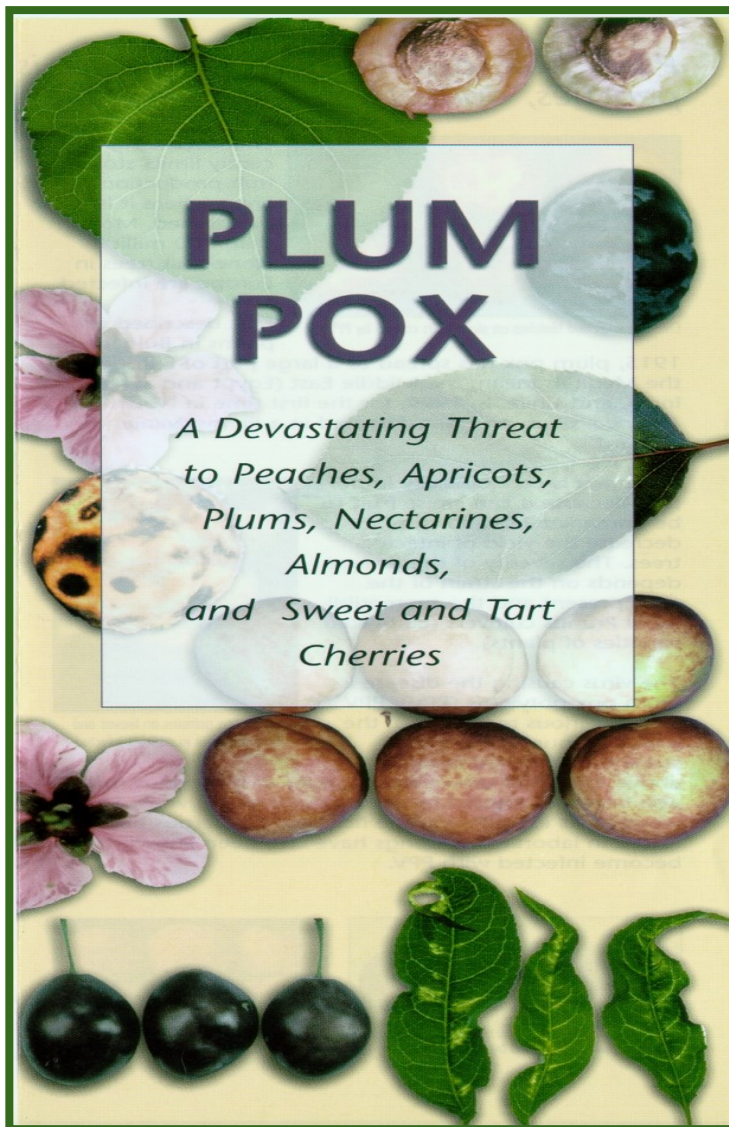


## **Dalla GWAS alle NBT :**

# **Approcci innovativi al miglioramento genetico del pesco**

D.ssa Sabrina Micali,  
CREA Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura – sede di Roma  
[sabrina.micali@crea.gov.it](mailto:sabrina.micali@crea.gov.it)

10.05.2021



Le nuove biotecnologie per  
la resistenza a Sharka in  
pesco

Sharka :ampia gamma di sintomi in pesco



Striature scure sui petali



Caduta e distorsione giovani foglie



Venature chiare e linee clorotiche su foglie adulte



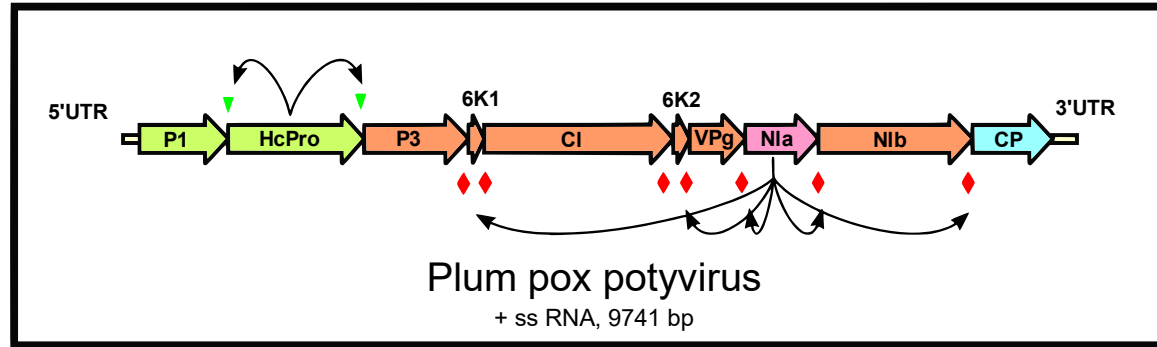
Discolorazione ad anello sui frutti

E' una delle malattie più dannose per tutto il genere *Prunus*

E' causata dal *Plum Pox virus*, genere *Potyvirus*

Fonti di resistenza (dominante) sono presenti in *P. armeniaca* e in specie affini, ma nessuna in pesco

Incroci interspecifici sono stati effettuati per introgradire la resistenza dalle specie affini

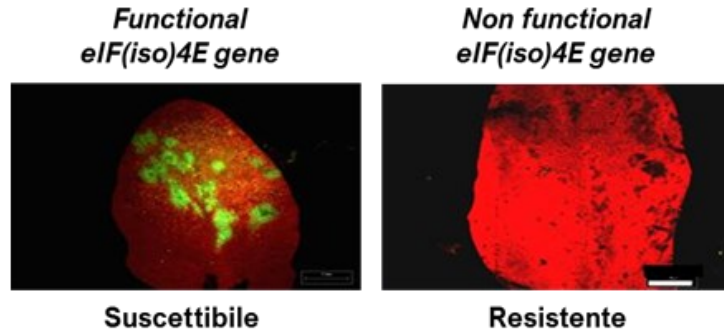


*Plum Pox virus*, codifica per 10 proteine.

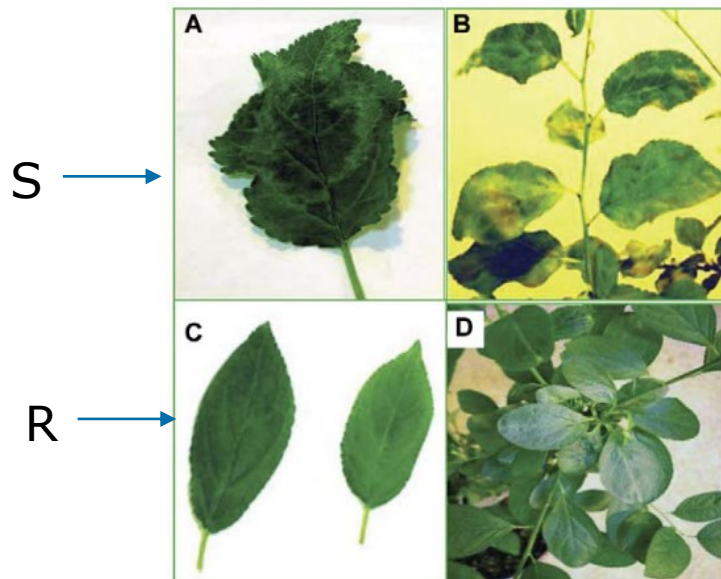
Per compiere il suo ciclo infettivo nella pianta il virus recluta proteine dell'ospite.

L'assenza o la parziale funzionalità di queste proteine porta ad una resistenza recessiva totale o parziale nei confronti del virus.

## Arabidopsis



(Decroocq et al., 2006, Nicaise et al., 2007)



## Prunus domestica

Wang et al. 2013

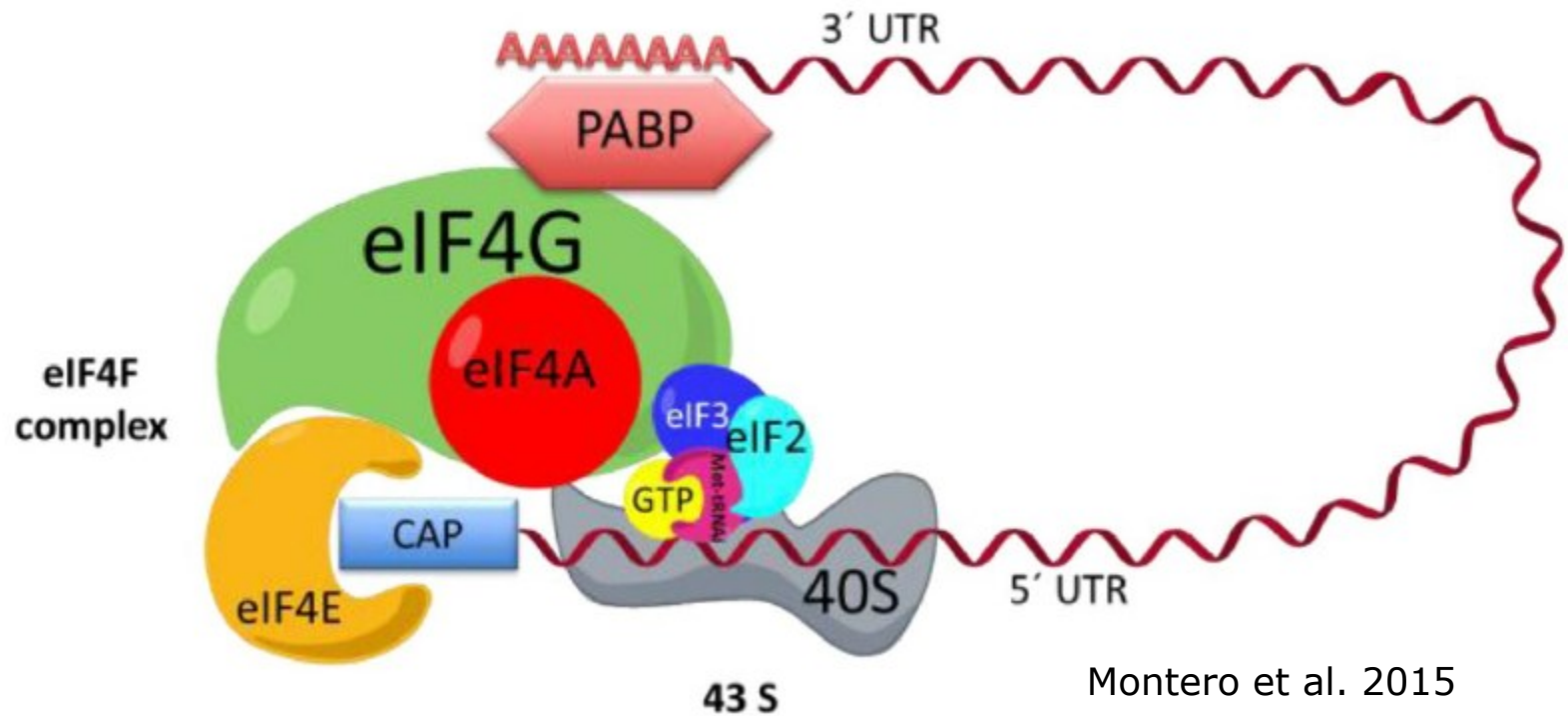
I geni che codificano per queste proteine sono detti geni di suscettibilità

