



Università degli Studi della Basilicata

Dottorato di Ricerca in
“Cities and Landscapes: Architecture, Archaeology, Cultural
Heritage, History and Resources”

TITOLO DELLA TESI

“Risposta molecolare ed ecofisiologica del frumento duro a
stress abiotici”

Settore Scientifico-Disciplinare
“BIO/11 - AGR/02”

Coordinatore del corso di Dottorato
Prof.ssa Antonella Guida

Dottorando
Dott.ssa Adele Sarli

Relatore
Prof. Michele Perniola

Co-relatore
Dott.ssa Gabriella Sonnante

Ciclo XXXV

SOMMARIO

Abstract	5
INTRODUZIONE	8
Frumento duro (genomica, agronomia e fisiologia), stress abiotici, utilizzo e carenza di azoto	8
Efficienza d'uso dell'azoto, adattamento alla disponibilità di azoto.	15
Coltivazione di frumento duro nelle aree del mediterraneo	17
Impatto ambientale (fertilizzanti azotati)	20
Genetica (asportazioni di azoto, risposta a stress abiotici)	22
Geni implicati nella risposta agli stress: superfamiglia dei fattori di trascrizione MYB	25
La sottofamiglia R2R3-MYB	27
MATERIALI E METODI	33
R2R3-MYB nel Grano Duro: Identificazione Nell'intero genoma, Cluster Poaceae-specifici, Espressione e dinamiche regolatorie in condizione di stress abiotici.	33
Identificazione e analisi filogenetica dei geni R2R3-MYBs nel frumento duro	33
Analisi WebLogo e MEME	36

Posizione cromosomica, struttura genica, proprietà proteiche e localizzazione cellulare.....	37
Materiale vegetale e condizioni di crescita.....	39
PCR quantitativa – qPCR	42
Network regolatori dei geni TdR2R3-MYB in condizioni di stress abiotico	45
Prova agronomica varietale.....	47
Varietà e siti sperimentali	47
Semina e analisi del raccolto	50
Analisi Statistica della varianza	51
RISULTATI	52
R2R3-MYB nel Grano Duro: Identificazione Nell'intero genoma, Cluster Poaceae-specifici, Espressione e dinamiche regolatorie in condizione di stress abiotici	52
Identificazione dei fattori di trascrizione R2R3-MYB nel frumento duro	52
Caratterizzazione del dominio R2R3.....	55
Posizione cromosomica, struttura genica, proprietà proteiche e localizzazione cellulare.....	58
Analisi filogenetiche e del motivo	64

espressione genica nei tessuti di grano duro in condizioni di stress abiotico	77
Pattern regolatori dei TdR2R3-MYB selezionati	83
Prova agronomica varietale: Produzione e qualità delle quattro varietà di frumento coltivate	88
Confronto tra i due siti di coltivazione	88
Confronto tra aree a concimazione standard e aree prive di concimazione azotata	89
Confronto tra varietà.....	90
DISCUSSIONI.....	92
Identificazione dei geni R2R3-MYb nel Grano Duro, Cluster Poaceae- specifici, Espressione e dinamiche regolatorie in condizione di stress abiotici.....	92
Produzione e qualità di quattro varietà di frumento duro in condizione di stress da CARENZA di azoto	98
Conclusioni e prospettive future	101
Tabelle supplementari	103
Referenze bibliografiche.....	126

ABSTRACT

Il frumento duro, *Triticum turgidum* subsp. *durum* (Desf.) Husn., è un cereale coltivato in tutto il mondo ed è una delle principali fonti di carboidrati vegetali nell'alimentazione umana. Si tratta di una delle colture più diffuse nei paesi del Mediterraneo, con un ruolo molto importante per la loro economia e tradizione. Queste aree sono caratterizzate da scarsità di piogge, siccità, salinità e basso contenuto di sostanza organica nel suolo, che causano limitazioni alla coltivazione senza apporto di fertilizzanti azotati. Recentemente però, è chiaramente emerso che l'uso massiccio di fertilizzanti a base di azoto (N) può determinare effetti dannosi significativi sul funzionamento degli ecosistemi terrestri e acquatici, sull'inquinamento atmosferico e delle acque e sulla salute umana. Tutte queste preoccupazioni pongono una maggiore enfasi sull'aumento dell'efficienza d'uso dell'azoto (NUE) e più in generale sull'adattamento di queste colture a condizioni di stress abiotico.

I fattori di trascrizione (FT) MYB rappresentano una delle più grandi famiglie di FT nelle piante, essendo coinvolti in vari processi vegetali specifici, come le risposte a stress biotici e abiotici. L'implicazione dei FT MYB nei meccanismi di tolleranza allo stress abiotico è particolarmente interessante per il miglioramento genetico delle colture, poiché le condizioni ambientali possono influenzare negativamente la crescita e la produttività.

Nel presente studio è stata eseguita un'identificazione dei FT R2R3-MYB nell'intero genoma del grano duro. La ricerca del profilo MYB e le analisi filogenetiche basate sull'omologia con *Arabidopsis* e riso dei FT MYB hanno portato all'identificazione di 233 R2R3-TdMYB (*Triticum durum* MYB). Sono stati rilevati tre gruppi MYB specifici per la famiglia delle Poaceae, uno dei quali non era mai stato descritto prima. L'analisi di espressione di otto geni, selezionati in diverse condizioni di stress abiotico, ha rivelato che la maggior parte di essi rispondeva soprattutto allo stress salino e da siccità. Infine, le analisi della rete di regolazione genica hanno portato all'identificazione di 41 bersagli genici per tre R2R3-TdMYB, che rappresentano nuovi candidati per le analisi funzionali. È stata inoltre condotta una sperimentazione su quattro varietà di frumento duro, di cui due moderne, Marco Aurelio e Kanakis; una degli anni Settanta, Svevo, e una antica, Senatore Cappelli. I quattro genotipi sono stati coltivati in due siti sperimentali con caratteristiche pedoclimatiche differenti e alla raccolta sono state valutate la risposta produttiva e qualitativa in relazione al sito e a due diverse condizioni agronomiche: concimazione azotata standard e assenza di concimazione azotata.

