

## **Valutazione di varietà di frumento per la cerealicoltura lucana in base ai tratti radicali**

Roberta Rossi<sup>1</sup> e Mariana Amato<sup>2</sup>

1 CREA-Za

2 Università degli studi della Basilicata –Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali

Il progetto Lucan cereals mira alla gestione colturale sostenibile della produzione dei cereali lucani. In questo contesto la valutazione delle varietà di frumento è di grande importanza: l'architettura e la dinamica di accrescimento e sviluppo dell'apparato radicale delle piante giocano un ruolo fondamentale nell'efficienza di acquisizione delle risorse idriche e nutrizionale. Diversi studi hanno mostrato come i processi di selezione varietale e miglioramento genetico nel frumento abbiano influenzato non solo le rese ed i parametri epigei ma anche l'architettura della radice (Gioia et al., 2015). Studi sul frumento tenero hanno mostrato come in generale la dimensione dell'apparato radicale sia minore nelle varietà moderne rispetto alle varietà locali con possibili conseguenze negative sulla capacità della radice di esplorare lo spazio e intercettare i nutrienti mobili (Waines & Ehdaie, 2007). L'interazione fra partners di ricerca ed aziendali nel progetto Lucan cereals ha dato origine ad un lavoro dimostrativo e di comparazione di alcune caratteristiche dell'apparato radicale di una varietà moderna di frumento duro ed una antica varietà locale usate nel progetto stesso. In particolare UNIBAS- SAFE ha individuato assieme al Partner CONPROBIO Lucano due varietà commerciali più rilevanti in termini di produttività e qualità del prodotto per la coltivazione in biologico. CONPROBIO Lucano ha fornito il seme delle due varietà. UNIBAS-SAFE ha quindi collaborato con il CREA-ZA nell'allestimento delle parcelle sperimentali per il confronto varietale fra una varietà moderna di frumento duro (cv Core) ed una antica varietà locale (cv Saragolle Lucana). Questo contributo presenta alcuni dei risultati ottenuti in test di campo e di laboratorio.

Il campo è stato creato presso il campus UNIBAS di Macchia Romana a Potenza in collaborazione fra i partners UNIBAS-SAFE e CREA-ZA, secondo uno schema sperimentale a blocchi randomizzati con 4 ripetizioni nel quale sono stati messi a confronto:

- Varietà antica Saragolle lucana, fornita da Con. Pro. Bio
- Varietà moderna di frumento Core, fornita da Con. Pro. Bio

I rilievi morfologici sono stati eseguiti nel 2020 durante le prime fasi di crescita delle plantule, in particolare durante fase fenologica 13- Three Leaves emerged della scala fenologica di Zadock per i cereali [<https://www.agric.wa.gov.au/grains/zadoks-growth-scale>]. I rilievi hanno avuto l'obiettivo di determinare differenze di vigore nell'accrescimento della porzione epigea (seedling vigor) e differenze nella morfologia dell'apparato radicale. Per quanto riguarda i caratteri ipogei è stata applicata una tecnica innovativa di fenotipizzazione delle radici con l'obiettivo di quantificare in maniera rapida alcuni caratteri legati all'efficienza di acquisizione delle risorse mobili. Acqua e nutrienti.

Per entrambe le tipologie di parametri (vigore delle plantule ed architettura radicale), l'obiettivo principale è stato definire un protocollo di misura e analisi dati speditivo e basso costo tale da poter essere facilmente implementato dagli agricoltori stessi, da servizi di extension in agricoltura e da tecnici agronomi. In particolare l'analisi di immagine dell'area fogliare è stata realizzata ricorrendo ad un software di tipo freeware liberamente accessibile in rete.

