



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

LE BASI GENETICHE DELLA DEISCENZA
DEL BACCELLO IN *PHASEOLUS*
VULGARIS

The genetic control of pod dehiscence in *Phaseolus*
vulgaris

TESI COMPILATIVA

Studente:
Giacomo Paolinelli

Relatore:
PROF. ROBERTO PAPA

Correlatore:
DR. VALERIO DI VITTORI

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

Alla mia famiglia
A Veronica

SOMMARIO

ELENCO DELLE FIGURE	1
SIGLE ED ABBREVIAZIONI	3
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI.....	5
1. RISORSE GENETICHE E LEGUMINOSE	7
1.1 Biodiversità.....	7
1.2 Caratteristiche e conservazione delle Risorse Genetiche.....	9
1.3 Descrizione botanica e sistematica leguminose	13
1.4 Importanza agronomica delle leguminose	15
1.5 Importanza nutrizionale delle leguminose	17
2. L'IMPORTANZA DEL MIGLIORAMENTO GENETICO NELLE LEGUMINOSE.....	18
2.1 Il Miglioramento genetico.....	18
2.2 Metodi di miglioramento genetico e utilizzo del metodo del reincrocio	19
2.3 Miglioramento genetico delle leguminose e del fagiolo (<i>P. vulgaris</i>).....	24
3. LA SINDROME DA DOMESTICAZIONE E IL MECCANISMO DI DISPERSIONE DEI SEMI	26
3.1 Il processo di domesticazione	26
3.2 La domesticazione del Fagiolo (<i>P. vulgaris</i>)	28
3.3 La sindrome della domesticazione	33
3.4 Il meccanismo della dispersione del seme (seed shattering) in <i>Arabidopsis thaliana</i> .	35
3.5 Il meccanismo di dispersione dei semi e l'evoluzione parallela.....	39
4. <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> E SEED SHATTERING	46
4.1 L'architettura fenotipica del meccanismo di dispersione dei semi in fagiolo (<i>P. vulgaris</i>).....	46
4.2 Le basi genetiche della deiscenza del baccello in <i>P. vulgaris</i>	52
CONCLUSIONI	58
BIBLIOGRAFIA	60

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1: Variabilità fenotipica osservabile in semi di differenti varietà di fagiolo (<i>Phaseolus vulgaris</i>).	8
Figura 2: Distribuzione geografica di accessioni wild (in giallo) e landraces (in rosso) del fagiolo comune (Cortinovis et al., 2021).	10
Figura 3: Schema di costituzione delle Increase Intelligent Collections (Bellucci et al., 2021).	12
Figura 4: Specie leguminose erbacee di particolare importanza alimentare: (a) Lupino, (b) Fagiolo comune, (c) Cece, (d) Lenticchia (Bellucci et al., 2021).	14
Figura 5: Rapporto di simbiosi mutualistica tra leguminosa (attraverso l'apparato radicale) e <i>Rhizobium</i> (Lindström et al., 2020).	15
Figura 6: Tubercoli radicali formati da <i>Rhizobium</i> durante il processo di azotofissazione (Garofalo, 2020).	16
Figura 7: Dimensione della pannocchia ed eterosi in un ibrido ottenuto dall'incrocio di due linee parentali.	19
Figura 8: Il contributo del genoma del parentale donatore è dimezzato ad ogni generazione di reincrocio (Robbins et al., 2019).	21
Figura 9: Schema di reincrocio con rappresentazione della riduzione del genoma del donatore fino all'ottenimento in BC ₄ /F ₂ , di un individuo omozigote per il carattere donato dal parentale (RR) (Vogel, 2009 con modifiche).	23
Figura 10: Centri di origine delle specie coltivate descritti da Vavilov (1926) (Borém et al., 1997).	27
Figura 11: Centri di domesticazione delle piante (Gepts, 2001).	28
Figura 12: Distribuzione geografica dei principali pool selvatici di fagiolo (De Ron et al., 2015).	29
Figura 13: Perdita di diversità genetica nel pool wild andino rispetto al mesoamericano alla luce di diversi marcatori molecolari (Cortinovis et al., 2020).	30
Figura 14: Differenze fenotipiche tra teosinte e mais. (Doebley et al., 1990 con modifiche).	34

Figura 15: Scansione al microscopio elettronico di una siliqua matura di <i>A. thaliana</i> selvatica (Liljegren et al., 2004).....	36
Figura 16: Osservazione al microscopio del margine delle valve con colorazione specifica per la lignina nella siliqua wild type (F) e mutante (ind-2) (G) di <i>A. thaliana</i> (Liljegren et al., 2004 con modifiche).	37
Figura 17: Modello della cascata genetica alla base della formazione della zona di deiscenza in <i>A. thaliana</i> (Di Vittori et al., 2019, con modifiche da Dong et al., 2015).	38
Figura 18: Pattern di lignificazione delle pareti cellulari nell'endocarpo b di specie della famiglia Brassicacea (Hofhuis et al., 2016)..	39
Figura 19: Il fenotipo rachide fragile o “brittle-rachis (a sinistra) ed un fenotipo resistente (rachide non fragile o “non-brittle rachis”) (a destra) in orzo (Pourkheirandish et al., 2015 con modifiche).	40
Figura 20: Immagine al microscopio elettronico di pareti cellulari in corrispondenza della zona di abscissione nella spiga di orzo caratterizzata da rachide fragile (E) e rachide resistente (F) (Pourkheirandish et al., 2015 con modifiche).	40
Figura 21: Baccelli maturi di soia domesticata (fenotipo non-shattering o indeiscente) (A) e baccelli maturi di soia selvatica (fenotipo shattering o deiscente) (B) (Dong et., al 2014 con modifiche).	43
Figura 22: Meccanismo molecolare alla base della riduzione del pod shattering in soia. (Dong et al., 2014 con modifiche).	44
Figura 23: Baccelli e semi di genotipi selvatici (A), domesticati “dry bean” (B) e domesticati indeiscenti “snap bean” (C).	47
Figura 24: Differente pressione selettiva per il carattere “Pod shattering” in popolazioni e razze di fagiolo adattate a diverse condizioni ambientali (Parker et al., 2020).....	48
Figura 25: Pattern di lignificazione della guaina ventrale in baccelli deiscenti (C e D) e baccelli indeiscenti (A e B) a 30 giorni dopo l'allegagione (baccello maturo) Di Vittori et al., (2021).	51
Figura 26: Schema di sviluppo della popolazione BC4/F4 o sviluppata da Di Vittori et al., (2021) (Di Vittori et al., 2021).	55
Figura 27: Risultati dell'analisi GWAS condotta da Di Vittori et al. (2021) su una popolazione di linee di introgressione BC4/F4 (Di Vittori et al., 2021 con modifiche).	56

SIGLE ED ABBREVIAZIONI

ISPRA= ISTITUTO SUPERIORE PER LA PROTEZIONE E RICERCA AMBIENTALE

DNA= ACIDO DESOSSIRIBONUCLEICO

VIR= VAVILOV INSTITUTE OF PLANT GENETIC RESOURCES

INCREASE= INTELLIGENT COLLECTIONS OF FOOD LEGUMES GENETIC RESOURCES
FOR EUROPEAN AGROFOOD SYSTEMS

R-CORE= REFERENCE CORE

SSD= SINGLE SEED DESCENT

T-CORE= TRAINING CORE

H-CORE= HYPER CORE

F1= PRIMA GENERAZIONE FILIALE

BC1= PRIMA GENERAZIONE DI REINCROCIO

BC1/F1= PRIMA GENERAZIONE FILIALE DELLA PRIMA GENERAZIONE DI REINCROCIO

BC4= QUARTA GENERAZIONE DI REINCROCIO

QTL= QUANTITATIVE TRAIT LOCUS

BAM= BREEDING ASSISTITO CON MARCATORI MOLECOLARI BACKGROUND

SAM= SELEZIONE ASSISTITA DA MARCATORI MOLECOLARI

BC4/F2= SECONDA GENERAZIONE FILIALE DELLA QUARTA GENERAZIONE DI
REINCROCIO

AFLP= AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM

SSR= SIMPLE SEQUENCE REPEAT

SNP= SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM

RNA= ACIDO RIBONUCLEICO

SHP= SHATTERPROOF

IND= INDEHISCENT

ALC= ALCATRAZ

FUL= FRUITFULL

RPL= REPLUMLESS

NST= NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR

ADPG= ARABIDOPSIS DEHISCENCE ZONE POLYGALACTURONASE
BTR= BRITLLE RACHIS TRAIT
AT= ARABIDOPSIS THALIANA
SHATI= SHATTERINGABORTIONI
SHAI= SHATTERINGI
OG= ORIZA GLABERRIMA
OS= ORIZA SATIVA
ZM= ZEA MAIS
GM= GLYCINE MAX
GS= GLYCINE SOJA
FCC= FIBER CAP CELLS
PDH= POD DEHISCENCE I
CP=COWPEA
PV= PHASEOLUS VULGARIS
ILS= INTROGRESSION LINES
RIL= RECOMBINANT INBRED LINE
BC3= TERZA GENERAZIONE DI REINCROCIO
ANOVA= ANALYSIS OF VARIANCE
NILs= NEAR ISOGENIC LINES
DAP= DAYS AFTER POD SETTING
GWAS= GENOME WIDE ASSOCIATION STUDIES
ADP= ANDEAN DIVERSITY PANEL
MDP= MIDDLE AMERICAN DIVERSITY
GBS= GENOTYPING BY SEQUENCING
RT-PCR= REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI IN TEMPO REALE
CESA= CELLULOSE SYNTHASE

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

Il presente elaborato intende investigare le basi genetiche della deiscenza del baccello in *Phaseolus vulgaris*. La riduzione o perdita della capacità di disperdere i semi rappresenta un evento cruciale della domesticazione del fagiolo e di molte altre specie ed identificarne le basi molecolari, fisiologiche e fenotipiche è di fondamentale importanza per rispondere a domande centrali sulla domesticazione e sull'evoluzione delle specie. Il fagiolo comune (*P. vulgaris*) rappresenta una specie modello per lo studio della domesticazione, grazie alla presenza di almeno due eventi di domesticazione indipendenti che consentono di studiare la domesticazione in parallelo entro la stessa specie.

A tal proposito, una delle domande centrali alle quali si intende dare una risposta nel presente elaborato è se la domesticazione parallela avvenuta in specie diverse per fenotipi simili (evoluzione fenotipica parallela) sia il risultato di eventi di mutazione e selezione in loci ortologhi (evoluzione molecolare parallela).

Inoltre, in termini pratici, conoscere le basi genetiche della modulazione della deiscenza del baccello è di fondamentale importanza al fine di fornire strumenti utili nei programmi di miglioramento genetico. In fagiolo, le varietà cosiddette “dry bean”, per la produzione del seme, preservano infatti una quota residua di deiscenza che rappresenta un compromesso tra la necessità di ridurre le perdite di seme in campo e di poter recuperare facilmente il seme in post-raccolta, tramite la sgranatura dei baccelli. Al tempo stesso, nelle varietà da fagiolino “snap bean” la domesticazione ha fortemente ridotto il contenuto di fibre nei baccelli con la formazione di varietà completamente indeiscenti.

La recente identificazione di una chiara correlazione tra adattamento ad ambienti aridi, nei quali vi è maggiore suscettibilità alla deiscenza, e fissazione di alleli di resistenza contro l'apertura dei baccelli in queste regioni, suggerisce che l'identificazione di marcatori molecolari e geni alla base di questo carattere sia fondamentale per poter ricostruire l'architettura fenotipica desiderata in nuove varietà, al fine di rispondere sia alle esigenze produttive che a quelle degli ambienti di coltivazione.

Conoscere le basi molecolari di un carattere risulta inoltre particolarmente importante soprattutto quando si ricorre all'utilizzo di risorse genetiche per l'introduzione di nuova

variabilità genetica e fenotipica nel miglioramento genetico, per le quali è tuttavia importante poter effettuare uno screening predittivo su caratteri di interesse ed evitare al tempo stesso di introdurre caratteri indesiderati nelle nuove varietà mentre si selezionano caratteri target.

In considerazione dell'importanza che il miglioramento genetico delle leguminose dovrà rivestire sempre più in futuro, per il loro valore nutrizionale ed agronomico, ed in vista di un'agricoltura sostenibile e rispettosa delle esigenze nutrizionali e della crescente domanda di alimenti, il presente elaborato intende illustrare gli aspetti maggiormente rilevanti legati all'uso delle risorse genetiche nell'ambito del miglioramento genetico delle leguminose, fornendo al tempo stesso una revisione aggiornata delle recenti scoperte relative alle basi molecolari della deiscenza del baccello in fagiolo, come caso studio di un carattere di rilevante interesse.

1. RISORSE GENETICHE E LEGUMINOSE

1.1 Biodiversità

Con il termine biodiversità si può intendere la variabilità racchiusa negli esseri viventi, come piante, batteri, ed animali, che popolano complessi ecosistemi. Ad oggi sono state descritte circa 1.7 milioni di specie; le stime effettuate suggeriscono che il valore di specie effettivamente esistenti oggi possa variare da 5 a 100 milioni, con una stima prudente che suggerirebbe l'esistenza di 12.5 milioni di specie (Swingland, 2013). All'interno di ogni ecosistema, la frazione fisica (abiotica) presente è in costante interazione con la controparte biotica, con una reciproca influenza. De Long (1996) definisce la diversità biologica come la varietà e la variabilità degli organismi viventi e dei sistemi ecologici in cui essi vivono, includendo la diversità a livello di *ecosistema*, di *specie* e a livello *genetico*.

La diversità di *ecosistema* definisce il numero e l'abbondanza degli habitat, delle comunità viventi e degli ecosistemi all'interno dei quali i diversi organismi vivono e si evolvono (ISPRA). Con diversità di *specie* si intende la ricchezza di specie, misurabile numericamente sulla base delle stesse specie che sono presenti in una zona, o di frequenza delle specie, cioè la loro abbondanza o la loro rarità in un habitat (ISPRA). La diversità *genetica* definisce la variabilità dei geni all'interno di una determinata specie o popolazione (ISPRA), contribuendo ad arricchire la variabilità fenotipica osservabile (Figura 1).



Figura 1: Variabilità fenotipica osservabile in semi di differenti varietà di fagiolo (Phaseolus vulgaris).

L'attuale livello di diversità a livello genetico di una specie è il risultato di un lungo processo evolutivo. Durante l'evoluzione di una specie, infatti, forze evolutive come le mutazioni, la pressione selettiva esercitata dall'ambiente (selezione naturale) e dall'uomo (processo di domesticazione), la deriva genetica e le migrazioni, unite a fenomeni come la ricombinazione genetica, hanno contribuito a modellare la variabilità genetica delle specie, creandone di nuova. La caratterizzazione ed il mantenimento della biodiversità, la quale risulta spesso essere inesplorata e quindi poco sfruttata, sono fondamentali affinché si possa utilizzare in maniera efficiente questa enorme risorsa di variabilità e al tempo stesso preservarla evitandone il depauperamento.

La variabilità negli ecosistemi naturali può essere fortemente influenzata dalle attività antropiche, come anche entro un sistema agricolo, dove l'uomo, tra gli input necessari allo svolgimento della pratica agricola, seleziona le migliori varietà disponibili per la specie di interesse. Con l'utilizzo in campo agricolo di poche varietà a stretta base genetica si può avere un rischio concreto di una riduzione della diversità genetica (Bitocchi, 2004). Il miglioramento genetico potrebbe quindi beneficiare della disponibilità di risorse genetiche (e.g., ecotipi, landraces, forme selvatiche) da utilizzare allo scopo di introdurre caratteristiche fenotipiche di interesse non presenti, o presenti in quantità insufficiente, nelle varietà migliorate (e.g.,

resistenza a malattie), nelle quali l'incrocio risulta l'unica possibilità di introdurre nuova variabilità genetica (Bellucci et al., 2021).

1.2 Caratteristiche e conservazione delle Risorse Genetiche

La convenzione sulla diversità biologica definisce le risorse genetiche come “materiale genetico con un valore reale e potenziale” (Bitocchi, 2004). Una risorsa genetica può essere rappresentata anche da uno o più geni che trasmettono caratteristiche di interesse economico, ambientale e nutrizionale impiegabili ai fini del miglioramento genetico. L'uso ottimale delle risorse genetiche rappresenta un requisito chiave per competere con le sfide sociali legate all'agricoltura, inclusa la conservazione dell'agro-biodiversità, la sostenibilità agricola, la sicurezza alimentare e la salute umana (Cortinovis et al., 2021).

Le tipologie di risorse genetiche sono rappresentate da:

-Varietà locali (Landraces): caratterizzate da un adattamento specifico alle condizioni ambientali e di coltivazione di una determinata area, in funzione degli usi, delle conoscenze, delle abitudini e della tradizione della popolazione che l'ha sviluppata e che ne continua la coltivazione. In Figura 2 si riporta la mappa con la distribuzione geografica di accessioni wild e landraces del fagiolo comune (*P. vulgaris*). Le popolazioni di landraces sono variabili, altamente eterogenee, non hanno subito interventi di miglioramento genetico, e sono spesso ben identificabili presentando un nome locale (Bitocchi, 2004). Le landraces sono un importante fonte di variabilità genetica e adattativa da conservare, gestire ed utilizzare (Cortinovis et al., 2021), essendo capaci di tamponare l'effetto delle variazioni ambientali e la diffusione di parassiti e patogeni, garantendo allo stesso tempo produzioni stabili (Bitocchi, 2004);

-Specie spontanee (wild species): sono genotipi che non hanno subito il processo di domesticazione.

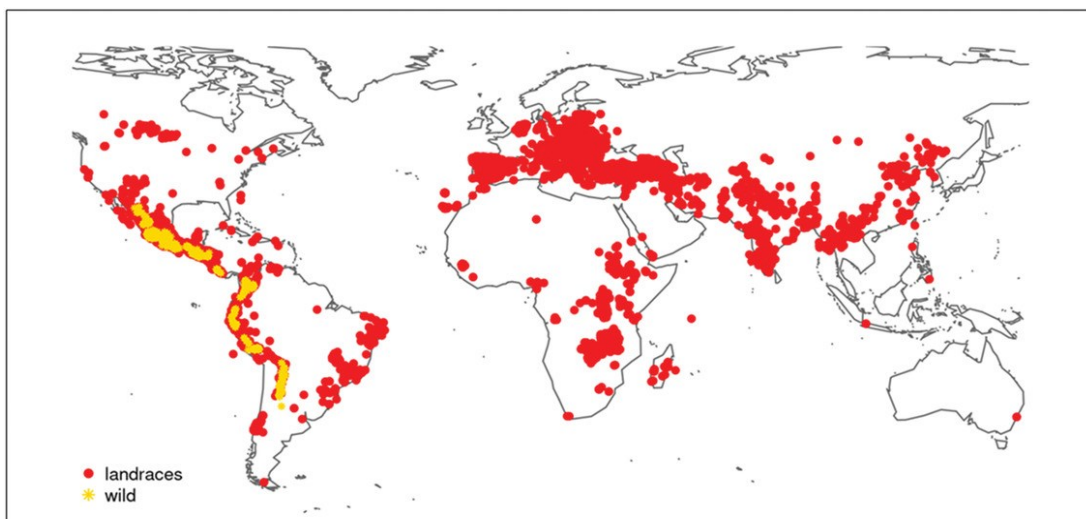


Figura 2: Distribuzione geografica di accessioni wild (in giallo) e landraces (in rosso) del fagiolo comune (Cortinovis et al., 2021).

-Progenitori spontanei delle forme domesticate (Wild relatives) (Figura 2): popolazioni costituite dai diretti progenitori da cui è partito il processo di domesticazione, utilizzabili in programmi di miglioramento genetico per caratteristiche di interesse;

-Ecotipi (Ecotypes): popolazioni ed individui spontanei adattati ad un determinato ambiente, geograficamente limitato, indipendentemente dall'intervento umano (che risulta determinante invece per le landraces) (Bitocchi, 2004).

-Varietà migliorate (Bred varieties): costituiscono il risultato finale di programmi di miglioramento genetico condotti da costitutori di varietà. Vengono costituite con l'obiettivo di fare fronte a necessità concrete in campo da parte degli agricoltori, e dei consumatori. Le varietà migliorate hanno la caratteristica di essere omogenee, uniformi e stabili nel tempo e si dimostrano agronomicamente e commercialmente superiori. A seconda delle diverse modalità di propagazione e di incrocio, si può avere ad esempio la costituzione di cloni per le specie a propagazione vegetativa, linee pure per le specie prevalentemente autogame e ibridi F1 per le specie prevalentemente allogame (Bitocchi, 2004);

-Stocks genetici: collezioni di varianti genetiche utilizzate nella ricerca (Bitocchi, 2004);

-DNA: librerie di DNA, cloni di frammenti di DNA come sonde, sequenze espresse e geni, usati nella ricerca (Russel et al., 2016).

La conservazione delle risorse genetiche e della biodiversità è fondamentale per evitare il fenomeno dell'erosione genetica, il quale comporta la perdita di variabilità genetica e quindi di variabilità fenotipica per importanti caratteri. L'agricoltura moderna oggi tende a favorire l'utilizzo di poche varietà elette tra le centinaia di varietà locali presenti, ma poco

caratterizzate, e/o sfruttate. Se da un lato ciò ha determinato l'aumento di rese produttive, favorendo il passaggio da un'agricoltura mezzadrile ad una agricoltura "industriale", dall'altro ha causato una evidente riduzione della diversità genetica nelle varietà coltivate (Van de Wouw et al., 2010).

I metodi di conservazione delle risorse genetiche possono essere definiti come metodi *in situ* oppure *ex situ*.

-*Ex situ*: le specie e le popolazioni vengono conservate al di fuori del loro habitat naturale, ad esempio in banche del germoplasma, campi di collezione ed orti botanici (Swingland, 2013). Viene definito come un metodo statico di conservazione del germoplasma.

La collezione di semi e piante presso il N.I. Vavilov Institute of Plant Genetic Resources (VIR) è una delle più antiche banche del germoplasma del mondo.

Le dimensioni della collezione presso il VIR sono aumentate da 301 accessioni nel 1901 a oltre 330.000 accessioni nel 2017, con 64 famiglie botaniche, 376 generi e 2169 specie rappresentate (Dzyubenko, 2018).

-*In situ*: è la conservazione di ecosistemi e di habitat naturali ed il mantenimento e recupero di popolazioni specifiche, vitali, nel loro ambiente naturale o, nel caso di specie addomesticate, nell'ambiente in cui esse hanno sviluppato le loro caratteristiche distintive. A differenza del metodo di conservazione *ex situ*, questo è un sistema dinamico di conservazione, perché esercitato in presenza di pressione selettiva ambientale determinata da fattori abiotici e biotici. Tra i fattori biotici troviamo anche l'azione esercitata dall'uomo, il quale contribuisce a conservare tradizioni locali, pratiche, saperi e sistemi culturali legati ad una determinata coltura.

