



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DELLA
TUSCIA

DIBAF

*DIPARTIMENTO PER LA INNOVAZIONE NEI SISTEMI
BIOLOGICI AGROALIMENTARI E FORESTALI*

PROGETTO DI RICERCA

**Caratterizzazione genetico/molecolare di varietà locali di “grani antichi” coltivate
nel Lazio**

**Soggetto proponente: Dipartimento per l’innovazione dei sistemi biologici,
agroalimentari e forestali (DIBAF), dell’Università degli Studi della Tuscia di
Viterbo.**

Responsabile scientifico: Prof. Mario Ciaffi

Prof. Mario Ciaffi

TITOLO DEL PROGRAMMA DI RICERCA

“Caratterizzazione genetico/molecolare di varietà locali di “grani antichi” coltivate nel Lazio”

Soggetto proponente: Dipartimento per l’innovazione dei sistemi biologici, agroalimentari e forestali (DIBAF), dell’Università degli Studi della Tuscia di Viterbo.

Responsabile scientifico: Prof. Mario Ciaffi

PREMESSA

Nell’ambito delle attività del progetto “Casa delle Sementi della Valle dell’Aniene - progetto pilota per il recupero e la gestione partecipata della riproduzione delle risorse genetiche autoctone”, oggetto dell’Accordo Quadro, stipulato da ARSIAL, DIBAF, X Comunità Montana della Valle dell’Aniene e Parco Naturale Regionale dei Monti Simbruini, accogliendo le istanze provenienti dal territorio e anche al fine di valutare geneticamente diverse accessioni di *Triticum* collezionate da ARSIAL nel predetto comprensorio, ARSIAL e DIBAF hanno elaborato il progetto “Caratterizzazione genetico/molecolare di varietà locali di “grani antichi” coltivate nel Lazio”. Infatti tra gli obiettivi del Progetto “Casa delle Sementi della Valle dell’Aniene” si prevede la reintroduzione di varietà, non commerciali di cereali, al fine di valorizzare i numerosi prodotti tipici da forno (pane, paste e dolci), legati alla tradizione ed alla storia del territorio. Nella Valle dell’Aniene, in passato era molto diffusa la coltivazione di cereali (grano, orzo e mais), come testimoniato dalle Cronache archiviate nella biblioteca dei Monasteri Benedettini di Subiaco e dalla presenza di numerosi “vecchi molini” nelle aree: Mola Vecchia di Jenne, Molino di Filettino, Molino di Trevi, Molino di Jenne, Molini di Subiaco.

I numerosi prodotti trasformati, come dolci, pane e pasta, legati alla storia e alla tradizione locale, che rientrano nell’elenco dei Prodotti Agroalimentari Tradizionali (PAT), potrebbero essere preparati utilizzando farine e semole ottenute da varietà non commerciali di frumento tenero e duro, da reintrodurre nell’areale e da coltivare secondo criteri e tecniche connesse con l’agricoltura biologica, allo scopo di garantire una filiera interamente certificata.

Inoltre il Piano settoriale 2018-2020, indica la necessità di avviare indagini di caratterizzazione genetico molecolare di tutte le accessioni di *Triticum* collezionate da ARSIAL, anche al fine della loro iscrizione, come “varietà da conservazione”, al Registro Nazionale.

Dal punto di vista botanico il termine grani o frumenti include diverse specie della famiglia delle Graminaceae (Poaceae) tutte appartenenti al genere *Triticum*. Questo genere comprende circa 20 specie, sia coltivate che selvatiche, con un diverso livello di ploidia: specie diploidi, tetraploidi ed esaploidi, con un numero cromosomico di base per ognuno dei genomi presenti nelle specie pari a 7 (Dubcowky and Dvorak, 2007). Limitandoci ai frumenti coltivati più importanti, tra le specie diploidi ($2n=14$) abbiamo il monococco (*Triticum monococcum*) che fu il primo frumento coltivato dall’uomo neolitico circa 10.000 anni fa, nella mezza luna fertile quando nacque l’agricoltura. Sono invece frumenti tetraploidi ($2n=28$) il farro (*Triticum turgidum* subspecie *dicoccum*), coltivato ai tempi degli antichi romani (dal termine farro deriva la parola farina), il frumento duro (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) che sostituisce il farro a partire dalla fine dell’impero romano ed il *Triticum turgidum* ssp. *turanicum* (noto commercialmente con il nome di kamut® o di “grano khorasan”), una sottospecie molto simile al grano duro che si è originata nel territorio dell’attuale Iran. Infine, tra i frumenti

esaploidi ($2n=42$) troviamo lo spelta (*T. aestivum* ssp. *spelta*) ed il frumento tenero (*T. aestivum* ssp. *aestivum*).

