverno e riprende con la buona stagione.

**Levata.** All'inizio della levata, nodi e internodi, con all'apice gli abbozzi della spiga si trovano ravvicinati in prossimità del suolo avvolti dalle foglie. Con l'innalzarsi della temperatura si assiste all'allungamento degli internodi con un veloce aumento dell'altezza dei culmi. Quando la spiga arriva all'altezza dell'ultima foglia, da cui rimane avvolta evidenziando un ingrossamento, si ha lo stadio di botticella. Nella fase di levata il frumento assorbe notevoli quantità d'acqua ed elementi nutritivi.

**Spigatura e fioritura.** La spigatura avviene con la fuoriuscita dell'infiorescenza dalla guaina dell'ultima foglia; dopo un intervallo di circa 5-6 giorni inizia la fioritura a partire dalle spighette poste a metà della spiga proseguendo poi con quelle poste sotto e sopra (fioritura ad andamento acropeto). Le antere liberano il polline prima dell'apertura delle glumelle e dunque l'impollinazione è prevalentemente autogama cleistogama. Ogni spiga può essere costituita da circa 18-20 spighette formate da più fiori, ma non tutti portano alla formazione di cariossidi; in ottime condizioni soltanto due fiori per spighetta risultano in media allegati, con una produzione potenziale di circa 35-40 cariossidi per spiga.

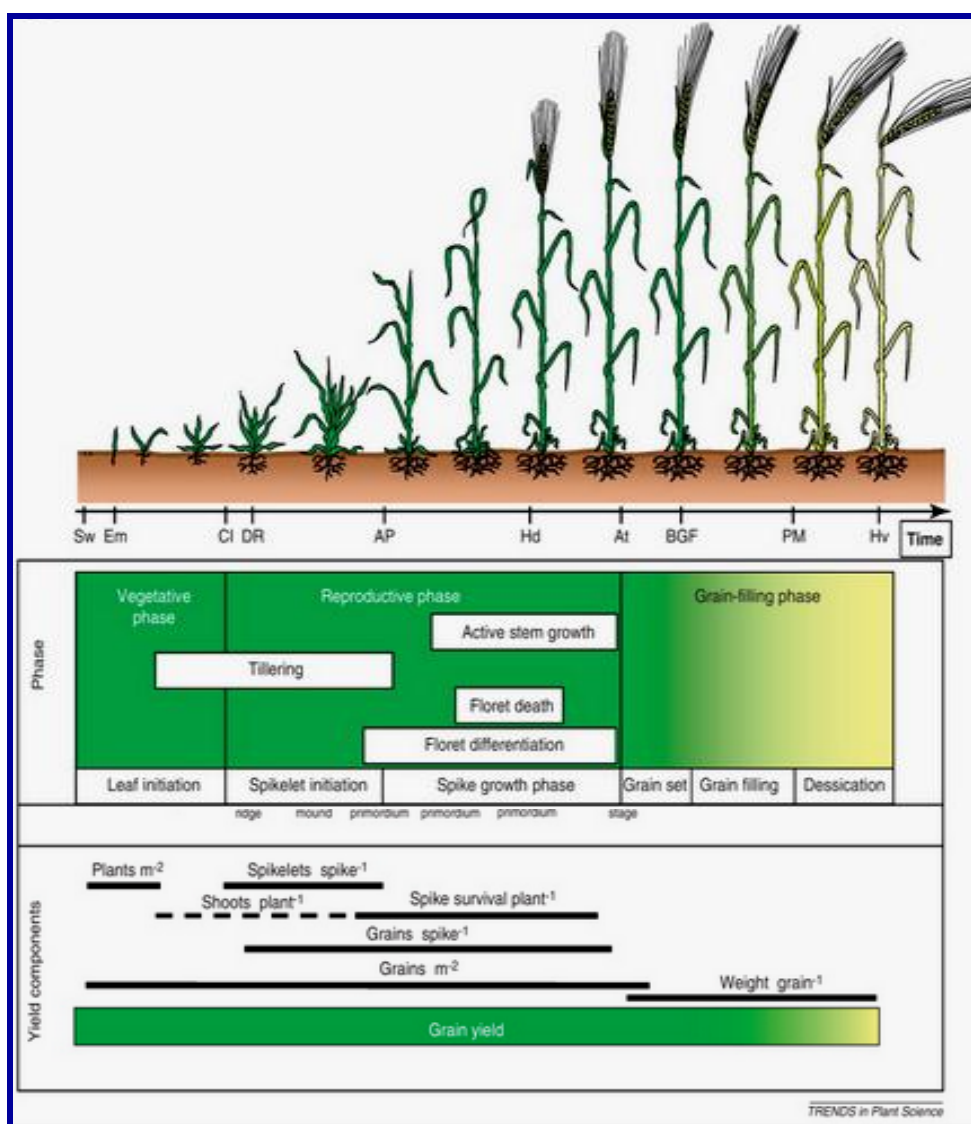
**Maturazione.** Avvenuta la fecondazione, si forma l'embrione e inizia l'accumulo di sostanze di riserva nell'endosperma delle cariossidi che in seguito si ingrossano fino a raggiungere il volume dei granelli maturi. La maturazione può svolgersi in quattro fasi successive:

1. maturazione latte: le cariossidi di color verde raggiungono il massimo volume e sono ripiene di un liquido lattiginoso;
2. maturazione cerosa: le cariossidi perdono acqua (rimane una quantità intorno al 40%) ma contemporaneamente continuano ad essere accumulate in esse sostanze di riserva; assumono consistenza cerosa, il colore diviene giallognolo (viraggio) e solamente alcune parti della pianta sono ancora turgide e vitali;

3. maturazione piena o fisiologica: tutta la pianta ha esaurito la capacità di compiere fotosintesi ed appare ingiallita e secca; cessa l'accumulo di sostanze di riserva nei semi; continua la perdita d'acqua da parte delle cariossidi (la percentuale d'acqua nei granelli si aggira attorno al 25-30%);

4. maturazione di morte: l'umidità si porta su valori dell'11-13% che consentono una mietitura ottimale.

La maggior parte delle sostanze accumulate nelle cariossidi viene sintetizzata dopo la spigatura dall'ultima foglia a bandiera, dalla spiga stessa e dall'ultimo internodo. È fondamentale quindi mantenere attive e vitali queste parti preservandole dalle malattie fungine. Molto negativi nella fase di formazione delle cariossidi sono gli stress idrici causati da siccità e temperature elevate (stretta da caldo); in questi casi viene precocemente interrotto l'accumulo di sostanze nelle cariossidi che si presentano leggere e striminzite (Viggiani *et al.*, 2009).



**Fig. 1.3.1.** Fasi fenologiche del frumento (Sreenivasulu & Schnurbusch, 2012)

## **2. AMBIENTE E PRODUTTIVITA'**

### **2.1. Stress ambientali in uno scenario globale in cambiamento**

Le piante si sono evolute in modo da vivere in ambienti in cui sono esposte a differenti fattori di stress, spesso in combinazione tra loro, che possono alterarne la crescita, lo sviluppo e la produttività (Atkinson & Urwin, 2012). A livello generale, possiamo distinguere tra stress biotici ed abiotici.

Per stress biotici si intendono quelli causati da organismi viventi, come ad esempio funghi, batteri, virus, nematodi, insetti, acari, lumache. Gli stress abiotici sono invece causati da fattori legati ad eccessi o carenze di tipo chimico o fisico nelle condizioni ambientali quali la siccità, l'elevata o la bassa temperatura, le lesioni da congelamento o da vento, la carenza di nutrienti, il forte irraggiamento solare, i raggi UV, la salinità, i metalli pesanti e l'ipossia; possono essere altresì provocati da pratiche culturali improprie, come ad esempio l'eccesso d'irrigazione o la semina a profondità troppo elevate (Hirayama & Shinozaki, 2010).

Nelle piante, gli stress abiotici e biotici limitano la crescita, lo sviluppo e la resa delle specie agrarie coltivate attraverso modificazioni a livello fisiologico, morfologico, biochimico e molecolare (Mittler & Blumwald, 2010).

Le condizioni ambientali che maggiormente influiscono negativamente sulla resa delle colture sono determinate dagli stress abiotici associati alla carenza di acqua, allo squilibrio ionico ed alle temperature estreme (Peleg *et al.*, 2011), e lo scenario a livello mondiale è destinato a peggiorare notevolmente nei prossimi anni. Il cambiamento ambientale globale rappresenta una delle più grandi sfide che l'umanità deve affrontare oggi e a cui dovrà far fronte nel futuro.

Le recenti proiezioni FAO (2009) hanno ipotizzato che entro il 2050 la popolazione mondiale potrebbe crescere del 34%, con un incremento quindi di 2,3 miliardi di persone da sfamare. Questo aumento riguarderà soprattutto i paesi in via di sviluppo. Inoltre, l'effetto del cambiamento della dieta delle popolazioni emergenti, con aumento del consumo di carne, ha come risvolto un aumento della richiesta delle produzioni vegetali per unità di alimento prodotto. Pertanto, si prospetta l'esigenza di aumentare la produzione mondiale di cibo quantomeno del 70% e, di conseguenza, si stima che la richiesta di colture di base come i cereali aumenterà fino al 50% in più, con un incremento di quasi un miliardo di tonnellate; inoltre, il consumo di acqua per scopi agricoli dovrebbe aumentare di quasi l'11% entro il 2050.

L'ultimo "Assessment Report" dell'Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC, 2007) ha evidenziato che i cambiamenti climatici a livello globale comporteranno una grande imprevedibilità e variabilità nelle quantità di piogge, un sensibile aumento della incidenza e

della gravità degli episodi di siccità non solamente nelle zone aride e semiaride, e la crescita delle temperature medie a livello planetario nel 2100 di 1,8-4,0° C rispetto alla media 1980-2000. A questi mutamenti del clima saranno associati anche variazioni per quanto riguarda gli effetti negativi causati da un aumento delle erbe infestanti, dei parassiti e delle malattie sulle colture (Jaggard *et al.*, 2010).

Un altro grande problema è rappresentato dal numero crescente di aree agricole utilizzate per la produzione di biocarburanti, condizione che determina una competizione per la disponibilità di terreni coltivabili per la produzione alimentare. La scarsità e l'incertezza delle risorse di combustibili fossili ha causato un interesse crescente nel convertire cereali in biocarburante, determinando una insicurezza senza precedenti riguardo alla disponibilità di cibo (Young, 2009; Banerjee, 2011). Questa situazione ha portato ad una escalation dei prezzi dei prodotti alimentari e fornisce un'ulteriore sfida per soddisfare il futuro fabbisogno di produzione di alimenti (Powell *et al.*, 2012).

## **2.2. Risposte delle piante a condizioni di stress idrico**

Quasi la metà delle terre attualmente irrigate e circa il 20% dei terreni coltivati mondiali sono interessati da stress idrico, che costituisce uno dei più gravi problemi della produzione agricola incidendo negativamente sulla crescita e la produttività delle specie agrarie coltivate in tutto il mondo (Bartels e Sunkar, 2005; Jaggard *et al.*, 2010). Questo scenario è destinato a coinvolgere più della metà delle aree agricole nei prossimi 50 anni (Cattivelli *et al.*, 2008; Sinclair, 2010), e la competizione per le risorse idriche tra le aree urbane e agricole renderà più complesso il problema della disponibilità di acqua (Rosegrant *et al.*, 2009; Boote *et al.*, 2011).

Il concetto di “stress idrico” può avere un significato meteorologico, agronomico fisiologico o molecolare a seconda dell'ambito a cui si fa riferimento (Passioura *et al.*, 2007). In agricoltura, il termine “deficit idrico” si riferisce ad una condizione in cui la quantità d'acqua resa disponibile grazie alle precipitazioni e/o attraverso l'irrigazione risulta insufficiente a compensare il processo di traspirazione delle colture (Tuberosa, 2012).

Tra le condizioni ambientali che possono indurre stress da carenza d'acqua nelle piante, le più critiche sono rappresentate da periodi di limitata o assente piovosità, scarsa umidità dell'aria, alta irradiazione solare; inoltre, anche la presenza di elevata salinità e basse temperature possono rendere difficoltoso l'assorbimento di acqua dal terreno (Ni *et al.*, 2009; Shao *et al.*, 2009).

Essendo organismi sessili, le piante hanno sviluppato meccanismi specifici che consentono loro di rilevare precisi cambiamenti ambientali e rispondere alle complesse condizioni di stress, spesso multipli, riducendo al minimo i danni, mantenendo le

fondamentali risorse necessarie per la crescita e la riproduzione (Rizhsky *et al.*, 2004; Umezawa *et al.*, 2009; Hua *et al.*, 2012).

Le piante rispondono agli stress ambientali a più livelli come molecolare, cellulare, anatomico, morfologico e fisiologico (Bray, 1993, 1997; Munns, 2002; Chaves *et al.*, 2003; Bartels & Sunkar, 2005; Munns & Tester, 2008; Witcombe *et al.*, 2008). Le risposte delle piante ad una o più sollecitazioni possono inoltre variare a seconda delle specie e del genotipo, della durata e gravità dell'evento, dello stadio di sviluppo della pianta quando lo stress è imposto e delle condizioni individuali della coltura (Bray, 1997; Mittler & Blumwald, 2010; Yang & Miao, 2010).

In frumento, il periodo maggiormente critico è la spigatura: qualora lo stress idrico colpisca la pianta in tale periodo la produttività può risultare notevolmente decurtata principalmente a causa di una riduzione del numero di semi per spiga a sua volta imputabile a danni ai tessuti riproduttivi (Edmeades *et al.*, 1989; Monneveux *et al.*, 2012). Gli altri stadi fenologici che risentono di uno stress idrico risultano essere la fase di levata, quando per evitare necrosi e sterilità dei culmi di accostamento è importante che vi sia una buona disponibilità idrica, e la fase di maturazione della cariosside, periodo in cui viene determinata la dimensione della granella (Araus *et al.*, 2002; Farooq *et al.*, 2009).

### **2.3. Meccanismi di risposta a stress idrico**

In generale, la resistenza alla siccità viene definita come la capacità di una pianta di vivere, crescere e riprodursi in modo soddisfacente in situazioni di limitato approvvigionamento idrico o in condizioni di deficit idrico periodico (Turner, 1979).

Esistono diversi meccanismi che consentono alle piante di resistere ed eventualmente attenuare gli effetti negativi che conseguono a condizioni di stress idrico. In generale, bisogna fare una netta distinzione tra le strategie che aiutano le piante a sopravvivere a periodi di siccità molto intensi e le caratteristiche che consentono di limitare le perdite di produttività delle colture esposte a livelli lievi o intermedi di stress idrico (Tuberosa, 2012).

Le piante possono far fronte alla siccità sia attraverso strategie di “fuga dallo stress” (Ludlow, 1989) oppure attraverso strategie di “tolleranza allo stress” (Levitt, 1972; Turner, 1986). Tra le diverse definizioni di resistenza alla siccità che sono state fornite nel corso degli ultimi decenni, quelle originali formulate dai suddetti autori mantengono la propria validità e offrono un approccio razionale per classificare le strategie che consentono alle piante di limitare gli effetti negativi provocati dalla scarsità d’acqua.

**1) Strategia di fuga o “drought escape”,** tramite la quale viene prevenuta l’esposizione allo stress. In questo caso la pianta completa il proprio ciclo vitale prima che lo stress idrico raggiunga livelli critici (Bazzaz, 1979; Heschel & Riginos, 2005; Luo *et al.*, 2011).

Le piante caratterizzate da questo tipo di strategia mostrano un alto livello di plasticità fenotipica, intesa come la capacità di un genotipo di esibire un fenotipo differente in maniera tale da poter sopravvivere in ambienti inospitali o poveri di risorse (Bradshaw, 1972; Sultan, 1987; Huey *et al.*, 2002; Nicotra *et al.*, 2010). Tale predisposizione è legata all'opportunità di aggiustare e sincronizzare la durata delle varie fasi fenologiche e del ciclo vitale in generale (Cheves *et al.*, 2003; Donnelly *et al.*, 2012). Una maggiore fertilità, quindi successo riproduttivo, può essere raggiunta anche attraverso una migliore ripartizione degli assimilati ai frutti in via di sviluppo. Questa strategia è associata alla capacità della pianta di conservare le riserve in alcuni organi (fusti e radici) e di rilocarle ai frutti in maturazione nella parte terminale del ciclo vitale. Questa tipologia di risposta è stata ben documentata in diverse piante coltivate, come i cereali (Gebbing & Schnyder, 1999; Bruce *et al.*, 2002; Tardieu & Tuberosa, 2010) ed alcune leguminose (Rodriguez *et al.*, 1995; Chaves *et al.*, 2002; 2009), specie agrarie che sono in grado di distribuire rapidamente le riserve di assimilati in caso di condizioni di siccità. In riso, si verifica di frequente la fioritura anticipata come strategia di fuga dallo stress idrico (Yano *et al.*, 2001; Laceras *et al.*, 2004; Xue *et al.*, 2009); in tal caso le piante usufruiscono delle riserve d'acqua accumulate prima che si manifestino gli eventi siccitosi stagionali (Yang *et al.*, 2003; Ishimaru *et al.*, 2010).

Per quanto riguarda il frumento duro, Araus e colleghi (2002) e Reynolds e Tuberosa (2008) hanno posto l'accento sulla possibilità di attuare programmi di miglioramento genetico mirati ad adattare e/o ridurre la durata di alcune fasi del ciclo vegetativo, strategia che potrebbe portare ad esiti particolarmente positivi relativamente alle condizioni climatiche del Mediterraneo.

**2) Strategia di tolleranza o “drought tolerance”** che, in accordo con la definizione di Levitt (1972), può essere suddivisa in due meccanismi principali: a) meccanismo finalizzato ad **evitare la disidratazione** o **“dehydration avoidance”** e b) meccanismo di **tolleranza alla dissecazione** o **“desiccation tolerance”**.

a) La dehydration avoidance si basa su caratteristiche morfo-fisiologiche che consentono alla pianta, o a parte di essa, di mantenere alti livelli di idratazione in condizioni di elevata evapotraspirazione. Questo meccanismo consente alla pianta di non esporre allo stress i processi biochimici e fisiologici coinvolti nella crescita e produttività. La disidratazione può essere ridotta minimizzando la perdita d'acqua attraverso la chiusura degli stomi, modificando l'orientamento delle foglie (Morgan, 1984; Jones & Corlett, 1992; Zlatev, 2005), riducendo l'intercettazione di radiazione luminosa – riducendo quindi anche la temperatura fogliare tramite l'arrotolamento fogliare (Ehleringer & Cooper, 1992; Jing-Jing Xiang *et al.*, 2012) con conseguente diminuzione dell'area fogliare (Chaves *et al.*, 2003; Chenu *et al.*, 2008), oppure massimizzando la capacità di assorbimento dell'acqua tramite un maggior sviluppo dell'apparato radicale (Jackson *et al.*, 2000; Henry *et al.*, 2012) e aumentando la conduttanza idrica (Cruz, 1992; Chaves *et al.*, 2003; Scoffoni *et al.*, 2011). Inoltre, il

disseccamento delle foglie più vecchie contribuiscono al risparmio idrico e può essere visto come un programma di “riciclo” all'interno della pianta, consentendo la redistribuzione dei nutrienti immagazzinati dalle foglie più vecchie allo stelo o alle più giovani foglie. Durante la senescenza indotta da siccità, vengono attivate alcune proteasi specifiche per la risposta a stress idrico, che non sono normalmente indotte in condizioni di invecchiamento naturale, come nel caso di alcune forme della proteasi cisteina (Khanna-Chopra *et al.*, 1999; Simova-Stoilova *et al.*, 2010). A seconda della tipologia di meccanismo messo in atto dalla pianta, Levitt (1972) ha attuato una ulteriore classificazione in piante conservatrici (*water savers*) e piante dissipatrici (*water spenders*) di acqua. Le prime mantengono alto il contenuto idrico dei tessuti minimizzando l'evapotraspirazione, mentre le seconde accumulano nei tessuti la massima quantità d'acqua disponibile.

b) Quelle caratteristiche che consentono alle piante di mantenere attive, almeno parzialmente, le funzioni metaboliche principali ed un adeguato turgore cellulare in condizioni di disidratazione vengono incluse all'interno dei meccanismi di tolleranza alla siccità; tale capacità è correlata principalmente ad un efficiente uso dell'acqua. La tolleranza allo stress idrico può essere conseguita principalmente attraverso l'aggiustamento osmotico e/o grazie a cambiamenti di elasticità della parete cellulare e/o tissutale (Touchette *et al.*, 2007; Farooq *et al.*, 2009; Scholz *et al.*, 2012). Quest'ultima viene espressa come funzione del modulo di carico elastico ( $\epsilon$ ) di una singola foglia, che rappresenta il rapporto tra la variazione del turgore cellulare (P) e quella del volume cellulare ( $\Delta V / V$ ) relativamente alla foglia stessa [ $\epsilon = \Delta P / (\Delta V / V)$ ]. Questo parametro fornisce una misura di quanto il turgore cellulare diminuisca con la perdita d'acqua nella foglia. La diminuzione del turgore si collega direttamente con la diminuzione del potenziale idrico della foglia e fornisce la forza motrice per il flusso d'acqua nel *continuum* suolo-pianta-atmosfera (Murphy & Ortega, 1995; Ortega, 2010). Alti valori di  $\epsilon$  (bassa elasticità) possono determinare un valore di P minore ma gradienti di potenziale osmotico dal suolo alla foglia più elevati, consentendo alla pianta di estrarre una maggiore quantità d'acqua dal suolo. Bassi valori di  $\epsilon$  (alta elasticità) possono aiutare a mantenere valori positivi di turgore cellulare ad un particolare contenuto di acqua nei tessuti.

L'aggiustamento osmotico in risposta alla carenza idrica avviene nelle foglie, nell'ipocotile, nelle radici, e negli organi riproduttivi di specie di piante diverse. Questo meccanismo consente alle cellule di diminuire il potenziale osmotico e di aumentare di conseguenza il gradiente di afflusso dell'acqua, al fine di mantenere valori positivi di turgore cellulare, necessari per l'apertura degli stomi, la crescita e l'espansione della foglie (Chaves *et al.*, 2003; Bowne *et al.*, 2012). Tale strategia è considerata uno dei principali processi nell'adattamento delle piante a condizioni di siccità o stress salino. Un abbassamento del potenziale osmotico in risposta a deficit idrico deriva dalla concentrazione di soluti osmotici non appena l'acqua fuoriesce dal vacuolo ed il volume cellulare diminuisce (Loutfy *et al.*, 2011; Nio *et al.*, 2011).

Questi osmoliti compatibili possono essere ioni (ad esempio K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub>-SO<sub>4</sub><sup>-</sup> e-HPO<sub>4</sub>) oppure composti organici (prolina, glicina betaina, carboidrati, ecc.) altamente solubili che, di norma, non interferiscono con il metabolismo cellulare, le cui concentrazioni sono mantenute attraverso una combinazione della loro sintesi e catabolismo. Inoltre molti di questi osmoliti hanno proprietà protettive delle caratteristiche strutturali delle membrane e della funzionalità enzimatica (Valliyodan & Nguyen, 2006). Il gradiente di potenziale nel *continuum* suolo-pianta-atmosfera è la forza che guida il trasporto dell'acqua nella pianta da un punto ad alto (meno negativo) potenziale idrico a un altro punto a basso (più negativo) potenziale idrico. Normalmente il flusso avviene dal suolo ( $\Psi_s = -0,01 \div -0,15$  MPa) verso l'atmosfera ( $\Psi_{atm} = -50 \div -100$  MPa) passando attraverso la pianta.

Il potenziale idrico ( $\Psi$ , MPa) viene espresso come la somma di:

- Potenziale di turgore ( $\Psi_t$ , MPa);
- Potenziale osmotico o soluto ( $\Psi_s$ , MPa);
- Potenziale matriciale ( $\Psi_m$ , MPa);
- e il potenziale gravitazionale ( $\Psi_g$ , MPa):

$$\Psi = \psi_t + \psi_s + \psi_m + \psi_g$$

Poichè il contributo di  $\psi_m$  e  $\psi_g$  è trascurabile per la maggior parte delle specie erbacee coltivate, un accumulo di soluti (generando un  $\psi_s$  più negativo) rappresenta un meccanismo per il mantenimento di un  $\psi_t$  positivo a basso  $\Psi$ .

Diversi studi hanno dimostrato una correlazione positiva tra aggiustamento osmotico e produttività, intesa in termini di resa o biomassa, in specie agrarie coltivate quali mais (Sharp *et al.*, 2004; Chimenti *et al.*, 2006; Morison *et al.*, 2008), orzo (González *et al.*, 2008; Vaezi *et al.*, 2010), riso (Robin *et al.*, 2003; Ashraf, 2010) e frumento (Moinuddin *et al.*, 2005; Fan *et al.*, 2008; Nio *et al.*, 2011; Farouk, 2011).

#### **2.4. Produttività e caratteri correlati in frumento duro**

L'agricoltura nel 21° secolo si trova ad affrontare una grande sfida in termini di sicurezza alimentare; negli ultimi anni, i prezzi dei cereali sono aumentati rapidamente e molti osservatori hanno riconosciuto, tra le cause di questi aumenti, anche gli avversi eventi climatici quali episodi di prolungata siccità ed incremento della temperatura, che hanno determinato un considerevole calo di produttività; questo, in uno scenario globale in cui la domanda di cereali è in continuo aumento a causa della crescita demografica (Lobell *et al.*, 2011; Tuberosa, 2012). Pertanto, la sicurezza alimentare nel ventunesimo secolo si dovrà basare sempre di più anche sulla disponibilità di cultivar con una maggiore resistenza a



condizioni di siccità e con alta stabilità in termini di produttività (Borlaug, 2007; Tester & Langridge, 2010; Reynolds *et al.*, 2011; Serraj *et al.*, 2011; Chapman *et al.*, 2012). Considerando la grande importanza che rivestono i cereali quali componenti principali della dieta umana, la produttività di queste colture risulta essere uno dei più importanti caratteri studiati e manipolati in programmi di miglioramento genetico, sin dall'inizio dell'agricoltura.

Sono stati effettuati numerosi esperimenti in campo ed in condizioni controllate per cercare di determinare quali siano i caratteri morfo-fisiologici e agronomici maggiormente coinvolti nella resistenza allo stress idrico dei cereali, in modo da poterli selezionare più efficacemente al fine di ottenere una produttività accettabile anche in condizioni di carenza idrica (Tardieu, 2012). Obiettivo di un programma di miglioramento genetico volto a potenziare la risposta agli stress abiotici è quello di migliorare la stabilità della resa in granella.

Negli ultimi decenni, gli approcci molecolari hanno messo a disposizione nuove opportunità per la dissezione ed una più mirata manipolazione delle basi genetiche e funzionali della resa in condizioni di siccità (Forster *et al.*, 2000; Sinclair *et al.*, 2004; Tuberosa & Salvi, 2006; Jenks *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2007; Xu & Crouch, 2008; Ashraf, 2010; Mittler & Blumwald, 2010; Deikman *et al.*, 2012).

L'approccio utilizzato per il miglioramento genetico per la stabilità della resa in granella è quello di scomporre la risposta della pianta a condizioni di stress idrico nei singoli parametri ad essa correlati (Sreenivasulu & Schnurbusch, 2012) ed individuare un ideotipo con elevata produttività potenziale che possa essere selezionato da parte del miglioratore per la tolleranza alla siccità, che sia facilmente rilevabile e sufficientemente attendibile (Teulat *et al.*, 1997; Pfeiffer *et al.*, 2000).

La produttività potenziale viene intesa come la produttività di un genotipo che si sviluppa in un ambiente favorevole in termini di apporto idrico e di nutrienti, nel quale gli altri stress vengono controllati (Acevedo & Fereres, 1993; Richards *et al.*, 2000). L'aumento della potenzialità produttiva si può realizzare attraverso la redistribuzione della biomassa a favore degli organi riproduttivi e a scapito di altri organi quali foglie, radici e culmi (Austin *et al.*, 1980; Reynolds *et al.*, 2009).

Per quanto concerne il frumento, Donald (1968) ha proposto un modello concettuale di pianta tollerante allo stress idrico caratterizzata da una elevata potenzialità produttiva, dimensioni ridotte, costituita da pochi culmi ed in grado di sopravvivere e competere in mezzo a piante con caratteristiche simili. Questo ideotipo di frumento dovrebbe impiegare risorse limitate nella struttura della pianta e massimizzare l'utilizzo dei fotosintetati per uno sviluppo più rilevante della granella con conseguente aumento della produttività. Tale modello è stato successivamente rielaborato (Blum *et al.*, 1989; Loss *et al.*, 1994; Richards *et al.*, 1996, 2001, 2002; Araus *et al.*, 2002; Chaves *et al.*, 2003), includendo altri caratteri

strutturali, molecolari, fisiologici e biochimici al fine di selezionare piante con una produttività sempre più elevata. Tra questi i più rilevanti risultano essere:

- dimensioni dell'apparato radicale;
- dimensione del seme e lunghezza del coleottilo;
- vigore precoce e accumulo della biomassa nel periodo di pre-antesi;
- riserva di nutrienti nel peduncolo e nel penultimo internodo;
- fotosintesi della spiga;
- conduttanza stomatica;
- caratteri cellulari quali accumulo di acido abscissico (ABA), aggiustamento osmotico e tolleranza ai periodi prolungati caratterizzati da temperature elevate;
- caratteristiche anatomiche della foglia quali l'arrotolamento;
- il mantenimento della colorazione verde delle foglie; tale carattere definito *stay-green* consente il rallentamento della senescenza fogliare durante la fase riproduttiva, l'aumento dell'efficienza fotosintetica nelle fasi fenologiche avanzate ed un maggiore accumulo di fotosintetati, favorendo una migliore redistribuzione degli assimilati per lo sviluppo ed il riempimento della granella (Acevedo & Ferers, 1993; Christopher *et al.*, 2008; Lopes & Reynolds, 2012).

Va sottolineato che il contributo di ciascuno di questi caratteri alla potenzialità produttiva risulta strettamente collegato al tipo di ambiente nel quale le piante vengono coltivate ed alla tipologia di risposta specifica a stress biotici ed abiotici, che condizionano in maniera rilevante il rendimento finale di una determinata cultivar (Otegui & Slafer, 2004; Barnabás *et al.*, 2008).

Sebbene la resa in frumento si realizzi nella fase finale dello sviluppo, essa risulta condizionata da avvenimenti che si verificano nell'arco di tutto il ciclo vitale della pianta. L'aumento della resa in granella è stato conseguito tramite la selezione di importanti caratteri agronomici che conferiscono un più alto potenziale produttivo, andando ad agire su quei fattori che controllano direttamente la resa in quanto tale, o attraverso l'identificazione e la selezione di caratteri che conferiscono tolleranza alla pianta in condizioni di stress abiotico o biotico (Slafer, 2003; Araus *et al.*, 2008).

Alla luce di queste considerazioni, una strategia piuttosto importante è stata individuata nel miglioramento indiretto della produttività attraverso la selezione di caratteri secondari che siano altresì collegati all'aumento della resa o ad una elevata produttività. Tale metodologia si basa essenzialmente sulla conoscenza della fisiologia di una determinata cultivar e viene definita *breeding analitico* (Araus *et al.*, 2008; Passioura, 2012).

Intorno alla metà del secolo scorso grazie alla "Rivoluzione Verde", l'attività di miglioramento genetico del frumento a livello internazionale, svolta principalmente presso il CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo) in Messico, ha permesso la costituzione di un pool genetico di materiali elite ben adattato agli ambienti temperati e

caldi, caratterizzato da taglia ridotta, precocità medio-elevata (insensibilità al fotoperiodo, accoppiata alla semina autunnale) ed alta capacità produttiva in condizioni mediamente favorevoli.

Questi risultati sono stati raggiunti grazie all'impiego di tecniche agronomiche moderne e, soprattutto, un maggiore impiego di fertilizzanti azotati. Il connubio tra miglioramento genetico e tecniche agronomiche innovative ha permesso di ottenere varietà più produttive o *High Yielding Varietis*, HYV (Frederick e Bauer, 1999; Foulkes, 2011). Per quanto riguarda il frumento, negli ultimi 50 anni grazie a questi progressi si è verificato un incremento della resa in granella da 1,4 a 3,1 t ha<sup>-1</sup>, con un conseguente aumento della produttività totale da 303 milioni di tonnellate nel 1966 a 654 milioni di tonnellate del 2010 (dati FAOSTAT, 2010).

I caratteri da prendere in considerazione come potenziali oggetti di selezione per migliorare la produttività in condizioni di limitata disponibilità idrica dovrebbero presentare una sufficiente variabilità genetica, essere geneticamente correlati con la resa e dovrebbero presentare una ereditabilità più elevata rispetto alla resa *per se* (Blum, 1988, 2011; Monneveux e Ribaut, 2006). Idealmente, il rilevamento del carattere scelto dovrebbe essere non distruttivo, rapido, preciso e poco costoso. Inoltre, il carattere secondario da selezionare dovrebbe essere importante per gli effetti sulla resa attraverso l'intero ciclo di crescita, o parte di esso, e fare riferimento a livelli superiori di organizzazione funzionale (ad esempio, a livello di copertura fogliare piuttosto che di pianta singola), fornendo in questo modo informazioni a lungo termine sulla prestazione eco-fisiologica della coltura (Tuberosa, 2012).

In altre parole, l'accento dovrebbe essere posto sulla fenotipizzazione di quei caratteri che costitutivamente possono migliorare la resa *per se* o in condizioni di stress moderato (Blum, 2009; Passioura, 2010), piuttosto che su quelle caratteristiche che migliorano la sopravvivenza delle piante in condizioni di siccità estrema (Bartels *et al.*, 2006), in prospettiva di una possibile compensazione negativa in condizioni in cui lo stress è meno accentuato (Blum, 1996, 2005, 2006; Passioura, 2002, 2007, 2010; Sinclair, 2011).

## **2.5. Resa e sue componenti collegate alla produttività**

Considerando la difficoltà nel selezionare direttamente il carattere resa in ambienti siccitosi a causa della bassa ereditabilità e dell'alta interazione tra genotipo e ambiente (GxE) (Jackson *et al.*, 1996; Quarrie *et al.*, 1999; Richard *et al.*, 2004; Rebetzke *et al.*, 2009), la resa in granella del frumento può essere suddivisa in "componenti numeriche" quali: il numero di piante nate per m<sup>2</sup>, il numero di spighe fertili per pianta, il numero di cariossidi per spighe e il peso medio delle cariossidi (Slafer, 2003; Reynolds *et al.*, 2012). Da un punto di vista fisiologico e funzionale, le suddette componenti risultano essere correlate alla produttività

anche in condizioni di stress idrico e, di conseguenza, possono essere utilizzate come elementi di selezione.

Per descrivere a livello fisiologico la produttività, Hay e Walker (1989) hanno proposto la seguente equazione:

$$GY = BY \times HI$$

dove;

- GY: Grain Yield = produttività;
- BY: Biomass Yield = quantità di biomassa a maturità;
- HI: Harvest Index = percentuale di biomassa allocata nella granella.

Le componenti della resa che vengono maggiormente utilizzate al fine di valutare la produttività finale in frumento sono il numero di semi per m<sup>2</sup> (NG: Number of Grains) e il peso medio individuale della granella (IGW: Individual Grain Weight) (Slafer *et al.*, 1999) da qui l'equazione:

$$GY = NG \times IGW$$

Va inoltre sottolineato il ruolo fondamentale sulla resa che in ambiente siccitoso hanno l'altezza della pianta e la data di fioritura. Quest'ultima soprattutto ha un ruolo fondamentale in ambienti Mediterranei dove lo stress idrico e termico in fase di accumulo della granella penalizzano particolarmente genotipi tardivi, seppur caratterizzati da elevato potenziale produttivo.

### **2.5.1. Numero dei semi**

Il numero finale dei semi è determinato dal numero delle spighe dei culmi fertili e dal numero dei semi per spiga che concorrono a determinare il numero finale dei semi per m<sup>2</sup> (Slafer e Rawson, 1994; Dolferus & Richards, 2011). Il numero potenziale di semi per spiga viene determinato durante la fase di allungamento dei culmi, in corrispondenza della partizione degli assimilati che si verifica nei 20-30 giorni precedenti l'antesi e conseguente sviluppo della spiga (Fischer, 2009, 2011). In questa fase si assiste anche alla formazione della foglia bandiera e della penultima foglia, che determinano in gran parte la produzione di fotosintetati durante la fase di riempimento della granella; inoltre, l'accrescimento della spighe e l'allungamento dei culmi determina la competizione per l'uso degli assimilati (Frederick & Bauer, 1999; Foulkes, 2011). Il peso secco delle spighe ad antesi e numero di semi per m<sup>2</sup> presentano una forte correlazione, ed è per questa ragione che una maggiore riallocazione della biomassa alla spiga prima della fase di antesi rappresenta applicare

rappresenta una caratteristica positiva per ottenere varietà con una produttività più elevata. Tale scopo può essere raggiunto in due modi:

1. Incrementando la partizione dei fotosintetati verso gli organi riproduttivi.
2. Ottimizzando i processi fotosintetici durante le fasi più critiche dello sviluppo

Il primo obiettivo è stato raggiunto in frumento tenero e duro grazie ai programmi di miglioramento genetico sviluppati a partire dalla “Rivoluzione verde”, attraverso processi di ibridazione introgressiva del gene *Rht* (Reduced height; Ellis *et al.*, 2005), che determina il carattere *dwarf* (taglia ridotta) della pianta (Richards, 1992a, 1992b; Addisu *et al.*, 2009). Come conseguenza, la biomassa che viene accumulata negli organi riproduttivi risulta essere maggiore rispetto a quella presente nei fusti, determinando una riduzione della competizione per gli assimilati nella fase di pre-antesi. Le colture possono poi avvantaggiarsi di una incrementata fertilizzazione azotata senza soffrire di un allettamento eccessivo. Richards (1992a), Miralles e Slafer (1995) Royo *et al.*, (2007) e Araus *et al.*, (2008), hanno dimostrato che esiste una soglia di altezza di al di sopra della quale non vi è alcun aumento della biomassa mentre vi è una proporzionale riduzione dell'indice di raccolta (HI: Harvest Index); allo scopo di ottimizzare la resa, le cultivar moderne attualmente commercializzate presentano perciò un'altezza compresa tra i 70 e i 100 cm.

Al fine di incrementare il numero potenziale di semi, che determina un aumento della resa, si potrebbe agire sullo sviluppo di uno specifico organo senza compromettere la crescita della pianta. Rebetzke e colleghi (2011) hanno dimostrato come, ad esempio, la riduzione della crescita del peduncolo che sottende la spiga si risolve in una maggiore partizione degli assimilati alla spiga in sviluppo, per consentire ai fiori distali nella spighetta di crescere ed essere fecondati (Fischer & Stockman, 1986; Youseffian *et al.*, 1992; Miralles *et al.*, 1998; Araus *et al.*, 2008). Il numero delle spighette rimane invariato, ma cresce il numero di semi per spiga (Brooking & Kirby, 1981; Fischer & Stockman, 1986; Nizam and Marshall, 1989; Miralles *et al.*, 1998; Pearce *et al.*, 2011) al fine di aumentare il numero di semi per unità di superficie e la resa in granella (Brandle & Knott, 1986; Flintham *et al.*, 1997; Ferrante *et al.*, 2013).

Lo sviluppo della spiga richiede l'accumulo di fotosintetati durante la fase di pre-antesi; per ottenere una maggiore partizione degli assimilati e, di conseguenza, un incremento del numero potenziale di semi, è possibile manipolare la durata di questa fase di sviluppo così critica. In frumento, sono note tre tipologie di geni che influenzano la data di fioritura, e che quindi possono determinare modificazioni della lunghezza delle fasi del ciclo vegetativo, a seconda della disponibilità di acqua e dei processi di evapotraspirazione:

- geni che rispondono al fotoperiodo *Photoperiod response* (geni *Ppd*; Foulkes *et al.*, 2004)
- geni che rispondono alla vernalizzazione *Vernalization response* (geni *Vrn*; Korzun *et al.*, 1997)

- geni che regolano la fioritura indipendentemente dal fotoperiodo e dalla vernalizzazione, detti anche geni *Earliness per se* o *Eps* (Yang *et al.*, 2003; Dubcovsky *et al.*, 2007), che si attivano in seguito all'accumulo di gradi-giorno e a prescindere dalle condizioni ambientali quali fotoperiodo e basse temperature necessarie per la vernalizzazione.

### **2.5.2. Peso dei semi**

Relativamente al numero dei semi, il peso medio dei semi è caratterizzato da un intervallo di variazione più ristretto ed una correlazione inferiore nei confronti della resa (Slafer & Andrade, 1993; Pedró *et al.*, 2012). L'aumento del numero di semi comporta un ampio impiego degli assimilati che, di conseguenza, sono meno disponibili per la crescita delle dimensioni dei semi stessi; tale condizione è responsabile della forte correlazione negativa tra peso e numero di semi per spiga (Reynolds *et al.*, 2011; Pedro *et al.*, 2012). Cariossidi di dimensioni più rilevanti possono essere ottenute allungando il periodo della fase di riempimento della granella; in tale maniera viene ritardato lo stadio di senescenza e viene assicurato un maggior accumulo di fotosintetati disponibili per la crescita in dimensioni dei semi.