Nell'ambito della gestione, caratterizzazione e valorizzazione delle risorse genetiche, è nato nel 2020 il progetto INCREASE (Intelligent Collections of Food Legumes Genetic Resources for European Agrofood Systems) (<https://www.pulsesincrease.eu/>), incentrato sullo studio di quattro specie leguminose: fagiolo (*P. vulgaris*), cece (*Cicer arietinum*), lenticchia (*Lens culinaris*) e lupino (*Lupinus albus* e *L. mutabilis*). Il progetto ha come obiettivo quello di stabilire dei protocolli per migliorare la gestione e l'uso delle risorse genetiche delle leguminose alimentari, fornendo anche un'elevata caratterizzazione molecolare e fenotipica, essendo specie cruciali per la sostenibilità, la sicurezza alimentare e la salute umana (Bellucci et al., 2021). Nel complesso, il progetto intende rafforzare la consapevolezza dell'importanza delle risorse genetiche delle specie leguminose, rappresentando contemporaneamente un modello e uno strumento importante da applicare per la conservazione, la caratterizzazione e l'utilizzo delle risorse genetiche anche in altre specie (Cortinovis et al., 2021). Questi obiettivi

verranno realizzati anche mediante esperimenti innovativi come il “Citizen science”, finalizzato alla diffusione del progetto verso stakeholder e cittadini, i quali saranno attivamente coinvolti in attività di caratterizzazione fenotipica di landraces di fagiolo in diversi areali di coltivazione europei, anche su piccola scala (i.e., dalla coltivazione in balcone fino alla coltivazione in orti e giardini) (Cortinovis et al., 2021). Tra gli aspetti innovativi del progetto, INCREASE assemblerà delle "Collezioni intelligenti" di accessioni di diverse dimensioni per massimizzare la diversità di ciascuna specie (Bellucci et al., 2021) (Figura 3):

1) The Reference Core (R-CORE), la collezione più ampia in termini di accessioni e variabile in dimensione per specie, si baserà prevalentemente su linee SSD (Single Seed Descent) e materiali già disponibili da progetti precedenti. Queste collezioni includeranno migliaia di linee SSD che saranno genotipizzate utilizzando un approccio a bassa copertura (e.g., Genotyping by sequencing [GBS]);

2) Il Training Core (T-CORE), che rappresenta un sotto campione dell’R-CORE e comprende circa 450 linee per specie. Un approccio di sequenziamento più approfondito è previsto insieme ad un'ampia caratterizzazione fenotipica sia in condizioni controllate che sul campo per questa collezione;

3) L'Hyper-Core (H-CORE), che consisterà in 40-80 accessioni accuratamente scelte, con l'obiettivo primario di campionare la più grande diversità possibile entro specie, sulle quali verranno effettuate analisi più approfondite, a livello molecolare e fenotipico.

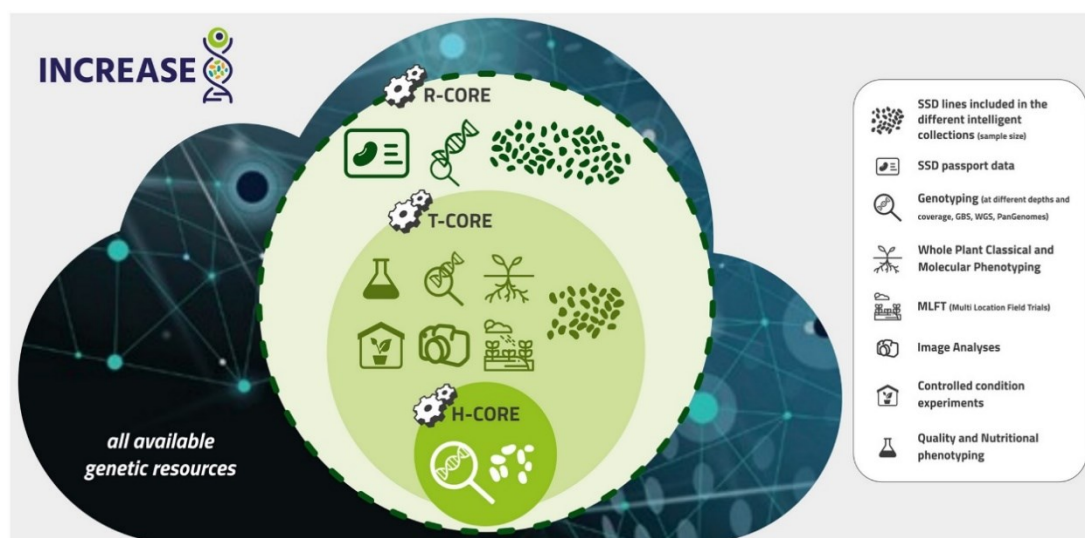


Figura 3: Schema di costituzione delle Increase Intelligent Collections (Bellucci et al., 2021).

La grande quantità di dati prodotti sarà analizzata per:

- 1) Indagare il livello e la struttura della diversità genetica delle risorse genetiche di quattro specie leguminose di rilevante interesse agrario.
- 2) Identificare varianti funzionali che potrebbero avere ruoli importanti nel determinare la variazione fenotipica per un gran numero di caratteri.
- 3) Predire i fenotipi di accessioni nelle banche del germoplasma sulla base del loro profilo molecolare.

Ciò fornirà un importante strumento nelle mani di genetisti e ricercatori per il miglioramento genetico delle leguminose alimentari e la conservazione della biodiversità.

1.3 Descrizione botanica e sistematica leguminose

Le leguminose o fabacee sono una famiglia di piante dicotiledoni dell'ordine delle Fabales; si presentano con fiori ciclici, eteroclamidi, pentameri, monoclini, (raramente diclini), actinomorfi o zigomorfi (Cortesi, 1933). L'androceo si presenta generalmente con dieci stami, racchiusi nella carena. Possiamo avere due tipologie di stami: Monoadelfi (filamenti fusi tra loro) oppure Diadelfi (9+1), nove saldati e uno libero (Cortesi, 1933). Il Gineceo, con stilo terminale, generalmente presenta un solo carpello, più di rado 2, rarissimamente da 5 a 15 e contiene numerosi ovuli, in due file alterne (Engler et al., 1897, Taubert et al., 1891). Le leguminose vengono così definite in quanto producono frutti detti baccelli o legumi, di forma allungata e costituiti da due valve entro cui sono allineati i semi.

Le leguminose possono comprendere specie erbacee annue o perenni, arbusti o alberi con foglie per lo più composte (costituite quindi da “foglioline” più piccole disposte a coppie, una opposta all'altra, su di un asse verde con una fogliolina terminale, detta quindi imparipennata) (Cortesi, 1933). L'apparato radicale, tipicamente a fittone, presenta dei tubercoli ricollegabili all'attività di simbiosi con il batterio *Rhizobium*. La famiglia delle Fabacee è una delle più grandi famiglie delle piante vascolari, con circa 12.000 specie riunite in 430 generi (Cortesi, 1933).

Si dividono in tre sottofamiglie e in numerose tribù:

- Mimosoideae: alberi o arbusti delle zone tropicali o subtropicali con fiori actinomorfi. Fanno parte di questa sottofamiglia: *Ingeae*, *Acacieae*, *Eumimosae*, *Piptadenieae* etc., (Stevens, 2017; Cortesi, 1933);

- Caesalpinioideae: alberi per lo più delle zone equatoriali o subtropicali con fiori papilionacei. Fanno parte di questa sottofamiglia: *Dimorphanthreae*, *Cynometreae*, *Amherstieae*, *Bauhineae*, *Cassieae* etc., (Stevens, 2017; Cortesi, 1933);
- Faboideae (Papilionoideae): alberi, arbusti e specie erbacee diffuse soprattutto nelle zone temperate. Presentano fiori zigomorfi papilionacei (Stevens, 2017; Cortesi, 1933).

Le Faboideae comprendono la maggior parte delle specie di importanza alimentare, soprattutto per il grande apporto proteico dei loro semi, come la soia (*Glycine max*), il pisello (*Pisum sativum*), il cece (*C. arietinum*), il fagiolo (*P. vulgaris*), la lenticchia (*L. culinaris*), il lupino (*L. albus* e *L. mutabilis*) (Figura 4) e l'arachide (*Arachis hypogea*). Le leguminose da granella possono essere distinte tra macroterme (primaverili-estivi) come fagiolo e soia e microterme (autunno-vernine) come fava (*Vicia faba*), cece, lupino, lenticchia e pisello.



Figura 4: Specie leguminose erbacee di particolare importanza alimentare: (a) Lupino, (b) Fagiolo comune, (c) Cece, (d) Lenticchia (Bellucci et al., 2021).

1.4 Importanza agronomica delle leguminose

Le leguminose possono garantire un'importante attività di arricchimento del suolo in termini di rilascio di azoto, e sin dall'antichità (III secolo a.C.) il botanico Teofrasto scriveva che i Greci avevano l'abitudine di coltivare fave per concimare i loro terreni (Costanzo, 2006). L'intuizione avuta anticamente dai Greci è stata confermata poi attraverso approfonditi studi scientifici che hanno chiarito le basi del processo di Azotofissazione (Figura 5).

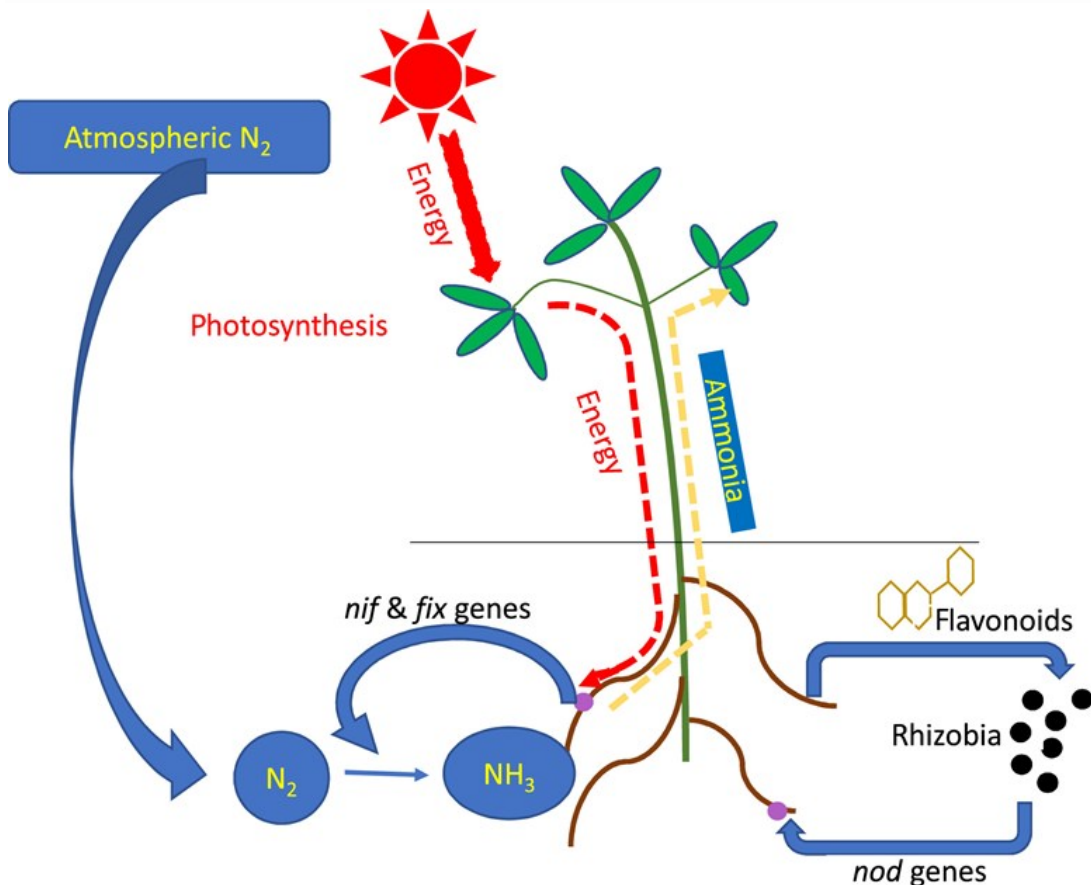


Figura 5: Rapporto di simbiosi mutualistica tra leguminosa (attraverso l'apparato radicale) e *Rhizobium*; il batterio fornisce azoto in forma ammoniacale (NH_3) alla pianta che lo "ospita", ed in cambio essa conferisce al batterio nutrimento sottoforma di carbonio organico (Lindström et al., 2020).

La trasformazione dell'azoto atmosferico (N_2) in azoto ammoniacale (NH_3) è operata da organismi simbiotici del genere *Rhizobium* ed esiste una stretta specificità tra il ceppo di *Rhizobium* e la specie di leguminosa che può contrarre la simbiosi (Garofalo, 2020). All'aspetto visivo, l'instaurarsi della simbiosi comporta la formazione di un nodulo detto tubercolo radicale (Figura 6), ed è proprio in questa struttura che avviene la riduzione

dell'azoto atmosferico (N_2) in azoto ammoniacale (NH_3) grazie all'enzima nitrogenasi (Figura 5) (Vischetti, 2019).

L'azoto ammonico è successivamente reso disponibile per la sintesi di importanti molecole biologiche come amminoacidi, proteine, vitamine e acidi nucleici attraverso i processi di nitrificazione e nitratazione (Vischetti, 2019).

Grazie all'azotofissazione, la pianta dispone di azoto necessario per il proprio metabolismo, ma una parte dell'azoto fissato raggiunge comunque il suolo risultando quindi disponibile per le successive colture o per quelle che vengono coltivate insieme alle leguminose (ad esempio nel caso di consociazioni). Ciò comporta la possibilità di ridurre significativamente gli input di concimazione azotata, qualora avvenga una valorizzazione ed un efficiente utilizzo delle leguminose all'interno dei sistemi colturali (e.g., come nel caso delle rotazioni).



Figura 6: Tubercoli radicali formati da Rhizobium durante il processo di azotofissazione (Garofalo, 2020).

Infatti, inserendo una leguminosa nella rotazione si può ridurre l'utilizzo di fertilizzanti chimici, adottando una tipologia di agricoltura a basso input, fondamentale per ridurre l'impatto ambientale della stessa (e.g., riducendo le emissioni di gas serra, l'inquinamento delle falde e i processi di eutrofizzazione) (Lemke et al., 2007), favorendo la diversificazione degli agroecosistemi e riducendo le spese per l'acquisto di concimi azotati minerali (Stagnari et al., 2017).

In virtù delle proprietà sopra descritte, le leguminose vengono impiegate in pratiche come il sovescio (definito anche concimazione verde). La pratica consiste nell'incorporare al terreno piante coltivate sullo stesso, in modo che le stesse fungano da concime naturale, rilasciando nel terreno i nutrienti che hanno precedentemente assorbito. Questa pratica migliora

sensibilmente la fertilità, la struttura, la ritenzione idrica del suolo, e arricchisce di sostanza organica il terreno. È stato scientificamente provato da Dabin et al. (2016) che il sovescio di leguminose possa apportare al terreno 53-76 kg N/ha ogni anno, riducendo l'applicazione di fertilizzanti azotati del 31%.

In campo zootecnico, molte leguminose erbacee vengono coltivate, raccolte ed utilizzate per la produzione di foraggio destinato all'alimentazione del bestiame. Tra le più importanti essenze erbacee utilizzate per la creazione di prati troviamo l'erba medica (*Medicago sativa*), il trifoglio rosso (*Trifolium pratense*), la lupinella (*Onobrychis sativa*) e la sulla (*Hedysarum coronarium*).

1.5 Importanza nutrizionale delle leguminose

In ambito alimentare i legumi possono avere destini ed utilizzi diversi; dal consumo della granella tal quale, all'estrazione di oli, come nel caso dei semi di arachidi e soia. Dai semi di soia e pisello possiamo ottenere farine proteiche destinate alla produzione di alimenti adatti a particolari esigenze alimentari e adatte alla produzione di farine per la panificazione. Inoltre, per alcune specie, come nel caso del fagiolo per la produzione del fagiolino verde (i.e., tipologia "snap bean"), la pianta viene coltivata per il frutto (i.e., baccello), raccolto precocemente e consumato fresco.

I legumi sono un alimento prezioso sotto il punto di vista nutrizionale perché presentano un alto livello proteico (20-45%), con la presenza di alcuni aminoacidi essenziali, e contengono carboidrati complessi (30-60%) e fibre (5-37%) (Maphosa et al., 2017). I legumi hanno un basso livello di grassi, ad eccezione delle arachidi (45%), dei ceci (15%) e della soia (47%) (Maphosa et al., 2017); inoltre, contengono minerali essenziali (ferro, calcio, zinco) e vitamine (e.g., vitamine del gruppo B) (Maphosa et al., 2017). Le ricerche hanno dimostrato che la maggior parte dei composti bioattivi dei legumi ha proprietà antiossidanti, con un ruolo fondamentale nella prevenzione di malattie tumorali, malattie cardiache, osteoporosi ed altre malattie (Maphosa et al., 2017). Questi includono isoflavoni, lignani, inibitori della proteasi, inibitori della tripsina e chimotripsina, saponine, alcaloidi, fitoestrogeni e fitati (Maphosa et al., 2017). Le saponine ed i glicosidi sono un gruppo di composti bioattivi presenti nei legumi a cui è stata attribuita attività ipocolesterolemica e anticancerogena; quindi, l'introduzione dei legumi nella dieta può offrire protezione contro malattie croniche (Carbonaro, 2015).

2. L'IMPORTANZA DEL MIGLIORAMENTO GENETICO NELLE LEGUMINOSE

2.1 Il Miglioramento genetico

Il miglioramento genetico delle piante è un processo iniziato inconsciamente circa 10.000 anni fa, ed è proseguito ininterrottamente fino ad oggi con strumenti sempre più sofisticati e conoscenze molto più approfondite a disposizione dell'uomo (Lorenzetti et al., 2018). Il miglioramento genetico può essere definito come:

- L'arte di discernere differenze economicamente importanti nel materiale vegetale per selezionare e moltiplicare i migliori (Lorenzetti et al., 2018);
- Manipolazione della variabilità per indirizzare la composizione delle popolazioni delle piante coltivate verso un dato obiettivo (Lorenzetti et al., 2018);
- L'arte e la scienza di cambiare le piante nel corso delle generazioni (Lorenzetti et al., 2018);

Il miglioramento genetico (in inglese *Plant Breeding*) mette a disposizione di agricoltori varietà o cultivar adatte a sistemi di coltivazione innovativi, sostenibili, con elevate rese, resistenza ad avversità biotiche ed abiotiche, adatte a situazioni climatiche proibitive, migliorando l'aspetto nutrizionale e qualitativo del prodotto, in linea con la tradizione alimentare (Bellucci et al., 2021). Il miglioramento genetico è un importante strumento nelle mani di agricoltori e genetisti per far fronte alle sfide dettate dai cambiamenti climatici e alla crescita demografica (i.e., raggiungimento di 9.6 miliardi di esseri umani entro il 2050) (Stagnari et al., 2017), la desertificazione e l'incessante consumo di suolo operato dall'uomo. Un esempio fondamentale nella storia del miglioramento genetico è quello di Nazzareno Strampelli, il quale avviò un programma di miglioramento genetico sul frumento tenero basato sull'incrocio di varietà dotate di differenti caratteristiche, seguito dalla selezione per linea pura e dall'applicazione del metodo pedigree (Lorenzetti et al., 2018) allo scopo di costituire nuove varietà dotate di resistenza all'allettamento, resistenza alle ruggini e precocità di maturazione (Lorenzetti et al., 2018).

2.2 Metodi di miglioramento genetico e utilizzo del metodo del reincrocio

L'obiettivo finale del miglioramento genetico è la costituzione di varietà o cultivar; per le specie agrarie più importanti, la varietà deve possedere, per potere essere iscritta al Registro Nazionale delle Varietà, dei requisiti di distinguibilità, uniformità, stabilità e valore agronomico.

A seconda del metodo di propagazione delle specie, si possono avere differenze nelle strategie di miglioramento genetico. Le *specie a propagazione vegetativa* generano prole mediante la separazione, da un individuo preesistente, di organi o parti di organi che porteranno alla formazione di un nuovo individuo geneticamente identico (clone).

Nelle *specie prevalentemente allogame* la riproduzione avviene prevalentemente mediante l'incrocio. Il polline viene trasportato da un'antera di un individuo, al gineceo di un altro individuo della stessa specie. Nel miglioramento delle specie allogame risultano importanti i concetti di inbreeding ed eterosi. Una *linea inbred* è una linea omozigote ottenuta in seguito ad un processo di inbreeding (incrocio di individui strettamente imparentati o mediante cicli ripetuti di autofecondazione di singole piante selezionate; Russel, 2016). Questo processo può generare il fenomeno della *depressione da inbreeding*, ovvero la diminuzione del vigore e della fertilità accompagnata dalla comparsa di caratteri recessivi sfavorevoli. Il *fenomeno dell'eterosi* o *lussureggiamento degli ibridi* corrisponde al maggior vigore dell'ibrido osservabile rispetto alle linee parentali che lo hanno costituito (Figura 7). Nel caso della costituzione degli ibridi, caratterizzati da elevata uniformità e produttività ma seme molto costoso, si possono selezionare 2, 3 o 4 linee parentali/inbred sulla base dell'attitudine alla combinazione specifica, sfruttando il fenomeno dell'eterosi. Un esempio concreto è quello del mais, in cui il successo degli ibridi è più evidente (Figura 7).



Figura 7: Dimensione della pannocchia ed eterosi in un ibrido ottenuto dall'incrocio di due linee parentali.

In aggiunta agli ibridi, nel miglioramento genetico delle allogame l'obiettivo può essere quello di costituire varietà in equilibrio Hardy-Weinberg, cioè popolazioni con accoppiamento casuale di individui e frequenze alleliche e genotipiche in equilibrio da una generazione all'altra, in assenza di fattori di disturbo (e.g., selezione, deriva) (Encyclopaedia Britannica, 2006).