Tutti i frumenti coltivati hanno un importante carattere in comune, la loro spiga è rigida e quando raggiunge la maturità non si frantuma per liberare nel terreno la granella che contiene. Al contrario, le specie selvatiche di frumento, comprese quelle coltivate ai primordi dell'agricoltura, hanno la spiga fragile che a maturazione si frammenta e libera le cariossidi nel terreno circostante. In effetti, la rigidità della spiga rappresenta la prima e più importante evidenza della domesticazione del frumento da parte dell'uomo neolitico diventato agricoltore (Dubcowky and Dvorak, 2007). Un secondo carattere contraddistingue alcuni dei frumenti coltivati ed è rappresentato dalla cosiddetta cariosside vestita o nuda. I frumenti vestiti sono *T. monococcum*, *T. dicoccum*, e *T. spelta*, mentre i frumenti a cariosside nuda sono il frumento duro, il tenero ed il *T. turanicum*. In queste ultime specie la sgranatura meccanica (trebbiatura) della spiga produce infatti cariossidi libere da rivestimenti (glume) e la granella può essere direttamente trasformata in farina o semola.

A partire da 10.000 anni fa, l'uomo ha costantemente selezionato le tipologie migliori di frumenti, prima su basi totalmente empiriche e poi, a partire dai primi del '900, sfruttando le conoscenze genetiche e più recentemente quelle genomiche. Su basi empiriche l'uomo ha selezionato le forme coltivate differenziandole da quelle selvatiche (come abbiamo detto precedentemente in queste ultime i semi cadono dalla spiga una volta maturi, un carattere estremamente utile per la dispersione dei semi prodotti, ma che rende difficile la raccolta dei semi da parte dell'uomo) e successivamente ha preferito le forme nude, soprattutto se caratterizzate da semi grandi, per un'ovvia comodità in quanto i semi nudi non devono essere decorticati. Negli ultimi 100 anni si è tuttavia assistito ad un intenso lavoro di miglioramento genetico che ha portato alla selezione dei frumenti moderni attraverso un susseguirsi di nuove varietà. Il lavoro di miglioramento genetico del frumento fu avviato agli inizi del '900 da Nazareno Strampelli. I suoi sforzi condussero alla realizzazione di decine di varietà di frumento tenero e duro, alcune delle quali di grandissimo successo internazionale, come ad esempio il frumento duro Cappelli (1915, noto anche come Senatore Cappelli) o i frumenti teneri Mentana (1923) e San Pastore (1931) (Bozzini et al. 1998; Lorenzetti, 2000). Nel periodo antecedente la seconda guerra mondiale, l'adozione delle varietà selezionate da Strampelli ha permesso di raggiungere importanti incrementi produttivi (Lorenzetti, 2000). Dopo il lavoro pionieristico di Strampelli, Norman Borlaug, un genetista che lavorava presso il CIMMYT (un'istituzione di ricerca internazionale con sede in Messico) ha dato origine ai cosiddetti "frumenti moderni" grazie ad una estesa attività di miglioramento genetico, determinando un rinnovamento varietale che è stato definito come "rivoluzione verde" (Prohens and Nuez, 2003). Alla base di tutto il lavoro di miglioramento genetico c'era, e c'è tuttora, l'esigenza di aumentare la produzione per unità di superficie in un contesto sostenibile. L'aumento della produzione cerealicola è stato ottenuto attraverso l'uso di migliori tecniche di coltivazione (inclusi l'uso di fertilizzanti e di agro farmaci) e attraverso la selezione di piante geneticamente più produttive e che rispondono meglio alle moderne tecniche di coltivazione. Nel caso del frumento, l'enorme aumento produttivo registrato in Italia (la resa per ettaro è quantomeno triplicata dagli inizi del '900 ad oggi) e nel mondo è attribuibile per almeno il 50% al miglioramento genetico e nei prossimi decenni il ruolo del miglioramento genetico sarà anche maggiore.