Complessivamente questo studio fornisce una descrizione dettagliata dei geni R2R3-MYB del grano duro contribuendo ad approfondire la comprensione della risposta molecolare del grano duro a condizioni climatiche sfavorevoli. Fornisce in aggiunta una valutazione della

risposta genotipica diversificata allo stress da N sia da un punto di vista quantitativo che qualitativo, gettando le basi per ulteriori studi finalizzati alla selezione di genotipi e caratteri fenotipici di valore per il successo dei futuri programmi di miglioramento genetico del frumento duro.

INTRODUZIONE

FRUMENTO DURO (GENOMICA, AGRONOMIA E FISIOLOGIA), STRESS ABIOTICI, UTILIZZO E CARENZA DI AZOTO

Il frumento duro, *Triticum turgidum* subsp. *durum* (Desf.) Husn., genoma tetraploide AABB, è una pianta erbacea della famiglia delle Poaceae. Si tratta di una delle colture di cereali più diffuse nel bacino del Mediterraneo, in base alla quantità di calorie che fornisce nella dieta umana, fondamentale per la produzione di pasta e semola. La sua evoluzione parte dal farro domestico, *T. turgidum* ssp. *dicoccum* (Schrank ex Schübl.) Thell., che deriva a sua volta dal farro selvatico, *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* (Körn. Ex Asch. & Graebn.) Thell., circa 10.000 anni fa nella Mezzaluna Fertile (Maccaferri et al. 2019). Pertanto, il processo di evoluzione del grano duro tetraploide è il risultato dell'addomesticamento praticato dall'uomo, della continua evoluzione durante la domesticazione, e del miglioramento dell'allevamento delle varietà autoctone, fino alle moderne cultivar di grano duro. I progenitori selvatici delle piante moderne possono servire come fonti di preziosa diversità genetica per vari caratteri, quali ad esempio, la resistenza alle malattie e la qualità nutrizionale. Un'analisi genomica comparativa

completa tra colture coltivate e progenitori selvatici è considerata una strategia chiave per rilevare nuovi alleli benefici e variazioni strutturali che potrebbero limitare gli sforzi di allevamento, nonché per comprendere le più ampie conseguenze genetiche dell'evoluzione e della storia della selezione. Nel 2019, il genoma di 10,45 gigabasi (Gb) della cultivar di grano duro Svevo, è stato sequenziato e assemblato "de novo". Questo grande passo avanti ha consentito di analizzare la diversità genetica dell'intero genoma, rivelando cambiamenti imposti da migliaia di anni di selezione e riproduzione e allo stesso tempo, ha posto le basi per ulteriori studi, sempre più accurati e fondamentali per la gestione e il potenziamento di questa coltura (Maccaferri et al. 2019).

Le aree del Mediterraneo, tra cui l'Europa meridionale e l'Africa settentrionale, in cui la coltivazione di frumento duro è maggiormente diffusa, sono caratterizzate da scarsità di piogge, con problemi critici come la siccità, la salinità e il basso quantitativo di materia organica del suolo, che causano limitazioni alla coltivazione senza fertilizzanti azotati.

È ormai noto che la combinazione di più stimoli stressanti può avere un effetto deleterio, molto più del loro singolo effetto. Secondo le stime

mondiali, una media del 50% delle perdite di resa nelle colture agricole è dovuta a fattori abiotici come l'alta temperatura (20%), la bassa temperatura (7%), la salinità (10%), la siccità (9%) e altre forme di stress (4%) (Oerke et al., 1994 e Thiert, 2006). Pertanto, per sostenere la produzione di grano, è necessario mitigare l'effetto degli stress abiotici che si verificano ormai abitualmente, conoscerne la tipologia e il comportamento che la pianta adotta al verificarsi di queste condizioni. Sempre più frequentemente si assiste a fenomeni di salinità, siccità, e degradazione del suolo che porta alla carenza di nutrienti essenziali per la crescita della pianta.

Quando si verificano fenomeni come elevata salinità del suolo è fondamentale considerare che i sali solubili forniscono la maggior parte degli elementi essenziali per la crescita delle piante, ma i loro livelli eccessivi possono essere dannosi. I terreni salini, così chiamati quando la quantità di sali risulta eccessiva, contengono solitamente una miscela di costituenti come cloruri, solfati, carbonati e bicarbonati di sodio, calcio e magnesio, in proporzioni notevolmente variabili da luogo a luogo a seconda della fonte di sali. Questi suoli si trovano comunemente nelle regioni aride e semi-aride, dove le precipitazioni annuali sono insufficienti per soddisfare il fabbisogno di evapotraspirazione delle piante. Di conseguenza, i sali presenti nello strato di terreno non vengono lisciviati e restano in una quantità dannosa per la crescita delle piante. La salinità colpisce le piante in diversi modi come effetti

osmotici, tossicità di ioni specifici e/o disturbi nutrizionali (Lauchli e Epstein, 1990). In generale, lo stress salino accelera lo sviluppo riproduttivo ma influisce negativamente sullo sviluppo della spiga e diminuisce il potenziale di resa del grano. È stato inoltre dimostrato, che brevi periodi di stress salino durante l'organogenesi hanno conseguenze irreversibili sulla crescita e sullo sviluppo del grano (Grieve et al., 2001).

La risposta dello sviluppo delle piante allo stress da siccità si manifesta attraverso una maggiore crescita delle radici e la soppressione della crescita dei germogli, con conseguente aumento del loro rapporto (Sharp et al., 2004; Yamaguchi e Sharp, 2010; Xu et al., 2013). Una combinazione di una discesa radicale più veloce e di radici più efficienti può comportare un'estrazione più efficace di acqua dal sottosuolo e fornire benefici di resa (Lilley e Kirkegaard, 2011). È stato dimostrato che livelli elevati di acido abscissico (ABA) funzionano come promotori della crescita delle radici e contemporaneamente repressori della crescita dei germogli (Sharp et al., 2004; Xu et al., 2013). La capacità delle colture di estrarre acqua da un volume di suolo maggiore è fondamentale per la stabilità della resa in condizioni di impoverimento dell'umidità del suolo nei sistemi di produzione pluviali. Pertanto, i sistemi con radici profonde contribuiscono a un maggiore potenziale di resa in condizioni di siccità (Reynolds et al., 2009; Pask e Reynolds, 2013). I recenti progressi nella ricerca sulla tolleranza alla siccità hanno portato alla scoperta di molti geni chiave che regolano i tratti morfofisiologici. I

geni che controllano l'architettura delle radici e lo sviluppo stomatico svolgono un ruolo importante per l'estrazione dell'acqua dal suolo e per la sua ritenzione. Diventa pertanto obiettivo comune la loro completa identificazione e conoscenza al fine di individuare strategie di selezione molecolare idonee per il miglioramento della tolleranza alla siccità (Kulkarni et al., 2017).

