

D.M. 84318 del 14.11.2014

<b>Titolo del progetto</b>	<b>RIDUZIONE DI INPUT DI ORIGINE EXTRA-AZIENDALE PER LA DIFESA DELLE COLTIVAZIONI BIOLOGICHE MEDIANTE APPROCCIO AGROECOLOGICO</b>
<b>Acronimo del progetto</b>	<b>DIBIO</b>
<b>Titolo del sotto-progetto</b>	<b>CEREALI RESISTENTI A MALATTIE FUNGINE TRASMESSE DA SEME PER L'AGRICOLTURA BIOLOGICA</b>
<b>Acronimo del sub-progetto</b>	<b>DIBIO_CERES-BIO</b>
<b>Periodo a cui si riferiscono le attività descritte<sup>i</sup></b>	<b>30 aprile 2019- 31 dicembre 2019</b>
<b>Centro o Unità di ricerca</b>	CREA Cerealicoltura e colture Industriali
<b>Direttore</b>	Nicola Pecchioni
<b>Indirizzo</b>	SS 673 km 25+200 – 71122 Foggia
<b>Tel/Fax</b>	+390881714911; +390881713150
<b>e-mail</b>	ci@crea.gov.it
<b>Responsabile U.O.</b>	Nome e Cognome: Pasquale De Vita Qualifica Primo Ricercatore tel., fax: +390881714911; +390881713150 e-mail: pasquale.devita@crea.gov.it
<b>Gruppo di lavoro</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Chiara Lanza, Ricercatore - CREA-CI sede di Bergamo</li><li>• Sabrina Locatelli, Ricercatore - CREA-CI sede di Bergamo</li><li>• Carlotta Balconi, Tecnologo - CREA-CI sede di Bergamo</li><li>• Anna Maria Mastrangelo, Primo Tecnologo - CREA-CI sede di Bergamo/Foggia</li><li>• Giovanna Calandra, Operatore tecnico - CREA-DC sede di Palermo</li><li>• Vito Campanella, Ricercatore - CREA-CI sede di Palermo</li></ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Claudia Miceli, Ricercatore - CREA-DC sede di Palermo</li> <li>• Dominique Parisio, Operatore tecnico - CREA-DC sede di Palermo</li> <li>• Iliaria Alberti, Ricercatore - CREA-CI sede di Rovigo</li> <li>• Cristina Baldin, Collaboratore tecnico - CREA-CI sede di Rovigo</li> <li>• Roberta Paris, Ricercatore - CREA-CI sede di Bologna</li> <li>• Romana Bravi, Primo Ricercatore - CREA-DC sede di Lonigo (VI)</li> <li>• Laura Fiorini, Operatore Tecnico - CREA-DC sede di Lonigo (VI)</li> <li>• Luca Riccioni, Primo Ricercatore - CREA-DC sede di Roma</li> <li>• Maria Teresa Valente, Collaboratore Tecnico - CREA-DC sede di Roma</li> <li>• Anita Rose Haegi, Ricercatore - CREA-DC sede di Roma</li> <li>• Maria Aragona, Ricercatore - CREA-DC sede di Roma</li> <li>• Alessandro Infantino, Primo Ricercatore - CREA-DC sede di Roma</li> <li>• Alessandro Tondelli, Ricercatore - CREA-GB sede di Fiorenzuola d'Arda (PC)</li> <li>• Nadia Faccini, Collaboratore tecnico - CREA-GB sede di Fiorenzuola d'Arda (PC)</li> <li>• Patrizia Vaccino, Ricercatore CREA-CI sede di Vercelli</li> <li>• Marco Canella, Collaboratore tecnico - CREA-CI sede di Vercelli</li> <li>• Stefano Monaco, Ricercatore - CREA-CI sede di Vercelli</li> <li>• Pasquale De Vita, Primo Ricercatore - CREA-CI sede di Foggia</li> <li>• Agata Rascio, Ricercatore - CREA-CI sede di Foggia</li> <li>• Maria Pellegrino, Operatore tecnico - CREA-CI sede di Foggia</li> <li>• Luciano Capuano, Operatore tecnico - CREA-CI sede di Foggia</li> <li>• Alfredo Morcone, Operatore tecnico - CREA-CI sede di Foggia</li> </ul>
--	---

