

MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE ALIMENTARI E FORESTALI

DECRETO 24 ottobre 2019

Istituzione del registro volontario e criteri di valutazione di varietà di grano turanico (*Triticum turgidum* subsp. *turanicum*).
(19A06993)

(GU n.265 del 12-11-2019)

IL CAPO DIPARTIMENTO
delle politiche europee ed internazionali
e dello sviluppo rurale

Vista la legge 25 novembre 1971, n. 1096, che disciplina l'attività sementiera e in particolare gli articoli 19 e 24 che prevedono l'istituzione obbligatoria, per ciascuna specie di coltura, dei registri di varietà aventi lo scopo di permettere l'identificazione delle varietà stesse;

Visto il decreto del Presidente della Repubblica 24 novembre 1972, pubblicato nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana n. 44 del 17 febbraio 1973, con il quale sono stati istituiti i registri di varietà di cereali, patata, specie oleaginose e da fibra;

Visto il decreto legislativo 30 marzo 2001, n. 165, relativo alle norme generali sull'ordinamento del lavoro alle dipendenze delle amministrazioni pubbliche, in particolare l'art. 4, commi 1 e 2 e l'art. 16, comma 1;

Visto il decreto legislativo 30 luglio 1999, n. 300, di riforma dell'organizzazione di governo a norma dell'art. 11 della legge 15 marzo 1997, n. 59;

Visto il decreto del Presidente del consiglio dei ministri 8 febbraio del 2019, n. 25, recante il regolamento di organizzazione del Ministero delle politiche agricole alimentari, forestali e del turismo, a norma dell'art. 1, comma 9, del decreto-legge 12 luglio 2018, n. 86, convertito, con modificazioni, dalla legge 9 agosto 2018, n. 97;

Visto il decreto del Ministro delle politiche agricole alimentari e forestali 7 marzo 2018, registrato alla Corte dei conti il 3 aprile 2018 al n. 191, con il quale sono stati individuati gli uffici dirigenziali non generali ai sensi del decreto del Presidente del consiglio dei ministri n. 143 del 17 luglio 2017;

Visto il decreto-legge 12 luglio 2018, n. 86, recante disposizioni urgenti in materia di riordino delle attribuzioni dei Ministeri dei beni e delle attività culturali e del turismo, delle politiche agricole alimentari e forestali e dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare, nonché in materia di famiglia e disabilità, convertito con modifiche dalla legge 9 agosto 2018, n. 97;

Visto la direttiva direttoriale 1° marzo 2019, n. 12032, registrata presso l'Ufficio centrale di bilancio di questo Ministero, con la quale è stata data attuazione agli obiettivi definiti dalla direttiva del Capo Dipartimento delle politiche europee ed internazionali e dello sviluppo rurale - DIPEISR, del 1° marzo 2019, n. 107, per l'attività amministrativa e per la gestione 2019;

Visto il decreto-legge 21 settembre 2019, n. 104, recante

Non siamo responsabili di eventuali imprecisioni o inesattezze contenute nel testo riportato, l'unico testo facente fede ai fini legali è quello pubblicato sulla versione cartacea della Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, ovvero della Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea.

Pagina 1 di 3

disposizioni urgenti per il trasferimento di funzioni e per la riorganizzazione dei Ministeri per i beni e le attività culturali, delle politiche agricole alimentari, forestali e del turismo, dello sviluppo economico, degli affari esteri e della cooperazione internazionale, delle infrastrutture e dei trasporti e dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare, nonché per la rimodulazione degli stanziamenti per la revisione dei ruoli e delle carriere e per i compensi per lavoro straordinario delle Forze di polizia e delle Forze armate e per la continuità delle funzioni dell'Autorità per le garanzie nelle comunicazioni;

Visto il decreto del Presidente della Repubblica del 22 maggio 2019 - registrato alla Corte dei conti il 20 giugno 2019, registro n. 749, con il quale al dott. Giuseppe Blasi è stato conferito l'incarico di Capo del Dipartimento delle politiche europee e internazionali e dello sviluppo rurale, nell'ambito del Ministero delle politiche agricole alimentari, forestali e del turismo;

Vista la nota del 4 settembre 2019, n. 9208, inerente lo svolgimento delle attività della Direzione generale dello sviluppo rurale e della Direzione generale per la promozione della qualità agroalimentare e dell'ippica, con la quale sono state impartite indicazioni al fine di assicurare la continuità amministrativa nelle more del perfezionamento degli incarichi dirigenziali, incaricando i capi Dipartimento, nell'ambito dei quali sono incardinate le Direzioni generali prive di direttore, di assicurare lo svolgimento dei compiti strumentali connessi all'organizzazione e alla gestione delle risorse strumentali, finanziarie e umane attribuite ai relativi Dipartimenti ai sensi dell'art. 5 del decreto legislativo n. 300/1999 e successive modificazioni ed integrazioni;

Considerato che il gruppo di lavoro permanente per la protezione delle piante, sezione sementi, di cui decreto ministeriale 30 giugno 2016, nella riunione del 30 settembre 2019 ha espresso parere favorevole all'istituzione del registro volontario del grano turanico e all'adozione dei criteri per la valutazione, ai fini dell'iscrizione nel registro nazionale, delle relative varietà;

Ritenuto di accogliere la proposta sopra menzionata;

Decreta:

Art. 1

1. È istituito il registro volontario grano turanico (*Triticum turgidum* subsp. *turanicum*) allo scopo di identificare le relative varietà. La procedura d'iscrizione al registro nazionale, di cui all'art. 19 della legge 25 novembre 1971, n. 1096, delle varietà di grano turanico è soggetta ai criteri di cui all'allegato al presente decreto.

Il presente decreto entrerà in vigore il giorno successivo a quello della sua pubblicazione nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana.

Roma, 24 ottobre 2019

Il Capo del Dipartimento: Blasi

Avvertenza:

Non siamo responsabili di eventuali imprecisioni o inesattezze contenute nel testo riportato, l'unico testo facente fede ai fini legali è quello pubblicato sulla versione cartacea della Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, ovvero della Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea.

Il presente atto non e' soggetto al visto di controllo preventivo di legittimita' da parte della Corte dei conti, art. 3, legge 14 gennaio 1994, n. 20, ne' alla registrazione da parte dell'Ufficio centrale del bilancio del Ministero dell'economia e delle finanze, art. 9 del decreto del Presidente della Repubblica n. 38/1998.

CRITERI E PROCEDURE TECNICHE PER L'ISCRIZIONE
AL REGISTRO NAZIONALE VOLONTARIO DI VARIETÀ
DI *TRITICUM TURGIDUM* SUBSP. *TURANICUM*

Il lavoro dei criteri e delle procedure per l'iscrizione di varietà di *Triticum turgidum* subsp. *turanicum* è stato predisposto in collaborazione tra il Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali di seguito Ministero, CREA-DC, Assosementi, Rete Semi Rurali e Oriana Porfiri in qualità d'esperto della specie.

1 PARTE GENERALE

1.1 Gestione delle prove

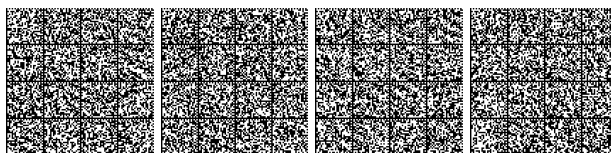
Il Centro di coordinamento, nominato dal Ministero, avvalendosi di un gruppo tecnico costituito dai rappresentanti delle Istituzioni che effettuano le prove, avrà il compito di:

- esaminare la documentazione tecnica fornita dal richiedente;
- proporre le località e le varietà testimoni per la prova agronomica;
- predisporre l'elaborazione finale dei risultati delle prove.

Le funzioni del Centro di coordinamento consistono in:

- ricevimento campioni di seme;
- validazione del ricevimento e idoneità del campione sul portale SIAN;
- reperimento campioni di seme di varietà di riferimento;
- preparazione degli schemi sperimentali;
- preparazione e invio dei campioni di seme per tutti gli organismi coinvolti nella realizzazione dell'attività sperimentale;
- effettuazione di sopralluoghi alle prove di campo;
- elaborazione statistica dei risultati;
- preparazione dei rapporti di prova per la riunione del Gruppo di lavoro permanente per la protezione delle piante - Sezione Sementi;
- inserimento dei risultati delle prove nel portale SIAN.

Il Centro di coordinamento potrà consultare i rappresentanti dei costitutori e delle ditte sementiere.



Per lo svolgimento delle prove descrittive si utilizzano i protocolli CPVO/UPOV in vigore. Poichè per la specie in esame non è disponibile un protocollo CPVO/UPOV le modalità di svolgimento delle prove descrittive sono riportate in allegato nel presente documento (allegato n. 2).

1.2 Questionario tecnico

Per una corretta impostazione delle prove, il Centro di coordinamento si avvale del questionario tecnico, che è compilato on-line dal richiedente (vedi nota¹) al momento della presentazione della domanda di iscrizione al registro, contenente genealogia, descrizione morfologica, caratteristiche agronomiche e qualitative, compresa la destinazione d'uso della varietà, modalità di selezione, mantenimento e riproduzione e le caratteristiche che la differenziano dalle altre varietà note più simili.

Il questionario tecnico è consultabile in italiano on-line sul sito del Ministero ed è riportato anche in allegato nel presente documento (allegato n. 1).

1.3 Tempi per la presentazione della domanda

La domanda per l'iscrizione della nuova varietà deve essere compilata on-line sul SIAN entro il:

<i>10 agosto</i>	<i>varietà a semina autunnale</i>
<i>30 novembre</i>	<i>varietà a semina primaverile</i>

1.4 Materiale da inviare al Centro di coordinamento

Il richiedente deve inviare al Centro di coordinamento entro il:

<i>20 agosto</i>	<i>semina autunnale</i>
<i>15 gennaio</i>	<i>semina primaverile</i>

il seguente materiale per ogni varietà:

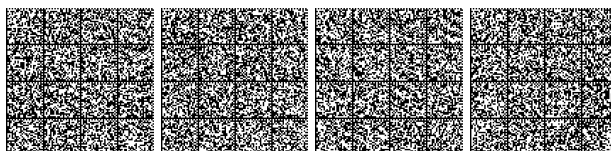
- a) 8 kg di semente.