### **Le caratteristiche della radice nelle prime fasi di crescita: lo screening dell'angolo gravitropico**

L'architettura dell'apparato radicale, in particolare la distribuzione di radici lungo il profilo, così come la velocità di colonizzazione del profilo stesso, influenzano l'efficienza di acquisizione di risorse mobili quali acqua e azoto. Nei cereali uno dei tratti radicali più studiati in relazione all'efficienza di acquisizione delle risorse mobili nel suolo è il cosiddetto angolo gravitropico, ossia l'angolo di crescita degli assi delle radici rispetto al piano di campagna. L'angolo gravitropico, sebbene sia modulato in

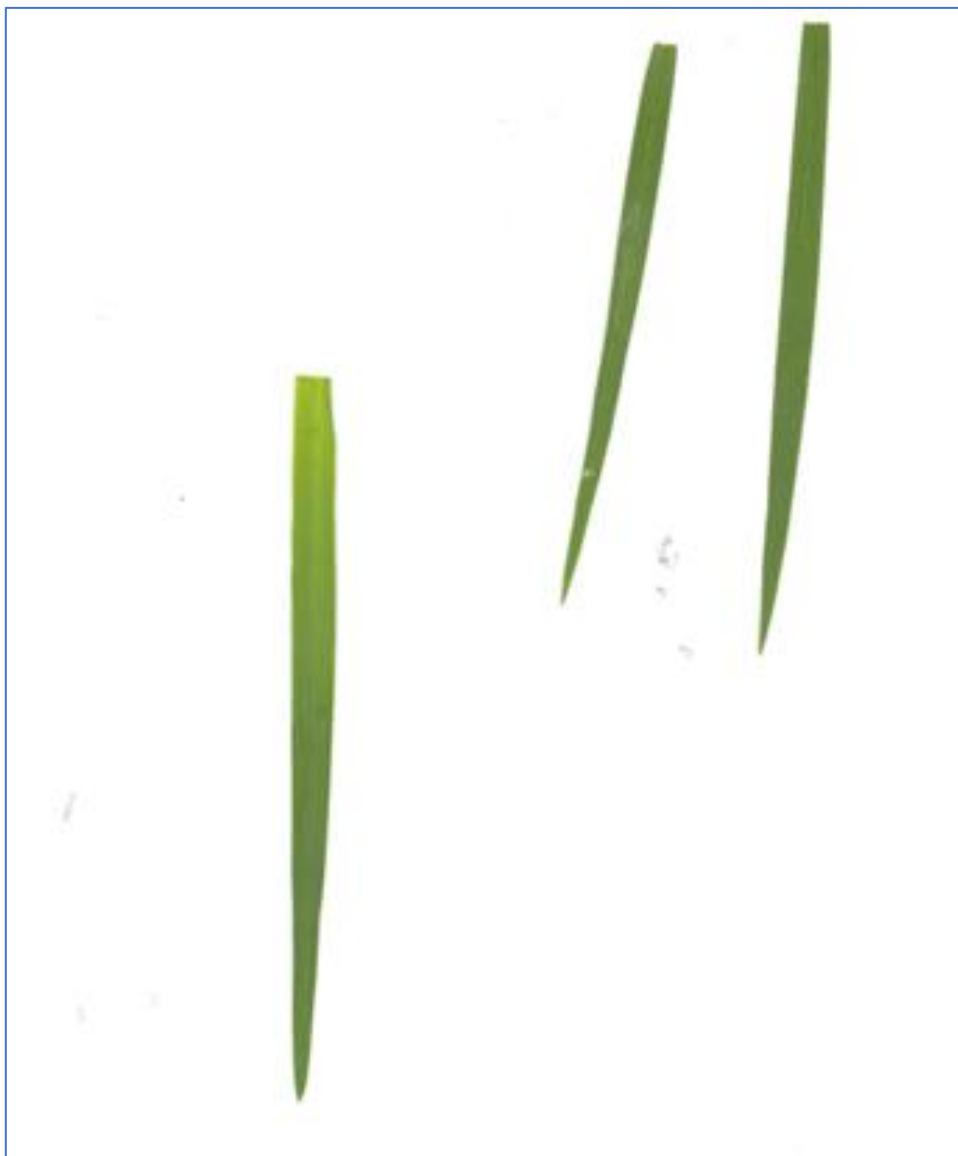
una certa misura dall'ambiente di crescita è un carattere ereditario, interessante quindi ai fini del miglioramento genetico dei cereali.