Il termine "grani antichi" è un termine "commerciale", di recente molto utilizzato per identificare tutta una serie di frumenti che furono alla base dell'alimentazione delle civiltà mediterranee per alcuni millenni, prima di essere progressivamente sostituiti dalle "moderne varietà" di frumenti derivate da programmi di miglioramento genetico. Questi "grani antichi" attualmente stanno suscitando un nuovo interesse per le loro particolari caratteristiche nutrizionali, per la loro capacità di adattarsi al metodo produttivo biologico, sempre più in crescita, e perché si prestano alla valorizzazione agricola di ambienti marginali, dove attuare tecniche di produzione di particolare significato agronomico per realizzare modelli colturali di tipo estensivo per produzioni di qualità, adeguata redditività e sostenibilità paesaggistico-ambientale (Fiore et al. 2019). In generale, nella categoria dei cosiddetti "grani antichi" rientrano popolazioni locali di frumenti vestiti (monococco, dicocco e spelta), antiche

varietà locali di frumenti teneri e duri che sono state ampiamente coltivate in Italia fino ai primi del 900, ed alcune antiche varietà di frumento duro (es. Senatore Cappelli) e tenero (es. Gentilrosso, Verna) selezionate da ricercatori attraverso programmi di miglioramento genetico a partire dai primi del 900 sino agli anni 60. Le motivazioni per cui i cosiddetti “grani antichi” sono stati abbandonati sono molteplici e complesse ma riconducibili soprattutto ad una ridotta capacità di competere con le moderne varietà in termini di rese produttive e di adattamento alle moderne tecniche di coltivazione (Fiore et al. 2019). Tali caratteristiche, se dapprima apparivano come criticità nell’ambito di un approccio produttivo convenzionale, basato soprattutto su obiettivi produttivi quantitativi, appaiono ora dei punti di forza nel quadro di un modello agricolo di qualità sia sotto il profilo ambientale che nutrizionale.

Le varietà locali di “grani antichi”, al contrario delle varietà moderne, sono costituite da popolazioni eterogenee (varietà multilinee) e sono state oggetto solo della selezione inconsapevole dell’agricoltore. Si tratta frequentemente di colture rustiche, tolleranti condizioni di stress ambientale (freddo, siccità) e capaci di dare una produzione interessante in condizioni di modesta fertilità del terreno. L’antichità di coltivazione ed il legame con le tradizioni ne hanno fatto, in molti casi, colture tipiche di determinate aree geografiche inquadrabili economicamente come colture di nicchia legate a delle filiere locali e, in alcuni casi, oggetto di marchi comunitari (DOP e IGP) come nel caso del farro della Garfagnana. Sono sempre più numerosi gli agricoltori, i pastifici e panifici biologici che per garantire al consumatore alimenti più salutari, preferiscono lavorare con queste varietà che, pur producendo meno, presentano caratteristiche di grande valore: maggiore rusticità e capacità di resistere alle avversità climatiche, qualità nutritive più equilibrate, ed in alcune situazioni maggiore digeribilità grazie al basso indice di glutine. Tali varietà locali rappresentano non soltanto una risorsa insostituibile di prodotti di qualità, ma anche una fonte preziosa di caratteri potenzialmente utili e di genotipi estremamente co-adattati agli ambienti di coltivazione regionali. In generale, la conoscenza della diversità genetica e della struttura genetica di varietà locali può avere un impatto rilevante nell’ambito del miglioramento genetico di diverse specie di interesse agrario. Nel caso dei frumenti, queste informazioni sono sicuramente utili per pianificare programmi di conservazione delle varietà locali, mantenendo inalterata la loro variabilità genetica, ed eventualmente per selezionare i genotipi più idonei alla costituzione di varietà multilinee, migliorandone la produttività e la competitività rispetto alle varietà commerciali. Inoltre, l’accresciuto interesse per i “grani antichi” ha determinato una progressiva espansione delle superfici coltivate, non rispettando sempre l’abbinamento varietà/popolazione locale-areale tipico. In altri termini, entro i confini di un areale dove tradizionalmente viene coltivata una particolare varietà locale, le semine sono state realizzate anche impiegando semente non originaria dell’areale stesso, come in passato è stato riscontrato ad esempio per il farro della Garfagnana IGP (Report Progetto FAGADOP). In molti casi si possono creare quindi situazioni confuse legate alla mancanza di un sistema di riproduzione del seme, a scapito della valorizzazione della varietà locale come coltura tradizionale di particolari ambienti e aggravate dal fatto che relativamente alle superfici coltivate non esistono statistiche basate su ordinati rilevamenti, ma solo stime.