Altra problematica particolarmente rilevante è la carenza di nutrienti in suoli sempre più poveri di materia organica. Questa tipologia di stress si verifica quando un nutriente essenziale non è disponibile in quantità sufficiente per soddisfare i requisiti di una pianta in crescita. Tuttavia, l'uso squilibrato di fertilizzanti inorganici e prodotti chimici, indirizzato a sopperire tale mancanza per proteggere e massimizzare la resa delle piante, ha progressivamente provocato il deterioramento fisico, chimico e biologico dei suoli di coltivazione del grano. L'azoto (N) è l'elemento più importante per il funzionamento ottimale delle colture (Shivay, 2007) ma la maggior parte delle colture lo utilizza in maniera inefficiente. Gli agricoltori, infatti, tendono sempre più a preferire l'agricoltura sostenibile, praticando la rotazione e limitando la fertilizzazione a causa degli alti costi legati ad un ambiente generale povero e pertanto altamente esigente di fertilizzanti. Essendo l'azoto direttamente collegato alla resa e alla qualità in termini di contenuto proteico, è importante studiare come le piante affrontano tale carenza durante la crescita e, in particolare, durante il processo di sviluppo e senescenza

della pianta. In questa fase dello sviluppo, infatti, l'azoto svolge un ruolo particolarmente importante, per cui bassi livelli di fornitura di questo nutriente essenziale inducono una senescenza precoce associata a una riduzione dell'accumulo di proteine nei chicchi di grano. Nel grano duro, è stato dimostrato che l'intera crescita della pianta viene gravemente compromessa dalla carenza di N. Questa tipologia di stress, infatti, determina gravi cambiamenti fenotipici che influenzano negativamente le proprietà e la resa del grano.

L'utilizzo dell'azoto da parte delle piante comporta il susseguirsi di una serie di fasi, principalmente assorbimento, riduzione, assimilazione, traslocazione e rimobilizzazione. La forma di N che le piante preferiscono assorbire dipende dall'adattamento della pianta alle condizioni del suolo, essendo il nitrato la forma di N maggiormente presente nei suoli aerobici, mentre l'ammonio è più abbondante nelle zone umide e soggette ad allagamento o nei terreni acidi (Maathuis, 2009). L'assorbimento dei nitrati avviene a livello dell'apparato radicale attraverso due sistemi che agiscono in modo coordinato per assorbire il nitrato dal suolo e distribuirlo nell'intera pianta (Tsay et al., 2007): un sistema di trasporto a bassa affinità (LATS), che è mediato dalla famiglia di geni NRT1, e un sistema di trasporto ad alta affinità (HATS), che avviene per mezzo della famiglia di geni NRT2, quando la concentrazione di nitrati esterni è bassa (Masclaux- Daubresse et al., 2010). L'assimilazione dell'azoto richiede la riduzione del nitrato in

ammonio e quindi la sua incorporazione negli aminoacidi. La reazione di riduzione, che avviene sia nelle radici che nei germogli è catalizzata, nel citosol, dalla nitrato-reduttasi (NR), che produce nitrito, che viene traslocato nel cloroplasto e ridotto in ammonio dalla nitrito-reduttasi (NiR) (Meyer e Stitt, 2001). L'ammonio derivante dal nitrato, o quello prodotto dalla fotorespirazione o dal riciclo degli aminoacidi, è per lo più assimilato nei plastidi. La glutammina sintasi (GS) catalizza l'aggiunta dell'ammonio su una molecola di glutammato (Glu) per produrre glutammina (Gln). È stato dimostrato che tutte le piante condividono i comuni meccanismi di rimobilizzazione dell'azoto. Nei cereali, analogamente al pomodoro e al tabacco, la glutammina è il composto azotato preferibilmente traslocato. Durante la senescenza, le concentrazioni di asparagina e glutammina aumentano nella linfa del floema ed è probabile che entrambi gli aminoacidi svolgano un ruolo importante nel rendere disponibile l'azoto nella foglia a bandiera per la rimobilizzazione agli organi riproduttivi. Poiché la glutammina è la principale forma di N nella linfa del floema, gli enzimi glutammina sintasi (GS) e glutammina ossoglutarato amminotrasferasi/glutammato sintasi (GOGAT) sono importanti per la rimobilizzazione e il riutilizzo di N sia negli organi senescenti che in quelli in fase di sviluppo (Zuluaga et al., 2019).

EFFICIENZA D'USO DELL'AZOTO, ADATTAMENTO ALLA DISPONIBILITÀ DI AZOTO

L'efficienza d'uso dell'azoto (NUE) viene definita come la frazione di N applicato che viene assorbito e utilizzato dalla pianta. Le strategie per migliorare la NUE dovrebbero comportare miglioramenti al germoplasma e un'agronomia ottimizzata che si adattino al clima e alle caratteristiche del suolo. Per ottenere soluzioni efficaci, è essenziale una profonda comprensione della genetica, dell'ambiente, della gestione del suolo e dell'interazione tra queste componenti. L'implementazione di soluzioni appropriate richiede infatti una gestione agronomica attenta ai fattori ambientali e l'utilizzo di varietà migliorate, ottimizzate per gli scenari climatici attuali e futuri. Poiché la NUE è un tratto complesso che comprende diversi processi, identificare i corretti caratteri per il miglioramento genetico non è banale. I processi chiave includono l'efficienza di assorbimento dell'azoto, l'efficienza di utilizzo (strettamente correlata alla resa) e la sua ripartizione (indice di raccolta: biochimico e specifico dell'organo). Ognuno di questi processi è finemente regolato e conduce al risultato finale (produzione) in cui vi è sempre un compromesso tra resa e aspetti di qualità (contenuto di N

e di proteine nei cereali) (Hawkesford et al. 2020). Tale compromesso è estremamente problematico e limitante nel contesto attuale, in quanto il continuo aumento della popolazione mondiale (si prevede una crescita di circa un terzo entro il 2050), assieme all'aumento della domanda alimentare (soprattutto nei paesi emergenti), porterà nei prossimi trent'anni alla necessità di produrre il 70% di cibo in più. Per tenere il passo con la domanda alimentare, la produzione globale di cereali, attualmente di 33,8 milioni di tonnellate nel 2020/21 (Martínez-Moreno et al 2022), dovrebbe aumentare complessivamente del 40% tra il presente e il 2050. Questa nuova emergenza globale richiede pertanto un grosso sforzo, e non solo da parte dei ricercatori, per il raggiungimento dell'obiettivo comune, l'"intensificazione sostenibile" della produzione (Perniola et al., 2015).