Le specie prevalentemente autogame sono definite tali perché il polline di un fiore feconda le strutture femminili fiorali dello stesso fiore o di un fiore diverso della stessa pianta (autofecondazione). Le tecniche di miglioramento genetico prese in considerazione per queste specie sono spesso classificate come “entro popolazioni naturali”: (e.g., Selezione massale, Selezione per linea pura o individuale) o “entro popolazioni costituite dall'uomo” (e.g., Metodo pedigree, Metodi per popolazione riunita). Un importante schema di miglioramento genetico, ampiamente utilizzato nelle specie prevalentemente autogame è il reincrocio (backcrossing; Figura 9). Il reincrocio può essere utilizzato per trasferire un carattere di interesse da un parentale donatore ad un parentale ricorrente (varietà affermata) carente del carattere richiesto, ma quali-quantitativamente superiore al parentale donatore per altre caratteristiche di interesse. Il reincrocio prevede un iniziale incrocio tra i due parentali e l'ottenimento di una popolazione F1 con 50% del patrimonio genetico del parentale ricorrente e 50% del genoma del parentale donatore (Hebard, 2005). La linea F1 può essere quindi reincrociata con il parentale ricorrente (reincrocio 1 o backcross 1; BC1). Il primo reincrocio ha lo scopo di reintegrare nella progenie il genoma del parentale ricorrente e quindi ridurre la percentuale del genoma donatore (Figura 8). Al tempo stesso, la selezione fenotipica (prevalentemente per caratteri qualitativi o di facile misurazione) e/o quella assistita da marcatori molecolari, permettono di mantenere il carattere target (ed il gene responsabile introgresso dal parentale donatore) nella progenie. Nella progenie del primo reincrocio (i.e., BC1:F1) avremo quindi individui aventi in media un 25% di genoma donatore ed un 75% di genoma ricorrente (Hebard, 2005), secondo il principio per cui ad ogni reincrocio, la percentuale di genoma donatore diminuisce del 50% (Figura 8).

Successivi reincroci permettono quindi di ripristinare il genoma della varietà selezionata (parentale ricorrente) e di introgredire al tempo stesso, nel background genomico della varietà migliorata, solo i geni di interesse del parentale donatore. Si procede in questo senso finché la percentuale di genoma donatore non viene ridotta quasi completamente, con netta predominanza del genoma ricorrente, mantenendo però il carattere desiderato (Hebard, 2005) (Figura 8).

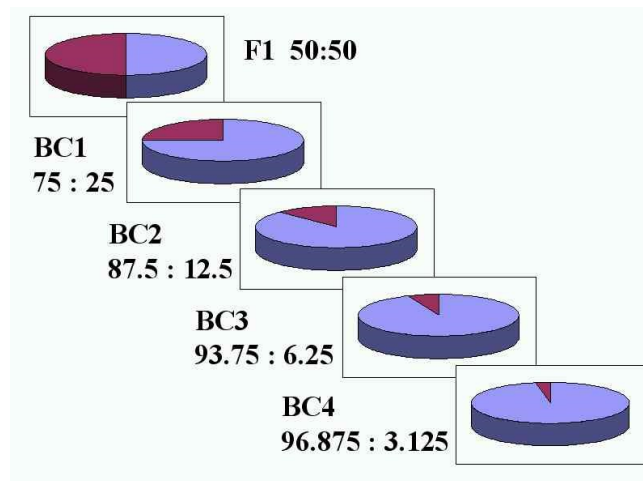


Figura 8: Il contributo del genoma del parentale donatore è dimezzato ad ogni generazione di reincrocio. Alla generazione BC4 il genoma del parentale ricorrente è il ~ 97% (Robbins et al., 2019).

Nel caso in cui il fenotipo di interesse del parentale donatore sia dato da un gene in condizione dominante, sarà fondamentale recuperare l'omozigosi del carattere per creare una linea stabile (Hebard, 2005). Questo obiettivo può essere raggiunto grazie all'utilizzo di marcatori molecolari che permettono di discriminare, all'interno della progenie eterozigote, gli individui che portano il locus di interesse in condizione di linea pura, soprattutto nel caso in cui l'eterozigote non risulti distinguibile fenotipicamente dall'omozigote dominante per effetto di fenomeni di dominanza completa. Nel caso in cui il fenotipo di interesse sia espresso da un gene in condizione omozigote recessiva (come nel caso di molti caratteri della domesticazione), il procedimento del reincrocio si articola in modalità simili. Tuttavia, gli individui col carattere di interesse, per caratteri Mendeliani, possono essere selezionati più facilmente anche mediante selezione fenotipica, in quanto gli individui recessivi nella popolazione saranno gli unici per i quali ad un fenotipo corrisponderà un solo genotipo.

Il reincrocio viene spesso utilizzato per inserire in varietà migliorate caratteristiche interessanti come resistenze a stress biotici ed abiotici. Spesso, le risorse genetiche (landraces, ecotipi e progenitori selvatici) rappresentano, come descritto nel capitolo precedente, una fonte di variabilità importante per questi caratteri. Tuttavia, questi materiali, seppur adattati a determinati ambienti, possono presentare caratteristiche poco desiderabili a seconda dei contesti di coltivazione ed in generale la loro scarsa caratterizzazione molecolare e fenotipica ne rende difficile l'impiego nel miglioramento genetico. Per questo motivo, soprattutto nei programmi di miglioramento genetico come il reincrocio, risulta fondamentale disporre di

marcatori molecolari che permettano di stabilire il genotipo e predire il fenotipo delle progenie del reincrocio, al fine di eliminare il più possibile, ad ogni re-incrocio, caratteristiche indesiderate durante la selezione delle progenie. Una delle migliori fasi per l'utilizzo di marcatori per la selezione è nelle prime generazioni ed in fase precoce di sviluppo degli individui, questo perché, i genotipi di cui si può predire un fenotipo indesiderato, possono essere immediatamente scartati, con notevoli vantaggi sul piano economico e sull'efficienza della valutazione dei caratteri desiderati. Inoltre, disporre di informazioni sui geni e i QTL (quantitative trait locus), e quindi su marcatori molecolari per caratteri di interesse, può permettere a priori uno screening migliore delle risorse genetiche da utilizzare come materiale donatore. Inoltre, nella selezione di progenie backcross (già selezionate per il gene di interesse) è possibile usare dei marcatori 'background' non associati al gene di interesse ma bensì ad altri geni non richiesti nella nuova varietà (BAM-breeding assistito con marcatori molecolari background). I marcatori, quindi, possono essere utilizzati anche per selezionare contro il genoma donatore, accelerando il recupero del genoma parentale ricorrente ed evitando l'introggressione di geni indesiderati (Ente Nazionale Risi, 2012);

La selezione assistita da marcatori molecolari (SAM) si riferisce quindi all'uso di marcatori molecolari in stretta associazione a loci bersaglio, rendendoli di supporto allo screening fenotipico, o addirittura in alcuni casi anche sostituirlo (Ente Nazionale Risi, 2012). Identificando un marcatore del DNA associato all'allele di interesse (dominante o recessivo), le piante che possiedono particolari geni possono essere caratterizzate in base al loro genotipo piuttosto che al loro fenotipo (Ente Nazionale Risi, 2012).

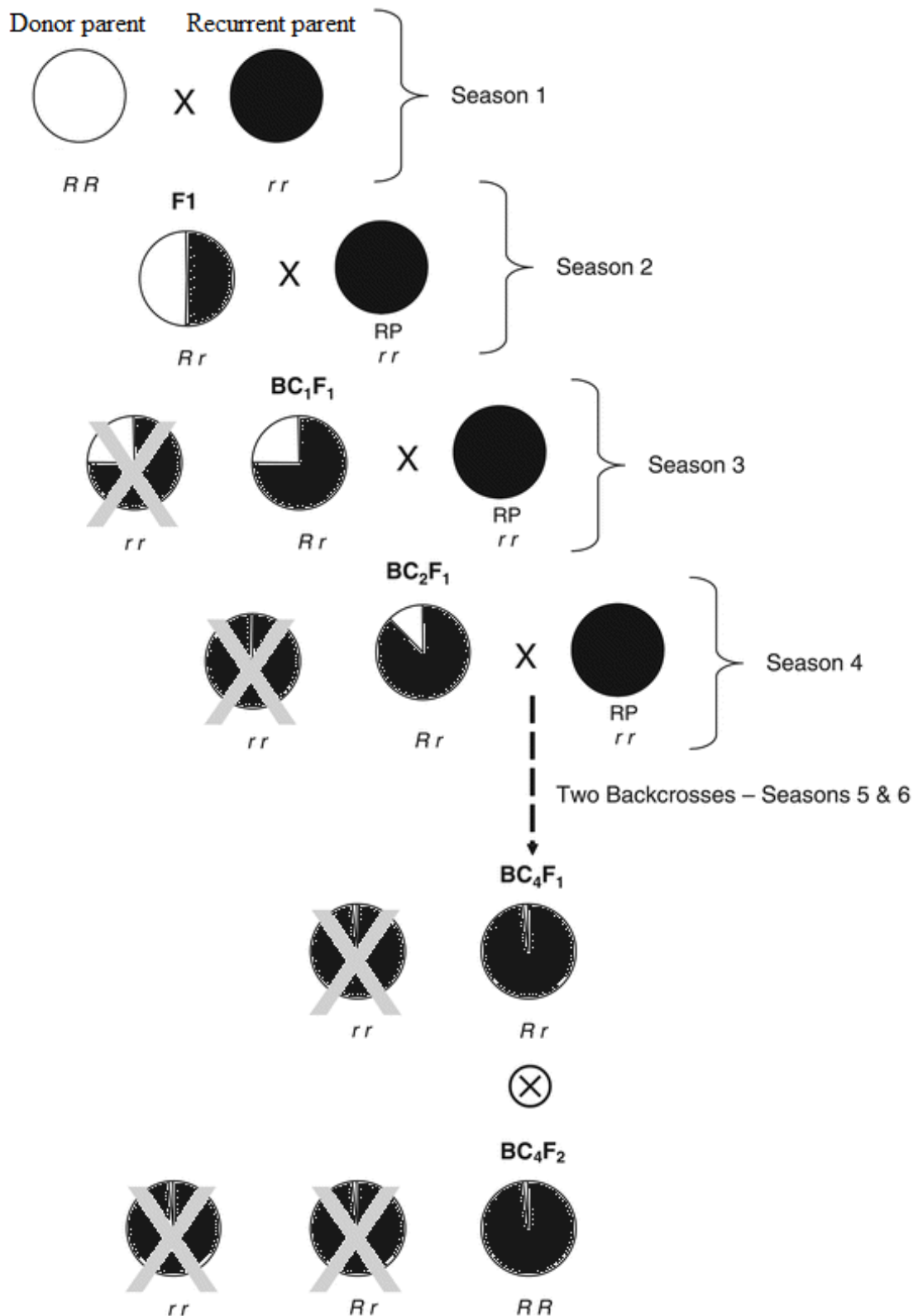


Figura 9: Schema di reincrocio con rappresentazione della riduzione del genoma del donatore fino all'ottenimento in BC₄/F₂, di un individuo omozigote per il carattere donato dal parentale (RR) (Vogel, 2009 con modifiche).

I vantaggi fondamentali nell'utilizzo di marcatori sono:

- La selezione può essere effettuata allo stato di plantula o seme, non si necessita di grandi quantità di materiale (Ente Nazionale Risi, 2012);
- La caratterizzazione molecolare è più sicura e facile rispetto allo screening fenotipico, con elevato livello di affidabilità, in particolare per caratteri quantitativi (Ente Nazionale Risi, 2012);
- Non vi è interferenza tra genotipo e ambiente, permettendo di selezionare direttamente il carattere d'interesse (Ente Nazionale Risi, 2012);
- Selezione mirata e continuata dei genotipi, senza eliminare gli eterozigoti per il carattere che possono essere conservati ed allevati fino al raggiungimento dell'omozigosi (Ente Nazionale Risi, 2012).

2.3 Miglioramento genetico delle leguminose e del fagiolo (*P. vulgaris*)

Rispetto al miglioramento genetico nell'ambito dei cereali, il breeding nel campo delle leguminose richiede che ulteriori sforzi vengano fatti, e risulta quindi fondamentale porre l'attenzione su queste specie (Bellucci et al., 2021), per le motivazioni già espresse nelle sezioni 1.4 e 1.5 di questo elaborato. La produzione nel campo dei legumi da granella è ostacolata da numerosi stress biotici (insetti, malattie) ed abiotici (terreni salini, acidi, non fertili, siccità, temperature elevate e temperature basse) comportando elevate riduzioni alle rese degli agricoltori di tutto il mondo (Chamarthi et al., 2011). All'interno della famiglia delle leguminose diversi sono i risultati ottenuti e diverso è il progresso tra le specie; infatti, nel caso della soia la disponibilità della sequenza del genoma (Schmutz et al., 2010) e di piattaforme "high-throughput" per la genotipizzazione (Hyten et al., 2008) hanno permesso, grazie a sforzi maggiori, di accelerare il breeding molecolare di questa specie (Chamarthi et al., 2011). Nel fagiolo, il miglioramento genetico riguarda prevalentemente il miglioramento della resistenza a stress biotici ed abiotici, combinati con la necessità di mantenere la qualità del prodotto e le caratteristiche della classe di mercato, che risulta di fondamentale importanza nel rispetto delle diverse preferenze dei consumatori (Assefa et al., 2019). Negli Usa, in Canada e nei paesi Europei gli sforzi del miglioramento genetico si sono concentrati prevalentemente sulle resistenze per le principali malattie (muffa bianca, peronospora batterica, ruggine, antracnosi e virus del mosaico del fagiolo comune) e sulla minor suscettibilità verso gli insetti (coleotteri, cimici ed afidi) (Assefa et al., 2019). Per quanto riguarda gli stress abiotici, fondamentale è la ricerca di meccanismi di resistenza ad elevate

temperature (con valori superiori a 30°C di giorno e 20°C di notte si verifica una riduzione significativa di resa e di qualità del prodotto), basse temperature (il fagiolo è sensibile alle basse temperature, che possono limitare la produzione nella prima parte della stagione), bassi livelli di fosforo, bassi livelli di azoto, tossicità da alluminio e terreni acidi (Assefa et al., 2019). Per quanto riguarda il miglioramento genetico, è fondamentale inoltre distinguere le varietà sulla base del prodotto atteso. Nel caso del fagiolo possiamo distinguere le tipologie da “sgrano” (dry bean) coltivate per la produzione della granella e le varietà per la produzione del fagiolino verde (snap bean o french bean). Nel caso del miglioramento genetico delle varietà da fagiolino oltre alla resistenza a stress biotici, si richiede un basso contenuto di fibre nei baccelli e l’assenza del filo (i.e., fibre) nelle suture del baccello, caratteristiche associate all’assenza del “pod shattering” (i.e., apertura del baccello a maturità che permette la dispersione dei semi). Nel caso delle varietà dry bean, il pod shattering può rappresentare una causa di diminuzione delle rese, dovuta all’apertura precoce (pre-raccolta) dei baccelli e relativa dispersione del seme. Tuttavia, questo carattere non viene visto a priori come una caratteristica indesiderata, in quanto in quantità moderate consente di favorire il processo di sgranatura e di recupero dei semi, il quale risulterebbe particolarmente complicato in varietà totalmente indeiscenti. Inoltre, il livello di deiscenza (presenza ed intensità del pod-shattering), come verrà spiegato nei successivi capitoli, può essere fortemente influenzato dalla siccità (i.e., con elevate temperature e bassa umidità, vi è una maggiore manifestazione del carattere) il che suggerisce che a seconda dell’ambiente di coltivazione sarà importante valutare con attenzione la necessità di costituire varietà con diversi gradi di resistenza.

Caratteri di interesse (i.e., resistenza a stress biotici) possono quindi essere recuperati in risorse genetiche (e.g., progenitori wild del fagiolo, landraces) le quali però possono presentare anche elevati o moderati livelli di pod shattering. È quindi fondamentale conoscere le basi genetiche di questo carattere per ricostruire l’architettura genetica desiderata nelle varietà ottenute col miglioramento genetico, anche attraverso programmi come il reincrocio.

3. LA SINDROME DA DOMESTICAZIONE E IL MECCANISMO DI DISPERSIONE DEI SEMI

3.1 Il processo di domesticazione

La domesticazione è il risultato di un processo di selezione che ha portato ad un maggior adattamento delle piante alla coltivazione e quindi, all'utilizzazione da parte dell'uomo. La pressione ambientale e la selezione, più o meno conscia, operata dall'uomo hanno determinato la transizione da forme spontanee a forme domestiche adattate alle necessità umane e alle relative pratiche agricole. La domesticazione delle piante rappresenta un punto di svolta fondamentale della storia dell'uomo; infatti, ha segnato il passaggio da cacciatore-raccoglitore a società basate sull'agricoltura (Bitocchi, et al. 2012a). Questo processo ha portato ad avere colture totalmente dipendenti dall'uomo per la loro sopravvivenza (Bitocchi, et al. 2012a), con le piante domestiche che non sarebbero in grado di competere in ambienti privi degli input forniti dall'agricoltura.

Nikolai Vavilov (agronomo, botanico e genetista russo) definì il concetto di “Centri di Origine” (Figura 10) delle piante coltivate (Vavilov, 1926). Egli evidenziò otto diverse aree geografiche primarie di origine e diversificazione (Figura 10) infine ridotte a sette (Dorofeyev e Filatenko, 1992; Corinto, 2014). I centri di origine sono quelle regioni dove sulla base di dati fitogeografici, archeologici e genetici una determinata specie ha avuto origine. Il concetto di centri di origine può essere esteso a quello di centri di domesticazione e diversificazione secondaria (Figura 11), che rappresentano quelle aree geografiche in cui le specie sono state domestiche e hanno subito processi significativi di adattamento. I centri di origine e di domesticazione sono spesso centri condivisi da diverse specie. Specie come fagiolo e mais condividono un areale di domesticazione in Mesoamerica, ed il fagiolo, come verrà spiegato successivamente, ha subito un ulteriore processo di domesticazione, indipendente e parallelo nelle Ande, che rappresenta un centro di domesticazione importante anche per altre specie come la patata e l'arachide (Figura 11). In Mesoamerica, i dati archeologici suggeriscono che il processo di domesticazione delle piante ha avuto inizio circa 9.600 anni fa (Flannery, 1986). Specie leguminose come il pisello, la lenticchia ed il cece sono state domestiche nella regione

della mezzaluna fertile, in un areale dove anche importanti specie cerealicole (i.e., orzo e frumento) hanno subito il processo di domesticazione (Figura 11).

I dati archeo-botanici suggeriscono che nel Vicino Oriente l'agricoltura ebbe inizio intorno al 9000 a.C., ma già nel 7000 a.C., la domesticazione delle piante riguardava un notevole numero di specie (Van Zeist et al., 2002).



Figura 10: Centri di origine delle specie coltivate descritti da Vavilov (1926) (Borém et al., 1997).

Centers of Domestication of Crop Plants

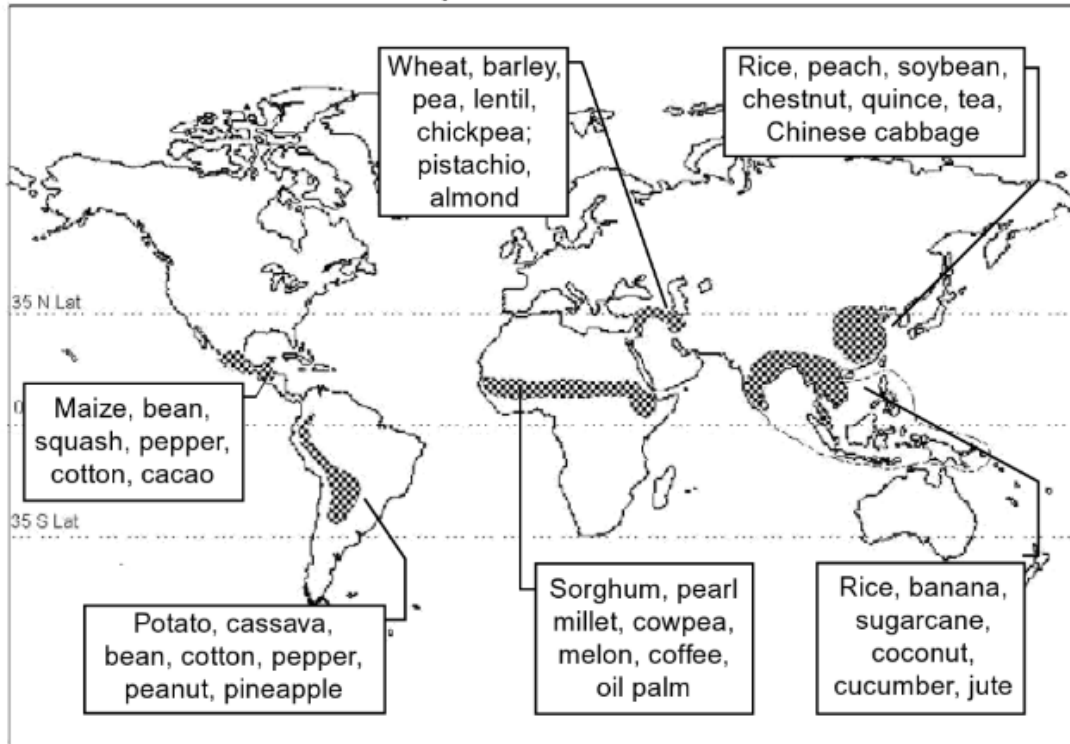


Figura 11: Centri di domesticazione delle piante. Nei box sono riportati i nomi delle specie che sono state domesticate nelle rispettive regioni (Gepts, 2001).

3.2 La domesticazione del Fagiolo (*P. vulgaris*)

La diversità genetica di una popolazione è il risultato della propria complessa storia evuzionistica e quindi di forze come la deriva genetica, il flusso genico e la migrazione, la selezione e le mutazioni che insieme al sistema riproduttivo, sono cruciali per il modellamento della diversità genetica e la struttura di un pool di individui (Cortinovis et al., 2020). Le forme selvatiche di fagiolo si estendono dal nord del Messico al nord-ovest dell'Argentina e sono caratterizzate da tre principali pool genici ecogeografici: Mesoamericano (Figura 12 in blu), Andino (Figura 12 in rosso), che includono entrambi sia forme selvatiche che forme domesticate, ed il pool Ecuador-nord Perù (Figura 12 in giallo) che presenta una distribuzione molto ristretta di individui selvatici (Debouck et al., 1993) ed è caratterizzato dalla presenza della faseolina di riserva di tipo I nei semi (Kami et al., 1995).



Figura 12: Distribuzione geografica dei principali pool selvatici di fagiolo (De Ron et al., 2015).

L'utilizzo di diverse tipologie di marcatori quali allozimi (Koenig et al., 1989), dati della faseolina (Gepts et al., 1985, Gepts et al., 1986) e marcatori multi-locus (Becerra-Velasquez et al., 1994, Freyre et al., 1996, Papa et al., 2003, Rossi et al., 2009) hanno confermato la struttura della diversità dei pool genici del fagiolo comune, sottolineando la maggior struttura e variabilità genetica del pool selvatico mesoamericano nei confronti del pool selvatico andino. Rossi et al. (2009) ha comparato i loro dati AFLP (amplified fragment length polymorphism) con i dati SSR (simple sequence repeat) di Kwak e Gepts et al. (2009), notando che la perdita di diversità genetica osservabile tra i due gene pool selvatici (Mesoamericano e Andino) era altamente associata al tasso di mutazione del marcatore utilizzato; più alto era il tasso di

mutazione del marcatore, come nel caso dei marcatori SSR rispetto ai marcatori AFLP, più bassa era la differenza in termini di diversità genetica tra i due pool genici ed il “loss of genetic diversity” (i.e., perdita di diversità genetica) osservabile tra popolazioni selvatiche Mesoamericane e Andine (Figura 13) (Cortinovic et al., 2020).