Diversi studi (Austin *et al.*, 1977; Schnyder, 1993; Yang & Zhang, 2006; Barnabás *et al.*, 2008; Vassileva *et al.*, 2012) hanno dimostrato inoltre come i processi fotosintetici fogliari durante il riempimento della granella svolgano un ruolo fondamentale nel definire la crescita e il peso dei semi; infatti, sono proprio gli assimilati prodotti in questa fase a partire dalla foglia bandiera, dalla spiga, dal culmo e dalla penultima foglia, che determinano l'80-90% del peso secco della granella. La produzione di carboidrati durante la fotosintesi nelle fasi iniziali di riempimento della granella determina un rapido aumento del peso della cariosside (Brocklehurst, 1977; Kiniry, 1993; Scofield *et al.*, 2009). Durante la fase di allungamento degli internodi, i carboidrati idrosolubili vengono immagazzinati nei culmi e successivamente ridistribuiti verso la spiga nel corso dello stadio finale di riempimento della granella contribuendo, in questo modo, a determinare fino al 30% della resa in granella (Blum, 1998; Araus *et al.*, 2002; Monneveux *et al.*, 2012; Dreccer *et al.*, 2013). Tuttavia, recenti ricerche svolte su riso indicano che è possibile manipolare specificatamente le dimensioni del seme in modo da influenzare le resa potenziale e la stabilità della resa (Li *et al.*, 2011).

## **2.6. Miglioramento dell'uso dell'acqua nella produzione delle colture**

L'approvvigionamento d'acqua dolce è assolutamente indispensabile per tutte le forme di agricoltura, anche se la quantità di acqua necessaria varia notevolmente tra i diversi tipi di agricoltura e regioni climatiche. Data la portata delle attività agricole (1,54 miliardi di ettari

di seminativi e colture permanenti; dati FAOSTAT 2010), questo significa che questa attività domina l'uso dell'acqua dolce e rappresenta circa il 70% dei prelievi di risorse idriche a livello mondiale (Morison *et al.*, 2008; dati FAOSTAT 2010). Poiché gran parte dell'acqua utilizzata per le colture si perde attraverso i processi d'evaporazione e traspirazione, in netto contrasto con gli usi domestici ed industriali, l'agricoltura arriva a rappresentare l'80-90% di acqua dolce utilizzata dagli esseri umani (Shiklomanov & Rodda 2003; Rijsberman 2006; FAO, 2010). La crescita della popolazione, l'urbanizzazione e lo sviluppo economico fanno aumentare le richieste di acqua. Di conseguenza, vi è una crescente competizione per le risorse idriche tra l'agricoltura e le altre utenze, mentre in molte regioni si registra una riduzione della qualità delle acque così come della quantità (Morison *et al.*, 2008); chiaramente, per rendere l'agricoltura sostenibile è necessario ridurre i consumi di acqua a livello globale.

Sotto il profilo socio-economico, gravi e prolungate siccità hanno un effetto particolarmente negativo; come riportato da Coldiretti (2012), l'International Grains Council (Igc) ha diffuso le proprie cifre a livello globale, dalle quali risulta un crollo del raccolto mondiale di 39 milioni di tonnellate di grano, con conseguente aumento dei prezzi. Tale calo è stato determinato tanto dai problemi fatti registrare nell'Unione Europea quanto dai crolli produttivi in Argentina, in Ucraina, in Russia e, soprattutto, in Australia, dove la siccità si è fatta sentire ancora una volta riducendo del 19% i volumi. Secondo l'Igc, sono diminuiti anche gli stock, passando da 199 a 197 milioni di tonnellate, ed il consumo globale.

Per un migliore utilizzo dell'acqua in agricoltura è necessaria una stretta collaborazione tra diverse discipline di ricerca quali miglioramento genetico, fisiologia vegetale, agronomia, biotecnologia. Il contributo di ciascuna disciplina dovrebbe confluire nello scopo finale di individuare e/o sviluppare colture che richiedano meno acqua e che mantengano contemporaneamente alti livelli di produttività in condizioni di buona disponibilità idrica, obiettivo perseguibile attraverso (i) una migliore comprensione dei fattori morfo-fisiologici e molecolari che determinano la crescita e la risposta della pianta in condizioni di differenti disponibilità idriche e (ii) l'individuazione dei loci che influenzano la variabilità genetica di tali fattori.

Kofi Annan, Segretario Generale dell'ONU, nel 2000 ha dichiarato: “Abbiamo bisogno di una Rivoluzione Blu in agricoltura che sia focalizzata sull'aumento della produttività per unità di acqua utilizzata”; tale concetto viene definito “more crop per drop” (UNIS 2000).

La quantità di resa prodotta per unità di acqua utilizzata viene definita come “efficienza dell'uso dell'acqua” (WUE, Water Use Efficiency), o “produttività dell'acqua” (Jones, 1993, 2004; Morison *et al.*, 2008; Tardieu, 2012).

Diverse strategie possono migliorare la produttività dell'acqua in agricoltura: alcune prevedono un migliore utilizzo della risorsa idrica e cambiamenti nella gestione delle colture mentre altre comportano la coltivazione di varietà che siano più efficienti nel loro consumo

d'acqua (Condon *et al.*, 2004). Per queste ragioni, migliorare l'efficienza dell'uso dell'acqua delle colture agrarie rappresenta un imperativo urgente in uno scenario in cui si assiste ad un crescente bisogno di salvaguardare le risorse idriche (Condon *et al.*, 2004; Morison *et al.*, 2008; Davies *et al.*, 2010; Tardieu, 2012; Tuberosa, 2012).

L'efficienza dell'uso dell'acqua viene generalmente definita agronomia tramite la seguente formula (Viets, 1962):

$$WUE = \text{Crop Yield} / \text{Water use to produce the yield}$$

dove;

Crop Yield = rappresenta generalmente la resa in termini economici;

Water use to produce the yield = la quantità d'acqua fornita alla coltura per produrre la resa finale.

Il termine efficienza dell'uso dell'acqua può essere utilizzato in un'ampia gamma di scale; può essere riferito all'utilizzo di un'azienda agricola, di una coltura, di una pianta o di parti di essa, come ad esempio della foglia (Morison *et al.*, 2008.) Nel settore agricolo, il termine WUE può essere utilizzato a diversi livelli;

- a livello di foglia viene inteso come il tasso di fotosintesi della foglia a seconda del tasso di traspirazione;
- a livello di pianta intera si riferisce al rapporto tra biomassa totale secca e l'acqua utilizzata;
- a livello di resa economica finale viene definita come il raccolto finale prodotto per unità di superficie traspirata.

Inoltre, è possibile includere o escludere l'evaporazione dalla superficie del "terreno e direttamente dalle piante, definita "efficienza di traspirazione (TE o 'transpiration efficiency'). Il concetto di WUE può essere applicato anche su scale temporali molto diverse. A livello di coltura o di campo, la WUE può per riferirsi ad intervalli di tempo di giorni o mesi, o per l'intera stagione di crescita del raccolto, o per anno. A livello di foglia o pianta, può essere applicato quando si considerino i flussi diffusivi di CO<sub>2</sub> e vapore acqueo attraverso le foglie, la WUE rappresenta il rapporto tra il tasso netto di assimilazione di CO<sub>2</sub> e il tasso di traspirazione (Penman & Schofield, 1951), e di solito si riferisce ad un lasso di tempo di secondi o minuti.

Nel caso di colture da granella, quando si considera l'efficienza dell'uso dell'acqua stagionale, la WUE viene definita come la quantità di sostanza secca prodotta, ossia la resa in granella (GY, Grain Yield) per unità di acqua persa attraverso l'evapotraspirazione. Una formula classica che mette in evidenza il ruolo cruciale della WUE nel determinare la resa in



granella di colture cresciute in condizioni di limitata disponibilità di acqua è stata suggerita da Passioura (1977):

$$GY = W \times WUE \times HI$$

dove:

W = è la quantità totale di acqua traspirata dalle colture ed evaporata dal campo;

HI = è l'indice di raccolto, cioè, il rapporto tra GY e biomassa totale.

Quando si utilizza questa formula, occorre considerare la possibile interdipendenza di queste variabili, con il risultato che la selezione per migliorare la WUE al fine di aumentare la resa (GY) può essere parzialmente compensata da una riduzione della quantità d'acqua estratta dal terreno. In effetti, un certo numero di caratteri può influenzare sia la componente W che la WUE.

Richards (2006) e Salekdeh *et al.* (2009) hanno identificato protocolli di fenotipizzazione per gestire ciascun fattore della formula, descrivere le loro caratteristiche principali e illustrare la loro integrazione con i diversi approcci molecolari. In questo modo, è possibile aumentare la resa di talune colture in ambienti caratterizzati da scarsità d'acqua, selezionando piante per una varietà di caratteri che possono avere effetto sulla produttività tramite una delle componenti dell'equazione di Passioura. Queste includono, ad esempio:

- estendere la durata del ciclo colturale in frumento, permettendo la coltivazione in periodi dell'anno in cui si abbia bassa evaporazione dal suolo, aumentando di conseguenza la quantità d'acqua disponibile per le successive fasi di sviluppo della pianta, in modo tale da incrementare la componente W dell'equazione (Slafer *et al.*, 2005; Richards, 2006; Rebetzke *et al.*, 2007; Richards *et al.*, 2007);
- la selezione per il carattere *early vigor* (vigore precoce) che, in condizioni di bassa evapotraspirazione, può consentire alle colture annuali di ottimizzare la WUE e limitare la perdita di acqua per evaporazione diretta a livello della superficie del suolo. In questo modo, è possibile immagazzinare una maggiore quantità d'acqua che risulta così disponibile per le successive fasi di sviluppo, quando l'umidità del terreno si esaurisce progressivamente e diventa sempre più limitante per la resa (Slafer *et al.*, 2005; Richards, 2006; Rebetzke *et al.*, 2007; Richards *et al.*, 2007). Il carattere *early vigor* è stato sfruttato per migliorare la WUE e la resa del frumento (Asseng *et al.*, 2003; Richards, 2006; Rebetzke *et al.*, 2007);
- la regolazione osmotica in frumento (Morgan, 2000) che aiuta a sostenere lo stato idrico del fusto durante le fasi principali di sviluppo delle piante (aumento HI);
- la selezione per il carattere *stay-green* in frumento e sorgo, ossia mantenere più a lungo le foglie verdi in condizioni di siccità terminale. Il ritardo della senescenza fogliare permette un ulteriore assorbimento di acqua e azoto dal suolo, in questo modo si realizza un

aumento della resa per unità di acqua utilizzata poiché sono disponibili più carboidrati per il riempimento della granella (aumento HI; Borrell *et al.*, 2000, 2001),

- un apparato radicale sviluppato in profondità che contribuisce allo sviluppo della granella in frumento poiché determina un aumento della componente W.

Passioura (2006) ha messo in evidenza come la peculiarità che accomuna questi caratteri è che essi agiscono durante tutta la durata del ciclo vitale della coltura (o almeno durante i periodi chiave dello sviluppo), piuttosto che attraverso risposte allo stress idrico immediate o a breve termine.

Un buon elemento di selezione per predire la WUE risulta essere la variazione isotopica del carbonio 13 ( $\Delta^{13}C$ ). Questo parametro misura il rapporto degli isotopi stabili del carbonio ( $^{13}C/^{12}C$ ) nella materia vegetale secca rispetto al rapporto presente nell'atmosfera (Condon *et al.*, 1990). A causa delle differenze di anatomia fogliare e dei meccanismi di fissazione del carbonio nelle specie C3 o C4, gli studi sul  $\Delta^{13}C$  possono avere implicazioni più ampie per le specie C3 in cui la variazione di  $\Delta^{13}C$  è maggiore rispetto alla specie C4, e ha un impatto maggiore sulla resa delle colture (Condon *et al.*, 1990, 2006). Comunemente, ma non sempre (Turner *et al.*, 2007),  $\Delta^{13}C$  è negativamente associato a WUE durante il periodo di accumulo della biomassa (Condon *et al.*, 1990, 2004; Araus *et al.*, 2002; Rebetzke *et al.*, 2002, Xu *et al.*, 2007; Royo *et al.*, 2008).

In condizioni di stress idrico, la discriminazione del carbonio 13 ( $\Delta^{13}C$ ) è un buon predittore della conduttanza stomatica (Condon *et al.*, 2002.) e della WUE in diverse colture (Turner, 1997; Tambussi *et al.*, 2007). Un certo numero di studi condotti nel frumento tenero e duro in diverse condizioni di disponibilità di acqua hanno mostrato che la correlazione tra  $\Delta^{13}C$  e GY finale varia da positivo, quando una grande quantità d'acqua è disponibile per la coltivazione, al negativo in condizioni di siccità, senza alcuna correlazione a in condizioni intermedie (Condon *et al.*, 1993, 2004). Questi risultati possono essere interpretati in base all'influenza sia della conduttanza stomatica che della attività fotosintetica sul  $\Delta^{13}C$ , e sul fatto che la produzione di biomassa è limitata, in anni particolarmente piovosi, da una bassa conduttanza stomatica, un vantaggio in condizioni di siccità (Turner, 1997). Il  $\Delta^{13}C$  misurato nella granella è correlato positivamente con la durata del ciclo di crescita (Araus *et al.*, 1997) e negativamente con la temperatura della foglia (Richards *et al.*, 2002). Pertanto, il rapporto tra  $\Delta^{13}C$  e GY dipende dalle condizioni ambientali, dalla fenologia della coltura e l'organo (ad esempio, foglie o semi) da cui vengono raccolti i campioni (Araus *et al.*, 1997; Merah *et al.*, 2001, Condon *et al.*, 2004).

Un esempio di grande successo nel breeding convenzionale selezionando un carattere con elevata WUE, è rappresentato dallo sviluppo di linee di frumento in cui le regioni genomiche che conferiscono una WUE alta (ma sostenuti tassi di assimilazione) sono state introgressate in materiale elite (Rebetzke *et al.*, 2002). Al fine di stimare la WUE è stata utilizzata la discriminazione dell'isotopo 13 del carbonio ( $\Delta^{13}C$ ), misurata con uno spettrometro di

massa. Questa strategia ha portato al rilascio commerciale di genotipi di frumento con un aumento della resa del 10-15% in ambienti aridi e a bassa produttività, e senza penalità nella resa in ambienti a più alto rendimento. Questo vantaggio scompare per valori di piovosità superiori a 500 mm, dimostrando che questo tipo di materiale vegetale è adatto ad ambienti particolare siccitosi.

Il breeding per la WUE ha talvolta portato a risultati negativi, dando origine a piante piccole con traspirazione, fotosintesi e resa ridotte (Blum, 2005).

Poiché il tasso di fotosintesi è meno sensibile alle condizioni ambientali rispetto alla conduttanza stomatica, il rapporto tra fotosintesi e conduttanza stomatica è più spesso massimizzato per bassi valori di entrambe le variabili, risultando in un basso accumulo di biomassa. Va tenuto presente che gli agricoltori alla fine del ciclo raccolgono la granella e non la WUE, il che significa che bassi valori della WUE possono essere effettivamente desiderabili solo quando la WUE è negativamente associata con GY, come è ben noto per quei cereali che si distinguono per valori differenti nella loro WUE intrinseca (Blum, 2005, 2006, 2009). Pertanto, la WUE non dovrebbe essere sempre alla presa come indicatore della tolleranza alla siccità. Il miglior esempio è fornito da una popolazione di linee inbred ricombinanti (Recombinant Inbred Lines o RILs), che si differenziano per la loro capacità di estrarre l'acqua dal suolo dovuta a differenze di profondità delle radici, e quindi una maggiore capacità di accedere all'umidità immagazzinata negli strati più profondi del suolo. Dal momento che la produzione di biomassa è strettamente legata alla traspirazione, il breeding per massimizzare la captazione dell'umidità dal suolo è un obiettivo molto importante per il miglioramento della resa in condizioni di stress idrico. L'uso efficace dell'acqua (Effective Use of Water o EUW) implica la massima cattura dell'umidità del terreno per la traspirazione, che coinvolge anche la ridotta traspirazione non stomatica e la minima perdita d'acqua per evaporazione del suolo (Blum, 2009).

Poiché la WUE è maggiore nei genotipi caratterizzati da bassa conduttanza stomatica, che deriva spesso da uno stato idrico inferiore, i genotipi che sono più dispendiosi (vale a dire, con un WUE inferiore) sono altresì in grado di estrarre più acqua dal terreno (Merah, 2001; Rebetzke, 2002; Blum, 2006, 2009, 2011), pur mantenendo alta la conduttanza stomatica, ed avranno di conseguenza una resa maggiore. Al contrario, in condizioni di umidità del suolo limitata, la WUE bassa derivante da eccessiva evapotraspirazione non consente l'accumulo sostenuto di sostanza secca e la sua partizione verso gli organi riproduttivi (Monneveux & Ribaut, 2006; Richards, 2006; Tambussi, 2007; Barnabás *et al.*, 2008; Sinclair *et al.*, 2008). Questo risultato introduce un concetto fondamentale per l'interpretazione del rapporto causa-effetto tra i caratteri morfo-fisiologici e la resa in granella in condizioni di stress idrico: la presenza e la grandezza di questo rapporto a livello della pianta intera o a livello di regioni cromosomiche non sono universali e possono variare

molto secondo la dinamica (in termini di tempo e frequenza) e dell'intensità degli episodi siccitosi (Collins *et al.*, 2008; Sinclair, 2011; Tardieu, 2012).

Alla luce di queste considerazioni, va in ogni caso tenuto conto della grande importanza della WUE per ricerca studi inerenti la resistenza alla siccità, in quanto questo carattere fornisce informazioni su come la pianta risponde e si comporta a seconda della quantità d'acqua disponibile.

### **3. CARATTERIZZAZIONE GENOTIPICA: MARCATORI MOLECOLARI, MAPPE GENETICHE ED ANALISI QTL**

Considerando la complessità dei meccanismi che regolano il carattere resa e le sue componenti, nonché la resistenza allo stress idrico, non è sorprendente che i mezzi a disposizione del miglioramento genetico tradizionale non sempre si siano dimostrati all'altezza delle esigenze degli agricoltori.

Una delle difficoltà maggiori del miglioramento genetico risiede nella capacità di poter verificare l'avvenuto inserimento in una cultivar di geni utili che possano migliorare il carattere di interesse, nonché la contemporanea introgressione assieme ad essi di altri geni che determinano caratteri svantaggiosi da un punto di vista agronomico; in situazioni in cui i primi sono associati ai secondi, infatti, la situazione risulta complessivamente sfavorevole (*linkage drag*). Un ulteriore limite pratico del miglioramento genetico tradizionale risiede nel fatto di essere legato ai tempi dei cicli biologici delle specie vegetali, in quanto si basa sull'identificazione di un elevato numero di progenie (diversi incroci, diversi cicli selettivi) per selezionare determinati fenotipi; in questo modo è necessario attendere che il carattere si manifesti per poterlo valutare, come ad esempio le caratteristiche legate al fiore o al frutto, l'epoca di fioritura e spigatura.

Negli ultimi decenni i progressi tecnici legati alla introduzione della biologia molecolare, e in particolar modo i marcatori molecolari, stanno contribuendo a rendere più efficiente il miglioramento genetico. In particolare, tali progressi stanno contribuendo ad una migliore comprensione dei fattori genetici e fisiologici alla base della produttività delle colture agrarie. Grazie al loro utilizzo è inoltre possibile individuare le regioni cromosomiche responsabili di caratteri chiave quali la resa e della WUE in condizioni di stress idrico, attraverso l'analisi dei loci per i caratteri quantitativi detti anche QTL (Quantitative Trait Loci) (Tuberosa *et al.*, 2002; Tuberosa & Salvi, 2006, Maccaferri *et al.*, 2006).

#### **3.1. Marcatori molecolari**

I marcatori molecolari rappresentano una particolare classe di marcatori genetici. Per marcatore genetico s'intende una qualunque caratteristica determinata geneticamente che consente di diversificare due o più genotipi; in altri termini, una sequenza di DNA la cui presenza in forme alternative (alleli) può essere rilevata mediante analisi del fenotipo, del prodotto genico o della stessa sequenza di DNA.

Esistono tre tipologie principali di marcatori genetici: marcatori morfologici, marcatori biochimici, marcatori molecolari.

I primi marcatori ad essere usati nel miglioramento genetico sono stati i marcatori morfologici, ossia geni mendeliani con effetti sul fenotipo ben evidenti (per esempio colore dei fiori, forma del seme). I marcatori morfologici presentano dei limiti data la prevalente dominanza della loro espressione, la manifestazione spesso rilevabile in fase avanzata del ciclo ed il limitato polimorfismo reperibile nelle varietà coltivate.

Migliori caratteristiche rispetto ai marcatori morfologici sono state evidenziate dai marcatori biochimici; all'interno di questi possiamo distinguere due principali classi. La prima comprende i composti chimici eterogenei a basso peso molecolare (come ad esempio fenoli, flavonoidi), di scarsa utilità nella selezione perché influenzati dall'ambiente e di complessa analisi. Alla seconda classe appartengono le proteine di riserva ed enzimatiche, che risultano poco o per nulla influenzabili dall'ambiente ed evidenziabili attraverso metodologie relativamente poco costose e di rapida realizzazione. Oltre però all'esistenza di un numero limitato di sistemi enzimatici polimorfici nelle diverse specie, non possono né essere evidenziate differenze nucleotidiche che per la degenerazione del codice genetico codificano per prodotti proteici identici, né valutate regioni genomiche non codificanti.

Si definisce marcatore molecolare un locus genomico che, in virtù della sua presenza, contraddistingue in modo unico ed inequivocabile il segmento cromosomico con il quale si identifica. I marcatori molecolari sono basati esclusivamente su polimorfismi della sequenza del DNA e sono di solito presenti in numero molto elevato. Le caratteristiche che hanno reso i marcatori molecolari di così ampio utilizzo sono inoltre l'ereditarietà mendeliana, l'ubiquitarità nel genoma sia in regioni trascritte che non, quindi anche regioni di regolazione e soprattutto regioni intergeniche, l'assenza di influenza da parte dell'ambiente e dello stadio di sviluppo e di effetti epistatici e pleiotropici, i costi relativamente bassi di analisi che spesso risultano facilmente automatizzabili, e la natura neutrale rispetto alla selezione naturale. La possibilità di utilizzare i polimorfismi della sequenza del DNA come marcatori genetici è legata all'introduzione di due importanti tecniche di biologia molecolare, l'ibridazione di tipo *Southern*, a metà degli anni '70 (Southern Blot Hybridization o SBH; Southern, 1975) su cui si basano i marcatori RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; Botstein *et al.*, 1980), e la reazione a catena della polimerasi o PCR (Polymerase Chain Reaction; Mullis & Faloona, 1987), agli inizi degli anni '80, alla base di molte tecniche di marcatori molecolari.

Mentre i marcatori RFLP sono ormai tecnicamente superati e quindi non più utilizzati, i marcatori basati su PCR sono ancora ampiamente utilizzati.

Tra le principali tecniche di marcatori molecolari basati su PCR ricordiamo i RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA; Williams *et al.*, 1990) o polimorfismi del DNA amplificato a caso, i microsatelliti o SSR (Simple Sequence Repeat; Tautz *et al.*, 1986; Tautz, 1989), gli AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Vos *et al.*, 1995), ed i e DArT® (Diversity Arrays Technology Jaccoud *et al.*, 2001). Di recente, la combinazione delle

tecniche di PCR con quelle basate su tecnologie di tipo 'microarray' e sequenziamento di DNA con approcci di nuova generazione (NGS, 'next-generation sequencing') ha portato ad un enorme sviluppo dei marcatori SNP (Single Nucleotide Polymorphism, polimorfismi al singolo nucleotide). Questi ultimi sfruttano, come polimorfismi, le sostituzioni nucleotidiche, di gran lunga il tipo di polimorfismo genetico più comune.

Come per ogni altro locus Mendeliano, i marcatori molecolari possono essere ad ereditarietà dominante, dove non è possibile distinguere l'eterozigote da uno dei due omozigoti (per esempio in situazioni in cui il polimorfismo tra i due alleli è dato dalla presenza/assenza di un frammento di DNA (ad esempio, in RAPD e AFLP); o codominante, dove l'eterozigote ed i due omozigoti sono perfettamente distinguibili in quanto i polimorfismi tra alleli sono causati da differenze di lunghezza dei frammenti di DNA (ad esempio, per RFLP e SSR).

I marcatori rivestono notevole interesse per la ricerca genetica di base ed applicata (miglioramento genetico), oltre che nell'attività sementiera. Tra le possibili applicazioni ricordiamo:

- 1) la costruzione di mappe genetiche, utili per individuare fattori genetici coinvolti nel controllo delle caratteristiche di interesse agronomico;
- 2) la selezione assistita con marcatori (MAS: Marker-Assisted Selection);
- 3) la caratterizzazione della variabilità genetica, la classificazione e conservazione del germoplasma;
- 4) l'identificazione varietale.

Descriverò ora con maggiore dettaglio le tecniche di marcatori che ho utilizzato nello svolgimento della tesi.

### **3.1.1 SSR: Simple Sequence Repeat (Ripetizioni di Sequenze Semplici o Microsatelliti)**

I marcatori SSR sono basati su tecniche di amplificazione di sequenze semplici ripetute. Vengono altresì definiti loci microsatelliti in quanto sono costituiti da piccole sequenze di DNA, ossia unità mono-, di-, tri- fino a penta- o esa- nucleotidiche, ripetute in tandem in numero variabile (da 1 a diverse decine di unità, e a grandezza sempre inferiore a 1 kilobase). I loci microsatelliti sono presenti nel genoma di tutti gli organismi eucarioti e particolarmente numerosi negli esseri viventi superiori (Tautz, 1989; Ellegren, 2004; Kalia *et al.*, 2011); essi risultano determinati da sequenze costituite dalla ripetizione di un breve motivo di base di lunghezza generalmente compresa tra 1 e 6 bp (Tautz, 1989). Sono tipicamente multiallelici e contraddistinti da una distribuzione uniforme nel genoma, con frequenza di dispersione di un satellite ogni 10-40 kb, fino anche ad uno ogni 1,9 kb

(Temnykh *et al.*, 2001; Ellegren, 2004; Kalia *et al.*, 2011). I marcatori SSR mostrano inoltre un'elevata variabilità di lunghezza probabilmente causata da fenomeni di crossing-over ineguale e da scivolamento della polimerasi nella fase di replicazione del DNA [(“polymerase slippage”) (Tautz *et al.*, 1986; Röder *et al.*, 1998; Gupta & Varshney, 2000; Somers *et al.*, 2004)] oppure per errato appaiamento della regione ripetuta di due filamenti di DNA durante la replicazione; questa condizione infatti determina la formazione di anse con conseguente aumento o diminuzione delle unità ripetute del filamento sintetizzato ex novo [(“replication slippage”) (Eisen *et al.*, 1999; Varshney *et al.*, 2005)]. Le variazioni di una singola ripetizione risultano essere le più frequenti (Weber e Wong, 1993; Varshney *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2009). Riassumendo, le caratteristiche che rendono i marcatori SSR di così ampio utilizzo sono:

- la riproducibilità elevata;
- l'uniformità della distribuzione nel genoma;
- la codominanza;
- alti livelli di informatività;
- la capacità di rilevare un elevato numero di alleli.

Per identificare i marcatori SSR si utilizzano solitamente librerie di cloni (frammenti di DNA) genomici, che vengono analizzate con particolari sonde ripetute, al fine di identificare quei cloni che presentano le sequenze microsatelliti. Una volta ottenuti tali risultati, le sequenze che fiancheggiano le regioni ripetute vengono utilizzate per progettare e sintetizzare primer specifici.

Per rilevare la presenza del polimorfismo (in questo caso differenze in termini di peso molecolare presenti tra gli alleli dei genotipi da discriminare) si utilizzano in genere elettroforesi su gel di agarosio o di poliacrilammide. Per amplificare gli SSR è anche possibile utilizzare una PCR multiplex basata nell'utilizzo all'interno della stessa reazione di due o più primer aventi lo stesso protocollo di amplificazione. La PCR multiplex, anche se consente di risparmiare tempo e accrescere l'informatività, può determinare una restrizione dell'efficienza di amplificazione e un incremento di prodotti di amplificazioni indesiderati (Donini *et al.*, 1998; Collard *et al.*, 2005; Xu, 2008).

### **3.1.2 DArT®: (Diversity Arrays Technology)**

I DArT sono marcatori bi-allelici generalmente dominanti che possono essere sviluppati in assenza di conoscenze di sequenze genomiche della specie su cui si applicano. La tecnologia DArT è stata originariamente sviluppata da A. Kilian e D. Jaccoud (Jaccoud *et al.*, 2001) presso il Centre for Application of Molecular Biology to International Agriculture (CAMBIA, www.cambia.org). A partire dagli studi su riso, la tecnica DArT è stata applicata per l'analisi di diverse colture, patogeni fungini e qualche specie animale (Wenzl *et al.*, 2004; Akbari *et*



*al.*, 2006; Semagn *et al.*, 2006). Attualmente DArT Pty. Ltd. ([www.diversityarrays.com](http://www.diversityarrays.com)) fornisce diversi servizi per un certo numero di queste specie. Inoltre Triticarte Pty Ltd ([Www.triticarte.com](http://Www.triticarte.com)), una joint venture tra Value Added Wheat CRC Ltd e la Diversity Arrays Technology Pty Ltd, è stata istituita per il settore cereali per offrire servizi di genotipizzazione per i breeders di orzo e frumento (Akbari *et al.*, 2006).

La tecnologia DArT rappresenta un metodo per realizzare marcatori genetici polimorfici. DArT è una metodologia sequenza-indipendente e altamente informativa, in grado di rilevare migliaia di marcatori in un singolo esperimento. I marcatori DArT vengono tipizzati in parallelo, utilizzando piattaforme microarray ad alto rendimento e con un basso costo per analisi.

La procedura DArT comprende essenzialmente cinque fasi: 1) la costruzione di una libreria genomica; 2) la stampa della libreria genomica su microarray (ossia un insieme di microscopiche sonde di DNA fissate ad una superficie solida come un chip di silicio formanti un array o matrice); 3) la marcatura delle rappresentazioni genomiche, 4) ibridazione di questa rappresentazione genomica marcata sul microarray, seguita da lavaggio e 5) scansione ed analisi dei dati.

Essi risultano particolarmente utili per accelerare i processi di selezione delle piante, e per la caratterizzazione della variabilità genetica di specie domestiche e dei loro parenti selvatici. Sono stati sviluppati DArT di successo per il riso, l'orzo, grano e manioca ed è stato realizzato un apposito pacchetto di gestione ed analisi dei dati, un elemento chiave della tecnologia, interamente costruita con componenti *Open Source*, cioè liberi da brevetto; in questo modo, è stato possibile saturare numerose mappe di associazione genetica precedentemente costituite per diverse specie di interesse agronomico (Gupta *et al.*, 2008, 2010; Reif *et al.*, 2011)

### **3.2. Mappe genetiche**

I marcatori molecolari co-segregano con i geni e vengono ereditati secondo le leggi di Mendel; essi quindi possono essere utilizzati nella costruzione di mappe genetiche; le mappe vengono impiegate per posizionare sui cromosomi i geni che controllano i caratteri qualitativi e sono elementi essenziali per la dissezione dei fattori che controllano i caratteri quantitativi o QTLs. Per mappa genetica si intende una rappresentazione lineare dei cromosomi sotto forma di gruppi di associazione o di *linkage* tra i vari geni e/o marcatori, che riporta le distanze relative tra loci in unità di ricombinazione (unità di mappa o centiMorgan “cM”). Una distanza di 1 cM corrisponde all'1% di ricombinazione tra due marcatori, ovvero un gamete ricombinante ogni 100. In genere, una mappa si ricava dai dati morfologici e/o molecolari ottenuti dall'analisi di una popolazione sperimentale segregante. Possono essere

mappati solo marcatori genetici polimorfici nella popolazione (cioè loci che presentano almeno due alleli nella popolazione). Per la costruzione delle mappe possono essere impiegati ogni tipo di marcatori molecolari.

Nelle specie vegetali sono utilizzati vari tipi di popolazioni sperimentali per la costruzione di mappe genetiche e per il mappaggio di QTL. Possono essere utilizzate popolazioni F<sub>2</sub>, ottenute mediante autofecondazione dell'ibrido F<sub>1</sub> prodotto dall'incrocio di due linee omozigoti diversificate, oppure popolazioni BC<sub>1</sub> ottenute mediante il reincrocio dell'ibrido F<sub>1</sub> con una delle due linee parentali. Popolazioni F<sub>2</sub> o da reincrocio non permettono però di replicare le osservazioni (una pianta = un genotipo) e di "immortalizzare" la popolazione, rendendo quindi problematica una ampia ed approfondita fenotipizzazione in anni diversi. Per tale ragione vengono preferite popolazioni "immortalizzate", come ad esempio gli aploidi raddoppiati (DH o Double Haploids) o le linee inbred ricombinanti (Recombinant Inbred Lines o RIL). Le linee RIL e quelle DH infatti possono essere mantenute mediante autofecondazione; offrono la possibilità di aggiungere, in tempi successivi, nuovi marcatori ad una mappa precedentemente prodotta, e di effettuare fenotipizzazioni più dettagliate, nel tempo e nello spazio.

Lo sviluppo delle RIL avviene per autofecondazioni successive a partire dalla popolazione F<sub>2</sub> scegliendo, in ciascuna generazione, un solo seme/pianta per originare la generazione successiva; ad ogni generazione la quota di eterozigosi si dimezza, in modo da accrescere progressivamente l'omozigosi. Dopo 6-7 generazioni il livello di omozigosi sarà vicino al 100% e ciascuna linea avrà fissato gli alleli in brevi blocchi di associazione risultando, visti gli eventi di ricombinazione accumulati, in una costituzione genomica a mosaico rispetto a quella dei parentali della popolazione. Le popolazioni DH si possono ottenere ad esempio mediante androgenesi attraverso coltura di antere o polline prelevati da una F<sub>1</sub>, e successivo raddoppiamento cromosomico. In tal modo è possibile ottenere molto rapidamente linee omozigoti che risultano fissate a tutti i loci.

La produzione di un mappa genetica passa attraverso tre fasi:

- 1) Calcolo della distanza tra tutte le coppie di loci (geni o marcatori) sulla base delle frequenze di ricombinazione e valutazione della presenza di associazione attraverso test statistici (ad esempio, il test del chi-quadrato,  $\chi^2$ , o il metodo del punteggio LOD).
- 2) Suddivisione dei loci in gruppi di associazione (anche detti di concatenazione).
- 3) Ordinamento dei loci all'interno di ciascun gruppo di associazione.

A tale scopo attualmente esistono pacchetti statistici come ad esempio MAPMAKER MAPMAKER (Lander *et al.*, 1987) e JOINMAP (Stam & Van Ooijen, 1995; Van Ooijen, 2006).

Una volta costruite, le mappe genetiche vengono utilizzate per identificare i segmenti cromosomici coinvolti nel controllo dei caratteri sia qualitativi che quantitativi. Il mappaggio genico per caratteri qualitativi è piuttosto semplice e si basa sulla ricerca di associazione tra

valori fenotipici facilmente rilevabili e marcatori molecolari, all'interno di una popolazione segregante.

Più complesso risulta invece il mappaggio di geni che controllano caratteri quantitativi, quali ad esempio la resa (granella, biomassa), l'epoca di spigatura e fioritura, l'altezza, il peso del seme.

### **3.3. Analisi QTL: dissezione dei caratteri quantitativi**

A differenza dei caratteri Mendeliani, per i quali gli individui sono suddivisibili in classi discrete, e sono controllati da uno o pochi geni (caratteri mono – oligogenici), la maggior parte dei caratteri di interesse agronomico (come, ad esempio la resa, l'altezza, la resistenza alla siccità o alle malattie) appartiene alla categoria dei caratteri quantitativi. I caratteri quantitativi variano in modo continuo in un insieme di individui, possono essere misurati e descritti mediante misure, e generalmente producono una distribuzione continua degli individui nell'ambito di una popolazione ampia (Sham *et al.*, 2002). Dal punto di vista genetico, i caratteri quantitativi dipendono dall'azione di molti geni, e sono perciò definiti anche caratteri poligenici. Inoltre, a differenza dei caratteri Mendeliani i caratteri quantitativi risentono fortemente dell'interazione con l'ambiente (Semagn *et al.*, 2010).

In base alle ipotesi di Nilsson-Ehle (1909) e East (1916), si assume che la variabilità genetica di un carattere quantitativo sia controllata dagli effetti di numerosi geni, detti Loci per Caratteri Quantitativi (QTL, Quantitative Trait Loci) (Bulmer, 1985; Edwards *et al* 1987.; Falconer & Mackay, 1996; Xu, 1997; Lynch e Walsh, 1998; Xu, 2010).

I caratteri quantitativi complicano il processo di selezione nel miglioramento genetico perché le prestazioni di un individuo (per esempio, una linea o una cultivar) riflettono solo in parte la sua costituzione genetica, infatti:

(i) i caratteri quantitativi sono controllati da geni multipli, e piante con lo stesso fenotipo possono avere alleli diversi per ciascuno dei molti geni o QTL,

(ii) piante con lo stesso genotipo possono mostrare diversi fenotipi quando coltivati in ambienti diversi;

(iii) l'effetto di QTL può dipendere dalla costituzione allelica della pianta ad altri QTL (cioè le relazioni degli effetti genetici tra i vari QTL non sono necessariamente di tipo additivo).

Per questi motivi, non è sempre possibile dedurre il genotipo dal fenotipo.

Uno dei problemi principali della genetica quantitativa consiste appunto nel capire come distinguere quanto della variabilità osservata ( $V_p$ ) per un carattere è dovuta alla variabilità genetica ( $V_g$ ) e quanto è di origine ambientale ( $V_e$ ), secondo la formula:

$$V_p = V_g + V_e$$

La finalità di questo tipo di studi è identificare quali regioni sono responsabili del controllo dei caratteri quantitativi, ovvero mappare i QTL coinvolti nella determinazione di un particolare fenotipo.

La teoria del mappaggio QTL è stata descritta per la prima volta da Sax (1923), il quale aveva osservato che le dimensioni dei semi di fagiolo *Phaseolus vulgaris* L. (un carattere complesso) erano associate al colore del tegumento del seme (carattere semplice, monogenico). Questo concetto è stato ulteriormente elaborato da Thoday (1961), che ha suggerito che la segregazione di caratteri monogenici ad ereditarietà mendeliana poteva essere utilizzata per individuare QTL purchè strettamente associati, cosicché fosse possibile mappare e caratterizzare tutti i QTL coinvolti in caratteri complessi.

Questa metodologia è stata ottimizzata grazie allo sviluppo dei marcatori molecolari ed al loro utilizzo per costituire mappe genetiche che consentono la dissezione dei caratteri quantitativi e, di conseguenza, una conoscenza più approfondita di numerosi caratteri d'interesse agronomico.

Il mappaggio dei QTL richiede:

(1) una appropriata popolazione di mappa (popolazione sperimentale segregante per uno o più caratteri di interesse);

(2) fenotipizzazione della popolazione per il carattere(i) di interesse (caratteri morfologici, caratteri agronomici, resistenza a malattie, resistenza alla siccità, ecc.) in condizioni controllate e/o in campo;

(3) la genotipizzazione della popolazione attraverso l'uso di marcatori molecolari in numero adeguato per ricoprire l'intero genoma ed in modo tale da essere uniformemente distanziati in ciascun cromosoma;

(4) l'identificazione dei marcatori associati a QTL per il carattere di interesse;

(5) la convalida e la verifica dell'applicabilità e dell'affidabilità dei QTL mappati per applicazioni pratiche nel miglioramento genetico.

Tra le diverse tecniche di analisi QTL, si possono distinguere due filoni principali, ovvero le analisi di linkage e la mappatura per associazione.

### **3.3.1. Analisi di linkage**

In base al numero di marcatori utilizzati simultaneamente per l'analisi possiamo distinguere diverse tipologie di mappaggio QTL.

Analisi a singolo marcatore (Single Marker Analysis), che consente di stabilire l'associazione tra uno specifico marcatore molecolare ed un carattere quantitativo di interesse. Questo tipo di mappaggio si basa sull'analisi della varianza (ANOVA) ed è il metodo più semplice per il mappaggio QTL (Soller *et al.* 1976). Una volta che i dati genotipici e quelli fenotipici sono disponibili per la popolazione in questione, l'analisi ANOVA verifica

l'associazione statistica dei marcatori molecolari ed i caratteri fenotipici di interesse. Per ogni marcatore molecolare tipizzato, la progenie viene divisa in due gruppi, a seconda del loro genotipo al marcatore, e viene confrontata con la distribuzione media del fenotipo nei due gruppi. Ad ogni locus marcatore, la valutazione della significatività dei dati per la presenza di un QTL si basa sul test t di student o il test F di Fisher. Se il test risulta essere significativo, il carattere fenotipico ed il marcatore considerato risultano associati, e tale condizione suggerisce la presenza di un QTL nella regione cromosomica individuata dal marcatore (Doerge, 2002).

I principali vantaggi dell'ANOVA includono la sua semplicità, perché considera ogni locus marcatore separatamente. Tale metodo presenta anche un serie di limitazioni:

(i) i QTL sono mappati uno alla volta e non vengono presi in considerazione gli effetti di altri QTL;

(ii) l'effetto ascrivibile ad un QTL dipende sia dalla reale importanza che ha il QTL nell'espressione del carattere, che dalla sua distanza dal marcatore che ci permette di individuarlo;

(iii) la differenza tra le classi fenotipiche tende a diminuire all'aumentare della distanza tra marcatore e QTL: è difficile distinguere con precisione tra l'effetto di un QTL importante debolmente associato e quello di un QTL minore strettamente associato ad un marcatore;

(iv) spesso l'utilizzo di soglie di significatività non opportune possono determinare "falsi positivi". Esistono test di aggiustamento, come il test di Bonferroni, Scheffe o Tukey, che correggono il livello di significatività in base al numero di marcatori considerati che equivale al numero di test statistici indipendenti effettuati (Neter *et al.*, 1997).