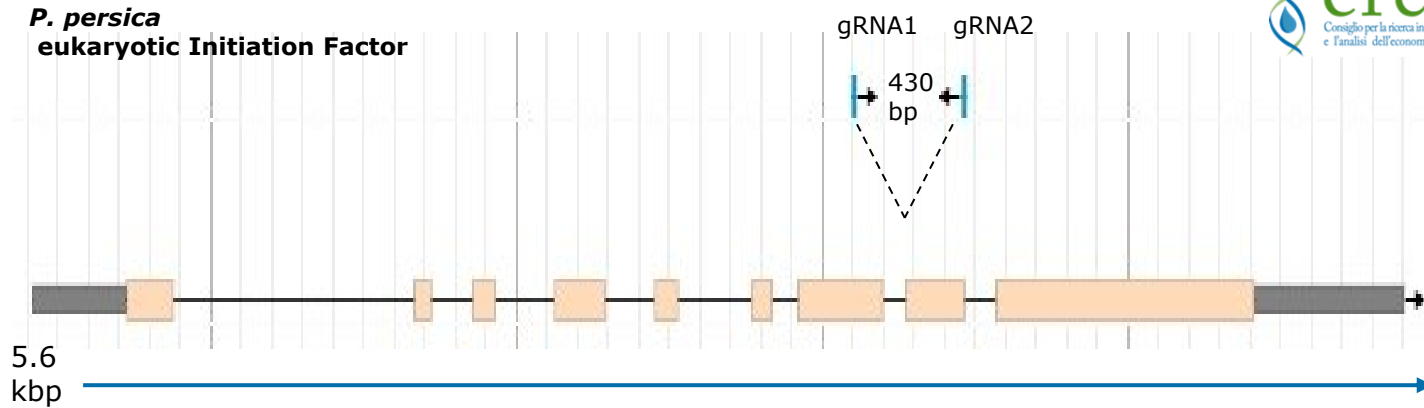
Codificano per fattori necessari al patogeno per compiere il suo ciclo infettivo, ma hanno anche un ruolo costitutivo nella cellula e/o nella vita della pianta.

Sono altamente conservati nelle specie vegetali

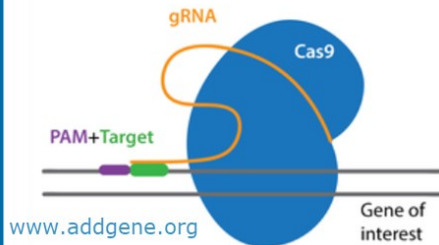
La caratterizzazione di un sistema pianta-patogeno in una specie modello può essere trasportata alle specie coltivate

Geni di suscettibilità: fattori di inizio della traduzione degli eucarioti (eIF)

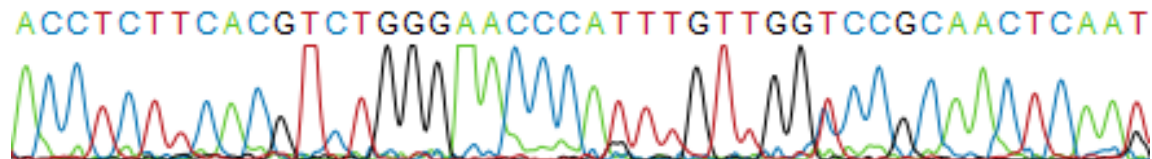




Disegnate due guide per una delezione di 430bp

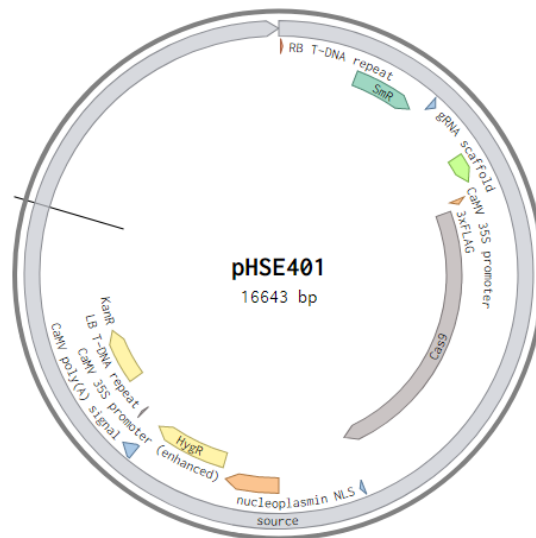


Risequenziamento nelle cultivar utilizzate



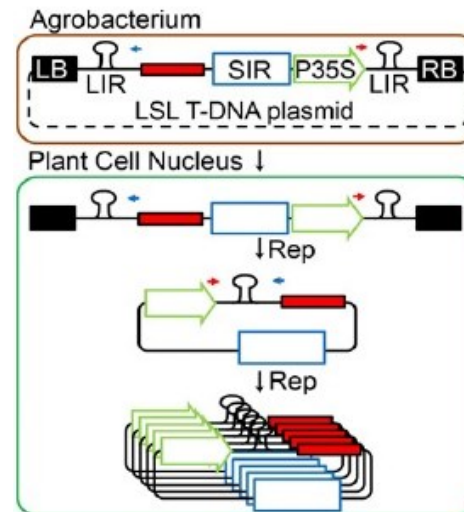
## Clonati 2 RNA-guida in tandem

**(U6-26p)-(Target-1)-(gRNA-Sc)-(U6-26t)-(U6-29p)-(Target-2)-(gRNA-Sc)-(U6-26t)**



Xing et al 2014

Vettore plasmidico

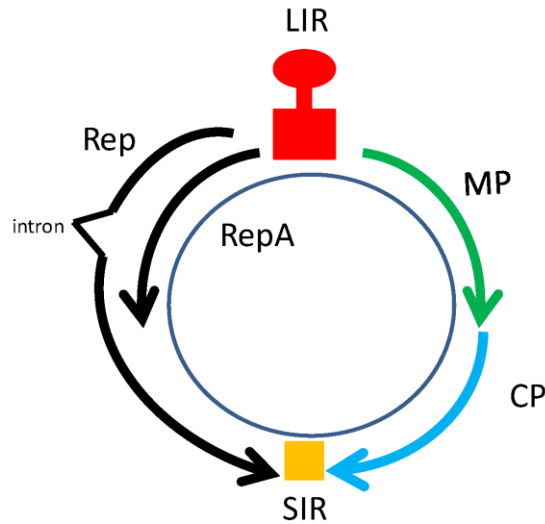


Baltes et al 2014

Vettore derivato da geminivirus



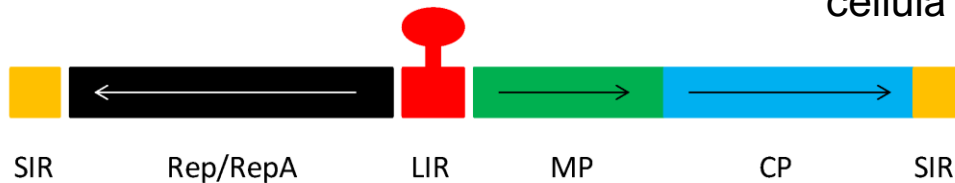
(a)



Diffusi in tutto il mondo, infettano un'ampia varietà di specie vegetali mono e dicotiledoni

Genoma circolare a ssDNA piccolo ~2.8 Kb contenente 4-6 ORF

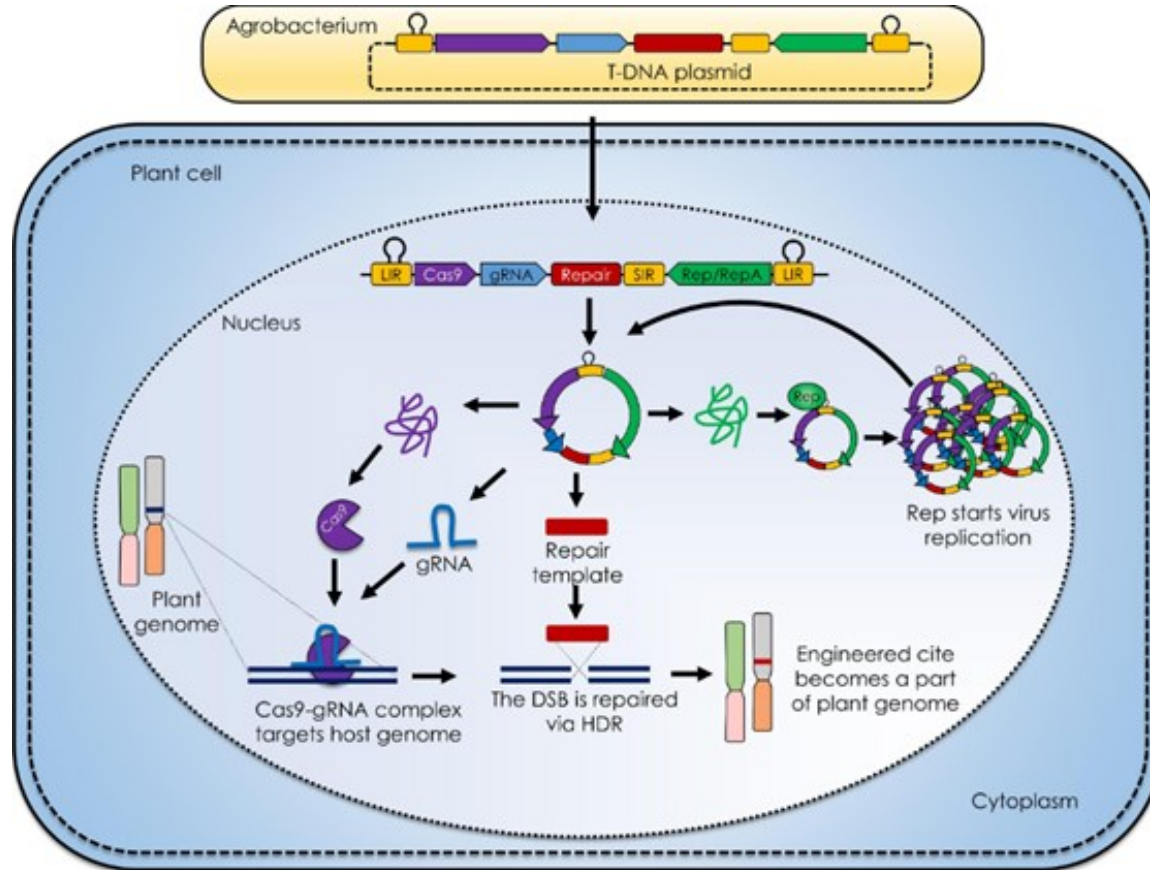
Richiedono solo la proteina Rep/RepA per iniziare la replicazione all'interno della cellula ospite



## Struttura genomica dei geminivirus

MP: movement protein, CP: coat protein, LIR and SIR: long and short intergenic regions; Rep/RepA: replication associated protein