## **Obiettivi di ricerca**

### Frumento tenero e duro

- Monitoraggio della presenza degli agenti delle carie del frumento (*Tilletia* spp.) attraverso la raccolta di campioni di frumento tenero e duro nelle principali aree cerealicole italiane e successiva identificazione e determinazione della virulenza attraverso prove in serra;
- Validazione di una metodologia diagnostica di tipo molecolare per il precoce accertamento di infezioni da agenti di carie (*Tilletia* spp.);
- Identificazione su base morfologica e molecolare e determinazione della virulenza di *Fusarium* spp. attraverso prove in serra;
- Identificazione dei genotipi resistenti alla carie (*Tilletia* spp.) ed al mal del piede (*Fusarium culmorum*) fra le varietà antiche e moderne di frumento duro e tenero;
- Identificazione di marcatori genetici di tipo SNP per la resistenza alla carie (*Tilletia* spp.) ed al mal del piede (*Fusarium* spp) del frumento tenero e duro;

### Mais

- Messa a punto tecnologie analitiche per l'identificazione molecolare di ceppi fungini di *Fusarium verticillioides* presenti nell'areale di coltivazione del mais in Italia;
- Identificazione di linee di mais resistenti *F. verticillioides*;

#### Orzo

- Raccolta di nuovi isolati di *Pyrenophora graminea* negli areali di coltivazione per valutare la resistenza dei materiali genetici di orzo in fase di selezione;
- Pyramiding di geni di resistenza al fungo *P. graminea* in orzo al fine di garantire una resistenza duratura nei confronti di diversi isolati;

#### Riso

- Pyramiding di geni di resistenza al brusone (*Pyricularia oryzae*) e al *Fusarium fujikuroi* attraverso lo sviluppo di linee con ampio spettro di resistenze

#### **Attività prevista**

WP 1 – Monitoraggio, caratterizzazione e preparazione degli inoculi artificiali di *Tilletia* spp., *Fusarium* spp. e *Pyrenophora graminea*

WP 2 – Pyramiding di geni di resistenza a brusone e *Fusarium* e sviluppo di linee con ampio spettro di resistenze

WP 3 - Identificazione di genotipi di mais resistenti a *Fusarium verticillioides* e messa a punto di tecnologie analitiche per l'identificazione molecolare precoce

WP 4 – Identificazione di varietà resistenti alla carie ed al mal del piede in frumento tenero e delle relative basi genetiche

WP 5 - Identificazione di varietà resistenti alla carie ed al *Fusarium* spp in frumento duro e delle relative basi genetiche

WP 6 - Pyramiding di geni di resistenza al fungo *Pyrenophoragraminea*, agente causale della striatura bruna dell'orzo.

#### **Attività svolta**

**WP 1 – Monitoraggio, caratterizzazione e preparazione degli inoculi artificiali di *Tilletia* spp., *Fusarium* spp. e *Pyrenophora graminea***

**Attività 1.1 Identificazione e caratterizzazione della *Tilletia* spp.**

**Sedi CREA coinvolte: CREA-DC Roma**

1) Sono stati analizzati una serie di campioni di frumento provenienti dal CREA di Foggia (n=4) e dal Crea di Palermo (n=2) con sintomi di carie, per identificare le specie di *Tilletia* presenti negli areali cerealicoli italiani. L'analisi sanitaria dei campioni di frumento provenienti da Foggia e Palermo ha evidenziato per tutti la presenza di *T. laevis*;

2) Successivamente sono state determinate le condizioni ottimali per lo sviluppo dell'infezione da parte di *T. laevis* (syn.*T. foetida*). Sono state eseguite semine scalari (ogni 15 gg) di frumento duro (100 semi) naturalmente contaminato con *T. laevis* a partire da ottobre 2019 fino a gennaio 2020 al fine di valutare le

condizioni idrometeorologiche più favorevoli allo sviluppo della malattia. A tal fine stati monitorati i dati provenienti da una stazione idrometeorologica per correlarli allo sviluppo della malattia. La presenza dell'infezione è stata verificata a partire da 30mo giorno dopo la semina su 50 piantine per ciascuna epoca di semina in corrispondenza della fase di "inizio dell'accestimento" mediante saggio molecolare. Le rimanenti 50 piantine saranno valutate a fine ciclo per verificare la presenza di sintomi di carie e confermare i dati delle analisi molecolari. L'analisi molecolare su 50 piantine di frumento duro della prima semina eseguita a ottobre 2019 per la valutazione della temperatura ottimale per la germinazione delle teliospore non ha mostrato ancora la presenza della *Tilletia*, probabilmente a causa delle temperature ambientali piuttosto alte, sfavorevoli allo sviluppo della malattia.