### **Metodologia sperimentale**

#### **Screening del vigore delle plantule: misura dell'area fogliare e dell'area fogliare specifica**

Le giovani plantule delle due cultivar oggetto dello studio sono state prelevate allo stadio di terza foglia. Per preservare il turgore fogliare le plantule sono state prelevate estraendo una porzione dell'apparato radicale ed una piccola zolla di terreno e trasportate immediatamente in laboratorio.

Le foglie sono state recise in corrispondenza dell'attaccatura della lamina, sono state pesate con una bilancia analitica e sono state scansionate utilizzando uno scanner ad alta risoluzione (Delta-T scan). Dopo la scansione sono state imbustate ed essiccate in stufa ventilata alla temperatura di 70°C per 48 ore.



**Figura 1. Esempio di scansione delle foglie**

## Analisi di Immagine:

Al fine di misurare l'area fogliare, l'immagine scansionata (formato .tiff o .jpeg) è stata analizzata e mediante il programma open source "ImageJ" (Image J 1.50i, National Institute of Health, USA). L'immagine scansionata viene visualizzata nel formato jpeg o .tiff in ImageJ. Prima di procedere con le misure lineari e/o di superficie, è necessario effettuare la calibrazione tra l'unità di misura espressa in pixel (di default in ImageJ) e l'unità prescelta (mm o cm). Per la calibrazione è stato utilizzato un righello precedentemente posizionato sul bordo della superficie da scansionare. Si è proceduto procedendo misurando il segmento di lunghezza nota. In tal modo è possibile calcolare la corrispondenza tra i pixel e l'unità di misura prescelta. Il software registra il dato di calibrazione e fornisce direttamente l'output nell'unità di misura prescelta. Successivamente si procede con l'aggiustamento delle soglie di colore dell'immagine in modo da avere uno sfondo dell'immagine di colore scuro e in modo che gli oggetti da misurare (le foglie) siano ben evidenti (ad esempio possiamo usare uno sfondo nero su cui le foglie verdi sono ben visibili). Per fare ciò si procede usando la funzione Image > Adjust > Color Threshold. Questo ultimo comando consente di impostare i valori di soglia di colore del target (le foglie) ed il colore di background [ImageJ User Guide, IJ 1.46r, Ferreira T., Rasband W. 2012]

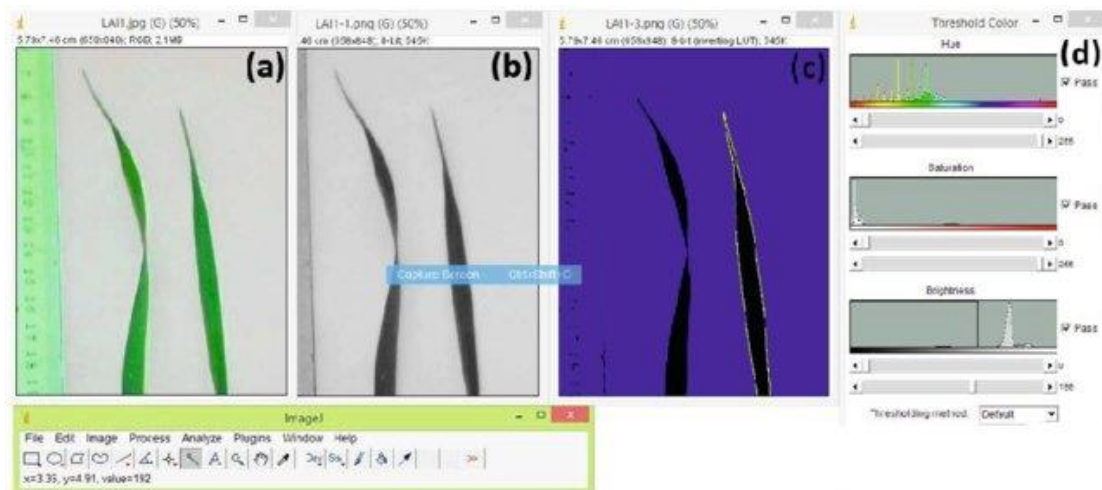
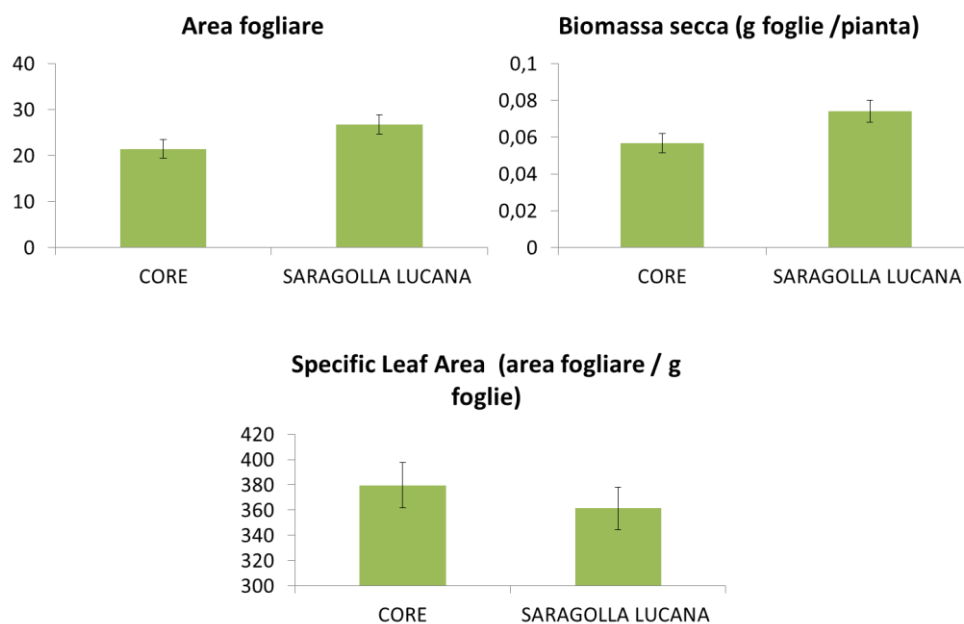