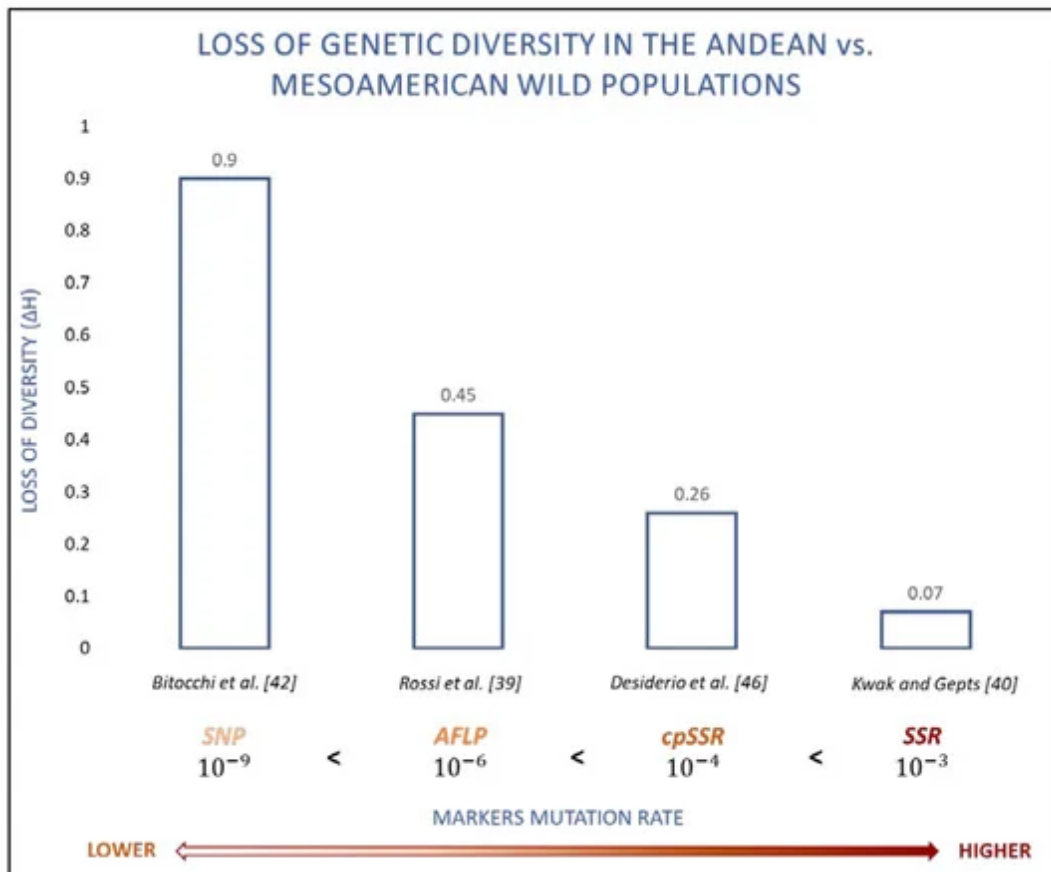


Figura 13: Perdita di diversità genetica nel pool wild andino rispetto al mesoamericano alla luce di diversi marcatori molecolari (Cortinovic et al., 2020).

Sulla base di queste osservazioni, Rossi et al. (2009) suggerirono che l’origine Mesoamericana del fagiolo poteva spiegare i contrastanti patterns di diversità per diversi marcatori molecolari quando i due pool genici vengono comparati, grazie all’ipotesi del “bottleneck” o collo di bottiglia (Nei et al., 1975).

Questa ipotesi è stata fortemente consolidata da Bitocchi et al. (2012b) che hanno dimostrato una perdita di diversità a livello nucleotidico (SNP; single nucleotide polymorphism) del 90% nella popolazione Andina selvatica rispetto alla popolazione mesoamericana selvatica (Figura 13; Cortinovic et al., 2020), che può essere spiegato col fatto

che la popolazione selvatica andina risultava “impoverita” rispetto alla mesoamericana, per effetto di un collo di bottiglia (i.e., migrazione di alcuni individui Mesoamericani verso il Sud e conseguente formazioni del pool selvatico Andino). I marcatori che differiscono nel loro tasso di mutazione possono evidenziare differenti pattern di diversità molecolare nella stessa popolazione o specie; questo perché il numero di generazioni necessarie alle mutazioni per permettere di recuperare la diversità genetica, dopo un collo di bottiglia, è previsto essere un valore vicino al reciproco del tasso di mutazioni del marcatore (Nei et al., 1975, Nei et al., 1976, Nei et al., 2005). Inoltre, l’analisi filogenetica ha rivelato che sia le accessioni selvatiche andine che le accessioni selvatiche Ecuador-nord Perù sono fortemente correlate a due distinti gruppi Mesoamericani localizzati in una grande area del Messico centrale (Bitocchi et al., 2012b), rinforzando la teoria dell’origine Mesoamericana del fagiolo e conseguente formazioni degli altri pool selvatici per effetto di eventi migratori, come confermato dal lavoro di Schmutz et al. (2014).

Inoltre, la domesticazione del fagiolo comune in Mesoamerica ha indotto una importante riduzione della diversità genetica (circa il 72%), come è stato dimostrato da Bitocchi et al. (2012a) attraverso il sequenziamento di cinque frammenti genici in una collezione di 214 accessioni di fagiolo comune, che includevano sia forme selvatiche sia forme domesticate. L’impatto della domesticazione (i.e., riduzione della diversità genetica), è stato osservato anche nel pool andino da Bitocchi et al. (2012a) ma con una intensità molto inferiore; questo è stato spiegato con l’effetto bottleneck. Essendo il germoplasma andino selvatico già “impoverito” prima della domesticazione, popolazioni che hanno già subito una perdita della loro diversità genetica per effetto di un collo di bottiglia subiranno una perdita minore di diversità in seguito ad un processo di domesticazione, in quanto la diversità genetica su cui agirà la domesticazione sarà stata minore nel pool Andino selvatico rispetto a quella presente nel pool Mesoamericano selvatico (Bitocchi, et al., 2012a). La presenza di una domesticazione parallela nelle Ande ed in Mesoamerica (Bitocchi, et al., 2012a) offre in fagiolo la possibilità di studiare il processo di domesticazione ed i suoi effetti in una stessa specie ed in eventi replicati e distinti, rappresentando una specie modello.

Schmutz et al. (2014), attraverso lo studio di accessioni selvatiche e landraces, hanno identificato regioni e geni sotto selezione durante la domesticazione, sia nel pool Andino che nel pool Mesoamericano. Schmutz et al. (2014) hanno evidenziato come meno del 10% delle regioni sotto selezione fosse comune nei due pool, suggerendo eventi di domesticazione indipendenti e l’importanza del fagiolo come modello per lo studio della domesticazione. Per indagare gli effetti della domesticazione sui due pool genici di fagiolo, Bellucci et al. (2014)

sfruttarono il potenziale del RNA sequencing (RNA-seq) combinando l'informazione della diversità a livello di sequenza nucleotidica (in regioni codificanti) con la possibilità di analizzare l'espressione genica. Bellucci et al. (2014) hanno dimostrato per la prima volta che la domesticazione del fagiolo comune in Mesoamerica era caratterizzata non solo da una significativa riduzione della diversità nucleotidica, ma anche da un profondo impatto sull'architettura dell'espressione e co-espressione genica al livello del trascrittoma. Bellucci et al. (2014) rivelarono che il 9% dei contigs analizzati erano sotto selezione durante la domesticazione e che la selezione in questi contigs ha indotto una riduzione (26%) nella diversità dell'espressione genica. Generalmente i geni che sono sotto selezione mostrano una maggiore diversità genetica negli alleli selvatici rispetto agli alleli domesticati (Cortinovis et al., 2020). Tuttavia, Bellucci e collaboratori (Bellucci et al., 2014) rilevarono anche la presenza di selezione diversificante, seppur in una piccola frazione dei contigs analizzati (2,8%), nei quali le forme selvatiche erano monomorfiche a livello di sequenza, mentre le forme domestiche erano polimorfiche (Cortinovis et al., 2020). Per quanto riguarda il livello di espressione genica, nelle accessioni domestiche venne rilevata generalmente una sotto-regolazione dell'espressione genica rispetto alle accessioni selvatiche, il che è coerente con mutazioni del tipo "perdita di funzione", frequenti nel processo di domesticazione. Questi risultati hanno dimostrato che la domesticazione in fagiolo ha agito probabilmente per aumentare la diversità funzionale in pochi loci target, putativamente associati ad adattamento a nuovi ambienti e a nuovi sistemi di coltivazione, in parallelo con una riduzione complessiva della diversità genetica al livello del trascrittoma, che conferma il generale effetto di riduzione della diversità genetica associato al processo di domesticazione visto anche in altre specie.

I fagioli domesticati furono introdotti in Europa successivamente ai viaggi che portarono alla scoperta del nuovo Mondo, e furono poi rapidamente diffusi in diverse aree europee caratterizzate da diverse condizioni ambientali e pratiche agronomiche. Lo studio dei meccanismi alla base del processo di adattamento del fagiolo in Europa offre la possibilità di identificare strategie utili a fronteggiare i cambiamenti climatici, oltre ad una maggiore comprensione dell'evoluzione di questa specie. Diversi studi basati su marcatori molecolari e biochimici hanno permesso di stabilire l'origine ed il pool genico di numerose accessioni europee. Angioi et al. (2010) hanno stimato che il 44,2% delle landraces europee derivano da almeno un evento di ibridazione tra pool Mesoamericano e pool Andino, suggerendo un ruolo fondamentale dell'ibridazione e della ricombinazione nell'adattamento, in seguito all'abbattimento delle barriere geografiche che mantenevano isolati i due pool genici

(Cortinovis et al., 2020), con la comparsa di nuove combinazioni geniche in Europa sulle quali la selezione adattativa può aver agito (Cortinovis et al., 2020).

3.3 La sindrome della domesticazione

Il processo di domesticazione coinvolge diversi cambiamenti a livello molecolare, morfologici e fisiologici, che risultano in modifiche strutturali e funzionali, condivise dalla maggior parte delle specie coltivate. La domesticazione ha quindi reso la specie coltivata distinguibile dal suo parentale selvatico per una serie di caratteristiche. L'insieme dei tratti comuni che distinguono le specie domesticate dai loro progenitori selvatici sono conosciuti come i tratti della "sindrome della domesticazione" (Di Vittori et al., 2017). Questi cambiamenti hanno garantito produzioni maggiori in ambienti coltivati, ma allo stesso tempo hanno ridotto l'adattamento delle specie domesticate alle condizioni ambientali degli ambienti selvatici (da qui anche la definizione di "sindrome" negli individui domesticati), dove invece le forme selvatiche presentano un maggiore fitness (Di Vittori et al., 2017).

I caratteri della sindrome della domesticazione sono:

- *Dormienza del seme*; ridotta nelle forme domesticate per garantire una più rapida e simultanea germinazione del seme;
- *Habitus di crescita*; la forma domesticata presenta spesso un habitus di crescita a cespuglio o comunque più compatto e con meno ramificazioni;
- *Gigantismo*; la pianta domesticata presenta le parti edibili di maggiori dimensioni rispetto al progenitore selvatico;
- *Precocità*; la forma domesticata fiorisce e matura prima della forma selvatica;
- *Sensibilità al fotoperiodo*; gli individui domesticati sono insensibili al fotoperiodo e/o si adattano a nuovi areali di coltivazione per la durata del giorno e della luce;
- *Produttività*; la selezione ha generato piante domesticate molto più produttive;
- *Pigmentazione e forma dei semi e dei frutti*; la domesticazione ha generato un aumento nella variabilità fenotipica nelle parti edibili;
- *Dispersione del seme*; nelle piante domesticate vi è una perdita parziale o totale della capacità di disperdere i semi a maturazione; proprietà fondamentale per la propagazione della specie selvatiche che però porta a riduzioni di resa in campo nelle specie domesticate. Verrà trattata in dettaglio nel prossimo paragrafo.

Tra i tratti della sindrome della domesticazione, la perdita o riduzione della dispersione dei semi è una caratteristica chiave selezionata in molte specie domesticate. Insieme alla dormienza del seme, la dispersione dei semi è essenziale, infatti, nelle forme selvatiche per incrementare la fitness, in termini di spazio e tempo, riducendo la competizione tra piante di generazioni vicine (Di Vittori et al., 2019). Un chiaro esempio di domesticazione è quello avvenuto nel mais (*Zea mays*), il quale risulta molto diverso dal suo progenitore selvatico, il teosinte (*Euchlaena mexicana*) (Figura 14). Le differenze morfologiche chiave tra teosinte e mais sono: (1) due ranghi nel teosinte contro quattro (o superiori) di semi nel mais, (2) spighe singole nel teosinte contro spighe appaiate nel mais, (3) gluma esterna dura nel teosinte contro gluma esterna molle nel mais (4), pannocchia con shattering (disarticolazione del seme) nel teosinte contro pannocchia non-shattering nel mais, (5) infiorescenze laterali primarie maschili nel teosinte contro infiorescenze laterali primarie femminili nel mais e (6) rami laterali primari normalmente lunghi nel teosinte contro rami laterali primari corti nel mais e minor ramificazione nel mais, che presenta un culmo centrale ben distinto (Doebley et al., 1990).

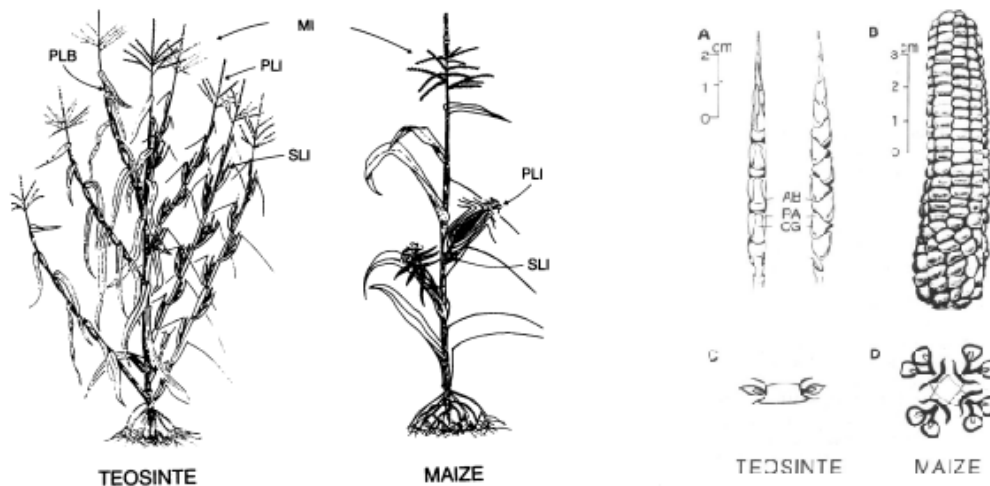


Figura 14: Differenze fenotipiche tra teosinte e mais. MI, infiorescenza principale, PLI infiorescenza primaria laterale, SLI infiorescenza secondaria laterale, PLB branca primaria laterale. (Doebley et al., 1990 con modifiche).

3.4 Il meccanismo della dispersione del seme (seed shattering) in *Arabidopsis thaliana*.

L'utilizzo di specie modello per lo studio di caratteri di interesse è di fondamentale importanza per stabilire le varianti molecolari, i geni e i meccanismi alla loro base.

Arabidopsis thaliana fa parte della famiglia delle Brassicaceae ed è un sistema modello per la ricerca. Presenta un genoma relativamente piccolo (circa 125 milioni di paia di basi), costituito da 5 cromosomi contenenti un numero stimato di 20.000 geni (Meinke et al., 1998). È una pianta con dimensioni piccole (20-50 cm) e ciclo di vita corto (circa 6 settimane) (Passardi et al., 2007). Diversi studi per comprendere il meccanismo fenotipico e genetico della dispersione dei semi sono stati effettuati inizialmente su questa specie.

In *A. thaliana*, la siliqua matura è formata da tre diversi tessuti: le valve, il reple e i margini delle valve, localizzati tra ogni valva ed il reple (Figura 15) (Liljegren et al., 2004). I margini delle valve corrispondono alla zona di deiscenza (Figura 15) e comprendono due ulteriori tessuti: strato di lignificazione e strato di separazione (Figura 15). Lo strato di lignificazione al margine delle valve e uno strato interno lignificato delle valve (endocarpo b) (Figura 15) sono necessari per la creazione di tensione meccanica nella siliqua secca prima del distacco delle valve dal reple (Figura 15) che avviene nello strato di separazione (Di Vittori et al., 2019). È stato dimostrato che la mancata differenziazione di una parete secondaria lignificata nello strato di lignificazione di un mutante di *A. thaliana* (*ind-2*) (Figura 16) causa il fallimento dell'apertura della siliqua, diversamente dalla forma selvatica (Figura 16) che invece è deiscente (Liljegren et al., 2004). È stato inoltre dimostrato che la mancanza di uno strato funzionale di abscissione, insieme alla lignificazione ectopica dello strato di cellule che connettono le valve al reple previene la deiscenza della siliqua; infatti, la separazione cellulare necessita di uno strato cellulare specializzato che non sia lignificato e che possa essere soggetto ad autolisi (Rajani et al., 2001).

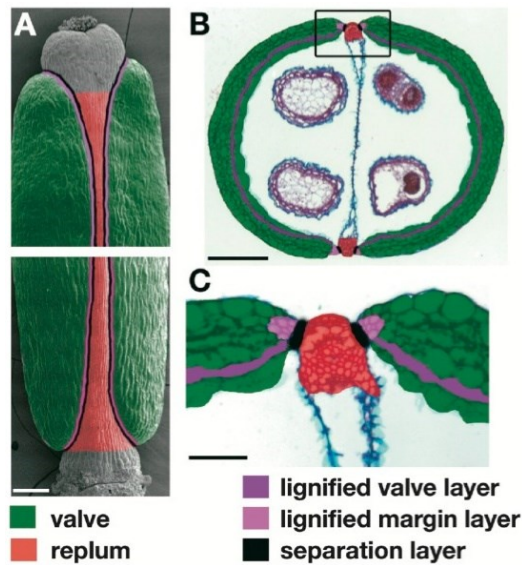


Figura 15: Scansione al microscopio elettronico di una siliqua matura di *A. thaliana selvatica* (Liljegren et al., 2004).

Il controllo genetico della dispersione dei semi è stato approfondito in moltissime specie, e diversi geni sono stati identificati nella specie modello *A. thaliana*, insieme alla loro interazione per la corretta formazione della zona di deiscenza. È stato evidenziato come diversi fattori di trascrizione controllino, mediante una cascata genica, la corretta determinazione dei tessuti coinvolti nell'apertura della siliqua (Figura 17). Liljegren et al. (2000) hanno identificato due fattori di trascrizione MADS-box (*Shatterproof-1* e *Shatterproof-2*) che agiscono a monte della cascata genica che dirige la formazione della zona di deiscenza (Figura 17). Il doppio mutante *shp-1/shp-2* mostra completa indeiscenza, una zona di deiscenza poco sviluppata con un contenuto ridotto di lignina nello strato di lignificazione (Liljegren et al., 2000). I geni target di *SHP1* e *SHP2* sono *Indehiscent* (Liljegren et al., 2004) e *Alcatraz* (Rajani et al., 2001); essi promuovono la corretta differenziazione dello strato di lignificazione e dello strato di separazione, rispettivamente. Entrambi i mutanti *IND* e *ALC* producono un frutto indeiscente.

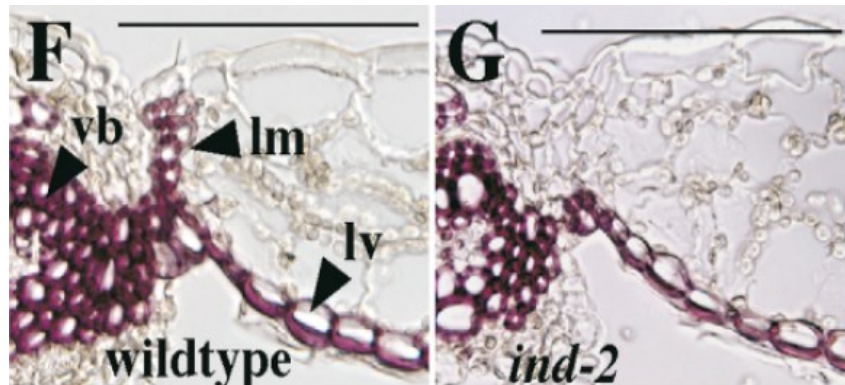


Figura 16: Osservazione al microscopio del margine delle valve con colorazione specifica per la lignina nella siliqua wild type (F) e mutante (*ind-2*) (G) di *A. thaliana*. Il mutante *ind-2* manca la corretta differenziazione dei margini delle valve e la lignificazione delle cellule dei margini delle valve. *Vb*, Fascio cribro-vascolare, *lm* strato lignificato del margine della valva, *lv* strato cellulare interno lignificato della valva. (Liljegren et al., 2004 con modifiche).

I fattori di trascrizione *Fruitfull* (*FUL*) (Gu et al., 1998, Ferrándiz et al., 2000) e *Replumless* (*RPL*) (Roeder et al., 2003), confinano l'espressione di *SHP*, *IND* e *ALC* ai margini delle valve (Figura 17). *FUL* e *RPL* sono espressi infatti nelle valve e nel reple, rispettivamente, dove prevengono la lignificazione ectopica che sarebbe promossa dai geni del margine delle valve (*SHP*, *IND*) (Figura 17).

A valle della cascata genica promossa da *SHP*, un fattore di trascrizione *NAC* (*NST1*) è coinvolto nell'ispessimento della parete cellulare secondaria e nei processi di corretta deposizione della lignina nello strato di lignificazione (Mitsuda et al., 2008) (Figura 17). Il mutante *nst-1* manca completamente della lignificazione dei margini delle valve, il che risulta in silique completamente indeiscenti (Mitsuda et al., 2008). Infine, l'attività di due endopoligalatturonasi codificate dai geni *ARABIDOPSIS DEHISCENCE ZONE POLYGALACTURONASE1* (*ADPG1*) e *ADPG2*, sono necessarie per la degradazione della pectina nella lamella mediana, promuovendo il distacco delle valve dal reple nello strato di separazione prima della dispersione dei semi (Ogawa et al., 2009).