COLTIVAZIONE DI FRUMENTO DURO NELLE AREE DEL MEDITERRANEO

L'Unione Europea è il principale produttore di grano duro, con 9,4 milioni di tonnellate prodotte ogni anno. Le aree di produzione e coltivazione sono concentrate nei paesi del Mediterraneo. L'Italia è il maggior produttore con circa 4 milioni di tonnellate (Eurostat, 2022). Negli ultimi decenni, a causa dell'abbandono di molte aree a bassa fertilità e della mancanza di cultivar adatte, la superficie coltivata a grano duro in Italia è diminuita (Guarda et al., 2004). La causa di tale diminuzione è attribuibile anche alla sensibilità agli stress termici e alla siccità (Fontana et al 2015, Guzmán et al 2016), che si prevede aumenteranno nelle aree idonee alla coltivazione di frumento duro (Dosio et al 2018, Naumann et al 2018). La selezione di genotipi caratterizzati da una maggiore efficienza di utilizzo delle risorse e da una maggiore adattabilità alle aree marginali sarà la sfida principale dei prossimi anni. Le varietà di grano locali, o varietà autoctone, potrebbero rappresentare un'alternativa agronomicamente valida. Sono molto alte, meno produttive delle varietà moderne, non omogenee né regolari, con un contenuto proteico della granella variabile e con un glutine a minor

contenuto gliadina e glutenine (Sanchez-Garcia et al., 2015). Le farine ottenute da queste varietà, sebbene meno adatte alla lavorazione industriale, garantiscono risultati migliori se macinate a pietra naturale (farina di tipo 2). Queste farine mostrano risultati qualitativi interessanti e producono un ottimo pane con l'utilizzo del lievito madre (Torri et al., 2013). La scelta di coltivare varietà locali rappresenta una strategia per tutelare e valorizzare la biodiversità, creare filiere locali per i piccoli produttori e rappresentare un patrimonio storico-culturale. Tra le avversità agronomiche per la coltivazione del grano duro nell'area mediterranea, la disponibilità di N e di acqua rappresentano i principali vincoli che limitano la resa del grano duro (Passioura, 2002), pertanto il miglioramento dell'efficienza d'uso dell'acqua (WUE) e della NUE sono tra i principali obiettivi della ricerca sulle colture in ambiente mediterraneo (Lupini et al. 2021; Hamdy et al., 2003). Una possibile soluzione per recuperare i sistemi agricoli abbandonati e le aree marginali a bassa fertilità potrebbe ricercarsi nella diversificazione dei sistemi colturali a favore di antiche cultivar di grano duro, come Senatore Cappelli e Svevo (Desclaux et al. 2008, Giunta et al. 2019). Le antiche varietà come il Senatore Cappelli hanno il vantaggio di avere

basse esigenze di fertilizzazione (Vaghar e Ehsanzadeh, 2018) in relazione, rispettivamente, al loro basso potenziale di resa e all'elevata suscettibilità all'allettamento. Negli ultimi tempi, vista la crescente domanda di prodotti tipici, le vecchie cultivar ad alto contenuto proteico (Mefleh et al., 2020) hanno rappresentato per gli agricoltori una valida alternativa in grado di garantire redditi più elevati. Inoltre, i consumatori tendono a considerare le vecchie cultivar come una fonte di qualità associata al territorio e come un modo per salvaguardare e valorizzare la biodiversità (Desclaux et al., 2007). Una delle più importanti vecchie cultivar italiane è il Senatore Cappelli. Grazie alla sua maggiore adattabilità, è stata coltivata anche in aree marginali (Dinelli et al., 2013) in Italia e nel bacino del Mediterraneo fin dalla prima metà del XX secolo. È la più rappresentativa di un ampio gruppo di cultivar ad alto fusto appartenenti al gruppo "typicum mediterraneo". Presenta caratteristiche nutrizionali più favorevoli rispetto ad altre cultivar e a quelle autoctone, tra cui un maggior contenuto di fibre e micronutrienti e una ridotta esigenza di contaminazione da pesticidi, come il glifosate (Prandi et al. 2017).

IMPATTO AMBIENTALE (FERTILIZZANTI AZOTATI)

Le forme azotate biologicamente disponibili, come il nitrato o l'ammoniaca, scarseggiano nei sistemi naturali e agricoli. Quindi, per sostenere un'elevata produttività agricola vengono utilizzati i fertilizzanti sintetici, come l'urea o il nitrato di ammonio, che sono le principali fonti di N applicate alle colture e rappresentano fino al 50% dei costi operativi in agricoltura. È noto che la maggior parte delle piante coltivate a cereali, come grano, riso e mais, utilizza solo il 30–40% dei fertilizzanti azotati applicati, mentre il resto rimane inutilizzato e viene quindi perso per lisciviazione nel terreno o rilasciato nell'atmosfera sotto forma di gas azotati (N_2 , N_2O), causando un grave inquinamento ambientale. L'eccesso di N residuo può causare l'eutrofizzazione dei sistemi terrestri e acquatici, può essere trasformato in diverse forme chimiche nell'ambiente, portando a diversi effetti che oltre ad essere negativi sull'ambiente, possono avere conseguenze negative per la salute dell'uomo (de Vries, 2021). Queste preoccupazioni hanno portato da un lato all'esigenza di definire itinerari tecnici, coerenti con le direttive europee in materia di agricoltura conservativa e di sostenibilità ambientale del comparto agricolo, e dall'altro alla necessità di

incrementare l'efficienza dell'azoto delle colture. L'organizzazione mondiale della sanità ha inoltre fissato dei limiti specifici sulla quantità di nitrati nell'acqua potabile. Pertanto, l'utilizzo di N nelle colture impone una problematica alquanto paradossale: da un lato è essenziale per sostenere un'elevata produttività agricola, dall'altro è pericoloso perché è inquinante e può generare gravi conseguenze a livello ambientale e di salute.