3) Al fine di fornire l'inoculo necessario per le prove di resistenza previste nel WP4 e WP5, a partire dal mese di dicembre 2018 sono state eseguite semine di grano tenero (varietà ignota), naturalmente contaminato da *T. laevis*, per ottenere la quantità sufficiente alla realizzazione delle prove di campo condotte a Foggia (attività 4.1) e a Vercelli (attività 5.1). A Ottobre 2019, l'inoculo artificiale prodotto è stato caratterizzato per la virulenza ed inviato al CREA-CI di Foggia. La semina eseguita nel 2018 per la produzione di inoculo ha permesso di ricavare quantitativi di teleospore del patogeno sufficienti (circa 20 gr.) per gli inoculi artificiali programmati. Le quantità definite e usate per gli inoculi sono state 1 gr di soro per kg di seme. I sori sono stati spediti presso le sedi di competenza per i successivi inoculi per le prove di resistenza di tutti i genotipi in studio (attività 4.1 e 5.1), mentre presso la sede del CREA-DC di Roma sono stati inoculati 20 genotipi di frumento duro, 20 di frumento tenero e 5 linee differenziali di grano tenero (100 semi/genotipo) e seminati in vaso a dicembre 2019.

4) Parallelamente sono stati messi a punto dei saggi molecolari per la valutazione precoce dell'infezione di *Tilletia* spp. A tal fine è stato valutato un metodo di diagnosi molecolare mediante Taqman Real-time PCR di *T. laevis* nelle piantine di grano, a partire dal 30mo giorno dopo la semina (GDS) prima della fase di accestimento. I primer e la sonda, disponibili in letteratura, sono specifici per *T. laevis* e *T. caries*. È stato messo a punto un metodo di estrazione "grezza" del DNA su frammenti di 0.5-1 cm escissi dalla parte basale del germoglio, a ridosso del colletto, a 30, 49 e 79 GDS, prima e seconda foglia della stessa pianta a 102 GDS. È stata eseguita la valutazione dell'efficienza e della sensibilità su diluizioni seriali di DNA purificato da *T. laevis* arricchite con una quantità fissa di DNA purificato ed estratto grezzo di pianta sana (*Tilletia*-free). La valutazione fenotipica dei sintomi della malattia è stata eseguita su piante cresciute fino alla maturità (fase di crescita Feekes 11.4) per la presenza dei sori. La taqman real time PCR eseguita su DNA grezzo estratto da pianta ha mostrato un'ottima efficienza di amplificazione (compresa nell'intervallo 95%-110%), un alto indice di correlazione ( $R^2 > 0,99$ ) e una buona sensibilità (10 fg). La rilevazione molecolare eseguita sull'estratto grezzo di pianta ha mostrato la presenza di *T. laevis* nel 67% delle piantine di grano a 30 gds, 57% a 49 gds e 100% a 79 gds ; 83% e 50% a 102 gds rispettivamente per la prima e la seconda foglia della stessa pianta. L'analisi molecolare sulla prima foglia ha mostrato una sensibilità di rilevazione più elevata rispetto all'analisi sulla seconda foglia indicando una distribuzione del patogeno irregolare in questa fase sulle seconde foglie. La valutazione fenotipica dei sintomi della malattia è stata eseguita su piante cresciute fino alla maturità (fase di crescita Feekes 11.4) per la presenza dei sori. I risultati hanno mostrato un'incidenza media di infezione del 57%, mostrando una buona attendibilità dei risultati della diagnosi molecolare.

### **Attività 1.2 Identificazione e caratterizzazione del *Fusarium* spp**

#### **Sedi CREA coinvolte: CREA-DC Palermo**

Campioni di piante di frumento duro con sintomatologia ascrivibile al complesso del "Mal del piede", sono state sottoposti ad analisi fitosanitarie al fine di isolare le specie responsabili della malattia. In particolare i miceti afferenti al genere *Fusarium* sono stati identificati e caratterizzati dal punto di vista morfo fisiologico. Gli isolati identificati come *Fusarium culmorum* sono stati selezionati per valutare la loro virulenza nei confronti di una varietà commerciale di frumento duro (Simeto) mediante saggio in vitro. Tra gli isolati saggiati, l'isolato 162 è risultato dotato di particolare aggressività nei confronti dell'ospite e quindi è stato scelto per i successivi saggi di resistenza. I saggi di resistenza sono stati condotti in vitro su seme di alcune varietà commerciali e di popolazioni di grani antichi disponibili presso il centro di Palermo. I saggi sono stati

realizzati immergendo le cariossidi dei diversi genotipi in una sospensione conidica del patogeno. Sono state messe a confronto 3 diverse concentrazioni: 1x10<sup>3</sup>, 1x10<sup>4</sup> e 1x10<sup>5</sup> e sono stati valutati i seguenti parametri: germinabilità e vigore vegetativo.