## Vettore virale 'decomposto' inserito in Agrobatterio



Zaidi and Mansoor 2017

I geni virali non necessari sono rimossi e sostituiti con i geni di interesse. Il movimento all'interno avviene tramite inserimento nel T-DNA di Agrobatterio

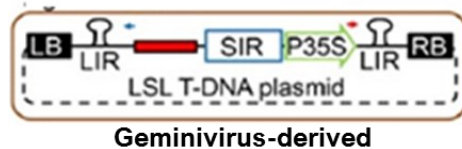
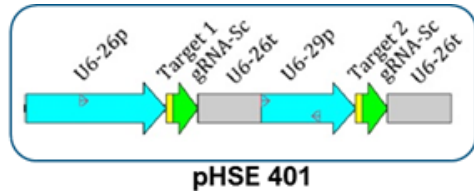
## IMPLEMENTING THE CRISPR/CAS9 SYSTEM FOR TARGETING SHARKA RESISTANCE IN PEACH

MONTICELLI S.\*, MICALI S.\*, OLMEDO-MOYA B.\*\*\*, OLIVARES VERA F.\*\*\*, URBINATI G.\*, GENTILE A.\*, CABONI E.\*, DECROOQ V.\*\*\*, PRIETO H.\*\*, VERDE I.\*

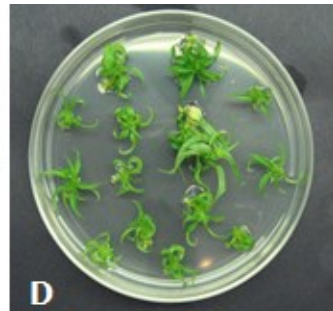
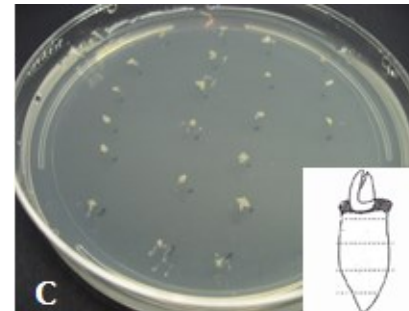
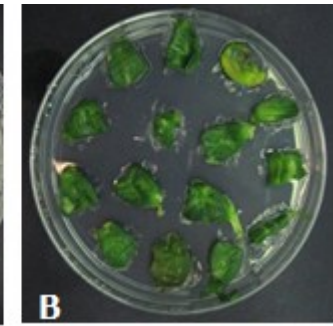
\*CREA - Centro di ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura, via di Fioranello, 52 - 00134 Rome (Italy)  
\*\*Biotechnology Laboratory, La Platina Research Station, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Santa Rosa, 11610 La Pintana, Santiago (Chile)  
\*\*\* UMR 1332 BFP, INRA, University of Bordeaux, A3C and Virology Teams, 33882 Villenave-d'Ornon Cedex (France)

sabrina.micali@crea.gov.it

## Infezione con Agrobatterio



Cotiledoni



Asse embrionale

Efficienza di rigenerazione molto bassa



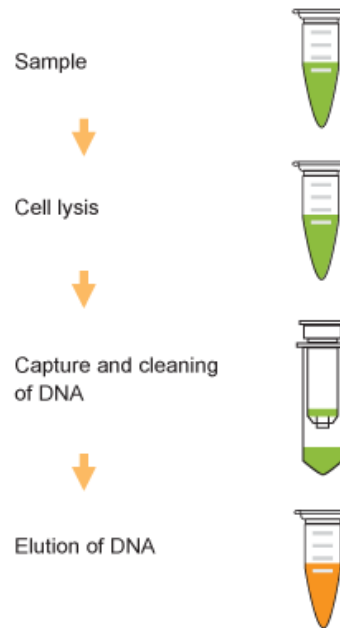
Genotipo-dipendente e spesso limitata a tessuti derivanti da seme

# Screening molecolare trasformanti



Prelievo foglie germogli infettati

## Estrazione del DNA

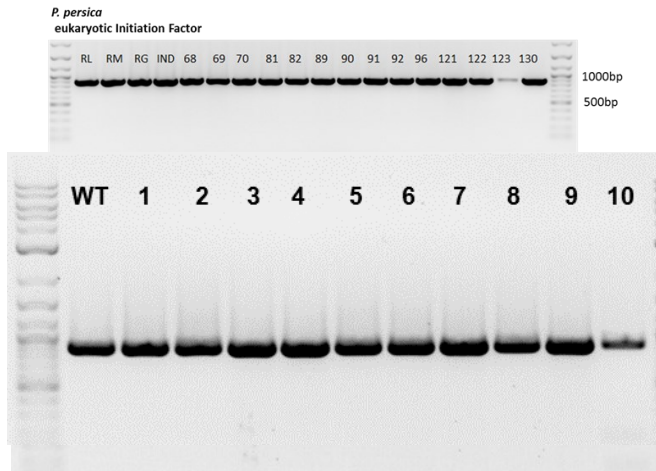


### *P. Persica* Eukaryotic Initiation Factor

AAGGCGTCAATGGAAGGCTTGAAGCTCAATTATATTGAAGAATTCAAGGAGAGATTAC  
**Primer 1**  
 TAATAAAGGACCCTATACACTACATTAGTAATCAGAGTTGTGTCTAGGGAGTGTGGTATC  
 GTGAGATCAAACCTAGCTAGATTGATCAAATATTGTATAAAGTCTACAAGAGTATCACTCA  
 AAGAAAACTCTATAATAGGCCACATAAATCAAACCGAATACCCCATTTTATTAAGTA  
 CAGGAGAAGTCCACATGACATTAGAAGGGTGCATGTTGAGAGCCCGAAATCTAACTA  
 CAAGTATAGTATGACTAGAAAACACAACAAGTTTTACATTTTTTCGTCTTAATTATGAGG  
 TATACTGACCCAAACTGAACAGAATGCTAAAACTTTTTCAGATACGAGACAGATATG  
 ATTGAAAAGATAGTTGAACGTATTTTTGGTGTGTTGATTA AACATTCTCAAATGATGATT  
**Primer 2**  
 TAAAGGACTTTGTTGGAATGGATCGGTAAATGAAATTAATCCAAATGAGTTTGTGTA  
 TGGGTTCAGAAGAAGTTCGTGTAATAGGGATTTGTGGGATGCCAGGGATTGGTAAGAGT  
 ACTGTTGCAAAGCTCTTTCTCAAAGAATTCGCAGTCAATTTGATGCTATCAGTTTCATT

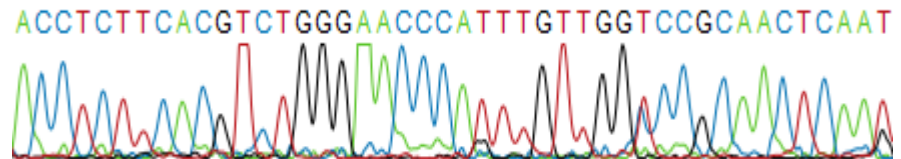
CCCTAAGACCTCGCTCTGACGAGTACTTCACAGTCTACAGGAGCTGACTAAGG  
 AGTATGTGACCAGGGCATGAGGAAGCCGGTTTTCTGTCTGGGGAGCAGAAGAA  
 CATCGTGGACCTCCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTACCGTTAAGCAGCTCAAGI  
 GACTACTTCAAGAAGATTGAGTGCTCGATTGCGTGCAGATCTCTGGCGTTGAGGA  
 CTTCAACGCCTCCCTGGGGACCTACCACGATCTCCTGAAGATCATTAAAGGATAAGC  
 TTCTGGACAACGAGGAGAATGAGGATATCCTCGAGGACATTGTGCTGACACTCAC  
 TGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGCCTGAAGACTTACGCCATCTCTTI  
 TGACAAGGTCATGAAGCAGCTCAAGAGGAGGAGGTACACCGGCTGGGGGAGGCTC  
 CAGGAAGCTCATCAACGGCATTTCGGGACAAGCAGTCCGGGAAGACGATCCTCGAC  
 CTGAAGAGCGATGGCTTCGCGAACCCGAATTTATGACAGCTGATTCAGATGACAC  
 TCACATTCAAGGAGGATATCCAGAAGGCTCAGGTGAGCGGCCAGGGGACTCGCT  
 ACGAGCATATCGGAACCTCGCTGGCTCGCCAGCTATCAAGAAGGGGATTCTGCA  
 CGTGAAGGTTGTGGACGAGCTGGTGAAGTTCATGGGAGGCACAAGCCTGAGAAC  
 GTCATTGAGATGGCCCGGAGAATCAGACCACGAGAAGGCCAGAAAGAACTCAC  
 GAGAGGATGAAGAGGATCGAGGAGGCGATTAAAGAGCTGGGGTCCCAGATCCTCA  
 GAGCACCCGGTGGAGAACACGCAGCTGCAGAATGAGAAGCTCTACCTGTACTACC

Disegno dei primer sul gene e sulla Cas9



**Screening tramite PCR**

Identificazione della delezione di ~400bp



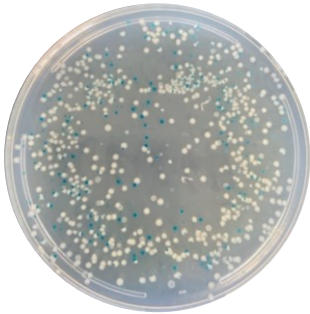
**Screening tramite sequenziamento Sanger**