Lander e Botstein (1989) hanno sviluppato un metodo di mappaggio QTL più efficace noto come "Mappatura ad intervallo" o "Interval Mapping"(IM), spesso chiamato "Simple Interval Mapping" (SIM), basato sull'uso delle mappe genetiche come strutture base per la localizzazione dei QTL. Attraverso l'analisi di mappatura per intervallo (Interval Mapping), è possibile testare, per ogni porzione di mappa contenuta tra due marcatori adiacenti, le due ipotesi dell'analisi QTL:

- l'ipotesi nulla; ossia il QTL non è presente o è presente, ma non è associato al marcatore;
- l'ipotesi alternativa; ossia, il QTL è presente nella regione cromosomica in esame.

Questo tipo di mappaggio si basa sul calcolo statistico del "Logarithm of Odds" o LOD attraverso il metodo della massima verosimiglianza; in altre parole, il valore del LOD è indice della probabilità di ottenere i risultati quando il QTL è effettivamente presente nella posizione in esame, e con l'effetto genetico stimato, rispetto alla probabilità di osservare gli stessi dati per caso (cioè, in assenza del QTL). Il SIM fornisce il punteggio LOD per posizioni successive sulla mappa genetica (es. ogni cM), e per intervalli tra marcatori. Generalmente, il valore di LOD pari a 3 è considerato valore soglia minimo nel mappaggio di QTL. I valori del LOD potranno quindi essere considerati congiuntamente, allo scopo di ottenere un profilo

LOD lungo l'intera mappa genetica. Tale profilo potrà essere rappresentato graficamente, ponendo il punteggio LOD in ordinata e la mappa cromosomica in cM in ascissa. La mappatura per intervallo presenta una serie di vantaggi rispetto all'analisi a singolo marcatore:

- (i) la posizione e l'effetto del QTL può essere determinata più accuratamente;
- (ii) il test LOD per identificare un putativo QTL è molto più potente (minore frequenza di falsi negativi);
- (iii) programmi statistici permettono in taluni casi di stimare l'interazione epistatica tra QTL diversi.

Un problema da considerare è costituito dal fatto che quando il profilo del LOD raggiunge la significatività in molti punti adiacenti e i picchi di significatività del profilo non sono ben definiti, si può essere in presenza di QTL multipli (QTL che controllano l'espressione dello stesso carattere fenotipico) o falsi positivi (cioè QTL il cui effetto rilevato dipende in realtà da QTL presenti negli intervalli vicini) (Martinez & Curnow, 1992).

I modelli a QTL multipli rappresentano un miglioramento rispetto a quelli a singolo marcatore, grazie alla loro capacità di identificare singolarmente i picchi dei QTL associati sullo stesso cromosoma e di rilevare l'interazione tra QTL che potrebbe altrimenti rimanere inosservata (Schork, 1993). Sono stati proposti diversi approcci per mappare QTL multipli. Jansen (1993) e Zeng (1993, 1994) hanno proposto in lavori indipendenti di combinare il SIM con l'analisi di regressione multipla in quella che viene definita Composit Interval Mapping (CIM). Questa tipologia di mappaggio risulta più precisa ed efficiente in quanto consente di distinguere e separare QTL vicini sullo stesso cromosoma. Tale metodologia mira ad un aumento dell'efficienza e della precisione della mappatura QTL fondata su un'appropriata separazione di possibili effetti multipli associati al carattere quantitativo. Utilizzando l'analisi statistica CIM, la mappatura per intervallo è meno influenzata, nei limiti di precisione d'analisi, da altri QTL localizzati in intervalli presenti in posizioni diverse (cromosomi diversi) o adiacenti all'intervallo saggiato. L'analisi QTL vera e propria viene preceduta da una "single-marker analysis" (test statistico: regressione lineare semplice) su tutto il genoma per identificare i marcatori più significativamente associati al carattere, i quali saranno poi impiegati come cofattori. In questo modo è possibile confrontare più QTL, a seguito di una preliminare analisi "interval mapping", definendo come cofattori i marcatori che fiancheggiano il QTL da esaminare. Tale metodo risulta più efficace per i caratteri ad elevata ereditabilità, in quanto gran parte della variazione genetica può essere controllata e rimossa dalla variazione residuale presente nel modello per marcatori multipli. I vantaggi di questo metodo sono:

- i) aumento della sensibilità dell'analisi statistica;
- ii) maggior precisione in riferimento alla posizione del QTL ;

iii) migliore stima dell'effetto del QTL grazie alla selettività e al simultaneo uso di altri marcatori nell'analisi (Zeng, 1993).

Le limitazioni principali di questo tipo di mappaggio sono:

(i) il CIM può essere influenzato da una distribuzione non uniforme dei marcatori nel genoma, ovvero, i test statistici in una regione ricca di marcatori possono non essere paragonabili a quelli di una regione povera di marcatori;

(ii) vi è difficoltà nello stimare il contributo comune alla variabilità genetica di QTL multipli collegati;

(iii) il CIM non è direttamente estensibile per analizzare gli effetti epistatici;

(iv) l'uso di marcatori strettamente associati come cofattori può ridurre la potenza statistica per rilevare un determinato QTL (Zeng *et al.* 1999).

Per far fronte ai limiti della CIM, Kao *et al.* (1999) ha proposto ed attuato la mappatura ad intervallo multiplo multiple interval mapping o (MIM) per mappare simultaneamente QTL multipli. Il concetto di base del MIM è quello di adattare i molteplici effetti dei QTL putativi ed i relativi effetti epistatici direttamente in un unico modello per facilitare la ricerca e la valutazione di posizioni, effetti ed interazioni di QTL multipli. La MIM consiste di quattro componenti: (1) un procedimento di valutazione volto ad analizzare la probabilità dei risultati dato un modello genetico (numero, posizione e condizioni epistatiche del QTL), (2) una strategia di ricerca ottimizzata per selezionare il miglior modello genetico (tra quelli campionati) nello spazio dei parametri, (3) una procedura di stima per tutti i parametri dell'architettura genetica del carattere quantitativo (numero, posizioni, effetti epistatici del QTL; variabilità genetica e covarianze spiegate dagli effetti del QTL) e (4) una procedura di previsione per stimare o prevedere i valori genotipici degli individui e della loro progenie in base alla scelta del modello genetico e dei valori stimati per i parametri genetici (Zeng *et al.* 1999).

Per queste ragioni, MIM tende ad essere più un metodo più potente e preciso nel rilevare QTL rispetto ai metodi come SIM e CIM. Il modello MIM si basa sul modello di Cockerham per interpretare i parametri genetici ed il metodo di massima verosimiglianza per stima dei parametri genetici (Kao *et al.* 1999). Satagopan *et al.* (1996) e Sillanpää e Arjas (1998) hanno utilizzato un approccio bayesiano basandosi su una catena di Markov Simulazione Monte Carlo per mappare QTL multipli.

### **3.3.2. Mappaggio per associazione**

L'analisi di associazione basata sul *Linkage disequilibrium* (LD) è il secondo metodo di mappatura QTL. Secondo Gupta *et al.* (2005), la mappatura per associazione si riferisce all'associazione significativa di un marcatore molecolare con una caratteristica fenotipica,

mentre il LD si riferisce alla associazione non casuale tra due marcatori (alleli a loci diversi), tra due geni o QTL, tra un gene / QTL e un locus marcatore. Pertanto, la mappatura per associazione è uno dei diversi modi per utilizzare il LD. I termini *linkage* e LD sono spesso confusi. Il *linkage* si riferisce all'ereditarietà correlata di loci attraverso la associazione fisica su un cromosoma, mentre LD si riferisce alla correlazione tra alleli in una popolazione (Flint-Garcia *et al.*, 2003), ma non necessariamente sullo stesso cromosoma. LD può essere utilizzato nei genomi di specie vegetali per la costruzione di mappe di LD, per studiare l'associazione marcatore-carattere sia indipendentemente che in combinazione con l'analisi di linkage, e per lo studio della genetica di popolazioni e la loro evoluzione sia in natura che in condizioni di coltivazione (Gupta *et al.*, 2005). La mappatura per associazione si divide generalmente in due grandi categorie:

(i) mappatura associazione a "gene candidato", che si riferisce ai polimorfismi in geni candidati selezionati che si presuppone abbiano un ruolo nel controllo variazione fenotipica per i tratti specifici e

(ii) mappatura di associazione per l'intero genoma, o scansione del genoma, che esamina la variazione genetica in tutto il genoma per individuare indicazioni di associazione tra vari caratteri complessi (Risch & Merikangas, 1996).

Il mappaggio di associazione sulla base dei geni candidati richiede informazioni sulla posizione e la funzione dei geni coinvolti nei processi genetici, biochimici e fisiologici che portano alla variabilità finale del carattere di interesse (Risch & Merikangas, 1996; Mackay, 2001). La scansione sull'intero genoma necessita di strumenti di alta capacità di sequenziamento del DNA o ad alta densità di oligonucleotidi array per identificare in modo efficiente polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) ad una densità tale da riflettere accuratamente la struttura del LD del genoma e la diversità degli aplotipi.

Il mappaggio di associazione è una indagine basata sulla popolazione, che sfrutta la ricombinazione storica per identificare i geni candidati che influiscono su caratteri complessi (Falconer & Mackay, 1996). A differenza delle analisi di linkage, in cui vengono utilizzati i rapporti di parentela per prevedere correlazioni tra fenotipo e genotipo, la mappatura per associazione si basa su materiali generalmente già disponibili per LD per misurare associazioni tra fenotipo e marcatori a livello dell'intera popolazione (Kruglyak, 1999; Ewens & Spielman, 2001; Jannink *et al.*, 2001). La diversità genetica è valutata in popolazioni naturali per identificare polimorfismi che sono correlati alla variazione fenotipica. Il LD è valutato in grandi popolazioni per molte generazioni, durante le quali la pressione selettiva fa aumentare o diminuire la frequenza di alleli particolari o di combinazioni alleliche (Falconer & Mackay, 1996). La mappatura per associazione e quella di linkage differiscono in termini di come la costituzione genetica del carattere possa influenzare la potenza statistica dell'analisi. L'importanza di un particolare allele nel determinare la variazione fenotipica in una popolazione dipende dalla sua frequenza e dal suo effetto. In questo modo, la mappatura per



associazione ha un basso potere nel rilevare gli alleli rari, anche se questi alleli hanno un grande effetto fenotipico. Viceversa, alleli che sono identificati attraverso la mappatura di linkage che coinvolge incroci tra due genitori essenzialmente scelti a caso, possono avere un grande effetto, ma potrebbero non essere importanti dal punto di vista evolutivo perché sono rari. Le analisi di linkage utilizzando popolazioni sperimentali derivate da un incrocio biparentale forniscono informazioni sui caratteri che tendono ad essere specifici per la stessa popolazione o geneticamente correlati ad essa, e soprattutto riguardano esclusivamente l'analisi dei due alleli forniti dai genitori coinvolti nell'incrocio; i dati ottenuti attraverso il mappaggio per associazione sono applicabili invece ad una base genomica ed a un numero di alleli molto più ampio.

Come già detto, il miglioramento genetico si prefigge di ottenere nuovi genotipi con caratteristiche superiori, e quindi si basa sulla selezione dei caratteri di interesse agronomico in popolazione con variabilità genetica per i medesimi. Tale selezione può essere effettuata solo sulla base dell'analisi del fenotipo, ma questa a volte risulta piuttosto complicata (per esempio caratteri a bassa ereditabilità o che si presentano in modo aleatorio). In questi casi risulta molto utile l'utilizzo dei marcatori molecolari. L'efficacia della selezione per un determinato carattere può essere aumentata agendo su un secondo carattere, i cui geni siano concatenati (linked) con quelli che controllano l'espressione del carattere primario, e i cui genotipi siano più facilmente identificabili rispetto ad esso. Quando una tale selezione indiretta venga applicata ai singoli marcatori concatenati ai geni su cui si vuole agire, siano essi geni coinvolti nell'espressione di un carattere qualitativo che quantitativo, il procedimento viene definito come selezione assistita da marcatori (Marker Assisted Selection o MAS). L'obiettivo del miglioratore genetico infatti è quello di combinare in una varietà il maggior numero di alleli favorevoli tra quelli possibili ai loci che influenzano l'espressione del carattere.

In particolare, l'utilizzo di marcatori molecolari associati a specifici caratteri agronomici permette l'introggressione di geni utili mediante il reincrocio o la piramidizzazione, ovvero la combinazione di più alleli in un unico genotipo. Siccome i loci di molte resistenze tendono a formare dei cluster risultando localizzati in modo strettamente associato nello stesso cromosoma, gli alleli responsabili di diverse resistenze possono essere rintracciati in diverse accessioni e combinati in tandem nello stesso genotipo. La disponibilità di marcatori molecolari strettamente associati ai geni di resistenza consente la selezione di rari ricombinanti che presentano gli alleli favorevoli associati in tandem. I marcatori del DNA offrono la possibilità di attuare la selezione assistita in generazioni precoci, F<sub>2</sub>-F<sub>3</sub>, e ad uno stadio di sviluppo precoce, come quello di plantula, rendendo così la procedura di valutazione rapida, aspetto molto importante soprattutto per i caratteri che sono espressi ad uno stadio di sviluppo molto tardivo, come ad esempio quelli inerenti al fiore, al frutto o al seme. Si può perciò operare la selezione dei genotipi che determinano un fenotipo desiderabile basandosi

semplicemente su un'analisi molto precoce con marcatori molecolari senza la necessità che il carattere si manifesti per poterlo valutare. La MAS risulta preferibile rispetto alla selezione convenzionale se il gene sotto selezione è dominante ed il marcatore molecolare è codominante; se l'espressione del gene sotto selezione è influenzata dall'ambiente, se il suo fenotipo si evidenzia in un solo sesso (nelle piante dioiche) o solo dopo fioritura.

Molti dei caratteri d'interesse agronomico si sono rivelati essere sotto il controllo di un major gene più molti minor genes; mentre la selezione fenotipica risulta efficace nel mantenere solo il QTL principale, la selezione assistita permette di seguire anche i QTL minori. L'individuazione di marcatori molecolari associati ai diversi QTL per il carattere permette di riunire in un unico genotipo gli alleli favorevoli alla manifestazione del carattere per tutti i loci coinvolti.

Infatti, 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 (Salvi & Tuberosa, 2005).

**CAPITOLO II**  
**OBIETTIVI DELLA RICERCA**



La mia attività di ricerca è stata sviluppata all'interno del progetto europeo "DROPS" (Drought Tolerant Yielding Plants), che coinvolge quindici partner provenienti da diverse parti del mondo quali Francia, Australia, Germania, Regno Unito, Ungheria, Stati Uniti, Turchia, Italia, Belgio e Paesi Bassi. DROPS è un progetto finanziato dalla Comunità Europea e integra diverse discipline quali la fisiologia, la genetica, l'agronomia, la statistica ed il *modelling*, per una visione d'insieme del problema della siccità

Scopo generale di tale progetto è quello di sviluppare nuovi metodi e strategie volti a mantenere alti livelli di produttività in condizioni di deficit idrico e ad aumentare l'efficienza dell'uso d'acqua (Water Use Efficiency, WUE) in mais, frumento duro e tenero. Nell'ambito del progetto verrà valutata inoltre l'interazione tra genotipo ed ambiente con un approccio che combini risposte fisiologiche e caratteristiche genetiche in esperimenti di campo ed in condizioni controllate, secondo modelli eco-fisiologici. Ogni carattere può infatti mostrare risposte positive, negative o nulle a seconda dei livelli di stress idrico.

Tra le molteplici attività e le diverse specie oggetto di studio all'interno del progetto DROPS, la mia attività di ricerca è stata focalizzata su frumento duro ed è stata articolata in modo da rispondere a tre obiettivi principali:

- 1) Caratterizzazione molecolare del panel di 188 accessioni e costruzione della mappa genetica mediante integrazione di marcatori molecolari SSR presso i laboratori di genetica del DipSA (UNIBO) e marcatori DArT presso il Diversity Array Technology Pty Ltd (Yarralumla, Australia);
- 2) Studio dell'efficienza dell'uso dell'acqua in un subset di 100 accessioni di frumento duro attraverso un esperimento in condizioni controllate presso il "Centre for Sustainable Agriculture - Lancaster Environment Centre", Lancaster University (UK);

Tramite prove sperimentali di campo in due stagioni di crescita sono stati effettuati:

- 3) nel 2010/11; studio della variabilità genetica di importanti caratteri agronomici (resa e sue componenti principali, data di emergenza, fioritura, spigatura, altezza, ecc) di frumento duro, nel medesimo subset di 100 accessioni di frumento duro al fine di confermare l'idoneità del materiale vegetale e dei caratteri scelti per successive analisi di mappaggio per associazione;
- 4) nel 2011/12; studio della base genetica di importanti caratteri agronomici correlati allo stress idrico utilizzando un panel più ampio di 188 accessioni di frumento duro, attraverso caratterizzazioni fenotipiche in prove replicate in 3 ambienti (Italia, Ungheria e Turchia), e in condizioni differenti di regimi irrigui (irrigato e non irrigato), che verranno integrate con successive analisi di mappaggio di QTLs (Quantitative Trait Loci, loci per i caratteri quantitativi) per localizzare le regioni cromosomiche coinvolte nel controllo genetico dei caratteri di interesse.



**CAPITOLO III**  
**MATERIALI E METODI**





## MATERIALE VEGETALE

Per questa ricerca è stata utilizzata una collezione di germoplasma (panel) costituita da 188 accessioni di frumento duro, principalmente cultivar e linee pure derivate da programmi di miglioramento genetico; tale materiale nel suo complesso rappresenta gran parte della diversità genetica presente nei principali pool genici di frumento duro utilizzati in programmi di miglioramento genetico mondiali per l'adattamento a condizioni ambientali di tipo Mediterraneo. La maggior parte delle accessioni è costituita da linee elite a taglia bassa, sviluppate tra l'inizio del 1970 sino alla fine del 1990. Le accessioni incluse nella collezione sono state scelte a partire da una collezione di 330 accessioni valutate in prove sperimentali di campo comparate, effettuate nel 2003 presso l'Azienda Universitaria di Cadriano (Maccaferri *et al.*, 2005; 2006). La scelta dei materiali da includere nel panel si è basata principalmente sull'analisi del pedigree e della durata del ciclo colturale; dal panel sono state escluse le accessioni strettamente imparentate, così come quelle con data di emergenza troppo precoce o troppo tardiva. Inoltre, il panel è stato costruito privilegiando l'uniformità in data di fioritura, e le prove condotte hanno provato che il range di variazione per data di fioritura è pari a 7 giorni complessivi.

Sul panel sono stati condotti esperimenti per valutare la resa in granella, le sue componenti, ed in generale le risposte a condizioni di diversa disponibilità idrica (Maccaferri *et al.*, 2008; 2011). Il panel di 188 accessioni è stato inoltre caratterizzato dal punto di vista molecolare presso i laboratori del DipSA dell'Università di Bologna, utilizzando circa 300 marcatori molecolari di tipo SSR e circa 900 marcatori DArT (Maccaferri *et al.*, 2011).

Il materiale può essere classificato secondo il paese di provenienza come segue (Tabella 1):

- 84 accessioni provenienti dal "International Center for Agricultural Research in the Dry Areas" (ICARDA);
- 41 accessioni italiane, comprendenti alcuni importanti "genotipi fondatori", utilizzati anche nei programmi di breeding dell'"International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT)/ICARDA";
- 21 accessioni pervenute dalla Spagna;
- 18 accessioni prodotte dal CIMMYT, alcuni delle quali sono state utilizzate in programmi nazionali di breeding nel Bacino del Mediterraneo;
- 14 accessioni provenienti dal Marocco;
- 2 accessioni provenienti dalla Tunisia;
- 8 accessioni rappresentative del germoplasma coltivato in condizioni irrigue nelle aree del sud-ovest degli Stati Uniti (Arizona/California) e comunemente denominate "desert durums".

**Tabella 1.** Lista delle 188 accessioni elite di frumento duro. Sono stati riportati il nome, l'origine e il coefficiente di appartenenza ai 5 Sottogruppi (da S1 a S5), ottenuto attraverso l'analisi di struttura basata su 96 SSRs debolmente associati. Ogni accessione è stata assegnata al Sottogruppo con il valore del coefficiente di appartenenza più elevato. All'interno di ciascun Sottogruppo, l'elenco delle accessioni è stato ordinato secondo valori decrescenti del coefficiente di appartenenza. Per ciascun Sottogruppo, sono stati riportati i nomi dei principali genotipi fondatori.

Accessione	Origine	Struttura genetica del germoplasma: Sottogruppi principali ed individuali				
		Sottogruppi di appartenenza				
		S1	S2	S3	S4	S5
		ICARDA germplasm for dryland areas	ICARDA germplasm for temperate areas	Italian and early '70 CIMMYT germplasm	CIMMYT germplasm (late '70-early '80)	CIMMYT germplasm (late '80-early '90)

**Sottogruppo S1 - ICARDA dryland (Omrabi 3)**

TOMOUH	Siria <sup>a</sup>	<b>0.971</b>	0.007	0.006	0.011	0.005
OMBIT 1	Siria	<b>0.968</b>	0.010	0.009	0.009	0.004
MASSARA 1	Siria	<b>0.956</b>	0.009	0.006	0.018	0.012
MRB 17	Siria	<b>0.949</b>	0.023	0.006	0.016	0.005
OMRABI 3	Siria	<b>0.948</b>	0.010	0.009	0.027	0.006
OMRABI 5	Siria	<b>0.944</b>	0.012	0.011	0.012	0.020
AW12/BIT	Siria	<b>0.940</b>	0.013	0.031	0.009	0.006
YOUNES 1	Siria	<b>0.789</b>	0.014	0.014	0.173	0.010
Blk2//134xS-69-186/368-1/3/Mrb5/4/Albit3	Siria	<b>0.703</b>	0.059	0.176	0.042	0.020
OMLAHN 3	Siria	<b>0.679</b>	0.132	0.025	0.093	0.072
OMSNIMA 1	Siria	<b>0.606</b>	0.204	0.016	0.159	0.016
CAPEITI 8	Italia	<b>0.598</b>	0.076	0.314	0.005	0.007
TELSET 5	Siria	<b>0.514</b>	0.435	0.022	0.015	0.013
AZEGHAR 2	Siria	<b>0.483</b>	0.056	0.050	0.384	0.026
OMGENIL 3	Siria	<b>0.421</b>	0.117	0.029	0.415	0.017
APPULO	Italia	<b>0.408</b>	0.225	0.354	0.008	0.005

**Sottogruppo S2 - ICARDA temperate (Cham1)**

ISLY	Marocco	0.011	<b>0.959</b>	0.009	0.009	0.012
MAROCCO 1808	Marocco	0.015	<b>0.942</b>	0.015	0.017	0.011
MESSAPIA	Italia	0.010	<b>0.940</b>	0.024	0.017	0.010
MAROCCO 1809	Marocco	0.012	<b>0.934</b>	0.011	0.025	0.018
MAROCCO 1804	Marocco	0.017	<b>0.921</b>	0.021	0.021	0.020
SHABHA	Siria	0.016	<b>0.920</b>	0.038	0.014	0.012
ARTENA	Spagna	0.014	<b>0.920</b>	0.026	0.014	0.026
MAROCCO 1807	Marocco	0.011	<b>0.914</b>	0.014	0.051	0.010
COLOSSEO	Italia	0.012	<b>0.902</b>	0.007	0.063	0.015
ALDEANO	Spagna	0.016	<b>0.898</b>	0.060	0.016	0.010

---

**Sottogruppo S2 - ICARDA temperate (Cham 1)**

ROQUENO	Spagna	0.027	<b>0.897</b>	0.013	0.042	0.021
PRODURA	Italia	0.007	<b>0.890</b>	0.015	0.082	0.006
SEBOU	Spagna	0.022	<b>0.884</b>	0.016	0.048	0.030
FURAT 1	Siria	0.015	<b>0.880</b>	0.063	0.033	0.008
Aric 31708.70/3/Bo//C.de Chile/Br/4/Cit/Gta	Siria	0.059	<b>0.855</b>	0.022	0.042	0.022
Ouassel- 1/4/Buc/Chrc//Prl/3/Pvn/5/Hel /3/Bit/Corm//Shwa	Siria	0.007	<b>0.847</b>	0.011	0.090	0.045
JABATO	Spagna	0.035	<b>0.841</b>	0.020	0.072	0.032
ARIESOL	Spagna	0.010	<b>0.827</b>	0.050	0.078	0.035
JORDAN	Siria	0.022	<b>0.825</b>	0.052	0.090	0.011
SAADA 3/DDS//MTL 1	Siria	0.013	<b>0.824</b>	0.060	0.076	0.027
SEBAH	Siria	0.010	<b>0.809</b>	0.011	0.160	0.010
HEIDER	Siria	0.020	<b>0.804</b>	0.006	0.155	0.014
RADIO SO	Italia	0.029	<b>0.787</b>	0.140	0.032	0.012
CMH82A.1062/3/GGoVZ394/ Messico <sup>b</sup> /SBA81/PLC/4/AAZ		0.047	<b>0.784</b>	0.014	0.127	0.029
CHAM 1	Siria	0.028	<b>0.779</b>	0.033	0.149	0.011
BOLIDO	Spagna	0.073	<b>0.769</b>	0.011	0.109	0.038
SEBATEL 1	Siria	0.035	<b>0.762</b>	0.010	0.184	0.010
HAURANI	Siria	0.238	<b>0.712</b>	0.032	0.009	0.009

APPIO	Italia	0.164	<b>0.706</b>	0.046	0.015	0.069
QUADALETE	Siria	0.023	<b>0.698</b>	0.197	0.076	0.007
BOLO	Spagna	0.013	<b>0.690</b>	0.010	0.041	0.246
MARZAK	Marocco	0.276	<b>0.683</b>	0.016	0.014	0.011
BOLENGA	Spagna	0.026	<b>0.653</b>	0.255	0.060	0.006
DERAA	Siria	0.017	<b>0.630</b>	0.034	0.272	0.047
STOJOCRI 3	Siria	0.122	<b>0.617</b>	0.023	0.228	0.010
BLK2	Siria	0.016	<b>0.615</b>	0.020	0.287	0.062
KRS/HAUCAN	Siria	0.018	<b>0.608</b>	0.013	0.340	0.021
LIRA B 45	Italia	0.047	<b>0.598</b>	0.332	0.016	0.007
VALBELICE	Italia	0.261	<b>0.591</b>	0.133	0.010	0.006

***Sottogruppo S2 - ICARDA temperate (Cham 1)***

ATLAST 1	Siria	0.014	<b>0.583</b>	0.020	0.328	0.056
MAROCCO 1805	Marocco	0.097	<b>0.559</b>	0.010	0.308	0.026
CRESO	Italia	0.020	<b>0.554</b>	0.023	0.393	0.009
ARCANGELO	Italia	0.196	<b>0.548</b>	0.168	0.077	0.011
MURLAGOST 1	Siria	0.008	<b>0.532</b>	0.009	0.391	0.059
GEROMTEL 1	Siria	0.023	<b>0.521</b>	0.029	0.386	0.041
CAPPELLI	Italia	0.053	<b>0.517</b>	0.384	0.016	0.030
DURCAL	Spagna	0.032	<b>0.507</b>	0.015	0.412	0.033
KABIR 1	Siria	0.028	<b>0.489</b>	0.204	0.261	0.018
AWALI 1	Siria	0.081	<b>0.465</b>	0.115	0.323	0.017
KORIFLA	Siria	0.060	<b>0.458</b>	0.260	0.033	0.188
MOHAWK	USA <sup>e</sup>	0.018	<b>0.457</b>	0.291	0.218	0.015
GIDARA 2	Siria	0.429	<b>0.449</b>	0.014	0.100	0.007
BRACHOUA	Siria	0.032	<b>0.448</b>	0.042	0.359	0.118
DUKEM/3/RUFF/FG O//Y AV79	Messico	0.027	<b>0.448</b>	0.064	0.331	0.013
OUASLAHN	Siria	0.015	<b>0.444</b>	0.158	0.292	0.090
TRINAKRIA	Italia	0.224	<b>0.440</b>	0.299	0.025	0.011
GEZIRA 17	Siria	0.022	<b>0.427</b>	0.487	0.055	0.009
CORTEZ	USA <sup>e</sup>	0.071	<b>0.419</b>	0.079	0.383	0.048

WADALMEZ 1	Siria	0.010	<b>0.370</b>	0.245	0.207	0.169
GR/BOY	Siria	0.034	<b>0.365</b>	0.277	0.269	0.054
CLAUDIO	Italia	0.009	<b>0.360</b>	0.260	0.149	0.222

***Sottogruppo S3 – Italian / CIMMYT germplasm (Valnova, Mexicali 75)***

VALNOVA	Italia	0.006	0.010	<b>0.970</b>	0.006	0.008
BRADANO	Italia	0.012	0.012	<b>0.949</b>	0.012	0.015
ANTON	Spagna	0.046	0.013	<b>0.907</b>	0.009	0.025
DUREX	USA	0.015	0.053	<b>0.897</b>	0.019	0.017
OFANTO	Italia	0.038	0.040	<b>0.895</b>	0.008	0.019

***Sottogruppo S3 – Italian / CIMMYT germplasm (Valnova, Mexicali 75)***

GARGANO	Italia	0.091	0.022	<b>0.870</b>	0.007	0.010
WB 881	USA	0.011	0.105	<b>0.857</b>	0.007	0.020
BRAVADUR	USA	0.021	0.086	<b>0.829</b>	0.052	0.012
CANNIZZO	Italia	0.086	0.027	<b>0.803</b>	0.064	0.020
IXOS	Italia	0.018	0.117	<b>0.790</b>	0.063	0.012
VARANO	Italia	0.109	0.014	<b>0.767</b>	0.099	0.011
GRAZIA	Italia	0.018	0.022	<b>0.765</b>	0.161	0.034
FORTORE	Italia	0.111	0.134	<b>0.735</b>	0.006	0.013
MEXICALI 75	Messico	0.020	0.015	<b>0.729</b>	0.041	0.195
MONGIBELLO	Italia	0.013	0.094	<b>0.715</b>	0.041	0.136
KRONOS	USA	0.008	0.115	<b>0.679</b>	0.193	0.006
CICCIO	Italia	0.338	0.014	<b>0.639</b>	0.005	0.005
KOFA	USA	0.026	0.339	<b>0.614</b>	0.013	0.008
PLINIO	Italia	0.035	0.210	<b>0.606</b>	0.109	0.041
PIETRAFITTA	Italia	0.009	0.019	<b>0.598</b>	0.365	0.010
REVA	USA	0.010	0.304	<b>0.584</b>	0.090	0.011
LESINA	Italia	0.136	0.248	<b>0.568</b>	0.038	0.011
PLATANI	Italia	0.389	0.019	<b>0.561</b>	0.009	0.021
TORREBIANCA	Italia	0.012	0.270	<b>0.538</b>	0.013	0.168
QUADRATO	Italia	0.045	0.357	<b>0.514</b>	0.030	0.053
COLORADO	USA	0.011	0.275	<b>0.511</b>	0.186	0.017

SENADUR	Spagna	0.014	0.397	<b>0.430</b>	0.020	0.138
ANGRE	Spagna	0.022	0.250	<b>0.383</b>	0.158	0.187
SAJUR	Siria	0.022	0.158	<b>0.365</b>	0.259	0.196
ORT 1	Siria	0.044	0.281	<b>0.330</b>	0.061	0.284

**Sottogruppo S4 – CIMMYT (Yavaros 79, Karim)**

KARIM	Tunisia	0.006	0.008	0.004	<b>0.975</b>	0.007
DUILIO	Italia	0.007	0.008	0.004	<b>0.973</b>	0.008

**Sottogruppo S4 – CIMMYT (Yavaros 79, Karim)**

OURGH	Marocco	0.008	0.007	0.004	<b>0.969</b>	0.012
ANOUAR	Marocco	0.004	0.014	0.007	<b>0.967</b>	0.007
MAAMOURI 1	Siria	0.009	0.016	0.010	<b>0.951</b>	0.014
YASMINE	Marocco	0.031	0.008	0.004	<b>0.949</b>	0.008
TERBOL 97-3	Siria	0.023	0.013	0.013	<b>0.940</b>	0.011
AINZEN 1	Siria	0.006	0.028	0.013	<b>0.939</b>	0.014
BICRE	Siria	0.018	0.038	0.009	<b>0.927</b>	0.009
AGHRASS 1	Siria	0.021	0.008	0.026	<b>0.919</b>	0.025
BCRCH 1	Siria	0.035	0.029	0.007	<b>0.916</b>	0.012
BRONTE	Italia	0.023	0.020	0.069	<b>0.880</b>	0.008
LOUKOS 1	Siria	0.022	0.055	0.018	<b>0.872</b>	0.033
AMEDAKUL 1	Siria	0.022	0.115	0.011	<b>0.842</b>	0.011
AMMAR 1	Siria	0.010	0.044	0.093	<b>0.840</b>	0.013
CHABHA 88	Siria	0.024	0.101	0.010	<b>0.839</b>	0.026
LAHN	Siria	0.035	0.016	0.013	<b>0.829</b>	0.108
TENSIFT 1	Siria	0.042	0.078	0.054	<b>0.817</b>	0.009
OUASLOUKOS 1	Siria	0.087	0.059	0.027	<b>0.787</b>	0.041
TUNSYR 1	Siria	0.030	0.131	0.013	<b>0.757</b>	0.069
ADYT 02 - 505//OSA- 1/STJ-5	Siria	0.016	0.174	0.007	<b>0.754</b>	0.049
WEST BRED TURBO	USA	0.143	0.064	0.024	<b>0.751</b>	0.018
OMRUF 2	Siria	0.011	0.102	0.016	<b>0.746</b>	0.124
BORLI	Spagna	0.009	0.044	0.012	<b>0.723</b>	0.212
BIC/3/CHAM1//GRA//STK	Siria	0.207	0.043	0.010	<b>0.720</b>	0.021

SVEVO	Italia	0.047	0.216	0.017	<b>0.700</b>	0.020
QUAD//ERP/MAL/3/ UNKN	Siria	0.274	0.027	0.006	<b>0.668</b>	0.025
BICREDERAA 1	Siria	0.022	0.270	0.037	<b>0.661</b>	0.010
MERIDIANO	Italia	0.173	0.131	0.031	<b>0.640</b>	0.025
GUEROU 1	Siria	0.008	0.292	0.023	<b>0.640</b>	0.037

***Sottogruppo S4 – CIMMYT (Yavaros 79, Karim)***

RAZZAK	Tunisia	0.020	0.233	0.013	<b>0.635</b>	0.100
CANYON	Spagna	0.010	0.286	0.010	<b>0.632</b>	0.061
OTB 6	Siria	0.045	0.302	0.016	<b>0.624</b>	0.013
MIKI 1	Siria	0.034	0.301	0.036	<b>0.620</b>	0.008
YOUSEF 1	Siria	0.006	0.346	0.018	<b>0.610</b>	0.019
JAWHAR	Marocco	0.022	0.034	0.047	<b>0.599</b>	0.298
TAREK	Marocco	0.019	0.350	0.009	<b>0.591</b>	0.032
NILE	Siria	0.033	0.352	0.015	<b>0.589</b>	0.011
QUABRACH 1	Siria	0.065	0.128	0.213	<b>0.579</b>	0.015
MARSYR 1	Siria	0.234	0.152	0.038	<b>0.566</b>	0.010
BIGOST 1	Siria	0.041	0.372	0.010	<b>0.551</b>	0.026
FLAMINIO	Italia	0.010	0.010	0.431	<b>0.538</b>	0.011
ARISLAHN 5	Siria	0.071	0.106	0.274	<b>0.526</b>	0.023
LAGONIL 2	Siria	0.055	0.295	0.099	<b>0.514</b>	0.037
DUROI	Spagna	0.042	0.378	0.009	<b>0.510</b>	0.062
DON PEDRO	Siria	0.078	0.353	0.025	<b>0.507</b>	0.036
CHABA/DERAA H.MOUL(MOR)/	Siria	0.038	0.339	0.028	<b>0.506</b>	0.089
CHABA 88	Siria	0.009	0.428	0.018	<b>0.501</b>	0.044
AUS 1	Siria	0.027	0.234	0.194	<b>0.501</b>	0.044
MOULSABIL 2	Siria	0.007	0.258	0.068	<b>0.499</b>	0.168
OMBAR	Siria	0.352	0.049	0.015	<b>0.489</b>	0.096
CHACAN	Siria	0.020	0.307	0.075	<b>0.477</b>	0.121
OUASERL 1	Siria	0.259	0.159	0.054	<b>0.469</b>	0.059
KHABUR 1	Siria	0.009	0.440	0.072	<b>0.461</b>	0.018
LAGOST 3	Siria	0.019	0.225	0.066	<b>0.422</b>	0.267

BOABDIL	Spagna	0.054	0.362	0.008	<b>0.403</b>	0.172
ZEINA 1	Siria	0.039	0.314	0.216	<b>0.363</b>	0.069
ITALO	Italia	0.090	0.329	0.182	<b>0.352</b>	0.047

**Sottogruppo S5 – CIMMYT (Altar 84, Gallareta)**

GALLARETA	Spagna	0.004	0.005	0.004	0.006	<b>0.980</b>
AHI-OU 1	Messico	0.007	0.014	0.006	0.005	<b>0.969</b>
GS/CRA//SBA81/3/HO/ MEXI_1/ 5/MEMO/6/2*	Messico	0.005	0.010	0.007	0.028	<b>0.951</b>
KULRENGI-BALIKCIL 8	Messico	0.012	0.018	0.006	0.020	<b>0.944</b>
SOOTY_9/2*TARRO 1 BUSHEN 4/ TARRO 2//BUSHEN 4	Messico	0.080	0.010	0.011	0.008	<b>0.891</b>
PORTO 5	Messico	0.021	0.018	0.014	0.103	<b>0.844</b>
ACUATICO/YAZI 1	Messico	0.007	0.053	0.013	0.122	<b>0.805</b>
RASCON 37/2*TARRO 2	Messico	0.013	0.155	0.007	0.031	<b>0.793</b>
FOCHA 1/5*ALAS	Messico	0.005	0.008	0.006	0.206	<b>0.775</b>
BISU 1/PATKA 3	Messico	0.008	0.192	0.042	0.025	<b>0.733</b>
YAZI 10.1	Messico	0.014	0.067	0.015	0.172	<b>0.732</b>
ARCOBALENO	Spagna	0.005	0.012	0.011	0.299	<b>0.673</b>
PLATA 16	Messico	0.011	0.029*	0.010	0.282	<b>0.667</b>
BOMBASI	Spagna	0.010	0.006	0.006	0.321	<b>0.657</b>
TOPDY 21/RASCON 33	Messico	0.008	0.302	0.028	0.037	<b>0.625</b>
SULA	Spagna	0.010	0.018	0.035	0.327	<b>0.609</b>
ASTIGI	Spagna	0.015	0.202	0.011	0.200	<b>0.573</b>
MARJANA ROK/FGO//STIL/3/ BISU 1	Marocco	0.011	0.026	0.033	0.386	<b>0.544</b>
ILLORA	Spagna	0.013	0.416	0.019	0.033	<b>0.518</b>
IRIDE	Italia	0.010	0.193	0.038	0.302	<b>0.456</b>
NORBA	Italia	0.080	0.218	0.176	0.079	<b>0.448</b>
CIMMYT 266	Messico	0.019	0.323	0.034	0.267	<b>0.358</b>

<sup>a</sup> Tutte le accessioni provenienti dalla Siria sono state selezionate all' ICARDA.

<sup>b</sup> Tutte le accessioni provenienti dal Messico sono state selezionate al CIMMYT.

<sup>c</sup> Tutte le accessioni provenienti dagli Stati Uniti d'America sono state selezionate in Arizona ("desert durums").



Tale materiale così descritto è stato inizialmente saggiato utilizzando un sub-panel di 100 accessioni scelte nell'ambito delle 188 complessive appena descritte. Questo sub-panel è stato valutato preliminarmente nella prova di campo condotta nell'annata 2010-11, ed in parallelo nell'esperimento condotto in ambiente controllato. I criteri di scelta delle 100 accessioni sono stati molteplici, basati sui risultati delle prove precedenti, ma elementi essenziali nella scelta sono stati:

- (i) la stabilità produttiva nei diversi ambienti;
- (ii) la resa media realizzata nelle diverse condizioni ambientali;
- (iii) la data di fioritura (cosicché il 50% del materiale ha data di fioritura con range di due giorni ed il 70% circa di tre giorni);
- (iv) il grado di parentela, in modo da ridurre al minimo la presenza di accessioni altamente imparentate.

Il materiale così complessivamente descritto, è stato saggiato nel presente lavoro in quattro diversi esperimenti, ovvero:

1. Caratterizzazione molecolare del panel di 188 accessioni e costruzione della mappa genetica mediante integrazione di marcatori molecolari SSR ("Simple Sequence Repeat" presso i laboratori di genetica del DipSA (UNIBO) e marcatori DArT ("Diversity Arrays Technology"), presso il Diversity Array Technology Pty Ltd (Yarralumla, Australia);
2. Prova sperimentale in ambiente controllato presso il Lancaster Environment Center (LEC, UK);
3. Prova preliminare di campo condotta nella stagione di crescita 2010/2011 presso l'azienda sperimentale del Dipartimento di Scienze Agrarie della Facoltà di Agraria dell'Università di Bologna a Cadriano, Valle del Po, 44° 33' N e 11° 24' E, Italia;
4. Prove sperimentali di campo condotte nella stagione di crescita 2011/2012 sul panel completo in tre diversi ambienti Italia, Ungheria e Turchia, ed in due regimi idrici (irrigato, indicato con la sigla "I" o *irrigated*, e non irrigato, indicato con la sigla "R" o *rainfed*).

## **1. ANALISI MOLECOLARE**

### **1.1 Marcatori SSR**

In questo studio, il panel di accessioni precedentemente analizzate da Maccaferri *et al.* (2006, 2011) è stato caratterizzato da un punto di vista molecolare utilizzando set addizionale composto da circa 400 marcatori microsatelliti (indicati con SSR acronimo di “Simple Sequence Repeat”), e 900 marcatori DArT (Diversity Arrays Technology), per un totale di circa 1300 marcatori.