GENETICA (ASPORTAZIONI DI AZOTO, RISPOSTA A STRESS ABIOTICI)

Il termine stress, riferito ad un organismo vegetale, è definibile come un evento temporale che può, potenzialmente, modificare negativamente le funzioni della pianta, quali la crescita o la riproduzione. Lo stress può avere natura differente e, nel contesto biologico, può essere affrontato in diversi modi dalle piante. Lo stress ricevuto da un organismo vegetale si classifica, in base all'origine della perturbazione, in due insiemi: stress biotico e stress abiotico. Lo stress biotico deriva dall'azione di organismi terzi alla pianta, ad esempio parassiti, a differenza dello stress abiotico la cui causa è rappresentata da carenze o eccessi di sostanza abiotiche, quali i nutrienti o l'acqua. In generale le condizioni ambientali che possono causare stress comprendono quindi fenomeni di allagamento o di siccità, eccesso di salinità nel suolo, alte e basse temperature, contenuto non adeguato di minerali nel suolo, troppa o poca luce e inquinamento ambientale (Nakabayashi et al., 2015). Le risposte degli organismi vegetali agli stress possono variare notevolmente poiché influenzate da svariati fattori, in particolare dalle caratteristiche dello stress (severità, durata e tempo di esposizione) e dalle caratteristiche della pianta (organo o tessuto, stadio dello sviluppo e genotipo). Sotto

l'influenza di questi fattori la pianta risponde agli stress essenzialmente in due modi: sviluppa resistenza o resilienza, quindi sopravvive e riesce a svilupparsi, oppure diventa suscettibile allo stimolo stressante e di conseguenza muore. I meccanismi di resistenza comprendono la prevenzione dell'esposizione allo stress, la tolleranza dello stress e in generale, se la condizione stressante viene raggiunta in modo progressivo, la pianta può andare incontro al fenomeno chiamato "acclimatazione", ossia modifica il proprio stato fisiologico in risposta allo stress. La condizione stressante può essere quindi contrastata dall'organismo vegetale mediante l'espressione di geni coinvolti nella specifica risposta, la modifica del proprio metabolismo e la variazione qualitativa e quantitativa della crescita. Lo stress vegetale è valutato attentamente in campo industriale su larga scala, ad esempio nel contesto di produzione di un determinato tipo di pianta. I piani di produzione devono essere messi a punto cercando di limitare il più possibile la presenza di stress abiotici e di garantire il corretto apporto di nutrienti. Gli agricoltori sanno da tempo che spesso è il verificarsi simultaneo di diversi stress abiotici, piuttosto che una specifica condizione di stress, che è più letale per le colture. Studi recenti hanno

rivelato che la risposta delle piante a una combinazione di due diversi stress abiotici è unica e non può essere estrapolata direttamente dalla risposta delle piante a ciascuno dei diversi stress applicati individualmente. I risultati di questi studi suggeriscono che ogni condizione di stress abiotico richiede una risposta di acclimatazione unica, adattata alle esigenze specifiche della pianta, e che una combinazione di due o più stress diversi potrebbe richiedere una risposta che è anche unica (Mittler, 2006). Una delle condizioni di stress che da anni richiama l'attenzione di molti ricercatori e agricoltori è quella dovuta alla carenza di N nelle colture. L'N è un nutriente minerale essenziale per la crescita delle piante poiché è un componente importante della clorofilla e degli amminoacidi, che costituiscono le proteine. Perciò la sua disponibilità, o la sua mancanza influenza la crescita e lo sviluppo delle piante, la resa delle colture e la produzione primaria su scala planetaria (Rodrigo et al., 2012).

GENI IMPLICATI NELLA RISPOSTA AGLI STRESS: SUPERFAMIGLIA DEI FATTORI DI TRASCRIZIONE MYB

I fattori di trascrizione (FT) riconoscono generalmente piccole sequenze di DNA contenute nei promotori dei geni. Alcuni di questi fattori e di queste sequenze sono comuni a più promotori e sono utilizzati in maniera costitutiva; altri sono specifici e la loro attività è regolata.

I fattori di trascrizione che cooperano con la RNA polimerasi II possono essere divisi in tre gruppi:

- **I fattori di trascrizione generali** sono necessari per l'inizio della sintesi dell'RNA di tutti i geni di classe II (geni che codificano per proteine). Essi formano con la RNA polimerasi II un complesso in prossimità del punto di inizio della trascrizione, determinando il sito d'inizio; questo complesso è chiamato complesso basale di trascrizione.
- **I fattori di trascrizione “upstream”** sono proteine che riconoscono corte sequenze di consenso di DNA localizzate a monte del sito d'inizio della trascrizione. Questi fattori sono ubiquitari ed agiscono aumentando l'efficienza della trascrizione dei geni target.