Lo studio della diversità e della struttura genetica delle varietà locali di “grani antichi” dovrebbe quindi rappresentare il punto di partenza per la gestione della loro conservazione e per un loro utilizzo sostenibile (Fiore et al. 2019). Nonostante la potenziale importanza di questo materiale, la caratterizzazione genetica delle varietà locali di “grani antichi”, come strumento chiave per la loro conservazione ed utilizzazione, è stata per molto tempo ignorata e solo ultimamente è stata rivalutata a livello regionale.

I primi studi riguardanti la caratterizzazione della variabilità genetica presente in varietà locali sono stati condotti impiegando unicamente descrittori morfologici o morfo-fisiologici, stabiliti dallo “International Plant Genetic Resources Institute” (IPGRI) e dallo International Union for the Protection of new Varieties Of plants (UPOV), oltre alla valutazione della variabilità delle proteine di riserva del seme. Al giorno d'oggi, i marcatori molecolari rappresentano un potente strumento per analizzare la diversità genetica presente entro e tra le varietà locali coltivate *on farm* o conservate *ex*

situ nelle banche del germoplasma, con la possibilità di fornire utili indicazioni per la gestione della loro conservazione. Recentemente, alcuni studi sono stati condotti in Italia per valutare la diversità genetica delle varietà locali di “grani antichi” utilizzando i marcatori molecolari (Pagnotta et al. 2005 e 2009; Colomba e Gregorini, 2011; Mangini et al., 2017), ma per quanto ne sappiamo, nessuno ha riguardato varietà locali coltivate nel Lazio. Inoltre, lo scopo principale di questi studi è stato quello di valutare principalmente le relazioni genetiche tra le diverse accessioni, analizzando un numero limitato di genotipi per varietà locale che non permette una precisa stima della variabilità intra-varietale e quindi uno studio approfondito della loro struttura genetica.

Le varietà locali di specie autogame, come ad esempio orzo e frumento, sono infatti costituite da una mescolanza di linee omozigoti (linee pure) strettamente imparentate che, sebbene viventi l’una accanto all’altra, rimangono più o meno indipendenti nella riproduzione. In queste popolazioni il processo di autofecondazione continuata assicura l’omozigosi e fornisce discendenze per lo più omogenee: la variabilità genetica è concentrata tra le linee ed è pertanto dovuta a differenze tra gli omozigoti per la loro composizione allelica. Tali specie tollerano bene l’*inbreeding* conseguente alla naturale propensione all’autofecondazione e presentano un ottimo adattamento all’ambiente in cui si trovano, ma sono poco flessibili nei confronti di ulteriori cambiamenti. L’incrocio occasionale e la mutazione spontanea, seguiti dalla segregazione e dalla ricombinazione, sono due fattori che talvolta si oppongono al raggiungimento della situazione limite di omozigosi a tutti i loci. Tali fattori, creando variabilità genetica, danno alla popolazione la possibilità di evolversi e di adattarsi a condizioni ambientali variabili. L’analisi del genoma delle varietà locali di “frumenti antichi” con marcatori molecolari, analizzando un numero sufficiente ampio di genotipi per popolazione, consente di ricostruire la loro struttura genetica, fornendo modelli di distribuzione della variabilità all’interno di gruppi di individui e di ripartizione della variabilità tra sotto-popolazioni, e suggerendo anche come questi modelli si evolvono nel tempo e nello spazio.

Tra i marcatori molecolari, i polimorfismi a singolo nucleotide indicati con l’acronimo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) sono mutazioni puntiformi che provocano differenze di singole coppie di basi, tra sequenze di DNA presenti nelle regioni codificanti e non codificanti del genoma. Questi polimorfismi permettono di differenziare genotipi all’interno di una stessa specie e di assegnare l’appartenenza di un individuo ad una specifica popolazione o sottopopolazione. L’avvento delle tecnologie di sequenziamento di nuova generazione ad alto rendimento (Next Generation Sequencing, NGS) ha consentito l’identificazione su larga scala di SNP nelle specie vegetali e lo sviluppo di piattaforme di genotipizzazione efficienti, per studi di associazione (Zhao et al. 2003; Bardel et al. 2005) e caratterizzazione genetica, anche nei frumenti (Trebbi et al. 2011; Wang et al. 2014; BurrIDGE et al. 2017), in cui il diverso livello di ploidia delle specie (tetraploidi ed esaploidi) rende difficile l’utilizzo dei microsatelliti (SSR).