In particolare, per quanto riguarda la mia ricerca, sono state impiegate coppie di primer (identificate con le sigle WMS, BARC, CFA, CFD, CNL, KSUM e WMC seguite da un numero specifico) disegnate sulle sequenze fiancheggianti loci microsatelliti e disponibili pubblicamente nel GrainGenes DataBase o messi a disposizione da Martin Ganai della TraitGenetics (Germania).

È stata data maggiore importanza ai marcatori inclusi nelle seguenti mappe *consensus* di frumento già pubblicate:

- Ta-SSR-2004 di Somers 2004;
- Ta-Synthetic/Opata-BARC di Song 2005;
- Wheat-Composite 2004 ( <http://wheat.pw.usda.gov/> ).

Allo scopo di identificare i polimorfismi da utilizzare per l'analisi della collezione di cultivar sono stati saggiati quasi 1000 marcatori SSR su un numero ridotto di otto cultivar ben diversificate, nella specifico Kofa, Svevo, Meridiano, Claudio, Simeto, Levante, Colosseo e Lloyd. I marcatori SSR utilizzati per la genotipizzazione sono stati scelti tra quelli che sono risultati polimorfici in almeno una popolazione di RIL di frumento duro, utilizzate in studi precedenti (Maccaferri *et al.*, 2008; Mantovani *et al.*, 2008; Maccaferri *et al.*, 2012)

Il DNA era stato precedentemente estratto, per ogni campione, a partire da tessuto fogliare liofilizzato e macinato, usando il protocollo di estrazione C-TAB descritto da Saghai-Marooif *et al.* (1984).

Per le reazioni PCR è stato utilizzato il protocollo di marcatura basato sulla sequenza M13, come riportato da Oetting *et al.* (1995)

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 prolungamento M13 (“coda” o “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 MgCl<sub>2</sub>;
- 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;
- un ultimo ciclo con completa estensione dei prodotti di PCR a 72°C per 7 minuti.

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), che consente l'individuazione degli alleli in tempo reale grazie al sistema a doppio laser dell'apparecchio. Tale sistema offre la possibilità di effettuare una PCR multiplex, ossia coppie di primer marcate a diversa lunghezza d'onda nella stessa reazione PCR e caricamenti successivi nello stesso gel; questo può essere infatti riutilizzato fino a un totale di almeno tre corse elettroforetiche consecutive, con un conseguente notevole risparmio di tempo per singolo locus analizzato. Sono stati utilizzati vetri di 18 cm di lunghezza e spaziatori da 0,25 mm e pettine di plastica da 64 pozzetti. Per ogni corsa, tra le due lastre è stata versata una miscela liquida composta da 30 ml di Acrilamide Long Ranger al 5%, 200 µl di APS al 10% e 20 µl di Temed. Dopo 20 min a temperatura ambiente, la miscela polimerizza ed è quindi possibile utilizzare il gel. Gli amplificati sono stati miscelati con un rapporto di diluizione 1:30 con il blu denaturante e sono stati inizialmente denaturati a 95°C per 5 minuti e raffreddati in

ghiaccio; successivamente 0.8 µl di ogni campione del prodotto PCR diluito, è stato caricato nei pozzetti del gel, immersi in tampone TBE 1X.

Per attribuire l'appropriato peso molecolare a ciascun allele sono stati impiegati particolari standard di peso molecolare ottimizzati per il sistema LICOR. In caso di fenomeni di comparsa di bande spurie accanto a quella principale, dovuti ai fenomeni di *stuttering*, il peso molecolare dell'allele è stato attribuito alla banda più intensa tra quelle amplificate.

## **1.2. Marcatori DArT**

I profili DArT di ciascuna delle 188 accessioni sono stati generati, contemporaneamente al mappaggio degli SSR, presso il Diversity Array Technology Pty Ltd (Yarralumla, Australia).

Segue una breve descrizione metodologica.

I marcatori DArT sono stati sviluppati seguendo il protocollo descritto da Akbari *et al.* (2006). Per l'array, è stata generata una rappresentazione genomica (*genomic representation*), a partire da un *bulk* di accessioni di frumento, secondo il metodo di riduzione della complessità genomica (*complexity reduction*) descritto da Wenzl *et al.* (2004). La procedura ha previsto la digestione enzimatica del DNA genomico mediante *PstI* e *TaqI* seguita da ligazioni di specifici adattatori e successive amplificazioni selettive dei frammenti digeriti, secondo un procedimento AFLP-simile. Tale fase ha lo scopo di ridurre la complessità genomica totale (*complexity reduction*) ed ottenere una frazione rappresentativa dell'informazione genetica del gruppo di campioni in esame. Ciascun frammento è stato quindi clonato in specifici vettori di *Escherichia coli* al fine di creare una libreria genomica così come descritto da Jaccoud *et al.* (2001). È stato a questo punto costituito il *diversity panel (array)*: i singoli frammenti clonati e sequenziati sono stati immobilizzati (*spotting*), mediante l'ausilio di robot (MicroGridII, Biorobotics, Cambridge, UK), su un supporto rigido (*poly-L-lysine microarray*; Erie Scientific, Portsmouth, NH, USA), ordinati secondo uno schema DOT-BLOT; l'insieme dei cloni random spottati costituisce la *genomic representation*.

Le immagini degli array sono state acquisite utilizzando uno scanner confocale a doppio laser Tecan LS300 (Grodig, Salzburg, Australia), impostando i valori di potenza dei laser e di sensibilità in modo da ottenere un rapporto di circa 1 fra i segnali globali dei due fluorofori (Cy5 e Cy3). A questo punto, mediante ausilio di un software appositamente sviluppato (DArT soft v.7.3; Cayala *et al.*, in preparazione), l'intensità relativa di ibridazione è stata computata in dati binari (presenza del segnale *vs.* assenza del segnale): i cloni-frammenti che presentavano un netto polimorfismo di ibridazione sono stati considerati e trattati come loci polimorfici. Nel presente lavoro, è stato utilizzato un array costituito da 5000 cloni di una libreria genomica di frumento tenero e uno sviluppato mediante ibridazione di 2304 cloni

genomici di frumento duro (Mantovani *et al.*, 2008). I marcatori DArT ottenuti da frumento tenero sono stati indicati dall'acronimo wPt- (dove “w” sta per “wheat”, mentre “P” e “t” riprendono, rispettivamente, il nome dell'enzima di restrizione *PstI* e *TaqI*) seguito dal numero corrispondente ad un determinato clone della rappresentazione genomica

### **1.3. Mappa genetica del materiale vegetale in valutazione**

La caratterizzazione genotipica del materiale è stata seguita dall'ordinamento dei marcatori testati secondo le informazioni disponibili da una mappa *consensus* realizzata presso i laboratori del DipSA, derivata da 14 mappe bi-parentali (Maccaferri *et al.*, dati non pubblicati)

La mappa *consensus* è stata ottenuta dai 14 set di dati utilizzando il software Carthagene v.4.0 (de Givry *et al.*, 2005).

La posizione di mappa e le distanze relative dei loci SSRs e DArT analizzati sul panel oggetto del presente lavoro, sono state ricavate direttamente dalla mappa *consensus*. Successivamente la mappa ottenuta è stata testata per la presenza di alleli rari (ovvero con frequenza inferiore al 10%) nonché ripulita da individui con eccesso di dati mancanti, con utilizzo del software GenStat® (VSN International, 2012).

## **2. PROVA SPERIMENTALE IN AMBIENTE CONTROLLATO**

Presso il Centre for Sustainable Agriculture - Lancaster Environment Centre (LEC) Lancaster University, United Kingdom, partner del progetto DROPS, abbiamo condotto una prova sperimentale in ambiente controllato del material descritto.

Il LEC è dotato di una serra, nella quale abbiamo potuto fissare i livelli ottimali per lo sviluppo delle piante, ovvero 23°C diurni; 15°C notturni, con fotoperiodo di 18 ore (dalle 6 alle 22, condizioni medie luminose primaverile - estivo).

Per tale valutazione, è stato identificato un subset di 100 accessioni nell'ambito del panel completo composto da 188 accessioni

Per la valutazione del materiale è stata utilizzata una piattaforma di fenotipizzazione nella quale è stato condotto un esperimento sulle suddette 100 accessioni scelte, in sei repliche, con piante allevate in condizioni di regime irriguo ottimale. La piattaforma è costituita da 100 bilance collegate ad una stazione informatica dedicata alla registrazione ed alla conservazione di tutte le informazioni acquisite, attraverso la quale è possibile registrare ogni 15 minuti il peso delle piante poste su ognuna di esse.

Per l'esperimento è stato seguito il protocollo descritto a seguire:

### **2.1 Pre-germinazione;**

1) per ciascuna replica, 100 piastre Petri sono state etichettate con il codice identificativo corrispettivo a ciascuna accessione specifica. Per ogni genotipo, all'interno di ciascuna Petri, sono stati posti 6 semi adagiati su 2 fogli di carta assorbente bagnati con acqua deionizzata e successivamente collocati al buio in una cella di crescita a 4 °C fino all'emissione della radichetta e dell'abbozzo del fusto (8 giorni). Durante il periodo di pre-germinazione, 200 vasi rettangolari con base quadrata, delle dimensioni di 33 cm di altezza e 6 cm di lato, sono stati preparati per la semina.

### **2.2. Preparazione dei vasi**

1) Ciascun vaso rettangolare è stato riempito fino all'orlo con "Scotts® Levington M3 Pot and Bedding High Nutrient Compost", caratterizzato da bassa conduttività: 450-550 mS; pH standard: 5,3-5,7; Mg / litro aggiunto: N = 280, P = 160, K = 350.

2) il vaso è stato battuto su di un ripiano nella serra per compattare il compost, e riempito un'altra volta fino all'orlo; l'operazione è poi stata ripetuta finché il compost ben compattato risultasse 3 cm al di sotto il bordo del vaso stesso

3) l'operazione è stata ripetuta fino a riempire tutti i 200 vasi

4) i vasi così preparati sono stati bagnati fino a farli gocciolare con uguali quantità di acqua di rubinetto con un contenitore da 60 ml

5) sono state preparate 200 etichette, con riportato il codice identificativo dei differenti genotipi, che sono state successivamente collocate nei vasi in modo tale che la parte superiore dell'etichetta risultasse a livello della parte superiore del vaso

### **2.3. Semina**

1) Al termine del periodo di pre-germinazione, 200 semi, 2 per ciascun genotipo in ciascuna replica, sono stati seminati nei rispettivi vasi e collocati adiacenti sui due banchi della serra

2) tutti i semi sono stati ricoperti con 1cm ca. di compost ed ogni vaso è stato ricoperto con un foglietto di alluminio per evitare l'effetto causato dal sistema di aria condizionata

3) all'emergenza delle plantule sono stati rimossi i fogli di alluminio dalla superficie dei vasi; da quel momento, ogni pianta è stata adacquata ogni mattina con 60 ml di acqua del rubinetto (un contenitore colmo).

### **2.4. Prima raccolta**

Alla comparsa della terza foglia (ca. 7-10 giorni dopo la germinazione), su 100 piante per ciascuna replica, una per genotipo, sono stati rilevati i seguenti caratteri:

- peso del vaso con la pianta;
- peso del vaso senza pianta;
- peso fresco della pianta tagliata alla base;
- lunghezza e larghezza della prima e seconda foglia; ;
- le piante tagliate sono state raccolte in sacchetti di carta etichettati, e successivamente posti nel forno di essiccazione per calcolare il peso della sostanza secca dopo 7 giorni;
- sono stati raccolti campioni costanti dalla terza foglia e posti in provette Eppendorf etichettate con il numero di riconoscimento degli specifici genotipo e replica, e collocato nel freezer a -20 ° C nel laboratorio di fisiologia, per la successiva analisi ABA.

- Le ulteriori corrispettive 100 piante, una per genotipo, entro ciascuna replica sono state poste sulle 100 bilance che costituiscono la piattaforma di fenotipizzazione, Ogni pianta è stata da quel momento in poi innaffiata ogni con 60ml di acqua del rubinetto ogni mattina per mantenere un peso compreso tra 800g e 900g, fino ad arrivare allo stadio di 6° foglia. In corrispondenza di ciascun blocco dell'alfa lattice
- tinytag datalogger, per registrare ogni 15 minuti i parametri ambientali (ovvero temperatura (T min, T max e T relativa) e l'umidità (H min, H max e H relativa).

## **2.5. Seconda raccolta**

- alla comparsa della 6° foglia (ca. 11-13 giorni dopo essere state messe sulle bilance), su 100 piante per ciascuna replica, una per genotipo, sono stati rilevati i seguenti caratteri:
  - peso della pianta con il vaso;
  - peso del vaso senza pianta;
  - peso fresco della pianta;
  - lunghezza e larghezza della quarta e quinta foglia;
  - le piante tagliate sono state raccolte in sacchetti di carta etichettati, e successivamente posti nel forno di essiccazione per calcolare il peso della sostanza secca dopo 10 giorni.
  - sono stati scaricati tutti dati raccolti registrati dalla stazione informatica collegata alle bilance

Il suddetto esperimento è stato ripetuto ciclicamente per 6 repliche sottoponendo le piante alle stesse condizioni di regime irriguo. Questo è stato necessario a causa delle differenti condizioni ambientali riscontrate nella serra, in maniera tale da poter controllare quanto più possibile la componente ambientale con un appropriato disegno sperimentale (alfa lattice).

Dai dati così ottenuti è stato possibile ricavare una stima dell'uso dell'acqua (water use = WU) dalla formula:

$$WU (g H_2O) = [\text{starting FW (g)} + \text{water given over whole period (g)}] - \text{final FW (g)}$$

Il peso iniziale della sostanza vegetale fresca (starting fresh weight = FW)= è stato misurato a partire dal materiale vegetale pesato alla prima raccolta. L'acqua utilizzata (water given over whole period) rappresenta la somma di tutta l'acqua utilizzata per adacquare le piante durante la loro permanenza sulle bilance (10gg). Il peso finale della sostanza vegetale fresca (final FW = final fresh weight) è stato determinato al momento della raccolta finale.



Il peso secco finale è stato in seguito diviso per il valore del consumo idrico (WU) per ricavare l'efficienza dell'uso dell'acqua (WUE) per tutto il periodo dell'esperimento.

## **2.6. Analisi ABA**

L'analisi ABA è stata eseguita utilizzando la tecnica "Radioimmuno assay" o RIA, basata sull' anticorpo monoclonale MAC 252, seguendo il protocollo suggerito da Quarrie *et al.* (1988), modificato da Barrieu & Simonneau (2000).

### **2.6.1. Materiale e reagenti**

- 1) flaconcini o provette da 1.5 ml e rack di gommapiuma
- 2) pipette e puntali
- 3) micro-centrifuga da 40 campioni
- 4) (Tampone )buffer fosfato salino (PBS)
- 5) ABA marcato con il trizio (3H-ABA) disciolto nel PBS contenente 5 mg/ml di gamma globulina
- 6) Anticorpo monoclonale MAC252 per ABA disciolto in PBS contenente 5 mg / ml di albumina di siero bovino (BSA) e 4 mg /ml di PVP (polivinilpirrolidone)
- 7) Ammonio solfato saturato
- 8) Standard ABA non marcati ( $B_{min}[ABA]$ ; 2000; 1000; 500; 250, 125; 62,5;  $B_{max}[H_2O]$ )
- 9) Liquido di scintillazione Ecoscint H e contatore a scintillazione e luminescenza "Packard 1600TR Liquid Scintillation Counter",

### **2.6.2. Preparazione del materiale vegetale**

Per ciascuna replica, il tessuto vegetale raccolto allo stadio di terza foglia è stato posto in tubi Eppendorf precedentemente pesati ed etichettati, ed immersi immediatamente in azoto liquido.

I campioni sono stati successivamente lasciati nell'essiccatore a freddo per 24 ore. Trascorso questo periodo, il tessuto secco è stato tritato e macinato all'interno di ciascun tubo fino a ridurlo ad una polvere fine. I tubi Eppendorf con il tessuto fogliare macinato sono stati pesati e a questo valore è stato sottratto il peso delle Eppendorf vuote precedentemente pesate, per calcolare il peso del tessuto secco macinato. In ciascuna provetta Eppendorf con il tessuto fogliare macinato, è stata aggiunta acqua deionizzata in un rapporto 1:50.

I campioni così preparati, sono state posizionate sull'agitatore in cella per 12 ore al fine di estrarre l'ABA dai campioni; termine di questo periodo, i campioni sono stati congelati.

### **2.6.3. Analisi del contenuto di ABA**

Per ciascuna analisi, sono stati utilizzati contemporaneamente due rack . Ciascun rack può contenere 40 tubi, ossia 32 campioni ed 8 standard , che devono essere disposti secondo il seguente layout di caricamento:

<b>Bmin [ABA]</b>	<b>2000</b>	campione 1	campione 2	campione 3	campione 4	campione 5	campione 6	campione 7	campione 8
<b>100</b>	<b>500</b>	campione 9	campione 10	campione 11	campione 12	campione 13	campione 14	campione 15	campione 16
<b>250</b>	<b>125</b>	campione 17	campione 18	campione 19	campione 20	campione 21	campione 22	campione 23	campione 24
<b>62,5</b>	<b>Bmax [H<sub>2</sub>O]</b>	campione 25	campione 26	campione 27	campione 28	campione 29	campione 30	campione 31	campione 32

I campioni sono stati scongelati a temperatura ambiente e successivamente centrifugati per 4 minuti prima dell'uso.

Nei rack di gommapiuma, sono state collocate provette da 1,5 ml in numero corrispettivo ai campioni da analizzare. In ciascuna di esse sono stati aggiunti 200 µl di PBS al 50%, 100 µl di 3H-ABA, 100 µl di MAC252 e separatamente, a seconda dell'ordine di caricamento, 50 µl di standard e 50 µl di ciascun campione. I flaconcini così preparati, sono stati successivamente centrifugati per 1 minuto e refrigerati per 45 minuti.

Terminato questo tempo, sono stati aggiunti 0,5 ml di ammonio solfato saturato e le provette sono state poste al buio a temperatura ambiente per 30 minuti al fine di far precipitare il complesso ABA-anticorpo monoclonale. I campioni sono stati successivamente centrifugati per 4 minuti fino a vedere sul fondo del flaconcino una pallina di rivestimento o *pellet* di colore bianco. Dalle provette così ottenute è stato eliminato il liquido surnatante ed è stato poi aggiunto 1,0 ml di ammonio solfato al 50% (50 ml di ammonio solfato saturato + 50 ml di acqua deionizzata) al fine di rimuovere il materiale radioattivo non precipitato in eccesso; i flaconcini sono stati miscelati a mano per fare sospendere di nuovo il complesso ABA-anticorpo monoclonale. Le provette sono state quindi centrifugate per 5 minuti ed il liquido surnatante è stato nuovamente rimosso. Ad ogni campione sono stati aggiunti 100 µl di acqua deionizzata e 1,5 ml di liquido di scintillazione Ecoscint H. E' stato utilizzato un mixer vortex per ri-sospendere i pellets presenti sul fondo di ogni tubo, fino a quando il liquido presente all'interno di ciascun flaconcino è diventato di colore bianco. Ogni provetta è stata poi posta all'interno di fiale di vetro e successivamente nei rack del contatore a

scintillazione e luminescenza "Packard 1600TR Liquid Scintillation Counter". Il liquido di scintillazione produce emissioni di luce quando assorbe l'energia del decadimento radioattivo di un particolato, ed il contatore registra il numero di decadimenti radioattivi prodotti sottoforma di conteggi al minuto (cpm o *count per minute*).

Ai risultati ottenuti è stata applicata una trasformazione logit come segue:

$$\text{LOGIT}(B/B_{\max}) = \ln \frac{(B - B_{\min})(B_{\max} - B_{\min})}{1 - ((B - B_{\min})/(B_{\max} - B_{\min}))}$$

dove B, in cpm, quantifica la radioattività rimasta legata al MAC252 quando l'ABA del campione è stato aggiunto al flaconcino; Bmax quantifica la radioattività massima associata quando il solo 3H-ABA reagisce con il MAC252 e Bmin quantifica la radioattività associata minima quando una grande eccesso di ABA non marcato viene aggiunto al flaconcino. La curva di calibrazione è stata ottenuta riportando i conteggi trasformati con il logit per un range di (+)-cis, trans ABA standard contro il logaritmo naturale della concentrazione ABA non marcato presente in ciascuna provetta. In questo modo si ottiene una linea retta per la quale è stata calcolata un'equazione di regressione lineare. Questa equazione è stata utilizzata per convertire la trasformazione logit dei conteggi di ogni campione nella concentrazione calcolata di (+)-ABA.

### **3. PROVA PRELIMINARE IN CAMPO NELLA STAGIONE DI CRESCITA 2010/2011**

La prova sperimentale di campo nella stagione di crescita 2010/2011 (UNIBO 2011) è stata condotta presso l'azienda sperimentale del Dipartimento di Scienze Agrarie (DipSA) della Facoltà di Agraria dell'Università di Bologna a Cadriano, Valle del Po, 44° 33' N e 11° 24' E, Italia. Sono state valutate 100 accessioni di frumento duro, randomizzate secondo uno schema sperimentale alfa lattice in tre repliche. L'unità sperimentale era costituita da parcelle di dimensioni 1,20 x 3,00 m, ciascuna composta da 8 filette equidistanti; le parcelle erano distanziate all'incirca 30 cm dalle parcelle adiacenti, con densità di semina di 350 semi/m<sup>2</sup>. La semina della prova è stata effettuata a macchina in data 13/12/2010 e la raccolta è stata effettuata analogamente a macchina in data 04/07/2011; le parcelle sono state gestite secondo le normali pratiche colturali della zona. In pre - semina, il campo è stato fertilizzato con 2 q ha<sup>-1</sup> di urea. Nel corso dell'inverno ed all'inizio della primavera è stata somministrata una quantità pari a 150 kg ha<sup>-1</sup> 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.

#### **3.1. Rilievo dei dati fenotipici**

I rilievi fenotipici effettuati sulle accessioni di frumento duro sono stati i seguenti:

- 1. Data di emergenza:** data media di emergenza parcellare;
- 2. Danni da freddo** (indicato con FD acronimo di "Frost Damage"): se presente, valutati circa 15 giorni dopo episodi di congelamento. tale rilievo è stato basato su una stima visiva, utilizzando una scala che va da 0 a 9; dove 0 indica l'assenza di danni, e il punteggio da 1 a 9 rappresenta danni dell'area fogliare dal 10% al 90%;

[La data di spigatura, di fioritura e di maturità, sono state valutate come somma termica, o cumulo di calore al quale la coltura è complessivamente esposta durante il ciclo, espressa in GDD ("Growing Degree Days") e calcolata sommando le temperature medie giornaliere e considerando la temperatura di base (Gallagher, 1979)].

**3. Data di spigatura** (indicata con HD acronimo di "Heading Date") espressa in GDD dall'emergenza fino alla data in cui ca. il 50% dei culmi principali della parcella presentavano la spiga fuoriuscita per metà della guaina della foglia bandiera (Kadoks 55);

**4. Data di fioritura** (indicata con FT acronimo di "Flowering Time"): espressa in GDD dall'emergenza fino alla data in cui ca. 50% dei culmi principali della parcella presentavano le antere fuoriuscite dalle glume;

**5. Data di maturità** (indicata con MD acronimo di “Maturity Date”) : espressa in GDD dall’emergenza fino momento alla data in cui ca. il 50% dei culmi principali della parcella presentavano le spighe di colore giallo, indice di maturità;

**6. Altezza della pianta** (indicata con PH acronimo di “Plant Height”) nello stadio di maturazione, misurata su cinque culmi principali nelle due file centrali di ciascuna parcella per poter operare su piante rappresentative e in tre diversi punti distinti della pianta, ovvero:

- **Altezza del colletto della foglia bandiera** (indicata come FLC acronimo di “Flag Leaf Collar”): espressa in centimetri e misurata come distanza dal terreno della foglia bandiera;

- **Altezza della base della spiga** (indicata come BoE acronimo di “Base Of The Ear”): espressa in centimetri e misurata come distanza dal terreno della base della spiga;

- **Altezza della estremità della spiga** (indicata come ToE acronimo di “Tip Of The Ear”): espressa in centimetri e misurata come distanza dal terreno della estremità della spiga, escluse le reste;

**7. Lunghezza del peduncolo** (indicata come PdL acronimo di “Peduncle Length”), espressa in cm e calcolata come distanza tra la foglia bandiera e la base della spiga di ogni culmo principale;

**8. Indice di verde (SPAD)** espresso in unità e misurato come media di 20 foglie bandiera rappresentative della parcella attraverso il misuratore di clorofilla (SPAD-502; Minolta). I rilevamenti sono stati effettuati in due stadi: botticella (Zadoks 45) ed antesi (Zadoks 65);

**9. Allettamento** (indicato come Lodg acronimo di “Lodging”): stimato (se presente) nello stadio intermedio di riempimento della granella e a maturità;

**10. Numero di culmi fertili al m<sup>2</sup>** (indicato come FTpsm acronimo di “Fertile Tillers per square meter”): conteggio a maturità del numero di culmi fertili (almeno un seme) in un metro quadrato;

**11. Resa in granella** (indicata con GY acronimo di “Grain Yield”) ad umidità costante (15%) espressa in Mg per ettaro;

**12. Peso medio dei semi** (indicato con TKW acronimo di “Thousand Kernel Weight”) espresso in grammi e stimato sulla base media del peso di due campioni di 50 semi;

**13. Peso ettolitrico** (indicato come TW acronimo di “Test Weight) espresso in (kg hl<sup>-1</sup>) ed **Umidità della granella** (indicate con KM acronimo di “Kernel Moisture), espressa in (%), sono stati valutati sui medesimi campioni di seme standard, utilizzando il “Grain Analysis Computer GAC 2100” (Dickey-John Corporation, Minneapolis, MN, USA);

**14. Biomassa verde** (indicata come NDVI acronimo di “Normalized Difference Vegetation Index”), espressa in unità. Sono stati effettuati due rilevamenti; uno nella fase di accostamento precoce (NDVI Early Tileering o NDVI ET) ed uno alla comparsa del primo nodo (Zadoks 29-31) (NDVI Early Joint o NDVI EJ), utilizzando lo spettroradiometro

portatile (Green seeker Hand Held TM optical sensor unit; modello 505, Ntech Industries CA, USA).

Si ritiene opportuno precisare che nella successiva descrizione dei risultati saranno spesso riportati gli acronimi del nome in inglese dei caratteri come sopra indicati, in quanto di uso convenzionale in letteratura.

#### **4. PROVE SPERIMENTALI DI CAMPO NELLA STAGIONE DI CRESCITA 2011/2012**

Le prove sperimentali dell'annata 2011/12 sono state condotte in tre diverse località, ovvero:

1. Presso l'azienda sperimentale del Dipartimento di Scienze Agrarie della Facoltà di Agraria dell'Università di Bologna (UNIBO) a Cadriano, come nella prova preliminare;
2. Presso l'azienda sperimentale della Sabanci University in Turchia;
3. Presso l'azienda sperimentale di Martonvasar della AriHas University in Ungheria.

In tutte e tre le località sono state valutate 188 accessioni di frumento duro, randomizzate secondo uno schema sperimentale alfa lattice. In particolare, sono state realizzate tre repliche per le prove in condizioni non irrigate (*rainfed* a seguire) e due repliche per le prove irrigue (*watered* a seguire) realizzate in Ungheria e Turchia, dal momento che in Italia le condizioni atmosferiche particolarmente favorevoli allo sviluppo del frumento duro non consentono di poter procedere con le irrigazioni nei nostri ambienti.. L'unità sperimentale era costituita da parcelle composte da 8 filette equidistanti; le parcelle erano distanziate all'incirca 30 cm dalle parcelle adiacenti, con densità di semina di 350 semi/m<sup>2</sup>. La semina e la raccolta delle prove è stata effettuata a macchina nelle seguenti date:

1. UNIBO RAINFED (UNI\_R): semina 3 novembre 2011, raccolta 3 luglio 2012;
2. SABANCI RAINFED (SAB\_R) e SABANCI IRRIGATED (SAB\_I): semina 6 dicembre 2011, raccolta della prova irrigata 4 agosto 2012 e della prova irrigua 25 luglio 2012;
3. ARIHAS RAINFED (ARI\_R) e ARIHAS IRRIGATED (ARI\_I): semina primaverile in data 9 marzo 2012, raccolta 13 luglio 2012.

Le parcelle sono state gestite secondo le normali pratiche colturale della zona, comprensive della gestione delle infestanti, dei parassiti e di eventuali malattie, che non si sono riscontrate in nessuna delle repliche realizzate. Inoltre, SABANCI e ARIHAS hanno distinto due diversi regimi irrigui, intervenendo con irrigazioni al campo per distinguere le due diverse condizioni. In particolare

1. SABANCI ha fornito 60 ml di acqua alla coltura in prefioritura, con un intervento irriguo;
2. ARIHAS ha fornito complessivamente 221.6 ml di acqua alla coltura in 4 interventi consecutivi a partire dai giorni precedenti la fioritura.

#### **4.1. Rilievo dei dati fenotipici**

I rilievi fenotipici effettuati sulle accessioni di frumento duro sono stati i seguenti:

1. **Data di emergenza:** data media di emergenza parcellare;
2. **Danni da freddo** (indicato con FD acronimo di “Frost Damage”): se presente, valutati circa 15 giorni dopo episodi di congelamento. tale rilievo è stato basato su una stima visiva, utilizzando una scala che va da 0 a 9; dove 0 indica l’assenza di danni, e il punteggio da 1 a 9 rappresenta danni dell’area fogliare dal 10% al 90%;
3. **Vigore precoce** (indicato con EV acronimo di “Early Vigor”): punteggio stimato su base visiva utilizzando una scala che va da 1 a 5, prima della comparsa del primo nodo (Zadoks 29-31). I valori sono stati assegnati come segue: 1: crescita molto debole; 2: crescita debole; 3: crescita regolare; 4: crescita vigorosa; 5: crescita molto vigorosa;  
[La data di spigatura, di fioritura e di maturità, sono state valutate come somma termica, o cumulo di calore al quale la coltura è complessivamente esposta durante il ciclo, espressa in GDD (“Growing Degree Days”) e calcolata sommando le temperature medie giornaliere e considerando la temperatura di base (Gallagher, 1979)].
4. **Data di spigatura** (indicata con HD acronimo di “Heading Date”) espressa in GDD dall’emergenza fino alla data in cui ca. il 50% dei culmi principali della parcella presentavano la spiga fuoriuscita per metà della guaina della foglia bandiera (Kadoks 55);
5. **Data di fioritura** (indicata con FT acronimo di “Flowering Time”): espressa in GDD dall’emergenza fino alla data in cui ca. 50% dei culmi principali della parcella presentavano le antere fuoriuscite dalle glume;
6. **Data di maturità** (indicata con MD acronimo di “Maturity Date”) : espressa in GDD dall’emergenza fino momento alla data in cui ca. il 50% dei culmi principali della parcella presentavano le spighe di colore giallo, indice di maturità;
7. **Altezza della pianta** (indicata con PH acronimo di “Plant Height”) nello stadio di maturazione, misurata su cinque culmi principali nelle due file centrali di ciascuna parcella per poter operare su piante rappresentative e in tre diversi punti distinti della pianta, ovvero:
8. **Altezza del colletto della foglia bandiera** (indicata come FLC acronimo di “Flag Leaf Collar”): espressa in centimetri e misurata come distanza dal terreno della foglia bandiera;
9. **Altezza della base della spiga** (indicata come BoE acronimo di “Base Of The Ear”): espressa in centimetri e misurata come distanza dal terreno della base della spiga;
10. **Altezza della estremità della spiga** (indicata come ToE acronimo di “Tip Of The Ear”): espressa in centimetri e misurata come distanza dal terreno della estremità della spiga, escluse le reste;



11. **Lunghezza del peduncolo** (indicata come PdL acronimo di “Peduncle Length”), espressa in cm e calcolata come distanza tra la foglia bandiera e la base della spiga di ogni culmo principale;

12. **Indice di verde (SPAD)** espresso in unità e misurato come media di 20 foglie bandiera rappresentative della parcella attraverso il misuratore di clorofilla (SPAD-502; Minolta). I rilevamenti sono stati effettuati in due stadi: botticella (Zadoks 45) ed antesi (Zadoks 65);

13. **Senescenza fogliare** (indicata come Sen acronimo di “Senescence”): misurata attraverso lo SPAD su 20 foglie bandiera nella fase di maturazione cerosa precoce (Zadoks 83);

14. **Allettamento** (indicato come Lodg acronimo di “Lodging”): stimato (se presente) nello stadio intermedio di riempimento della granella e a maturità;

15. **Numero di culmi fertili al metro<sup>2</sup>** (indicato come FTpsm acronimo di “Fertile Tillers per square meter”): conteggio a maturità del numero di culmi fertili (almeno un seme) in un metro quadrato;

16. **Resa in granella** (indicata con GY acronimo di “Grain Yield”) ad umidità costante (15%) espressa in Mg per ettaro;

17. **Peso medio dei semi** (indicato con TKW acronimo di “Thousand Kernel Weight”) espresso in grammi e stimato sulla base media del peso di due campioni di 50 semi;

18. **Peso ettolitrico** (indicato come TW acronimo di “Test Weight) espresso in (kg hl<sup>-1</sup>) ed **Umidità della granella** (indicata con KM acronimo di “Kernel Moisture) sono stati valutati sui medesimi campioni di seme standard, utilizzando il “Grain Analysis Computer GAC 2100” (Dickey-John Corporation, Minneapolis, MN, USA);

19. **Biomassa verde** (indicata come NDVI acronimo di “Normalized Difference Vegetation Index”), espressa in unità. È stato effettuato un rilevamento in fase vegetativa, utilizzando lo spettroradiometro portatile (Green seeker Hand Held TM optical sensor unit; modello 505, Ntech Industries CA, USA).

Si ritiene opportuno precisare che nella successiva descrizione dei risultati saranno spesso riportati gli acronimi del nome in inglese dei caratteri come sopra indicati, in quanto di uso convenzionale in letteratura.

## **5. FATTORI AMBIENTALI**

### **5.1. Caratterizzazione del suolo**

La caratterizzazione dettagliata del terreno è stata effettuata in entrambe le stagioni di crescita, per ciascuna replica sperimentale.

#### **5.1.1. Campionamento gravimetrico del terreno**

I campioni gravimetrici di terreno sono stati raccolti a 30 e 60 cm di profondità per quantificare il contenuto idrico del suolo. I primi campioni sono stati raccolti ad inizio semina, per identificare il contenuto d'acqua iniziale, e gli ultimi campioni sono stati raccolti alla fine del ciclo colturale. Al fine di valutare la composizione e le proprietà idrauliche del terreno sono stati prelevati campioni in diverse posizioni del campo e, specificatamente, in ciascuna parcella del genotipo controllo DP005 – varietà Meridiano, e all'interno di ogni prova, sia *watered* che *rainfed*. Inoltre, il terreno è stato monitorato utilizzando sonde 5TM della Decagon Devices, posizionate per ciascuna replica entro le parcelle del genotipo controllo DP005 – varietà Meridiano, a 30 e 60 cm di profondità.

### **5.2. Caratterizzazione delle condizioni atmosferiche**

La precisa caratterizzazione giornaliera delle condizioni atmosferiche è stata ottenuta utilizzando una stazione meteo vicino ai campi sperimentali (mediamente le stazioni si trovano all'interno delle aree sperimentali); è stata effettuata in entrambe le stagioni di crescita, per ciascuna replica sperimentale.

I parametri registrati con frequenza oraria sono stati i seguenti:

- Temperatura dell'aria (Tmax e Tmin)
- Umidità (possibilmente non come media al giorno)
- Luce e radiazione fotosinteticamente attiva (“photosynthetically active radiation” o PAR, che rappresenta una misura dell'energia della radiazione solare intercettata dalla clorofilla *a* e *b* nelle piante. In altre parole, è una misura dell'energia effettivamente disponibile per la fotosintesi, che è minore dell'energia totale proveniente dal sole, in quanto lo spettro di assorbimento della clorofilla non è molto esteso. La PAR viene generalmente considerata pari al 50% della radiazione solare totale incidente. Si concentra nelle bande del blu e del rosso, con punte massime a 430 e 680 nm di lunghezza d'onda)

- Velocità del vento
- Pioggia

Per il trattamento di irrigazione, è stato mantenuto un livello di ca. 110% di sostituzione della evapotraspirazione calcolata. Al fine di evitare un eccessivo livello di stress idrico negli esperimenti non irrigati, è stata effettuata l'irrigazione dopo la fioritura, nel caso in cui le perdite d'acqua stimate per evapotraspirazione fossero risultate più del 70% rispetto alle condizioni irrigue.

## **6. ANALISI STATISTICA DEI DATI FENOTIPICI**

I valori fenotipici ottenuti dall'analisi del panel nella stagioni di crescita 2011 e 2012 sono stati utilizzati per l'analisi della varianza (ANalysis Of VAriance, ANOVA:), condotta sui valori delle singole unità sperimentali secondo uno schema a blocchi randomizzati. L'analisi è stata effettuata utilizzando il software GenStat® (VSN International, 2012).



## **CAPITOLO IV**

### **RISULTATI**

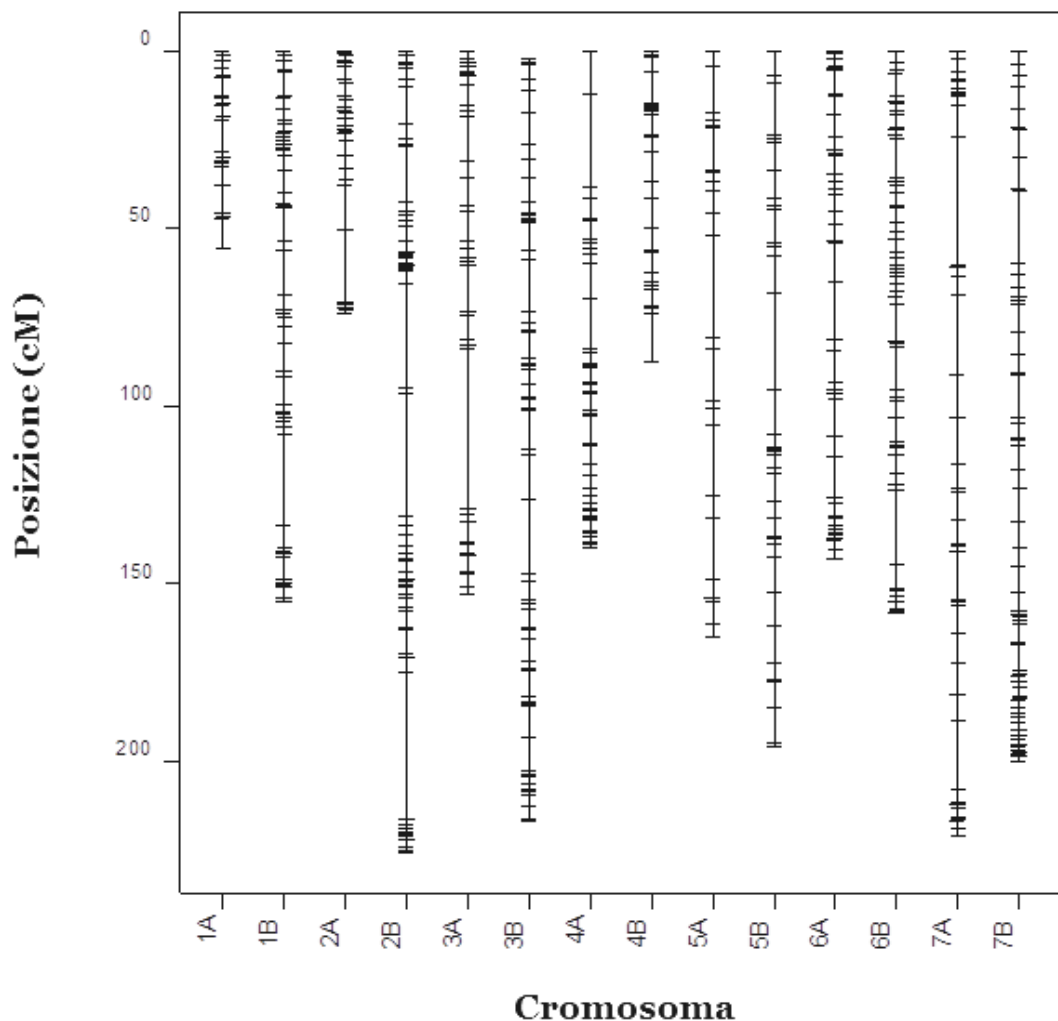


## 1. COSTRUZIONE DELLA MAPPA MOLECOLARE

Un totale di ca.1.303 marcatori SSR e DArT sono stati testati sul panel di 188 accessioni di frumento duro. Di questi, 333 sono risultati non presenti nella mappa *consensus*, quindi temporaneamente esclusi dalla mappa del panel in attesa che il cromosoma di appartenenza e la posizione vengano definiti. Dei rimanenti, 130 (corrispondenti al 13,4%) sono stati esclusi dall'analisi perché la frequenza dell'allele polimorfico era sotto il 10%, indicato come soglia per escludere casi marcatori con alleli rari. Complessivamente la mappa genetica del panel è stata realizzata con 840 marcatori molecolari, raggruppati in 14 gruppi di *linkage* e per un totale di 2.261,1 cM (Tabella 1.1 e Figura 1.1)

**Tabella 1.1.** Numero di marcatori e lunghezza relativa dei 14 cromosomi di frumento duro della mappa molecolare del panel di 188 accessioni.