Figura 2. Esempio di analisi di immagine con InmagJ, a, b= immagini di foglie nei colori originali e convertiti in scala di grigio per aumentare il contrasto, c = la stessa immagine analizzata, d = parametri la cui regolazione permette di discriminare con accuratezza il target dal background (l'immagine + tratta da Awad et al., 2014)

La specific leaf area è stata calcolata dividendo la superficie fogliare per il peso della foglia in grammi

## Risultati

La Saragolle Lucana ha mostrato un più rapido sviluppo dell'area fogliare, quest'ultima è risultata significativamente più alta dell'area fogliare della cv Core. La biomassa fogliare è anch'essa risultata significativamente maggiore mentre non sono state osservate differenze significative nella specific leaf area.



**Figura 3. Barplots del confronto tra le medie dei valori misurati di Area fogliare, biomassa fogliare e area fogliare specifica per le due Cultivar Core e Saragolle Lucana allo stadio fenologico della terza foglia**

La mancanza di differenze a livello di area fogliare specifica è attribuibile allo spessore della foglia che a parità di superficie risulta maggiore per la Saragolle Lucana. La letteratura scientifica riporta relazioni contrastanti fra SLA e performance produttiva (resa) (Rawson et al. 1987) . Una riduzione della SLA tuttavia suggerisce la presenza di un maggior numero di strati di mesofillo (Dornhoff and Shibles 1976), cui corrisponderebbe un maggior tasso di utilizzo della CO<sub>2</sub> per la produzione di biomassa fogliare (es. budget di Constable e Rawson 1980; Rawson 1986) ed un maggior tasso di incorporazione dell’azoto per unità di superficie fogliare (Khan e Tsunoda 1970, e revisione di Gifford 1987). Uno studio comparativo tra una varietà di frumento vigorosa (cv Vigour 18) ed altre varietà commerciali ha dimostrato che la crescita vigorosa epigea ed ipogea di Vigour 18 era il principale fattore coinvolto nel maggiore assorbimento di azoto per questa cultivar,

Complessivamente la Saragolle Lucana mostra caratteri interessanti per la coltivazione in biologico, quali un maggior vigore della plantula ed a parità di area fogliare un maggior spessore della foglia, caratteristica potenzialmente correlata al tasso di incorporazione dell’azoto ed al tasso di utilizzo del carbonio come substrato per la produzione di biomassa fogliare.