Identificazione in/del di poche basi

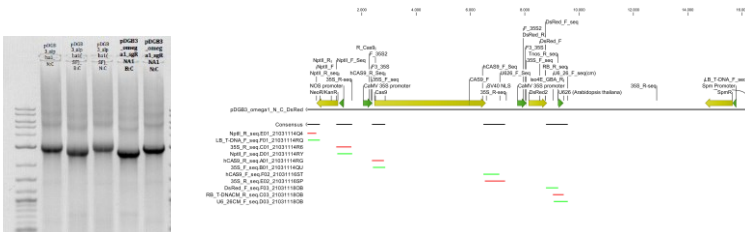
## Disegno della guida sul 1° esone



## Clonaggio (Golden Braid)



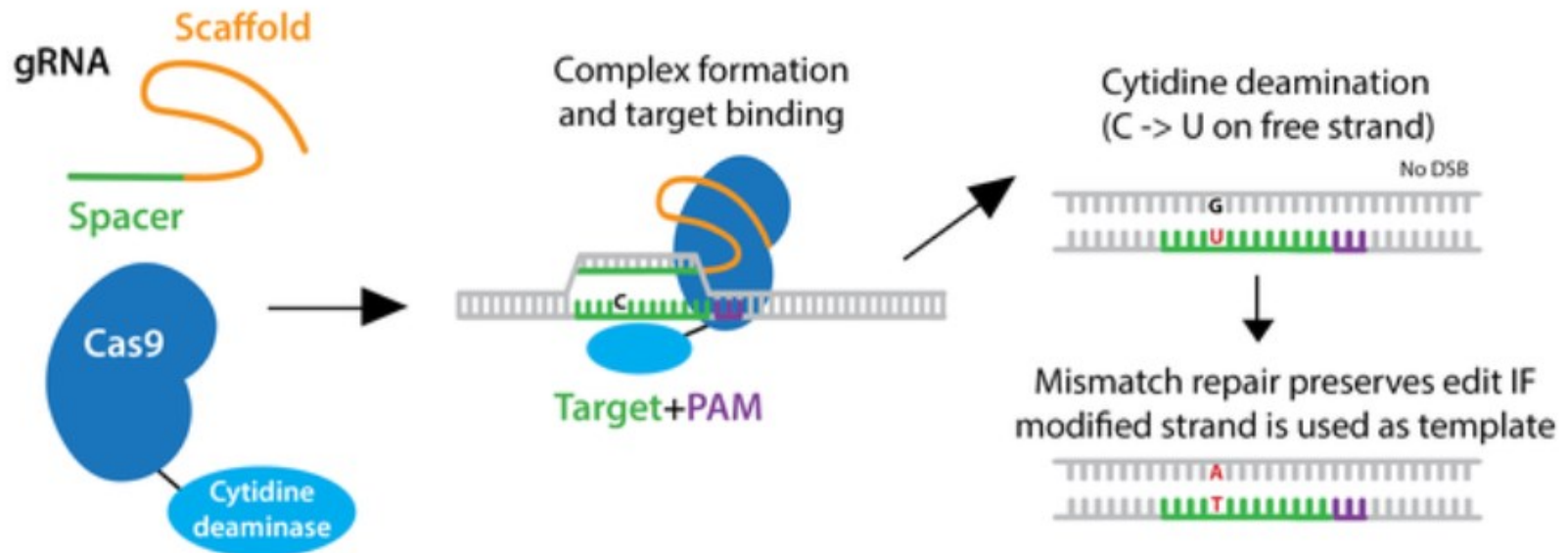
## Verifica costrutti



## Trasformazione in Agrobatterio



RIF 100 +  
GENT 50 +  
SPECT 50



dCas9 or Cas9 nickase  
fused to a cytidine deaminase

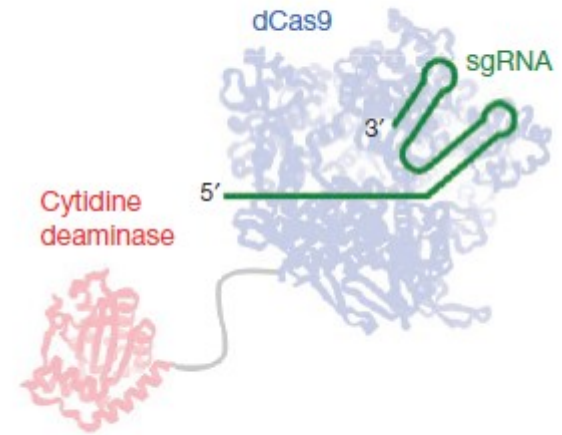
*Base excision repair inhibitor is  
also present in fusion protein*

Il complesso enzimatico è una endonucleas Cas9 inattiva (dCas9) o una nickase Cas9 (nCas9), che conserva la capacità di legarsi al DNA tramite sgRNA

## 2 tipi fondamentali di base editor:

Cytosine Base Editor (CBE) C → T

Adenine Base Editor (ABE) A → G



Crop name	Targeted genes	Type of base editor used		
<i>Oryza sativa</i>	<i>NRT1.1B and SLR1</i>	CBE	Enhance nitrogen use efficiency	Lu and Zhu (2017)
	<i>C287</i>	CBE	Herbicide resistant	Shimatani <i>et al.</i> (2017)
	<i>OsPDS, OsSBE1b</i>	CBE	Nutritional improvement	Li <i>et al.</i> (2017)
	<i>OsCDC48</i>	CBE	Regulate senescence and death	Zong <i>et al.</i> (2017)
	<i>OsSPL14</i>	CBE	Herbicide resistance	Tian <i>et al.</i> (2018)
	<i>OsMPK6</i>	ABE	Pathogen-responsive gene	Yan <i>et al.</i> (2018)
	<i>OsACC-T1</i>	ABE	Herbicide resistance	Li <i>et al.</i> (2018)
	<i>SLR1</i>	ABE	Della protein for plant height	Hua <i>et al.</i> (2018)
	<i>OsSPL14</i>	ABE	Plant architecture and grain yield	Hua <i>et al.</i> (2018)
	<i>OsRLCK185, OsCERK1</i>	CBE	Defence response	Ren <i>et al.</i> (2018)
	<i>Pi-d2</i>	CBE	Blast resistance	Ren <i>et al.</i> (2018)
	<i>Wx</i>	ABE	Rice amylose synthesis	Hao <i>et al.</i> (2019)
	<i>GL2/OsGRF4, OsGRF3</i>	ABE	Grain size and yield	Hao <i>et al.</i> (2019)
	<i>ALS</i>	CBE	Herbicide resistance	Veillet <i>et al.</i> (2019)
<i>Triticum aestivum</i>	<i>TaLOX2</i>	CBE	Lipid metabolism	Zong <i>et al.</i> (2017)
	<i>TaDEP1, TaGW2</i>	ABE	Panicle length and grain weight	Li <i>et al.</i> (2018)
<i>Zea mays</i>	<i>ZmCENH3</i>	CBE	Chromosomal segregation	Zong <i>et al.</i> (2017)
<i>Solanum tuberosum</i>	<i>StALS, StGBSS</i>	CBE	Herbicide resistance, Starch synthesis	Zong <i>et al.</i> (2018)
<i>Solanum lycopersicum and S. tuberosum</i>	<i>SLALS1</i>	CBE	Herbicide resistance	Veillet <i>et al.</i> (2019)
<i>Citrullus lanatus</i>	<i>ALS</i>	CBE	Herbicide resistance	Tian <i>et al.</i> (2018)

ABE, adenine base editor; CBE, cytidine base editor.

Mishra *et al.* 2019




## Trans-species synthetic gene design allows resistance pyramiding and broad-spectrum engineering of virus resistance in plants

Anna Bastet<sup>1,2,3,4</sup>, Baptiste Lederer<sup>1</sup>, Nathalie Giovinazzo<sup>1</sup>, Xavier Arnoux<sup>5</sup>, Sylvie German-Retana<sup>5</sup>, Catherine Reinbold<sup>6</sup>, Véronique Brault<sup>6</sup>, Damien Garcia<sup>7</sup>, Samia Djennane<sup>6</sup>, Sophie Gersch<sup>6</sup>, Olivier Lemaire<sup>6</sup>, Christophe Robaglia<sup>2,3,4</sup> and Jean-Luc Gallois<sup>1,\*</sup> 

CIYVV - Clover Yellow Vein Virus  
appartenente alla famiglia  
Potyviridae

## Mimicking natural polymorphism in *eIF4E* by CRISPR-Cas9 base editing is associated with resistance to potyviruses

Anna Bastet<sup>1,2</sup>, Delyan Zafirov<sup>1,2</sup>, Nathalie Giovinazzo<sup>1</sup>, Anouchka Guyon-Debast<sup>3</sup>, Fabien Nogué<sup>3</sup>, Christophe Robaglia<sup>2</sup> and Jean-Luc Gallois<sup>1,\*</sup> 

**Allele resistente di *Pisum sativo* :**  
*eIF4E* modificato - mantiene il suo  
ruolo nell'inizio della traduzione ma  
porta mutazioni non sinonime che  
impediscono l'interazione con il virus

<sup>1</sup>GAFI, INRA, Montfavet, France

<sup>2</sup>Laboratoire de Génétique et Biophysique des Plantes, CEA, CNRS, BIAM, Aix Marseille University, Marseille, France

<sup>3</sup>Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Saclay, Versailles, France

## Confronto tra eIF4E di *P. sativum* (R) e *A. thaliana* (S)

(a) JI2009 (S) 1 MVVEETPKSIITDD----QITTPNPNRVIEDDNNLEEGEILD-EDDSSA--TSKPVVHQPH  
 JI1405 (R) 1 .....  
 PI269818 (R) 1 .....  
 AteIF4E1 (S) 1 .A..D...VV.EEAKPNS.ENPID.YH.EGDDA....AGG.G.GNVDES..SG.PES.

W69L T80DS81D S84A G114R

JI2009 (S) 54 LLENSWTFWFDTPAAKSKQAAGSSMRPIYTFSTVEEFWSIYNNIHHPGKLAVGADFYCF  
 JI1405 (R) 54 .....L.....DD.S.....R.....  
 PI269818 (R) 54 .....W.....PD.....G.....  
 AteIF4E1 (S) 61 P..H...W..N..V...TS..S.L..VF.....L..MK..S...HG.....

JI2009 (S) 114 KHKIEPKWEDPICANGGKWTANYPKGKSDTSLWYLLAMIGEQFDHGDEICGAVVNVVRGR  
 JI1405 (R) 114 .....K.....  
 PI269818 (R) 113 .....N.....  
 AteIF4E1 (S) 121 ..I.....MTF..E...K.....L.....NI..K

JI2009 (S) 174 AEKISIWTKNASNEAAQVSIQKQWKEFLDYNETMGFIFHDDARKLDRNAKNKYVV  
 JI1405 (R) 174 .....  
 PI269818 (R) 173 .....  
 AteIF4E1 (S) 181 Q.R.....NSI...I.E..K.....A.TA

Bastet et al. 2018

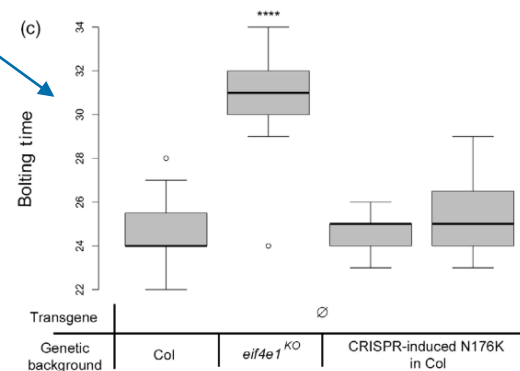
## 6 sostituzioni AA identificate

la sostituzione N176K in *A. thaliana* conferisce resistenza a diversi virus senza avere alcun effetto negativo sullo sviluppo della pianta stessa