Cromosoma	N° di marcatori	Lunghezza (cM)
1A	31	56,30
1B	83	162,7
2A	49	95,20
2B	86	231,3
3A	52	156,2
3B	78	214,8
4A	57	140,0
4B	29	119,8
5A	30	165,1
5B	44	195,7
6A	65	145,0
6B	77	158,0
7A	59	221,0
7B	100	200,0



**Figura 1.1.** Mappa genetica del panel di frumento duro. In figura sono riportati i 14 cromosomi di e la distribuzione per ciascun cromosoma dei marcatori analizzati.

La densità dei marcatori sulla mappa varia da 1,8 cM/marcatore (1A) a 5,5 cM/marcatore (5B), con una densità media di ca. 2,9 cM/marcatore. La lunghezza dei cromosomi del genoma A e del genoma B è di, rispettivamente, 978,8 e 1.282,3 cM, con densità di marcatori di 2,8 e 2,6 cM/marcatore. La lunghezza dei cromosomi varia da 56,3 cM (1A) a 231,3 cM (2B).

Sulla base delle informazioni fornite dai marcatori in comune con la mappa Ta-SSR-2004 di Somers *et al.* (2004) per il genoma A e B, abbiamo stimato che la mappa realizzata in questo lavoro copra ca. l' 88% del genoma di frumento duro.



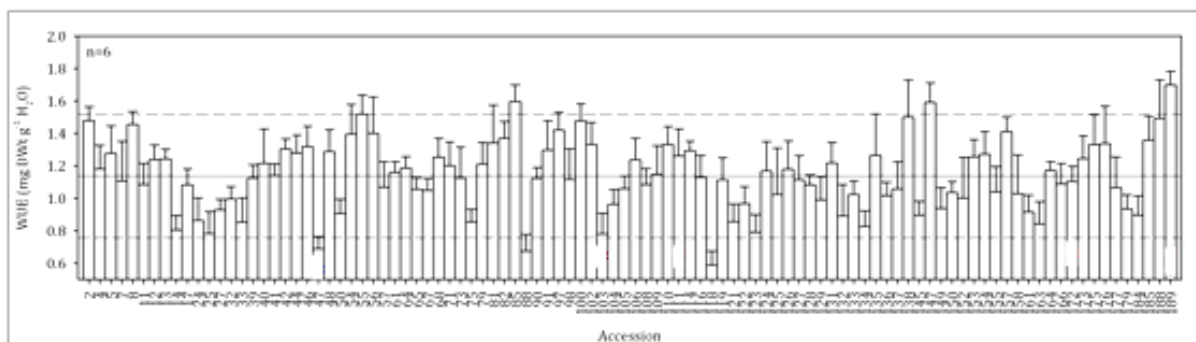
## 2. VALUTAZIONE DELLA WUE IN UN SUBSET DI 100 ACCESSIONI DI FRUMENTO DURO

L'ANOVA relativa all'efficienza dell'uso dell'acqua (WUE), valutata in un subset di 100 accessioni di frumento duro attraverso l'esperimento in condizioni controllate presso il Lancaster Environment Centre (LEC) dell'Università di Lancaster (UK), ha permesso di evidenziare: differenze altamente significative in termini di WUE (Figura 2.1) e DW, e differenze non significative per la concentrazione di ABA tra le 188 accessioni valutate, in termini di media dei valori ottenuti sulle sei repliche (Tabella 2.1).

**Tabella 2.1** Differenze tra accessioni presso il LEC di Lancaster. Per ciascun carattere sono riportati i valori medi delle 100 accessioni nelle sei repliche, i valori minimi e massimi, l'ereditabilità ( $h^2$ ), il coefficiente di variazione (CV), e la significatività del test F.

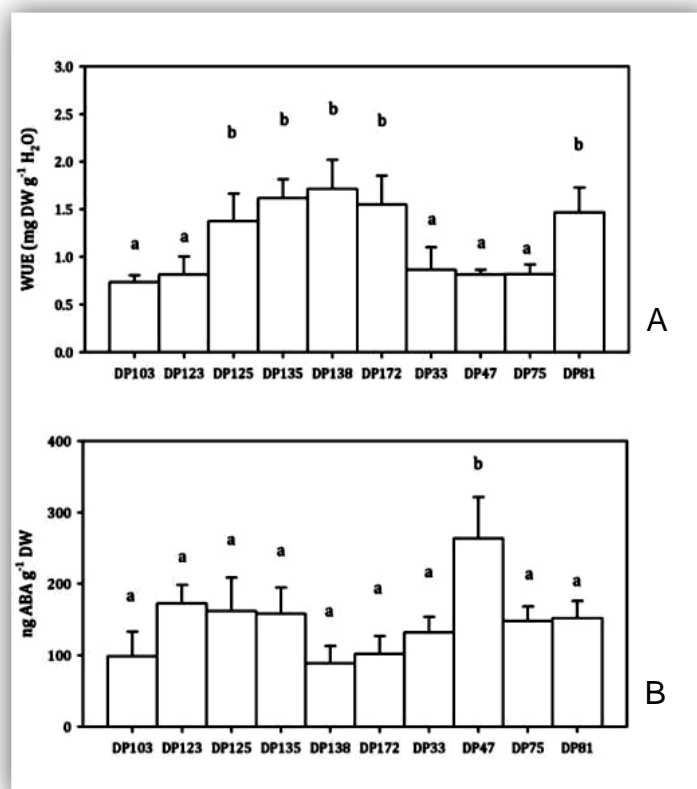
LEC 2011	WUE (mg DWT / WU g H <sub>2</sub> O)	ABA (ng ABA /g DWT)	DW (g)
media	1,14	158	0,68
min	0,18	7,06	0,11
max	2,46	539	1,46
CV(%)	30,2	38,2	30,2
h <sup>2</sup> (%)	55,9	48,4	48,7
tra accessioni	**	n.s.	**

- WUE: la media è risultata pari a 1,14 mg g<sup>-1</sup>, con un range di variazione da 4,80 a 9,82 mg g<sup>-1</sup>; le differenze fenotipiche tra accessioni sono risultate altamente significative;
- DW: le differenze fenotipiche tra accessioni sono risultate altamente significative, con valori medi di 0,68 g, valori minimi di 0,11 g e massimi di 1,46 g;
- ABA: le differenze tra accessioni non sono risultate significative, con valore medio di 158 ng g<sup>-1</sup>, compreso in intervallo da 7,06 a 539 ng g<sup>-1</sup>;



**Figura 2.1.** Distribuzione fenotipica della WUE tra le 100 accessioni del subset di frumento duro. Le differenti distribuzioni fanno riferimento al valore medio di ogni accessioni nelle 6 repliche in condizioni di regime irriguo ben irrigato.

Dettagli sugli estremi della distribuzione di frequenza presentata, si trovano nelle Figure 2.2 A e B.



**Figura 2.2. (A).** Distribuzione fenotipica relativa alle 5 accessioni con bassi valori di WUE (a) e valori elevati di WUE (b). I dati riportati fanno riferimento alle medie delle accessioni in tutte e sei le repliche. **(B).** Per le medesime accessioni sono riportate le distribuzioni medie della concentrazione di ABA nelle 6 repliche.

In particolare, (Figura 2.2. A) cinque accessioni hanno mostrato valori significativamente sempre maggiori rispetto alle altre accessioni per WUE in tutte le sei repliche, ovvero:

- BRAVADUR (DPO81), con valori medi di 1,74 mg g<sup>-1</sup>, minimi di 1,31 mg g<sup>-1</sup> e massimi di 2,19 mg g<sup>-1</sup>;

- AUS-1 (DP125); con una media osservata di 1,28 mg g<sup>-1</sup>, compresa in un intervallo di variazione da mg g<sup>-1</sup>;
- CHABHA 88 (DP135); con una media stimata di 1,68 mg g<sup>-1</sup> compresa in un intervallo da 1 mg g<sup>-1</sup> a mg g<sup>-1</sup>;
- FURAT-1 (DP138); con un dato medio di 1,63 mg g<sup>-1</sup>, con valori minimi di 1,05 mg g<sup>-1</sup> e massimi di 2,55 mg g<sup>-1</sup>
- OUASRL-1 (DP172); con valori medi di 1,42 mg g<sup>-1</sup>, compresi tra 1 e 2,52 mg g<sup>-1</sup>;

Di contro, cinque accessioni hanno mostrato valori significativamente sempre inferiori rispetto alle altre accessioni per WUE in tutte le sei repliche, ovvero:

- BOLENGA (DP033); con una media stimata di 0,96 mg g<sup>-1</sup>, compresa tra 0,47 e 1,45 mg g<sup>-1</sup>
- 1805 (DP047); con valori medi di 0,77 mg g<sup>-1</sup> minimi di 0,6 mg g<sup>-1</sup> e massimi di 0,96 mg g<sup>-1</sup>;
- ZEINA 1 (DP075); con dato medio corrispondente a 0,98 mg g<sup>-1</sup> compreso in un intervallo di variazione da 0,75 a 1,28 mg g<sup>-1</sup>;
- MEXICALI 75 (DP103); con una media osservata di di 0,9 mg g<sup>-1</sup>, compresa in un intervallo da 0,6 a 1,52 mg g<sup>-1</sup>;
- ARISLAHN 5 (DP123); con valori medi di 0,89 mg g<sup>-1</sup>, minimi di 0,58 mg g<sup>-1</sup> e massimi di 1,17 mg g<sup>-1</sup>.

Considerando in contenuto in ABA, non è stata riscontrata alcuna correlazione significativa tra concentrazione di ABA e WUE per le 10 accessioni che hanno mostrato in tutte e sei le repliche valori massimi e minimi della WUE. I risultati relativi alla concentrazione di ABA per le sole 10 accessioni menzionate poc'anzi sono riportati in Figura 2.2.B.

### 3. VALUTAZIONE FENOTIPICA DI UN SUBSET DI 100 ACCESSIONI DI FRUMENTO DURO PER CARATTERI AGRONOMICI

Dall'ANOVA dei dati fenotipici misurati nella prova sperimentale condotta in Italia nella stagione di crescita 2010/2011 (UNIBO 2011) sono state osservate differenze significative o altamente significative per la maggior parte dei caratteri tra le 100 accessioni di frumento duro.

Le differenze fenotipiche sono state riportate nella Tabella 3.1.

I risultati dell'ANOVA per ciascun carattere sono descritti in dettaglio di seguito.

**Tabella 3.1.** Differenze tra accessioni per i dati del 2011 in Italia (UNIBO 2011). Per ciascun carattere sono riportati i valori medi delle 100 accessioni nelle tre repliche, i valori minimi e massimi, l'ereditabilità ( $h^2$ ), il coefficiente di variazione (CV), e la significatività del test F.

UNIBO 2011	GY (Mg ha <sup>-1</sup> )	TKW (g)	FTpsm (nr. M <sup>-2</sup> )	KM (%)	TW (kg hl <sup>-1</sup> )
media	7,10	59,0	102	11,7	76,6
min	4,80	48,0	167	10,3	56,9
max	9,32	69,9	530	13,2	82,5
signif F	**	**	**	**	**
$h^2$ (%)	50,8	90,6	47,5	74,9	41,7
CV (%)	14,8	3,5	15,8	2,5	5,2

#### 3.1. Resa di granella e sue componenti

Dall'ANOVA dei dati fenotipici rilevati per la resa in granella (GY) e sue componenti in senso allargato (TKW: peso dei 1000 semi, TW: peso ettolitrico, FTpsm: numero dei culmi fertili m-2, KM: umidità del seme) è stato possibile osservare, per gran parte di questi caratteri, differenze significative tra accessioni (Tabella 3.1).

Più in dettaglio:

- GY: la media è risultata pari a 7,10 Mg ha<sup>-1</sup>, con un intervallo di variazione da 4,80 a 9,82 Mg ha<sup>-1</sup>; le differenze fenotipiche tra accessioni sono risultate altamente significative;
- TKW: le differenze fenotipiche tra accessioni sono risultate altamente significative, con valori medi di 59,0 g, valori minimi di 48,4 g e massimi di 69,9 g;
- TW: sono state osservate differenze altamente significative tra accessioni, con valore medio di 76,6 kg hl<sup>-1</sup>, compreso in intervallo da 56,9 a 82,5 kg hl<sup>-1</sup>;
- in rapporto a KM, le differenze tra accessioni sono risultate altamente significative, la media stimata è di 11,7%, con valori compresi tra 10,3 e 13,2%;

- FTpsm: presenta differenze altamente significative tra accessioni, il valore medio rilevato è di 102 culmi m<sup>-2</sup>, con valori minimi di 167 culmi m<sup>-2</sup> e valori massimi di 530 culmi m<sup>-2</sup>.

**Tabella 3.2** Differenze tra accessioni per i dati del 2011 in Italia (UNIBO 2011). Per ciascun carattere sono riportati i valori medi delle 100 accessioni nelle tre repliche, i valori minimi e massimi, l'ereditabilità (h<sup>2</sup>), il coefficiente di variazione (CV), e la significatività del test F.

UNIBO 2011	FLC (cm)	BoE (cm)	ToE (cm)	Ped (cm)	GDD to HD (°C)	GDD to FT (°C)	GDD to MD (°C)
media	52,7	71,7	78,7	19,2	1.029	1.162	1.866
min	46,5	63,0	66,5	7,60	964	1.103	1.726
max	82,2	83,5	133	28,6	1.135	1.232	1.965
signif F	†	**	**	**	**	**	**
h <sup>2</sup> (%)	75,7	85,0	71,4	84,5	84,8	86,3	60,4
CV (%)	12,9	4,5	12,4	8,9	1,8	1,6	2,3

### **3.2. Altezza della pianta e lunghezza del peduncolo**

L'ANOVA dei caratteri altezza della pianta (PH), a livello del colletto della foglia bandiera (FLC), della base della spiga (BoE), dell'estremità della spiga (ToE), e lunghezza del peduncolo (PedL) ha evidenziato (Tabella 3.2.) :

- FLC: le differenze fenotipiche tra accessioni mostrano una bassa significatività, con valori medi equivalenti a 52,7 g, compresi in un intervallo da 46,5 e 82,2 cm;
- BoE: presenta differenze altamente significative tra accessioni, con valori medi di 71,7 cm, valori minimi di 63,0 cm e valori massimi di 83,5cm;
- ToE: sono state riscontrate differenze altamente significative tra accessioni, con valori medi 78,7 cm con un intervallo di variazione compreso tra 66,5 e 133 cm;
- PdL: le differenze tra accessioni sono risultate altamente significative, la media stimata è di 19,2 cm, con valori compresi tra 7,60 e 28,6 cm.

### **3.3. Data di spigatura, di fioritura e di maturità**

Dall'analisi ANOVA dei dati fenotipici rilevati per la data di spigatura (HD), la data di fioritura (FT) e la data di maturità (MD), è stato possibile osservare differenze altamente significative per ciascun carattere (Tabella 3.2.)

In particolare:

- GDD-HD: presenta valore medio di 1.029 °C, compreso in un intervallo di tra 964 e 1.135 °C;
- GDD-FT: mostra una media di 1.162 °C, con valori compresi tra 1.103 e 1.232 °C;
- GDD-MD: presenta valore medio di 1.866 °C, compreso in un intervallo tra 1.726 e 1.965 °C.

**Tabella 3.3** Differenze tra accessioni per i dati del 2011 in Italia (UNIBO 2011). Per ciascun carattere sono riportati i valori medi delle 100 accessioni nelle tre repliche, i valori minimi e massimi, l'ereditabilità ( $h^2$ ), il coefficiente di variazione (CV), e la significatività del test F.

UNIBO 2011	NDVI ET (unità)	NDVI EJ (unità)	SPAD B (unità)	SPAD A (unità)
media	0,46	0,69	45,7	48,1
min	0,15	0,32	39,3	41,4
max	0,77	0,85	51,6	54,4
signif F	**	**	**	**
$h^2$ (%)	59,0	61,5	71,0	84,5
CV (%)	13,4	5,9	5,7	4,2

### **3.4. Indice di verde e biomassa verde**

Dall'analisi dell'indice di verde (SPAD) in due diversi stadi fenologici, sono state osservate differenze altamente significative tra accessioni, sia per lo SPAD B (botticella) con valore medio di 39,3 unità, compreso in un intervallo di variazione da 39,3 a 51,6 unità, che relativamente allo SPAD A (antesi) che presenta una media di 48,1 unità, compresa tra 41,4 e 54,4 unità.

Per quanto riguarda l'NDVI, le differenze tra accessioni sono risultate altamente significative sia per l'NDVI B, con media di 0,46 unità, compresa in un intervallo da 0,15 a 0,77 unità, che per quanto riguarda l'NDVI A, il quale mostra un valore medio di 0,69 unità, valore minimo di 0,32 unità e massimo di 0,85 unità.

#### 4. CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA DEL PANEL COMPLETO DI 188 ACCESSIONI DI FRUMENTO DURO, IN PROVE REPLICATE IN 3 AMBIENTI (ITALIA, UNGHERIA E TURCHIA), IN CONDIZIONI DI DIFFERENTI DI REGIMI IRRIGUI (IRRIGATO E NON IRRIGATO) PER IMPORTANTI CARATTERI AGRONOMICI.

I risultati dell'ANOVA relativamente ai dati fenotipici rilevati sulle 188 accessioni di frumento duro nelle prove sperimentali condotte nella stagione di crescita 2011/2012 in Italia (UNI\_R), Turchia in condizioni irrigue (SAB\_I) e non irrigue (SAB\_R), ed Ungheria in condizioni irrigue (ARI\_I) e non irrigue (ARI\_R), sono descritti in dettaglio di seguito.

##### 4.1. Resa di granella e sue componenti

Dall'ANOVA dei dati fenotipici rilevati per la resa in granella (GY) e sue componenti in senso allargato (TKW: peso dei 1000 semi, TW: peso ettolitrico, FTpsm: numero dei culmi fertili m-2, KM: umidità del seme) è stato possibile osservare, per gran parte di questi caratteri, differenze significative o altamente significative tra accessioni entro ciascun ambiente.

- Più in dettaglio, considerando il carattere GY (Tabella 4.1.1):

**Tabella 4.1.1.** Differenze fenotipiche tra accessioni per la resa in granella (GY) nei diversi ambienti nelle prove sperimentali del 2012. Per ciascun ambiente sono stati riportati i valori medi, minimi, e massimi, l'errore, il coefficiente di variazione, la significatività tra accessioni, la significatività dell'interazione genotipo x ambiente (GxE), ed il valore medio del genotipo di controllo Meridiano (DP005) nei diversi ambienti.

GY (Mg ha <sup>-1</sup> )	UNI_R 2012	SAB_R 2012	ARI_R 2012	SAB_I 2012	ARI_I 2012
media	10,4	1,35	3,01	4,62	3,61
min	5,57	0,14	1,60	2,15	1,91
max	13,0	2,78	3,93	6,48	5,72
CV (%)	10,7	20,3	16,4	16,9	13,3
h2 (%)	71,4	59,8	46,9	64,4	68,3
tra accessioni	**	**	**	**	**
GxE	**				
media DP005	12,0	1,14	3,18	4,79	4,12

- per quanto riguarda UNI\_R, GY mostra differenze altamente significative tra accessioni, con valori minimi di 5,57 Mg ha<sup>-1</sup> e valori massimi di 13,04 Mg ha<sup>-1</sup>;
- relativamente a SAB\_R, GY presenta una elevata significatività tra accessioni, con un intervallo di variazione da 0,14 a 2,78 Mg ha<sup>-1</sup>;
- riguardo ad ARI\_R, possiamo osservare una differenza altamente significativa tra accessioni per GY, con valori compresi tra 1,60 e 3,39 Mg ha<sup>-1</sup>;
- per quanto concerne SAB\_I, GY mostra una significatività elevata tra accessioni, con valori minimi di 2,15 Mg ha<sup>-1</sup> e valori massimi di 6,48 Mg ha<sup>-1</sup>;
- per quanto riguarda ARI\_I, GY presenta differenze altamente significative tra accessioni, con valori compresi tra 1,91 e 5,72 Mg ha<sup>-1</sup>.
- l'interazione Genotipo x Ambiente (GxE) è risultata altamente significativa;
- i valori medi del genotipo di controllo Meridiano (DPO05) variano da un minimo di 1,14 Mg h<sup>-1</sup> ad un massimo di 12,0 Mg h<sup>-1</sup>, secondo l'andamento dei diversi ambienti.

I valori medi di GY negli ambienti non irrigui mostrano un decremento andando da UNI\_R con 10,42 Mg ha<sup>-1</sup>, ad ARI\_R con 3,01 Mg ha<sup>-1</sup> a SAB\_R con 1,35 Mg ha<sup>-1</sup>. In condizioni irrigue, i valori medi di SAB\_I con 4,62 Mg ha<sup>-1</sup> risultano superiori a quelli di ARI\_I, con 3,61 Mg ha<sup>-1</sup>. Per quanto riguarda la Turchia, i valori medi di GY in condizioni irrigue, 5,50 Mg ha<sup>-1</sup>, risultano maggiori di quelli in condizioni non irrigue, corrispondenti a 1,35 Mg ha<sup>-1</sup>. Per quanto concerne l'Ungheria, le medie stimate in ambiente non irrigato (3,01 Mg ha<sup>-1</sup>) sono risultate inferiori a quelle in ambiente irrigato (3,61 Mg ha<sup>-1</sup>).

- Riguardo al carattere TKW, in particolare (Tabella 4.1.2.):



**Tabella 4.1.2.** Differenze fenotipiche tra accessioni per il peso dei mille semi (TKW) nei diversi ambienti nelle prove sperimentali del 2012. Per ciascun ambiente sono stati riportati i valori medi, minimi, e massimi, l'errore, il coefficiente di variazione, la significatività tra accessioni, la significatività dell'interazione Genotipo x Ambiente (GxE), ed il valore medio del genotipo di controllo Meridiano (DP005) nei diversi ambienti.

<b>TKW (g)</b>	<b>UNI_R 2012</b>	<b>SAB_R 2012</b>	<b>ARI_R 2012</b>	<b>SAB_I 2012</b>	<b>ARI_I 2012</b>
media	51,0	43,2	49,5	46,2	42,6
min	35,2	32,4	28,6	37,5	33,1
max	62,0	52,7	57,1	56,0	55,1
CV (%)	10,3	4,9	5,7	4,4	5,4
h <sup>2</sup> (%)	70,0	86,8	43,8	84,9	40,1
tra accessioni	**	**	**	**	**
GxE	**				
media DP005	58,2	50,2	51,7	45,4	44,7

- osservando i dati relativi a UNI\_R, TKW mostra differenze altamente significative tra accessioni, con valori compresi tra 35,2 e 62,0 g;
- relativamente a SAB\_R, TKW presenta una elevata significatività tra accessioni, con valori minimi di 32,4 g e valori massimi di 52,7 g;
- riguardo ad ARI\_R, sono state rilevate differenze altamente significative tra accessioni per TKW, con un intervallo di variazione compreso tra 28,6 e 57,1 g;
- per quanto concerne SAB\_I, possiamo osservare differenze altamente significative tra accessioni per TKW, con valori minimi di 37,5 g e valori massimi di 56,0 g;
- per quanto riguarda ARI\_I, TKW presenta una significatività elevata tra accessioni, con valori compresi tra 33,1 e 55,1 g;
- l'interazione Genotipo x Ambiente (GxE) è risultata altamente significativa;
- i valori medi del genotipo di controllo Meridiano (DP005) variano da un minimo di 44,7 g ad un massimo di 58,2 g, secondo l'andamento dei diversi ambienti.

I valori medi di TKW negli ambienti non irrigui mostrano un decremento andando da UNI\_R con 51,0 g, a ARI\_R con 49,5 g a SAB\_R con 43,2 g; in condizioni irrigue, i valori medi di SAB\_I con 46,2 g risultano superiori a quelli di ARI\_I, con 42,6 g. Per quanto riguarda la Turchia, i valori medi del TKW in condizioni irrigate (46,2 g) sono risultati maggiori di quelli in condizioni non irrigue, corrispondenti a 43,2 g. Per quanto concerne l'Ungheria, la media dei valori del peso dei mille semi in ambiente non irrigato, equivalenti a 49,5 g, risultano superiori al valore medio in ambiente irriguo (42,6 g)

- Per quanto concerne TW (Tabella 4.1.3.):

**Tabella 4.1.3.** Differenze fenotipiche tra accessioni per il peso ettolitrico (TW) nei diversi ambienti nelle prove sperimentali del 2012. Per ciascun ambiente sono stati riportati i valori medi, minimi, e massimi, l'errore, il coefficiente di variazione, la significatività tra accessioni, la significatività dell'interazione Genotipo x Ambiente (GxE), ed il valore medio del genotipo di controllo Meridiano (DPO05) nei diversi ambienti.

TW (kg hl <sup>-1</sup> )	UNI_R 2012	SAB_R 2012	ARI_R 2012	SAB_I 2012	ARI_I 2012
media	77,0	79,3	79,4	79,1	74,8
min	83,0	71,6	74,2	73,6	76,5
max	91,1	83,6	84,0	82,2	83,7
CV (%)	6,8	1,4	1,2	1,7	6,0
h <sup>2</sup> (%)	11,1	55,7	38,6	12,6	7,60
tra accessioni	†	**	**	*	†
GxE	**				
media DPO05	76,0	78,9	78,7	78,9	78,4

- considerando i dati di UNI\_R, TW mostra una bassa significatività tra accessioni, con valori minimi di 83,0 kg hl<sup>-1</sup> e valori massimi di 91,1 kg hl<sup>-1</sup> ;
- relativamente a SAB\_R, TW presenta differenze altamente significative tra accessioni, con valori compresi tra 71,6 e 83,6 kg hl<sup>-1</sup>;
- per quanto riguarda ARI\_R, sono stati rilevate differenze altamente significative tra accessioni per il TW con valori minimi di 74,2 kg hl<sup>-1</sup> e massimi di 84,0 kg hl<sup>-1</sup>;
- per quanto concerne SAB\_I, le differenze osservate del TW risultano significative tra accessioni, con valori minimi di 73,6 kg hl<sup>-1</sup> e valori massimi di 82,2 kg hl<sup>-1</sup>;
- osservando i dati relativi ad ARI\_I, TW presenta una bassa significatività tra accessioni, con valori compresi tra 76,5 kg hl<sup>-1</sup> e 83,7 kg hl<sup>-1</sup>;
- l'interazione Genotipo x Ambiente (GxE) è risultata altamente significativa;
- i valori medi del genotipo di controllo Meridiano (DPO05) variano da un minimo di 76,0 kg hl<sup>-1</sup> ad un massimo di 78,9 kg hl<sup>-1</sup>, secondo l'andamento dei diversi ambienti.

Il carattere TW negli ambienti non irrigui mostra valori medi alquanto simili con 77,0 kg hl<sup>-1</sup> per UNI\_R, 79,3 kg hl<sup>-1</sup> a SAB\_R e 79,4 kg hl<sup>-1</sup>; per quanto riguarda ARI\_R; in condizioni irrigue, i valori medi di SAB\_I con 79,1 kg hl<sup>-1</sup> risultano leggermente superiori a quelli di ARI\_I, con 74,8 kg hl<sup>-1</sup>. Per quanto concerne la Turchia, i valori medi del TW in condizioni irrigate (79,3 kg hl<sup>-1</sup>) sono risultati pressoché equivalenti a quelli in condizioni non irrigue (79,1 kg hl<sup>-1</sup>). Per quanto riguarda l'Ungheria, la media dei valori del peso ettolitrico in

ambiente non irrigato, corrispondente a 79,4 kg hl<sup>-1</sup>, risulta superiore al valore medio in ambiente irriguo (74,8 kg hl<sup>-1</sup>).

- Considerando KM (Tabella 4.1.4.):

**Tabella 4.1.4.** Differenze fenotipiche tra accessioni per l'umidità della granella (KM) nei diversi ambienti nelle prove sperimentali del 2012. Per ciascun ambiente sono stati riportati i valori medi, minimi, e massimi, l'errore, il coefficiente di variazione, la significatività tra accessioni, la significatività dell'interazione Genotipo x Ambiente (GxE), ed il valore medio del genotipo di controllo Meridiano (DP005) nei diversi ambienti.

<b>KM (%)</b>	<b>UNI_R 2012</b>	<b>SAB_R 2012</b>	<b>ARI_R<sup>(1)</sup> 2012</b>	<b>SAB_I 2012</b>	<b>ARI_I<sup>(1)</sup> 2012</b>
media	9,21	9,06	13,3	8,51	13,3
min	7,80	7,91	12,0	7,99	12,4
max	10,4	10,9	14,3	9,30	14,0
CV (%)	4,5	3,2	-	1,7	-
h2 (%)	47,7	42,4	-	52,5	-
tra accessioni	**	†	n.s.	**	n.s.
GxE	**				
media DP005	9,4	9,4	13,4	8,5	13,2

(1) la valutazione di questo carattere in questo ambiente è stata fatta solo su 20 genotipi scelti nel panel, per cui si riportano solamente i valori medi, massimo e minimo ed il valore di Meridiano DP005.

- i dati relativi a UNI\_R per il KM mostrano una elevata significatività tra accessioni, con valori compresi tra 7,80% e 10,4%;
- per quanto riguarda SAB\_R, KM presenta una bassa significatività tra accessioni, con valori minimi del 7,91% e valori massimi di 10,9%;
- per quanto concerne ARI\_R, non è stata riscontrata alcuna significatività tra accessioni per il KM, con valori compresi tra il 12,0 ed il 14,3%;
- relativamente a SAB\_I, KM mostra differenze altamente significative tra accessioni, con valori minimi di 8,00% e valori massimi di 9,30%;
- osservando i dati relativi ad ARI\_I, il carattere umidità della granella (KM) non presenta alcuna significatività tra accessioni, con un intervallo di variazione dal 12,4 al 14,0%.
- l'interazione Genotipo x Ambiente (GxE) è risultata altamente significativa;
- i valori medi del genotipo di controllo Meridiano (DP005) variano da un minimo di 9,4% ad un massimo di 13,4%, secondo l'andamento dei diversi ambienti.

Il carattere KM negli ambienti non irrigui mostra valori medi alquanto simili per UNI\_R (9,21%) e per SAB\_R (9,06%), mentre per quanto riguarda ARI\_R la media risulta maggiore con il 13,3%; in condizioni irrigue, i valori medi di SAB\_I, corrispondenti a 8,51%, risultano inferiori a quelli di ARI\_I, con il 14,3%. Per quanto concerne la Turchia, i valori medi di KM in condizioni non irrigate, con 8,06%, sono risultati di poco inferiori a quelli in condizioni irrigate, corrispondenti a 8,51%. Per quanto riguarda l'Ungheria, la media di KM in condizioni non irrigate (13,3%), risulta del tutto simile alla media in condizioni irrigue (13,3%).

- Osservando i dati relativi a FTpsm (Tabella 4.1.5.):

**Tabella 4.1.5.** Differenze fenotipiche tra accessioni per il numero di culmi fertili al m<sup>2</sup> a maturità (FTpsm) nei diversi ambienti nelle prove sperimentali del 2012. Per ciascun ambiente sono stati riportati i valori medi, minimi, e massimi, l'errore, il coefficiente di variazione, la significatività tra accessioni, la significatività dell'interazione Genotipo x Ambiente (GxE), ed il valore medio del genotipo di controllo Meridiano (DP005) nei diversi ambienti.

<b>FTpsm (nr. M<sup>-2</sup>)</b>	<b>UNI_R 2012</b>	<b>SAB_R 2012</b>	<b>ARI_R<sup>(1)</sup> 2012</b>	<b>SAB_I 2012</b>	<b>ARI_I<sup>(1)</sup> 2012</b>
media	166	363	269	474	477
min	150	135	110	160	214
max	245	600	530	600	1.096
CV (%)	16,1	18,3	-	9,8	-
h <sup>2</sup> (%)	33,3	50,8	-	31,3	-
tra accessioni	**	**	*	*	n.s
GxE	**				
media DP005	180	280	253	476	511

(1) la valutazione di questo carattere in questo ambiente è stata fatta solo su 20 genotipi scelti nel panel, per cui si riportano solamente i valori medi, massimo e minimo ed il valore di Meridiano DP005.

- quanto riguarda UNI\_R, FTpsm mostra una elevata significatività tra accessioni, con valori compresi tra 150 e 245 culmi m<sup>-2</sup>;
- per quanto concerne SAB\_R, FTpsm presenta differenze altamente significative tra accessioni, con valori minimi di 135 culmi m<sup>-2</sup> e valori massimi di 600 culmi m<sup>-2</sup>;
- relativamente ai dati di ARI\_R, le differenze per FTpsm risultano significative tra accessioni, con un intervallo di variazione compreso tra 110 e 530 culmi m<sup>-2</sup>;
- riguardo a SAB\_I, FTpsm mostra differenze significative tra accessioni, con valori minimi di 160 culmi m<sup>-2</sup> e valori massimi di 600 culmi m<sup>-2</sup>;

- osservando i dati relativi ad ARI\_I, FTpsm non presenta alcuna significatività tra accessioni, con valori compresi tra 214 a 1.096 culmi m<sup>-2</sup>;
- l'interazione Genotipo x Ambiente (GxE) è risultata altamente significativa;
- i valori medi del genotipo di controllo Meridiano (DPO05) variano da un minimo di 180 culmi m<sup>-2</sup> ad un massimo di 511 culmi m<sup>-2</sup>, secondo l'andamento dei diversi ambienti.

I valori medi di FTpsm negli ambienti non irrigui mostrano un decremento andando da SAB\_R, con 363 culmi m<sup>-2</sup> ad ARI\_R ,con 269 culmi m<sup>-2</sup>, ad UNI\_R con 166 culmi m<sup>-2</sup>. In condizioni irrigue, i valori medi di SAB\_I (473 culmi m<sup>-2</sup>) risultano di poco inferiori a quelli di ARI\_I, (477 culmi m<sup>-2</sup>). Osservando i dati relativi alla Turchia, i valori medi del FTpsm in condizioni irrigue, ossia 473 culmi m<sup>-2</sup> , risultano maggiori di quelli in condizioni irrigate, corrispondenti a 363 culmi m<sup>-2</sup>. Per quanto riguarda l'Ungheria, la media dei valori del numero di culmi fertili per metro quadro in ambiente irrigato (477 culmi m<sup>-2</sup>) risulta maggiore a quella in condizioni non irrigue (269 culmi m<sup>-2</sup>).

#### **4.2. Altezza della pianta e lunghezza del peduncolo**

L'analisi ANOVA dei caratteri altezza della pianta (PH), a livello del colletto della foglia bandiera (FLC), della base della spiga (BoE), dell'estremità della spiga (ToE), e lunghezza del peduncolo (PdL) ha evidenziato differenze fenotipiche significative tra accessioni per gran parte dei suddetti caratteri nei diversi ambienti.

- Più in dettaglio, considerando FLC (Tabella 4.2.1.):

**Tabella 4.2.1.** Differenze fenotipiche tra accessioni per l'altezza della pianta a livello del colletto della foglia bandiera (FLC) nei diversi ambienti nelle prove sperimentali del 2012. Per ciascun ambiente sono stati riportati i valori medi, minimi, e massimi, l'errore, il coefficiente di variazione, la significatività tra accessioni, la significatività dell'interazione Genotipo x Ambiente (GxE), ed il valore medio del genotipo di controllo Meridiano (DP005) nei diversi ambienti.

FLC (cm)	UNI_R 2012	SAB_R 2012	ARI_R <sup>(1)</sup> 2012	SAB_I 2012	ARI_R <sup>(1)</sup> 2012
media	56,6	38,6	27,5	46,6	35,7
min	45,0	20,9	19,0	38,0	21,0
max	83,1	67,4	36,0	61,4	47,0
CV (%)	7,3	11,8	-	9,3	-
h <sup>2</sup> (%)	80,9	67,9	-	44,7	-
tra accessioni	**	**	†	**	n.s
GxE	**				
media DP005	56,9	45,5	28,1	38,2	35,6

(1) la valutazione di questo carattere in questo ambiente è stata fatta solo su 20 genotipi scelti nel panel, per cui si riportano solamente i valori medi, massimo e minimo ed il valore di Meridiano DP005.

- per quanto riguarda UNI\_R, FLC mostra differenze altamente significative tra accessioni, con valori minimi di 45,0 cm e valori massimi di 83,1 cm;
- relativamente a SAB\_R, FLC una significatività elevata tra accessioni, con un intervallo di variazione tra 20,9 e 67,4 cm;
- riguardo ad ARI\_R, è stata rilevata una bassa significatività tra accessioni per il FLC, con valori compresi tra 19,0 e 36,0 cm;
- per quanto concerne SAB\_I, possiamo osservare differenze altamente significative tra accessioni per il FLC, con valori minimi di 38,0 cm e valori massimi di 61,4 cm;
- per quanto riguarda ARI\_I, FLC non presenta alcuna significatività tra accessioni, con valori compresi tra 21,0 e 47,0 cm;
- l'interazione Genotipo x Ambiente (GxE) è risultata altamente significativa;
- i valori medi del genotipo di controllo Meridiano (DP005) variano da un minimo di 28,1 cm ad un massimo di 56,9 cm, secondo l'andamento dei diversi ambienti.

I valori medi di FLC negli ambienti non irrigui mostrano un andamento decrescente andando da UNI\_R, con 56,6 cm, a SAB\_R con 38,6 cm ad ARI\_R con, 27,5 cm. In condizioni irrigue, i valori medi di SAB\_I con 46,6 cm, risultano superiori a quelli di ARI\_I, corrispondenti a 35,7 cm. I dati relativi alla Turchia, mostrano che i valori medi di FLC in condizioni non irrigue (38,6 cm), risultano inferiori a quelli osservati in condizioni irrigate

(46,6 cm). In Ungheria, le medie dei valori di FLC in ambiente non irrigato, 27,5 cm, risultano inferiori a quelli ottenuti in condizioni irrigue, ossia 37,5 cm.

- Per quanto riguarda il carattere BoE (Tabella 4.2.2.);

**Tabella 4.2.2.** Differenze fenotipiche tra accessioni per l'altezza della pianta a livello della base della spiga (BoE) nei diversi ambienti nelle prove sperimentali del 2012. Per ciascun ambiente sono stati riportati i valori medi, minimi, e massimi, l'errore, il coefficiente di variazione, la significatività tra accessioni, la significatività dell'interazione Genotipo x Ambiente (GxE), ed il valore medio del genotipo di controllo Meridiano (DP005) nei diversi ambienti

<b>BoE (cm)</b>	<b>UNI_R 2012</b>	<b>SAB_R 2012</b>	<b>ARI_R<sup>(1)</sup> 2012</b>	<b>SAB_I 2012</b>	<b>ARI_I<sup>(1)</sup> 2012</b>
media	76,4	50,9	38,6	66,0	53,9
min	60,9	37,0	27,0	54,0	36,0
max	114	90,9	52,0	89,5	69,0
CV (%)	7,0	8,7	-	6,7	-
h <sup>2</sup> (%)	85,2	79,5	-	70,9	-
tra accessioni	**	**	*	**	n.s
GxE	**				
media DP005	76,0	64,3	40,6	51,3	54,2

(1) la valutazione di questo carattere in questo ambiente è stata fatta solo su 20 genotipi scelti nel panel, per cui si riportano solamente i valori medi, massimo e minimo ed il valore di Meridiano DP005.

- osservando i dati inerenti ad UNI\_R, possiamo riscontrare differenze altamente significative tra accessioni per il BoE, con valori minimi di 60,9 cm e valori massimi di 114cm;
- per quanto concerne SAB\_R, BoE presenta una elevata significatività , con valori compresi tra 37,0 e 90,9 cm;
- i dati relativi ad ARI\_R, mostrano una bassa significatività tra accessioni per BoE, con un intervallo di variazione tra 27,0 e 52,0 cm;
- riguardo a SAB\_I, i dati rivelano una elevata significatività tra accessioni per BoE, con valori minimi di 54,0 cm e valori massimi di 89,5 cm;
- relativamente ad ARI\_I, BoE non mostra alcuna significatività tra accessioni, con valori compresi tra 36,0 e 69,0 cm;
- l'interazione Genotipo x Ambiente (GxE) è risultata altamente significativa;
- i valori medi del genotipo di controllo Meridiano (DP005) variano da un minimo di 40,6 cm ad un massimo di 76,0 cm, secondo l'andamento dei diversi ambienti.

Le medie di BoE negli ambienti non irrigui mostrano valori decrescenti andando da UNI\_R (76,4 cm) a SAB\_R (50,9 cm) ad ARI\_R (38,6 cm). In condizioni irrigue, i valori medi di SAB\_I, equivalenti a 66,0 cm risultano superiori a quelli di ARI\_I, corrispondenti a 53,9 cm. Considerando i dati della Turchia, i valori medi di BoE in condizioni non irrigue (50,9 cm) risultano inferiori di quelli in condizioni irrigate (66,0 cm). I dati relativi all'Ungheria hanno messo in evidenza che la media di BoE in ambiente non irrigato (38,6 cm) risulta inferiore a quella osservata in condizioni irrigue (53,9 cm).

- Per quanto concerne il carattere ToE (Tabella 4.2.3.);

**Tabella 4.2.3.** Differenze fenotipiche tra accessioni per l'altezza della pianta a livello dell'estremità della spiga (ToE) nei diversi ambienti nelle prove sperimentali del 2012. Per ciascun ambiente sono stati riportati i valori medi, minimi, e massimi, l'errore, il coefficiente di variazione, la significatività tra accessioni, la significatività dell'interazione Genotipo x Ambiente (GxE), ed il valore medio del genotipo di controllo Meridiano (DP005) nei diversi ambienti.