Le sementi non devono essere sottoposte ad alcun trattamento. Eccezionalmente, nel caso di seme trattato il richiedente deve indicare prodotto commerciale impiegato, principio attivo, modalità d'impiego e allegare, anche inviando in modalità informatica al Centro di coordinamento, la scheda di sicurezza del formulato.

La semente deve avere le seguenti caratteristiche:

germinabilità 85%
purezza specifica 99%

¹ Nota 1. Per richiedente si intende: costituente della varietà o avente causa o rappresentante designato da uno di questi.



- b) Spighe 200 unità al 1° anno di prova ed eventualmente, su richiesta del Centro di coordinamento, anche al 2° anno di prova. L'invio del materiale per la prova descrittiva e per la prova agronomica e di utilizzazione della varietà candidata non pregiudica la sua possibile protezione.

1.5 Numero di località

La prova descrittiva viene realizzata in una località/anno.

La prova agronomica viene realizzata in 3 località/anno per il convenzionale e 4 località/anno per il biologico (centro-sud-isole).

1.6 Accertamenti speciali

Su richiesta esplicita del richiedente possono essere effettuati accertamenti speciali o analisi aggiuntive purché ritenuti ripetibili e significativi dal Centro di coordinamento d'intesa con il Ministero.

Nell'ambito della procedura on-line per la presentazione della domanda, il richiedente deve fornire adeguata documentazione tecnica contenente tutte le informazioni necessarie all'individuazione dei protocolli opportuni di rilevamento e validazione del carattere speciale.

Nel caso di accertamenti speciali volti a verificare particolari caratteristiche agronomiche o destinazioni d'uso la varietà candidata sarà confrontata con testimoni specifici.

1.7 Durata delle prove

Per le prove descrittiva e agronomica i rilievi vengono condotti in due stagioni di semina.

2. PROVA DESCRITTIVA

Scopo della prova descrittiva è l'identificazione della nuova varietà mediante l'accertamento dei requisiti di distinguibilità, omogeneità e stabilità.

La prova comprende allevamento in campo di parcelle del miscuglio cariossidi e di file spiga per il rilievo dei caratteri morfo-fisiologici e una caratterizzazione molecolare mediante l'utilizzo di microsatelliti. La caratterizzazione molecolare è complementare a quelle morfo-fisiologiche accertate in campo (allegato n. 5).



2.1 Condizioni della prova

La popolazione di ogni parcella e delle file-spiga deve rispettare le condizioni previste nella tabella 1.

TABELLA 1: numero di piante su cui effettuare i rilievi

<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>turanicum</i>		
Varietà (n° piante)	File spiga (n°)	Alternatività (n° piante)
1500	100	500

I caratteri che prevedono misurazioni devono essere effettuati su un numero minimo di 20 individui.

Di seguito vengono riportate le dimensioni indicative delle parcelle:

Miscuglio cariossidi in fila continua

Lunghezza	8,5 m
Larghezza	1,2 m
Distanza tra le file	0,18 m circa
n° di file	6
superficie	10 m ²

File-spiga

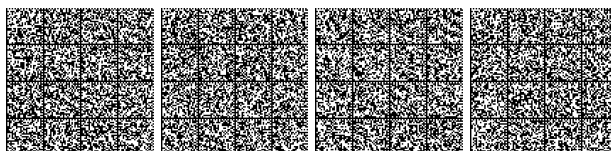
Lunghezza	1,5 m
Distanza tra le file	0,20 m circa
n° di file	100

Le tecniche colturali devono essere adeguate per un ottimale sviluppo delle piante al fine della migliore espressione dei caratteri.

2.2 Collezione di riferimento e scelta dei testimoni varietali

Il Centro di coordinamento deve disporre di una collezione di riferimento allo scopo di valutare la distinguibilità della varietà in prova rispetto a quelle note.

La collezione è costituita da materiale di propagazione, scheda descrittiva e possibilmente da una riproduzione fotografica e da un database contenente i dati morfofisiologici delle varietà.



La collezione comprende almeno le varietà iscritte o protette a livello comunitario e possono essere incluse anche varietà che sono state iscritte o protette in passato o, in casi specifici, comunque conosciute.

Nell'ambito della collezione di riferimento vengono identificati i testimoni da utilizzare per l'accertamento della distinguibilità.

Il raggruppamento delle varietà in prova va effettuato sulla base delle informazioni fornite dal richiedente attraverso il questionario tecnico come indicato nella tabella 2.

Le varietà da utilizzare come testimoni saranno quelle che vengono considerate più simili in rapporto a tale confronto.

Nella scelta viene tenuta presente anche l'origine genetica della varietà in prova.

TABELLA 2		Caratteri	
Specie		Descrizione	
<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>turanicum</i>	1	Seme: colorazione al fenolo	
	20	Gluma inferiore: pubescenza della superficie esterna	
	21	Paglia: pienezza in sezione trasversale	
	22	Ariste: colore	
	24	Spiga: colore (a maturazione)	
	28	Seme: forma	
	29	Seme: gibbosità	
	30	Tipo di sviluppo	

2.3 Valutazione della distinguibilità

Una varietà è considerata distinta se si differenzia chiaramente per uno o più caratteri morfologici da tutte le altre varietà di cui è nota l'esistenza al momento della domanda di iscrizione. I caratteri che consentono di verificare la distinguibilità della varietà sono quelli riportati nella scheda descrittiva.

2.3.1 Caratteri qualitativi

Nel caso di caratteri qualitativi ovvero non misurabili quantitativamente, due varietà sono considerate distinte quando uno o più caratteri hanno differente stato di espressione.

2.3.2 Caratteri quantitativi

Nel caso di caratteri che mostrano una scala continua di espressione, sia che questa possa essere osservata o in altri casi misurata, due varietà sono considerate differenti se l'espressione del carattere differisce di almeno uno stato di espressione.



2.4 Valutazione dell'omogeneità

L'uniformità è valutata tramite l'osservazione delle piante fuori tipo rilevate in:

- a) parcella (tabella 3.1);
- b) mediante rilevazioni di laboratorio dei microcaratteri morfologici su un campione predefinito di piante o parti di esse (tabella 3.2);
- c) nelle file-spiga (tabella 3.3) con l'individuazione delle piante o file-spiga "fuori-tipo".

Il giudizio viene, quindi, espresso sulla prova in parcella, sulle file-spiga e sui caratteri e/o microcaratteri dove sono previste prove di laboratorio (ad esempio colorazione al fenolo, pubescenza della cavità ventrale, ecc).

Per la valutazione in parcella le soglie sono indicate nella tabella 3.1. I caratteri che devono essere osservati su un campione di 1500 piante sono indicati con "B" nella scheda descrittiva (allegato n. 2).

Le osservazioni dei caratteri indicati con "A" nella scheda descrittiva sono effettuate su almeno 100 individui. Per questi caratteri (ad eccezione dei caratteri 1 e 27), contrassegnati con "A", si procede alla valutazione dell'omogeneità in due fasi. Inizialmente si rileva il carattere su 20 individui, se non si osservano fuori tipo la varietà è dichiarata, per quel carattere, uniforme. Se, invece, sono osservati più di 3 fuori tipo, la varietà è dichiarata non omogenea. Se, infine, il numero di fuori tipo è compreso fra 1 e 3 dovranno essere osservati altri 80 individui.

Una fila-spiga è considerata fuori tipo se vi è più di una pianta fuori tipo all'interno di quella fila spiga.

La varietà viene considerata omogenea se il numero di fuori tipo risulta inferiore o uguale alla soglia stabilita.

Nel caso di caratteri a bassa ereditabilità (fortemente influenzati dall'ambiente) l'individuazione di fuori tipo verrà effettuata tenendo conto della variabilità fenotipica osservata entro la varietà candidata.

Le soglie sono riportate nelle tabelle seguenti:

TABELLA 3.1 Omogeneità caratteri in parcella e in laboratorio (caratteri "B")

GIUDIZIO NEGATIVO SE IL TOTALE DEI FUORI-TIPO È SUPERIORE A:	
N° PIANTE	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>turanicum</i> Pop.st. 0,5% Prob $\geq 95\%$
750	7
1000	9
1500	12

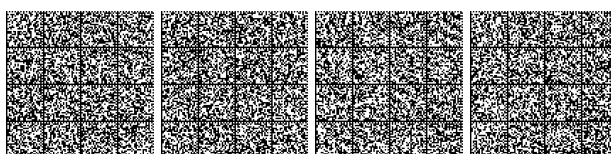


TABELLA 3.2 Omogeneità caratteri in parcella e in laboratorio (caratteri "A")

GIUDIZIO NEGATIVO SE IL TOTALE DEI FUORI-TIPO E' SUPERIORE A:	
N°PIANTE ESAMINATE	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>turanicum</i> Per i caratteri indicati con "A" Pop.st. 2,0% prob. ≥ 95
1-2	0
3-18	1
19-41	2
42-69	3
70-99	4
100-131	5

TABELLA 3.3 Omogeneità caratteri file-spiga

GIUDIZIO NEGATIVO SE IL TOTALE DEI FUORI-TIPO E' SUPERIORE A:	
N° FILE-SPIGA	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>turanicum</i> Pop.st. 2,0% Prob $\geq 95\%$
1-2	0
3-18	1
19-41	2
42-69	3
70-99	4
100-131	5

2.5 Valutazione della stabilità

Una varietà è stabile se è conforme alla definizione dei suoi caratteri essenziali a seguito di riproduzioni o moltiplicazioni successive. Il requisito di stabilità è dato per acquisito laddove è accertato il requisito di omogeneità.



2.6 Scheda descrittiva

La scheda descrittiva è consultabile in italiano on-line sul sito del Ministero.

Per la specie non è disponibile un protocollo CPVO/UPOV, la scheda descrittiva e le modalità di svolgimento della prova descrittiva sono riportate in allegato nel presente documento (allegato n. 2).

3. PROVA PER LA VALUTAZIONE AGRONOMICA

Scopo della prova agronomica è quello di valutare per ciascuna varietà le caratteristiche agronomiche, resistenza agli stress biotici e abiotici, le potenzialità produttive e l'adattabilità agli areali di coltivazione.

Le prove verranno realizzate come riportato in allegato nel presente documento (allegato n. 3).