### **Caratteristiche radicali**

Il rilievo delle caratteristiche radicali è stato effettuato durante la fase fenologica di inizio accostamento, quando le due cultivar contavano un numero di culmi circa pari a 3 senza differenze significative tra le varietà. Per il rilievo delle caratteristiche biometriche della radice è stata utilizzata una innovativa tecnica di fenotipizzazione in pieno in campo nota con il nome inglese di “shovelomics” (Trachsel et al, 2013).

La tecnica è stata eseguita su piante cresciute in pieno campo. Per ogni pianta campionata (sub 2 repliche per parcella per un totale di 14 osservazioni per cultivar) è stata inserita una piccola vanga di larghezza 15 cm, altezza 25 cm ad una distanza di 20 cm dal colletto della pianta, facendo leva con la vanga è stato estratto un piccolo monolite contenente le radici. Ogni campione è stato immerso in acqua per facilitare il distacco delle particelle di suolo. Per ogni campione è stata scelta una pianta

rappresentativa che è stata trasportata in laboratorio per essere misurata utilizzando una tipica lavagna graduata (shovelomic Board - Trachsel et al, 2013). La figura sottostante mostra un esempio di misurazione.

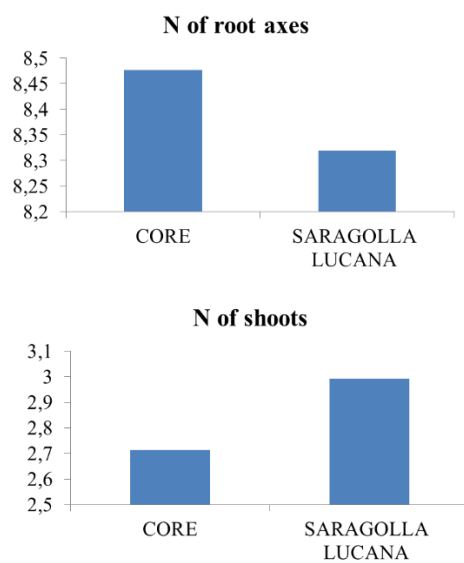
Sono stati rilevati i seguenti caratteri: numero di assi radicali, angolo gravitropico delle radici, densità di radici laterali, numero di fusti.



**Figura 4. Fotografia di una pianta di frumento posizionata sulla lavagna graduata (Shovelomic board) per la misura dell'angolo gravimetrico**

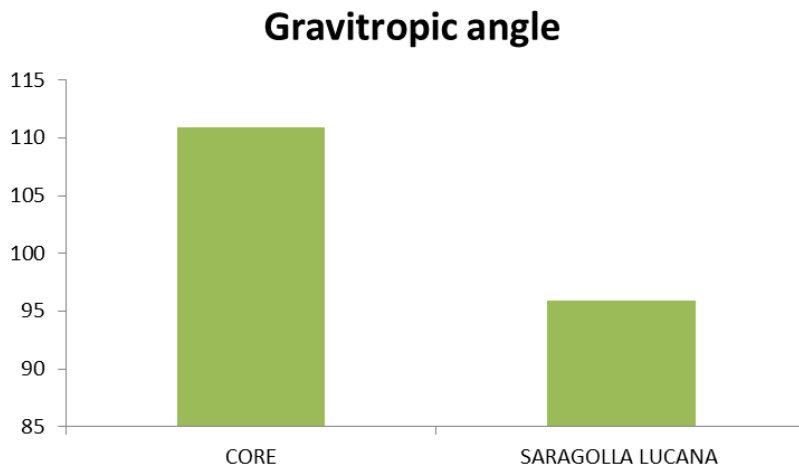
## Risultati

Le due cultivar non differivano per numero di assi radicali né per numero di fusti secondari, questi due parametri sono in genere correlati. Sono state riscontrate solo piccole non significative differenze.