L'isolato di *F. culmorum* saggiato nelle prove *in vitro* è stato utilizzato anche per le prove *in vivo* per valutare la resistenza dei genotipi di frumento duro e tenero nelle prove di campo realizzate a Foggia (attività 4.2) ed a Vercelli (attività 5.2). Per questa valutazione è stata preparata una sospensione conidica alla concentrazione di 1x10<sup>5</sup> conidi/ml. Il CREA di Palermo ha predisposto un protocollo di infezione dei semi di frumento duro e tenero che è stato utilizzato per la preparazione delle prove di pieno campo previste nell'attività 4.2 e 5.2 presso il CREA di Foggia.

I saggi di resistenza a *F. culmorum in vitro*, condotti su un panel di varietà commerciali, hanno evidenziato una assenza di resistenza/tolleranza al patogeno da parte dei genotipi considerati. Di contro alcune popolazioni di varietà da conservazione (Russello e Timilia) hanno dimostrato di possedere una minore sensibilità al patogeno.

### **Attività 1.3 Identificazione e caratterizzazione del *Fusarium verticilloides***

#### **Sedi CREA coinvolte: CREA-CI Rovigo, CREA-CI Bergamo**

Nel corso del periodo di riferimento è stato effettuato lo screening micologico su n. 14 campioni di mais provenienti dal Piemonte (2 località), Lombardia (3 località), Veneto e Toscana (1 località). L'attività è stata condotta utilizzando due linee di mais DKC 6728 e MAS 78-T selezionate in collaborazione con il CREA di Bergamo. I ceppi che ad una valutazione morfologica risultavano appartenere al genere *Fusarium* sono stati isolati e purificati, e successivamente si è proceduto all'ottenimento delle colture pure per sottoporli ad indagine molecolare. Gli screening micologici hanno messo in evidenza che tutti i campioni di semente analizzati, hanno evidenziato la presenza *Fusarium* spp., con gravità di infezione che variava soprattutto in funzione della località di coltivazione. Alcuni campioni hanno presentato lo sviluppo di miceti saprofitari che hanno reso complesso l'isolamento dei ceppi di *Fusarium* presenti.

Sulla base dei dati di patogenicità dei diversi ceppi se ne sceglieranno alcuni che verranno utilizzati durante la campagna mais 2020 per la preparazione di inoculi artificiali sia per le prove di laboratorio su cariossidi mature sia per le prove in campo di inoculo sulle sete (metodo SCIA) su materiali genetici precedentemente caratterizzati presso CREA di Bergamo (WP3).

E' stata, inoltre, svolta una ricerca bibliografica e sono stati strutturati dei pre-test per valutare quale screening rapido meglio si adatta alla valutazione della sensibilità varietale nei confronti di *F. verticilloides* nell'ambito delle attività previste dal progetto.

### **Attività 1.4 Identificazione e caratterizzazione della *Pyrenophora graminea***

#### **Sedi CREA coinvolte: CREA-DC Roma**

Al fine di costituire popolazioni di isolati monoconidici di *P. graminea* rappresentativi di una/più località sono state condotte diverse campagne di raccolta di foglie di orzo sintomatiche della striatura in due località italiane (Sassari e Fiorenzuola d'Arda, PC) e di campioni di seme di orzo (n=15) provenienti da diverse aree geografiche italiane. L'identificazione degli isolati è stata effettuata su base morfologica (forma e dimensione dei conidi) seguita da conferma molecolare e caratterizzazione del *mating type*, mediante utilizzo di primers specifici. Gli isolamenti da foglie infette di orzo hanno consentito di allestire una collezione di 50 isolati monoconidici che sono conservati in tubi di PDA a +4°C. Gli isolamenti dai 15 lotti di seme non hanno permesso di isolare nessun ceppo di *P. graminea*. L'identificazione molecolare con l'utilizzo di primers specifici per *P. graminea* e *P. teres* ha evidenziato la presenza di *P. teres* su 24 dei 25 isolati dalla Sardegna, mentre per l'Emilia Romagna, gli isolati di *P. graminea* erano 22 su 25 totali, i restanti erano *P. teres*. E' stata iniziata la caratterizzazione del Mating type dei 50 isolati presenti in collezione, mediante uso di primers specifici per i due diversi Mating: al momento, su 10 isolati analizzati 9 appartengono al Mating type 2 (4 di *P. teres*, 5 di *P. graminea*) ed 1 al Mating type 1 (*P. graminea*).