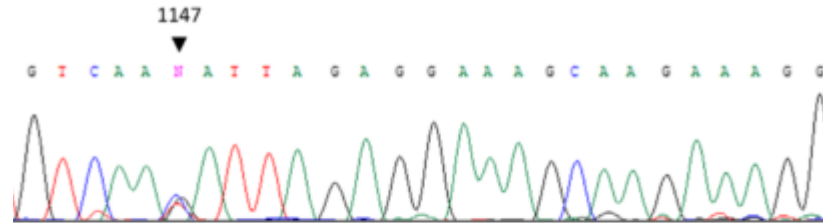
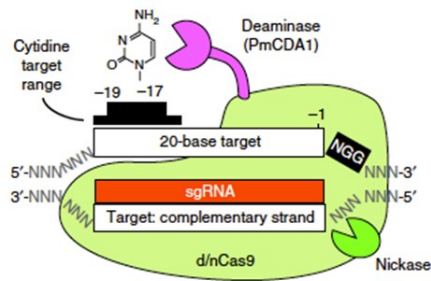
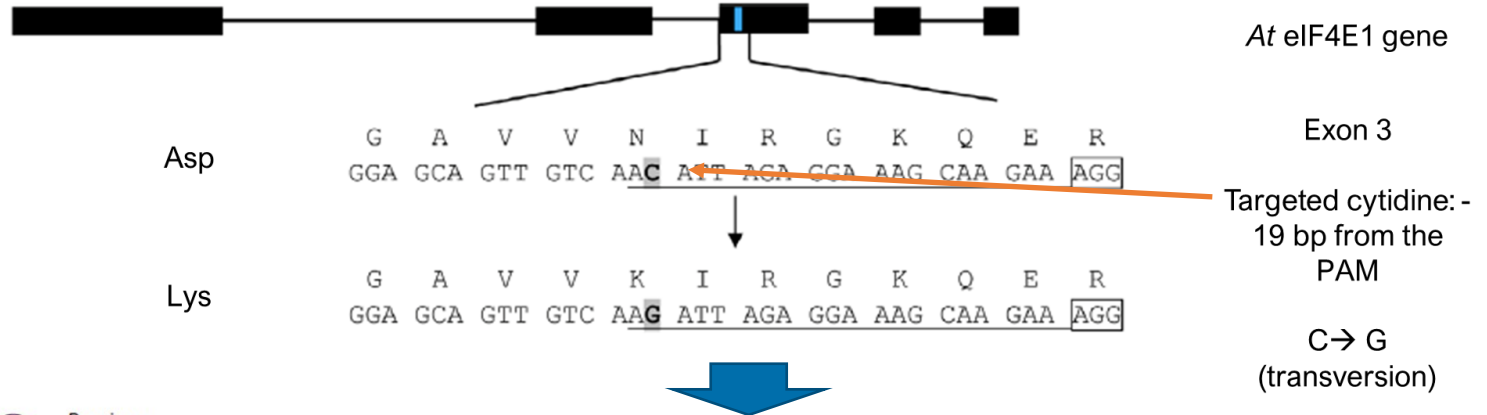
## *A. thaliana*

TuMV-N163Y	S	S	S	S	S	S	R
TuMV-E116Q	S	S	S	S	S	S	R
WMV	S	S	S	S	S	R	R
CIYVV N°30	S	R	S	S	S	R	R
CIYVV-DSMZ	S	R	S	S	R	R	R
TuMV	S	S	R	R	R	R	R

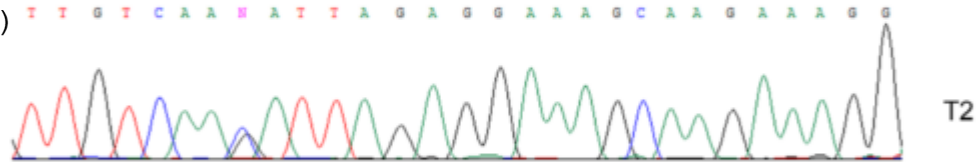
Transgene	∅			eIF4E1	G114R	N176K	T80D S81D
Genetic background	Col	<i>4e1</i> <sup>KO</sup>	<i>iso4e</i> <sup>KO</sup>	<i>4e1</i> <sup>KO</sup> x <i>iso4e</i> <sup>KO</sup>			



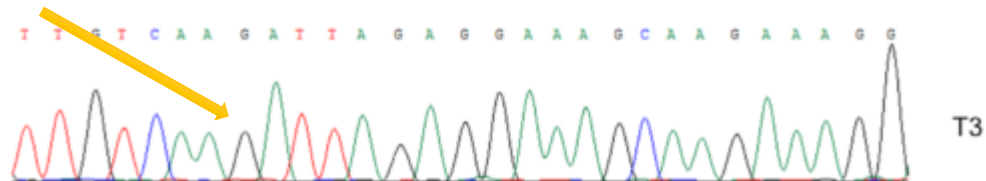
# Crispr/Cas9 base editing: transversione C->G



CAS9 + Citidine Deaminase (pmCDA1)  
Shimatani et al. 2017

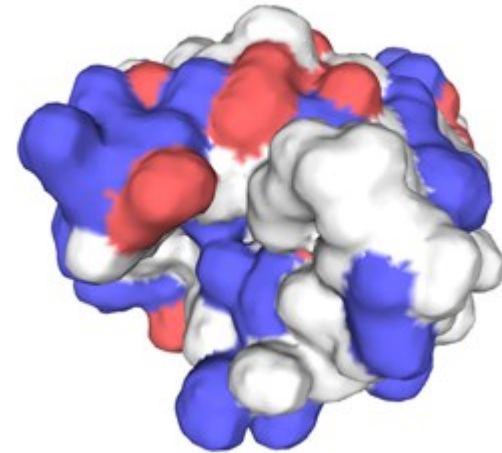


Bastet et al. 2019

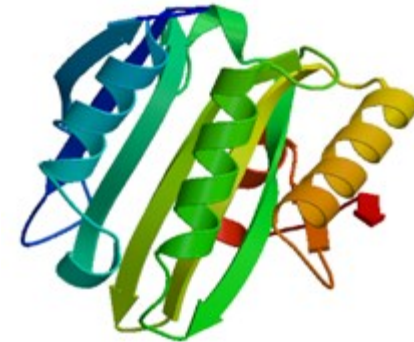


Sistema molto efficiente, ottenute 50% di piante T1 modificate

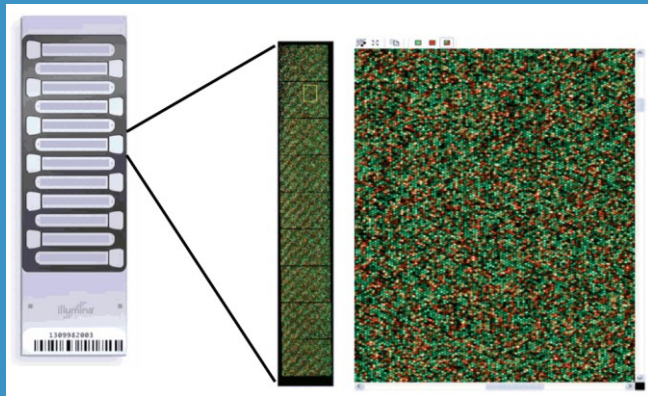
## Homology modelling



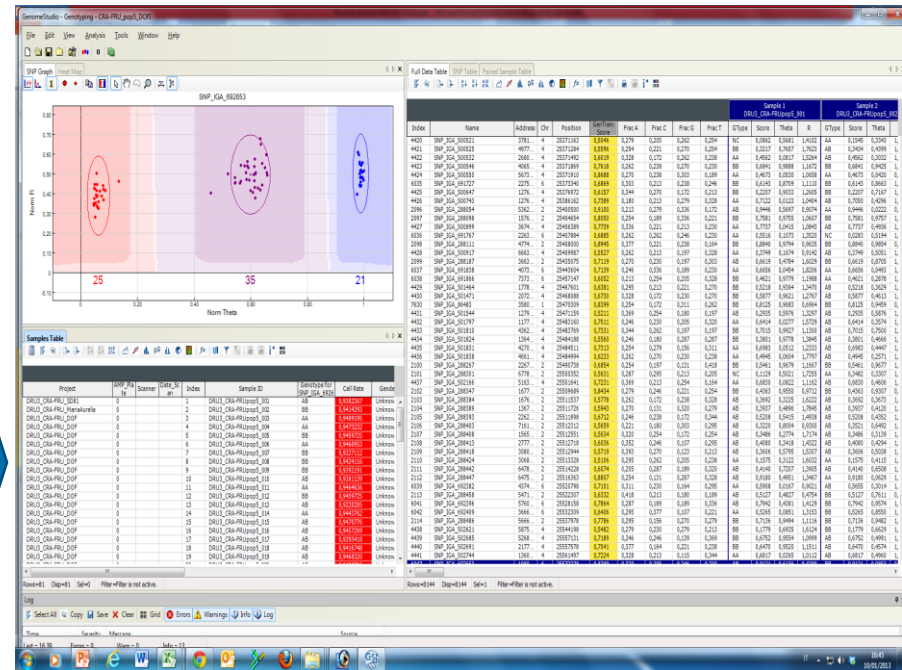
eIF di pesco



Studio *in silico* dell'effetto di mutazioni puntiformi sulla struttura della proteina



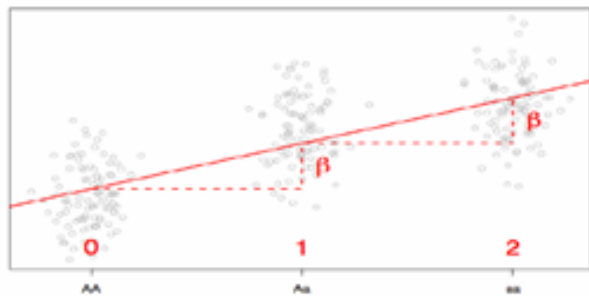
9K Infinium Illumina SNP Chip  
Verde et al. 2012



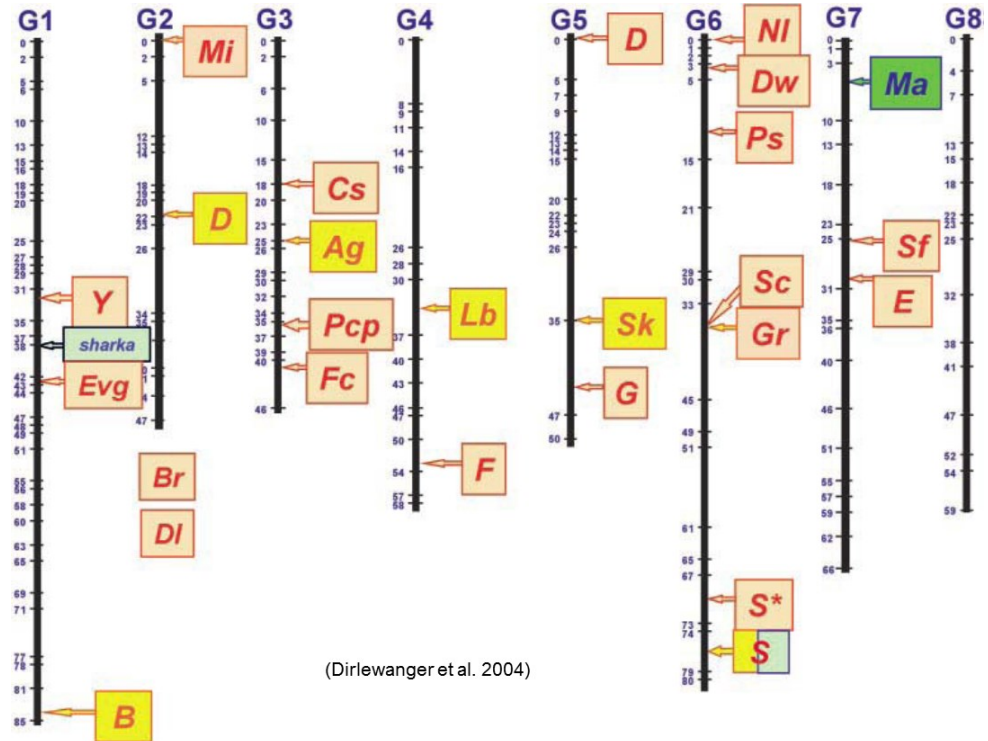
Saturazione di mappe di associazione, analisi dei QTL in popolazioni biparentali e multiparentali - Pedigree Based Analysis, Genomics Selection, GWAS

## Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops

Elisabeth Dirlewanger\*, Enrique Graziano<sup>†‡</sup>, Tarek Joobeur<sup>†§</sup>, Francesc Garriga-Calderé<sup>†¶</sup>, Patrick Cosson\*, Werner Howad<sup>†</sup>, and Pere Arús<sup>†||</sup>

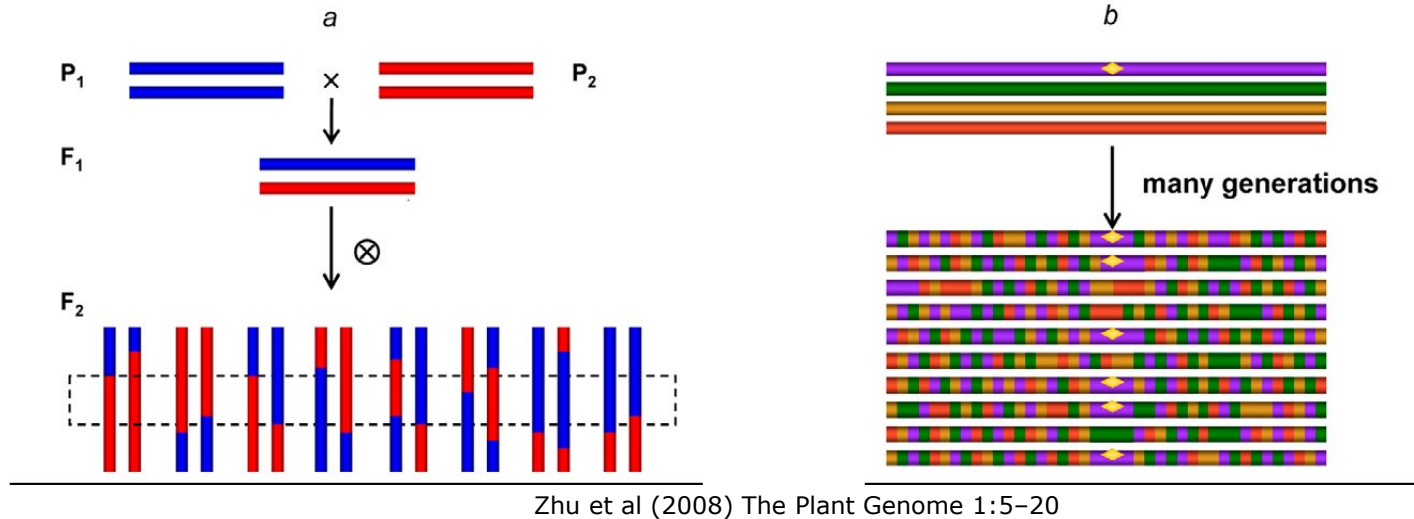


Correlazione genotipo/fenotipo



Localizzazione di geni e QTL che controllano diversi caratteri

Due diversi approcci per descrivere la variabilità osservata a livello fenotipico:

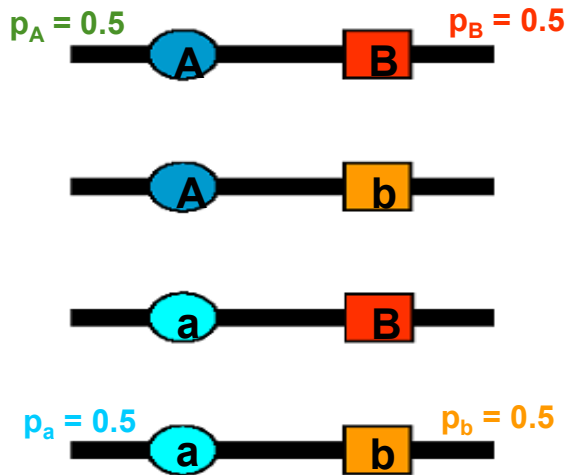


- E' necessario sviluppare una popolazione per ogni carattere che si vuole studiare
- Il QTL identificato è popolazione-specifico
- Spesso utilizzo di genotipi con scarso valore agronomico
- Necessarie popolazioni ampie per ottenere una risoluzione adeguata del QTL
- Sfrutta la variabilità esistente in una popolazione naturale, come le collezioni di germoplasma
- E' possibile mappare molti caratteri diversi in un'unica collezione
- Risoluzione maggiore
- Si basa sul Linkage Disequilibrium

Associazione non casuale di alleli in due o più loci.

Differenza tra le frequenze alleliche osservate e attese (distribuzione casuale dovuta all'assortimento indipendente).

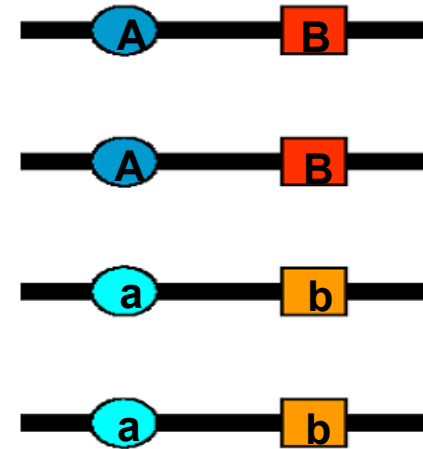
## Linkage Equilibrium



	B	b
A	0.25	0.25
a	0.25	0.25

$$D' = 0$$

## Linkage Disequilibrium

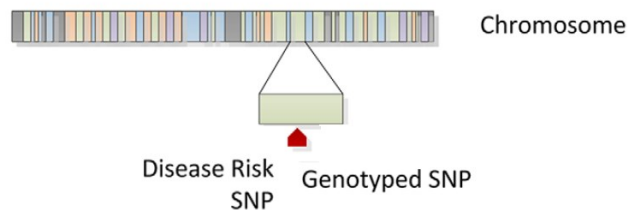


	B	b
A	0.5	0
a	0	0.5

$$D' = 1$$

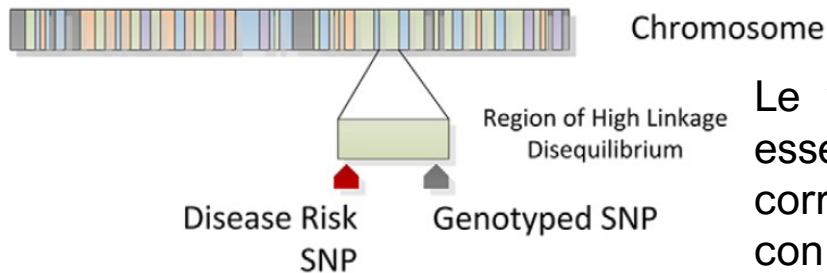


### direct Association

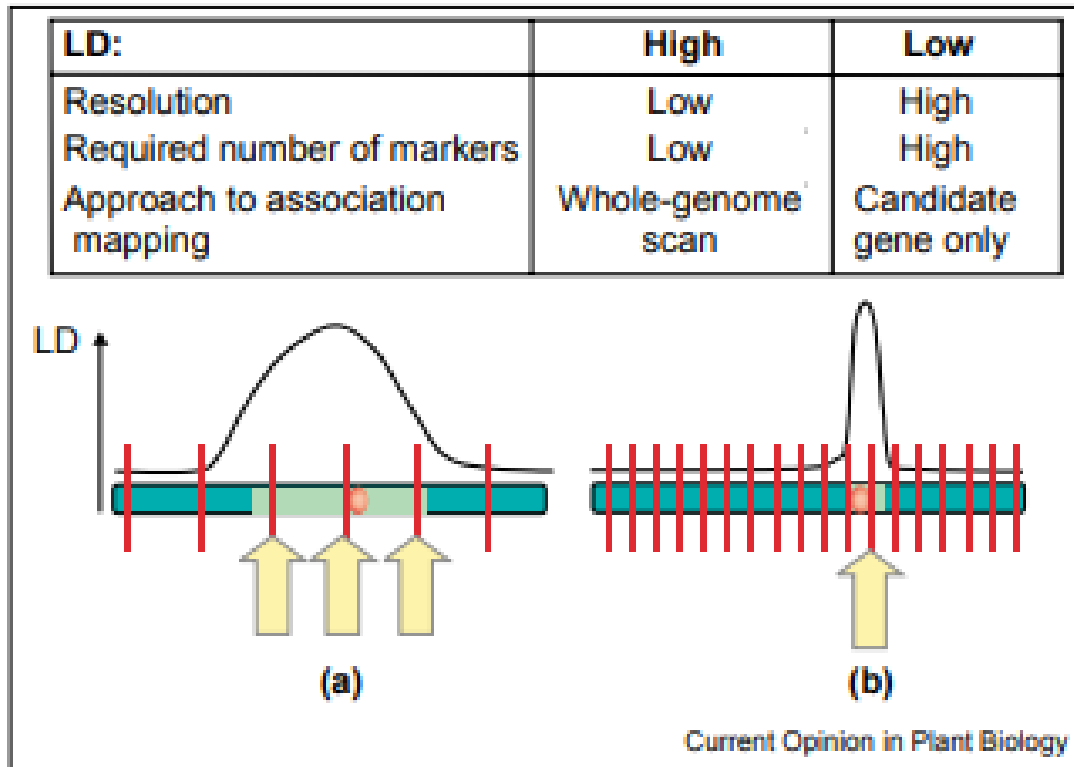


In esperimenti di GWAS solo una piccola proporzione delle varianti genetiche associate al fenotipo viene direttamente misurata.

### Indirect Association



Le varianti causali non genotipizzate possono essere identificate in maniera indiretta tramite correlazione del fenotipo con un marker in LD con queste.



Rafalski et al. 2002

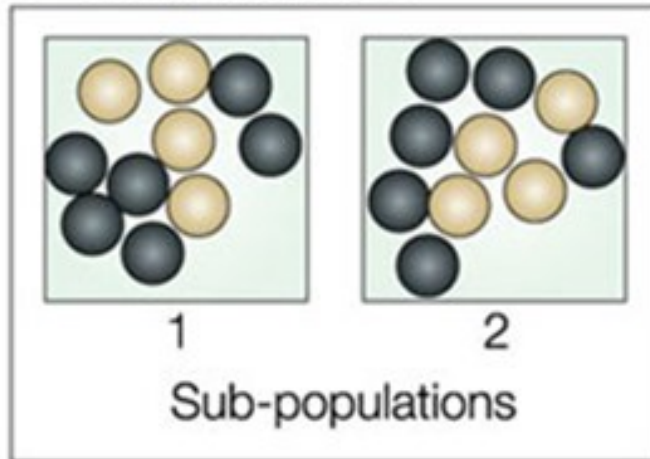
Conoscere il livello di LD è essenziale per progettare un esperimento di association mapping

Suddivisione della popolazione in sottogruppi distinti.