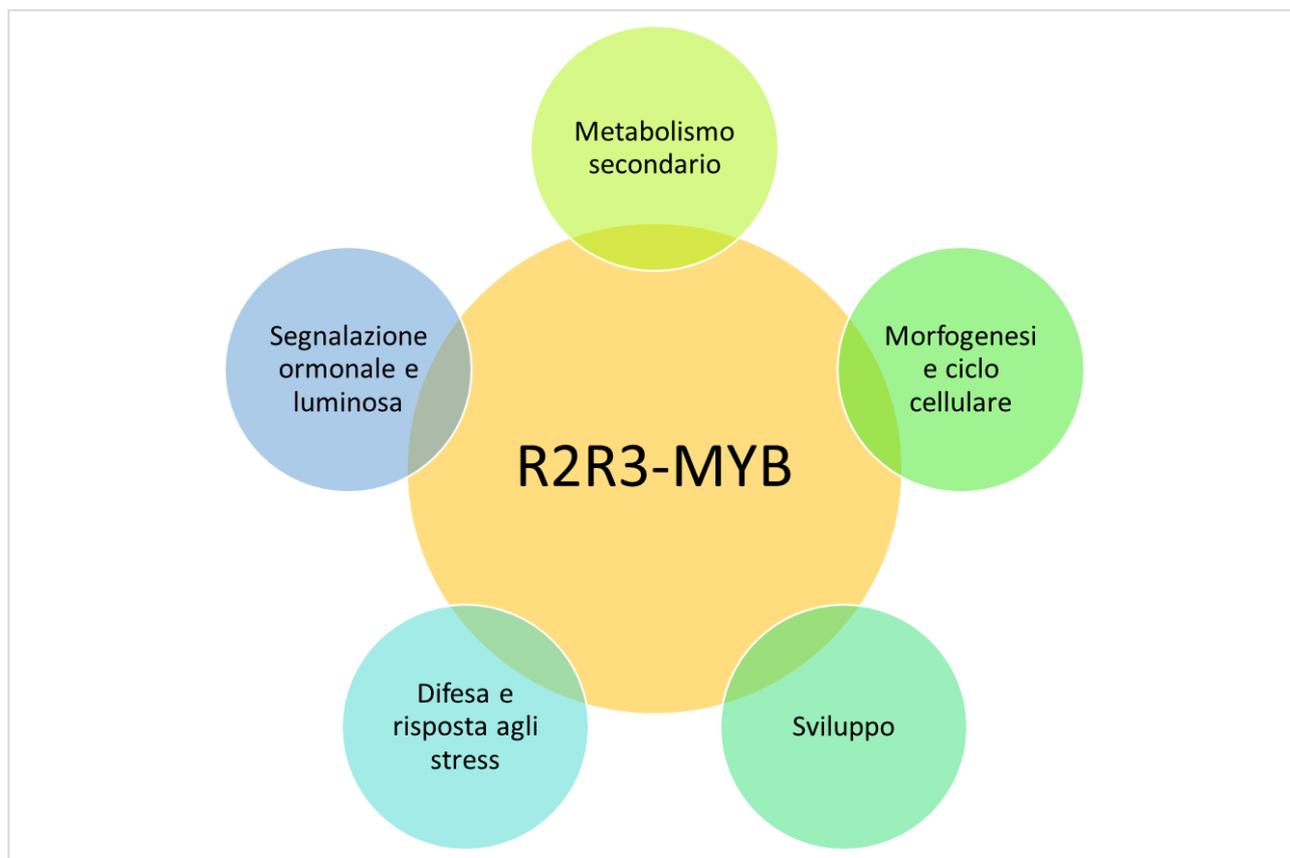
- **I fattori di trascrizione inducibili** funzionano allo stesso modo dei fattori "upstream", ma possiedono un ruolo regolatore. Essi sono sintetizzati o attivati in maniera tessuto-specifica e riconoscono sequenze chiamate elementi di risposta.

I geni della superfamiglia dei fattori di trascrizione MYB (FT MYB) contengono un dominio conservato di legame del DNA chiamato "DNA-binding domain" (DBD). Il dominio di legame del DNA MYB è costituito da ripetizioni imperfette, R1, R2 e R3, ciascuna contenente 50-53 amminoacidi che formano un'architettura molto simile. Ogni ripetizione, contenente tre α -eliche ben definite, forma una variante del motivo "helix-turn-helix" con tre residui di triptofano regolarmente distanziati tra la seconda e la terza elica, che formano un core idrofobico all'interno della struttura. La terza elica di R2 e R3 è coinvolta nel riconoscimento di basi specifiche del DNA, con il quale interagisce direttamente per formare una struttura stabile. La superfamiglia MYB, nelle piante, può essere suddivisa in tre sottofamiglie in base al numero di "R" nei geni MYB, denominate R-related (1R), R2R3-MYB (2R), e R1R2R3-MYB (3R) (Stracke et al., 2001).

LA SOTTOFAMIGLIA R2R3-MYB

Più di 80 geni R2R3-MYB sono stati inizialmente identificati nel genoma di *Arabidopsis thaliana*, che rappresentano il principale contributo alle grandi dimensioni della famiglia MYB (Romero et al., 1998). Nel corso degli anni, grazie a numerosi studi e al progresso di nuove tecnologie "omiche", questi dati sono stati continuamente aggiornati in *Arabidopsis* e confermati in altre specie vegetali, tra cui la vite (*Vitis vinifera*), la petunia (*Petunia hybrida*), melo (*Malus domestica*), mais (*Zea mays*), riso (*Oryza sativa*), grano tenero (*Triticum aestivum*) (Dubos et al., 2010; Du et al., 2015; Jiang and Rao, 2020; Wei et al., 2020; Xiao et al., 2020). La molteplicità dei geni R2R3-MYB è correlata alla diversità funzionale di questi geni nelle piante. In effetti, il loro coinvolgimento in diversi processi vegetali specifici, come il metabolismo secondario, il ciclo cellulare, lo sviluppo e le risposte a stress biotici e abiotici, è stato ora confermato in diversi studi (Stracke et al., 2001; Dubos et al., 2010; Blanco et al., 2018; Millard et al., 2019; Blanco et al., 2022) (Figura 1).

Figura 1 | Funzioni principali dei geni R2R3-MYB



L'implicazione dei FT MYB nei meccanismi di tolleranza allo stress abiotico è particolarmente interessante per l'allevamento delle colture, poiché condizioni ambientali avverse, come siccità, elevata salinità, alta o bassa temperatura, assenza o eccesso di nutrienti in genere, possono influire negativamente sulla crescita e sulla produttività (Mittler, 2006; Zhang et al., 2012a). Pertanto, negli ultimi anni, i ricercatori stanno concentrando sempre più i loro studi sull'identificazione di FT MYB coinvolti nella tolleranza allo stress in *Arabidopsis* e nelle specie di colture (An et al., 2018; Zhao et al., 2019; Deng et al., 2020; Fang et al.,

2020; Wang et al., 2020; Zhang et al., 2020; Zhao et al., 2020b). Nei cereali, diversi studi mostrano l'implicazione dei FT MYB nella risposta allo stress abiotico. Ad esempio, il gene TaMYB30-B di grano migliora la tolleranza allo stress da siccità nell'*Arabidopsis* transgenica attraverso la regolazione dei geni reattivi allo stress (Zhang et al., 2012b). La sovra-espressione di OsMYB55 del riso ha portato a una migliore crescita delle piante allevate ad alta temperatura attraverso la regolazione di vari geni coinvolti nel metabolismo degli aminoacidi, tra cui la glutammina sintetasi (OsGS1;2), la glutammina amidotransferasi (GAT1) e la glutammato decarbossilasi 3 (GAD3) (El-kereamy et al., 2012). La sovraespressione di TaODORANT1 del grano ha determinato una up-regolazione dell'espressione di diversi geni correlati allo stress in risposta sia alla siccità che allo stress salino nel tabacco transgenico (Wei et al., 2017). La sovra-espressione di TaMpc1-D4 di grano ha ridotto la tolleranza alla siccità nell'*Arabidopsis* transgenica mentre il suo silenziamento al contrario, ha aumentato la tolleranza alla siccità (Li et al., 2020a2020b). La sovra-espressione di TaMYB344 nel tabacco transgenico ha aumentato la tolleranza alla siccità, al calore e allo stress salino (Wei et al., 2020). Inoltre, è stato riscontrato che diversi geni MYB

sono regolati dalla mancanza di N nel grano (Curci et al., 2017; Wang et al., 2019).