## **WP 2 – Pyramiding di geni di resistenza a brusone e Fusarium e sviluppo di linee con ampio spettro di resistenze**

**Sedi CREA coinvolte: CREA-CI Vercelli, CREA-DC Roma**

Una linea di riso (EZ82) portante due geni di resistenza al brusone (Pik e Pi-ta) è stata incrociata con tre varietà (King, Arsenal e Greppi) portanti geni di resistenza al *Fusarium* in due loci distinti (qBk1 e qBK2). In totale, sono stati ottenuti 40 semi F1. Per quanto riguarda la resistenza alla fusariosi, sulla base delle sequenze ai loci coinvolti sono stati sviluppati marcatori molecolari di tipo CAPS per la selezione assistita. Tali marcatori sono stati validati sui parentali King, Arsenal e Greppi e sul ricorrente EZ82. I semi F1 sono stati seminati in camera di crescita. Sono in corso le analisi molecolari al fine di verificare che tali semi siano prodotti di effettivo incrocio.

## **WP 3 - Identificazione di genotipi di mais resistenti a *Fusarium verticillioides* e messa a punto di tecnologie analitiche per l'identificazione molecolare precoce**

**Sedi CREA coinvolte: CREA-CI Bergamo, CREA-CI Rovigo, CREA-DC Lonigo**

Sono state condotte attività di tipo preliminare per la preparazione dei materiali genetici, precedentemente caratterizzate in campo per resistenza a *F. verticillioides* (Balconi et al., 2014), e la messa a punto di nuove tecniche analitiche di diagnosi dell'infezione.

1) Nella scelta dei materiali sono state incluse alcune linee storiche presenti presso la Banca del Germoplasma del CREA-CI di Bergamo selezionate a partire dalle varietà open diffuse nell'era precedente all'avvento degli ibridi moderni (Lo 018, Lo 021, Lo 043, Lo 051 w, Lo 186, Lo 241, Lo 295, Lo 309, Lo 387, Lo 435, Lo 577, Lo 578, Lo 863) con caratteristiche riguardanti la tipologia di granella (tipo flint o semi-flint) adatta all'uso alimentare (food) e altre più nuove selezionate negli ultimi anni (Lo1270, Lo1320A, Lo1374, Lo1413ae, Lo1489ae, Lo1502, Lo1504, Lo1524, Lo1540). Nella sperimentazione è stata inclusa anche la linea pubblica B73wt considerata come controllo negativo in quanto molto suscettibile all'attacco fungino. Tra i genotipi selezionati sono presenti anche una linea bianca white e due linee mutanti ae (amylose extender) che presentano livelli elevati di amilosio.

2) Nel corso della campagna maidicola 2019 è stata effettuata la raccolta di campioni utili per lo svolgimento dell'attività 1.3 (Identificazione e caratterizzazione del *Fusarium verticillioides*, coordinata da Ilaria Alberti, CREA-CI di Rovigo); tale attività preliminare è indispensabile per poter poi procedere con l'attuazione delle attività previste nel WP3. A tale scopo, è stato effettuato un monitoraggio dei ceppi fungini di *Fusarium verticillioides* presenti nell'areale di coltivazione del mais prelevando, nell'ambito della rete di confronto varietale coordinata da CREA sede di Bergamo, campioni da prove condotte nel 2019, selezionando 8 località distribuite nelle principali regioni a vocazione maidicola quali Lombardia, Toscana, Friuli, Piemonte, Veneto. Dall'elenco degli ibridi in coltivazione ne sono stati selezionati due (DKC 6728 e MAS 78-T) appartenenti alle principali classe di maturazione FAO 600 e 700 (Tab. 1), la cui granella (250 g) proveniente dai campi di n. 8 località, sono stati inviati al CREA di Rovigo, che in collaborazione con CREA-DC di Lonigo, ha avviato l'isolamento e la caratterizzazione morfologica e molecolare di ceppi tossigeni di *F. verticillioides* (attività 1.3).