Dovuta a deriva genetica, domesticazione, selezione ecc.

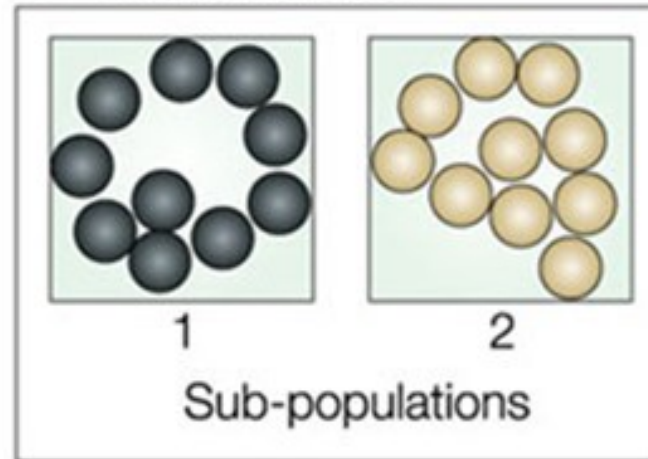
Frequenze alleliche tra le sottopopolazioni significativamente differenti

**a** Total population



Popolazione non strutturata

**b** Total population

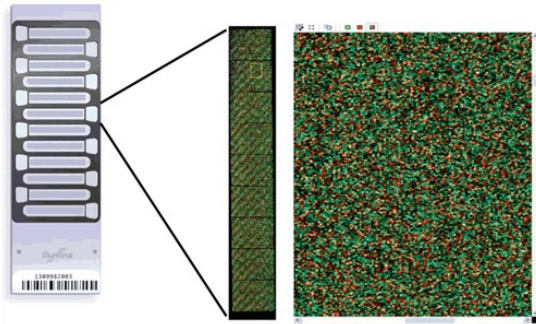


Popolazione strutturata

RESEARCH ARTICLE

# Whole-Genome Analysis of Diversity and SNP-Major Gene Association in Peach Germplasm

IPSC 9K SNP array genotyping



Analizzate 1580 accessioni di *Prunus*



1240 accessioni uniche

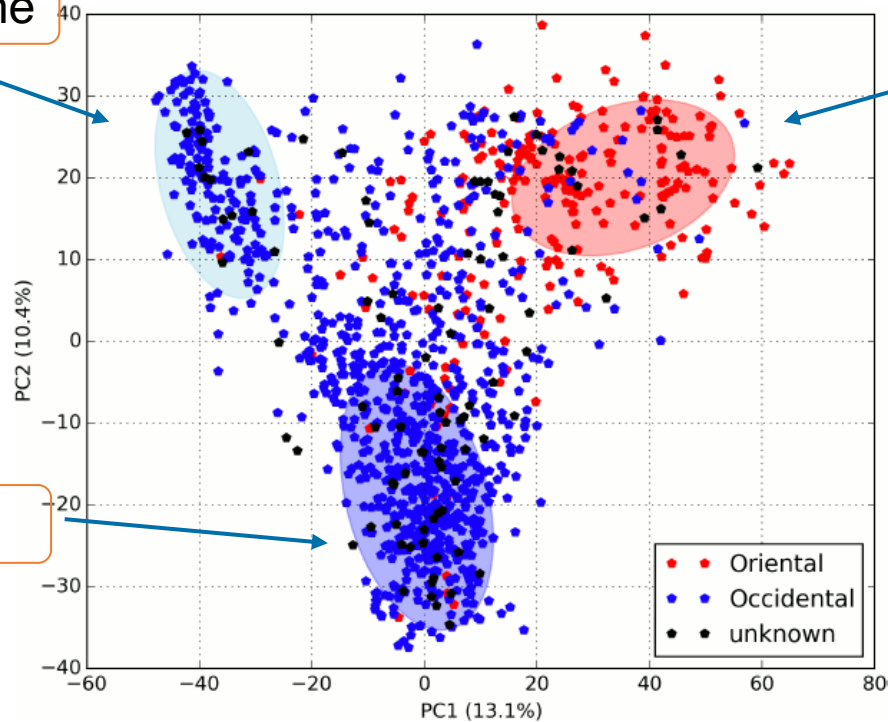
Table 1. Number of SNPs per class of the IPSC 9K array in a collection of 1,580 *Prunus* accessions.

Class	Class description	# SNPs
A	No Call <5%, three genotypes	4,330
B	Null allele or preferential annealing	230
C	Duplicated sequences/genes	778
D	False SNPs	772
E	Failed	2,034
<b>Total</b>		<b>8,144</b>

## PCA

disseminazione

domesticazione

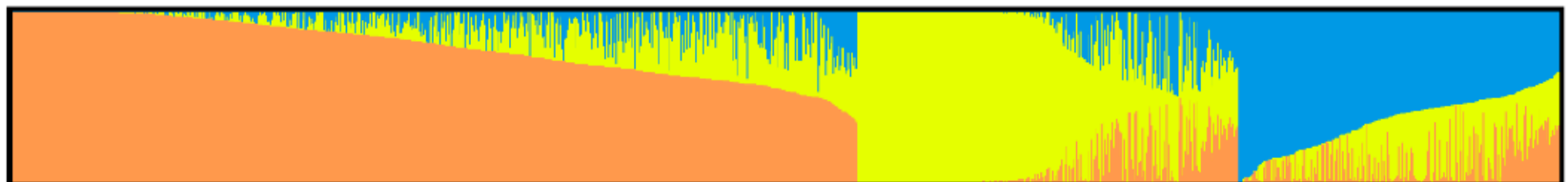


breeding

Identificati 3 sottogruppi:

- P1 Occidentale Breeding
- P2 Occidentale Tradizionale
- P3 Orientale

K3



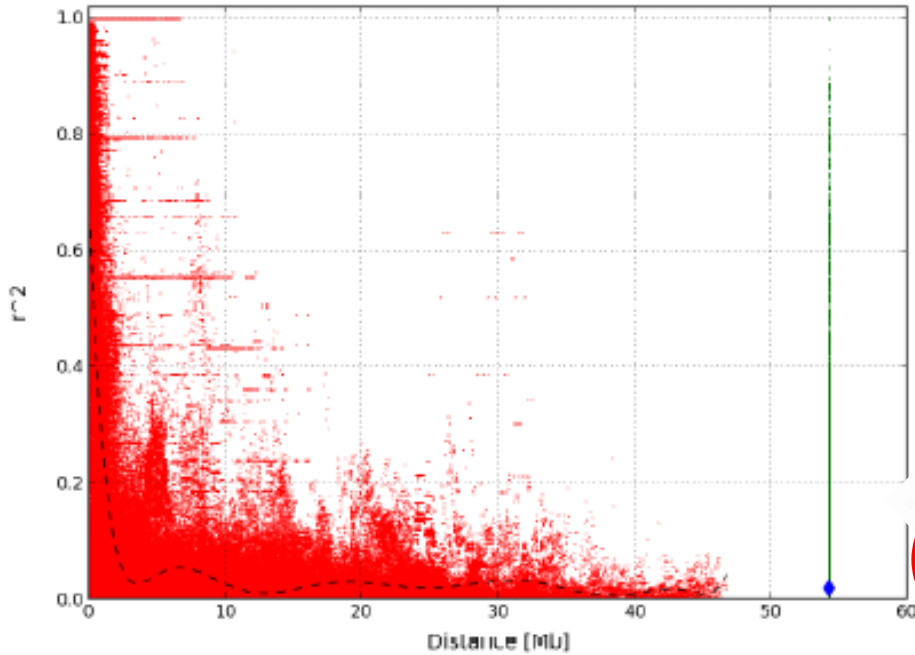
STRUCTURE

# Domesticazione e disseminazione del pesce



Verde et al. 2013

B) P2OC<sub>T</sub>



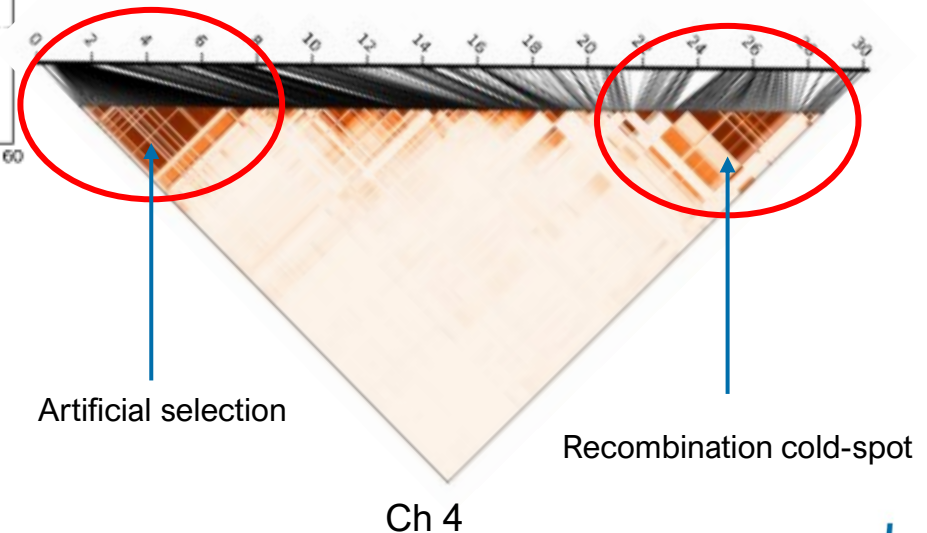
Decadimento del valore medio del linkage disequilibrium in funzione della distanza

Decadimento più veloce negli Admixture

Alti livelli di LD in tutti i cromosomi

3 blocchi tra 1.2 e 2 Mb comuni a tutti i sottogruppi in CH4 e Ch5

Altri blocchi sparsi a mosaico



## Fenotipizzazione: 7 caratteri qualitativi



nettarina



pesca



rosaceo



campanulaceo



aglandolare



globose



reniformi

### Caratteri analizzati

Tomentosità del frutto (G/g)

Forma del frutto (S/s)

Colore della polpa (Y/y)

Polpa melting/non melting  
(F/f/f1)

Acidità titolabile (D/d)

Ghiandole fogliari (E/e)