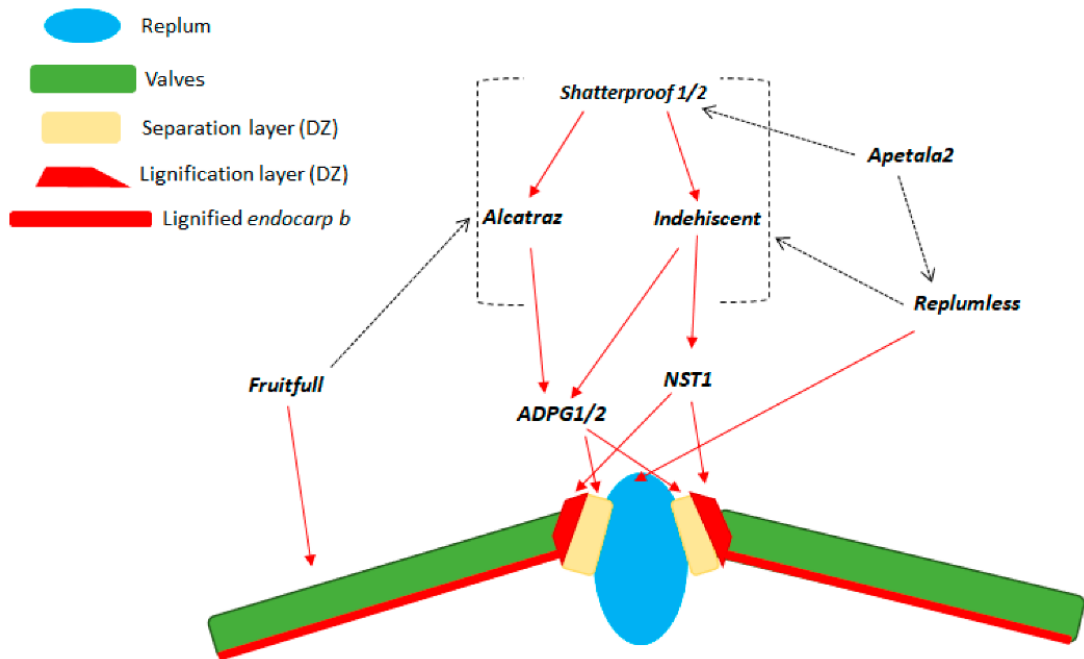


Figura 17: Modello della cascata genetica alla base della formazione della zona di deiscenza in *A. thaliana* (Di Vittori et al., 2019, con modifiche da Dong et al., 2015).

Hofhuis et al. (2016) hanno studiato il meccanismo di dispersione dei semi di tipo esplosivo in una specie appartenente al genere *Cardamine*, nella famiglia delle Brassicaceae. In questa specie hanno evidenziando una elevata deposizione asimmetrica di lignina nelle pareti cellulari dell'endocarpo b delle valve della siliqua (Figura 18).

Hofhuis et al. (2016) hanno proposto un modello nel quale queste "cellule a cerniera" sono necessarie per immagazzinare la tensione meccanica utile alla torsione esplosiva delle valve; quando la zona di deiscenza si rompe, questa "cerniera" si apre e permette all'endocarpo b di rilasciare la tensione accumulata. La diversa elasticità tra esocarpo ed endocarpo b è responsabile della torsione esplosiva delle valve (Hofhuis et al., 2016). Hofhuis et al. (2016) hanno confrontato il pattern di lignificazione delle valve di diverse specie della famiglia delle Brassicaceae, dimostrando come la deposizione asimmetrica della lignina sia un pattern ricorrente nelle specie del genere *Cardamine*, caratterizzate dal seed-shattering esplosivo, mentre un pattern di lignificazione uniforme nelle pareti cellulari caratterizza specie come *A. thaliana*, che presentano una tipologia di deiscenza meno intensa (Figura 18).

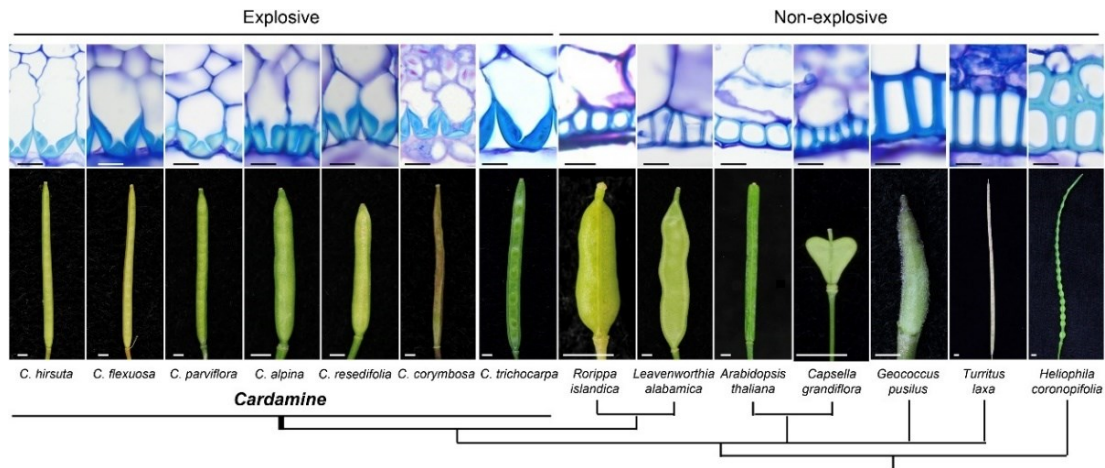


Figura 18: Pattern di lignificazione delle pareti cellulari nell'endocarpo b di specie della famiglia Brassicacea. Le specie del genere Cardamine presentano una deposizione asimmetrica della lignina nella parete cellulare (tipologia a cerniera) che risulta associata a meccanismi di seed-shattering esplosivi. In altre specie, caratterizzate da una deposizione di lignina simmetrica si verifica seed shattering meno intenso. In alto; immagini al microscopio ottico di sezioni trasverse di valve mature con pareti cellulari colorate da blu di toluidina. In basso; frutti wild-type maturi (Hofhuis et al., 2016).

3.5 Il meccanismo di dispersione dei semi e l'evoluzione parallela

La perdita (o riduzione) dei meccanismi di dispersione del seme è un esempio di evoluzione fenotipica parallela, in quanto questo carattere della sindrome della domesticazione è stato soggetto a selezione in modo indipendente in diverse specie, in centri di domesticazione ed in periodi storici diversi, portando agli stessi cambiamenti funzionali (Di Vittori et al., 2019). La domesticazione offre numerosi esempi di evoluzione fenotipica parallela, associata con l'adattamento ai bisogni umani ed ai nuovi agro-ecosistemi (Di Vittori et al., 2017). La domesticazione del seed-shattering si è quindi verificata in specie provenienti anche da famiglie lontane, con meccanismi differenti a seconda dell'infiorescenza/frutto, ma col raggiungimento dello stesso risultato. Ad esempio, nelle specie selvatiche di specie cerealicole, come frumento ed orzo, la dispersione dei semi avviene quando la spighetta si disarticola dal rachide, che costituisce l'asse centrale dell'infiorescenza; questo fenotipo viene definito come "rachide fragile" (Figura 19). Pourkheirandish et al. (2015) hanno dimostrato che lo spessore della parete cellulare primaria ed in particolare della parete secondaria nello strato di abscissione (i.e., il tessuto localizzato tra il rachide e la spighetta) risulta inferiore

negli individui caratterizzati dal rachide fragile, rispetto alle equivalenti pareti cellulari in una spiga caratterizzata da rachide non fragile (Figura 20).

A livello genetico, Pourkheirandish et al. (2015) hanno identificato due geni (*Btr1* e *Btr2*) nel cromosoma 3, che sono responsabili del fenotipo “rachide fragile” nell’orzo selvatico quando entrambi sono in condizione dominante; due mutazioni (i.e., delezioni) indipendenti hanno portato alla neo-funzionalizzazione di entrambi i loci (*Btr1* e *Btr2*), il che ha generato piante di orzo con rachide resistente quando almeno uno dei due geni è in forma recessiva.



Figura 19: Il fenotipo rachide fragile o “brittle-rachis (a sinistra) ed un fenotipo resistente (rachide non fragile o “non-brittle rachis”) (a destra) in orzo (Pourkheirandish et al., 2015 con modifiche).

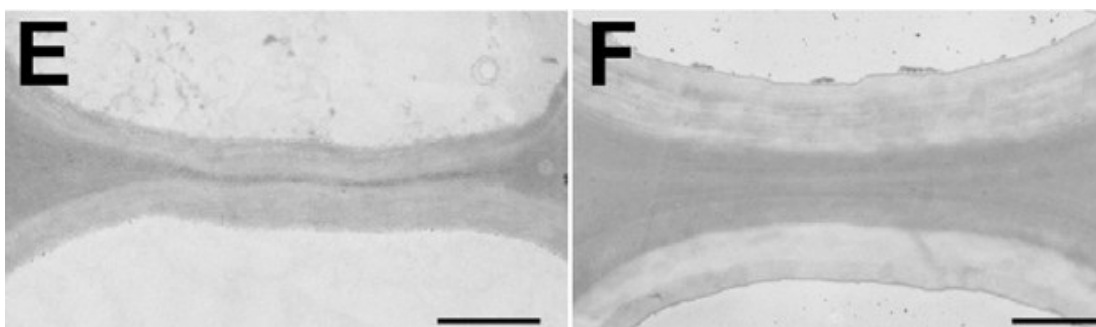


Figura 20: Immagine al microscopio elettronico di pareti cellulari in corrispondenza della zona di abscissione nella spiga di orzo caratterizzata da rachide fragile (E) e rachide resistente (F). Risulta evidente il maggiore spessore della parete cellulare primaria (in grigio chiaro) e secondaria (in grigio scuro) nello strato di separazione della spiga con rachide resistente (Pourkheirandish et al., 2015 con modifiche).

La dispersione dei semi avviene nei cereali anche con altri meccanismi, che dipendono dall'architettura dell'infiorescenza. Nel riso (*Oryza sativa* L.), che produce una pannocchia, la cariosside si disarticola al pedicello, che è l'ultima ramificazione che porta il fiore nell'infiorescenza; in questa specie, il corretto sviluppo di uno strato specializzato di abscissione cellulare, alla giunzione tra pedicello e fiore, è necessario per la dispersione della cariosside (Konishi et al., 2006, Li et al., 2006, Zhou et al., 2012, Yoon et al., 2014). Li et al. (2006) hanno riportato che *Oryza nivara* (specie selvatica di riso) ha uno strato di abscissione continuo tra pedicello e cariosside. La forma domesticata, *O. sativa*, presenta invece uno strato di separazione incompleto con un attaccamento più forte della cariosside al pedicello ed una maggiore resistenza alla dispersione del seme. Inoltre, è stato osservato che individui della sottospecie *Japonica* presentano maggiore resistenza allo shattering rispetto alle cultivar della sottospecie *Indica*, grazie ad uno strato di abscissione più discontinuo.

Per quanto riguarda il controllo genetico dello shattering nel riso, diversi loci e geni sono stati identificati alla base della riduzione o perdita di questo carattere. Un polimorfismo a singolo nucleotide sul cromosoma 1 nella regione regolatrice di un gene homeobox tipo-BEL1 (*qSH1*; omologo di *REPLUMLESS AtRPL* di *A. thaliana*) porta alla mancata differenziazione dello strato di abscissione alla base della cariosside definendo un fenotipo non-shattering (Konishi et al., 2006). Zhou et al. (2012) hanno identificato *SHATTERINGABORTION1 (SHATI)* nel riso, che codifica un fattore di trascrizione *APETALA2* necessario per la differenziazione della zona di abscissione e per lo shattering. Yoon et al. (2014) hanno identificato *SH5*, un gene omologo di *qSH1*, che è positivamente coinvolto nello sviluppo della zona di abscissione; la sua sovra-espressione, porta ad una riduzione della deposizione della lignina alla base della spighetta, con aumento della suscettibilità allo shattering. Li et al. (2006) hanno identificato una mutazione che è associata alla riduzione dello shattering sul cromosoma 4, restringendo un QTL precedentemente individuato ad una regione di 1.7Kb, in corrispondenza del gene *SH4*, omologo del fattore di trascrizione *MYB3*. Lin et al. (2007) identificarono *SHAI* per la dispersione del seme sul cromosoma 4, il quale è allelico a *SH4*. Wu et al. (2017) hanno dimostrato che il gene *OgSH4* nel riso africano ha subito un processo di domesticazione con una mutazione nel gene associata alla perdita del seed shattering; *OgSH4* è il gene ortologo di *SH4/SHAI* nel riso asiatico (Li et al., 2006, Lin et al., 2007), il che suggerisce l'occorrenza di evoluzione parallela a livello molecolare tra le due specie di riso (*O. sativa* e *O. glaberrima*).

In sorgo (*Sorghum bicolor*), Lin et al. (2012) identificarono un gene (*ShI*) con dominanza completa per il carattere dello shattering. Il gene in questione è un fattore di trascrizione della

famiglia *YABBY* e la presenza di tre alotipi distinti associati con la mancanza di shattering suggerisce l'occorrenza di diversi eventi di domesticazione indipendenti nello stesso locus. Lin et al. (2012) dimostrarono che una mutazione del suo ortologo nel riso (*OsSh1*) porta a riduzione della dispersione del seme, ipotizzando una funzione conservata di questo gene nelle monocotiledoni.

Sempre Lin et al. (2012), identificarono nel mais due QTL nei cromosomi 1 e 5 associati con la modulazione della dispersione del seme, contenenti due geni ortologhi di *Sh1* (i.e., *ZmSh1-1* e *ZmSh1-5*), che rinforza l'ipotesi di un'evoluzione parallela a livello molecolare tra specie cerealicole.

Nei legumi come il fagiolo comune e la soia, il pod-shattering avviene quando il baccello secco si apre a maturità lungo la sutura ventrale. Dong et al. (2014) hanno dimostrato che l'aumento dell'ispessimento della parete cellulare secondaria nelle "fiber cap cells" della sutura ventrale nella soia domesticata (*Glycine max*) determina la resistenza all'apertura delle valve; nel progenitore selvatico (*Glycine soja*) il mancato ispessimento delle pareti cellulari nelle "fiber cap cells" determina la deiscenza del baccello a maturazione (Figura 21). Inoltre, Funatsuki et al. (2014) hanno dimostrato che la lignificazione di uno strato interno delle valve è positivamente correlato con il livello di shattering nella soia selvatica; questa osservazione suggerisce un parallelismo con la lignificazione dell'endocarpo b di *A. thaliana* che contribuisce alla modulazione dello shattering (Figura 15 e Figura 17) (Di Vittori et al., 2019).

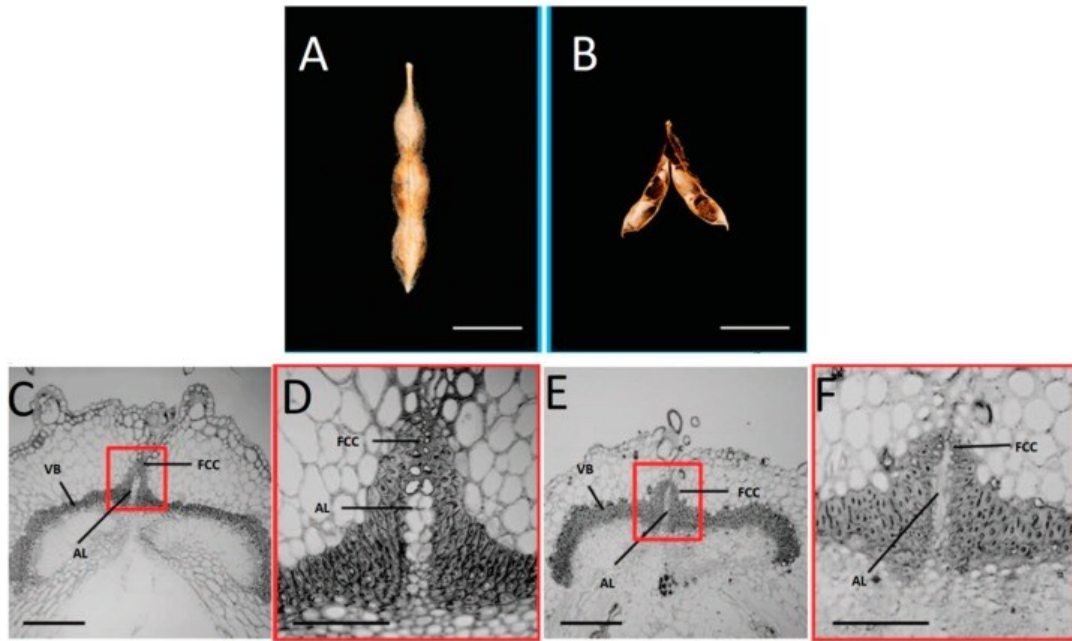


Figura 21: Baccelli maturi di soia domesticata (fenotipo non-shattering o indeiscente) (A) e baccelli maturi di soia selvatica (fenotipo shattering o deiscente) (B); Immagine al microscopio della zona di deiscenza e delle fiber cap cells (FCC) in soia domesticata (C,D), e soia selvatica (E,F) (D ed (F) sono zoom di (C) ed (E), rispettivamente. (Dong et., al 2014 con modifiche).

A livello genetico, nella soia, un gene ad effetto maggiore nel cromosoma 16 è responsabile per la resistenza allo shattering, mediata dal maggior ispessimento delle pareti cellulari nelle fiber cap cells (Dong et al., 2014). Questo gene, chiamato *SHATI-5* è il gene omologo di *AtNST* (Mitsuda et al., 2008) che promuove l'ispessimento della parete cellulare secondaria nella zona di deiscenza di *A. thaliana*. Dong et al. (2014) hanno dimostrato la localizzazione del prodotto genico (proteina) del gene *SHATI-5* nelle fiber cap cells (Figura 22). Inoltre, l'allele domesticato (*GmSHATI-5*) risultava sovra-espresso (con un rapporto di 15 volte) nelle fiber cap cells della sutura ventrale del baccello in soia domesticata rispetto all'allele selvatico nello stesso tessuto (*GsSHATI-5*) (Figura 22). Dong et al. (2014) hanno dimostrato che una mutazione (delezione) nella regione del promotore dell'allele domesticato (*GlycineSHATI-5*) ha determinato il mancato riconoscimento da parte di un fattore di repressione della trascrizione, risultante in una sovra-espressione dell'allele domesticato e nel fenotipo indeiscente (Figura 22).

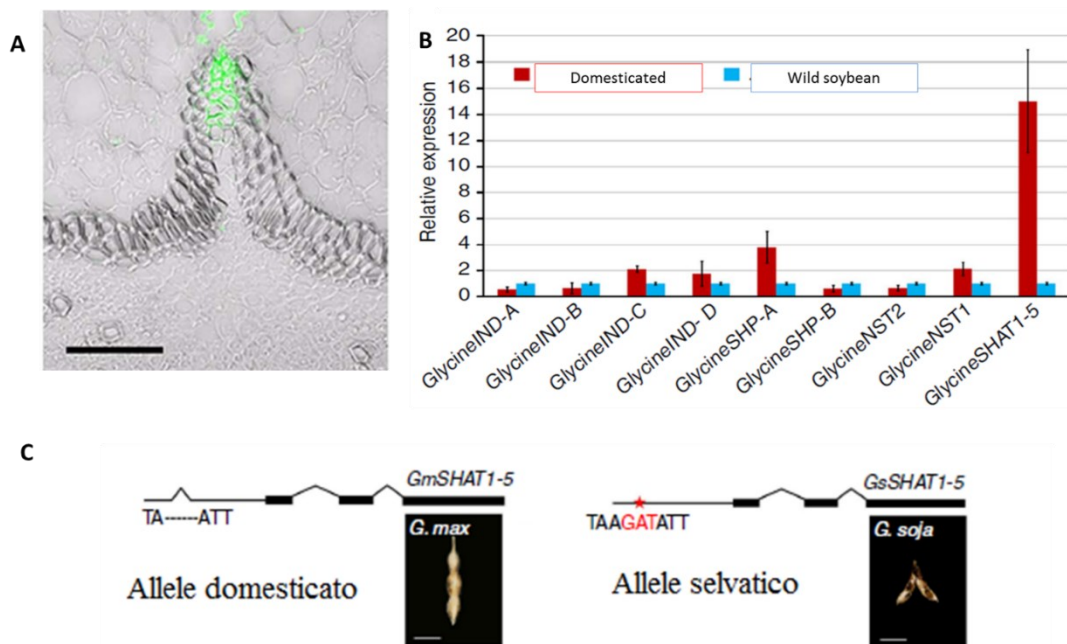


Figura 22: Meccanismo molecolare alla base della riduzione del pod shattering in soia. (A) proteina GmSHAT1-5 intensamente accumulata nelle “fiber cap cells” (FCC) a 18 DPA (giorni dopo l’antesi). (B) Analisi dell’espressione di vari orologi di geni descritti per la modulazione del seed shattering in *A. thaliana*, nelle FCC del baccello di soia. (C) Mutazione nella regione del promotore nell’allele domestico, alla base del mancato riconoscimento da parte di un repressore della trascrizione (Dong et al., 2014 con modifiche).

In soia, un altro gene chiamato *PDHI* promuove la deposizione della lignina nello sclerenchima interno delle valve del baccello (Funatsuki et al., 2014), positivamente associata alla maggior torsione delle valve e al pod-shattering; Funatsuki et al. (2014) hanno identificato nei genotipi resistenti al pod-shattering la presenza di un polimorfismo di un singolo nucleotide che genera un prematuro codone di stop ed una proteina non funzionale (Funatsuki et al., 2014).

Nel fagiolo dall’occhio (*Vigna unguiculata*), una specie vicina filogeneticamente al fagiolo comune, Lo et al. (2018) hanno recentemente mappato due QTLs per il pod shattering sui cromosomi 3 e 5, denominati *CPshat3* e *CPshat5*; quest’ultimo locus mappa in una regione sintenica col major locus *qPD5.1-Pv* nel fagiolo comune, il quale è associato al fenotipo indeiscente (Rau et al., 2018, Di Vittori et al., 2021); Takahashi et al. (2020) hanno suggerito che i caratteri “pod shattering” e “pod tenderness” siano associati a una mutazione nel gene ortologo di *MYB26* in *Vigna angularis* e *Vigna unguiculata*, mentre Di Vittori et al. (2021) hanno proposto l’ortologo di *MYB26* come gene responsabile del fenotipo indeiscente in

fagiolo all'interno del major locus *qPD5.1-Pv* (Rau et al., 2018). Questi risultati suggeriscono l'azione dell'evoluzione parallela anche a livello molecolare per la perdita del pod shattering tra queste specie vicine, come suggerito da Di Vittori et al. (2021).