Tabella 1 - Elenco delle località e degli ibridi di mais raccolti per monitoraggio ceppi tossigeni di <i>F. verticillioides</i>				
Anno	Località	Regione	Ibrido	Classe FAO
2019	ARQUA' POLESINE	Veneto	DKC 6728	600
			MAS 78-T	700
2019	FONTANELLA	Lombardia	DKC 6728	600
			MAS 78-T	700
2019	MARCIANO DELLA CHIANA	Toscana	DKC 6728	600
			MAS 78-T	700
2019	POZZUOLO DEL FRIULI	Friuli	DKC 6728	600
			MAS 78-T	700
2019	BERGAMO	Lombardia	DKC 6728	600
			MAS 78-T	700
2019	CHIVASSO	Piemonte	DKC 6728	600
			MAS 78-T	700
2019	VILAFRANCA PIEMONTE	Piemonte	DKC 6728	600
			MAS 78-T	700
2019	CIGNONE	Lombardia	DKC 6728	600
			MAS 78-T	700

#### **WP 4 – Identificazione di varietà resistenti alla carie ed al mal del piede in frumento tenero e delle relative basi genetiche**

**Sedi CREA coinvolte: CREA-CI Vercelli, CREA-CI Foggia**

##### **Attività 4.1 Prove di campo per la resistenza alla carie (*Tilletia spp*) a Vercelli e Foggia**

Il CREA-CI ha predisposto l'allestimento di un dispositivo sperimentale con 135 genotipi di frumento tenero rappresentativi di un ampio periodo storico (landraces, varietà obsolete, da conservazione e moderne) per i quali erano disponibili informazioni genotipiche di caratterizzazione molecolare con marcatori di tipo SNP. Le linee identificate dal CREA-CI di Vercelli sono state inviate al CREA-CI di Foggia che ha provveduto prima alla disinfestazione, con una soluzione di ipoclorito di sodio, e successivamente all'inoculazione con l'inoculo di *Tilletia laevis* (syn.*T. foetida*) prodotto dal CREA-DC di Roma (attività 1.1). L'inoculazione è stata condotta mescolando il seme di ciascun genotipo con una aliquota, di peso noto, di spore del patogeno. Una parte dei materiali genetici è stata inviata a Vercelli ed il resto è stato seminato a Foggia. A Foggia i materiali genetici sono stati seminati il 19-12.2020 mentre a Vercelli la semina è stata eseguita alla fine di Dicembre. In entrambe le località la prova è stata allestita seguendo uno schema sperimentale a blocco completo e randomizzato con due repliche e due trattamenti (tesi controllo e tesi inoculata con *T. laevis*) per un totale di 540 parcelle per ciascuna località. Ogni parcella elementare era costituita da una fila di 2 m lineare di lunghezza. Alla maturazione latteo-cerosa i materiali i genotipi saranno valutati in funzione della severità della malattia espressa in percentuale e calcolata in base al rapporto tra il numero totale di spighe in ciascuna fila e il numero di spighe malate.

##### **Attività 4.2 Prove di campo per la resistenza al *Fusarium spp* a Vercelli e Foggia**

La prova ha riguardato gli stessi genotipi utilizzati per l'Attività 4.1 (n. 135). I semi di ciascun genotipo sono stati disinfettati con una soluzione di ipoclorito di sodio e successivamente immersi per 3 minuti nella sospensione conidica dell'isolato di *Fusarium culmorum* prodotto dal CREA-DC di Palermo (attività 1.3). Successivamente i semi sono stati lasciati asciugare a temperatura ambiente prima di essere seminati in pieno campo. Una parte dei materiali genetici è stata inviata a Vercelli ed il resto è stato seminato a Foggia. A Foggia i materiali genetici sono stati seminati il 19-12.2020 mentre a Vercelli la semina è stata eseguita alla fine di Dicembre. In entrambe le località la prova è stata allestita seguendo uno schema sperimentale a blocco completo e randomizzato con due repliche e due trattamenti (tesi controllo e tesi inoculata con *Fusarium culmorum*) per un totale di 540 parcelle per ciascuna località. Ogni parcella elementare era costituita da una fila di 2 m lineare di lunghezza. I rilievi, per valutare la presenza di sintomi ascrivibili a *F. culmorum* e quindi la maggiore o minore suscettibilità al patogeno, inizieranno a partire dallo stadio di 3-5 foglie.