ToE (cm)	UNI_R 2012	SAB_R 2012	ARI_R <sup>(1)</sup> 2012	SAB_I 2012	ARI_I <sup>(1)</sup> 2012
media	83,3	56,1	42,4	73,3	59,5
min	66,7	46,6	30,0	61,5	39,0
max	123	97,5	57,0	97,0	75,0
CV (%)	0,0	6,4	-	6,0	-
h2 (%)	85,1	85,7	-	71,6	-
tra accessioni	**	**	†	**	n.s
GxE	**				
media DP005	83,3	72,2	44,1	56,2	61,3

(1) la valutazione di questo carattere in questo ambiente è stata fatta solo su 20 genotipi scelti nel panel, per cui si riportano solamente i valori medi, massimo e minimo ed il valore di Meridiano DP005.

- i dati relativi ad UNI\_R, mostrano differenze altamente significative tra accessioni per ToE, con valori compresi tra i 66,7 e 123 cm;
- per quanto riguarda SAB\_R, ToE presenta una elevata significatività, con valori minimi di 46,6 e valori massimi di 97,5 cm;
- osservando i dati ARI\_R, è stata rilevata una bassa significatività tra accessioni per ToE, con un intervallo di variazione tra i 30,0 e 57,0 cm;
- relativamente a SAB\_I, ToE mostra valori altamente significativi tra accessioni, con valori minimi di 61,5 cm e valori massimi di 97,0 cm;
- riguardo ad ARI\_I, ToE non presenta alcuna significatività tra accessioni, con valori che variano da 39,0 a 75,0 cm;



- l'interazione Genotipo x Ambiente (GxE) è risultata altamente significativa;
- i valori medi del genotipo di controllo Meridiano (DPO05) variano da un minimo di 44,1 cm ad un massimo di 83,3 cm, secondo l'andamento dei diversi ambienti.

Il dato medio dei valori dell'altezza della pianta a livello dell'estremità della spiga (ToE) negli ambienti non irrigui presenta un andamento decrescente andando da UNI\_R (83,3 cm), a SAB\_R (56,1 cm) ad ARI\_R (42,4 cm). In condizioni irrigue, i valori medi di SAB\_I con 73,3 cm risultano superiori a quelli di ARI\_I, corrispondenti a 59,5 cm. Dall'osservazione dei dati medi relativi alla Turchia, risulta che i valori medi di ToE in condizioni non irrigue, ovvero 56,1 cm, risultano inferiori a quelli in condizioni irrigate, equivalenti a 73,3 cm. Per quanto riguarda l'Ungheria, l'analisi delle medie di ToE ha evidenziato come i valori in ambiente non irrigato (42,4 cm), risultino inferiori a quelli osservati in condizioni irrigue (59,5 cm).

- Considerando il carattere PdL (Tabella 4.2.4.):

**Tabella 4.2.4.** Differenze fenotipiche tra accessioni per la lunghezza del peduncolo (PedL) nei diversi ambienti nelle prove sperimentali del 2012. Per ciascun ambiente sono stati riportati i valori medi, minimi, e massimi, l'errore, il coefficiente di variazione, la significatività tra accessioni, la significatività dell'interazione Genotipo x Ambiente (GxE), ed il valore medio del genotipo di controllo Meridiano (DPO05) nei diversi ambienti.

<b>PdL (cm)</b>	<b>UNI_R 2012</b>	<b>SAB_R 2012</b>	<b>ARI_R<sup>(1)</sup> 2012</b>	<b>SAB_I 2012</b>	<b>ARI_I<sup>(1)</sup> 2012</b>
media	19,8	12,3	3,80	19,4	5,60
min	13,1	5,40	2,00	10,5	3,00
max	33,7	23,5	5,00	34,6	12,0
CV (%)	11,9	23,7	-	21,2	-
h2 (%)	83,8	71,3	-	43,4	-
tra accessioni	**	**	n.s.	**	n.s.
GxE	**				
media DPO05	19,2	18,7	3,67	13,1	5,40

(1) la valutazione di questo carattere in questo ambiente è stata fatta solo su 20 genotipi scelti nel panel, per cui si riportano solamente i valori medi, massimo e minimo ed il valore di Meridiano DPO05.

- per quanto riguarda UNI\_R, PdL presenta differenze altamente significative tra accessioni con valori compresi tra 13,1 di 33,7 cm;
- i dati osservati per SAB\_R, mostrano che PdL ha una elevata significatività tra accessioni, con valori che variano da 5,40 e 23,5 cm;

- relativamente ad ARI\_R, non è stata rilevata alcuna significatività tra accessioni per PdL, con valori minimi di 2,00 e valori massimi di 5,00 cm;
- per quanto concerne SAB\_I, PdL mostra differenze altamente significative tra accessioni, con un intervallo di variazione tra 10,5 e 34,6 cm;
- i dati relativi ad ARI\_I, non hanno evidenziato alcuna significatività tra accessioni per PdL, con valori massimi di 3,00 cm e valori minimi di 12,0 cm;
- l'interazione Genotipo x Ambiente (GxE) è risultata altamente significativa;
- i valori medi del genotipo di controllo Meridiano (DP005) variano da un minimo di 13,1 cm ad un massimo di 19,2 cm, secondo l'andamento dei diversi ambienti.

I dati medi osservati per PdL negli ambienti non irrigui mostrano valori decrescenti andando da UNI\_R con 19,8 cm, a SAB\_R con 12,3 cm ad ARI\_R con 3,80 cm. In condizioni irrigue, i valori medi di SAB\_I (19,4 cm) risultano superiori a quelli di ARI\_I, (5,60 cm). Per quanto riguarda la Turchia, i valori medi di PdL in condizioni irrigue, ovvero 19,1 cm, risultano superiori a quelli stimati in condizioni non irrigate, equivalenti a 12,3 cm. Per quanto concerne l'Ungheria, le medie dei valori di PdL in ambiente non irrigato (3,80 cm), risultano inferiori a quelli osservati in condizioni irrigue (5,60 cm).

#### **4.3. Data di spigatura, di fioritura e di maturità**

Dall'ANOVA dei dati fenotipici rilevati per la data di spigatura (HD), la data di fioritura (FT) e la data di maturità (MD), valutate come somma termica, o cumulo di calore al quale la coltura è complessivamente esposta durante il ciclo, espressa in GDD ("Growing Degree Days"), è stato possibile osservare :

- Considerando GDD-HD (Tabella 4.3.1.):

**Tabella 4.3.1.** Differenze fenotipiche tra accessioni per la data di spigatura (HD) in GDD nei diversi ambienti nelle prove sperimentali del 2012. Per ciascun ambiente sono stati riportati i valori medi, minimi, e massimi, l'errore, il coefficiente di variazione, la significatività tra accessioni, la significatività dell'interazione Genotipo x Ambiente (GxE), ed il valore medio del genotipo di controllo Meridiano (DP005) nei diversi ambienti.

<b>GDD-HD (°C)</b>	<b>UNI_R 2012</b>	<b>SAB_R 2012</b>	<b>ARI_R 2012</b>	<b>SAB_I 2012</b>	<b>ARI_I 2012</b>
media	1.142	1.515	850	1.233	834
min	1.062	1.421	792	1.182	773
max	1.220	1.649	948	1.301	945
CV (%)	1,6	2,3	1,4	1,3	1,6
h2 (%)	90,2	80,6	90,5	75,1	90,9
tra accessioni	**	**	**	**	**
GxE	**				
media DP005	1133	1232	843	1513	815

- i dati osservati per UNI\_R, presentano differenze altamente significative tra accessioni per GDD-HD), con valori minimi di 1.062 °C e valori massimi di 1.220 °C
- relativamente a SAB\_R, GDD-HD mostra una elevata significatività tra accessioni, con valori compresi tra 1.421 e 1.649 °C;
- per quanto riguarda ARI\_R, le differenze tra accessioni per GDD-HD risultano altamente significatività, con valori minimi di 792 e massimi di 948 °C;
- i valori relativi a SAB\_I, hanno evidenziato una significatività elevata tra accessioni, GDD-HD, con un intervallo di variazione da 1.182 a 1.301 °C;
- riguardo ad ARI\_I, GDD-HD risulta altamente significativa tra accessioni, con valori compresi tra 773 e 945 °C;
- l'interazione Genotipo x Ambiente (GxE) è risultata altamente significativa;
- i valori medi del genotipo di controllo Meridiano (DP005) variano da un minimo di 815°C ad un massimo di 1513 °C, secondo l'andamento dei diversi ambienti.

Le medie di GDD\_HD negli ambienti non irrigui presentato valori maggiori per SAB\_R (1.515 °C), seguiti da UNI\_R (1.142 °C) ed infine ARI\_R (850 °C). In condizioni irrigue, con un valore di 1.233 °C la media di SAB\_I risulta superiore a quella di ARI\_I, che equivale a 834 °C. Considerando i dati relativi alla Turchia, i valori medi di GDD\_HD in condizioni irrigue (1.515 °C) sono superiori a quelli stimati in condizioni non irrigate (1.233 °C). La media osservata per GDD-HD in Ungheria in ambiente non irrigato (850 °C) è risultata di poco superiore a quella stimata in condizioni irrigue (834 °C).

- Osservando i dati relativi a GDD-FT (Tabella 4.3.2.):

**Tabella 4.3.2.** Differenze fenotipiche tra accessioni per la data di fioritura (FT) in GDD nei diversi ambienti nelle prove sperimentali del 2012. Per ciascun ambiente sono stati riportati i valori medi, minimi, e massimi, l'errore, il coefficiente di variazione, la significatività tra accessioni, la significatività dell'interazione Genotipo x Ambiente (GxE), ed il valore medio del genotipo di controllo Meridiano (DP005) nei diversi ambienti.

GDD-FT (°C)	UNI_R 2012	SAB_R <sup>(1)</sup> 2012	ARI_R <sup>(2)</sup> 2012	SAB_I <sup>(1)</sup> 2012	ARI_I <sup>(2)</sup> 2012
media	1.260	1.481	-	1.296	-
min	1.170	1.264	-	1.264	-
max	1.333	1.686	-	1.390	-
CV (%)	1,9	-	-	-	-
h <sup>2</sup> (%)	79,0	-	-	-	-
tra accessioni	**	*	-	n.s	-
GxE	**				
media DP005	1255	1617	-	1295	-

(1) la valutazione di questo carattere in questo ambiente è stata fatta solo su 20 genotipi scelti nel panel, per cui si riportano solamente i valori medi, massimo e minimo ed il valore di Meridiano DP005.

(2) in questo ambiente il carattere non è stato misurato.

- per quanto riguarda UNI\_R, GDD-FT mostra una elevata significatività tra accessioni, con valori compresi tra 1.170 e 1.333 °C;
- per quanto concerne SAB\_R, GDD-FT presenta differenze significative tra accessioni, con valori minimi di 1.264 °C e valori massimi di 1.686 °C;
- analizzando i dati relativi a SAB\_I, possiamo constatare che GDD-FT non presenta alcuna significatività tra accessioni, con valori che variano da 1.264 a 1.390 °C;
- negli ambienti ARI\_R ed ARI\_I non sono stati eseguiti rilievi fenotipici per il carattere in esame;
- l'interazione Genotipo x Ambiente (GxE) è risultata altamente significativa;
- i valori medi del genotipo di controllo Meridiano (DP005) variano da un minimo di 1255 °C ad un massimo di 1513°C, secondo l'andamento dei diversi ambienti.ono variano da un minimo di 843 ad un massimo di 1513, secondo l'andamento dei diversi ambienti.

I valori medi di GDD-FT negli ambienti non irrigui sono superiori per SAB\_R (1.481 °C) rispetto ad UNI\_R (1.260 °C); quest'ultimi risultano pressoché equivalenti a quelli osservati per SAB\_I in condizioni irrigate (1.296 °C).

Per quanto riguarda la Turchia, la media dei valori di GDD-FT in ambiente irrigato (1.296 °C) mostra valori maggiori a quelli stimati in condizioni non irrigue (1481 °C).

- Relativamente a GDD-MD (Tabella 4.3.3.);

**Tabella 4.3.3.** Differenze fenotipiche tra accessioni per la data di maturità MD in GDD per L'Italia nelle prove sperimentali del 2012. Sono stati riportati i valori medi, minimi, e massimi, l'errore, il coefficiente di variazione, la significatività tra accessioni ed il valore medio del genotipo di controllo Meridiano (DP005).

<b>GDD-MD (°C)</b>	<b>UNI_R 2012</b>	<b>SAB_R<sup>(1)</sup> 2012</b>	<b>ARI_R<sup>(1)</sup> 2012</b>	<b>SAB_I<sup>(1)</sup> 2012</b>	<b>ARI_I<sup>(1)</sup> 2012</b>
media	2.027	-	-	-	-
min	1.938	-	-	-	-
max	2.144	-	-	-	-
CV (%)	2,5	-	-	-	-
h <sup>2</sup> (%)	42,4	-	-	-	-
tra accessioni	**	-	-	-	-
GxE	-				
media DP005	2047	-	--	-	-

(1) in questo ambiente il carattere non è stato misurato.

- sono presenti unicamente i dati relativi ad UNI\_R. Possiamo osservare differenze altamente significative tra accessioni, con un valore medio di 1.938 °C, compreso in un intervallo di variazione da 1.938 a 2.144 °C.

La media stimata per il genotipo di controllo Meridiano (DP005) è pari a 2027 °C

#### 4.4. Vigore precoce e senescenza

- Per quanto concerne EV (Tabella 4.4.1.);

**Tabella 4.4.1.** Differenze fenotipiche tra accessioni per il vigore precoce (EV) nei diversi ambienti nelle prove sperimentali del 2012. Per ciascun ambiente sono stati riportati i valori medi, minimi, e massimi, l'errore, il coefficiente di variazione, la significatività tra accessioni, la significatività dell'interazione Genotipo x Ambiente (GxE), ed il valore medio del genotipo di controllo Meridiano (DP005) nei diversi ambienti.

EV	UNI_R 2012	SAB_R <sup>(1)</sup> 2012	ARI_R 2012	SAB_I 2012	ARI_I 2012
media	2,85	-	3,96	3,57	3,82
min	1,00	-	3,00	0,00	2,00
max	5,00	-	5,00	5,00	5,00
CV (%)	22,3	-	8,2	16,1	12,0
h <sup>2</sup> (%)	22,2	-	31,5	22,2	14,5
tra accessioni	**	-	**	*	†
GxE	**				
media DP005	3,27	-	4,11	3,80	4,00

(1) in questo ambiente il carattere non è stato misurato.

- i dati relativi ad UNI\_R, mostrano una significatività elevata tra accessioni per EV, con valori minimi di 1,00 e valori massimi di 5,00;
- per quanto riguarda SAB\_R, EV presenta differenze significative tra accessioni, con valori compresi tra 1,00 e 5,00;
- esaminando i dati relativi a ARI\_R, possiamo notare che EV presenta differenze significative tra accessioni, con valori che variano da 3,00 a 5,00;
- in relazione a SAB\_I, EV mostra differenze significative tra accessioni, con un intervallo di variazione compreso tra 0,00 e 5,00;
- in rapporto ad ARI\_I, è stata riscontrata una bassa significatività tra accessioni per EV, con valori minimi di 2,00 e massimi di 5,00;
- l'interazione Genotipo x Ambiente (GxE) è risultata altamente significativa;
- i valori medi del genotipo di controllo Meridiano (DP005) variano da un minimo di 3,27 ad un massimo di 4,11 secondo l'andamento dei diversi ambienti.

I valori medi del carattere EV negli ambienti non irrigui mostrano un andamento decrescente andando da ARI\_R (3,96) a SAB\_R (3,57) ad UNI\_R (2,85). I dati medi relativi agli ambienti irrigati risultano leggermente superiori per ARI\_I, con 3,82, rispetto a quelli

osservati per SAB\_I (3,57). Per quanto riguarda la Turchia, la media dei valori di EV in ambiente irrigato e non irrigato è del tutto identica (3,57). In Ungheria, la media calcolata in condizioni non irrigue (3,96) è leggermente maggiore a quella stimata in condizioni irrigue (3,82).

- Relativamente al carattere senescenza ( SEN) (Tabella 4.4.2.);

**Tabella 4.4.2** Differenze fenotipiche tra accessioni per il la senescenza ( SEN) nei diversi ambienti nelle prove sperimentali del 2012. Per ciascun ambiente sono stati riportati i valori medi, minimi, e massimi, l'errore, il coefficiente di variazione, la significatività tra accessioni, la significatività dell'interazione Genotipo x Ambiente (GxE), ed il valore medio del genotipo di controllo Meridiano (DP005) nei diversi ambienti

<b>SEN (unità)</b>	<b>UNI_R 2012</b>	<b>SAB_R 2012</b>	<b>ARI_R<sup>(1)</sup> 2012</b>	<b>SAB_I 2012</b>	<b>ARI_I<sup>(1)</sup> 2012</b>
media	24,6	53,6	7,23	58,7	27,4
min	4,70	41,6	2,40	47,4	10,0
max	46,9	67,5	17,0	67,5	46,3
CV (%)	21,3	5,7	-	4,4	-
h <sup>2</sup> (%)	42,3	41,7	-	46,8	-
tra accessioni	**	n.s.	†	**	n.s
GxE	**				
media DP005	27,1	50,5	8,70	60,9	25,3

1) la valutazione di questo carattere in questo ambiente è stata fatta solo su 20 genotipi scelti nel panel, per cui si riportano solamente i valori medi, massimo e minimo ed il valore di Meridiano DP005.

- i dati osservati per UNI\_R, mostrano differenze altamente significative tra accessioni per SEN, con valori compresi tra 4,70 e 46,9 unità;
- in rapporto a SAB\_R, non è stata rilevata alcuna significatività tra accessioni per SEN, con valori minimi di 41,6 unità e valori massimi di 67,5 unità;
- per quanto riguarda ARI\_R, SEN presenta una bassa significatività tra accessioni, con un intervallo di variazione da 2,40 a 17,0 unità;
- per quanto concerne SAB\_I, SEN mostra differenze altamente significative tra accessioni, con valori che variano da 47,4 a 67,5 unità;
- i dati relativi ad ARI\_I, SEN non presenta alcuna significatività tra accessioni tra accessioni, con valori minimi di 10,0 unità e massimi di 46,3 unità;
- l'interazione Genotipo x Ambiente (GxE) è risultata altamente significativa;
- i valori medi del genotipo di controllo Meridiano (DP005) variano da un minimo di 8,70 unità e 60,9 unità, secondo l'andamento dei diversi ambienti.

Le medie di SEN negli ambienti non irrigui presentano valori superiori per SAB\_R (53,6 unità), seguiti da UNI\_R (24,6 unità) con un divario significativo rispetto ad ARI\_R (7,23 unità) In condizioni irrigate, SEN mostra valori maggiori per SAB\_I (58,7 unità) rispetto ad ARI\_I. In Turchia, la media stimata in condizioni irrigate, equivalente a 58,7 unità, risulta superiore a quella in condizioni non irrigue, ossia 53,6 unità. Per quanto riguarda l'Ungheria, il dato medio di SEN relativo alle condizioni irrigue (27,4 unità) è notevolmente maggiore di quello rilevato in condizioni non irrigate (7,23 unità).

#### **4.5. Indice di verde e biomassa verde**

L'ANOVA dei dati fenotipici rilevati per il carattere indice di verde (SPAD) e per il carattere biomassa verde (NDVI) in diversi stadi fenologici ha permesso di evidenziare:

- Considerando SPAD B (Tabella 4.5.1.):

**Tabella 4.5.1.** Differenze fenotipiche tra accessioni per lo SPAD allo stadio di botticella (SPAD B) nei diversi ambienti nelle prove sperimentali del 2012. Per ciascun ambiente sono stati riportati i valori medi, minimi, e massimi, l'errore, il coefficiente di variazione, la significatività tra accessioni, la significatività dell'interazione Genotipo x Ambiente (GxE), ed il valore medio del genotipo di controllo Meridiano (DP005) nei diversi ambienti.

<b>SPAD B (unità)</b>	<b>UNI_R 2012</b>	<b>SAB_R<sup>(1)</sup> 2012</b>	<b>ARI_R<sup>(1)</sup> 2012</b>	<b>SAB_I<sup>(1)</sup> 2012</b>	<b>ARI_I<sup>(1)</sup> 2012</b>
media	44,6	47,8	46,6	55,7	48,4
min	32,4	40,6	39,8	50,1	32,2
max	54,6	55,0	51,1	60,2	57,6
CV (%)	12,7	-	-	-	-
h2 (%)	27,9	-	-	-	-
tra accessioni	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
GxE	**				
media DP005	48,4	49,6	49,7	56,8	50,1

(1) la valutazione di questo carattere in questo ambiente è stata fatta solo su 20 genotipi scelti nel panel, per cui si riportano solamente i valori medi, massimo e minimo ed il valore di Meridiano DP005.

- i dati osservati per UNI\_R, presentano differenze altamente significative tra accessioni per SPAD B con valori minimi di 32,4 unità e valori massimi di 54,6 unità;
- relativamente a SAB\_R, SPAD B non mostra alcuna significatività tra accessioni, con valori compresi tra 40,6 e 55,0 unità;



- per quanto riguarda ARI\_R, le differenze tra accessioni per SPAD B non sono risultate significative, con valori minimi di 39,8 unità e massimi di 51,1 unità;
- i valori relativi a SAB\_I, hanno evidenziato differenze non significative tra accessioni per SPAD B, con un intervallo di variazione da 50,1 a 60,2 unità;
- riguardo ad ARI\_I, SPAD B non presenta alcuna significatività tra accessioni, con valori compresi tra 32,2 e 57,6 unità;
- l'interazione Genotipo x Ambiente (GxE) è risultata altamente significativa;
- i valori medi del genotipo di controllo Meridiano (DPO05) variano da un minimo di 48,4 unità ad un massimo di 56,8 unità, secondo l'andamento dei diversi ambienti.

Per quanto concerne il confronto fra medie, SPAD B in condizioni non irrigate mostra valori con andamento crescente a partire da UNI\_R (44,6 unità), seguito da ARI\_R (46,6 unità) e infine SAB\_R (47,8 unità). In condizioni irrigate con un valore di 55,7 unità, la media di SAB\_I risulta superiore a quella di ARI\_I, corrispondente a 48,4 unità. Considerando i dati relativi alla Turchia, i valori medi di SPAD B in condizioni irrigue (55,7 unità) risultano superiori a quelli stimati in condizioni non irrigate (47,8 unità). La media osservata per SPAD B in Ungheria in ambiente non irrigato (46,6 unità) è risultata alquanto simile a quella in condizioni irrigue (48,4 unità).

- Per quanto riguarda SPAD A (Tabella 4.5.2.);

**Tabella 4.5.2.** Differenze fenotipiche tra accessioni per lo SPAD allo stadio di antesi (SPAD A) nei diversi ambienti nelle prove sperimentali del 2012. Per ciascun ambiente sono stati riportati i valori medi, minimi, e massimi, l'errore, il coefficiente di variazione, la significatività tra accessioni, la significatività dell'interazione Genotipo x Ambiente (GxE), ed il valore medio del genotipo di controllo Meridiano (DPO05) nei diversi ambienti.

SPAD A (unità)	UNI_R 2012	SAB_R <sup>(1)</sup> 2012	ARI_R <sup>(1)</sup> 2012	SAB_I <sup>(2)</sup> 2012	ARI_I <sup>(1)</sup> 2012
media	41,6	53,0	50,1	-	51,0
min	27,3	45,2	47,2	-	44,2
max	53,9	60,2	54,4	-	60,7
CV (%)	17,8	-	-	-	-
h <sup>2</sup> (%)	33,3	-	-	-	-
tra accessioni	**	n.s.	n.s.	-	n.s.
GxE	**				
media DPO05	45,0	55,3	51,9	-	51,0

(1) la valutazione di questo carattere in questo ambiente è stata fatta solo su 20 genotipi scelti nel panel, per cui si riportano solamente i valori medi, massimo e minimo ed il valore di Meridiano DPO05.

(2) in questo ambiente il carattere non è stato misurato.

- relativamente ad UNI\_R, SPAD A mostra una elevata significatività tra accessioni con valori che variano da 27,3 a 53,9 unità;
- i dati inerenti a SAB\_R, non presentano alcuna significatività tra accessioni per SPAD A, con valori compresi tra 45,2 e 60,2 unità;
- per quanto concerne ARI\_R, le differenze tra accessioni per SPAD A non sono risultate significative, con valori minimi di 47,2 unità e massimi di 54,4 unità;
- i dati osservati per ARI\_I, non presentano alcuna significatività tra accessioni relativamente a SPAD A, con un intervallo di variazione da 44,2 a 60,7 unità;
- l'interazione Genotipo x Ambiente (GxE) è risultata altamente significativa;
- i valori medi del genotipo di controllo Meridiano (DPO05) variano da un minimo di 45,0 unità ad un massimo di 55,3 unità, secondo l'andamento dei diversi ambienti.

Relativamente ai dati medi stimati, SPAD A in condizioni non irrigate presenta valori maggiori per SAB\_R (53,0 unità), seguiti da ARI\_R (50,1 unità) ed infine UNI\_R (41,6 unità). In condizioni irrigue possiamo osservare solo il dato relativo ad ARI\_I, corrispondente a 51,0 unità, del tutto simile alla media stimata in Ungheria in condizioni non irrigate, ossia 50,1 unità.

- I dati relativi all' NDVI denotano che (Tabella 4.5.5.);

**Tabella 4.5.5.** Differenze fenotipiche tra accessioni per l'NDVI allo stadio di Early Tillering (NDVI ET) nei diversi ambienti nelle prove sperimentali del 2012. Per ciascun ambiente sono stati riportati i valori medi, minimi, e massimi, l'errore, il coefficiente di variazione, la significatività tra accessioni, la significatività dell'interazione Genotipo x Ambiente (GxE), ed il valore medio del genotipo di controllo Meridiano (DPO05) nei diversi ambienti.

NDVI ET (unità)	UNI_R 2012	SAB_R <sup>(2)</sup> 2012	ARI_R <sup>(1)</sup> 2012	SAB_I <sup>(2)</sup> 2012	ARI_I <sup>(1)</sup> 2012
media	0,50	-	0,50	-	0,60
min	0,60	-	0,40	-	0,20
max	0,80	-	0,80	-	0,80
CV (%)	8,1	-	-	-	-
h2 (%)		-	-	-	-
tra accessioni	**	-	n.s.	-	n.s.
GxE	**				
media DPO05	0,65	-	0,54	-	0,61

(1) la valutazione di questo carattere in questo ambiente è stata fatta solo su 20 genotipi scelti nel panel, per cui si riportano solamente i valori medi, massimo e minimo ed il valore di Meridiano DPO05.

(2) in questo ambiente il carattere non è stato misurato.

- per quanto concerne UNI\_R, NDVI ET presenta differenze altamente significative tra accessioni, con valori minimi di 0,60 unità e valori massimi di 0,80 unità;
- per quanto riguarda ARI\_R, NDVI ET non presenta differenze significative tra accessioni, con valori compresi tra 0,40 e 0,80 unità;
- i valori osservati per ARI\_I, non hanno evidenziato alcuna significatività tra accessioni per NDVI ET, con un intervallo di variazione compreso tra 0,20 e 0,80 unità;
- l'interazione Genotipo x Ambiente (GxE) è risultata altamente significativa;
- i valori medi del genotipo di controllo Meridiano (DP005) variano da un minimo di 0,54 unità ad un massimo di 0,65 unità, secondo l'andamento dei diversi ambienti.

Le medie stimate per NDVI ET in condizioni non irrigate mostrano i medesimi valori medi per UNI\_R (0,50 unità) ed ARI\_R (0,50 unità). Per quanto riguarda l'Ungheria, la media stimata in ambiente irrigato (0,60 unità), risulta lievemente maggiore di quella osservata in condizioni non irrigue (0,50 unità).



**CAPITOLO V**  
**DISCUSSIONE**



Nel presente lavoro abbiamo riportato i risultati relativi alle prove effettuate in condizioni controllate e in prove di campo. Tali prove sono state condotte nell'ambito di uno studio complessivamente più ampio ed articolato svolto nell'ambito del progetto "DROPS" (DROught tolerant yielding Plants) per la dissezione di caratteri morfo-fisiologici ed agronomici maggiormente implicati nella resistenza allo stress idrico dei cereali, con l'obiettivo finale di sviluppare metodi di selezione più efficaci e giungere allo sviluppo di cultivar caratterizzate da produttività accettabile anche in condizioni di scarsità d'acqua (Tardieu, 2012).

## **1. VALUTAZIONI RELATIVE ALLA MAPPA GENETICA SVILUPPATA NEL PRESENTE STUDIO**

Negli ultimi decenni, gli approcci molecolari hanno messo a disposizione nuove opportunità per la dissezione ed una più mirata manipolazione delle basi genetiche e funzionali della resa in condizioni di siccità (Forster *et al.*, 2000; Sinclair *et al.*, 2004; Tuberosa & Salvi, 2006; Jenks *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2007; Xu & Crouch, 2008; Ashraf, 2010; Mittler & Blumwald, 2010; Deikman *et al.*, 2012).

Comparando i risultati ottenuti con la mappa genetica sviluppata nell'ambito del mio lavoro di tesi con quanto disponibile in letteratura (Maccaferri *et al.*, 2006, 2011), possiamo osservare che la mappa genetica disponibile ad oggi è caratterizzata da una più elevata densità di marcatori, con una densità media di ca. 2,9 cM/marcatore. Grazie all'utilizzo del set addizionale di ca. 400 marcatori SSR e 900 marcatori DArT è stato possibile migliorare il livello di saturazione delle regioni cromosomiche che erano risultate a bassa densità di marcatori nei lavori precedenti di Maccaferri *et al.* (2006, 2011). La possibilità di utilizzare una mappa *consensus* di riferimento (Maccaferri *et al.*, dati non pubblicati) risulta particolarmente utile in una specie come il frumento duro che non dispone ancora di una mappa fisica (Marone *et al.*, 2012). L'ordinamento dei marcatori secondo tale mappa *consensus* ci ha permesso di mappare e ordinare circa il 75% dei 1.303 marcatori originariamente utilizzati per la genotipizzazione e derivati da 14 mappe bi-parentali (Maccaferri *et al.*, dati non pubblicati) ed uniti attraverso dei marcatori ancoranti. I 333 marcatori attualmente non mappati perché non presenti nella *consensus* verranno aggiunti progressivamente, utilizzando dati disponibili in letteratura ed ulteriori progressi nella mappa medesima, come per esempio marcatori Single Nucleotide Polymorphism (SNPs), che sono già in valutazione nel medesimo materiale vegetale. Inoltre, l'analisi per l'eventuale presenza di marcatori con alleli rari, ovvero con frequenza allelica inferiore al 10%, ha escluso il 13,4% dei marcatori presenti nella mappa; tali marcatori esclusi sono distribuiti uniformemente all'interno del genoma e, seppur privando di un certo numero di marcatori la

mappa medesima, aumentano il livello di informatività della mappa medesima. La buona copertura del genoma, l'accuratezza della stima della posizione e la numerosità dei marcatori informativi destinati ad aumentare ulteriormente di numero con l'integrazione degli SNPs, rende questa mappa un valido strumento per future analisi di mappaggio genico e di QTL in frumento duro.

## **2. VALUTAZIONE DELLA WUE NEL SUBSET DI 100 ACCESSIONI DI FRUMENTO DURO**

La correlazione tra WUE e resa di granella in frumento, specialmente in condizioni di stress idrico, è oggetto di pareri controversi in letteratura (Rebetzke et al., 2002; Richards et al., 2010; Blum, 2005, 2009).

E' noto un esempio di grande successo nella selezione convenzionale di un carattere con elevata WUE, rappresentato dallo sviluppo di linee di frumento in cui le regioni genomiche che conferiscono un'alta WUE (ma sostenuti tassi di assimilazione) sono state introgressate in materiale elite (Rebetzke et al., 2002). Al fine di stimare la WUE è stata utilizzata la discriminazione dell'isotopo  $^{13}$  del carbonio ( $\Delta^{13}C$ ), misurata con uno spettrometro di massa. Questa strategia ha portato al rilascio commerciale di genotipi di frumento con un aumento della resa del 10-15% in ambienti aridi a bassa produttività, e senza penalità nella resa in ambienti a più alto rendimento. Questo vantaggio scompare per valori di piovosità superiori a 500 mm, dimostrando che questo tipo di materiale vegetale è adatto ad ambienti particolare siccitosi.

Di contro, il breeding per la WUE ha talvolta portato a risultati negativi, dando origine a piante piccole e caratterizzate da traspirazione, fotosintesi e resa ridotte (Blum, 2005).

Poiché il tasso di fotosintesi è meno sensibile alle condizioni ambientali rispetto alla conduttanza stomatica, il rapporto tra fotosintesi e conduttanza stomatica è più spesso massimizzato per bassi valori di entrambe le variabili, risultando in un basso accumulo di biomassa. Va tenuto presente che gli agricoltori alla fine del ciclo raccolgono la granella e non la WUE, il che significa che bassi valori della WUE possono essere effettivamente desiderabili solo quando la WUE è negativamente associata con GY, come è ben noto per quei cereali che si distinguono per valori differenti nella loro WUE intrinseca (Blum, 2005, 2006, 2009).

I dati relativi all'esperimento effettuato nell'ambito del mio lavoro in condizioni controllate hanno permesso di evidenziare differenze di WUE altamente significative tra le 100 accessioni del subpanel di frumento duro. In particolare, cinque accessioni hanno mostrato valori significativamente sempre maggiori rispetto alle altre accessioni per WUE in tutte le sei repliche, e cinque accessioni hanno mostrato valori significativamente sempre inferiori rispetto alle altre accessioni per WUE in tutte le sei repliche. La correlazione tra la



resa in granella misurata nei diversi ambienti e la WUE stimata nella piattaforma di fenotipizzazione a Lancaster è risultata significativa e di segno negativo solo considerando l'ambiente ARI\_I, ed al limite della significatività in tutti gli altri casi. E' verosimile ipotizzare che questa limitata connessione tra i risultati di campo e i risultati in piattaforma sia ascrivibile alle condizioni idriche ottimali presenti in piattaforma, che hanno probabilmente limitato la predittività dei valori in campo. Queste osservazioni fanno comunque ipotizzare la possibilità di predire la performance di varietà con alti o bassi valori di WUE in condizioni controllate per poi trasferire queste conoscenze in prove di campo al fine di sfruttare la relazione tra WUE in condizioni di stress e resa di granella (Morison & Gifford, 1984; Araus *et al.*, 2013; Nendel *et al.*, 2013).

I dati relativi alla concentrazione di ABA non hanno mostrato differenze significative tra i materiali in valutazione. Anche in questo caso, la probabile causa può essere la ottimale condizione di regime irriguo per le piante, dato che l'ormone oggetto di valutazione viene prevalentemente prodotto in condizioni di stress (Zhang and Davies, 1990; Quarrie, 1991; Sharp *et al.*, 2004; Seki *et al.*, 2007; Tuberosa, 2012)

### **3. VALUTAZIONI DEL SUBPANEL DI 100 ACCESSIONI E DEL PANEL COMPLETO DI 188 ACCESSIONI IN PROVE DI CAMPO**

Le 188 accessioni di frumento duro utilizzate in questa ricerca sono state scelte a partire da 330 cv elite con l'obiettivo di ottenere un panel di genotipi bilanciato per quanto riguarda le relazioni genetiche (di parentela) e relativamente uniforme per quanto concerne HD e FT (geni principali per il controllo dell fioritura). Tale caratteristica nel materiale utilizzato per la presente ricerca è molto importante poiché la risposta agli stress, e specialmente a quello idrico, risulta particolarmente sensibile allo stadio fenologico in cui la pianta si trova al momento in cui lo stress avviene. In frumento, infatti, la maggiore sensibilità allo stress coincide con le fasi di spigatura e fioritura: qualora lo stress idrico colpisca la pianta in tali stadi di sviluppo, la produttività può risultare notevolmente decurtata principalmente a causa di una riduzione del numero di semi per spiga a sua volta imputabile a danni ai tessuti riproduttivi (Edmeades *et al.*, 1989; Monneveux *et al.*, 2012). Pertanto, per valutare la risposta specifica e differenziale di ciascun genotipo alle condizioni ambientali, è necessario che tutte le accessioni oggetto di studio si trovino quanto più possibile allo stesso stadio fenologico quando lo stress avviene, ovvero che spigatura e fioritura in particolare siano quanto più possibile sincrone.

I dati relativi alle prove di campo condotte sia nel subpanel che nel panel completo hanno dimostrato che la data di spigatura (HD) in tutti gli ambienti e nelle due stagioni di crescita, ha una finestra massima di variazione di 7 giorni. Questo dato conferma per tutto il panel

oggetto di studio i risultati anticipati da Maccaferri *et al.*, (2011). Presso il DipSA dell'Università di Bologna in entrambi gli anni è stata esaminata anche la data di fioritura, della quale è nota una significativa correlazione positiva con la data di spigatura. Anche questi dati confermano la sincronia dello stadio fenologico del materiale in valutazione, trattandosi anche in questo caso di un intervallo di 7 giorni, che si riduce a soli 3 per il 70% circa del materiale ed addirittura a 2 per circa il 50% delle accessioni. E' importante rimarcare che, rispetto al lavoro di Maccaferri e colleghi (2011), il presente panel comprende 19 accessioni di origine messicana (CYMMIT) precedentemente non presenti ed inserite nel panel per sostituire alcuni materiali ridondanti dal punto di vista genotipico (Letta *et al.*, 2013). Pertanto il presente lavoro conferma che anche questa nuova costituzione del panel mantiene la caratteristica fenologica precedentemente osservata, rimarcando l'utilità del materiale per studi legati alla valutazione della risposta allo stress idrico (Maccaferri *et al.*, 2011)

GY è il risultato finale di complessi ed inter-connessi processi di sviluppo, che coinvolgono tutte le fasi fenologiche della pianta: l'accestimento, la fioritura, l'antesi ed il riempimento della granella (Peleg *et al.*, 2009). Le condizioni ambientali e la sensibilità di ciascun genotipo rispetto ad esse (interazione Genotipo × Ambiente) influenzano profondamente questi processi, aumentando così il grado di complessità nella valutazione della resa di granella, in particolare come risposta alle condizioni di stress.

Nel presente studio, il panel di 188 accessioni è stato valutato per GY e sue componenti in senso allargato (TKW, TW, KM, FTpsm) nonché per caratteri agronomici rilevanti quali HD, FT, MD, PH (a livello di FLC, BoE, ToP) e PdL, in cinque ambienti di tre Paesi del Bacino del Mediterraneo, permettendo così di analizzare i suddetti caratteri in ambienti differenti per quanto riguarda la quantità di acqua disponibile per la coltura.

Come riportato nei risultati, la media di GY delle accessioni è compresa tra un minimo di 1,35 Mg ha<sup>-1</sup> (SAB\_R) ed un massimo di 10,42 Mg ha<sup>-1</sup> (UNI\_R); all'interno di questa finestra di variazione, i valori medi per GY possono essere identificati come segue: (i) inferiori a 3,50 Mg ha<sup>-1</sup> (di qui in seguito identificati come a bassa produttività), con valori di GY corrispondenti a 1,35 Mg ha<sup>-1</sup> (SAB\_R) e a 3,01 Mg ha<sup>-1</sup> (ARI\_R); (ii) compresi tra 3,50 e 5,50 Mg ha<sup>-1</sup> (considerati ambienti a produttività media) con valori di GY equivalenti a 3,61 Mg ha<sup>-1</sup> (ARI\_I) e a 4,62 Mg ha<sup>-1</sup> (SAB\_I); (iii) superiori a 10 Mg ha<sup>-1</sup> per (UNI\_R). Pertanto, UNI\_R è risultato l'ambiente a produttività più elevata, confermando i risultati osservati in Maccaferri *et al.* (2011). secondo i quali gli ambienti italiani, ed in particolare quelli della pianura Padana, risultano particolarmente vocati e favorevoli allo sviluppo di frumento duro, anche in condizioni non irrigue, essendo generalmente l'acqua di pioggia sufficiente nonché disponibile nei momenti di maggiore necessità. Questo dato è evidente persino nel confronto tra i dati disponibili per le prove di campo effettuate presso l' Azienda Universitaria di Cadriano nelle stagioni di crescita 2011 e 2012. Osservando l'andamento climatico nei due

anni, infatti, risulta evidente che il 2012 abbia mostrato delle temperature medie maggiori del 2011 nelle fasi di sviluppo (dati non riportati). Nonostante il clima più sfavorevole, la produzione media del 2012 risulta maggiore, verosimilmente per condizioni meteorologiche favorevoli durante la fioritura. Il range di variazione appare però più ampio nel 2012; questo dato risulta molto interessante poichè altamente correlato con i gradi utili necessari alla maturazione. Il trend indica che i genotipi a più alta richiesta termica per la maturazione presentano una GY media più alta. Considerando la correlazione non significativa della resa di granella con le date di spigatura ed antesi, questo dato indica la risposta differenziale dei diversi genotipi alle condizioni ambientali presenti in fase di maturazione, come elemento favorevole o meno ad una maggiore GY. Visto l'interesse del dettaglio relativo alla data di maturazione rilevato nel 2012 solo presso UNI\_R, nella prova futura prevista per l'anno 2013 è stata richiesto il medesimo rilievo anche negli altri ambienti, per poter meglio valutare tale risposta in condizioni di regime idrico diversificato.

Il range di variazione complessivo dei valori medi di GY ha messo in evidenza che gli esperimenti realizzati nelle diverse località oggetto delle prove sperimentali di campo sono state condotti in condizioni ambientali molto diverse, indicando ambienti favorevoli in SAB\_I, ARI\_I e UNI\_R, e condizioni di stress idrico in SAB\_R e ARI\_R. In particolare, i valori medi minori rispetto a tutti gli altri ambienti registrati per la prova di campo SAB\_R possono essere attribuiti alle condizioni di stress idrico osservate durante l'intero ciclo di coltivazione.