**Figura 5. Barplots del confronto tra le medie dei valori misurati di numero di assi radicali (alto) e radici (basso) per le due Cultivar Core e Saragolle Lucana**

L'angolo gravitropico non ha mostrato differenze significative tra le due cultivar ma Saragolle Lucana ha mostrato una tendenza per lo sviluppo di un angolo più stretto. La variabilità intraspecifica tende ad essere particolarmente elevata per i caratteri radicali, e ciò è dovuto al fatto che le radici sono strutture caratterizzate da una elevata plasticità. Alcuni fattori ambientali quali la temperatura e la struttura del suolo influenzano il grado di apertura dell'angolo gravitropico.



**Figura 6. Barplots del confronto tra le medie dei valori misurati dell'angolo gravitropico per le due Cultivar Core e Saragolle Lucana**

Inoltre nella fase in cui è avvenuto il rilievo (inizio accostamento) erano già presenti le radici nodali che sono state incluse nella misura. Per una più esaustiva valutazione del tratto si ipotizza la comparazione dei risultati di uno screening in ambiente controllato con le misure di pieno campo.

## **Conclusioni**

### **Considerazioni agronomiche**

Gli studi condotti hanno consentito di evidenziare alcune differenze tra le due cultivars ed in particolare hanno consentito di individuare alcuni tratti nella Saragolle Lucana particolarmente interessanti in vista di una possibile coltivazione nei sistemi biologici: un più rapido sviluppo dell'area fogliare, un carattere che risulta utile in vista della competizione con le infestanti e dell'efficienza di acquisizione dell'azoto nelle prime fasi di crescita. La radice ha mostrato solo una debole non significativa differenza tra le cultivar, con una tendenza però in Saragolle verso lo sviluppo di un angolo gravitropico più stretto. Quest'ultimo carattere è associato ad una più efficiente capacità di acquisizione di acqua e nutrienti. Le metodiche individuate e descritte sono facilmente utilizzabili sia dagli agricoltori che dai servizi di extension in agricolture che da tecnici agronomi per il confronto varietale in pieno campo.

## **Morfologia delle radici in laboratorio**

### **Background**

In particolare la prima parte delle attività è consistita nella messa a punto di una metodologia rapida di fenotipizzazione della radice di giovani plantule di frumento. Questa metodologia di screening rapida

ed economica consente di individuare le differenze nella velocità di accrescimento e nella densità radicale in lunghezza delle radici seminali del frumento. Tali caratteristiche sono rilevanti sia in fase di insediamento della coltura (interazione con microrganismi patogeni della radice e intercettazione di composti azotati) che nella fase di maturazione. Una maggiore profondità e capacità di esplorazione dell'apparato radicale consentono di accedere a riserve idriche e nutrizionali in stadi di crescita nei quali l'efficienza di uso delle risorse ai fini della produzione di granella è massima.

### Materiali e metodi

Le cariossidi, selezionate per morfologia uniforme e sono state disinfettate immergendole per 15' in una soluzione di ipoclorito di sodio all'2%. Sono state quindi risciacquate per due minuti sotto acqua corrente e lasciate imbibire in acqua per 1 h. Le cariossidi (3 per varietà) sono state posizionate sul margine superiore di fogli di carta da germinazione precedentemente imbibiti in acqua. Le cariossidi, 3 per foglio sono state disposte verticalmente (embrione rivolto verso il basso) distanziate fra loro di circa 4-5 cm. Il foglio è stato arrotolato strettamente (diametro 1.5 cm circa), imbibito nuovamente in un vassoio colmo d'acqua corrente. Ogni rotolo è stato avvolto in una pellicola di plastica per alimenti, lasciando scoperto il margine inferiore di 5 cm. I rotoli sono stati quindi sistemati in un tubo di PVC (h=39 cm, Ø = 10 cm) riempito d'acqua fino ad un'altezza di 5 cm per favorire l'idratazione dei fogli per capillarità. Il tubo è stato lasciato a temperatura ambiente (circa 20-22 °C) e in condizioni di illuminazione naturale attraverso una vetrata fino allo sviluppo della seconda foglia. Al raggiungimento del citato stadio fenologico i rotoli sono stati aperti, le cariossidi con germinazione /accrescimento anomalo sono state escluse. Per ogni plantula con una riga è stata misurata manualmente la lunghezza della foglia più lunga, la lunghezza della radice più lunga ed il numero di radici seminali. Le radici sono state quindi asportate e la lunghezza totale e il diametro medio sono stati misurati mediante scansione e analisi di immagine (WINRhizo software - Régent Instruments Inc., Québec, CA)). I dati sono stati sottoposti a test-t delle medie per determinare differenze significative fra le medie.