L’obiettivo generale del presente progetto di ricerca è quello di valutare la diversità genetica mediante marcatori SNP di una collezione di “grani antichi” mantenuti presso l’ARSIAL e tuttora coltivati nel Lazio, con particolare riferimento a popolazioni locali di farro (*T. dicoccum*) tra le quali due popolazioni collezionate nella Valle dell’Aniene e varietà locali di frumento tenero (*T. aestivum*). Questa preliminare caratterizzazione genetico-molecolare sarà importante per delineare le più opportune linee guida per la salvaguardia e conservazione delle varietà/popolazioni locali, per la promozione del loro utilizzo sostenibile, ed in un prossimo futuro per lo sviluppo di una metodica di rintracciabilità genetica dei loro prodotti alimentari, a garanzia della tipicità, e come forma di tutela per produttori e consumatori.

OBIETTIVI DEL PROGRAMMA DI RICERCA

- 1) Allestimento di prove parcellari presso i campi sperimentali ARSIAL per la selezione delle piante che meglio esprimono le caratteristiche morfologiche e fenotipiche delle varietà/popolazioni locali oggetto di studio da utilizzare nelle analisi genetico-molecolari.

- 2) Analisi della struttura genetica mediante marcatori SNP delle varietà/popolazioni di “grani antichi” della regione Lazio prendendo in considerazione almeno 15 piante per varietà/popolazione locale individuate nelle prove sperimentali di campo. In particolare, verrà determinato il grado di variabilità genetica presente all’interno delle popolazioni/varietà locali individuando il numero di genotipi differenti per ciascuna di esse, con la finalità di verificare se le diverse tipologie fenotipiche individuate all’interno di ciascuna varietà/popolazione locale corrispondano a gruppi genetici distinti e facilmente rintracciabili.
- 3) Identificazione univoca ed affidabile (*fingerprinting*) delle varietà/popolazioni locali di grani antichi della regione Lazio mediante marcatori SNP anche rispetto a varietà/popolazioni locali e varietà antiche o iscritte al registro varietale coltivate nel Lazio o in regioni limitrofe.
- 4) Delineare in maniera preliminare sulla base delle analisi genetico-molecolari condotte le principali linee guida per la gestione della conservazione *in situ* ed *ex situ* delle varietà/popolazioni oggetto di studio e per un loro utilizzo sostenibile, e porre le basi per lo sviluppo di una metodologia di rintracciabilità genetica dei prodotti alimentari da loro derivati, a garanzia della tipicità, e come forma di tutela per produttori e consumatori.

MATERIALE VEGETALE ED ATTIVITÀ PREVISTE

A) Materiale vegetale

Le analisi genetico-molecolari verranno condotte su una collezione di “grani antichi” mantenuti presso l’ARSIAL e tuttora coltivati nel Lazio, con particolare riferimento a popolazioni locali di farro (*T. dicoccum*) e varietà locali di frumento tenero (*T. aestivum*).

In particolare, la collezione di popolazioni locali di farro comprende:

- 1) Due accessioni di una popolazione locale coltivata nella Valle dell’Aniene nei comuni di Cineto Romano, Riofreddo, Vallinfreda e Vivaro tutti in provincia di Roma;
 - 2) Due accessioni di una popolazione locale coltivata nell’alta Valle del Tronto in diversi comuni nella provincia di Rieti (Accumoli, Amatrice, Borbona, Cittareale, Colli sul Velino, Fiamignano, Labro, Leonessa, Morro Reatino, Petrella Salto, Posta e Rivodutri);
 - 3) Cinque accessioni recentemente collezionate dai tecnici ARSIAL nel Comune di Leonessa (RI);
 - 4) Una accessione recentemente collezionata dai tecnici ARSIAL nel comune di Amatrice (RI).
- Per un’accurata classificazione e identificazione delle popolazioni locali coltivate nel Lazio nelle analisi genetico-molecolari verranno inoltre incluse almeno quattro popolazioni di farro rappresentative delle tipologie coltivate nelle zone montane dell’Appennino Centrale (es. Farro di Monteleone e di Norcia coltivati in Umbria ed una popolazione locale coltivata in Abruzzo) e nella Garfagnana, insieme a quattro varietà moderne iscritte al Registro Varietale Nazionale e ottenute mediante selezione entro popolazione (es. Zefiro, Yakube e Rosso Rubino) o da incrocio con frumento duro (es. Padre Pio).