##### **Attività 4.3 Analisi GWAS**

Inizio attività prevista al secondo anno

## **WP 5 - Identificazione di varietà resistenti alla carie ed al fusarium spp in frumento duro e delle relative basi genetiche**

**Sedi CREA coinvolte: CREA-CI Foggia, CREA-CI Vercelli, CREA-CI Bergamo**

Il CREA-CI ha predisposto l'allestimento delle prove di campo per la valutazione della resistenza alla *Tilletia* spp utilizzando una collezione di 130 genotipi di frumento duro. I genotipi, di varia origine e provenienza, sono rappresentativi di un ampio periodo storico e comprendono landraces, varietà obsolete, da conservazione, moderne e linee in avanzata fase di selezione, per i quali sono disponibili informazioni genotipiche di caratterizzazione molecolare con marcatori di tipo SNP. L'inoculo a base di teliospore di *Tilletia laevis* (syn. *T. foetida*), prodotto dal CREA-DC (attività 1.1) è stato utilizzato per inoculare i semi dei materiali genetici di frumento duro. Il protocollo ha previsto una preliminare disinfestazione dei semi di ciascun genotipo con una soluzione di ipoclorito di sodio. I materiali genetici sono stati seminati a Foggia il 18.12.2020 mentre a Vercelli, a causa delle condizioni climatiche avverse del mese di dicembre e gennaio, la semina è stata rimandata. La prova di campo è stata allestita seguendo uno schema a blocchi completo e randomizzato con 2 repliche, due trattamenti (tesi controllo e tesi inoculata) e parcelle elementari (n. 520) costituite da una fila di 2 m lineari di lunghezza. Alla maturazione latteo-cerosa i materiali i genotipi saranno valutati in funzione della severità della malattia espressa in percentuale e calcolata in base al rapporto tra il numero totale di spighe in ciascuna fila e il numero di spighe malate.

### **Attività 5.2 Prove di campo per la resistenza al Fusarium spp a Vercelli e Foggia**

La prova ha riguardato gli stessi genotipi utilizzati per l'Attività 5.1 (n. 130). I semi di ciascun genotipo sono stati disinfettati con una soluzione di ipoclorito di sodio e successivamente immersi per 3 minuti nella sospensione conidica dell'isolato di *Fusarium culmorum* prodotto dal CREA-DC di Palermo (attività 1.3). Successivamente i semi sono stati lasciati asciugare a temperatura ambiente prima di essere seminati in pieno campo. Una parte dei materiali genetici è stata inviata a Vercelli ed il resto è stato seminato a Foggia. A Foggia i materiali genetici sono stati seminati il 18.12.2020 mentre a Vercelli la semina è rimandata a causa delle condizioni climatiche avverse registrate nel mese di dicembre e gennaio. La prova è stata allestita seguendo uno schema sperimentale a blocco completo e randomizzato con due repliche e due trattamenti (tesi controllo e tesi inoculata con *Fusarium culmorum*) per un totale di 540 parcelle per ciascuna località. Ogni parcella elementare era costituita da una fila di 2 m lineare di lunghezza. I rilievi, per valutare la presenza di sintomi ascrivibili a *F. culmorum* e quindi la maggiore o minore suscettibilità al patogeno, inizieranno a partire dallo stadio di 3-5 foglie.

### **Attività 5.3 Analisi GWAS**

Inizio attività prevista al secondo anno

### **Attività 5.4 Prove di campo per la resistenza a carie e fusarium**

Presso il CREA-CI di Foggia ed in collaborazione con il CREA-DC è stato allestito una screening per resistenza al *Fusarium* spp. ed alla *Tilletia* spp. mediante inoculo misto artificiale, su un set di 20 varietà commerciali di frumento duro attraverso l'allestimento di una prova sperimentale in pieno campo. Tale screening prevedrà una valutazione sia in termini di sintomi manifestati a livello di seme/plantula, sia in termini di rilascio di micotossine da parte del fungo.