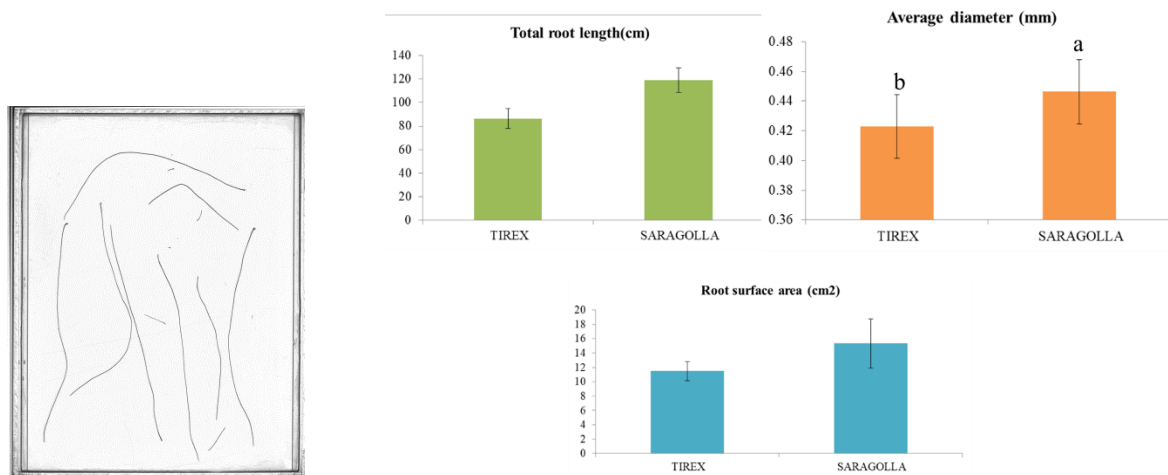
### Risultati

La lunghezza totale delle radici, il numero di radici seminali, la lunghezza delle foglie e la lunghezza del coleoptile sono risultati significativamente più alte in Saragolle (pval < 0.005). Le statistiche riassuntive sono riportate in tabella 1.

**Tabella 1. Valori medi dei parametri biometrici della radice per le due varietà oggetto di studio**

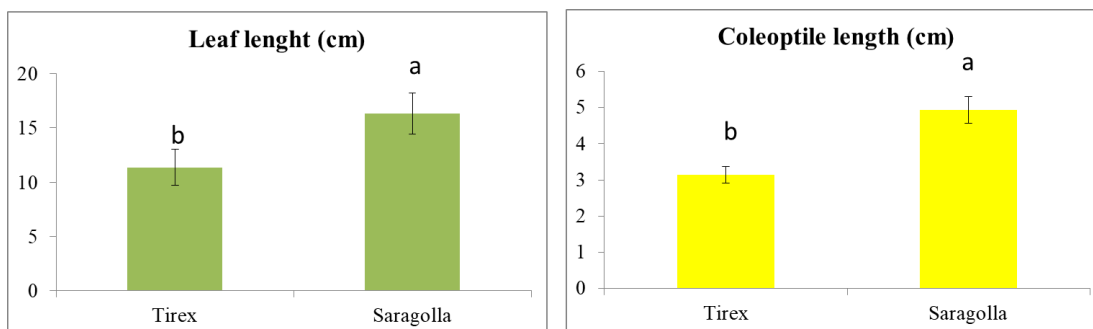
	Medie					Primary root length (cm)	Leaf length (cm)	Coleoptile length (cm)
	Root length (cm)	ProjArea(cm <sup>2</sup> )	SurfArea(cm <sup>2</sup> )	AvgDiam(mm)	N of seminals			
<b>Tirex</b>	87.086	3.707	11.647	0.426	4.375	28.125	11.350	3.150
<b>Saragolla</b>	119.063	5.453	17.132	0.458	5.400	29.180	16.300	4.940
	Dev. Standard							
<b>Tirex</b>	8.615	0.422	1.325	0.021	0.916	2.583	1.660	0.227
<b>Saragolla</b>	10.287	0.492	1.545	0.007	0.548	2.597	1.892	0.365