La collezione di varietà locali di frumenti teneri comprende:

- 1) Due accessioni di una varietà locale denominata grano Serena anticamente coltivato nel Comune di Campodimele (LT) e per la quale il Parco dei Monti Aurunci si sta operando per evitarne la completa estinzione;
- 2) Cinque accessioni della varietà locale Biancola probabilmente originaria della zona del Terminillo (RI) e oggi coltivata oltre che nel comune di Leonessa anche nell’altopiano di Rascino;
- 3) Una accessione della varietà locale Rosciola probabilmente originaria dell’Abruzzo e collezionata dai tecnici dell’ARSIAL presso un agricoltore del Comune di Fiamignano (RI);
- 4) Due accessioni di una varietà locale denominata Saracolla, probabilmente appartenente al frumento tenero e originaria dell’Abruzzo dove veniva chiamata Saravolla, collezionate dai tecnici dell’ARSIAL presso due agricoltori del Comune di Leonessa (RI);

- 5) Una accessione dell'antica varietà locale Solima coltivata in Abruzzo e collezionata dai tecnici dell'ARSIAL presso un agricoltore del Comune di Amatrice;
- 6) Una accessione di una varietà locale denominata "Grano Germanico", la cui origine è sconosciuta, collezionata dai tecnici dell'ARSIAL presso un agricoltore del Comune di Capranica (VT);
- 7) Tre accessioni della varietà locale Rieti largamente diffusa nelle zone cerealicole dell'Italia Centrale alla fine del XIX secolo e ampiamente utilizzata negli incroci per l'ottenimento di nuove varietà da Strampelli. Queste tre accessioni sono state collezionate dai tecnici dell'ARSIAL presso agricoltori di un piccolo comune nella provincia di Rieti (Colli sul Velino).
- 8) Una accessione di un'antica varietà locale denominata Maiorca ampiamente coltivata fino agli anni 30 dello scorso secolo in Italia Meridionale. Questa accessione è stata collezionata da tecnici dell'ARSIAL presso un agricoltore del comune di Montefiascone (VT).

Nelle analisi genetico-molecolare verranno inoltre incluse alcune varietà antiche, sempre mantenute nella banca del germoplasma di ARSIAL, come Marzotto (due accessioni), San Pastore (una accessione), Terminillo (una accessione), Virgilio (una accessione) ed una varietà moderna (Bologna).

B) Allestimento delle prove parcellari

Nella stagione agraria 2019-2020 verranno allestiti due campi sperimentali: uno per il confronto delle accessioni di popolazioni locali di farro, l'altro per le accessioni delle varietà locali di frumento tenero. In particolare, all'interno di ciascun campo sperimentale verranno allestite rispettivamente 10 e 16 parcelle, le prime relative alle 10 accessioni di popolazioni locali di farro, le seconde alle 16 accessioni di varietà locali di frumento tenero. A maturazione, da ognuna di queste parcelle verranno selezionate almeno 15 piante rappresentative della variabilità riscontrata all'interno di ciascuna accessione da cui verranno raccolte altrettante spighe che forniranno i semi per le analisi genetico-molecolari.

C) Allevamento in camera di crescita dei semenzali per l'estrazione del DNA

Da ciascuna delle 15 spighe delle piante selezionate all'interno delle singole parcelle relative alle diverse accessioni di popolazioni/varietà locali di farro e frumento tenero verranno ottenuti i semi mediante trebbiatura manuale. Cinque semi per ciascuna delle spighe selezionate per le diverse accessioni verranno seminati all'interno di pot di torba contenenti un apposito substrato di crescita (mix terriccio, sabbia e torba) e verranno fatti germinare all'interno di una cella climatica con temperatura ed illuminazione ottimali. Allo stadio di terza foglia verranno individuate le piantine migliori in modo da selezionare un semenzale relativo a ciascuna delle 15 spighe raccolte per ciascuna accessione. Per le popolazioni/varietà locali con un numero maggiore di accessioni, come nel caso del Farro di Leonessa (5 accessioni) e le varietà locali di frumento tenero Biancola (5 accessioni) e Rieti (3 accessioni), verranno prese in considerazione 10 piantine derivanti dai semi di dieci delle 15 spighe selezionate per ogni accessione. Nel caso del farro verranno reperiti semi di quattro diverse popolazioni locali rappresentative delle tipologie coltivate nelle zone montane dell'Appennino Centrale (es. Farro di Monteleone e di Norcia coltivati in Umbria ed una popolazione locale coltivata in Abruzzo) e nella Garfagnana e di quattro varietà iscritte al Registro Varietale Nazionale (es. Zefiro, Yakube, Rosso Rubino e Padre Pio) per confrontarle da un punto di vista genetico con le popolazioni locali coltivate nel Lazio. Un campione rappresentativo di 50 cariossidi per ciascuna delle popolazioni/varietà locali di farro utilizzate come confronto verranno seminati come descritto precedentemente per selezionare rispettivamente 15 e 5 piantine per ciascuna delle 4 popolazioni locali e ciascuna delle 4 varietà certificate. Analogamente per le varietà storiche di frumento tenero utilizzate come confronto da un campione rappresentativo di