## **WP 6 - Pyramiding di geni di resistenza al fungo Pyrenophoramminea, agente causale della striatura bruna dell'orzo**

**Sedi CREA coinvolte: CREA-GB Fiorenzuola d'Arda (PC) e CREA-DC Roma**

Varietà e linee in fase avanzate di selezione di orzo facenti parte dei programmi di miglioramento genetico di CREA-GB sono state seminate nell'autunno 2019 nei campi sperimentali del Centro. Da queste piante è stato campionato tessuto fogliare per l'estrazione del DNA e la verifica della presenza dell'allele di resistenza ai geni Rdg2a e Rdg1. Allo scopo sono stati sviluppati marcatori molecolari di tipo KASP, che



garantiscono un ottimo compromesso tra robustezza del dato, processività e costo per data point. Gli SNP testati sono riportati di seguito:

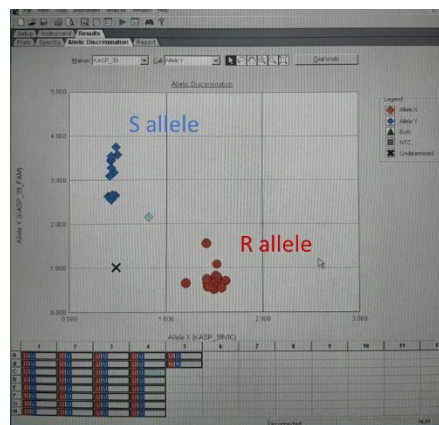
Rdg2a (KASP39)

```
ACTTTGGTCTGCTGAACAACCTTCACATATTAACAACATTTGTTGTGGGT[T/A]CCGGAGATGGCCTTGAATAGAGCA  
GCTCAAAGATTTGCAAAACCTTAGC
```

Rdg1 (KASP38)

```
ATAATAATCTCTGCATAAGAGCAGGAAAAAAGGTATAAAAAAGAGTTTTTGGTGATCTA[A/T]ATCAGTCACCTCC  
AGCTTCCTTGATGTCGACGSGTGAACCTCGTACTCCTGGTCACAGCCG
```

L'attività è cominciata come da cronoprogramma nel secondo semestre del primo anno e ha previsto la semina dei materiali per le prossime attività previste di incrocio (primavera 2020) e pyramiding di geni di resistenza. Le linee seminate sono state testate con marcatori molecolari sviluppati presso CREA-GB per identificare i genotipi portatori degli alleli di resistenza a Rdg2a e Rdg1. A titolo di esempio, si riporta nella seguente figura la genotipizzazione di un set di genotipi di orzo per il marcatore KASP39 (Rdg2a), grazie al quale è stato possibile distinguere i genotipi omozioti per l'allele di resistenza, che saranno utilizzati come parentali dei prossimi incroci.



### Eventuali differenze tra attività prevista e svolta

Per i saggi in vivo l'inoculo di *F. culmorum* (attività 1.2) non è stato prodotto su seme di avena sterilizzata secondo quanto riportato da Bateman (2005), poiché non garantiva una uniforme distribuzione sul seme. Si è quindi optato per una sospensione conidica a concentrazione nota.

In riferimento all'attività 5.4 le prove di campo sul frumento duro previste al CREA-CI di Bergamo sono state relizzate presso la sede di Foggia per ottimizzare la gestione degli inoculi fungini e la valutazione dei materiali genetici previsti nel WP4 e WP5.

### Descrizione risultati

I risultati riferiti alle varie attività saranno descritte a partire dalla prossima relazione sullo stato di avanzamento del progetto.

### Pubblicazioni

M.T. Valente, L. Orzali, G. Di Giambattista, L. Riccioni. Early molecular detection of the bunt disease fungi, *Tilletia caries* and *T. laevis*, in wheat plants. Abstracts of presentations at the XXV Congress of the Italian Phytopathological Society (SIPaV) J Plant 846 Pathol (2019) 101:811–848

Tesi di laurea: Identificazione molecolare di isolati di *Drechslera graminea* agenti della striatura bruna dell'orzo. Laureando: Eduard Narcis Gabriel Chiriches, relatore esterno: Alessandro Infantino. Università Sapienza di Roma, Aa 2019-2020.

#### **Altre attività divulgative**

Fascination of Plants Day, 13/05/2019, CREA-GB Fiorenzuola d'Arda (PC). Giornata di divulgazione del valore della ricerca scientifica sulle piante, per sensibilizzare il pubblico circa la rilevanza delle piante e della genetica vegetale nella vita di tutti i giorni.

#### **Firma del responsabile scientifico**



Pasquale DeBite

---