Saragolle è una cultivar a taglia alta, già nella fase di plantula si caratterizza per un maggiore vigore grazie ad una più rapida crescita degli organi epigei ed ipogei. Non sono state riscontrate differenze significative nella fenologia della parte epigea.



**Figura 7. Rappresentazione grafica dei risultati ottenuti con l'analisi di immagine delle radici seminali. Scansione in acqua delle radici seminali di una singola cariosside; dx: caratteristiche radicali. Confronto fra medie di Saragolle e Tirez per la lunghezza totale della radice (in alto a sinistra); il diametro medio (in alto a destra) e la superficie radicale totale (in basso)**

Le differenze principali si riscontrano sulla porzione epigea, il coleoptile che è 1.6 volte più lungo in Saragolle, mentre la lunghezza delle foglie è maggiore del 44%.



**Figura 8. Parametri epigei: confronto fra il valor medio pe la lunghezza della foglia (sinistra) e la lunghezza del coleoptile (cm)**

La maggiore lunghezza totale per Saragolle (+ 36%) non è da ascriversi alla maggiore lunghezza della radice primaria che differisce solo del 3% dalla radice primaria di Tirez, ma al contributo complessivo delle radici seminali. Il numero totale di radici seminali è risultato più alto in Saragolle (5.4) rispetto a Core (4.4), diametro della radice è leggermente ma significativamente superiore in Saragolle (+7%).

### Conclusioni

Le cultivar hanno evidenziato differenze significative nei parametri epigei ed ipogei già a livello di plantula. Saragolle complessivamente presenta un apparato radicale di maggiori dimensioni ed un maggiore vigore della plantula. In prospettiva queste caratteristiche potrebbero conferire alla cv una più efficiente nell'acquisizione delle risorse idriche e nutrizionali e/o capacità di competere con la flora infestante. La velocità di accrescimento della radice e quindi la profondità massima dell'apparato radicale presenta ridotte differenze fra cultivar. Questa caratteristica tuttavia deve essere validata su piante adulte.

La metodica di screening si è rivelata semplice e ripetibile. La tecnica necessita di ulteriori affinamenti per ridurre il numero di fallanze, legato sia allo spostamento delle cariossidi durante la crescita, che al danneggiamento della porzione epigea. Tali modifiche unitamente alla validazione dei tratti radicali in pieno campo, saranno oggetto delle attività di ricerca per i prossimi mesi.

## **Bibliografia citata**

André, F.; van Leeuwen, C.; Saussez, S.; Van Durmen, R.; Bogaert, P.; Moghadas, D.; de Ressaiguier, L.; Delvaux, B.; Vereecken, H.; Lambot, S. High-resolution imaging of a vineyard in south of France using ground-penetrating radar, electromagnetic induction and electrical resistivity tomography. *J. Appl. Geophys.* 2012, 78, 113–122.

Waines, J. G., & Ehdaie, B. (2007). Domestication and crop physiology: roots of green-revolution wheat. *Annals of Botany*, 100(5), 991-998.

Gioia, T., Nagel, K. A., Beleggia, R., Fragasso, M., Ficco, D. B. M., Pieruschka, R., ... & Papa, R. (2015). Impact of domestication on the phenotypic architecture of durum wheat under contrasting nitrogen fertilization. *Journal of Experimental Botany*, 66(18), 5519-5530.

Watt, M., Moosavi, S., Cunningham, S. C., Kirkegaard, J. A., Rebetzke, G. J., & Richards, R. A. (2013). A rapid, controlled-environment seedling root screen for wheat correlates well with rooting depths at vegetative, but not reproductive, stages at two field sites. *Annals of botany*, 112(2), 447-455