3.1 Prova qualitativa

Scopo della prova qualitativa è la valutazione della destinazione d'uso indicata per la varietà dal richiedente nel questionario tecnico. Verranno realizzate sul prodotto delle tre località/anno (allegato n. 3).

3.2 Testimoni varietali: criteri di scelta

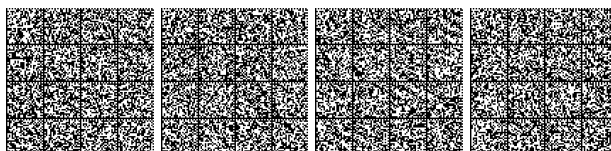
La varietà in iscrizione dovrà essere confrontata con le migliori varietà commerciali appartenenti alla medesima tipologia varietale e di utilizzazione. Il confronto dovrà seguire il principio di specificità del testimone avvalendosi delle informazioni fornite dal richiedente nel questionario tecnico. I testimoni varietali dovranno essere periodicamente aggiornati in funzione dei progressi della selezione e dell'evoluzione delle tipologie varietali.

3.3 Località: criteri di scelta

Le località di prova dovranno essere individuate in tre areali: centro, sud ed isole.

3.3 Valutazione dei risultati

I criteri per la valutazione del valore agronomico e di utilizzazione sono riportati in allegato 3.



4. RAPPORTI CON IL RICHIEDENTE

Nel caso dovessero insorgere problemi nel corso delle prove il Centro di Coordinamento informa il richiedente in tempo utile affinché possa prendere atto delle relative problematiche.

Al termine del primo anno di prove ufficiali, i dati provvisori rilevati sulle nuove varietà verranno messi a disposizione del richiedente interessato.

Al termine del secondo anno di prove ufficiali, i dati finali rilevati sulle nuove varietà verranno messi a disposizione del richiedente interessato dopo le valutazioni della Commissione Sementi.

5. COSTI DELLE PROVE

I costi delle prove effettuate secondo le modalità previste nel presente protocollo sono riportati in allegato nel presente documento (allegato n. 6).

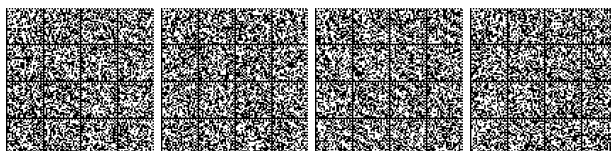
Eventuali accertamenti speciali effettuati ai sensi del punto 1.6 saranno definiti in termini di costi dal Centro di coordinamento d'intesa con il MiPAAFT.



Allegato 1

QUESTIONARIO TECNICO	
1.	SPECIE: FRUMENTO TURANICO o FRUMENTO KHORASAN – <i>Triticum turgidum</i> L. ssp. <i>turanicum</i> (Jakubz) A. Löve & D. Löve
2.	RICHIEDENTE – indicare se diverso dal costituente: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	Nome: _____
	Indirizzo: _____
	N° tel.: _____ N° fax: _____ e-mail: _____
3.	DENOMINAZIONE PROPOSTA O RIFERIMENTO DEL COSTITUTTORE:

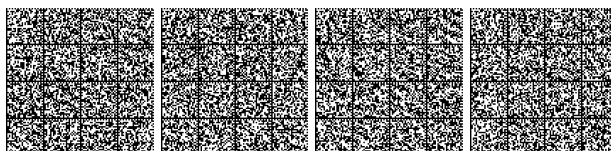
	La denominazione è: un codice (C) <input type="checkbox"/> o un nome di fantasia (F) <input type="checkbox"/>
	La denominazione è: provvisoria <input type="checkbox"/> definitiva <input type="checkbox"/>
4.	GENEALOGIA ED INFORMAZIONI SULLE MODALITÀ DI SELEZIONE, MANTENIMENTO E RIPRODUZIONE DELLA VARIETÀ:
4.1	Origine
	a) incrocio (indicare varietà parentali) <input type="checkbox"/>
	b) mutazione (indicare varietà parentale) <input type="checkbox"/>
	c) ritrovamento (specificare dove, quando e come è stata sviluppata) <input type="checkbox"/>
	d) altro (specificare) <input type="checkbox"/>
4.2	Metodo di propagazione
	a) seme <input type="checkbox"/>
	b) altro (specificare) <input type="checkbox"/>
4.3	Altre informazioni Nel caso di varietà la cui propagazione avviene per mezzo del seme, indicare il metodo di produzione:
	a) varietà prevalentemente autogame <input type="checkbox"/>
	b) varietà prevalentemente allogame (specificare) <input type="checkbox"/>
4.4	Origine geografica della varietà: nel caso di varietà che hanno come origine mutazione/ritrovamento o altro, indicare la regione e il Paese in cui la varietà è stata scoperta e sviluppata



4.5	Le informazioni relative ai componenti delle varietà ibride devono essere fornite compilando il documento Mod.RNV.QT.CONF.09.					
5.	CARATTERISTICHE VARIETALI DA INDICARE (i numeri tra parentesi sono riferiti ai caratteri indicati nella scheda descrittiva; indicare con una croce un solo livello di espressione per ciascun carattere)					
	N° nazionale	CPVO	UPOV	Stadio, Metodo	Caratteri: descrizione e classificazione	Varietà di riferimento
5.1	1.			92	Seme: colorazione al fenolo	
				A; VG	1	nulla o molto lieve <input type="checkbox"/>
					3	lieve <input type="checkbox"/>
					5	media <input type="checkbox"/>
					7	forte <input type="checkbox"/>
					9	molto forte <input type="checkbox"/>
5.2	20.			80-92	Gluma inferiore: pubescenza della superficie esterna (spighetta del terzo mediano della spiga)	
				A; VG	1	assente <input type="checkbox"/>
					9	presente <input type="checkbox"/>
5.3	21.			90-92	Paglia: pienezza in sezione trasversale (a metà tra la base della spiga e l'ultimo nodo)	
				A; VG	3	sottile <input type="checkbox"/>
					5	media <input type="checkbox"/>
					7	spessa <input type="checkbox"/>
5.4	22.			90-92	Ariste: colore	
				B; VG	1	biancastro <input type="checkbox"/>
					2	bruno chiaro <input type="checkbox"/>
					3	bruno <input type="checkbox"/>
					4	nero <input type="checkbox"/>
5.5	24.			90-92	Spiga: colore (a maturazione)	
				B; VG	1	bianca <input type="checkbox"/>
					2	leggermente colorata <input type="checkbox"/>
					3	fortemente colorata <input type="checkbox"/>
5.6	28.			92	Seme: forma	
				A; VG	3	ovoidale <input type="checkbox"/>
					5	semi allungato <input type="checkbox"/>
					7	allungato <input type="checkbox"/>
5.7	29.			92	Seme: gibbosità	
				A; VG	1	assente <input type="checkbox"/>
					9	presente <input type="checkbox"/>



5.8	30.		-	Tipo di sviluppo		
			B; VG	1	invernale	<input type="checkbox"/>
				2	alternativo	<input type="checkbox"/>
				3	primaverile	<input type="checkbox"/>
6.	VARIETÀ SIMILI E VARIETÀ CANDIDATA – CARATTERI DISTINTIVI (con riferimento all'elenco dei caratteri ed alla classificazione riportata nella scheda descrittiva)					
	Denominazione varietà simile	Carattere in cui la varietà simile è differente	Classe di espressione della varietà simile	Classe di espressione della varietà candidata		
	(1) In caso di identici stati di espressione delle varietà, indicare l'intensità della differenza.					
7.	INFORMAZIONI COMPLEMENTARI PER LA DETERMINAZIONE DEI CARATTERI DISTINTIVI DELLA VARIETÀ					
7.1	Resistenza a parassiti ed alle malattie					
7.2	Eventuali indicazioni particolari per l'esame della varietà.					
7.3	Conduzione della prova agronomica anche in biologico: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>					
7.4	Altre informazioni utili per l'identificazione della varietà					
8.	LA VARIETÀ È DA CONSIDERARSI UN ORGANISMO GENETICAMENTE MODIFICATO COSÌ COME DEFINITO DALL'ARTICOLO 2 DELLA DIR. 2001/18/CE E SUCCESSIVE MODIFICHE? SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>					
	In caso affermativo specificare gli estremi della decisione comunitaria cui il relativo evento fa riferimento ed allegare copia della dichiarazione scritta dell'Autorità responsabile che attesti che l'esame tecnico della varietà nel rispetto degli artt. 55 e 56 del regolamento Base non espone a rischi per l'ambiente in accordo alle norme della direttiva sopra citata.					



9.	LA VARIETÀ È DESTINATA A ESSERE IMPIEGATA COME ALIMENTO RICADENTE NEL CAMPO DI APPLICAZIONE DEL REG. CE 1829/2003 E SUCCESSIVE MODIFICHE?						
	SI <input type="checkbox"/>		NO <input type="checkbox"/>				
	In caso affermativo specificare gli estremi della decisione comunitaria cui il relativo evento fa riferimento.						
10.	AREALE DI COLTIVAZIONE SUGGERITO – è possibile indicare più di un ambiente						
	Centro <input type="checkbox"/>	Sud <input type="checkbox"/>	Isole <input type="checkbox"/>	Altro <input type="checkbox"/>	specificare		
11.	DESTINAZIONE D'USO DEL PRODOTTO:						
	PASTIFICAZIONE <input type="checkbox"/>	PANIFICAZIONE <input type="checkbox"/>		ALTRO <input type="checkbox"/> (specificare)			
	Luogo e data			Nome, cognome e qualifica del Richiedente - Firma e Timbro			



Allegato 2

SCHEDA DESCRITTIVA

Nome scientifico della specie:	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>turanicum</i>
Denominazione varietale:	
Costitutore:	
Responsabile conservazione in purezza:	
Rappresentante in Italia:	
Sigla rappresentativa della varietà all'iscrizione:	
Codice SIAN:	
Anno d'iscrizione al registro nazionale italiano:	
Ente che ha effettuato la prova di iscrizione:	
Località di svolgimento della prova:	
Periodo della prova:	
Data e riferimento documento CPVO:	

N° nazionale			Stadio, Metodo	Caratteri: descrizione e classificazione	Varietà di riferimento
--------------	--	--	----------------	--	------------------------