Analogamente a GY, anche i valori medi per le componenti della resa ed i rilevanti caratteri agronomici rilevati mostrano un range di variazione molto ampio nei diversi ambienti. Ad esempio, la media di FLC da 27,5 (ARI\_R) a 56,6 cm (UNI\_R); Boe da 38,6 (ARI\_R) a 76,4 cm (UNI\_R); TiP da 42,4 (ARI\_R) a 83,3 cm (UNI\_R); PdL da 3,8 (ARI\_R) a 19,8 cm (UNI\_R); TKW da 42,56 (ARI\_I) a 51,0 g (UNI\_R); TW da 74,8 (ARI\_I) a 79,4 kg hl<sup>-1</sup> (ARI\_R); KM da 8,51 (SAB\_I) a 13,27% (ARI\_R ed ARI\_I) e FTpsm da 166 (UNI\_R) a 477 nr. M-1 (ARI\_R).

In ogni ambiente, le accessioni hanno mostrato differenze altamente significative per i principali caratteri agronomici analizzati, indicando così che il panel oggetto di studio comprende una ampia gamma di diversità genetica, ben rappresentativa delle diverse cultivar elite selezionate nel tempo nelle aree di maggiore produttività della specie (Maccaferri *et al.*, 2011). Come genotipo di controllo, in ogni prova è stato utilizzato Meridiano (DP005) noto per le sue caratteristiche di elevato potenziale produttivo, elevata adattabilità a diversi ambienti e generale tendenza alla stabilità produttiva, caratteristiche che lo rendono adatto alla coltivazione in ambienti diversi; tali caratteristiche vengono confermate anche da prove condotte in molti paesi nel Bacino del Mediterraneo (Royo *et al.*, 2010; Maccaferri *et al.*, 2008). I valori medi misurati su Meridiano (DP005) per ciascun carattere sono riportati nelle singole tabelle. Come commento di carattere generale osserviamo che, come atteso, i valori

medi di Meridiano nei diversi ambienti tendono ad avvicinarsi sempre alla media generale dei genotipi, sovente oggetto di range di variazione ampi nei diversi ambienti. Questa osservazione conferma la corretta scelta di Meridiano DPO05 come buon punto di riferimento nella valutazione del panel.

La resa di granella in frumento è determinata dalle sue componenti TKW e FTpsm, le quali hanno un comportamento tendenzialmente differenziale nei diversi ambienti. Infatti, in termini generali, TKW è un carattere generalmente stabile, caratterizzato da un intervallo di variazione più ristretto nei confronti della resa (Slafer & Andrade, 1993; Pedró *et al.*, 2012). Decisamente più variabile è FTpsm, il quale risente maggiormente delle condizioni ambientali durante il ciclo di sviluppo vegetativo della pianta e che determina in larga misura il numero di semi per pianta prodotti nei diversi ambienti (Slafer *et al.*, 1993; Maccaferri *et al.*, 2008). L'aumento del numero di semi comporta un ampio impiego degli assimilati che, specialmente negli ambienti meno favorevoli, sono meno disponibili per la crescita in dimensione dei semi stessi; tale condizione è responsabile della forte correlazione negativa tra peso medio dei semi e numero di culmi fertili (Reynolds *et al.*, 2011; Pedro *et al.*, 2012). A tal proposito è necessario ricordare che negli ambienti meno fertili e in condizioni di limitata disponibilità idrica, l'accestimento è tendenzialmente limitato; qualora le condizioni di stress si manifestino ad accestimento e sviluppo completati, spesso l'elevata competizione tra culmi per luce, acqua e sostanze nutritive può diminuire la resa in granella per pianta nella misura in cui la presenza di più centri di accumulo di assimilati (*sinks*) non può compensare la perdita di produzione su base di singolo culmo, con conseguente minore produzione di granella per area coltivata (Sreenivasulu & Schnurbusch, 2012).

Per le medesime ragioni, TKW è fortemente influenzato anche da altre componenti come il numero di spighe, il numero di spiglette per spiga e il numero di semi per spigletta, che contribuiscono in modo diverso durante tutta la fase di sviluppo specialmente nelle fasi di allegazione ed accrescimento che seguono l'antesi (Slafer e Rawson, 1994).

A tal proposito, gli ambienti da noi valutati nel 2012 hanno presentato un'ampia gamma di casistiche. In termini generali, sia TKW che FTspm hanno mostrato una interazione Genotipo x Ambiente altamente significativa. TKW ha mostrato un range di variazione decisamente inferiore, dal momento che le medie sono andate da un minimo di 42,6 g (ARI\_I) ad un massimo di 51,0 g (UNI\_R) per TKW, e da un minimo di 166 culmi m<sup>-2</sup> (UNI\_R) a 477 culmi m<sup>-2</sup> (ARI\_I) per FTpsm. E' da notare come i valori massimi e minimi dei due caratteri corrispondano inversamente l'uno all'altro nei due medesimi ambienti. UNI\_R, come già riportato, risulta in termini assoluti l'ambiente a GY più elevata. Molto interessante è il caso di ARI\_I, il quale mostra un livello di GY significativamente maggiore rispetto ad ARI\_R, nonostante TKW sia inferiore nell'ambiente irrigato rispetto all'ambiente non irrigato. Come menzionato poc'anzi, questa superiorità è spiegabile proprio con il numero di culmi fertili prodotti dalla coltura la quale, verosimilmente in condizioni ambientali migliori sin

dall'inizio del proprio sviluppo, ha privilegiato il numero di culmi fertili prodotti a discapito del peso medio della granella ma risultante, complessivamente, in una resa superiore. Considerando i caratteri altezza della pianta e lunghezza del peduncolo, sono stati osservati valori medi con una differenza altamente significativa tra accessioni solo per quanto riguarda UNI\_R e SAB\_R, in quanto la valutazione di questo carattere in Ungheria è stata effettuata solo su un sotto campione di 20 genotipi all'interno panel. L'ambiente in cui è stato riscontrato il valore maggiore di GY (UNI\_R) corrisponde al medesimo nel quale sono stati stimati valori più elevati di altezza della pianta e lunghezza del peduncolo rispetto agli ambienti con valori di resa inferiori. Tale risultato è in accordo con l'identificazione di UNI\_R con l'ambiente più vocato per la coltivazione di frumento duro tra quelli oggetto di valutazione nell'ambito di questo studio (Maccaferri *et al.*, 2011).

Possiamo osservare che le differenze nel carattere 'altezza della pianta' sono evidenti in tutte le componenti di questo carattere, ovvero altezza della foglia bandiera, altezza alla base della spiga, altezza complessiva della pianta (escluse le reste) e lunghezza del peduncolo. In particolare, quest'ultimo risulta particolarmente sensibile alle diverse condizioni ambientali. Come noto in letteratura (Fischer & Stockman, 1986; Araus *et al.*, 2008) tale carattere è infatti particolarmente rispondente alle condizioni ambientali avverse, e soprattutto alla limitata disponibilità idrica, manifestando valori inferiori di lunghezza negli ambienti più limitanti, a favore della più rapida estrusione della spiga e del minor consumo delle limitate risorse ancora a favore dello sviluppo dei semi (Youseffian *et al.*, 1992; Miralles *et al.*, 1998; Rebetzke *et al.*, 2011).

Durante le diverse fasi di sviluppo della coltura, sono state effettuate anche numerose osservazioni e misure sulla colorazione fogliare (NDVI e SPAD); in particolare, è stato osservato che negli ambienti caratterizzati da valori più elevati di GY e coincidenti con le condizioni ambientali ed idriche più favorevoli alla coltura, le accessioni manifestano un livello maggiore di SPAD per più tempo, mantenendo un valore di *stay-green* più a lungo ed entrando in fase di senescenza fogliare più tardi rispetto a quelle coltivate negli ambienti che presentano valori inferiori di resa. E' ragionevole ipotizzare che il contenuto in clorofilla ed il maggiore *stay-green* giochi un ruolo fondamentale nei processi di sviluppo delle piante e, soprattutto, nel determinare la produttività finale, mantenendo più a lungo la capacità di procedere con l'attività di fotosintesi e quindi garantendo un maggior quantitativo potenziale di assimilati (Borrell *et al.*, 2000, 2001),

Infatti, come riportato in letteratura, cariossidi di dimensioni più rilevanti possono essere ottenute allungando il periodo della fase di riempimento della granella oppure ritardando lo stadio di senescenza, assicurando in tal modo un maggior accumulo di fotosintetati disponibili per la crescita in dimensioni dei semi (Reynolds *et al.*, 2011; Pedro *et al.*, 2012). Sono proprio gli assimilati prodotti in questa fase dalla spiga, dal culmo e dalla penultima foglia, che determinano l'80-90% del peso secco della granella (Austin *et al.*, 1977; Snyder,

1993; Yang & Zhang, 2006; Barnabás *et al.*, 2008; Vassileva *et al.*, 2012), contribuendo, in questo modo, a determinare fino al 30% della resa in granella (Blum, 1998; Araus *et al.*, 2002; Monneveux *et al.*, 2012; Dreccer *et al.*, 2013).

Molto importante è sottolineare come per tutti i caratteri rilevati e menzionati nel presente lavoro si sia identificata una differenza altamente significativa tra le 188 accessioni entro ciascun ambiente, sottolineando un comportamento differenziale dei singoli materiali alle diverse condizioni ambientali, requisito necessario per poter procedere con un'efficace analisi QTL entro ciascun ambiente e successivamente poi con un programma dedicato di miglioramento genetico dei materiali disponibili non solo per la ricerca, ma che per l'ottica del breeding applicato. Inoltre, l'elevata interazione Genotipo x Ambiente ci permetterà di valutare i QTL anche in un'ottica di *multi-environment analysis*, potendo definire con particolare interesse le regioni altamente stabili nei diversi ambienti e quelle invece più sensibili, con particolare interesse ai QTL rispondenti nello specifico ai trattamenti irrigui.

**CAPITOLO VI**  
**CONCLUSIONI E PROSPETTIVE**





La mia attività di ricerca è stata sviluppata all'interno del progetto europeo "DROPS" (Drought Tolerant Yielding Plants); in particolare, il mio progetto di ricerca è stato focalizzato su frumento duro ed è stato svolto all'interno del *WorkPackage 1* e *WorkPackage 2*, al fine di valutare l'interazione tra genotipo ed ambiente in campo con un approccio che combini risposte fisiologiche e caratteristiche genetiche in esperimenti di campo ed in condizioni controllate. Ogni carattere può infatti mostrare risposte positive, negative o nulle a seconda dei livelli di stress (Tardieu, 2012) a cui è sottoposto.

La caratterizzazione molecolare del panel di 188 accessioni mediante integrazione di marcatori molecolari SSR e marcatori DArT ha permesso di ottenere una mappa genetica caratterizzata da una più elevata densità di marcatori rispetto ai lavori precedenti (Maccaferri *et al.*, 2006, 2011) con una risoluzione di un marcatore ogni 2,9 cM, consentendo in tal modo una migliore saturazione delle regioni cromosomiche che precedentemente erano risultate a bassa densità di marcatori. La possibilità di avvalersi una mappa *consensus* di riferimento (Maccaferri *et al.*, dati non pubblicati) caratterizzata da un elevato numero di marcatori derivati da diverse mappe ci ha permesso di mappare e ordinare ca. il 75% dei 1.303 marcatori originariamente utilizzati per la genotipizzazione. Verranno effettuate ulteriori analisi per ampliare la mappa del panel utilizzando i 333 marcatori ad oggi non mappati ed i 67 marcatori con alleli rari esclusi in quanto non informativi, attraverso l'integrazioni di marcatori Single Nucleotide Polymorphism (SNPs), che sono già in valutazione nel medesimo materiale vegetale.

La buona copertura del genoma, l'accuratezza della stima della posizione e la numerosità dei marcatori informativi, destinati ad aumentare ulteriormente in numero con l'integrazione degli SNPs, rende questa mappa un valido strumento per future analisi di Association Mapping sul materiale vegetale disponibile.

Lo studio dell'efficienza dell'uso dell'acqua in un subset di 100 accessioni di frumento duro attraverso un esperimento in condizioni controllate presso il "Centre for Sustainable Agriculture - Lancaster Environment Centre", Lancaster University (UK); ha permesso di evidenziare differenze altamente significative in termini di WUE tra le 100 accessioni del subpanel di frumento duro.

Le condizioni di regime irriguo ottimale nelle quali è stato condotto l'esperimento hanno probabilmente limitato la predittività dei valori in campo. Le 10 accessioni caratterizzate da elevati o ridotti valori di WUE in tutte le sei repliche saranno oggetto di future ricerche in ambiente controllato in condizioni di stress idrico, al fine di valutare le risposte dei medesimi genotipi ad una limitata disponibilità d'acqua, per poi trasferire queste conoscenze in prove di campo.

I risultati relativi alla data di spigatura e di fioritura ottenuti nella prova preliminare di campo nella stagione di crescita 2010/2011 condotta sul subset di 100 accessioni di frumento duro e nelle prove comparate in diversi ambienti nella stagione di crescita 2010/2011, hanno

confermato quanto anticipato da Maccaferri *et al.* (2011). Inoltre, i dati relativi al primo anno della prova di campo hanno mostrato differenza altamente significative per la maggior parte dei caratteri agronomici oggetto di studio, comprovando l'idoneità del materiale vegetale e dei caratteri scelti per successive analisi di mappaggio per associazione.

Le prove comparate di campo condotte nella stagione di crescita 2011/2012 sul panel di 188 accessioni al fine di valutare importanti caratteri agronomici hanno permesso di osservare differenze significative o altamente significative tra accessioni per la maggior parte dei caratteri oggetto di studio, con range di variazione molto ampio nei diversi ambienti, a dimostrazione che il panel oggetto di studio comprende una ampia gamma di diversità genetica, ben rappresentativa delle diverse cultivar elite selezionate nel tempo nelle aree di maggiore produttività della specie (Maccaferri *et al.*, 2011), e che gli esperimenti realizzati nelle diverse località oggetto delle prove sperimentali di campo sono stati condotti in condizioni ambientali molto diverse.

Tale risultato è in accordo con lo scopo principale del *WorkPackage 1* e del *WorkPackage 2* del progetto DROPS, finalizzati, rispettivamente, ad individuare il materiale vegetale e nuovi metodi di screening per valutare l'idoneità dei genotipi a diversi *drought scenarios*

I dati relativi a GY confermano quanto atteso (Maccaferri *et al.*, 2011), ossia che le condizioni metereologiche e l'acqua di pioggia disponibile durante i momenti più critici per lo sviluppo della pianta, spigatura e fioritura, rendono gli ambienti italiani, ed in particolare quelli della pianura Padana, particolarmente vocati e favorevoli allo sviluppo di frumento duro, sebbene in condizioni non irrigue, e che i valori medi inferiori rispetto a tutti gli altri ambienti sono stati registrati per la prova di campo in condizioni di stress idrico più intenso.

I risultati ottenuti nelle prove comparate di campo del 2012 riguardo a TKW e FTpsm hanno confermato la forte correlazione negativa tra peso medio dei semi e numero di culmi fertili (Reynolds *et al.*, 2011; Pedro *et al.*, 2012). I risultati osservati comprovano che, in condizioni di limitata disponibilità idrica, data l'elevata competizione tra culmi per luce, acqua e sostanze nutritive, viene favorita la produzione di semi a discapito del numero di culmi (Sreenivasulu & Schnurbusch, 2012). Di contro, in condizioni ambientali favorevoli a partire dall'inizio dello sviluppo delle piante, viene privilegiato il numero di culmi fertili prodotti a discapito del peso medio della granella ma risultante, complessivamente, in una resa superiore (Slafer *et al.*, 1993; Slafer & Rawson, 1994; Maccaferri *et al.*, 2008; Pedro *et al.*, 2012).

I dati osservati per quanto riguarda il carattere altezza della pianta hanno confermato quanto osservato e predetto da Maccaferri e colleghi (2011) che identificano UNI\_R come l'ambiente più vocato per la coltivazione di frumento duro tra quelli oggetto di valutazione nell'ambito di questo studio.

Il significativo range di variazione di PdL nei diversi ambienti ha evidenziato come questo carattere risulti particolarmente sensibile alle diverse condizioni ambientali (Fischer &

Stockman, 1986; Araus *et al.*, 2008) soprattutto in condizioni limitata disponibilità idrica, dove PdL presenta valori inferiori di lunghezza, per avvantaggiare la più rapida estrusione della spiga e per limitare il consumo delle limitate risorse a favore dello sviluppo dei semi (Youseffian *et al.*, 1992; Miralles *et al.*, 1998; Rebetzke *et al.*, 2011).

Le osservazioni effettuate sulla colorazione fogliare (NDVI e SPAD) durante diverse fasi dello sviluppo colturale hanno confermato quanto riportato in letteratura (Reynolds *et al.*, 2011; Pedro *et al.*, 2012), ossia che ritardando lo stadio di senescenza è possibile accumulare una maggiore quantità di fotosintetati disponibili per la crescita in dimensioni dei semi (Reynolds *et al.*, 2011; Pedro *et al.*, 2012), contribuendo in questo modo a determinare fino al 30% della produttività finale (Blum, 1998; Araus *et al.*, 2002; Monneveux *et al.*, 2012; Dreccer *et al.*, 2013).

Al fine di individuare la variabilità allelica per i geni chiave o le regioni genomiche associate ai caratteri che conferiscono tolleranza alla siccità o una maggiore efficienza di utilizzo dell'acqua, negli anni futuri del progetto DROPS verranno effettuate analisi QTL dei caratteri valutati nelle prove di campo utilizzando la mappa genetica del panel completo ottenuta in questo lavoro. Tali analisi consentiranno la dissezione ed una più mirata manipolazione delle basi genetiche e funzionali della resa in condizioni di siccità. Infatti, le differenze altamente significative osservate tra le 188 accessioni per la maggior parte dei caratteri analizzati entro ciascun ambiente, e l'elevata significatività stimata relativamente all'interazione Genotipo x Ambiente per tutti i caratteri oggetto di analisi, ci permetterà di valutare i QTL nei singoli ambienti e in tutti gli ambienti, per determinare la stabilità di ogni QTL in tutti gli ambienti o identificare quelli che rispondono specificamente ad una precisa condizione di disponibilità idrica

Questi risultati, che saranno incrementati attraverso future analisi molecolari e prove di campo condotte nell'ambito dello stesso progetto, potrebbero rappresentare un buon punto di partenza per ulteriori indagini e l'applicazione pratica del breeding analitico in condizioni di siccità.



## **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, 406-421.
- Addisu, M., Snape, J.W., Simmonds, J.R., Gooding, M.J., 2009.** Reduced height (*Rht*) and photoperiod insensitivity (*Ppd*) allele associations with establishment and early growth of wheat in contrasting production systems. *Euphytica* 166: 249–267.
- Akbari, M., Wenzl, P., Caig, V., Carling, J., Xia, L., Yang, S.Y, 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. *Theor Appl Genet* 113: 1409–1420.
- Araus, J.L., Amaro, T., Zuhair, Y., Nachit, M.M., 1997.** Effect of leaf structure and water status on carbon isotope discrimination in field-grown durum wheat. *Plant Cell Environ* 20: 1484–1494.
- Araus, J.L., Cabrera-Bosquet, L., Serret, M.D., Bort, J., Nieto-Taladriz M.T., 2013.** Comparative performance of  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  for phenotyping durum wheat adaptation to a dryland environment. *Funct Plant Biol*
- Araus, J.L., Slafer, G.A., Reynolds, M.P., Royo, C., 2002.** Plant breeding and drought in C3 cereals: What should we breed for? *Ann Bot* 89: 925-940.
- Araus, J.L., Slafer, G.A., Royo, C., Serret, M.D., 2008.** Breeding for yield potential and stress adaptation in cereals. *Crit Rev Plant Sci* 27: 377–412.
- Ashraf, M., 2010.** Inducing drought tolerance in plants. Recent advances. *Biotechnol Adv* 28: 169-183.
- Asseng, S., Turner, N.C., Botwright, Y., Condon, A.G., 2003.** Evaluating the impact of a trait for increased specific leaf area on wheat yields using a crop simulation model. *Agron J* 95: 10–19.
- Atkinson, N.J., Urwin, P.E., 2012.** The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *J Exp Bot* 63: 3523-3544.
- 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. *J Agric Sci* 94: 675-689.

- Austin, R.B., Edrich, J.A., Ford, M.A., Blackwell, R.D., 1977.** The fate of the dry matter, carbohydrates and <sup>14</sup>C lost from the leaves and stems of wheat during grain filling. *Ann Bot* 41: 1309-1321.
- Banerjee, A., 2011.** Food, feed, fuel: transforming the competition for grains. *Dev. Change* 42: 529-557.
- Barnabás, B., Jäger, K., Fehér, A., 2008.** The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant Cell Environ* 31: 11-38.
- Barrieu, P., Simonneau, T., 2000.** The monoclonal antibody MAC252 does not react with the (-) enantiomer of abscisic acid. *J Exp Bot* 51: 305-307.
- Bartels, D., Sunkar, R., 2005.** Drought and salt tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci* 24: 23-58.
- Bartels, D., Sunkar, R., 2005.** Drought and salt tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci* 24: 23-58.
- Bazzaz, F.A., 1979.** Physiological ecology of plant succession. *Ann Rev in Ecol Syst* 10: 351-371.
- Blake, N.K., Lehfeltdt, B.R., Lavin, M., Talbert, L.E., 1999.** Phylogenetic reconstruction based on low copy DNA sequence data in an allopolyploid: The B genome of wheat. *Genome* 42: 351-360.
- Blanco, A., Giorgi, B., Perrino, R., Simeone, R., 1990.** Risorse genetiche e miglioramento della qualità del frumento duro. *Agricoltura Ricerca* 114: 41-58.
- Blum, A. 1996.** Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. *Plant Growth Regul* 20: 135-148.
- Blum, A., 1988.** *Plant Breeding for Stress Environments*. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, p 223.
- Blum, A., 1998.** Improving wheat grain filling under stress by stem reserve mobilisation. *Euphytica* 100: 77-83.
- Blum, A., 2005.** Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential—are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Aust J Agric Res* 56: 1159-1168.



- Blum, A., 2006.** Drought adaptation in cereal crops: a prologue. In: Ribaut, J.M., (ed) Drought Adaptation in Cereals. The Haworth Press, Inc., Binghamtown, NY, USA, pp 3–15.
- Blum, A., 2009.** Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crops Res* 112: 119–123.
- Blum, A., 2011.** *Plant Breeding for Water–Limited Environments*. New York, NY: Springer.
- Boote, K.J., Ibrahim, A.M.H., Lafitte, R., McCulley, R., Messina, C., Murray, S.C., Specht, J.E., Taylor, S., Westgate, M.E., Glasener, K., Bijl, C.G., Giese, J.H., 2011.** Position statement on crop adaptation to climate change. *Crop Sci* 51:2337–2343.
- Borlaug, N.E., 2007.** Sixty-two years of fighting hunger: personal recollections. *Euphytica* 157: 287–297.
- Borràs-Gelonch, G., Rebetzke, G.J., Richards, R.A., Romagosa, I., 2012.** Genetic control of duration of pre-anthesis phases in wheat (*Triticum aestivum* L.) and relationships to leaf appearance, tillering, and dry matter accumulation. *J Exp Bot* 63: 69-89.
- Borrell, A.K., Hammer, G.L., Henzell, R.G., 2000.** Does maintaining green leaf area in sorghum improve yield under drought? Dry matter production and yield. *Crop Sci* 40: 1037–1048.
- Borrell, A.K., Hammer, G.L., van Oosterom, E., 2001.** Staygreen: a consequence of the balance between supply and demand for nitrogen during grain filling? *Ann Appl Biol* 138: 91–95.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnik, M., Davis, R.W., 1980.** Construction of a genetic linkage map in human using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314-331.
- Bourlaug, N.E., 1968.** Wheat breeding and its impact on world food supply. Proc. 3<sup>rd</sup> Int. Wheat Genet. Symp., Canberra, Australia, Aust Acad Sci, 1-36.
- Bowne, J.B., Erwin, T.A., Juttner, J., Schnurbusch, T., Langridge, J.P., Bacic, A., Roessner, U., 2012.** Drought responses of leaf tissues from wheat cultivars of differing drought tolerance at the metabolite level. *Mol Plant* 5: 418–429.

- Bozzini, A., 1988.** Origin, distribution, and production of durum wheat in the world. In: Fabriani, G., Lintas, C., (eds) *Durum Wheat: Chemistry & Technology*. Am. Assoc. Cereal Chem.: St. Paul, MN, pp 1-16.
- Bradshaw, A.D., 1972.** Some of the evolutionary consequences of being a plant. *Evol Biol* 5: 25-47.
- Brandle, J.E., Knott, D.R., 1986.** The effect of a gene for semidwarfism (*Rht1*) on various characters in a spring wheat cross. *Can J Plant Sci* 66: 529–533.
- Bray, E. A., 1993.** Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol* 103: 1035– 1040.
- Bray, E. A., 1997.** Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci* 2: 48–54.
- Brocklehurst, P.A., 1977.** Factors controlling grain weight in wheat. *Nature* 26: 348-349.
- Brooking, I.R., Kirby, E.J.M., 1981.** Interrelationships between stem and ear development in winter wheat: the effects of Norin 10 dwarfing gene, *GAI/Rht2* *J Agri Sci (Cambridge)* 97: 373–381.
- Bruce, W.B., Edmeades, G.O., Barker, T.C., 2002.** Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. *J Exp Bot* 53: 13–25.
- Bulmer, M. G., 1985** *The Mathematical Theory of Quantitative Genetics*. 14<sup>th</sup> ed. Oxford University Press, USA, 252 pp.
- Cattivelli, L., Rizza, F., Badeck, F.W., Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A.M., Francia, E., Marè, C., Tondelli, A., Stanca, A.M., 2008.** Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Res* 105: 1–14.
- 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*). *Plant Cell* 17: 1033–1045.
- Chapman, S.C., Chakraborty, S., Dreccer, M.F., Howden, S.M., 2012.** Plant adaptation to climate change-opportunities and priorities in breeding. *CropPastureSci* 63: 251–268.

- Chaves, M., Maroco, J., Pereira, J., 2003.** Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Funct Plant Biol* 30: 239-264.
- Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C., 2009.** Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann Bot* 103: 551-560.
- Chaves, M.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S., 2003.** Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Funct Plant Biol* 30: 239–264.
- Chaves, M.M., Pereira, J.S., Maroco, J., Rodrigues, M.L., Ricardo, C.P.P., Oserio, M.L., Carvalho, I., Faria, T., Pinheiro, C., 2002.** How do plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Ann Bot* 89: 907–916.
- Chenu, K., Chapman, S.C., Hammer, G.L., McLean, G., Salah, H.B., Tardieu, F., 2008.** Short- term responses of leaf growth rate to water deficit scale up to whole-plant and crop levels: an integrated modelling approach in maize. *Plant Cell Environ* 31: 378–391.
- Childe, V.G., 1935.** New light on the most ancient East. In: Kegan & Paul (eds) , London, pp. 68-74.
- Chimenti, C.A., Marcantonio, M., Hall, A.J., 2006.** Divergent selection for osmotic adjustment results in improved drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) in both early growth and flowering phases. *Field Crops Res* 95: 305-315.
- Christopher, J.T., Manschadi, A.M., Hammer, G.L., Borrell, A.K., 2008.** Developmental and physiological traits associated with high yield and stay-green phenotype in wheat. *Aust J Agric Res* 59: 354-364.
- Coldiretti [WWW Document], 2012.** URL <http://www2.coldiretti.it/Pagine/default.aspx>
- Collard, B.C.Y, Jahufer, M.Z.Z, Brouwer, J.B, Pang, E.C.K, 2005.** An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping, and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169–196.
- Collins, N.C., Tardieu, F., Tuberosa, R., 2008.** Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: where do we stand? *Plant Physiol* 147: 469–486.

- Condon, A.G., Farquar, G.D., Rebetzke, G.J., Richards, R.A., 2006.** The application of carbon isotope discrimination in cereal improvement for water-limited environments. In: Ribaut, J.M., (ed) Drought Adaptation in Cereals. The Haworth Press, Inc., Binghamtown, NY, USA, pp 171–219.
- Condon, A.G., Farquar, G.D., Richards, R.A., 1990.** Genotypic variation in carbon isotope discrimination and transpiration efficiency in wheat. Leaf gas exchange and whole plant studies. *Aust. J Plant Physiol* 17: 9–22.
- Condon, A.G., Richards, R.A., Farquhar, G.D., 1993.** Relationships between carbon isotope discrimination, water use efficiency and transpiration efficiency for dryland wheat. *Aust J Agric Res* 44: 1693–1711.
- Condon, A.G., Richards, R.A., Rebetzke, G.J., Farquhar, G.D., 2004.** Breeding for high water-use efficiency. *J Exp Bot* 55: 2447–2460.
- Condon, AG., Richards, R.A., Rebetzke, G.J., Farquhar, G.D., 2002.** Improving intrinsic water-use efficiency and crop yield. *Crop Sci* 42: 122–131.
- Cruz, R.T., Jordan, W.R., Drew, M.C., 1992.** Structural changes and associated reduction of hydraulic conductance in roots of *Sorghum bicolor* L. following exposure to water deficit. *Plant Physiol* 99: 203-212.
- Davies, W.J., Zhang, J., Yang, J., Dodd I.C., 2011.** Novel crop science to improve yield and resource use efficiency in water-limited agriculture. *J Agric Sci* 149: 123–131.
- De Givry, S., Bouchez, M., Chabrier, P., Milan, D., Schiex, T., 2005** CAR(H)(T)AGene: multipopulation integrated genetic and radiation hybrid mapping. *Bioinformatics* 21: 1703- 1704.
- Deikman, J., Petracek, M., Heard, J.E., 2012.** Drought tolerance through biotechnology: improving translation from the laboratory to farmers' fields. *Curr Opin Biotechnol* 23: 243–250.
- Department of Agriculture Appropriations for 1957:** Hearings 84<sup>th</sup> Congress. 2<sup>d</sup> Session. United States House Committee on Appropriations 1956 p. 242.
- Doerge, R.W., 2002.** Multifactorial genetics: Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nature Rev Genet* 3: 43-52.
- Dolferus, R., Ji, X.M., Richards, A.R., 2011.** Abiotic stress and control of grain number in cereals. *Plant Sci* 181: 331–341.

- Donald, C.M., 1968.** The breeding of crop ideotypes. *Euphytica* 17: 385-403.
- Donini, P., Stephenson, P., Bryan, G.J., Koebner, R.M.D., 1998.** The potential of microsatellites for high throughput genetic diversity assessment in wheat and barley. *Genet Resour Crop Ev* 45: 415-421.
- Donnelly, A., Caffarra, A., Kelleher, C., O'Neill, B., Diskin, E., Pletsers, A., Proctor, H., Stirnemann, R., O'Halloran, J., Peñuelas, J., Hodkinson, T. R., Sparks, T. H., 2012.** Surviving in a warmer world: environmental and genetic responses. *Clim Res* 53: 245-262.
- Dreccer, M.F., Chapman, S.C., Rattey, A.R., Neal, J., Song, Y., Christopher, J.J., Reynolds, M., 2013.** Developmental and growth controls of tillering and water-soluble carbohydrate accumulation in contrasting wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes: can we dissect them? *J Exp Bot* 64: 143-160.
- Dubcovsky, J., Loukoianov, A., Bonafede, M., 2007.** Regulation of flowering time in wheat. *Wheat Prod Stressed Environ* 12: 659-665.
- Dvorak, J., McGuire, P.E., Cassidy, B., 1988.** Apparent sources of the A genomes of wheats inferred from polymorphism in abundance and restriction fragment length of repeated nucleotide sequences. *Genome* 30: 680-689.
- East, E.M., 1916.** Studies on size inheritance in *Nicotiana*. *Genetics* 1: 164-176.
- Edmeades, G.O., Bolanos, J., Lafitte, H.R., Rajareem, S., Pfeiffer, W., Fischer, R.A., 1989.** Traditional approaches to breeding for drought resistance in cereals. In: Baker, F.W.G., (ed) *Drought resistance in cereals*. ICSU Press, Oxon, UK, pp 27-52.
- Edwards, M.D., Stuber, C.W., Wendel, J.F., 1987.** Molecular-marker facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. I. Numbers, genomic distributions and types of gene action. *Genetics* 116: 113-125.
- Ehleringer, J., Cooper, T.A., 1992.** On the role of orientation in reducing photoinhibitory damage in photosynthetic-twig desert shrubs. *Plant Cell Environ* 15: 301-306.
- Eisen, J.A., 1999.** Mechanistic basis for microsatellite instability. In: Goldstein D.B., Schlotterer, C., (eds) *Microsatellites: Evolution and applications*. Oxford University Press, Oxford, UK., pp 66-79.

- Ellegren, H., 2004.** Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 5: 435–445.
- Ellis, M.H., Rebetzke, G.J., Azanza, F., Richards, R.A., Spielmeier, W., 2005.** Molecular mapping of gibberellins – responsive dwarfing genes in bread wheat. *Theor Appl Genet* 111: 423 – 430.
- Ewens, W.J., Spielman, R.S., 2001.** Locating genes by linkage and association. *TheorPopul Biol* 60: 135-139.
- Falconer, D.S., Mackay, T.F.C., 1996.** Introduction to quantitative genetics. 4<sup>th</sup> ed. Harlow, UK, Longman Group,. 464 pp.
- Fan, X.W., Li, F.M., Xiong, Y.C., An, L.Z., Long, R. J., 2008.** The cooperative relation between non-hydraulic root signals and osmotic adjustment under water stress improves grain formation for spring wheat varieties. *Physiol Plantarum* 132: 283–292.
- FAOSTAT [WWW Document], 2009.** “How to feed the world in 2050”. URL <http://www.fao.org>.
- FAOSTAT [WWW Document], 2009.** "World Wheat, Corn and Rice". Oklahoma State University;URL [http://nue.okstate.edu/crop\\_information/world\\_wheat\\_production.htm](http://nue.okstate.edu/crop_information/world_wheat_production.htm).
- FAOSTAT [WWW Document], 2009.** URL <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.
- FAOSTAT [WWW Document], 2010.** URL [http:// faostat3.fao.org/ home/ index.html](http://faostat3.fao.org/home/index.html).
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., Basra, S.M.A., 2009.** Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron Sustain Dev* 29: 185–212.
- Farouk, S., 2011.** Osmotic adjustment in wheat flag leaf in relation to flag leaf area and grain yield per plant. *J Stress Physiol Biochem* 7:117-138.
- Feldman, M., Levy, A. A., 2005.** Allopolyploidy—a shaping force in the evolution of wheat genomes. *Cytogenet. Genome Res* 109: 250–258.
- Feldman, M., Levy, A. A., 2009** Genome evolution in allopolyploid wheat—a revolutionary reprogramming followed by gradual changes. *J Genet Genomics* 36: 511–518.

- Feldman, M., Levy, A.A., 2012.** Genome Evolution Due to Allopolyploidization in Wheat. *Genetics* 192: 763-774.
- Feldman, M., Lupton, F.G.H., Miller, T.E., 1995.** Wheats. In: Smartt, J. and Simmonds, N.W., (eds) , *Evolution of Crops*. 2nd ed., London: Longman Scientific, pp. 184–192.
- Ferrante, A., Savin, R., Slafer, G.A., 2013.** Floret development and grain setting differences between modern durum wheats under contrasting nitrogen availability. *J Exp Bot* 64: 169-184.
- Feuillet, C., Langridge, P., Waugh, R., 2008.** Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends Genet* 24: 24-32.
- Fischer, R., Stockman, Y., 1986.** Increased kernel number in norin 10-derived dwarf wheat: evaluation of the cause. *Aust J Plant Physiol* 13: 767–784.
- Fischer, R.A., 2011.** Wheat physiology: a review of recent developments. *Crop Pasture Sci* 62: 95–114.
- Flintham, J.E., Borner, A., Worland, A.J, Gale, M.D., 1997.** Optimizing wheat grain yield: effects of *Rht* (gibberellin-insensitive) dwarfing genes. *J Agric Sci (Cambridge)* 128: 11–15.
- Forster, B.P., Ellis, R.P., Thomas, W.T.B., Newton, A.C., Tuberosa, R., This, D., El Enein, R.A., Bahri M.H., Ben Salem, M., 2000.** The development and application of molecular markers for abiotic stress tolerance in barley. *J Exp Bot* 51: 19–27.
- Foulkes, M.J., Slafer, .G.A, Davies, W.J., Berry, P.M., Sylvester-Bradley, R., Martre, P., Calderini, D.F., Griffiths, .S, Reynolds, M.P., 2011.** Raising yield potential of wheat. III. Optimizing partitioning to grain while maintaining lodging resistance. *J Exp Bot* 62: 469–486.
- 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.
- Frederick, J.R., Bauer, P.J., 1999.** Physiological and numerical components of wheat yield. In: Satorre, E.H., Slafer, G.A., (eds) *Wheat: Ecology and Physiology of Yield Determination*. The Haworth Press, Inc., Binghamtown, NY, USA, pp. 333–348.

- Fuller, D.Q., Asouti, E., Purugganan, M.D., 2012.** Cultivation as slow evolutionary entanglement: comparative data on rate and sequence of domestication. *Veget Hist Archaeobot* 21: 131–145.
- Gallagher, J.N., 1979.** Field studies of cereal leaf growth: I. Initiation and expansion in relation to temperature and ontogeny. *J Ex. Bo.* 117: 625–636.
- Gebbing, T., Schnyder, H., 1999.** Pre-anthesis reserve utilization for protein and carbohydrate synthesis in grains of wheat. *Plant Physiol* 121: 871–878.
- Gill, B.S., Chen, P.D., 1987.** Role of cytoplasm-specific introgression in the evolution of polyploid wheats. *Procl Natl Acad Sci USA* 84: 6800-6804.
- González, A., Martín, I., Ayerbe, L., 2008.** Yield and osmotic adjustment capacity of barley under terminal water-stress conditions. *J Agron Crop Sci* 194: 81-91.
- Gulbitti-Onarici, S., Sumer, S., Ozcan, S. 2007.** Phylogenetic relationships among some wild wheat species revealed by AFLP markers. *Bot J Linn Soc* 153: 67-72.
- Gupta, P.K., Langridge, P., Mir, R.R., 2010.** Marker-assisted wheat breeding: present status and future possibilities. *Mol Breed* 26: 145–161
- Gupta, P.K., Mir, R.R., Mohan, A., Kumar, J., 2008.** Wheat genomics: present status and future prospectus. *Int J Plant Genomics* 896: 451-341.
- Gupta, P.K., Rustgi, S., Kulwal, P.L., 2005.** Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: present status and future prospects. *Plant Mol Biol* 57: 461–485.
- Gupta, P.K., Varshney, R.K., 2000** The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113: 163–185.
- Haider, N., 2012** Evidence for the origin of the B genome of bread wheat based on chloroplast DNA. *Turk J Agric For* 36: 13-25.
- Hay, R.K.M., Walker, A.J., 1989.** An introduction to the physiology of crop yield. Longman Scientific & Technical - Science.
- Henry, A., Cal, A.J., Batoto, T.C., Torres, R.O., Serraj, R., 2012.** Root attributes affecting water uptake of rice (*Oryza sativa*) under drought. *J Exp Bot* 63: 4751-4763.



- Heschel, M.S., Riginos, C., 2005.** Mechanisms of selection for drought stress tolerance and avoidance in *Impatiens capensis* (Balsaminaceae). *Am J Bot* 92: 37–44.
- Hirayama, T., Shinozaki, K., 2010.** Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant J* 61: 1041–1052.
- Holdsworth, M. J., Finch-Savage, W.E., Grappin, P., Job, D., 2008.** Post-genomics dissection of seed dormancy and germination. *Trens Plant Scie* : 7–13.
- Hua, D., Wang, C., He, J., Liao, H., Duan, Y., Zhu, Z., Guo, Y., Chen, Z., Gong, Z., 2012.** A plasma membrane receptor kinase, GHR1, mediates abscisic acid- and hydrogen peroxide-regulated stomatal movement in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24: 2546–2561.
- Huang, S., Sirikhachornkit, A., Su, X.J., Faris, J., Gill, B., Haselkorn, R., Gornicki, P. 2002.** Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum/Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploid wheat. *Proc Natl Acad SciUSA* 99: 8133–8138.
- Huang, Z., Long, H., Wei, Y.M., Qi, P.F., Yan, Z.H., Zheng, Y.L., 2010.** Characterization and classification of  $\gamma$ -gliadin multigene sequences from *Aegilops* section *Sitopsis*. *Cereal Res Commun* 38: 1-14.
- Huey, R.B., Carlson, M., Crozier, L., Frazier, M., Hamilton, H., Harley, C., Hoang, A., Kingsolver, J.G., 2002.** Plants versus animals: Do they deal with stress in different ways? *Integr Comp Biol* 42: 415-423.
- International Grains Council, 2012.** World Grains Statistics 13-17.
- IPCC, 2007.** In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M., Miller, H.L., (eds), Cambridge Univ. Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Ishimaru, T., Hirabayashi, H., Ida, M., Takai, T., San-Oh, Y. A., Yoshinaga, S., Ando, I., Ogawa, T., Kondo, M., 2010.** A genetic resource for early-morning flowering trait of wild rice *Oryza officinalis* to mitigate high temperature-induced spikelet sterility at anthesis. *Ann Bot* 106: 515–520.