4. *PHASEOLUS VULGARIS* E SEED SHATTERING

4.1 L'architettura fenotipica del meccanismo di dispersione dei semi in fagiolo (*P. vulgaris*)

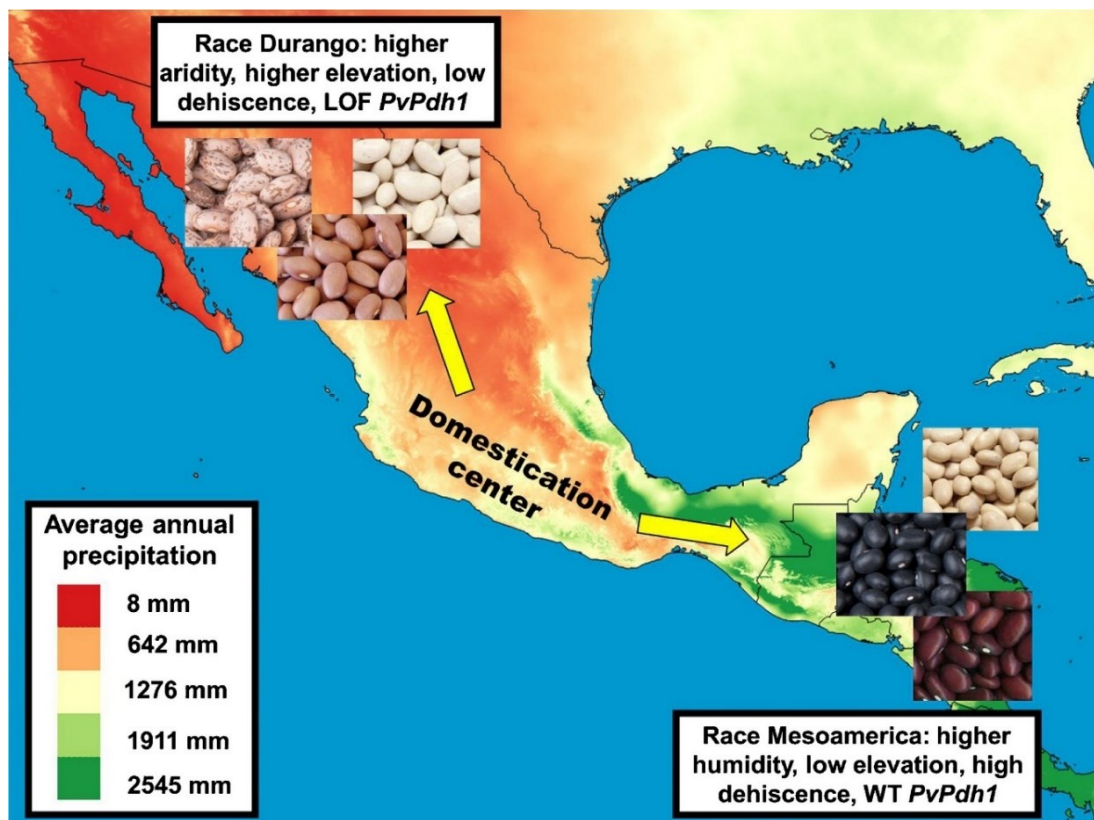
La riduzione o la perdita del meccanismo di dispersione dei semi (pod shattering) è una pietra miliare del processo di domesticazione in fagiolo e rappresenta un perfetto esempio di adattamento per un carattere a seconda delle diverse aree eco-geografiche in cui avviene la domesticazione; la diminuzione o perdita di pod shattering inoltre ha garantito agli agricoltori un più facile ed abbondante raccolto (Tang et al., 2013), in virtù delle minori perdite di resa associate a questo carattere. I genotipi selvatici di fagiolo sono generalmente caratterizzati da un alto livello di pod shattering e torsione elevata delle valve (i.e., pod twisting; i baccelli vengono definiti “sigaroidi” per la particolare forma assunta); questo fenotipo risulta in baccelli che, quando secchi a maturazione, possono aprirsi con elevata intensità, anche quando sottoposti a lievi pressioni esterne o interne, disperdendo i semi a diversi metri di distanza dalla pianta madre (Figura 23). La domesticazione ha determinato una riduzione della manifestazione di questo carattere in fagiolo, e nelle varietà “Dry Bean”, coltivate per la produzione del seme, il pod shattering non è stato tuttavia completamente eliminato (Figura 23). Queste varietà domestiche presentano bassi livelli di pod shattering in campo, ed una torsione del baccello (i.e., pod twisting) fortemente ridotta o addirittura in alcuni casi assente. Le caratteristiche sopra descritte permettono di limitare nelle varietà “dry bean” la perdita di prodotto (i.e., seme) ma al tempo stesso consentono una trebbiatura dei baccelli agevole che si ripercuote in un minor danneggiamento dei semi (e.g., trebbiatura meccanica) e un minor sforzo per rimuoverli dai baccelli secchi. La domesticazione o diversificazione per la produzione di nuove varietà e tipologie di fagiolo ha permesso la comparsa delle varietà “Snap Bean”, vocate per la produzione del fagiolino verde fresco (Figura 23). Nei baccelli di queste varietà si ha una forte riduzione o perdita di fibre, anche a livello della sutura (i.e., “string” in inglese o “filo”). I baccelli, totalmente indeiscenti, risultano difficili da trebbiare dopo la raccolta e non si aprono facilmente lungo le suture dorsale e ventrale.



Figura 23: Baccelli e semi di genotipi selvatici (A), domesticati “dry bean” (B) e domesticati indeiscenti “snap bean” (C).

Come descritto sopra, la domesticazione di questo carattere è un perfetto esempio di risposta alla selezione in popolazioni adattate a diverse regioni geografiche e condizioni ambientali. Recentemente, Parker et al. (2020) hanno infatti identificato un allele di resistenza per lo shattering nel gene *PvPdh1* in fagiolo, ortologo di *PDHI* in soia (Funatsuki et al., 2014). In particolare, Parker et al. (2020) hanno osservato una maggior frequenza dell’allele di resistenza nelle accessioni della razza ecogeografica Durango, la quale si è adattata alle regioni semi aride centrali e degli altipiani del Messico del nord (Singh et al., 1991) (Figura 24). Nelle regioni tropicali dove invece si sono adattati gli individui della razza Mesoamerica, vi è una minor suscettibilità al pod shattering, in quanto la maggiore umidità ambientale mitiga la suscettibilità allo shattering, riducendo la pressione selettiva. Gli alleli che predominano negli ambienti aridi possono essere quindi una fonte utile nel processo di miglioramento genetico del fagiolo, per quelle varietà destinate alla coltivazione in regioni dove si può prevedere maggiore aridità in fase di raccolta.

Risulta quindi fondamentale conoscere i geni che controllano un determinato carattere, per ricostruire l’architettura desiderata di un fenotipo, attraverso la possibilità di piramidizzare geni multipli e modulare la resistenza al pod shattering (Parker et al., 2021) a seconda delle esigenze.



*Figura 24: Differente pressione selettiva per il carattere “Pod shattering” in popolazioni e razze di fagiolo adattate a diverse condizioni ambientali. La razza Durango, adattata a regioni aride dove vi è maggiore suscettibilità al pod shattering, presenta l’allele di resistenza al locus *PvPdh1*, diversamente dagli individui della razza Mesoamerica, dove l’allele non-resistente è ampiamente diffuso, probabilmente come risultato di una minor pressione selettiva (i.e., regioni con maggiore umidità e minor suscettibilità allo shattering) (Parker et al., 2020).*

Il meccanismo alla base del pod shattering nel fagiolo è diverso rispetto a quello dei cereali, ed è dovuto da un “movimento igroscopico” delle valve dopo la disidratazione del baccello, ed il rilascio della tensione elastica accumulata durante la disidratazione risulta nell’apertura delle valve lungo la sutura. La quantità di lignina nei baccelli, ed il quantitativo di carbonio, sono stati associati alla diversa predisposizione verso il pod shattering in fagiolo (Murgia et al., 2017).

Per studiare l’architettura fenotipica e i meccanismi molecolari alla base di questo carattere, una popolazione di 267 ILs (i.e., Introgression Lines) è stata sviluppata e caratterizzata nell’ambito di una collaborazione tra i gruppi di ricerca del Prof. Roberto Papa (Università Politecnica delle Marche) e della Prof. Giovanna Attene (Università di Sassari).

La popolazione è stata sviluppata partendo da un incrocio tra il genotipo selvatico Mesoamericano “G12873” altamente deiscende ed un genotipo Andino “snap bean” denominato MIDAS, da cui era stata ottenuta precedentemente una RIL (i.e., recombinant inbred line) population (Koinange et al., 1996). La popolazione ILs è stata costruita tramite un primo reinrocio tra una RIL donatrice ad alto shattering (i.e., MG38) ed il parentale donatore (MIDAS). MG38 venne selezionato, in aggiunta alla presenza di elevato shattering, per tratti selvatici del baccello (taglia ridotta, valve pigmentate) e del del seme (piccole dimensioni). MG38 è stato scelto inoltre in quanto genotipo a sviluppo determinato, privo di dormienza e insensibile al fotoperiodo, al fine di facilitare l’allevamento della popolazione derivante (Murgia et al., 2017). MIDAS è caratterizzato da un baccello non shattering (totalmente indeiscende) largo, dritto, a ridotto contenuto di fibre, giallo e con semi relativamente grossi. La popolazione finale è stata ottenuta mediante due ulteriori reincroci (BC3), selezione fenotipica per mantenere il pod shattering nelle progenie e autofecondazione. In questo modo, sono state costituite delle linee quasi isogeniche rispetto a MIDAS, ma caratterizzate dalla segregazione del carattere shattering qualitativamente (presenza/ assenza) e quantitativamente (diversa intensità dello shattering).

I livelli di shattering (numero di baccelli aperti a maturità sul totale di baccelli presenti in una singola pianta) erano molto variabili; infatti i dati ottenuti confermano un valore percentuale di baccelli per pianta che si aprono a maturità da 0 a 82,6% con una media di 31,6%. Le modalità (percentuale di baccelli twisting e non-twisting per pianta) di shattering, come i livelli, risultavano anche altamente variabili entro la popolazione (Murgia et al., 2017). Dall’analisi chimica dei baccelli delle linee parentali, MG38 (elevata deiscenza) presentava un contenuto di carbonio del 43.8% in peso secco, con un aumento significativo del 6,8% rispetto alla linea MIDAS (totalmente indeiscende) (Murgia et al., 2017). Un’analisi della varianza (ANOVA) ha rivelato anche una differenza marginale significativa per il contenuto di idrogeno, maggiore in MG38 (6.7% peso secco) rispetto a MIDAS (6.5% peso secco) (Murgia et al., 2017). Nel confronto sull’intera popolazione che comprendeva sia linee indeiscenti e deiscenti, i baccelli delle linee d’introggressione deiscenti mostravano un aumento del contenuto di carbonio del 6,9% rispetto alle linee indeiscenti; inoltre le linee d’introggressione indeiscenti avevano lo stesso contenuto in carbonio di MIDAS, mentre le linee d’introggressione deiscenti rispecchiavano il livello di carbonio di MG38 (Murgia et al., 2017).

Inoltre, le valve del Baccello di MIDAS e MG38 hanno contenuti di fibre fortemente differenti. Il contenuto di fibre nei baccelli di MG38 (62%) era significativamente superiore

rispetto a quello di MIDAS con un contenuto di fibre di circa il 42%. I livelli di lignina, emicellulosa e cellulosa erano sempre maggiori nei baccelli di MG38 rispetto a MIDAS, ma in particolare, erano i baccelli delle linee d'introggressione ad elevato shattering (i.e., con pod shattering superiore al parentale MG38) a mostrare una elevata differenza nel contenuto di lignina rispetto alle linee indeiscenti, suggerendo un ruolo centrale di questo polimero della parete cellulare nella modulazione del pod shattering (Murgia et al., 2017).

Dalle analisi condotte da Murgia et al. (2017), lo shattering era significativamente associato ad un basso peso dei semi, piccole dimensioni del baccello e ad un basso indice di raccolta a livello di baccello. Gli autori suggerivano quindi che il pod shattering potrebbe avere un "costo energetico" per la pianta, legato alla sintesi delle biomolecole e la creazione dei tessuti necessari (deposizione di lignina nei baccelli) per la dispersione dei semi, che potrebbe ridurre le risorse disponibili per lo sviluppo di semi e baccelli. Il pod shattering potrebbe essere visto come una sindrome a livello del baccello, comprendente anche modificazioni significative ad altri caratteri associati (Murgia et al., 2017). Tuttavia, non si può escludere un effetto pleiotropico, con un gene in grado di controllare più caratteri (Murgia et al., 2017).

Di Vittori et al. (2021) hanno investigato il pattern di lignificazione nei baccelli di un set di linee quasi isogeniche (NILs; near isogenic lines) provenienti dalla popolazione sviluppata da Murgia et al. (2017) e Rau et al. (2019) e caratterizzate da elevato pod-shattering, confrontando i risultati ottenuti con il pattern di lignificazione dei baccelli indeiscenti di MIDAS. I risultati del lavoro mostrano come la lignificazione della guaina ventrale e dorsale siano già evidenti allo stadio di 6 DAP (days after pod setting; giorni dopo l'allegagione), sia per la linea deiscente (i.e., IL 244A/1A) che per quella indeiscente (MIDAS). Tuttavia, già a 6 DAP si osservava un maggior grado di lignificazione nella linea deiscente oltre ad una conformazione della guaina ventrale differente tra i due genotipi.

Allo stadio di 10 DAP, il pattern di lignificazione della sutura ventrale differiva in modo evidente tra i genotipi deiscenti e quelli indeiscenti. In particolare, a livello della zona di abscissione della linea non-shattering, alcuni strati di cellule non mostravano lignificazione nelle pareti cellulari, a differenza del corrispondente tessuto della linea indeiscente MIDAS, dove vi era maggiore lignificazione. Di Vittori et al. (2021) hanno suggerito che la presenza di questa lignificazione nella zona di abscissione garantisse una maggiore resistenza verso l'apertura del baccello, e che quindi si potesse postulare un meccanismo di evoluzione parallela a livello istologico per la resistenza allo shattering con soia, in virtù dei risultati di Dong et al. (2014) precedentemente illustrati. Inoltre, le pareti delle cellule che circondano la zona di abscissione nella guaina ventrale risultavano ispessite nei baccelli ad alto shattering,

se confrontate con lo stesso tessuto nei baccelli non-shattering; questo meccanismo (i.e., maggior ispessimento delle pareti cellulari nelle zone circostanti la zona di abscissione) potrebbe essere necessario per accumulare tensione nei baccelli ad alto shattering e promuoverne l'apertura a maturazione (Di Vittori et al., 2021), come descritto in altre specie, tra cui la specie modello *A. thaliana*. Infine, Di Vittori et al. (2021) hanno confermato che a 10 DAP il baccello ad elevato shattering mostra già uno strato interno nelle valve lignificato (Murgia et al., 2017), a differenza dei baccelli indeiscenti (MIDAS); questa modificazione istologica potrebbe essere coinvolta nella modulazione del pod shattering (Di Vittori et al., 2021), in modo simile a quanto dimostrato in soia (Funatsuki et al., 2014).

A 30 DAP (i.e., baccello maturo) infine, le differenze a livello istologico tra baccelli deiscenti e indeiscenti diventano evidenti (Di Vittori et al., 2021).

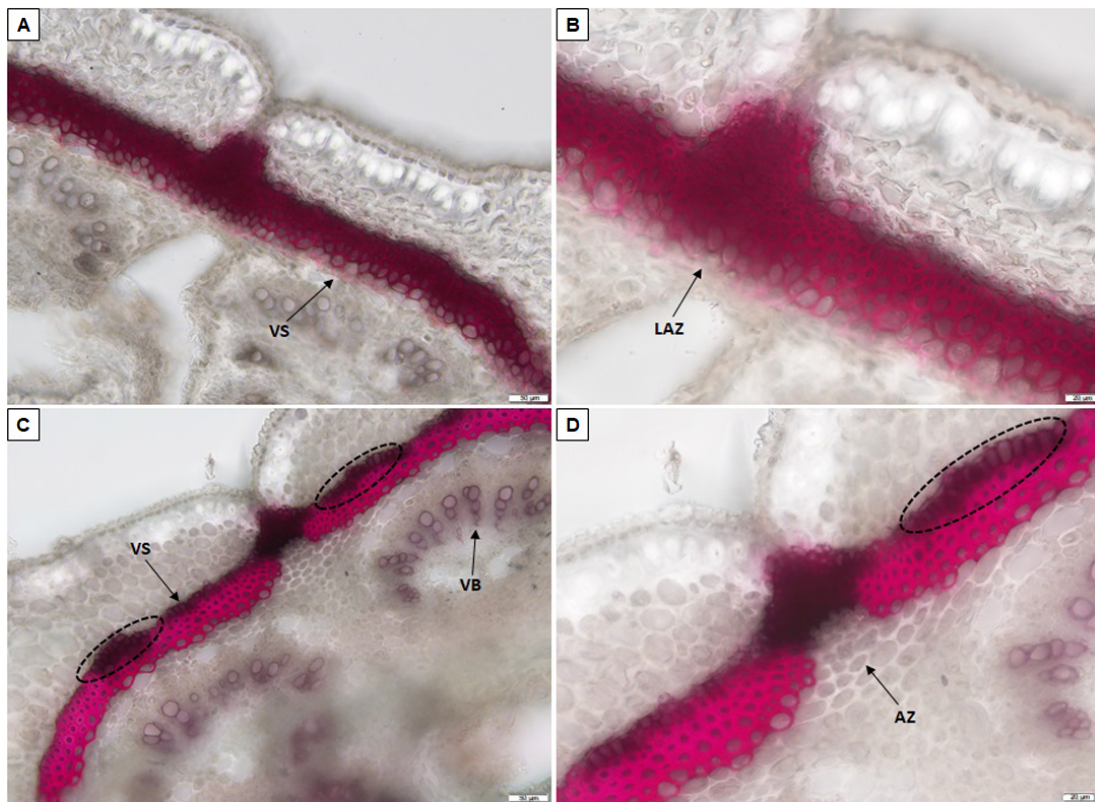


Figura 25: Pattern di lignificazione della guaina ventrale in baccelli deiscenti (C e D) e baccelli indeiscenti (A e B) a 30 giorni dopo l'allegagione (baccello maturo). B e D sono zoom di A e C. VS, ventral sheath (guaina ventrale), VB, vascular bundles (fasci vascolari), LAZ, lignified abscission zone (zona di abscissione lignificata), AZ, abscission zone (zona di abscissione) Di Vittori et al., (2021).

Nella regione dove i baccelli si aprono a maturazione, nel tipo shattering sono evidenti alcuni strati di cellule che mancano completamente la lignificazione della parete cellulare, in confronto con i tessuti equivalenti del tipo non-shattering (Figura 25) (Di Vittori et al., 2021).

Uno strato di abscissione non funzionale è responsabile per la perdita della deiscenza nel fagiolo comune (Di Vittori et al., 2021). La parete cellulare delle cellule della guaina ventrale delle linee ad alto shattering era inoltre fortemente ispessita rispetto al corrispettivo tessuto della linea non-shattering, ed il lume delle cellule appariva quasi completamente occluso, a causa della deposizione di lignina in alcune delle cellule della guaina ventrale del baccello deiscente. È possibile che diversi gradi di ispessimento della parete cellulare lungo le suture siano necessari per creare la tensione meccanica per avere lo shattering e la torsione del baccello (Di Vittori et al., 2021).

4.2 Le basi genetiche della deiscenza del baccello in *P. vulgaris*

La deiscenza del baccello e il seed shattering nelle piante, come altri caratteri fenotipici di interesse, sono regolati da meccanismi fisiologici e genetici complessi, ed il fenotipo finale risulta dall'interazione della componente genetica con l'ambiente di crescita e/o coltivazione. Numerosi geni e loci sono stati identificati per il controllo dello shattering in diverse specie coltivate (e.g., cereali e leguminose) e nella specie modello *A. thaliana*, e recenti studi stanno facendo luce sui meccanismi genetici alla base del meccanismo di dispersione dei semi anche in *P. vulgaris* (Rau et al., 2018, Parker et al., 2020, Di Vittori et al., 2021). Koinange et al. (1996) mapparono geneticamente il tratto delle fibre del baccello e nella sutura del baccello (i.e., pod string) nel fagiolo comune, in una popolazione mappante (RIL) ottenuta dall'incrocio tra MIDAS (landrace Andina snap bean, tipologia stringless) e G12873 (accessione wild Mesoamericana ad alto shattering). Nel loro studio hanno mappato il locus *St*, associato alle fibre nella sutura del baccello nel gruppo di linkage *D2*, corrispondente al cromosoma Pv02.

Nel loro lavoro, Koinange et al. (1996) hanno quindi assunto una correlazione diretta tra il ridotto contenuto di fibre nella sutura e l'assenza di pod-shattering. Successivamente, Nanni et al. (2011) e Gioia et al. (2013), hanno identificato, mediante l'approccio del "candidate gene" i geni omologhi in fagiolo di *SHATTERPROOF-1* e *INDEHISCENT*, rispettivamente. Questi due geni sono coinvolti direttamente nel meccanismo di shattering della siliqua in *A. thaliana* (Liljegren et al., 2000 e Liljegren et al., 2004) come precedentemente descritto. Nanni et al. (2011) hanno mappato il gene *PvSHP* sul cromosoma Pv06, in prossimità del gene *V* che controlla il colore del fiore (Nodari et al., 1993; McClean et al., 2002) in una posizione diversa

dal locus *St* (Pv02) (Koinange et al., 1996) utilizzando le popolazioni RIL mappanti BAT93 x JaloEEP558 (Freyre et al., 1998) e MIDAS x G12873 (Koinange et al., 1996). Gioia et al. (2013) hanno identificato e mappato la sequenza di *PvIND* utilizzando le stesse popolazione RIL di Nanni et al. (2011). *PvIND* è stato mappato sul cromosoma Pv02 vicino al locus *St*; tuttavia, Gioia et al. (2013) non hanno osservato una completa co-segregazione tra il locus *St* e *PvIND*. Recentemente, attraverso un'analisi GWAS (Genome-Wide Association Studies) condotta su di una popolazione ottenuta dall'incrocio tra ICA Bunsu (Pod-shattering suscettibile) x SXB 405 (Pod-shattering resistente; breeding line), entrambe appartenenti al pool genetico domesticato Mesoamericano, è stato identificato un QTL relativo alla deiscenza del baccello sul cromosoma Pv03 (Parker et al., 2020). Il QTL individuato è stato mappato tra i marcatori SNPs ss715639553 e ss715639323. Nello studio di Parker et al. (2020) non era stata presa in considerazione solo la popolazione bi-parentale ICA Bunsu x SXB 405, ma l'analisi di associazione GWAS per il carattere "pod shattering" era stata effettuata anche su due panel di accessioni al fine di esplorare la variabilità naturale per questo carattere. I panel utilizzati per l'analisi GWAS erano l'ADP (Andean Diversity Panel; Cichy et al., 2015) (208 accessioni) e il MDP (Middle American Diversity; Moghaddam et al., 2016) (278 accessioni). Il GWAS condotto su MDP ha identificato una SNP significativa (S1_149243152) localizzata a meno di 5.7 Kb dal gene candidato *PvPdh1* (Parker et al., 2020). Questo gene è l'ortologo di *GmPDHI* che regola la deiscenza del baccello in soia (Funatsuki et al., 2014). L'analisi ha rivelato inoltre altri loci potenzialmente coinvolti nella modulazione del pod shattering sui cromosomi Pv06 e Pv08 (Parker et al., 2020). L'analisi GWAS sul panel di accessioni andine (ADP) ha identificato associazioni significative col pod-shattering sui cromosomi Pv03, Pv05, Pv08 e Pv09 e diversi geni candidati (Parker et al., 2020), con una parziale sovrapposizione fisica tra i QTLs sui cromosomi Pv03 e Pv08 nelle analisi GWAS sui due panel. Il sequenziamento del gene *PvPdh1* ha rivelato la presenza di una mutazione non sinonima di un singolo nucleotide, alla posizione 485 della sequenza codificante del gene. Questa sostituzione determina un polimorfismo treonina/asparagina (T162N) nella proteina prodotta (Parker et al., 2020). Parker et al. (2020) dimostrò che la deiscenza del baccello nel pool genetico Mesoamericano aveva livelli più elevati nei genotipi con la treonina in posizione 162 rispetto a quelli con l'asparagina. Inoltre, si osservava una elevata frequenza dell'allele associato alla resistenza per il pod shattering nelle accessioni della razza Durango adattate ad ambienti aridi, nei quali deve essersi verificata una maggior pressione selettiva per favorire meccanismi di resistenza verso l'apertura del baccello, rispetto alle accessioni della razza Mesoamerica.