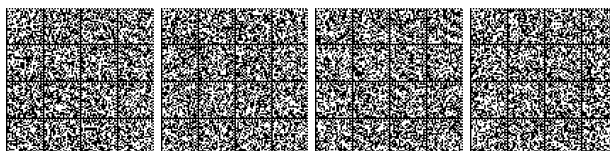
1.			00	Seme: colorazione al fenolo	
+			A; VG	1	assente o molto lieve <input type="checkbox"/>
			QN	3	lieve <input type="checkbox"/>
				5	media <input type="checkbox"/>
				7	forte <input type="checkbox"/>
				9	molto forte <input type="checkbox"/>
2.			09-11	Coleoptile: colorazione antocianica	
+			A; VG	1	assente o molto debole <input type="checkbox"/>
			QN	3	debole <input type="checkbox"/>
				5	media <input type="checkbox"/>
				7	forte <input type="checkbox"/>
				9	molto forte <input type="checkbox"/>
3.			25-29	Pianta: portamento	
+			B; VG	1	eretto <input type="checkbox"/>
			QN	3	semi-eretto <input type="checkbox"/>



N° nazionale		Stadio, Metodo	Caratteri: descrizione e classificazione	Varietà di riferimento
			5 intermedio	<input type="checkbox"/>
			7 semi-prostrato	<input type="checkbox"/>
			9 prostrato	<input type="checkbox"/>
4.		50-51	Pianta: frequenza di piante con la foglia a bandiera ricurva	
+		B; VG	1 nulla o molto bassa	<input type="checkbox"/>
		QN	3 bassa	<input type="checkbox"/>
			5 media	<input type="checkbox"/>
			7 alta	<input type="checkbox"/>
			9 molto alta	<input type="checkbox"/>
5.		50-51	Epoca di emergenza della spiga (prima spighetta visibile sulle spighe del 50% delle piante) Indicare la data della varietà e di due varietà note	
		B; MG	1 molto precoce	<input type="checkbox"/>
		QN	3 precoce	<input type="checkbox"/>
			5 media	<input type="checkbox"/>
			7 tardiva	<input type="checkbox"/>
			9 molto forte	<input type="checkbox"/>
6.		55-69	Foglia a bandiera: colorazione antocianica delle auricole	
		B; VG	1 assente o molto debole	<input type="checkbox"/>
		QN	3 debole	<input type="checkbox"/>
			5 media	<input type="checkbox"/>
			7 forte	<input type="checkbox"/>
			9 molto forte	<input type="checkbox"/>
7.		55-65	Foglia a bandiera: glaucescenza della guaina	
		B; VG	1 assente o molto debole	<input type="checkbox"/>
		QN	3 debole	<input type="checkbox"/>
			5 media	<input type="checkbox"/>
			7 forte	<input type="checkbox"/>
			9 molto forte	<input type="checkbox"/>
8.		55-65	Foglia a bandiera: glaucescenza del lembo (pagina inferiore)	
		B; VG	1 assente o molto debole	<input type="checkbox"/>
		QN	3 debole	<input type="checkbox"/>
			5 media	<input type="checkbox"/>
			7 forte	<input type="checkbox"/>
			9 molto forte	<input type="checkbox"/>



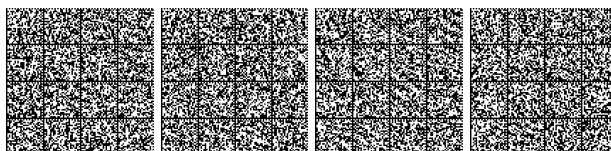
N° nazionale		Stadio, Metodo	Caratteri: descrizione e classificazione	Varietà di riferimento
9.		55-69	Culmo: pubescenza del nodo superiore	
+		B; VG	1 assente o molto debole	<input type="checkbox"/>
		QN	3 debole	<input type="checkbox"/>
			5 media	<input type="checkbox"/>
			7 forte	<input type="checkbox"/>
			9 molto forte	<input type="checkbox"/>
10.		60-69	Culmo: glaucescenza del culmo fra la foglia bandiera e la base della spiga	
		B; VG	1 assente o molto debole	<input type="checkbox"/>
		QN	3 debole	<input type="checkbox"/>
			5 media	<input type="checkbox"/>
			7 forte	<input type="checkbox"/>
			9 molto forte	<input type="checkbox"/>
11.		60-69	Spiga: glaucescenza	
		B; VG	1 assente o molto debole	<input type="checkbox"/>
		QN	3 debole	<input type="checkbox"/>
			5 media	<input type="checkbox"/>
			7 forte	<input type="checkbox"/>
			9 molto forte	<input type="checkbox"/>
12.		75-92	Pianta: altezza (compresa spiga e ariste) Indicare l'altezza in cm della varietà e di due varietà note	
		B; MG	1 molto bassa	<input type="checkbox"/>
		QN	3 bassa	<input type="checkbox"/>
			5 media	<input type="checkbox"/>
			7 alta	<input type="checkbox"/>
			9 molto alta	<input type="checkbox"/>
13.		75-92	Ariste all'apice della spiga: lunghezza rispetto alla spiga	
		B; VG	1 piu' corte	<input type="checkbox"/>
		QN	2 uguali	<input type="checkbox"/>
			3 piu' lunghe	<input type="checkbox"/>
14.		60-69	Spiga: pigmentazione antocianica delle antere	
		B-VG	1 assente o molto debole	<input type="checkbox"/>
		QN	3 debole	<input type="checkbox"/>
			5 media	<input type="checkbox"/>
			7 forte	<input type="checkbox"/>



N° nazionale		Stadio, Metodo	Caratteri: descrizione e classificazione	Varietà di riferimento
			9 molto forte	<input type="checkbox"/>
15.		80-92	Gluma inferiore: forma (spighetta del terzo mediano della spiga)	
		A; VG	1 ovoidale	<input type="checkbox"/>
		PQ	2 media oblunga	<input type="checkbox"/>
			3 stretta oblunga	<input type="checkbox"/>
16.		80-92	Gluma inferiore: forma della spalla (spighetta del terzo mediano della spiga)	
+		A; VG	1 inclinata	<input type="checkbox"/>
		PQ	2 arrotondata	<input type="checkbox"/>
			3 diritta	<input type="checkbox"/>
			4 elevata	<input type="checkbox"/>
			5 elevata con presenza di un 2° becco	<input type="checkbox"/>
17.		80-92	Gluma inferiore: larghezza della spalla (spighetta del terzo mediano della spiga)	
+		A; VG	1 molto stretta	<input type="checkbox"/>
			3 stretta	<input type="checkbox"/>
		QN	5 media	<input type="checkbox"/>
			7 larga	<input type="checkbox"/>
			9 molto larga	<input type="checkbox"/>
18.		80-92	Gluma inferiore: lunghezza del mucrone (spighetta del terzo mediano della spiga)	
		A; VG	1 molto corto	<input type="checkbox"/>
		QN	3 corto	<input type="checkbox"/>
			5 medio	<input type="checkbox"/>
			7 lungo	<input type="checkbox"/>
			9 molto lungo	<input type="checkbox"/>
19.		80-92	Gluma inferiore: curvatura del mucrone (spighetta del terzo mediano della spiga)	
+		A; VG	1 assente	<input type="checkbox"/>
		QN	3 debole	<input type="checkbox"/>
			5 moderata	<input type="checkbox"/>
			7 forte	<input type="checkbox"/>
			9 molto forte	<input type="checkbox"/>
20.		80-92	Gluma inferiore: pubescenza della superficie esterna (spighetta del terzo mediano della spiga)	
		A; VG	1 assente	<input type="checkbox"/>
		QL	9 presente	<input type="checkbox"/>
21.		90-92	Paglia: pienezza in sezione trasversale (a metà tra la base della spiga e l'ultimo nodo)	
+		A; VG	3 sottile	<input type="checkbox"/>



N° nazionale		Stadio, Metodo	Caratteri: descrizione e classificazione		Varietà di riferimento
		QN	5	media	<input type="checkbox"/>
			7	spessa	<input type="checkbox"/>
22.		90-92	Ariste: colore		
		B; VG	1	bianco	<input type="checkbox"/>
		PQ	2	bruno chiaro	<input type="checkbox"/>
			3	viola medio	<input type="checkbox"/>
			4	viola scuro	<input type="checkbox"/>
23.		90-92	Spiga: lunghezza (ariste escluse)		
		A; MS	3	corta	<input type="checkbox"/>
		QN	5	media	<input type="checkbox"/>
			7	lunga	<input type="checkbox"/>
24.		90-92	Spiga: colore (a maturazione)		
		B; VG	1	bianca	<input type="checkbox"/>
		PQ	2	leggermente colorata	<input type="checkbox"/>
			3	fortemente colorata	<input type="checkbox"/>
25.		90-92	Spiga: forma		
		B; VG	1	piramidale	<input type="checkbox"/>
		PQ	2	a bordi paralleli	<input type="checkbox"/>
			3	semi-clavata	<input type="checkbox"/>
			4	clavata	<input type="checkbox"/>
			5	fusiforme	<input type="checkbox"/>
26.		92	Spiga: densità		
		A; VG/MS	3	lassa	<input type="checkbox"/>
		QN	5	media	<input type="checkbox"/>
			7	compatta	<input type="checkbox"/>
27.		92	Seme: lunghezza dei peli all'estremità (in vista dorsale)		
+		A; VG	1	corti	<input type="checkbox"/>
		QN	3	medi	<input type="checkbox"/>
			5	lunghi	<input type="checkbox"/>
28.		92	Seme: forma		
+		A; MS/VG	3	leggermente allungato	<input type="checkbox"/>
		QN	5	moderatamente allungato	<input type="checkbox"/>
			7	fortemente allungato	<input type="checkbox"/>

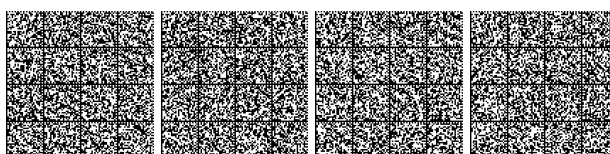


N° nazionale		Stadio, Metodo	Caratteri: descrizione e classificazione		Varietà di riferimento
29		92	Seme: gibbosità		
		A; VG	1	assente	<input type="checkbox"/>
		QN	2	presente	<input type="checkbox"/>
30		-	Tipo di sviluppo		
		B; VG	1	invernale	<input type="checkbox"/>
		PQ	2	alternativo	<input type="checkbox"/>
			3	primaverile	<input type="checkbox"/>

Legenda:

- A esame compiuto su di un campione di almeno 100 piante per l'accertamento dell'omogeneità
- B esame compiuto su di un campione di almeno 1500 piante in un plot per l'accertamento dell'omogeneità
- G misurazioni/osservazioni effettuate su gruppi di piante
- MG misurazione singola effettuata su di un gruppo di piante o su parti di esse per l'accertamento della distinguibilità
- MS misurazione effettuata su di un numero di piante individuali o su parti di esse per l'accertamento della distinguibilità
- VG valutazione visiva ottenuta tramite singola osservazione di un gruppo di piante o di parti di esse per l'accertamento della distinguibilità
- VS valutazione visiva ottenuta tramite osservazione di piante individuali o di parti di esse per l'accertamento della distinguibilità
- + vedi Metodologie per effettuare i rilievi

I numeri presenti nella colonna "Stadio, Metodo" si riferiscono agli stadi ottimali in cui valutare il carattere. Consultare la tabella relativa ai codici di crescita (Mod.RNV.COD.CER.09).