50 cariossidi seminate verranno selezionate 5 piantine per ciascuna accessione. Infine nel caso della varietà moderna Bologna, che dovrebbe essere una varietà monogenotipica, verrà presa in considerazione un'unica piantina per le analisi genetiche.

In sintesi quindi per il farro verranno prese in considerazione per l'estrazione del DNA e le successive analisi genetiche un totale di 205 piantine, di cui 125 relative alle popolazioni locali coltivate nel Lazio e 80 alle popolazioni locali e varietà certificate utilizzate come confronto, mentre per il frumento tenero un totale di 226 piantine di cui 200 relative alle varietà locali coltivate nel Lazio e 26 alle varietà storiche e moderne utilizzate come confronto.

D) Estrazione del DNA e analisi genetico molecolari

Dalle piantine selezionate allo stadio di terza foglia come descritto precedentemente verranno prelevati 200-300 mg di tessuto fogliare che sarà immediatamente congelato in azoto liquido e conservato in un frigorifero a -80°C fino all'estrazione del DNA. Il DNA genomico verrà estratto utilizzando il kit di estrazione "NucleoSpin® Plant II kit" (Macherey-Nagel, Düren, Germany) da 100 mg di tessuto fogliare congelato. La qualità e la concentrazione del DNA estratto verranno determinate mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,2% colorati con etidio bromuro, utilizzando come riferimento concentrazioni note del DNA del fago λ , e lettura spettrofotometrica mediante NoanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Tutti i campioni di DNA verranno quindi diluiti in modo da avere una concentrazione di 50 ng/ μ L e verranno conservati a -20 ° C fino al momento del loro uso.

Duecento ng di DNA genomico così ottenuto verrà analizzato utilizzando degli SNPs array specifici (Wheat 90K iSelect SNP array) (Wang et al., 2014), prodotti dalla ditta Illumina (San Diego, California, USA), che permettono potenzialmente l'analisi di 81.587 marcatori a singolo polimorfismo nucleotidico (SNPs). Tali marcatori sono distribuiti con un'alta densità nei due e tre genomi presenti rispettivamente nel farro nel frumento tenero e la loro posizione è mappata su ogni singolo cromosoma. I dati così ottenuti verranno sottoposti ad analisi statistica utilizzando il software R (R core team 2013) con il pacchetto "Cluster" calcolando prima la matrice delle distanze genetiche e poi utilizzando l'algoritmo presente nella funzione hclust che effettua una clusterizzazione basata sulla ricostruzione gerarchica dei gruppi. Per la suddivisione dei genotipi individuati in diversi gruppi genetici e ricostruire i rapporti filogenetici presenti tra le diverse accessioni verrà utilizzato il software FastStructure (Raj et al. 2014).

DURATA DEL PROGRAMMA

Il progetto decorre dalla data della stipula della convenzione operativa relativa al presente progetto, terminerà il 31 dicembre 2020 considerando anche eventuali proroghe e si svilupperà in 2 fasi.

SVILUPPO TEMPORALE DELLE ATTIVITA'

PRIMA FASE (durata indicativa 6-7 mesi)

1. Allestimento delle prove sperimentali di campo.
2. Selezione delle piante che meglio esprimono le caratteristiche morfologiche e fenotipiche delle varietà/popolazioni locali oggetto di studio da utilizzare nelle analisi genetico-molecolari.
3. Reperimento di popolazioni/varietà locali e varietà certificate di farro e frumento tenero da utilizzare come controlli nelle analisi genetico-molecolari.
4. Allevamento in camera di crescita dei semenzali per l'estrazione del DNA.
5. Estrazione del DNA da circa 430 semenzali.