Recentemente, Rau et al. (2018) hanno utilizzato gli approcci del “pool sequencing” e “GWAS” e hanno identificato, su una popolazione di ILs precedentemente sviluppata e fenotipizzata da Murgia et al. (2017) un major QTL (QTL ad effetto maggiore) sul cromosoma Pv05 (*qPD5.1-Pv*) per la presenza del pod shattering. Le osservazioni di Murgia et al. (2017) e Rau et al. (2018) suggerirono inoltre che la precisione della fenotipizzazione per il pod shattering migliorava utilizzando il contenuto in carbonio delle valve del baccello in combinazione con la presenza/assenza del tratto (SHy/n) e questo permise a Rau et al. (2018) di mappare, mediante GWAS, il locus *qPD5.1-Pv* con maggior risoluzione. In aggiunta al locus *qPD5.1-Pv*, Rau et al. (2018) identificò altri loci sui cromosomi Pv04, Pv05, Pv06 e Pv09, associati al livello e al modo dello shattering. Rau et al. (2018) proposero infine un modello nel quale in aggiunta al major locus (*qPD5.1-Pv*), almeno altri due QTLs sui cromosomi Pv05 (*qPD5.2-Pv*) e Pv04 (*qPD4.1-Pv*) modulino l'intensità dello shattering, spiegando cumulativamente il 72,4% della variabilità fenotipica per questo carattere. Le osservazioni di Rau et al. (2018) confermano studi meno recenti, che avevano già proposto un modello a tre loci alla base della modulazione del pod shattering in fagiolo (Lamprecht et al., 1932). Rau et al. (2018) hanno proposto inoltre un'interazione epistatica alla base del controllo genico del pod-shattering, con l'allele domesticato (dalla varietà MIDAS) al locus *qPD5.1-Pv* associato alla completa indeiscenza, che risulta epistatico sugli altri loci, associati alla intensità del pod shattering. Quando al major locus *qPD5.1-Pv* è presente un genotipo eterozigote o omozigote dominante per l'allele selvatico si ha deiscenza e la presenza di alleli selvatici a loci (QTLs) aggiuntivi determina una maggiore intensità del carattere; la presenza del genotipo omozigote recessivo del parentale domesticato al major locus *qPD5.1-Pv* determina invece sempre il fenotipo indeiscente a prescindere dal genotipo agli altri QTLs (Rau et al., 2018). Di Vittori et al. (2021), partendo dalla popolazione precedentemente sviluppata, e descritta nel presente elaborato, da Murgia et al. (2017) e Rau et al. (2018) hanno caratterizzato una popolazione di 1197 BC4/F4 ILs. In breve, questa popolazione è stata ottenuta attraverso il reincrocio della RIL MG38 (ottenuta dalla popolazione MIDAS x G12873; Koinange et al., 1996), con il parentale ricorrente MIDAS, seguito da altri due re-incroci col parentale domesticato, in presenza di selezione fenotipica per il pod-shattering (per materiali e metodi e lo schema di sviluppo della popolazione, fare riferimento a Murgia et al., 2017 e Rau et al., 2018).

Da questa popolazione, Di Vittori et al. (2021) hanno selezionato sei ILs BC3 ad alto shattering che sono state re-incrociate (BC4) con il parente ricorrente indeiscente MIDAS, al fine di costituire una nuova popolazione ricombinante e mappante di 1197 BC4/F4 ILs (per lo

schema di sviluppo della popolazione vedere Figura 26). La popolazione sviluppata da Di Vittori et al. (2021) aveva l'obiettivo di aumentare, sulla base di una selezione fenotipica, gli individui eterozigoti e potenzialmente ricombinanti, al fine di restringere (i.e., fine mapping) il major locus *qPD5.1-Pv* e identificare geni candidati per il fenotipo "indeiscente".

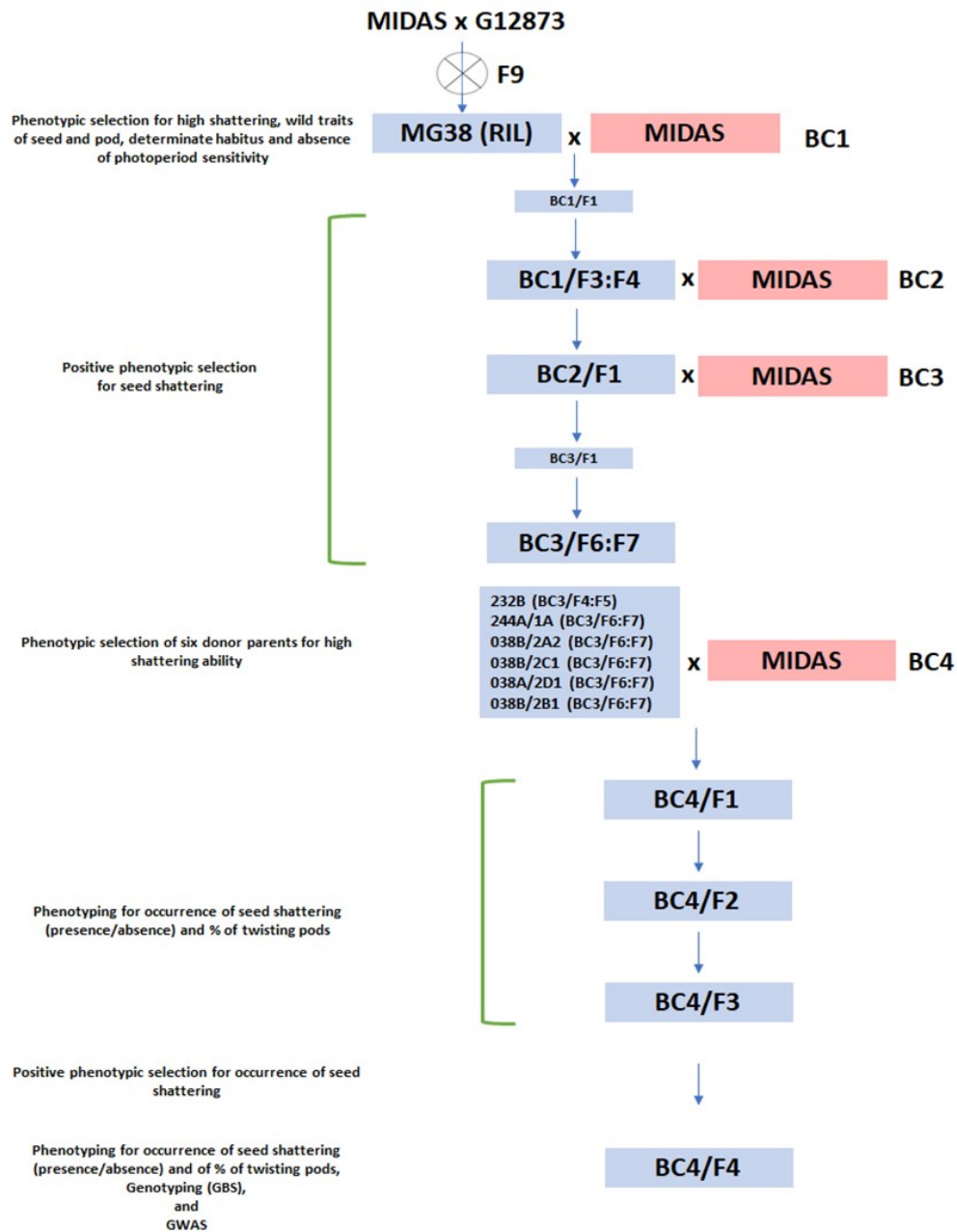


Figura 26: Schema di sviluppo della popolazione BC4/F4 o sviluppata da Di Vittori et al., (2021) (Di Vittori et al., 2021).

L'analisi GWAS per il pod-shattering con un dataset di 19 420 SNPs (identificate mediante genotyping by sequencing; GBS), su una popolazione di 1197 ILs ha confermato il major locus per il pod shattering alla fine del cromosoma Pv05 (*qPD5.1-Pv*; Rau et al., 2018). All'interno del QTL, 52 SNPs mostravano associazione significativa con la presenza/assenza del pod shattering, nell'intervallo tra i marcatori S5_38322754 e S5_39384267 (Figura 27; Di Vittori et al., 2021).

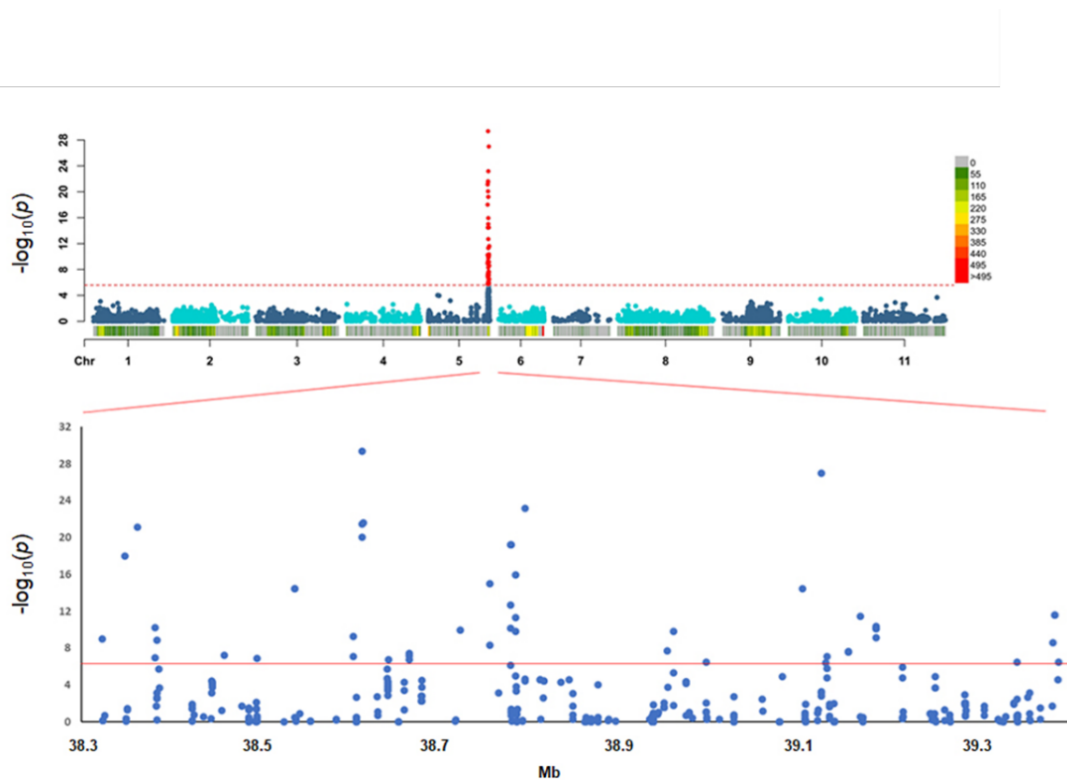


Figura 27: Risultati dell'analisi GWAS condotta da Di Vittori et al. (2021) su una popolazione di linee di introgressione BC4/F4. In alto, Manhattan plot che mostra l'associazione del *qPD5.1-Pv* sul cromosoma Pv05; in basso, zoom nella regione del locus *qPD5.1-Pv* (da circa 38.3 a 39.3 Mb sul cromosoma Pv05) con le SNPs identificate al suo interno. Linea rossa, soglia di significatività. (Di Vittori et al., 2021 con modifiche).

Il picco massimo del segnale GWAS per il pod-shattering era localizzato a circa 11Kb prima di un fattore di trascrizione *MYB26* (*PvMYB26*; Di Vittori et al., 2021). L'ortologo di *PvMYB26* è coinvolto nella differenziazione e ispessimento della parete secondaria dell'endotecio in *A. thaliana*, che risulta necessario affinché avvenga la deiscenza dell'antera e il rilascio del polline (Yang et al., 2007, 2017). In aggiunta al dato GWAS, sulla base dei dati di espressione (RNA-seq) in baccelli selvatici e domesticati a differenti stadi di sviluppo (6 and 10 DAP), e sui dati di espressione da qRT-PCR su baccelli in diversi stadi di sviluppo

del baccello (2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 13 DAP) in linee quasi isogeniche deiscenti e indeiscenti, e la parallela analisi istologica descritta al punto 4.1 del presente elaborato, Di Vittori et al. (2021) hanno identificato l'associazione tra *PvMYB26* e pod shattering.

Infatti, *PvMYB26* risultava sovra-espresso nei baccelli deiscenti ad uno stadio precoce di sviluppo (i.e., 5-6 DAP) rispetto ai baccelli indeiscenti o domesticati, e sotto-espresso nei baccelli deiscenti o selvatici a 9-11 DAP. L'occorrenza di modificazioni istologiche associate al pod shattering, descritte nel presente elaborato nella sezione 4.1, in uno stadio precoce di sviluppo del baccello (tra 6 e 10 DAP) (Di Vittori et al., 2021) e la regolazione fine di *PvMYB26* nello stesso stadio di sviluppo, suggeriscono un ruolo di questo gene nella differenziazione delle strutture del baccello necessarie all'occorrenza del pod-shattering.

Inoltre, la recente identificazione di geni ortologhi di *MYB26* (Takahashi et al., 2020) anche in altre specie leguminose, suggerisce che alla base dell'evoluzione fenotipica parallela di alcune specie leguminose possa esserci stata selezione a loci ortologhi (evoluzione molecolare parallela).

Di Vittori et al. (2021), integrando i dati di espressione ottenuti nel loro lavoro, l'identificazione di segnali di selezione in regioni geniche dalla letteratura (Bellucci et al., 2014, Schmutz et al., 2014), ed una ricerca bibliografica sui geni ortologhi in fagiolo di geni identificati come associati alla modulazione dello shattering in altre specie, hanno identificato e proposto un set di geni candidati alla base di questo carattere. Tra questi, Phvul.002G271000 (*PvIND*; Gioia et al., 2013) ortologo di *AtIND* (Liljegren et al., 2004) e Phvul.002G271700 (fattore di trascrizione *NAC*) ortologo di *NAC082*; entrambi i geni mappano in prossimità del locus *St* (Koinange et al., 1996); Phvul.003G252100, ortologo di *PDHI* in soia (Funatsuki et al., 2014), Phvul.004G144900, ortologo di *MYB52*, in una regione associata alla modulazione del pod shattering (Rau et al., 2019), Phvul.009G203400, ortologo di *AtFUL* (Gu et al. 1998) e con segnali di selezione parallela in Mesoamerica e nelle Ande (Schmutz et al., 2014 e Bellucci et al., 2014), Phvul.009G205100 e Phvul.009G205200, ortologhi di *Cesa7*, e Phvul.010G118700 come ortologo di *NST1* (Mitsuda et al., 2008) e *GmSHAT1-5* (Dong et al., 2014).

CONCLUSIONI

La biodiversità degli ecosistemi e quella disponibile nelle banche del germoplasma sono una risorsa fondamentale, rappresentando una fonte di nuova variabilità genetica che l'uomo può utilizzare. Le risorse genetiche, oggi potenzialmente a nostra disposizione per l'impiego nei programmi di miglioramento genetico, risultano spesso poco o non caratterizzate e lo sviluppo di protocolli per la caratterizzazione e conservazione delle risorse genetiche è oggi una priorità per un efficiente utilizzo di questa fonte di biodiversità. L'utilizzo di poche varietà a stretta base genetica nei moderni sistemi di coltivazione può contribuire al fenomeno dell'“erosione genetica”. Il ricorso a varietà locali come landraces o ecotipi, come fonte di nuova variabilità nel miglioramento genetico, è quindi un aspetto cruciale, al fine di poter esplorare e sfruttare geni responsabili per la capacità di adattamento e resistenza a fattori biotici ed abiotici, trasferendoli in varietà produttive e adattate ai moderni sistemi agricoli. Il ricorso alle risorse genetiche nel miglioramento genetico può essere di fondamentale importanza in quelle specie, come le leguminose, per le quali sono necessari ulteriori sforzi per migliorare e sfruttare a pieno le potenzialità, nutrizionali ed agronomiche, di queste specie.

Le risorse genetiche possono essere fonte di caratteri di interesse da introdurre nelle varietà migliorate, ma al tempo stesso la loro bassa caratterizzazione e il minor processo di selezione operato dall'uomo, può far sì che questi materiali presentino anche caratteri indesiderati. Conoscere le basi genetiche, i geni ed i meccanismi molecolari, alla base di determinati caratteri è di fondamentale importanza per ricostruire l'architettura genetica e fenotipica per caratteri di interesse anche in relazione alle condizioni ambientali in cui le nuove varietà verranno coltivate.

In questo elaborato, la modulazione del meccanismo di dispersione dei semi (pod-shattering) in fagiolo viene utilizzato come caso studio. Infatti, come descritto nell'elaborato, il pod-shattering è un perfetto esempio di carattere selezionato in funzione dell'ambiente, ed anche in funzione delle finalità produttive. A tal proposito, si è discusso di come questo carattere non debba essere visto negativamente a priori nelle specie domesticate; ad esempio, nel caso delle varietà “snap bean” da fagiolino, si richiede la selezione contro il pod-shattering, come anche devono essere assenti o ridotte le caratteristiche ad esso associate (e.g., alto

contenuto di fibre nel baccello e presenza del filo); per quanto riguarda le varietà “dry bean“ invece, destinate alla produzione del seme, si richiede un genotipo che permetta di ridurre al minimo le perdite di seme in campo ma che consenta al tempo stesso una facile trebbiatura (coadiuvata da un ridotto ma comunque residuo pod-shattering). Risulta quindi fondamentale coniugare le esigenze di mercato con la necessità di costituire le nuove varietà in relazione all’ambiente di coltivazione, ed al tempo stesso evitando di introdurre caratteri indesiderati insieme a quelli di interesse. Tutto ciò può essere ottenuto solo attraverso l’identificazione delle basi molecolari di caratteri di interesse, come nel caso studio del pod-shattering. In questa ottica, nel presente elaborato sono state riportate le recenti scoperte relative alle basi molecolari e all’architettura fenotipica del “pod-shattering” in una specie modello per lo studio della domesticazione, ovvero il fagiolo comune (*P. vulgaris*). Inoltre, nel presente elaborato si è discusso del fenomeno dell’evoluzione parallela fenotipica per i caratteri della domesticazione, ed in virtù della recente identificazione di geni ortologi alla base della modulazione del pod-shattering in diverse specie leguminose (i.e., geni ortologi di *AtMYB26*; Di Vittori et al., 2021 e Takahashi et al., 2020), della possibilità che alla base della evoluzione fenotipica parallela vi siano meccanismi di selezione a loci ortologi (i.e., evoluzione molecolare parallela). La sfida del miglioramento genetico, perseguibile attraverso una caratterizzazione ed un uso efficiente delle risorse genetiche, sarà quindi quella di creare nuove varietà in grado di soddisfare i bisogni dell’uomo, garantendo una maggior sicurezza alimentare, il soddisfacimento dei bisogni nutrizionali, riducendo l’impatto ambientale in vista dei cambiamenti climatici e del fenomeno della desertificazione.

BIBLIOGRAFIA

- Angioi, S.A., Rau, D., Attene, G., Nanni, L., Bellucci, E., Logozzo, G., Negri, V., Spagnoletti Zeuli, P.L., Papa, R. (2010) Beans in Europe: Origin and structure of the European landraces of *Phaseolus vulgaris* L. *Theor. Appl. Genet.* 2010, 121, 829–843. DOI:10.1007/s00122-010-1353-2.
- Assefa, T., Assibi Mahama, A., Brown, A.V. et al. (2019) A review of breeding objectives, genomic resources, and marker-assisted methods in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Mol Breeding* 39, 20. <https://doi.org/10.1007/s11032-018-0920-0>.
- Becerra-Velásquez, V.L., Gepts, P. (1994) RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in its centres of origin. *Genome (Canada)*. 37(2):256-263. DOI: 10.1139/g94-036.
- Bellucci, E., Bitocchi, E., Ferrarini, A., Benazzo, A., ...Delledonne, M., Papa, R. (2014) Decreased Nucleotide and Expression Diversity and Modified Coexpression Patterns Characterize Domestication in the Common Bean, *The Plant Cell*, Volume 26, Issue 5, Pages 1901–1912, <https://doi.org/10.1105/tpc.114.124040>.
- Bellucci, E., Mario Aguilar, O., Alseekh, S., Bett, K., Brezeanu, C., Cook, D., De la Rosa, L., Delledonne, M., Dostatny, D.F., Ferreira, J.J., Geffroy, V., Ghitarrini, S., Kroc, M., Kumar Agrawal, S., Logozzo, G., Marino, M., Mary-Huard, T., McClean, P., Meglič, V., Messer, T., Muel, F., Nanni, L., Neumann, K., Servalli, F., Sträjeru, S., Varshney, R.K., Vasconcelos, M.W., Zaccardelli, M., Zavarzin, A., Bitocchi, E., Frontoni, E., Fernie, A.R., Gioia, T., Graner, A., Guasch, L., Prochnow, L., Oppermann, M., Susek, K., Tenaillon, M. and Papa, R. (2021), The INCREASE project: Intelligent Collections of food-legume genetic resources for European agrofood systems. *Plant J*, 108: 646-660. <https://doi.org/10.1111/tpj.15472>.
- Bitocchi, E. (2004): Struttura della diversità genetica di varietà locali di pomodoro (*Lycopersicon esculentum* Mill). Tesi di Laurea, Università Politecnica delle Marche, Facoltà di Agraria, Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Agrarie, Dipartimento di Biotecnologie Agrarie ed Ambientali.