Metodologie per effettuare i rilievi

Carattere 1: seme: colorazione al fenolo

Protocollo per la determinazione della reazione al fenolo

Numero di semi per prova	100 semi, non trattati con prodotti chimici.
Attrezzature previste	Capsule Petri (diametro 9 cm).
Preparazione dei semi	Imbibire con acqua per 16-20 ore; eliminare l'acqua superficiale; posizionare i semi con il solco ventrale rivolto verso il basso e coprire la capsula Petri con il coperchio.
Concentrazione della soluzione utilizzata	Soluzione al fenolo 1%, preparata al momento dell'utilizzo.
Quantità di soluzione da utilizzarsi	I semi devono risultare coperti per 3/4
Ambiente in cui operare	Laboratorio
Luce	Luce naturale, non luce solare diretta.
Temperatura	18-20°C
Momento di valutazione	4 ore (dopo l'aggiunta della soluzione)
Scala di valutazione	Vedere stadi di espressione del carattere 25.
Note	Si dovrebbe includere almeno una varietà testimone come controllo

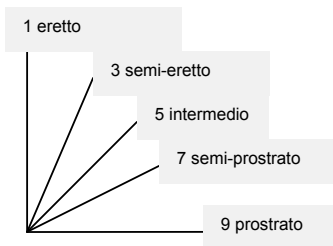
Carattere 2: Coleoptile: colorazione antocianica

Protocollo per la determinazione della colorazione antocianica

Numero di semi per prova	100 semi
Preparazione dei semi	Posizionare i semi non dormienti su carta da filtro inumidita, coperti da capsula Petri
Ambiente in cui operare	Laboratorio o serra
Luce	In seguito ad una crescita pari a 1 cm raggiunta dal coleoptile al buio, posizionare alla luce artificiale (o diurna) a 15.000 lux per 3-4 giorni
Temperatura	15-20°C
Momento di valutazione	Coleoptili completamente sviluppati (circa 1 settimana) allo stadio 09-11
Scala di valutazione	Vedere stadi di espressione del carattere 1.
Note	Si dovrebbero includere almeno due varietà testimone come controllo, in caso di test per la distinguibilità



Carattere 3: Pianta: portamento

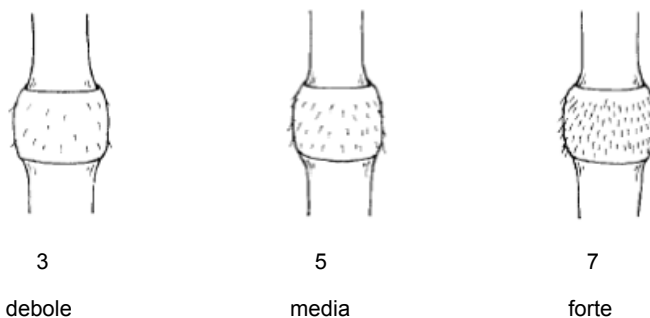


Il portamento delle piante dovrebbe essere valutato guardando il portamento delle foglie e dei culmi di accestimento, utilizzando l'angolo formato dalle foglie più esterne ed i culmi di accestimento con un immaginario asse verticale.

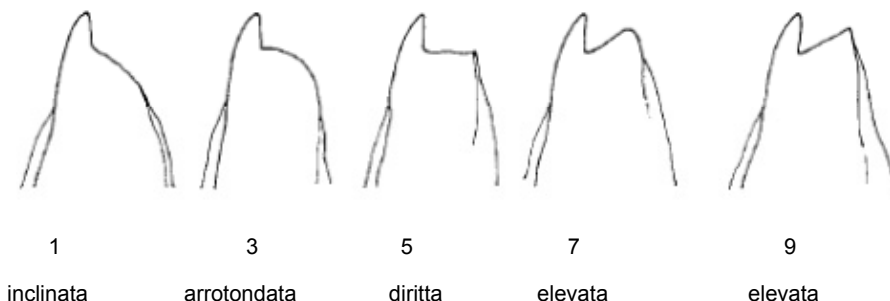
Carattere 4: Pianta: frequenza di piante con foglie a bandiera ricurva

- 1 tutte le foglie a bandiera sono diritte
- 3 circa 1/4 delle piante presenta foglia a bandiera ricurva
- 5 circa 1/2 delle piante presenta foglia a bandiera ricurva
- 7 circa 3/4 delle piante presenta foglia a bandiera ricurva
- 9 tutte le foglie a bandiera sono ricurve

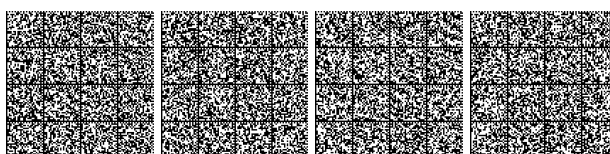
Carattere 9: Culmo: pubescenza del nodo superiore



Carattere 16: Gluma inferiore: forma della spalla (spighetta del terzo mediano della spiga)



con presenza di un 2° becco



Carattere 17: Gluma inferiore: larghezza della spalla (spighetta del terzo mediano della spiga)



3
stretta



5
media



7
larga

Carattere 19: Gluma inferiore: curvatura del mucrone (spighetta del terzo mediano della spiga)



1
diritto



2
leggermente arcuato



3
mediamente arcuato

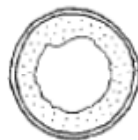


4
fortemente arcuato

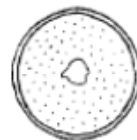
Carattere 21: Paglia: pienezza in sezione trasversale (a metà tra la base della spiga e l'ultimo nodo)



3
sottile



5
media



7
spessa

Carattere 27: Seme: lunghezza dei peli all'estremità (in vista dorsale)



3
corti



5
medi



7
lunghi



Carattere 28: Seme: forma



3

ovoide



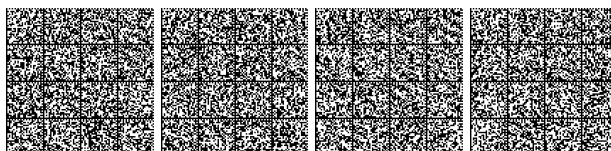
5

semi-allungato



7

allungato



Allegato 3**METODOLOGIA PER L'ESECUZIONE DELLA PROVA AGRONOMICA E QUALITATIVA****Numero di prove**

I campi verranno realizzati, annualmente, in 3 località distribuite nel centro, sud e isole. Le analisi qualitative, se richieste dal richiedente, verranno condotte annualmente per ogni località.

Varietà testimoni

I testimoni dovranno essere rappresentati da almeno una varietà scelta tra le più certificate e potranno essere rivisti periodicamente, con l'accortezza di garantire alle varietà in iscrizione il confronto per un biennio con gli stessi testimoni. In fase di prima applicazione del protocollo le varietà testimoni saranno scelte tra le più conosciute o presenti nella collezione del CREA-DC.

Metodologia sperimentale

in convezionale: per le prove agronomiche verrà utilizzato uno schema sperimentale a blocchi randomizzati, con almeno tre repliche e parcelle di 10m², seminate con seminatrici parcellari. La dose di semina per ogni varietà verrà determinata sulla base della germinabilità e del peso dei 1000 semi, in modo tale da garantire un investimento di semina di 200-250 semi germinabili per m². In ogni località di prova verrà adottata la migliore tecnica colturale in uso nell'areale applicando zero input di fertilizzanti.

in biologico: le prove verranno realizzate in aziende biologiche certificate. Verrà utilizzato uno schema sperimentale a blocchi randomizzati, con almeno tre repliche e parcelle di 10m², seminate con seminatrici parcellari. La dose di semina per ogni varietà verrà determinata sulla base della germinabilità e del peso dei 1000 semi, in modo tale da garantire un investimento di semina di 250 semi germinabili per m². In ogni località di prova verrà adottata la migliore tecnica colturale in uso nell'areale applicando bassi input di fertilizzanti.



Durante il ciclo colturale e sul seme raccolto verranno effettuati i seguenti rilievi:

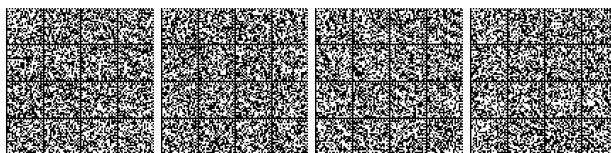
- Data di spigatura (giorni di differenza dal 1° aprile) (giorni);
- Altezza della pianta alla fioritura compresa spiga (cm);
- Allettamento alla raccolta: espressa con scala 0-9
- Danni da freddo: espressa con scala 0-9;
- Oidio: espressa con scala 0-9;
- Septoria: espressa con scala 0-9;
- Ruggine gialla: espressa con scala 0-9;
- Ruggine bruna: espressa con scala 0-9;
- Peso parcella (kg);
- Umidità alla raccolta (%);
- Peso ettolitrico (kg/hl);
- Peso 1000 semi (g)

Legenda: 0= assenza di danno; 9= danno massimo (da Corino et al. 1976).