La pubblicazione del genoma tetraploide (AABB) completamente assemblato della cultivar di grano duro Svevo (Maccaferri et al., 2019) offre l'opportunità di studiare le famiglie geniche su scala genomica.

Il presente studio ha avuto l'obiettivo di indagare la risposta molecolare ed eco-fisiologica del frumento duro agli stress abiotici, mimando condizioni particolarmente probabili in molte aree coltivabili ed in particolare nelle aree del Mediterraneo. A tale scopo, sono stati perseguiti due diversi approcci sperimentali con l'obiettivo comune di ampliare la conoscenza delle risposte di questa specie ai diversi stimoli stressanti in condizioni controllate di laboratorio e, in condizioni reali di campo, ovvero influenzate dall'ambiente di crescita circostante con caratteristiche pedoclimatiche variabili.

Il primo approccio sperimentale, seguito grazie alla collaborazione con il gruppo di ricerca dell'Istituto di Bioscienze e Biorisorse del CNR di Bari (IBBR-CNR), sotto la supervisione della Dott.ssa Gabriella Sonnante, ha previsto lo svolgimento di indagini accurate sul frumento duro in

condizioni di crescita controllate di laboratorio, con l'obiettivo di identificare i fattori di trascrizione R2R3-MYB coinvolti nella regolazione della risposta a diverse tipologie di stress abiotico. A questo scopo, abbiamo eseguito un'identificazione della famiglia genica R2R3-MYB nell'intero genoma nel grano duro e ci siamo concentrati su otto geni selezionati in base alla comparazione proteo-genomica con *Arabidopsis* e riso, analizzando quindi la loro espressione in diverse condizioni di stress, volutamente indotte, tra cui salinità, siccità e privazione di N. Inoltre, abbiamo esplorato le dinamiche regolatorie di questi geni per identificare bersagli genetici che potrebbero essere utili per il miglioramento genetico del frumento duro.

Il secondo filone sperimentale invece, seguito sotto la supervisione del Prof. Michele Perniola del dipartimento delle culture europee del mediterraneo (DICEM) dell'Università della Basilicata, ha avuto come obiettivo la valutazione dell'adattamento fisiologico di diverse varietà di frumento duro in condizioni di stress nutrizionale in ambienti colturali idonei e non. A tale scopo sono state coltivate quattro varietà di frumento duro, di cui due moderne, Marco Aurelio e Kanakis; una degli anni Settanta, Svevo; e una antica, Senatore Cappelli. I quattro genotipi

sono stati coltivati in due siti sperimentali con caratteristiche intrinseche differenti (clima, suolo ecc...) e alla raccolta sono state valutate la risposta produttiva e qualitativa in relazione a due diverse condizioni di concimazione: concimazione azotata standard e assenza di concimazione azotata.

MATERIALI E METODI

R2R3-MYB NEL GRANO DURO: IDENTIFICAZIONE NELL'INTERO GENOMA, CLUSTER POACEAE-SPECIFICI, ESPRESSIONE E DINAMICHE REGOLATORIE IN CONDIZIONE DI STRESS ABIOTICI.

IDENTIFICAZIONE E ANALISI FILOGENETICA DEI GENI R2R3-MYBS NEL FRUMENTO DURO

Per identificare i FT R2R3-MYB nel grano duro, le sequenze proteiche MYB di *Arabidopsis* e di riso sono state scaricate dal Database Plant FT (PTFD, <http://plantfdb.gao-lab.org/>; Jin et al., 2017) e utilizzate come “query” per la ricerca delle sequenze genomiche di grano duro cv. Svevo (disponibile su <https://wheat.pw.usda.gov/jb/?data=/ggds/whe-svevo2018>), di *A. thaliana* (e-value 1E-90, 80% di copertura) e *O. sativa* subsp. *japonica* (e-value 1E-50, 60% di copertura), separatamente.

È stato utilizzato il profilo Hidden Markov Model (HMM) per il dominio di legame del DNA MYB PF00249 (<http://pfam.xfam.org/family/PF00249>) come “query” per eseguire l'analisi HMMER (HMMER 3.1b2; <http://hmmer.org/download.html>, valore e-cutoff: 0.01) contro (1) l'output del BLAST precedente e (2) tutte le proteine MYB annotate

(<https://wheat.pw.usda.gov/jb/?data=/ggds/whe-svevo2018>). Il

risultato finale dell'analisi HMMER è stato verificato successivamente per la presenza e l'integrità dei domini DBD MYB, caratterizzati utilizzando il database di dominio conservato (CDD) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Lu et al., 2020).

Per selezionare solo i presunti FT R2R3-MYB, è stato eseguito un allineamento di sequenza multipla (MSA) con il servizio online MAFFT (versione 7; <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>; Katoh et al., 2019) con il programma L-INS-i. Le sequenze amminoacidiche a lunghezza intera selezionate sono state allineate con le sequenze dei FT MYB di *Arabidopsis*, recuperate da Plant TFDB e annotate secondo Katiyar et al. (2012) e Jiang e Rao (2020). Per confermare la presenza di ripetizioni sia R2 che R3 è stato eseguito il controllo manuale utilizzando Jalview (Waterhouse et al., 2009), mentre le sequenze con ripetizioni MYB incomplete e/o prive di più di due residui di triptofano altamente conservati sono state scartate (Yanhui et al., 2006; Du et al., 2015). Inoltre, dalle analisi è stata rimossa la sequenza TRITD3Av1G223560 per la presenza di basi ambigue nella sua sequenza CDS e per l'espressione molto bassa (< 1TPM).

I domini R2R3 di putativi R2R3-MYB di grano duro sono stati estratti e allineati con MAFFT (L-INS-i) per generare loghi di sequenza. Le posizioni degli amminoacidi iniziali e finali di R2R3 sono state annotate e le relative posizioni dei nucleotidi sono state localizzate sia sulla sequenza codificante che su quella genomica.