- Bitocchi, E., Bellucci, E., Giardini, A., Rau, D., Rodriguez, M., Biagetti, E., Santilocchi, R., Spagnoletti Zeuli, P., Gioia, T., Logozzo, G., Attene, G., Nanni, L. and Papa, R. (2012a), Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. *New Phytol*, 197: 300-313. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04377.x>.
- Bitocchi, E., Nanni, L., Bellucci, E., ...Attene, G., Papa, R. (2012b) Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (14) E788-E796; DOI: 10.1073/pnas.1108973109.
- Borém, A. & Milach, S. (1997). Plant breeding in the turn of the millennium. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 41. 10.1590/S1516-89131998000300001.
- Carbonaro, M., Nardini, M., Maselli, P. et al. (2015) Chemico-physical and nutritional properties of traditional legumes (lentil, *Lens culinaris* L., and grass pea, *Lathyrus sativus* L.) from organic agriculture: an explorative study. *Org. Agr.* 5, 179–187. <https://doi.org/10.1007/s13165-014-0086-y>.
- Chamarthi, S. K., Kumar, A., Vuong, T. D. Blair, M. W., Gaur, P. M., Nguyen, H. T., Varshney, R. K. (2011) Trait mapping and molecular breeding. In: *Biology and breeding of food legumes*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 296-313. ISBN 978-1-84593-766-9.
- Cichy K.A., Porch T.G., Beaver J.S., Cregan P., Fourie D., Glahn R.P., Grusak M.A., Kamfwa K., Katuramu D.N., McClean P. et al. (2015) A *Phaseolus vulgaris* diversity panel for Andean bean improvement. *Crop Science* 55: 2149–2160.
- Corinto, G.L. (2014) Nikolai Vavilov’s centers of origin of cultivated plants with a view to conserving agricultural biodiversity. *Human evolution* vol. 29 n.4 (000-000).
- Cortesi, F. (1933): Leguminose. *Enciclopedia Italiana*.
- Cortinovis, G., Frascarelli, G., Di Vittori, V., Papa R., (2020): Current State and Perspectives in Population Genomics of the Common Bean. *Plants* 9(3), 330 <https://doi.org/10.3390/plants9030330>.
- Cortinovis, G., Oppermann, M., Neumann, K., Graner, A., Gioia, T., Marsella, M., Alseekh, S., Fernie, A. R., Papa, R., Bellucci, E., & Bitocchi, E. (2021). Towards the development, maintenance, and standardized phenotypic characterization of single-seed-descent genetic resources for common bean. *Current Protocols*, 1, e133. doi: 10.1002/cpz1.133.

- Costanzo, L. (2006): Leguminose. Enciclopedia dei ragazzi.
- Dabin, Z., Pengwei Y., Na, Z., Changwei, Y., Weidong, C., Yajun, G., (2016): Contribution of green manure legumes to nitrogen dynamics in traditional winter wheat cropping system in the Loess Plateau of China. *European Journal of Agronomy*, Volume 72, Pages 47-55, ISSN 1161-0301, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eja.2015.09.012>.
- Debouck, D.G., Toro, O., Paredes, O.M. et al. (1993) Genetic diversity and ecological distribution of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) in northwestern South America. *Econ Bot* 47, 408–423. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02907356>.
- De Long, D. C. (1996). Defining Biodiversity. *Wildlife Society Bulletin* (1973-2006), 24(4), 738–749. <http://www.jstor.org/stable/3783168>.
- De Ron A. et al. (2015) Common Bean. In: De Ron A. (eds) *Grain Legumes. Handbook of Plant Breeding*, vol 10. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2797-5_1
- Di Vittori, V. et al. (2017) Domestication and Crop History. In: Pérez de la Vega M., Santalla M., Marsolais F. (eds) *The Common Bean Genome. Compendium of Plant Genomes*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-63526-2_2.
- Di Vittori, V., Gioia, T., Rodriguez, M., Bellucci, E., Bitocchi, E., Nanni, L., Attene, G., Rau, D. Papa, R. (2019) Convergent Evolution of the Seed Shattering Trait. *Genes*, 10, 68. <https://doi.org/10.3390/genes10010068>.
- Di Vittori, V., Bitocchi, E., Rodriguez, M., Alseekh S., ...and Roberto Papa (2021) Pod indehiscence in common bean is associated with the fine regulation of PvMYB26, *Journal of Experimental Botany*, Volume 72, Issue 5, 27 February 2021, Pages 1617–1633, <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa553>.
- Doebley J, Stec A, Wendel J, Edwards M. (1990) Genetic and morphological analysis of a maize-teosinte F2 population: Implications for the origin of maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9888–9892.
- Dong, Y., Yang, X., Liu, J., Wang, B.H., Liu, B.L., Wang, Y.Z. (2014): Pod shattering resistance associated with domestication is mediated by a NAC gene in soybean. *Nature communications* 5 issue 3352 DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms4352>.
- Dong, Y., Wang, Y. Z. (2015) Seed shattering: From models to crops. *Front. Plant Sci.*, 6, 476.

- Dorofeyev, V.F., Filatenko, A.A. (1992). Preface in Vavilov N. I., Origin and Geography of Cultivated Plants. Translation by Doris Love. London: Cambridge University Press.
- Dzyubenko N. I. (2018): Vavilov's Collection of worldwide crop genetic resources in the 21st century. *Biopreserv Biobank* 16(5):377-383 DOI: 10.1089/bio.2018.0045.
- Encyclopaedia Britannica (2006): Hardy-Weinberg law.
- Engler, A., Krause, K., Pilger, R.K.F., Prantl K. (1897): Die Natürlichen Pflanzenfamilien nebst ihren Gattungen und wichtigeren Arten, insbesondere den Nutzpflanzen, unter Mitwirkung zahlreicher hervorragender Fachgelehrten begründet. Leipzig, W. Engelmann DOI: <https://doi.org/10.5962/bhl.title.4635>.
- Ente Nazionale Risi (2012): Dipartimento di Ricerca, Miglioramento Genetico, Nuove varietà.
- Ferrándiz, C., Liljegren, S.J., Yanofsky, M.F. (2000) Negative regulation of the SHATTERPROOF genes by FRUITFULL during Arabidopsis fruit development. *Science*, 289, 436–438.
- Flannery, K.V. (1986) Guila Naquitz: Foraggiamento arcaico e agricoltura primitiva a Oaxaca, Messico. New York: Academic Press.
- Freyre, R., Ríos, R., Guzmán, L. et al. (1996) Ecogeographic distribution of *Phaseolus* spp. (Fabaceae) in Bolivia. *Econ Bot* 50, 195–215. <https://doi.org/10.1007/BF02861451>.
- Freyre R, Skroch PW, Geffroy V, Adam-Blondon A-F, Shirmohamadali A, Johnson WC, Llaca V, Nodari R, Pereira P, Tsai S-M, et al. (1998) Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. *Theoret Appl Genet* 97: 847–856.
- Funatsuki, H., Suzuki, M., Hirose, A., Inaba, H., Yamada, T., Hajika, M., Komatsu, K., Katayama, T., Sayama, T., Ishimoto, M., et al. (2014) Molecular basis of a shattering resistance boosting global dissemination of soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111, 17797–17802.
- Garofalo C. (2020) Università Politecnica delle Marche. Facoltà di agraria, Corso di Laurea in “SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE” (STA). Corso: Microbiologia agraria. Anno di corso: 2019-2020.

- Gepts, P., Bliss, F.A. (1985) F₁ hybrid weakness in the common bean: Differential geographic origin suggests two gene pools in cultivated bean germplasm, *Journal of Heredity*, Volume 76, Issue 6, Pages 447–450, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a110142>.
- Gepts, P., Osborn, T.C., Rashka, K. et al. (1986) Phaseolin-protein Variability in Wild Forms and Landraces of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Evidence for Multiple Centers of Domestication. *Econ Bot* 40, 451–468. <https://doi.org/10.1007/BF02859659>.
- Gepts P. (2001): Origins of plant agriculture and major crop plants. *EOLSS Publishers, Oxford, UK* p. 629-63.
- Gioia, T., Logozzo, G., Kami, J., Zeuli, P.S., Gepts P. (2013): Identification and characterization of a homologue to the Arabidopsis INDEHISCENT gene in common Bean. *Journal of Heredity* 104(2):273-86. DOI: 10.1093/jhered/ess102.
- Gu, Q., Ferrándiz, C., Yanofsky, M.F., Martienssen, R. (1998) The FRUITFULLMADS-box gene mediates cell differentiation during Arabidopsis fruit development. *Development*, 125, 1509–1517.
- Hebard, F.V. (2005) The backcross breeding program of the american chestnut foundation. *Journal of the american chestnut foundation. Volume XIX, Number 2*.
- Hofhuis, H., Moulton, D., Lessinnes, T., Routier-Kierzkowska, A.-L., Bompfrey, R.J., Mosca, G., Reinhardt, H., Sarchet, P., Gan, X., Tsiantis, M., et al. (2016) Morphomechanical innovation drives explosive seed dispersal. *Cell*, 166, 222–233.
- Hyten, D L , Song, Q., Chol, I Y., Yoon, M.S , Specht, J E , Matukumalli, L K et al. (2008) High-throughput genotyping With the GoldenGate assay in the complex genome of soybean. *Theoretical and Applied Genetics* 116, 945-952.
- ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale): Cos'è la biodiversità.
- Kami, J., V.B. Velásquez, D.G. Debouck and P. Gepts. (1995). Identification of presumed ancestral DNA sequences of phaseolin in *Phaseolus vulgaris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1101-1104.
- Koenig, R., Gepts, P. (1989) Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two major centers of genetic diversity. *Theoret. Appl. Genetics* 78, 809–817. <https://doi.org/10.1007/BF00266663>.
- Koinange, E.M.S., Singh, S.P., Gepts P. (1996): Genetic control of the domestication syndrome in common bean. *Crop science* 36, 1037-1045.

- Konishi, S., Izawa, T., Lin, S.Y., Ebana, K., Fukuta, Y., Sasaki, T., Yano, M.A. (2006) SNP caused loss of seed shattering during rice domestication. *Science*, 312, 1392–1396.
- Kwak, M., Gepts, P. (2009) Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). *Theor Appl Genet* 118, 979–992. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0955-4>.
- Lamprecht, H. (1932). Beiträge zur Genetik von *Phaseolus vulgaris*. *Hereditas* 16, 169–211.
- Lemke, R.L., Zhong, Z., Campbell, C.A. and Zentner, R. (2007), Can Pulse Crops Play a Role in Mitigating Greenhouse Gases from North American Agriculture? *Agronomy Journal*, 99: 1719-1725. DOI: <https://doi.org/10.2134/agronj2006.0327s>.
- Li, C., Zhou, A., Sang, T. (2006) Rice domestication by reducing shattering. *Science*, 311, 1936–1939.
- Lin, Z., Griffith, M.E., Li, X., Zhu, Z., Tan, L., Fu, Y., Zhang, W., Wang, X., Xie, D., Sun, C. (2007) Origin of seed shattering in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 226, 11–20.
- Lin, Z., Li, X., Shannon, L.M., Yeh, C.T., Wang, M.L., Bai, G., Peng, Z., Li, J., Trick, H.N., Clemente, T.E., et al. (2012) Parallel domestication of the Shattering1 genes in cereals. *Nat. Genet.*, 44, 720–724.
- Lindström K., Mousavi S. A. (2020) *Microbial Biotechnology* 13(5), 1314– 1335. DOI: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13517>.
- Liljegren, S.J., Ditta, G.S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J., Yanofsky, M.F. (2000) SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature*, 404, 766–770.
- Liljegren, Sarah J et al. (2004) Control of fruit patterning in *Arabidopsis* by INDEHISCENT. *Cell*, Volume 116, Issue 6, 843 – 853. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00217-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00217-X).
- Lo, S., Muñoz-Amatriaín, M., Boukar, O., Herniter, I., Cisse, N., Guo, Y.-N., Roberts, P.A., Xu, S., Fatokun, C., Close, T.J. (2018) Identification of QTL controlling domestication-related traits in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Sci. Rep.*, 8, 6261.
- Lorenzetti, F., Albertini, E., Frusciante, L., Rosellini, D., Russi, L., Tuberosa, R., Veronesi F. (2018): Miglioramento genetico delle piante agrarie. *Edagricole*.

- Maphosa Y., Jideani V. A. (2017). The Role of Legumes in Human Nutrition, Functional Food - Improve Health through Adequate Food. *Edited by Maria Chavarri Hueda, IntechOpen*, DOI: 10.5772/intechopen.69127.
- McClellan P.E., Lee R., Otto C., Gepts P., Bassett M. (2002) Molecular and phenotypic mapping of genes controlling seed coat pattern and color in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Hered* 93:148–152.
- Meinke W. D., Cherry M. J., Dean C., Rounsley D. S., Koornneef M. (1998) Arabidopsis thaliana: A model plant for genome analysis. *Science* vol 282, issue 5389, pp.662-682 DOI: DOI: 10.1126/science.282.5389.662.
- Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M. (2008) NAC transcription factors NST1 and NST3 regulate pod dehiscence in a partially redundant manner by promoting secondary wall formation after the establishment of tissue identity. *Plant J.*, 56, 768–778.
- Moghaddam S.M., Mamidi S., Osorno J.M., Lee R., Brick M., Kelly J., Miklas P., Urrea C., Song Q., Cregan P. et al. (2016) Genome-wide association study identifies candidate loci underlying agronomic traits in a Middle American diversity panel of common bean. *The Plant Genome* 9: doi: 10.3835/plantgenome2016.01.0008.
- Murgia M L., Attene G., Rodriguez, M., Bitocchi, E., Bellucci, E., Fois, D., Nanni, L., Gioia, T., Albani, D. M., Papa, R., Rau, D. (2017): A comprehensive phenotypic investigation of the “Pod-Shattering Syndrome” in Common Bean. *Frontiers in plant science* 8:251 DOI <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00251>.
- Nanni, L., Bitocchi, E., Bellucci, E., Rossi, M., Rau, D., Attene, G., Gepts, P., Papa R. (2011): Nucleotide diversity of a genomic sequence similar to SHATTERPROOF (*PvSHPI*) in domesticated and wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 123(8):1341-57. DOI: 10.1007/s00122-011-1671-z.
- Nei, M., Maruyama, T., Chakraborty, R. (1975). The Bottleneck Effect and Genetic Variability in Populations. *Evolution*, 29(1), 1–10. DOI: <https://doi.org/10.2307/2407137>.
- Nei, M., Chakraborty, R., Fuerst P.A. (1976) Infinite allele model with varying mutation rate *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73 (11) 4164-4168; DOI: 10.1073/pnas.73.11.4164.
- Nei, M. (2005) Bottlenecks, Genetic Polymorphism and Speciation, *Genetics, Volume 170, Issue 1, 1, Pages 1–4*, <https://doi.org/10.1093/genetics/170.1.1>.

- Nodari R.O., Tsai S.M., Gilbertson R.L., Gepts P. (1993) Towards an integrated linkage map of common bean. II. Development of an RFLP-based linkage map. *Theor Appl Genet* 85:513–520
- Ogawa, M., Kay, P., Wilson, S., Swain, S.M. (2009) ARABIDOPSIS DEHISCENCE ZONE POLYGALACTURONASE1 (ADPG1), ADPG2, and QUARTET2 are polygalacturonases required for cell separation during reproductive development in Arabidopsis. *Plant Cell*, 21, 216–233.
- Papa, R., Gepts, P. (2003) Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. *Theor Appl Genet* 106, 239–250. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1085-z>.
- Parker, T.A., Berny Mier y Teran, J.C., Palkovic, A., Jernstedt, J., Gepts P. (2020): Pod indehiscence is a domestication and aridity resilience trait in common bean. *New Phytologist foundation volume 225, numero 1 / p.558-570* DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.16164>.
- Parker, T.A., Lo, S., Gepts P., (2021): Pod shattering in grain legumes: emerging genetic and environment-related patterns. *The Plant Cell, volume 33, issue 2, p.179-199* DOI: <https://doi.org/10.1093/plcell/koaa025>.
- Passardi, F., Dobias, J., Valério, L., Guimil, S., Penel, C., Dunand, C. (2007) Morphological and physiological traits of three major Arabidopsis thaliana accessions. *Journal of Plant Physiology, Volume 164, Issue 8, Pages 980-992, ISSN 0176-1617,* <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.06.008>.
- Pourkheirandish, M. et al. (2015) Evolution of the Grain Dispersal System in Barley. *Cell, Volume 162, Issue 3, 527 – 539* DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.002>.
- Rajani, S., Sundaresan, V. (2001) The Arabidopsis myc-bHLH gene ALCATRAZ enables cell separation in fruit dehiscence. *Curr. Biol., 11, 1914–1922*.
- Rao I.M. (2014) Advances in improving adaptation of common bean and Brachiaria forage grasses to abiotic stress in the tropics. In: Pessaraki M (ed) *Handbook of plant and crop physiology. FL pp, Boca Raton, pp 847–889* DOI: <https://hdl.handle.net/10568/35000>.

- Rau, D., Murgia, M.L., Rodriguez, M., Bitocchi, E., Bellucci, E., Fois, D., Albani, D., Nanni, L., Gioia, T., Santo, D., Marcolungo, L., Delledonne, M., Attene, G. and Papa, R. (2018), Genomic dissection of pod shattering in common bean: mutations at non-orthologous loci at the basis of convergent phenotypic evolution under domestication of leguminous species. *Plant J*, 97: 693-714. <https://doi.org/10.1111/tpj.14155>.
- Rau D, Murgia ML, Rodriguez M, et al. (2019) Genomic dissection of pod shattering in common bean: mutations at non-orthologous loci at the basis of convergent phenotypic evolution under domestication of leguminous species. *The Plant Journal* 97, 693–714.
- Robbins M., The Ohio State University (2019): Backcrossing, Backcross (BC) Populations, and Backcross Breeding. *Plant breeding and genomics*.
- Roeder, A.H.K., Ferrándiz, C., Yanofsky, M.F. (2003) The role of the REPLUMLESS homeodomain protein in patterning the Arabidopsis fruit. *Curr. Biol.*, 13, 1630–1635.
- Rossi, M., Bitocchi, E., Bellucci, E., Nanni, L., Rau, D., Attene, G. and Papa, R. (2009), Linkage disequilibrium and population structure in wild and domesticated populations of *Phaseolus vulgaris* L. *Evolutionary Applications*, 2: 504-522. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2009.00082.x>.
- Russell P.J., Wolfe S.L., Hertz P.E., Starr C., McMillan B. (2016) Genetica agraria. EdiSES università.
- Schmutz, J., Cannon, S. B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W. et al (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean *Nature* 463, 178-183.
- Schmutz, J., McClean, P., Mamidi, S. et al. (2014) A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nat Genet* 46, 707–713. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng.3008>.
- Singh, S.P., Gepts, P. & Debouck, D.G. (1991) Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Econ Bot* 45, 379–396. <https://doi.org/10.1007/BF02887079>.
- Swingland, I. (2013). Biodiversity, Definition of. 10.1016/B978-0-12-384719-5.00009-5.
- Stagnari, F., Maggio, A., Galieni, A. et al. (2017): Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 4, 2. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0085-1>.
- Stevens, P. F. (2017). Angiosperm Phylogeny Website. Version 14, July 2017.

- Takahashi Y., Kongjaimun A., Muto C., Kobayashi Y., Kumagai M., Sakai H., Satou K., Teruya K., Shiroma A., Shimoji M., Hirano T., Isemura T., Saito H., Baba-Kasai A., Kaga A., Somta P., Tomooka N. and Naito K. (2020) Same Locus for Non-shattering Seed Pod in Two Independently Domesticated Legumes, *Vigna angularis* and *Vigna unguiculata*. *Front. Genet.* 11:748. doi: 10.3389/fgene.2020.00748.
- Tang, H., Cuevas, H. E., Das, S., Sezen, U. U., Zhou, C., Guo, H., et al. (2013). Seed shattering in a wild sorghum is conferred by a locus unrelated to domestication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 15824–15829. doi: 10.1073/pnas.1305213110.
- Taubert P. (1891): Leguminosae Natürliche Pflanzenfamilien III, 3. Editore Wilhelm Engelmann.
- Van de Wouw, M., Kik, C., Van Hintum, T., Van Treuren, R., & Visser, B. (2010). Genetic erosion in crops: Concept, research results and challenges. *Plant Genetic Resources*, 8(1), 1-15. doi:10.1017/S1479262109990062.
- Van Zeist, W., Milano, L., Bonacossi, D. M. (2002): La domesticazione delle piante e l'agricoltura: Vicino oriente ed Egitto. Il mondo dell'archeologia, Enciclopedia Treccani.
- Vavilov, N.I. (1926). Centres of Origin of Cultivated Plants. *Bull. Appl. Bot. Genet. Plant Breed.*, 16: 1-248.
- Vischetti C. (2019) Università Politecnica delle Marche. Facoltà di agraria, Corso di Laurea in “SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE” (STA). Corso: Chimica e biochimica agraria. Anno di corso: 2019-2020.
- Vogel K.E. (2009) Backcross Breeding. In: Scott M.P. (eds) Transgenic Maize. *Methods in Molecular Biology™*, vol 526. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-494-0_14.
- Wu, W., Liu, X., Wang, M., Meyer, R.S., Luo, X., Ndjiondjop, M., Tan, L., Zhang, J., Wu, J., Cai, H. et al. (2017) A single-nucleotide polymorphism causes smaller grain size and loss of seed shattering during African rice domestication. *Nat. Plants*, 3, 17064.
- Yang C., Xu Z., Song J., Conner K., Vizcay B.G., Wilson Z.A. (2007). Arabidopsis MYB26/MALE STERILE35 regulates secondary thickening in the endothecium and is essential for anther dehiscence. *The Plant Cell* 19, 534–548.

- Yang C., Song J., Ferguson A.C., Klisch D., Simpson K., Mo R., Taylor B., Mitsuda N., Wilson Z.A. (2017). Transcription factor MYB26 is key to spatial specificity in anther secondary thickening formation. *Plant Physiology* 175, 333–350.
- Yoon, J., Cho, L.H., Kim, S.L., Choi, H., Koh, H.J., An, G. (2014) The BEL1 type homeobox gene SH5 induces seed shattering by enhancing abscission-zone development and inhibiting lignin biosynthesis. *Plant J.*, 79, 717–728.
- Zhou, Y., Lu, D., Li, C., Luo, J., Zhu, B.F., Zhu, J., Shangguan, Y., Wang, Z., Sang, T., Zhou, B. et al. (2012) Genetic control of seed shattering in rice by the APETALA2 transcription factor shattering abortion1. *Plant Cell*, 24, 1034–1048.