La resistenza al freddo, oltre che dalle prove di campo, verrà pure valutata attraverso prove di laboratorio, seguendo la metodologia descritta da Borghi et al. (1986).

La valutazione della resistenza alle malattie fungine, oltre all'osservazione sulle avversità presenti in campo, verrà valutata, solo dietro richiesta dal richiedente, nell'ambito delle prove epidemiologiche di laboratorio, con infezione artificiale, allo stadio di plantula, con isolati diversi di ruggini ed oidio, secondo quanto descritto da Pasquini (1990).

La qualità tecnologica di ogni genotipo verrà determinata sul campione complesso derivante dalla miscela delle tre repliche di ogni località. In caso di richiesta di pastificazione sulla granella verranno determinati: il peso ettolitrico (metodo UNI EN ISO 7971 parte 1,2,3 -2009-), il peso dei 1000 semi (metodo ISO 520 oppure UNI 10266) ed il tasso in ceneri (metodo UNI EN ISO 2171 -2010-). Dopo la molitura verranno determinati sulla semola: il contenuto proteico (metodo Kjeldhal: ISO 20483 -2006- o metodo Dumas UNI CEN ISO/TS 16634 parte 2 -2009-), l'indice di glutine (metodo UNI 10690) gli indici di giallo e di bruno (determinati con il metodo colorimetrico a riflessione UNI CEN/TS 15465-2008-), l'alveogramma (metodo UNI 10453) e la pastificazione sperimentale con relativa prova di cottura (metodo D'Egidio et al., 1993). Nel caso la destinazione d'uso sia la panificazione e/o prodotti da forno sulla granella verranno determinati: il peso ettolitrico (metodo UNI EN ISO 7971 parte 1,2,3 -2009-), il peso dei 1000 semi (metodo ISO 520 oppure UNI 10266) e la durezza del seme (metodo AACC 39-70A). La macinazione verrà effettuata dopo condizionamento differenziato in funzione della durezza del seme come descritto da Corbellini et al. (1998). Sulla farina verranno determinati il contenuto proteico (metodo AACC 39-11 oppure Kjeldhal metodo ISO 20483 -2006-), il volume di sedimentazione (metodo Preston et al.-



1982-), l'indice di caduta o Falling Number (metodo ISO 3093-1982), il farinogramma (metodo ICC 115-D-1972), l'alveogramma (metodo ICC 121-1992) ed il volume del pane (metodo AACC 10-10B).

In caso di altre destinazioni d'uso saranno valutati i parametri da analizzare e i relativi costi.

La valutazione della qualità tecnologica verrà effettuata anche mediante la determinazione elettroforetica delle componenti gliadiniche e gluteniniche (Dal Belin Peruffo et al., 1984 - Pogna et al., 1988) (allegato n° 4).

Valutazione dei risultati agronomici e limiti di ammissibilità

Dall'analisi dei dati ottenuti verrà espresso, per ogni varietà candidata, un valore agronomico e di utilizzazione. I dati relativi alle prove agronomiche saranno sottoposti ad analisi statistica della varianza. La valutazione agronomica è positiva quando l'indice della media del biennio della produzione (t/ha) della varietà candidata, calcolato sulla media complessiva dei testimoni, è superiore o uguale a 95.



Allegato 4

PROTOCOLLO TECNICO PER LA CARATTERIZZAZIONE DELLE VARIETÀ
DI *Triticum turgidum* subsp. *turanicum* MEDIANTE ELETTROFORESI DELLE PROTEINE
DI RISERVA DEL SEME.

Il pattern elettroforetico delle proteine di riserva di *Triticum turgidum* subsp. *turanicum* è parte della valutazione della qualità tecnologica, è nota infatti la correlazione esistente tra qualità del glutine profilo proteico.

La descrizione si basa sulla identificazione e classificazione di due gruppi di proteine di riserva: le gliadine e le glutenine. Entrambe sono proteine alcol solubili appartenenti al gruppo delle prolamine che differiscono però a livello di polimerizzazione.

Le gliadine sono proteine monomeriche e hanno pesi molecolari che variano tra i 30 e i 70 KDa. Le glutenine sono invece polimeri costituiti da più sub-unità legate da ponti disolfuro ed hanno una struttura molto complessa raggiungendo pesi molecolari molto elevati, da qui la necessità di adottare tecniche differenti di separazione elettroforetica in gel di poliacrilammide.

Nel primo caso la separazione delle frazioni proteiche avviene in condizioni native a pH acido (A-PAGE), nel secondo caso la corsa elettroforetica avviene in condizioni denaturanti a pH 8,6 (SDS-PAGE). Di seguito vengono riportati i protocolli analitici per la loro rilevazione.

ANALISI FRAZIONE GLUTENINICA (Glutenine APM): SDS-PAGE

Acilamide (pura per elettroforesi)

Glicerolo

Bisacrilamide (pura per elettroforesi)

Acido cloridrico

Tris (hydroxymethyl-methylamina)

Sodio dodecilsolfato



	Temed	Pyronina G
	Ammonio persolfato	Acido tricloroacetico
	β -Mercaptoetanolo	Etanolo
Attrezzatura	Acido acetico glaciale	Coomassie Blue G-250
	Glycina	Coomassie Blue R-250
Cella		
elettroforetica verticale, alimentatore in grado di operare sia a voltaggio che ad amperaggio costante.		

Reagenti

Tutti i reagenti devono essere di tipo "Analar" o di grado migliore.

Soluzioni

Soluzione estraente (solo glutenine)

Soluzione stock:

6,25 ml TRIS-HCl pH 6,8

12,05 ml acqua distillata

2 g SDS

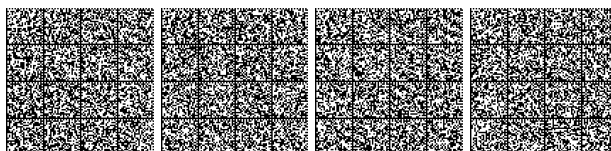
10 mg Pyronina G

10 ml Glicerolo

Questa soluzione può essere conservata per 2 mesi a 4°C.

Immediatamente prima dell'uso preparare la soluzione estraente aggiungendo a 4,25 ml di soluzione stock 0,75 ml di β -Mercaptoetanolo.

Portare a volume con acqua (10 ml finali).



Soluzione estraente (glutenine dopo estrazione gliadine)

27,0 g Urea

3 ml di β -Mercaptoetanololo

10 g SDS

Si può procedere in successione alla estrazione sullo stesso individuo sia della frazione gliadinica sia della frazione gluteninica. In questo caso al pellet residuo della estrazione delle gliadine vengono aggiunti 0,5 ml di soluzione 2.1.2. Lasciare in incubazione per tutta la notte a temperatura ambiente. Gli estratti, scaldati in acqua bollente per 10 minuti, una volta raffreddati vengono centrifugati a 18000xg per 10 minuti. Il surnatante è utilizzato per la corsa elettroforetica.

Soluzione per gli elettrodi (Tris Glycina 1 M pH 8,3)

Soluzione stock:

141,1 g Glycina

30 g TRIS pH 8,3

10 g SDS

acqua distillata fino a 1l

Tenere al freddo. Prima dell'uso diluire 1:10 con acqua distillata.

Soluzioni per il gel:

Soluzione stock per il gel di corsa (TRIS HCl 1M pH 8,8)

121,1 g TRIS,

20 ml circa di HCl,

acqua distillata fino ad 1l

Questa soluzione può essere conservata per 2 mesi a 4°C.

Soluzione stock per il gel di allineamento (TRIS HCl 1M pH 6,8):

121,1 g TRIS,

78 ml circa di HCl,

acqua distillata fino ad 1l



Questa soluzione può essere conservata per 2 mesi a 4°C.

Soluzione stock acrilamide: sciogliere 40,02 g di acrilamide in acqua distillata (volume finale 100 ml).

Soluzione stock bis-acrilamide: sciogliere 0,5198 g di bis-acrilamide in acqua distillata (volume finale 130 ml).

Soluzione 1% APS: sciogliere 100 mg di APS in 10 ml di acqua distillata. Questa soluzione va preparata al momento.

Soluzione al 10% SDS: sciogliere 10 g di SDS in acqua distillata; portare ad un volume finale di 100 ml. Questa soluzione può essere conservata a 15°C per 2 mesi.

Soluzione colorante

- a Coomassie Blue G-250 (0,25 g) + Coomassie Blue R-250 (0,75 g) in 100 ml di acqua.
- b Acido tricloroacetico (55 g) + Acido acetico glaciale (65 ml) + Metanolo (180 ml) + soluzione 'a' (25 ml). Portare a volume (1000 ml) con acqua.

Procedura

Estrazione delle proteine

La farina proveniente da un singolo seme o da più semi viene trasferita in una provetta da 1,5 ml tipo Eppendorf, a questa si aggiunge la soluzione estraente (750 µl/70-80 mg di farina). Si lasciano riposare i campioni per circa due ore a temperatura ambiente. Gli estratti, scaldati in acqua bollente per 10 minuti, una volta raffreddati vengono centrifugati a 18000 xg per 10 minuti. Il surnatante è utilizzato per la corsa elettroforetica. I campioni estratti possono essere conservati per 3-4 gg a 4°C.

Preparazione del gel

Assemblare la cella elettroforetica secondo le istruzioni fornite dalla ditta costruttrice.

Gel di separazione (acrilamide 10%): Per la preparazione di 2 gel di 16 x 18 cm spessore 1,5 mm sono necessari 20 ml di soluzione stock acrilamide, 26 ml di soluzione stock bis-acrilamide, 30 ml di soluzione stock pH 8,8. Degasare la soluzione per 10 minuti dopodichè aggiungere 2 ml APS (1%), 0,8 ml SDS (10%), 40 µl TEMED. Versare la soluzione con cura evitando la formazione di bolle d'aria, lasciare polimerizzare a temperatura ambiente per circa 30 minuti.



Gel di allineamento (acrilamide 3%): 1,5 ml di soluzione stock acrilamide, 2,15 ml di soluzione stock bis-acrilamide, 2,5 ml di soluzione stock pH 6,8, 13,15 ml acqua distillata Degasare la soluzione per 10 minuti dopodichè aggiungere 0,750 ml APS (1%), 0,2 ml SDS (10%), 15 µl TEMED. Versare la soluzione e posizionare con cura il 'pettine' evitando la formazione di bolle d'aria. Lasciare polimerizzare per 2 ore a temperatura ambiente.