- Isidro, J., Álvaro, F., Royo, C., Villegas, D., Miralles, D.J., García del Moral, L.F., 2011.** Changes in duration of developmental phases of durum wheat caused by breeding in Spain and Italy during the 20th century and its impact on yield. . *J Exp Bot* 64: 143-160.
- Jaccoud, D., Peng, K., Feinstein, D., Kilian, A., 2001.** Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Res* 29: e25.
- Jackson, P., Robertson, M., Cooper, M., Hammer, G., 1996.** The role of physiology understanding in plant breeding; from a breeding perspective. *Field Crops Research* 49: 11-39.
- Jackson, R.B., Sperry, J.S., Dawson, T.E., 2000.** Root water uptake and transport: using physiological processes in global predictions. *Trends Plants Sci* 5: 482-488.
- Jaggard, K.W., Qi, A., Ober, E.S. 2010.** Possible changes to arable crop yields by 2050. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365: 2835–2851.
- Jannink, J.L., Bink, M.C., Jansen, R.C., 2001.** Using complex plant pedigrees to map valuable genes. *Trends Plant Sci* 6: 337-342.
- Jansen, R.C., 1993.** Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 135: 205-211.
- Jenks, M.A., Hasegawa, P.M., Mohan Jain, S., (eds.) 2007.** *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops.* Dordrecht, The Netherlands: Springer, 817.
- Jones, H.G., 1993.** Drought tolerance and water use efficiency. In: Smith, J.A.C., Griffiths, H., (eds) , *Water deficits: plant responses from cell to community.* Oxford: Bios, pp.193–203.
- Jones, H.G., 1993.** Drought Tolerance and Water-use Efficiency. In: Smith, J.A.C., Griffiths, H., (eds) *Water Deficits Plant Responses from Cell to Community.* Bios Scientific Publishers, Ltd., Oxford, pp: 193-204.
- Jones, H.G., 2004.** What is water use efficiency? In: Bacon MA (eds) , *Water use efficiency in plant biology.* Blackwell, Oxford, pp. 27–41.
- Jones, H.G., 2004.** What is Water use Efficiency?. In: Bacon, M.A., (ed) *Water use Efficiency in Plant Biology.* Blackwell Publishing, Oxford, UK., pp: 27-41.

- Jones, H.G., Corlett, J.E., 1992.** Current topics in drought physiology. *J Agric Sci* 119: 291–96.
- Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R., Dhawan, A.K., 2011.** Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 117: 309-34.
- Kao, C.H., Zeng, Z.B., Teasdale, R.D., 1999.** Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 152: 1203- 1216.
- Kashkush, K., Feldman, M., Levy, A.A., 2002.** Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. *Genetics* 160: 1651–1659.
- Khanna-Chopra, R., Srivalli, B., Ahlawat, Y., 1999.** Drought induces many forms of cysteine proteases not observed during natural senescence. *Biochem Biophys Res Commun* 255: 324–327.
- Kihara, H., 1919.** Uber cytologische Studien bei einige Getreidearten. I. Spezies-Bastarde des Weizems und Weizenroggen-Bastarde. *Bot Mag* 32: 17-38.
- Kiniry, J.R., 1993.** Nonstructural carbohydrate utilization by wheat shaded during grain growth. *Agron J* 85: 844–849.
- Korzun, V., Roder, M., Worland, A.J., Borner, A., 1997.** Interchromosomal mapping of genes for dwarfing (*Rht 12*) and vernalization response (*Vrn1*) in wheat by using RFLP and microsatellite markers. *Plant Breed* 116: 227–232.
- Kruglyak, L., 1999.** Prospects for whole genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat Genet* 22: 139-144.
- Kumar, P., Gupta, V.K., Misra, A.K., Modi, D.R., Pandey, B.K., 2009.** Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics J* 2: 141–162.
- Lanceras, J.C., Pantuwan, G., Jongdee, B., Toojinda, T., 2004.** Quantitative trait loci associated with drought tolerance at reproductive stage in rice. *Plant Physiol* 135: 384–399.
- Lander, E.S., Botstein, D., 1989.** Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199; erratum 136: 705 (1994).
- Lander, E.S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M.J., Lincoln, S.E., Newburg, L., 1987.** MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181

- Landserg, J.J., 1977.** Effects of weather on plant development. In: Landserg, J., Cutting, C.V., (eds) Environmental Effect on Crop Physiology. Academic Press, London, pp. 289-307.
- LEGISLAZIONE ITALIANA [WWW Document], 1967.** URL <http://www.normattiva.it/atto/caricaDettaglioAtto?atto.dataPubblicazioneGazzetta=1967-07-29&atto.codiceRedazionale=067U0580&currentPage=1>
- Letta, T., Maccaferri M., Badebo, A., Ammar, K., Ricci, A., Crossa, J., Tuberosa, R., 2013.** Searching for novel sources of field resistance to Ug99 and Ethiopian stem rust races in durum wheat via association mapping. *Theor Appl Genet* DOI: 10.1007/s00122-013-2050-8.
- Levitt, J., 1972.** Responses of Plants to Environmental Stresses. New York, NY: Academic Press 694-698.
- Lev-Yadun, S., Gopher, A., Abbo, S., 2000.** "The cradle of agriculture". *Science* 288: 1602–1603.
- Li, Y., Fan, C., Xing, Y., Jiang, Y., Luo, L., Sun, L., Shao, D., Xu, C., Li, X., Xiao, J., He, Y., Zhang, Q., 2011.** Natural variation in GS5 plays an important role in regulating grain size and yield in rice. *Nat Genet* 43: 1266-1269.
- Lobell, D.B., Schlenker, W., Costa-Roberts, J., 2011.** Climate trends and global crop production since 1980. *Science* 333: 616–620.
- Lopes, M.S., Reynolds, M.P., 2012.** Stay-green in spring wheat can be determined by spectral reflectance measurements (normalized difference vegetation index) independently from phenology. *J Exp Bot* 63: 3789–3798
- Loss, S.P., Siddique, K.H.M., 1994.** Morphological and physiological traits associated with wheat yield increases in Mediterranean environments. *Adv Agron* 52: 229-276.
- Loutfy, N., El-Tayeb, M.A., Hassanen, A.M., Moustafa, M.F., Sakuma, Y., Inouhe, M.J., 2012.** Changes in the water status and osmotic solute contents in response to drought and salicylic acid treatments in four different cultivars of wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Res* 125: 173-84.
- Ludlow, M.M., 1989.** Strategies of response to water stress. In: Kreeb, K.H., Richter, H., Minckley, T.M., (eds) Structural and functional responses to environmental stress. The Hague, the Netherlands: SPB Academic, pp 269–281.

- Luo, N., Liu, J., Yu, X., Jiang, Y., 2011.** Natural variation of drought response in *Brachypodium distachyon*. *Physiol Plant* 141: 19–29.
- Lynch, M., Walch, B., 1998. Genetics and Analysis of Quantitative Traits. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, 980 pp.**
- Maccaferri M, Sanguineti MC, Corneti S, Araus Ortega, J.L., Ben Salem, M., Bort, J., DeAmbrogio, E., Garcia del Moral, L.F., Demontis, A., El-Ahmed, A., et al., . 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., Francia, R., Ratti, C., Rubies-Autonell, C., Colalongo, C., Ferrazzano, G., Tuberosa, R., Sanguineti, M.C., 2012.** Genetic analysis of *Soil-Borne Cereal Mosaic Virus* response in durum wheat: evidence for the role of the major quantitative trait locus *QSBM.UBO-2BS* and of minor quantitative trait loci. *Mol Breed* 29: 973-988.
- 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. *J Exp Bot* 62:409–438.
- Maccaferri, M., Sanguineti, M.C., Natoli, V., Araus-Ortega, J.L., Ben Salem, M., Bort, J., Chenenaoui, S., DeAmbrogio, E., Garcia del Moral, L., De Montis, A., El-Ahmed, A., Maalouf, F., Machlab, H., Moragues, M., Motawaj, J., Nachit, M., Nserallh, N., Ouabbou, H., Royo, C., Tuberosa, R., 2006.** A panel of elite accessions of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) suitable for association mapping studies. *Plant Gen Res* 4: 79–85.
- Maccaferri, M., Sanguineti, M.C., Noli, E., Tuberosa, R., 2005.** Population structure and long-range linkage disequilibrium in a durum wheat elite collection. *Mol Breed* 15: 271–289.
- Mackay, T.F.C., 2001.** The genetic architecture of quantitative traits. *Ann Rev Genet* 35: 303-339.
- 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. *Mol Breed* 22:629–648.

- Marcus, A., Feeley J., Volcani, T., 1966.** Protein synthesis in imbibed seeds. III. Kinetics of amino acid incorporation, ribosome activation, and polysome formation. *Plant Physiol* 41: 1167-1172.
- Marone, D., Laidò, G., Gadaleta, A., Colasuonno, P., Ficco, D.B.M., Giancaspro, A., Giove, S., Panio, G., Russo, M.A., De Vita, P., Cattivelli, L., Papa, R., Blanco, A., Mastrangelo, A.M., 2012.** A high-density consensus map of A and B wheat genomes. *Theor Appl Genet* 25: 1619-1638.
- Martinez-Perez, E., Shaw, P., Moore, G., 2001.** The Ph1 locus is needed to ensure specific somatic and meiotic centromere association. *Nature* 411: 204-207.
- Matsuoka, Y., 2011** Evolution of polyploid *Triticum* wheats under cultivation: the role of domestication, natural hybridization and allopolyploid speciation in their diversification. *Plant Cell Physiol* 52: 750-764.
- Merah, O., Deleens, E., Al Hakimi, A., Monneveux, P., 2001.** Carbon isotope discrimination and grain yield variations among tetraploid wheat species cultivated under contrasting precipitation regimes. *J Agron Crop Sci* 186: 129-134.
- Miralles, D.J., Katz S.D., Colloca, A., Slafer, G.A., 1998.** Floret development in near isogenic wheat lines differing in plant height *Field Crops Res* 59: 21-30
- Miralles, D.J., Richards, R.A., 2000.** Responses of leaf and tiller emergence and primordium initiation in wheat and barley to interchanged photoperiod. *Ann Bot* 85: 655-663.
- Miralles, D.J., Slafer, G.A., 1995.** Yield, biomass and yield components in dwarf, semidwarf and tall isogenic lines of spring wheat under recommended and late sowing dates. *Plant Breed* 114: 392-396.
- Mittlerand, R., Blumwald, E., 2010.** Genetic Engineering for Modern Agriculture: Challenges and Perspectives. *Annu Rev Plant Biol* 61: 443-462.
- Moinuddin, A., Fischer, R.A., Sayre, K.D., Reynolds, M.P., 2005.** Osmotic adjustment in wheat in relation to grain yield under water deficit environments. *Agron J* 97: 1062-1071.
- Monneveux, P., Jing, R., Misra, S.C., 2012.** Phenotyping for drought adaptation in wheat using physiological traits. *Front Physiol* 3: 429.

- Monneveux, P., Ribaut, J.M., 2006.** Secondary traits for drought tolerance improvement in cereals. In: Ribaut, J.M. (ed) Drought Adaptation in Cereals. The Haworth Press Inc., Binghamtown, NY, USA, pp 97–144.
- 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 Udl-IRTA, ICARDA, CIMMYT, Zaragoza. Options Méditerranéennes, Series A, 40: 71-83.
- Morgan, J.M., 1984.** Osmoregulation and water stress in higher plants. *Ann Revi Plant Physiol* 35:299–319.
- Morgan, J.M., 2000.** Increases in grain yield of wheat by breeding for an osmoregulation gene: relationship to water supply and evaporative demand. *Aust J Agric Res* 51: 971–978.
- Morison, J.I.L., Baker, N.R., Mullineaux, P.M., Davies, W.J., 2008.** Improving water use in crop production. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363: 639–658.
- Morison, J.L., Gifford, R.M., 1994a.** Plant growth and water use with limited water supply in high CO<sub>2</sub> concentrations. I Leaf area, water use and transpiration. *Aust J Plant Physiol* 11: 361–374.
- Morison, J.L., Gifford, R.M., 1994b.** Plant growth and water use with limited water supply in high CO<sub>2</sub> concentrations. II. Plant dry weight, partitioning and water use efficiency. *Aust J Plant Physiol* 11: 375–384.
- Mory, Y.Y., Chen, D., Sarid, S., 1972.** Onset of deoxyribonucleic acid synthesis in germinating wheat embryos. *Plant Physiol* 49: 20–23.
- Mullis, B., Faloona, F. A., 1987.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth Enzym* 155: 335-350.
- Munns, R., 2002.** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Envir* 25: 239–250.
- Munns, R., Tester, M., 2008.** Mechanisms of salinity tolerance. *Ann Rev Plant Biol* 59: 651–681.

**Murphy, R., Ortega, J.K.E., 1995.** A New Pressure Probe Method to Determine the Average Volumetric Elastic Modulus of Cells in Plant Tissue. *Plant Physiol* 107:995-1005.

**NDSU Agriculture Communication [WWW Document], 2007.** URL <http://www.ag.ndsu.edu/news/columns/biofuels-economics/new-energy-economics-is-biofuel-the-most-valuable-component-of-a-cellulosic-biorefinery/>

**Nelson, D., Repetti, P., Adams, T., Creelman, R., Wu, J., Warner, D., Anstrom, D., Bensen, R., Castiglioni, P., Donnarummo, M., Hinchey, B., Kumimoto, R., Maszle, D., Canales, R., Krolikowski, K., Dotson, S., Gutterson, N., Ratcliffe, O., Heard, J., 2007.** Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 104: 16450–16455.

**Nendel, C., Wieland, R., Mirschel, W., Specka, X., Guddat, C., Kersebaum, K.C., 2013.** Simulating regional winter wheat yields using input data of different spatial resolution. *Field Crops Res* 145: 67–77

**Neter, J., Kutner, M.H., Nachtshiem, C.J., Wasserman, W., 1997.** Applied linear statistical models 4<sup>th</sup> ed., Irwin, Chicago, Illinois, USA.

**Ni, F.T., Chu, L.Y., Shao, H.B., Liu, Z.H., 2009.** Gene Expression and Regulation of Higher Plants Under Soil Water Stress. *Curr. Genomics* 10: 269-280.

**Nicotra, A.B., Atkin, O.K., Bonser, S.P., Davidson, A.M., Finnegan, E.J., Mathesius, U., Poot, P., Purugganan, M. D., Richards, C. L., Valladares, F., van Kleunen, M., 2010.** Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends Plant Sci* 15: 684–692.

**Nilsson-Ehle, H., 1909.** Kreuzung Untersuchungen an Hafer und Weizen. *Acta Universitatis Lundensis* 5 (2) pp 1-122.

**Nio, S.A., Cawthray, G.R., Wade, L.J., Colmer, T.D., 2011.** Pattern of solutes accumulated during leaf osmotic adjustment as related to duration of water deficit for wheat at the reproductive stage. *Plant Physiol Biochem* 49: 1126-1137.

**Nio, S.A., Cawthray, G.R., Wade, L.J., Colmer, T.D. 2011.** Pattern of solutes accumulated during leaf osmotic adjustment as related to duration of water deficit for wheat at the reproductive stage. *Plant Physiol Biochem* 49: 1126–1137.



- Nizam Uddin, M., Marshall, D.R., 1989.** Effects of dwarfing genes on yield and yield components under irrigated and rainfed conditions in wheat (*Triticum aestivum* L.) *Euphytica* 42: 127–134.
- Nonogaki, H., Bassel, G.W., Bewley, J.D., 2010.** Germination – still a mystery. *Plant Science* 179:574–581.
- Oetting, W.S., Lee, H., Flanders, D., Weisner, G., Sellers, T., King, R.A., 1995.** Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. *Genomics* 30: 450–458.
- Ortega, J.K.E., 2010.** Plant cell growth in tissue. *Plant Physiol* 154: 1244–1253.
- Otegui, M.E., Slafer, A., 2004.** Increasing cereal yield potential by modifying developmental traits. In: Fischer, T., Turner, N., Angus, J., McIntyre, L., Robertson, M., Borrell, A., Lloyd, D., (eds) , *New Directions for a Diverse Planet. Proceedings for the 4<sup>th</sup> International Crop Science Congress, Brisbane, Australia.* URL [http://www.cropscience.org.au](http://www.cropsscience.org.au)
- Palmer, J., 2001.** *How to Brew.* Defenestrative Pub Co. p. 233.
- Passioura, J.B., 1977.** Grain yield, harvest index and water use of wheat. *J Aust Inst Agric Sci* 43: 117–120.
- Passioura, J.B., 2002.** Environmental biology and crop improvement. *Funct Plant Biol* 29: 537–546.
- Passioura, J.B., 2006.** Increasing crop productivity when water is scarce—from breeding to field management. *Agric Water Manage* 80:176-196.
- Passioura, J.B., 2007.** The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives. *J Exp Bot* 58: 113–117.
- Passioura, J.B., 2010.** Scaling up: the essence of effective agricultural research. *Funct Plant Biol* 37: 585–591.
- Passioura, J.B., 2012.** Phenotyping for drought tolerance in grain crops: when is it useful to breeders? *Funct Plant Biol* 39: 851–859.
- Passioura, J.B., Angus, J.F., 2010.** Improving productivity of crops in water-limited environments. *Adv Agron* 106: 37–75.

- Pearce, S., Saville, R., Vaughan, S.P., Chandler, P.M., Wilhelm, E.P., Sparks, C.A., Al-Kaff, N., Korolev, A., Boulton, M.I., Phillips, A.L., 2011.** Molecular characterization of *Rht-1* dwarfing genes in hexaploid wheat. *Plant Physiol* 57: 1820-1831.
- Pedró, A., Savin, R., Salfer, G.A., 2012.** Crop productivity as related to single-plant traits at key phenological stages in durum wheat. *Field Crops Res* 138: 42-51.
- Peleg, Z., Fahima, T., Krugman, T., Abbo, S., Yakir, D., Korol, A.B., Saranga, Y., 2009.** Genomic dissection of drought resistance in durum wheat x wild emmer wheat recombinant inbred line population. *Plant Cell Environ* 32: 758-79.
- Peleg, Z., Apse, M.P., Blumwald, E., 2011.** Engineering salinity and water-stress tolerance in crop plants: Getting closer to the field. *Adv Bot Res* 57: 405-443.
- Peleg, Z., Fahima, T., Korol, A.B., Abbo, S., Saranga, Y., 2011.** Genetic analysis of wheat domestication and evolution under domestication. *J Exp Bot* 62: 5051-5061.
- Penman, H.L., Schofield, R.K., 1951.** Some physical aspects of assimilation and transpiration. *Symp Soc Exp Biol* 5: 115-129.
- Petersen, G., Seberg, O., Yde, M., Berthelsen, K., 2006.** Phylogenetic relationships of *Triticum* and *Aegilops* and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat *Triticum aestivum*. *Mol Phylogenet Evol* 39: 70-82.
- Pfeiffer, W.H., Sayre, K.D., Reynolds, M.P., 2000.** Enhancing genetic grain yield potential and yield stability in durum wheat. In: Royo, C; Nachit, M.M.; Fonzo, N., Araus, J.L., (eds) *Options Méditerranéennes, Serie A, Séminaires Méditerranéens*. IAMZ, Zaragoza, Spain, 40: 83-93.
- Powell, N., Ji, X., Ravash, R., Edlington, J., Dolferus, R., 2012.** Yield stability for cereals in a changing climate. *Funct Plant Biol* 39: 539-552.
- Quarrie, S., Stoja, J., 1999.** Improvement drought resistance in small-grained cereals: A case study, progress and prospects. *Plant Growth Regul* 29: 1-29.
- Quarrie, S., Whitford, P., Appleford, N., Wang, T., Cook, S., Henson, I., Loveys, B., 1988.** A monoclonal antibody to (S)- abscisic acid: its characterization and use in a radioimmunoassay for measuring abscisic acid in crude extracts of cereal and lupin leaves. *Planta* 173: 330-339.

- Quarrie, S.A., 1991.** Implications of genetic differences in ABA accumulation for crop production. In: Davies, W.J., Jones, H.G., (eds) Abscisic Acid: Physiology and Biochemistry. Bios Scientific Publishers, Oxford, UK pp 227–243.
- Rayburn, A.L., Gill, B.S., 1986.** Isolation of D-genome-specific repeated DNA sequences from *Aegilops squarrosa*. Plant Mol Biol Rep 4: 102-109.
- Rebetzke, G.J., Condon, A.G., Farquhar, G.D., Appels, R., Richards, R.A., 2008.** Quantitative trait loci for carbon isotope discrimination are repeatable across environments and wheat mapping populations Theor Appl Genet 118: 123-137.
- Rebetzke, G.J. , Chapman, .S.C , McIntyre, L. , Richards, R.A. , Condon, A.G., Watt, M. , van Herwaarden, A.F., 2009.** Grain yield improvement in water-limited environments. In: Carver, B.F., (ed) Wheat: science and trade. Wiley-Blackwell, London, pp 215–249.
- Rebetzke, G.J., Condon, A.G., Richards, R.A., Farquhar, G.D., 2002.** Selection for reduced carbon isotope discrimination increases aerial biomass and grain yield of rainfed bread wheat. Crop Sci 42: 739–745.
- Rebetzke, G.J., Ellis, M.H., Bonnett, D.G., Condon, A.G., Falk, D., Richards, R.A., 2011.** The *Rht13* dwarfing gene reduces peduncle length and plant height to increase grain number and yield of wheat. Field Crops Res 124: 323-331.
- Rebetzke, G.J., Ellis, M.H., Bonnett, D.G., Richards, R A., 2007.** Molecular mapping of genes for coleoptile growth in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor Appl Genet 114: 1173–1183.
- Reif, J.C., Gowda, M., Maurer, H.P., Longin, C.F.H., Korzun, V., Ebmeyer, E., Bothe, R., Pietsch,C., Würschum, T., 2011.** Association mapping for quality traits in soft winter wheat. Theor Appl Genet 122:961–970.
- Reynolds, M., Foulkes, J., Furbank, R., Griffiths, S., King, J., Murchie, E., Parry, M., Slafer, G., 2012.** Achieving yield gains in wheat. Plant Cell Environ 35: 1799–1823.
- Reynolds, M., Manes, Y., Izanloo, A., Langridge, P., 2011.** Raising yield potential of wheat. I. Overview of a consortium approach and breeding strategies. J Exp Bot 62: 439–452.
- Reynolds, M., Tuberosa, R., 2008.** Translational research impacting on crop productivity in drought-prone environments. Curr Opin Plant Biol 11: 171–179.

- Reynolds, M.P., Foulkes, M.J., Slafer, G.A., Berry, P.M., Parry, M.A.J., Snape, J.W., Angus, W.J., 2009.** Raising yield potential in wheat. *J Exp Bot* 60: 1899-1918.
- Richard, N., 2002.** *Booze: The Drinks Bible for the 21st Century.* Octopus Publishing Group - Cassell Illustrated pp 56-60.
- Richards, R.A., 1992a.** The Effect of Dwarfing Genes in Spring Wheat in Dry Environments. I. Agronomic Characteristics. *Aust. J Agr Res* 43: 517-522.
- Richards, R.A., 1992b.** The Effect of Dwarfing Genes in Spring Wheat in Dry Environments. II. Growth, Water Use and Water-use Efficiency. *Water. Aust. J Agr Res* 43: 529-539.
- Richards, R.A., 1996.** Defining selection criteria to improve yield under drought. *Plant Growth Regul* 20: 157-166.
- Richards, R.A., 2000.** Selectable traits to increase crop photosynthesis and yield of grain crops. *J Exp Bot* 51: 447-458.
- Richards, R.A., 2006.** Physiological traits used in the breeding of new cultivars for water-scarce environments. *Agric Water Manage* 80: 197-211.
- Richards, R.A., Rebetzke, G., Condon, A., van Herwaarden, A., 2002.** Breeding opportunities for increasing the efficiency of water use and crop yield in temperate cereals. *Crop Sci* 42: 111-121.
- Richards, R.A., Watt, M., Rebetzke, G.J., 2007.** Physiological traits and cereal germplasm for sustainable agricultural systems. *Euphytica* 154: 409-425.
- Rijsberman, F.R., 2006.** Water scarcity: fact or fiction? *Agric Water Manage* 80: 5-22.
- Risch, N., Merikangas, K., 1996.** The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273: 1516-1517.
- Rizhsky, L., Liang, H.J., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S, Mittler, R., 2004.** When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol* 134: 1683-1696.
- Robin, S., Pathan, M.S., Courtois, B., Lafitte, R., Carandang, C., Lanceras, S., Amante, M., Nguyen, H.T., Li, Z., 2003.** Mapping osmotic adjustment in an advanced back-cross inbred population of rice. *Theor Appl Genet* 107: 1288-1296.

- Röder, M.S., Korzun, V., Wandehake, K., Planschke, J., Tixier, M.H., Leroy, P., Ganal, M.W., 1998.** A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149: 2007–2023.
- Rodrigues, M.L., Pacheco, C.A., Chaves, M.M., 1995.** Soil/plant relations, root distribution and biomass partitioning in *Lupinus albus* L. under drought conditions. *J Exp Bot* 46: 947-956.
- Rosegrant, M.W., Ringler, C., Zhu, T.J., 2009.** Water for agriculture: maintaining food security under growing scarcity. *Annu Rev Environ Resour* 34:205–222.
- Royo, C., Alvaro, F., Martos, V., Ramdani, A., Isidro, J., Villegas, D., Garcia del Moral, L.F., 2007.** Genetic changes in durum wheat yield components and associated traits in Italy and Spain during the 20th century. *Euphytica* 155: 259–270.
- Royo, C., Martos, V., Ramdani, A., Villegas, D., Rharrabti, Y., del Moral, L.F.G., 2008.** Changes in yield and carbon isotope discrimination of Italian and Spanish durum wheat during the 20th century. *Agronomy J* 100: 352–360.
- Runemark, H., Heneine, W.K., 1968.** *Elymus* and *Agropyron*, a Problem of Generic Delimitation. *Bot Not* 121: 51-79.
- Sahgai-Marroof, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A., Allard, R.W., 1984.** Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 1757-1761.
- Sakamoto, S., 1973.** Patterns of phylogenetic differentiation in the tribe *Triticeae*. *Seiken Zihō* 24: 11-31.
- Salekdeh, G.H., Reynolds, M., Bennett, J., Boyer, J., 2009.** Conceptual framework for drought phenotyping during molecular breeding. *Trends Plant Sci* 14: 488–496.
- Salina, E.A., Lim, K.Y., Badaeva, E.D., Shcherban, A.B., Adonina, I.G., Amosova, A.V., Samatadze, T.E., Vatolina, T.Y., Zoshchuk, S.A., Leitch, A.R., 2006.** Phylogenetic reconstruction of *Aegilops* section *Sitopsis* and the evolution of tandem repeats in the diploids and derived wheat polyploids. *Genome* 49: 1023-1035.
- Salvi, S., Tuberosa, R., 2005.** To clone or not to clone plant QTLs: present and future challenges. *Trends Plant Sci* 10: 297-304.

- Satagopan, J.M., Yandell, B.S., Newton, M.A., Osborn, T.C. A., 1996.** Bayesian approach to detect quantitative trait loci using Markov chain Monte Carlo. *Genetics* 144: 805-816.
- Sax, K., 1922.** Sterility in wheat hybrids. II. Chromosome behaviour in partially sterile hybrids. *Genetics* 7: 513-522.
- Sax, K., 1923.** The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 8: 552-560.
- Schnyder, H., 1993.** The role of carbohydrate storage and redistribution in the source-sink relations of wheat and barley during grain filling – a review. *New Phytol* 123: 233–245.
- Scholz, F.G, Bucci, S.J., Arias, N., Meinzer, F.C., Goldstein, G., 2012.** Osmotic and elastic adjustments in cold desert shrubs differing in rooting depth: coping with drought and subzero temperatures. *Oecologia* 170: 885-897.
- Schork, N.J., 1993.** Extended multipoint identity-by-descent analysis of human quantitative traits: efficiency, power, and modeling considerations. *Am J Hum Genet* 53: 1306-1313.
- Scoffoni, C., Rawls, M., McKown, A., Cochard, H., Sack, L., 2011.** Decline of leaf hydraulic conductance with dehydration: relationship to leaf size and venation architecture. *Plant Physiol* 156: 832–843.
- Scofield, G.N., Ruuska, S.A., Aoki, N., Lewis, D.C., Tabe, L.M., Jenkins, C.L.D., 2009.** Starch storage in the stems of wheat plants: localization and temporal changes. *Ann Bot* 103: 859–868.
- Seki, M., Umezawa, T., Urano, K., Shinozaki, K., 2007.** Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Curr Opin Plant Biol* 10: 296–302.
- Semagn, K., Bjørnstad, Å., Xu, Y., 2010.** The genetic dissection of quantitative traits in crops. *Electron J Biotechnol* 13 (5): 14.
- Semagn, K.; Bjørnstad, Å., Ndjioudjop, M.N., 2006.** An overview of molecular marker methods for plants. *Afr J Biotechnol* 5: 2540–2568.
- Serraj, R., McNally, K.L., Slamet–Loedin, I., Kohli, A., Haefele, S.M., Atlin, G., Kumar, A., 2011.** Drought resistance improvement in rice: an integrated genetic and resource management strategy. *Plant Prod Sci* 14: 1–14.

- Sham, P., Bader, J. S., Craig, I., O'Donovan, M., Owen, M., 2002.** DNA Pooling: a tool for large-scale association studies. *Nature Rev Genet* 3: 862–871.
- Shao, H.B., Chu, L.Y., Jaleel, C.A., Manivannan, P., Panneerselvam, R., Shao, M.A., 2009.** Understanding water deficit stress-induced changes in the basic metabolism of higher plants - biotechnologically and sustainably improving agriculture and the ecoenvironment in arid regions of the globe. *Crit Rev Biotechnol* 29: 131-51.
- Sharp, R.E., Poroyko, V., Hejlek, L.G., Spollen, W.G., Springer, G.K., Bohnert, H.J., Nguyen, H.T., 2004.** Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *J Exp Bot* 55: 2343–235.
- Sharp, R.E., Poroyko, V., Hejlek, L.G., Spollen, W.G., Springer, G.K., Bohnert, H.J., Nguyen, H.T., 2004.** Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *J Exp Bot* 55: 2343–2351.
- Shiklomanov, I.A., Rodda, J.C., 2003.** World water resources at the beginning of the 21st Century. International hydrology series. Cambridge University Press; Cambridge, UK: pp. 369 - 384.
- Sillanpää, M.J., Arjas, E., 1998.** Bayesian mapping of multiple quantitative trait loci from incomplete inbred line cross data. *Genetics* 148: 1373-1388.
- Simova-Stoilova, L., Vaseva, I., Grigorova, B., Demirevska, K., Feller, U., 2010.** Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. *Plant Physiol Biochem* 48: 200–206.
- Sinclair, T.R., 2011.** Challenges in breeding for yield increase for drought. *Trends Plant Sci* 16: 289–293.
- Sinclair, T.R., Purcell, L.C., Sneller, C.H., 2004.** Crop transformation and the challenge to increase yield potential. *Trends Plant Sci* 9: 70–75.
- Sinclair, T.R., Zwieniecki, M.A., Holbrook, N.M., 2008.** Low leaf hydraulic conductance associated with drought tolerance in soybean. *Physiol Plant* 132:446-451.
- Slafer, G.A., 2003.** Genetic basis of yield as viewed from a crop physiologist's perspective . *Ann Appl Biol* 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 Res* 3: 351-367.

- Slafer, G.A., Araus, J.L., Richards, R.A., 1999.** Promising traits for future breeding to increase wheat yield. In: Slafer, G.A., Satorre, E.H., (eds) , *Wheat Ecology and Physiology of Yield Determination*. The Haworth Press, Inc., Binghamtown, NY, USA, pp 379-415.
- Slafer, G.A., Araus, J.L., Royo, C., Garcia Del Moral, L.F., 2005.** Promising eco-physiological traits for genetic improvement of cereal yields in Mediterranean environments. *Ann Appl Biol* 146: 61–70.
- 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. *Aust J Plant Physiol* 21: 393-426.
- Soller, M.T., Brody, T., Genizi, A., 1876.** On the power of experimental designs for detection of linkage between marker loci and quantitative loci in crosses between inbred lines. *Theor Appl Genet* 47: 35-39.
- Somers, D.J., Isaac, P., Edwards, K., 2004.** A high density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 109: 1105-1114.
- Song, Q.J., Shi, J.R., Singh, S., Fickus, E.W., Costa, J.M., Lewis, J., Gill, B.S., Ward, R., Cregan, P.B., 2005.** Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. *Theor Appl Genet* 110: 550–560.
- Southern, E.M., 1975.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis *J Mol Biol* 98:503-517.
- Sreenivasulu, N., Schnurbusch, T., 2012.** A genetic playground for enhancing grain number in cereals. *Trends Plant Sci* 17: 91-101.
- Stam, P., van Ooijen, J.W., 1995.** JoinMap™ Version 2.0: software for the calculation of genetic linkage maps, CPRO-DLO, Wageningen, Netherlands.
- Sultan, S.E., 1987.** Evolutionary implications of phenotypic plasticity in plants. *Evol Biol* 21: 127-178.
- Syngenta [WWW Document], 2012.** Cereali: come produrre qualità in quantità. URL [http://www3.syngenta.com/country/it/it/media/libreria\\_news-eventi/Pagine/cereali\\_producere\\_qualit%C3%A0\\_in\\_quantit%C3%A0.aspx](http://www3.syngenta.com/country/it/it/media/libreria_news-eventi/Pagine/cereali_producere_qualit%C3%A0_in_quantit%C3%A0.aspx)



- Tambussi, E.A., Bort, J., Araus, J.L., 2007.** Water use efficiency in C3 cereals under Mediterranean conditions: a review of physiological aspects. *Ann Appl Biol* 150: 307–321.
- Tardieu, F., 2012.** Any trait or trait-related allele can confer drought tolerance: just design the right drought scenario. *J Exp Bot* 63: 25–31.
- Tardieu, F., Tuberosa, R., 2010.** Dissection and modelling of abiotic stress tolerance in plants. *Curr Opin Plant Biol* 13: 206-212.
- Tautz, D., 1989.** Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res* 17: 6463-6471.
- Tautz, D., Trick, M., Dover, G.A., 1986.** Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature* 322: 652-656.
- Temnykh, S., DeClerck, G., Lukashova, A., Lipovich, L., Cartinhour, S., McCouch, S., 2001.** Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, and genetic marker potential. *Genome Res* 11: 1441-1452.
- Tester, M., Langridge, P., 2010.** Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science* 327: 818–822.
- Teulat, B., This, D., Khairallah, M., Borries, C., Ragot, C., Sourdille, P., Leroy, P., Monneveux, P., Charrier, A 1998.** Several QTLs involved in osmotic-adjustment trait variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 96: 688-698.
- Thoday, J.M., 1961.** Location of polygenes. *Nature* 4786: 368-370.
- Touchette, B.W., Iannacone, L.R, Turner, G.E., Frank, A.R., 2007.** Drought tolerance versus drought avoidance: a comparison of plant–water relations in herbaceous wetland plants subjected to water withdrawal and repletion. *Wetlands* 27: 656–667.
- Tsunewaki, K., 2009.** Plasmon analysis in the *Triticum-Aegilops* complex. *Breed Sci* 59: 455–470.
- Tuberosa R., Salvi S. 2006.** Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. *Trends Plant Sci* 11: 405–412.

- Tuberosa, R., 2012.** Phenotyping for drought tolerance of crops in the genomics era. *Front Physiol* 3: 347.
- Tuberosa, R., Phillips, R.L., Gale, M., (eds) , 2005.** In the wake of the double helix: from the green revolution to the gene revolution. Bologna: Avenue Media. Proceedings of an international congress held at the University of Bologna, IT, 27–31 May 2003.
- 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. *Ann Bot* 89: 941–963
- Turner, N.C., 1979.** Drought resistance and adaptation to water deficits in crop plant. In: John Wiley and Sons, (ed) *Stress physiology in crop plant*. New York, USA pp 343-372.
- Turner, N.C., 1986.** Crop Water Deficits: A Decade of Progress. *Adv Agron* 39:1–51.
- Turner, N.C., 1997.** Further progress in crop water relations. *Adv Agron* 528: 293–338
- Turner, N.C., Palta, J.A., Shrestha, R., Ludwig, C., Siddique, K.H.M., Turner, D.W., 2007.** Carbon isotope discrimination is not correlated with transpiration efficiency in three cool-season grain legumes (Pulses). *J Integr Plant Biol* 49: 1478–1483.
- Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T., Shinozaki, K., 2009.** Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 17588–17593.
- UNIS, 2000.** Secretary General address to Developing Countries ‘South Summit’. UN Information Service Press Release, 13 April 2000. See [www.unis/unvienna.org/unis/pressrels/2000/sg2543.html](http://www.unis/unvienna.org/unis/pressrels/2000/sg2543.html).
- USDA, 2006.** National Nutrient Database for Standard Reference, Release 19, 2006.
- Vaezi, B., Bavei, V., Shiran, B., 2010.** Screening of barley genotypes for drought tolerance by agro-physiological traits in field condition. *Afr J Agric Res* 5: 881-892.
- Valliyodan, B., Nguyen, H.T., 2006.** Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Curr Opin Plant Biol* 9: 189–195.
- Van Ooijen, J.W., 2006.** JoinMap 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma BV Wageningen, Netherlands.

- Varshney, R.K., Graner, A., Sorrells, M.E., 2005.** Genic microsatellite markers in plants: Features and applications. *Trends Biotechnol* 23: 48–55.
- Vassileva, V., Demirevska, K., Simova-Stoilova, L., Petrova, T., Tsenov, N., Feller, U., 2012.** Long-term field drought affects leaf protein pattern and chloroplast ultrastructure of winter wheat in a cultivar-specific manner. *J Agron Crop Sci* 198: 104–117.
- Viets, F.G., 1962.** Fertilizers and the efficient use of water. *Adv Agron* 14: 223–264
- Viggiani, P., 2009.** Botanica. In: Viggiani, P., D'Egidio, M., Saviotti, G.B., (eds) *Il grano*. Script pp 8-14.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Vande Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., 1995.** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407-4414.
- VSN International, 2012.** GenStat for Windows, 15<sup>th</sup> Edn. Hemel Hempstead: VSN International. Web page: GenStat.co.uk.
- Weber, J.L., Wong, C., 1993.** Mutation of human short tandem repeats. *Hum Mol Genet* 2: 1123-1128.
- Wenzl, P., Carling, J., Kudrna, D., Jaccoud, D., Huttner, E., Kleinhofs, A., Kilian, A., 2004.** Diversity arrays technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:9915–9920.
- Wenzl, P., Li, H., Carling, J., Zhou, M., Raman, H., Paul, E., Hearnden, P., Maier, C., Xia, L., Caig, V., Ovesná, J., Cakir, M., Poulsen, D., Wang, J., Raman, R., Smith, K.P., Muehlbauer, G.J., Chalmers, K.J., Kleinhofs, A., Huttner, E., Kilian, A., 2006** A high-density consensus map of barley linking DArT markers to SSR and RFLP loci and agronomic traits. *BMC Genomics*. 7: 206–228.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalsky, J.A., Tingey, S.V., 1990.** DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535.
- Witcombe, J.R., Hollington, P.A., Howarth, C.J., Reader, S., Steele, K.A., 2008.** Breeding for abiotic stresses for sustainable agriculture. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363: 703–716.

- Worland, A.J., 1999.** The importance of Italian wheats to worldwide varietal improvement. *J Genet.& Breed* 53: 165-173.
- Xiang, J.J., Zhang, G.H., Qian, Q., Xue, H.W., 2012.** Semi-rolled *leaf1* encodes a putative glycosylphosphatidylinositol-anchored protein and modulates rice leaf rolling by regulating the formation of bulliform cells. *Plant Physiol* 159: 1488-1500.
- Xu, X., Yuan, H., Li, S., Monneveux, P., 2007.** Relationship between carbon isotope discrimination and grain yield in spring wheat under different water regimes and under saline conditions in the Ningxia Province (North-west China). *J Agron Crop Sci* 193: 422-434.
- XU, Y., 1997. Quantitative trait loci: separating, pyramiding, and cloning. Plant Breed Rev 15: 85-139.**
- XU, Y., 2010. Molecular plant breeding. Wallingford, UK, CABI,. 736 p.**
- Xu, Y., Crouch, J.H., 2008.** Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. *Crop Sci* 48: 391-407.
- Xue, Y., Wang, Z., Yang, J., Zhang, J., 2009.** An alternate wetting and moderate soil drying regime improves root and shoot growth in rice. *Crop Sci* 49: 2246-2260.
- Yang, F., Miao, L.F., 2010.** Adaptive responses to progressive drought stress in two poplar species originating from different altitudes. *Silva Fenn* 44: 23-37.
- Yang, J., Zhang, J., Wang, Z., Liu, L., Zhu, Q., 2003.** Postanthesis water deficiencies enhance grain filling in two-line hybrid rice. *Crop Sci* 43: 2099-2108.
- Yang, J., Zhang, J.H., 2006.** Grain filling of cereals under soil drying. *New Phytol* 169: 223-236.
- Yano, M., Kojima, S., Takahashi, Y., Lin, H., Sasaki, T., 2001.** Genetic control of flowering time in rice, a short-day plant. *Plant Physiol* 127: 1425-1429.
- Young, A.L., 2009.** Finding the balance between food and biofuels. *Environ Sci Pollut Res* 16: 117-119.
- Zadoks, J.C., Chang, T.T., Konzak, C.F., 1974.** A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res* 14: 415-421.

- Zeng, Z.B., 1993.** Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping Quantitative Trait Loci. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 90: 10972 – 10976.
- Zeng, Z.B., 1994.** Precision mapping of Quantitative Trait Loci. *Genetics* 136: 1457-1468.
- Zeng, Z.B., Kao, C.H., Basten, C.J., 1999.** Estimating the genetic architecture of quantitative traits. *Genet Res* 74: 279 – 289.
- Zhang, J., Davies, W.J., 1990.** Does ABA in the xylem control the rate of leaf growth in soil dried maize and sunflower plants? *J Exp Bot* 41: 1125–1132.
- Zhang, L., Liu, D., Lan, X., Zheng, Y., Yan, Z., 2008.** A synthetic wheat with 56 chromosomes derived from *Triticum turgidum* and *Aegilops tauschii*. *J Appl Genet* 49: 41-44.
- Zlatev, Z.S., 2005.** Effects of water stress on leaf water relations of young bean plants. *J Centr Europ Agric* 6:5–14.