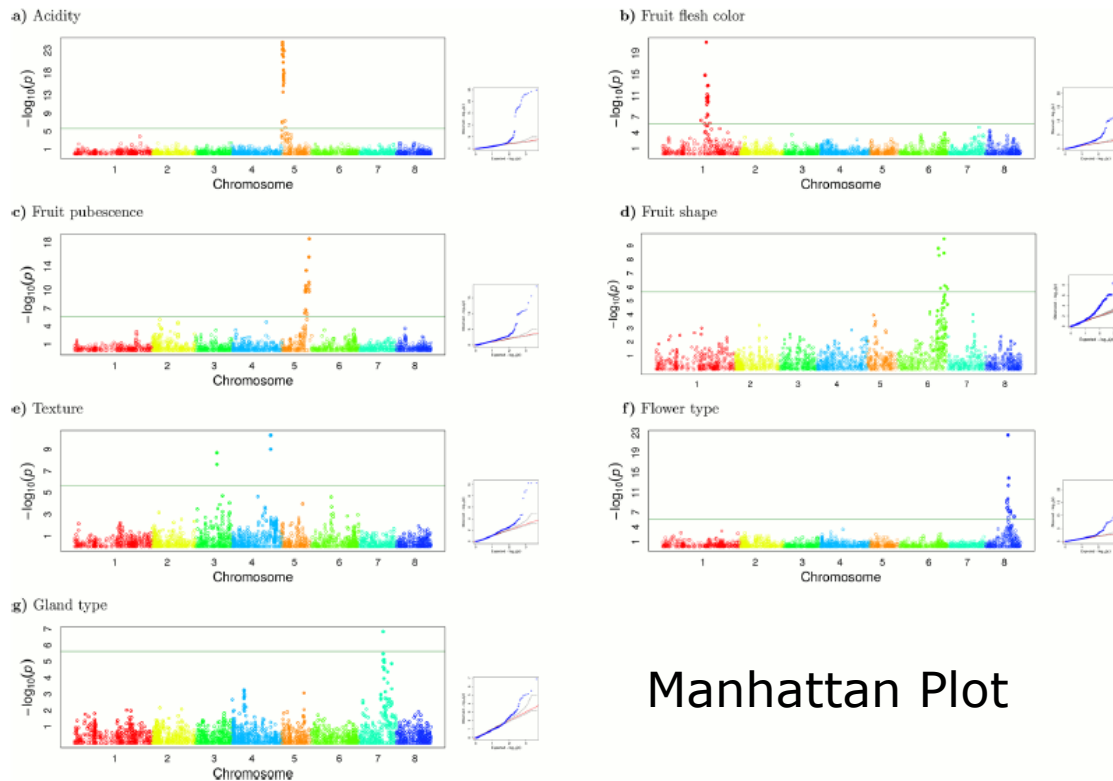
Tipo di fiore (Sh/sh)



platicarpa



Identificate associazioni significative per tutti i 7 caratteri esaminati nelle regioni genomiche già note.



## Manhattan Plot

**Fig 4. Genome wide association results for seven qualitatively inherited characters in peach.** Each Manhattan plot represents one phenotypic trait. Chromosomes are marked with a different color on the horizontal axis. The horizontal green line represents the significance threshold for the association of each character.

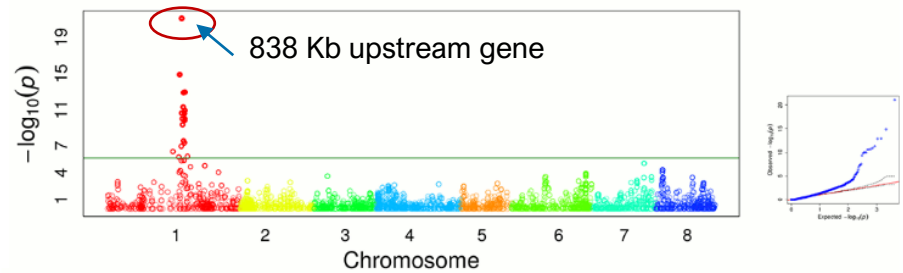
Linkage  
Disequilibrium alto

aplotipi di SNP  
possono essere  
maggiormente  
predittivi del singolo  
marcatore

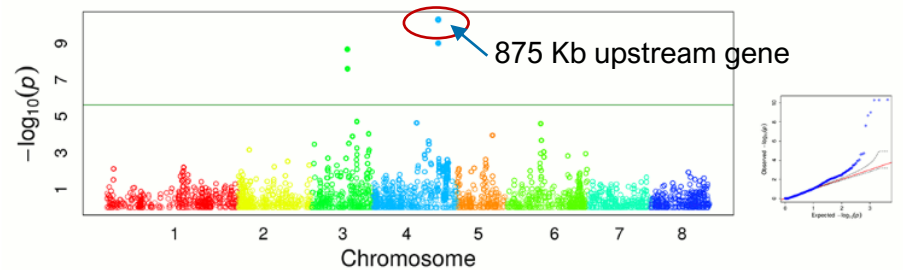
aplotipi popolazione-  
dipendenti scelti in  
base alla frequenza  
degli aplotipi nei  
parentali

**Geni causali già identificati per:**  
 Colore della polpa (Y/y)  
 Polpa non-melting/melting (F/f/f1)  
 Tomentosità del frutto (G/g)

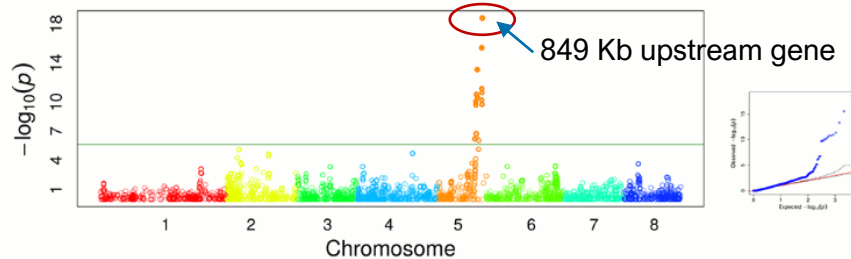
b) Fruit flesh color



e) Texture



c) Fruit pubescence

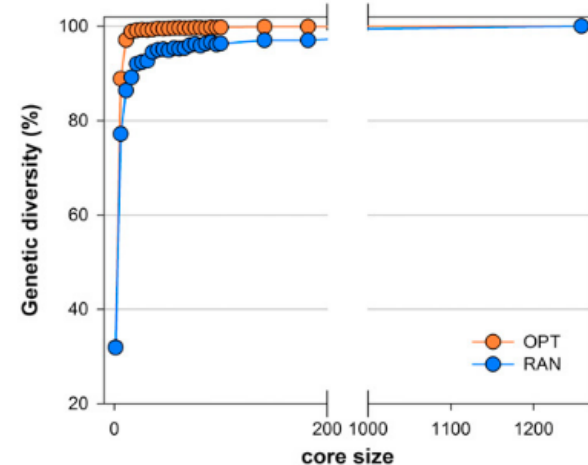
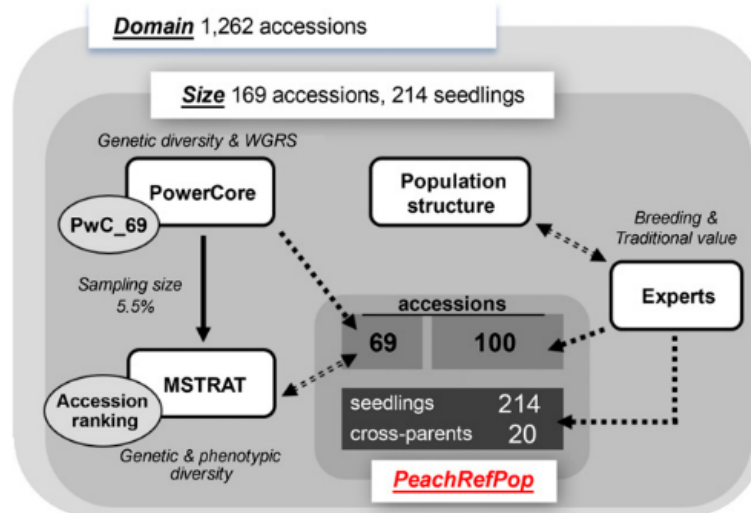


Per i caratteri i cui geni causali erano già noti, lo SNP più strettamente associato si trova ad una distanza equivalente a circa 1.9 cM dalla 5'-UTR del gene

## The Multisite *PeachRefPop* Collection: A True Cultural Heritage and International Scientific Tool for Fruit Trees

Marco Cirilli, Sabrina Micali, Maria José Aranzana, Pere Arús, Annarosa Babini, Teresa Barreneche, Marco Bink, Celia M. Cantin, Angelo Ciacciulli, José Enrique Cos-Terrer, Pavlina Drogoudi, Iban Eduardo, Stefano Foschi, Daniela Giovannini, Walter Guerra, Alessandro Liverani, Igor Pacheco, Thierry Pascal, Benedicte Quilot-Turion, Ignazio Verde, Laura Rossini, Daniele Bassi

Published October 2020. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.19.01412>  23



**169** varietà (1262 iniziali) e **234** piante (1464 iniziali) da progenie di incrocio

## Una rete mediterranea per conservare la biodiversità

D. Bassi<sup>1</sup> – M. J. ARANZANA<sup>4</sup> – M. CIRILLI<sup>1</sup> – J. COS TERRER<sup>2</sup> – P. DROGOUDI<sup>3</sup> – I. EDUARDO<sup>4</sup> – S. FOSCHI<sup>5</sup>  
S. MICALI<sup>6</sup> – L. ROSSINI<sup>1</sup> – I. VERDE<sup>6</sup>

<sup>1</sup>DISAA - Università di Milano

<sup>2</sup>IMIDA - Murcia (Spagna)

<sup>3</sup>DDFT - IPB&GR (Grecia)

<sup>4</sup>IRTA - Catalogna (Spagna)

<sup>5</sup>CRPV - Cesena (FC)

<sup>6</sup>CREA - Roma



PeachRefPop replicata in 5 siti Europei



Strumento per studi di genetica  
che tengano conto dell'interazione  
genotipo x ambiente

TAB. 1 - LOCALIZZAZIONE DELLE 'COPIE' DELLA "PEACHREFPOP"

Paese	Località	Accessioni	Latitudine	Longitudine	Altitudine	Ente
Grecia	Naoussa	400 <sup>(1)</sup>	40.620272	22.121489	119	DDFT, IPB&GR
Italia	Imola	400 <sup>(1)</sup>	44,334402	11,751956	53	CRPV, UniMi
Italia	Roma	180 <sup>(2)</sup>	41,47480	12,33581	79	Crea-OFA
Spagna	Gimenells	400 <sup>(1)</sup>	41,660484	0,390787	259	Irta Catalogna
Spagna	Murcia	400 <sup>(1)</sup>	38.065443,	-1,428592	278	Imida

<sup>(1)</sup>: sono presenti due parcelle (per facilitare lo studio dell'effetto di pratiche culturali, come concimazione e irrigazione): M1, comprendente tutte le 400 accessioni, M2, con un numero ridotto di genotipi.

<sup>(2)</sup>: presenti solo accessioni, mancano le popolazioni da incrocio

Grazie per l'attenzione