Condizioni corsa

Rimuovere il 'pettine' dal gel e sciacquare i pozzetti con la soluzione per gli elettrodi.

Riempire la cella con la soluzione per gli elettrodi e caricare i campioni nei pozzetti (10-20 µl).

Mantenere la temperatura del tampone nella camera inferiore intorno ai 15°C.

La corsa elettroforetica nel gel di allineamento è condotta a corrente costante di circa 8 mA/cm². Quando la Pyronina G entra nel gel di separazione si aumenta l'ampereaggio a 16 mA/cm² (voltage massimo 300V), la corsa ha termine quando il marcatore raggiunge il fondo.

Colorazione

Il gel viene rimosso dalla vasca e messo in una vaschetta con 250 ml di soluzione di fissaggio (15% TCA) per almeno 30 minuti. Si procede successivamente al lavaggio in acqua distillata e alla colorazione per tutta la notte a temperatura ambiente. La decolorazione, se necessaria, viene fatta mediante lavaggio in acqua per 2-3 ore.

Interpretazione dei risultati

Le glutenine APM sono codificate da geni posizionati sul braccio corto dei cromosomi del gruppo 1: 1A, 1B e 1D per i frumenti esaploidi e 1A e 1B per i frumenti tetraploidi.

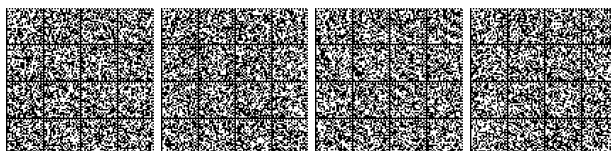
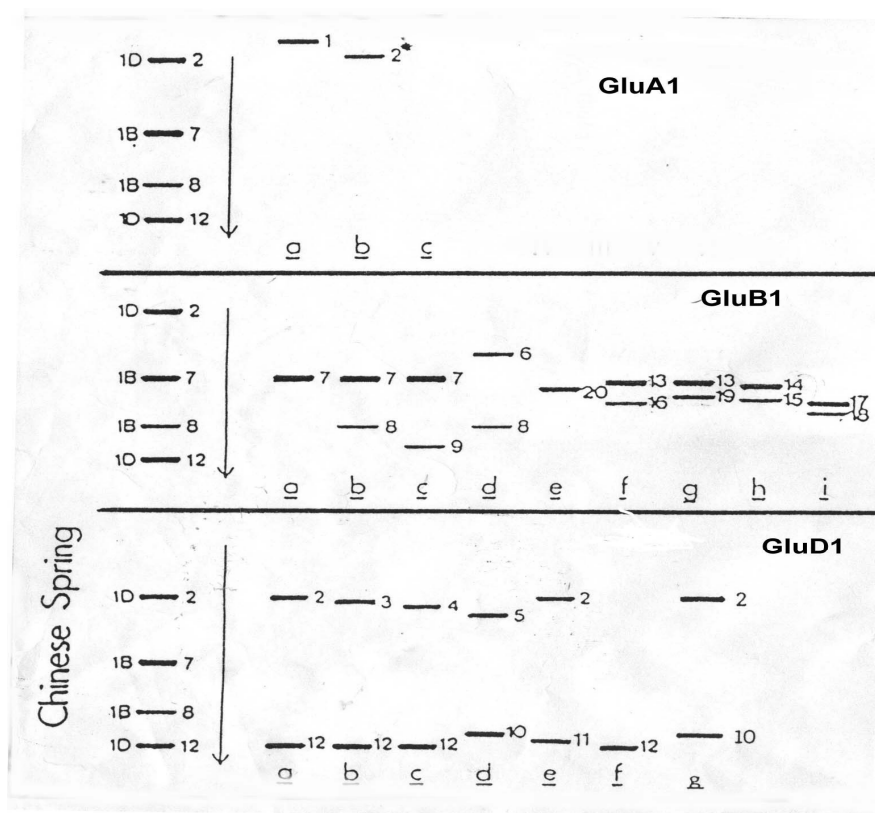
Ogni locus Glu-1 è responsabile della sintesi di due subunità differenti (x e y) che vengono sempre ereditate insieme, in alcuni casi però il gene per la subunità y non viene espresso come nel caso del locus Glu-A1 e di alcuni alleli del locus Glu-B1.



Le subunità gluteniniche codificate dai diversi alleli, presenti con maggiore frequenza nel germoplasma italiano (Pogna et al. 1989) e numerate secondo la nomenclatura adottata da Payne et al. 1983 sono riportate nella tabella seguente:

Glu-A1	Glu-B1	Glu-D1
Nulla	7	2+12
1	20	5+10
2*	7+8	5+12
	7*+8	
	7+9	
	6+8	
	17+18	

Nomenclatura delle bande (Glutenine APM) e riconoscimento degli alleli corrispondenti.



ANALISI FRAZIONE GLIADINICA: A-PAGE pH 3,1

Attrezzatura

Cella elettroforetica verticale, alimentatore in grado di operare sia a voltaggio che ad amperaggio costante.

Reagenti

Tutti i reagenti devono essere di tipo "Analar" o di grado migliore.

Acrilamide (pura per elettroforesi)	Acido tricloroacetico
Bisacrilamide (pura per elettroforesi)	Etanolo
Acido acetico glaciale	2-Cloroetano
Solfato ferroso	Urea
Acido ascorbico	Coomassie Blue G-250
Perossido di idrogeno	Coomassie Blue R-250
Pyronina G	

Soluzioni

Soluzione estraente (deve essere tenuta a freddo)

Pyronina G (0,05% w/v

in 2-Cloroetano (25% v/v)

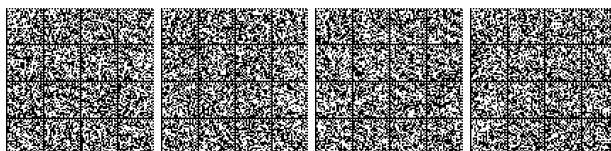
Soluzione gel Acrilammide 12,4% (2 gel 16 x 18 cm spessore 1,5 mm)

Urea 9,6 g

Acrilammide soluzione 40 % 23,25 ml

Bisacrilammide soluzione 2 % 15 ml

Acido Ascorbico 80 mg



Ferro Solfato (80 mg in 250 ml H₂O) 3,5 ml

Acido acetico 0,6 ml

Acqua fino a un volume finale di 80 ml

Polimerizzare con:

H₂O₂ (611 µl in 10 ml di H₂O) 55 µl / 40 ml soluzione di Acrilammide

Soluzione per gli elettrodi

Vasca superiore: 700 ml di acqua distillata + 1 ml Acido Acetico

Vasca inferiore: 4 l di acqua distillata + 10 ml Acido Acetico

Soluzione colorante

a Blue R-250 (1 g) + 100 ml di etanolo.

b Acido tricloroacetico (100 g) + 1000 ml di acqua distillata + soluzione 'a' (20ml).

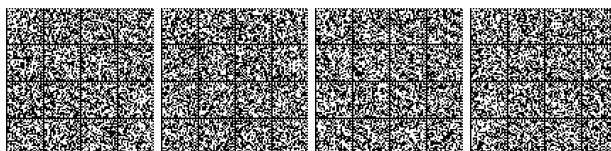
Estrazione delle proteine

La farina proveniente da un singolo seme o da più semi viene trasferita in provette da 1,5 ml tipo Eppendorf, a questa viene aggiunta la soluzione estraente (200 µl/70-80 mg di farina). Si lascia riposare tutta la notte a temperatura ambiente. Gli estratti vengono centrifugati a 18000 xg per 10 minuti. Il surnatante viene utilizzato per la corsa elettroforetica. I campioni estratti possono essere conservati per 3-4gg a 4°C.

Preparazione del gel

Assemblare la cella elettroforetica secondo le istruzioni fornite dalla ditta costruttrice.

Per la polimerizzazione viene utilizzata una soluzione allo 0,6% di perossido di idrogeno (55 µl per 40 ml di soluzione). Agitare rapidamente, versare tra i vetri la soluzione e posizionare il 'pettine' per la formazione dei pozzetti in cui verranno caricati i campioni da analizzare. La polimerizzazione sarà completata in circa 10-15 minuti.



Condizioni di corsa

Rimuovere il 'pettine' dal gel e sciacquare i pozzetti con la soluzione per gli elettrodi.

Riempire la cella con la soluzione per gli elettrodi e caricare i campioni nei pozzetti (10-20 μ l).

Mantenere la temperatura del tampone nella camera inferiore intorno ai 18°C.

La corsa elettroforetica è condotta a 500 Volt costanti (per un gel lungo 16 cm e spesso 1,5 mm) per h 3,45.

In questo sistema l'anodo è all'origine e quindi la polarità del campo elettrico va aggiustata di conseguenza.

Colorazione

Il gel viene rimosso dalla vasca e messo in una vaschetta con 200 ml di soluzione colorante. La colorazione procede per tutta la notte a temperatura ambiente. La decolorazione, se necessaria, viene fatta mediante lavaggio in acqua per 2-3 ore.

Interpretazione dei risultati

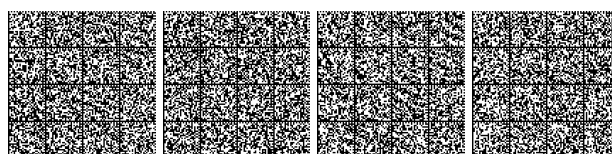
L'identificazione delle bande proteiche viene fatta misurando le loro mobilità relative secondo la nomenclatura adottata da Bushuk e Zillman (1978).

Frumento tenero e Spelta: come varietà standard vengono utilizzate i frumenti teneri Morandi e Pricama caratterizzate da polimorfismo sia livello delle γ -gliadine (allele γ -40 e γ -43,5 rispettivamente) e sia delle glutenine ad alto peso molecolare.

Frumento duro: le varietà standard utilizzate per la classificazione delle γ -gliadine e delle glutenine sono Creso (allele γ -45) e Latino (allele γ -42).