SECONDA FASE (indicativa 5-6 mesi)

- 1.** Analisi genetico-molecolari mediante marcatori SNPs.
- 2.** Analisi statistica dei dati.
- 3.** Discussione dei risultati ottenuti con i tecnici ARSIAL e con le comunità di agricoltori detentori delle popolazioni/varietà locali tutelate (L.R. 15/2000) oggetto di studio.

ESIGENZE FINANZIARIE

25.000 euro per l'intero progetto

- A.** Spese per materiali e reagenti ed acquisto Wheat 90K iSelect SNP array Illumina (per 432 analisi): € 23.000,00.
- B.** Spese per il Personale € 2.000,00: Voucher INPS (ex prestazione occasionale) per le attività di genotyping di laboratorio e la successiva analisi dei dati grezzi.

BIBLIOGRAFIA

- Bardel C, Danjean V, Hugot JP, Darlu P, Genin E (2005). On the use of haplotype phylogeny to detect disease susceptibility loci. *BMC Genet.* 6: 24.
- Bozzini A, Corazza L, D'Egidio MG, Di Fonzo N, Lafiandra D, Pogna NE, Poma I (1998). Durum wheat. In Italian contribution to plant genetics and breeding. Scarascia Mugnozza GT, Pagnotta MA, Eds. Tipolitografia Quatrini: Viterbo, Italy, pp. 181–194.
- Burridge AJ, Winfield MO, Allen AM, Wilkinson P, Barker GLA, Coghill J, Waterfall C, Edwards KJ (2017). High-Density SNP Genotyping Array for Hexaploid Wheat and Its Relatives. *Methods Mol. Biol.* 1679: 293–306.
- Colomba MS, Gregorini A (2011). Genetic diversity analysis of the durum wheat Graziella Ra, *Triticum turgidum L. subsp. durum* (Desf.) Husn. (*Poales, Poaceae*). *Biodivers J.* 2:73–84.
- Dubcovsky J, Dvorak J (2007). Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science*, 316: 1862–1866.
- Lorenzetti R (2000). The Wheat Science: The Green Revolution of Nazareno Strampelli. MiBAC: Roma, Italy, 1–230.
- Mangini G, Margiotta B, Marcotuli I, Signorile MA, Gadaleta A, Blanco A (2017). Genetic diversity and phenetic analysis in wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum* and *Triticum aestivum* subsp. *aestivum*) landraces based on SNP markers. *Genet Resour Crop Evol.* 64:1269–1280.
- Pagnotta MA, Mondini L, Atallah MF (2005) Morphological and molecular characterization of Italian emmer wheat accessions. *Euphytica* 146:29–37.
- Pagnotta MA, Mondini L, Codianni P, Fares C (2009) Agronomical, quality, and molecular characterization of twenty Italian emmer wheat (*Triticum dicoccon*) accessions. *Genet Resour Crop Evol* 56:299–310.
- Prohens J, Nuez F (2005). In the Wake of the Double Helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution. In Proceedings of the International Congress, 27–31 May 2003, Bologna, Italy; Scarascia Mugnozza GT, Tuberosa R, Phillips RL, Gale M, Eds. Avenue media: Bologna, Italy, pp. 53–75.
- R Core Team (2013) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <http://www.R-project.org/>.
- Raj A, Stephens M, Pritchard JK (2014). fastSTRUCTURE: Variational inference of population structure in large SNP data sets. *Genetics* 197: 573–589.
- Trebbi D, Maccaferri M, de Heer P, Sørensen A, Giuliani S, Salvi S, Sanguineti MC, Massi A, van der Vossen EAG, Tuberosa R (2011). High-throughput SNP discovery and genotyping in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Theor. Appl. Genet.* 123: 555–569.
- Wang S, Wong D, Forrest K, Allen A, Chao S, Huang BE, Maccaferri M, Salvi S, Milner SG, Cattivelli L, et al. (2014). Characterization of polyploid wheat genomic diversity using a high-density 90,000 single nucleotide polymorphism array. *Plant Biotech. J.* 12: 787–796.
- Zhao H, Pfeiffer R, Gail MH (2003). Haplotype analysis in population genetics and association studies. *Pharmacogenomics* 4: 171–178.