Bibliografia

Bushuk W., Zillman R. R. 1978. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. I Apparatus, method and nomenclature. Can. J. of Plant Sci. 58: 277-301.



Morel M.H. 1994. Acid-Polyacrilamide gel electrophoresis of wheat glutenins: a new tool for the separation of high and low molecular weight subunits. *Cer. Chem.*, 71(3):238-242.

Payne P.I., Lawrence G.J. 1983. Catalogue of alleles for the complex gene loci , Glu-A1, Glu-B1, and Glu-D1, which code for the high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cer. Res. Comm.* , 11: 229-241.

Dal Belin Peruffo, A. Pogna et.al. 1984. Diagrammi elettroforetici delle gliadine e chiave di identificazione delle varietà di grano tenero iscritte nel registro delle varietà. *Sementi Elette IV:3-9.*

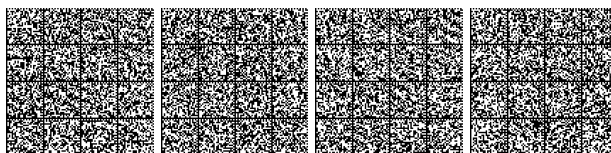
Dal Belin Peruffo, A. Pogna et.al. 1986. Diagrammi elettroforetici delle gliadine e chiave di identificazione delle varietà di grano duro iscritte nel registro delle varietà. *Sementi Elette III:3-17.*

Pogna A. et al. 1989. The high-molecular-weight subunits of glutenin in common wheat cultivars grown in Italy. *J. Genet & Breed.*, 43: 17-24.

Jackson E. A. et al. 1996. Proposal for combining the classification systems of alleles of Gli-1 and Glu-3 loci in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) *J.Genet.& Breed.*, 50:321-336.

Wrigley C.W., Autran J.C. and Bushuk W. 1982. Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of the grain protein. *Adv. in Cer. Sci. and Technol.* 5: 211-259.

TG/ 3/ 10 (proj.) Wheat, 94-05-19 UPOV.



Allegato 5

PROTOCOLLO TECNICO PER LA CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE
DELLE VARIETÀ DI *Triticum turgidum* subsp. *turanicum* MEDIANTE MICROSATELLITI
O SSR (Simple Sequence Repeats)

La descrizione del profilo molecolare è uno dei metodi d'elezione per la caratterizzazione varietale in molte specie. I loci genomici scelti per questo tipo di analisi sono i cosiddetti microsatelliti o SSR (Simple Sequence Repeats).

Essi sono costituiti da brevi sequenze ripetute di 2-5 nucleotidi (es: ATATATATAT; CGTCGTCGTCGT) sparse nel genoma. Le sequenze adiacenti ai microsatelliti sono generalmente conservate all'interno degli individui della stessa specie, ciò permette la selezione di primer specifici per l'amplificazione del frammento di interesse mediante PCR (Polymerase Chain Reaction). Gli alleli, a carattere codominante, sono identificati dalla lunghezza del frammento espressa in paia di basi. L'amplificazione di questi frammenti mediante l'uso della PCR e la loro separazione mediante elettroforesi darà origine ad un profilo tipico per ciascun individuo/varietà, utile per la sua identificazione.

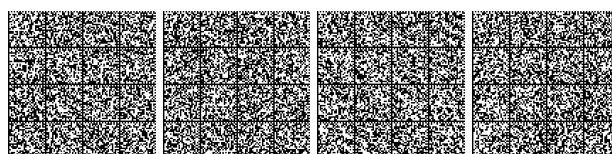
Gli SSR permettono:

- la catalogazione delle diverse accessioni;
- la creazione di un database con i dati ottenuti, da affiancare ai dati morfologici raccolti nella scheda descrittiva;
- l'automazione della procedura di analisi.

Scopo

Scopo della prova è la descrizione del profilo molecolare di varietà di *Triticum turgidum* Subsp. *Turanicum*.

Il profilo molecolare sarà ottenuto dallo studio di un numero adeguato di microsatelliti ben distribuiti nel genoma e con un elevato livello di polimorfismo. L'analisi si eseguirà in entrambi gli anni di prova, al termine dei quali il profilo molecolare sarà incluso nella scheda descrittiva delle nuove varietà a complemento della caratterizzazione morfofisiologica.



Materiali

Marcatori SSR (Simple Sequence Repeats)

Il protocollo analitico adottato fa riferimento al Metodo di analisi 8.10.2 (DNA based method - Triticum) pubblicato nelle Norme ISTA 2019 (International Seed Testing Association) che prevede l'impiego di 14 marcatori SSR prescritti a cui è possibile aggiungere di ulteriori per approfondire la descrizione varietale. I 14 marcatori analizzati sono distribuiti nell'intero genoma della specie Triticum.

Campione di analisi

Per la caratterizzazione varietale l'analisi dovrà essere condotta sia a partire da singoli semi/plantule che da pool di individui ottenuti da una miscela di semi/plantule. Il confronto tra i profili ottenuti dai singoli individui e dai pool permetterà di valutare la composizione e l'omogeneità della varietà in iscrizione.

Durante il secondo anno di prova l'analisi verrà ripetuta sul nuovo campione di seme inviato, ciò consentirà di confermare la stabilità genetica del materiale.

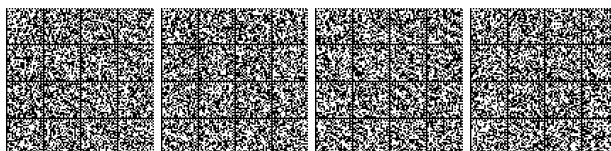
Metodi

Estrazione degli acidi nucleici

Gli acidi nucleici potranno essere estratti sia da seme che da plantule di circa 10 giorni secondo il protocollo proposto da Doyle e Doyle (1990) che prevede l'utilizzo di cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), un detergente ionico in grado di formare complessi insolubili con gli acidi nucleici in determinate concentrazioni saline della soluzione di estrazione. In alternativa potranno essere utilizzati kit di estrazione commerciali o ulteriori protocolli di estrazione opportunamente valutati.

Reazione di Amplificazione e sistemi di rilevazione

Data la grande varietà di protocolli disponibili per la reazione di amplificazione e dei sistemi di rilevazione (elettroforesi su gel, elettroforesi capillare) si ritiene inopportuno stabilire una procedura analitica rigida, perciò per l'allestimento delle analisi sarà possibile utilizzare protocolli diversi, fermo restando l'impiego del pannello di microsatelliti selezionati.



L'impiego congiunto di marcatori di peso molecolare e di varietà a profilo noto consentirà la valutazione della qualità delle amplificazioni ottenute in ciascuna analisi e la ripetibilità delle misure dei frammenti per ogni marcatore nei due anni di prova.

Elaborazione dati

I dati ottenuti per le nuove varietà verranno rielaborati grazie all'utilizzo di software specifici per la valutazione delle distanze genetiche (Felsenstein, J. 2005. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.; Peakall R. and Smouse P.E. Mol. Ecol. Notes. (2006) 6: 288-295).

I profili molecolari delle varietà saranno conservati in un database del laboratorio CREA-DC di Tavazzano (LO) e consentiranno di completare la descrizione della varietà in aggiunta ai dati morfofisiologici.

Bibliografia

Doyle and Doyle (1990). Focus 12:13-15.

International Rules for Seed Testing 2019 (ISSN 2310-3655)

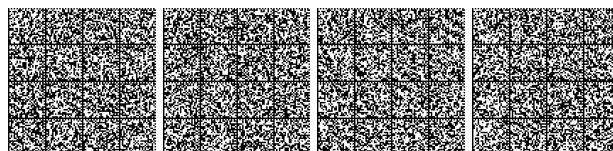
Song et al. (2005). Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. Theoretical and Applied Genetics 110, 550–560

Eujayl et al. (2002). Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. Theoretical and Applied Genetics 104, 399–407

Röder et al. (1998). A microsatellite map of wheat. Genetics 149, 2007–2023

Peakall, R. and Smouse P.E. (2012) Bioinformatics 28, 2537-2539

Felsenstein, J. 1989. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). Cladistics 5: 164-166



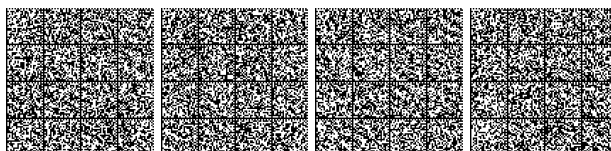
Allegato 6

**COSTI UNITARI (IL COSTO DEI TESTIMONI È INCLUSO NEL COSTO UNITARIO
PER CAMPIONE IN PROVA, I COSTI SI INTENDONO IVA INCLUSA)**

A	Spese generali di coordinamento –	€ 350,00
B	Descrittiva	
b1	Varietà (in campo) - per parcella	€ 450,00
B2	alternatività (varietà autunnali) – per parcella	€ 50,00
C	Agronomica	
c1	Varietà (in campo) - per parcella	€ 80,00
D	Analisi molecolari	
d1	per campione	€ 390
E	Resistenza al freddo	
e1	per campione	€ 70,00



Pastificazione (solo su richiesta del richiedente)		
f1	<i>Ceneri, macinazione, cont. proteico, test di sedimentazione, alveogramma, glutine secco, gluten index, colore, pastificazione, e umidità semola - per campione</i>	€ 380,00
f2	<i>Panificazione - per campione (solo su richiesta del richiedente)</i>	€ 160,00
f3	<i>Analisi elettroforetica (per campione)</i>	€ 100
G		
g1	Resistenza alle malattie (solo su richiesta del richiedente) <i>Oidio e Ruggini</i>	€ 100,00



COSTI DELLE PROVE PER L'ISCRIZIONE DI NUOVI VARIETÀ O IBRIDI DI CEREALI A PAGLIA AL REGISTRO (PER ANNO E PER VARIETÀ) (Euro)

Specie	Spese generali di coordinamento		Prova Descrittiva		Prova Agronomica	Analisi di laboratorio	Analisi di laboratorio			Costo totale
	A	B	B	C			D	E	F	
<i>Triticum turgidum</i> <i>subsp. turanicum</i>	350,00	500,00	[(b1x2) + (b3x1)]	720,00	[c1x3x3]	390	70,00	-	-	2.030,00