Sono stati eseguiti studi filogenetici basati su analisi di massima verosimiglianza (ML) utilizzando W-IQ-TREE (Trifinopoulos et al., 2016), con 1000 repliche bootstrap ultraveloci. Gli alberi filogenetici sono stati importati e annotati con iTOL v6 (Letunic and Bork, 2019).

I geni unici appartenenti ai cladi specifici delle Poaceae (Jiang e Rao, 2020) sono stati identificati attraverso la ricerca nel database PLAZA 4.5 per l'identificazione della famiglia genica ortologa (Van Bel et al., 2018).

La ricerca del motivo, il confronto e l'arricchimento sono stati eseguiti con universalmotif (Tremblay, 2019) e MEME suite (Bailey et al., 2015). I membri identificati sono stati infine filtrati mediante un'ispezione manuale dell'integrità dei domini R2R3.

ANALISI WEBLOGO E MEME

Una rappresentazione grafica per la distribuzione degli amminoacidi delle ripetizioni MYB R2 ed R3 del grano duro è stata generata tramite l'invio della sequenza multipla MAFFT L-INS-i dei domini R2R3 a WebLogo con parametri predefiniti (Crooks et al., 2004).

MEME (Bailey et al., 2015) è stato utilizzato per identificare i motivi ausiliari R2R3-MYB conservati in grano duro, impostando il numero massimo di motivi a 36, con una larghezza minima di sei e una larghezza massima di 53 amminoacidi, mentre gli altri parametri sono stati impostati sui valori predefiniti.

POSIZIONE CROMOSOMICA, STRUTTURA GENICA, PROPRIETÀ PROTEICHE E LOCALIZZAZIONE CELLULARE

La lunghezza di ciascun cromosoma e la posizione cromosomica dei geni R2R3-MYB identificati sono state ottenute da Ensembl Plants (Yates et al., 2022), utilizzando biomaRt (Durinck et al., 2009). Sulla base di queste informazioni, chromoMap (v0.2) (Anand e Rodriguez Lopez, 2022) è stato utilizzato per creare una mappa fisica cromosomica, sulla quale sono stati localizzati ed annotati i geni identificati. I FT di grano duro R2R3-MYB appena identificati sono stati nominati in base alla loro posizione cromosomica nel genoma A, B o U (non annotato), e dal cromosoma 1 a 7.

Le strutture esone/introne sono state visualizzate con Gene Structure Display Server (GSDS) (Hu et al., 2015), utilizzando le sequenze codificanti (CDS) e le corrispondenti sequenze genomiche recuperate da Ensembl Plants.

Le sequenze proteiche sono state utilizzate per prevedere il punto isoelettrico (pI) e il peso molecolare (Mw) di ciascun fattore di trascrizione R2R3-MYB di grano duro utilizzando lo strumento ExPASy-Compute pI/Mw (Artimo et al., 2012). La localizzazione subcellulare di

ciascuna proteina è stata prevista utilizzando il server CELLO v2.5 (Yu et al., 2004, 2006).

MATERIALE VEGETALE E CONDIZIONI DI CRESCITA

In questo studio è stata utilizzata la varietà di grano duro Svevo (CIMMYT Selection/Zenit, registrato nel 1996, codice 4417 del Catalogo Italiano, Ministero delle Politiche Agricole e Forestali-MIPAAF). I semi sono stati riposti in capsule di Petri con carta da filtro bagnata e mantenuti a 4°C per la germinazione. Dopo dieci giorni, le piantine sono state spostate in una camera di crescita e sottoposte a 8 ore di luce a 13°C e 16 ore di buio a 11°C, con un'umidità relativa (UR) del 50% per tre giorni. Quando gli epicotili avevano raggiunto le dimensioni di 0,5 cm, le piantine sono state trasferite in vasi contenenti l'80% di agriperlite e il 20% di argilla espansa e coltivate in un sistema idroponico. È stata quindi preparata una soluzione nutritiva standard come in Curci et al. (2017) e contenente 0,1 mM KH_2PO_4 , 0,65 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,75 mM K_2SO_4 , 10 mM H_3BO_3 , 1 mM MnSO_4 , 1 mM ZnSO_4 , 5 mM CuSO_4 , 0,05 mM $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 100 mM Fe-EDTA. L'apparato radicale è stato mantenuto immerso nella soluzione nutritiva, che è stata continuamente aerata con una pompa ad aria, mantenuta a pH 5,7 con 0,1 N H_2SO_4 e rinfrescata ogni due giorni. Per il test di stress salino, 72 piante di Svevo (3 piante per vaso, per ogni replica biologica) sono state

coltivate per circa 2 settimane nelle condizioni di cui sopra, fino al raggiungimento dello stadio di crescita Z14 (Zadoks et al., 1974). In questa fase di sviluppo, le piante sono state divise in due gruppi: 36 piante sono state trasferite in una soluzione di NaCl 250 mM, al fine di indurre stress da salinità, e le altre 36 piante sono state mantenute nella soluzione nutritiva standard come piante di controllo. Per l'esperimento di stress da siccità, è stata seguita la stessa procedura per far crescere 72 piante fino al raggiungimento dello stadio Z14. Successivamente, 36 piante sono state trasferite in una soluzione di PEG 6000 al 16,1%, contenente il 10% di soluzione di macronutrienti, lo 0,1% di soluzione di micronutrienti, 161 g/L di PEG 6000 e 0,6 ml di acido solforico per raggiungere il pH desiderato. Le altre 36 piante sono rimaste nella soluzione nutritiva standard. Per eseguire l'esperimento sul deficit di N, le piante sono state inizialmente coltivate come sopra in condizioni N standard (Zuluaga et al., 2018). Nella fase Z14, metà delle piante è stata trasferita in una soluzione priva di N, dove $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ è stato sostituito con 1,77 mM di $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, al fine di imporre uno stress N a breve termine come descritto in Zuluaga et al. (2018). Radici e foglie sono state raccolte sia dalle piante di controllo che da quelle stressate

a 2, 6, 12 e 24 ore dopo il trattamento con stress salino o siccità e a 6, 12, 24 e 48 ore dopo l'astinenza da N, immediatamente congelate in azoto liquido e conservate in $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ prima dell'uso.

PCR QUANTITATIVA – qPCR

L'RNA totale è stato estratto da radici e foglie delle piantine stressate (NaCl, PEG o N) e da quelle delle corrispondenti piantine di controllo, utilizzando il kit *NucleoSpin RNA Plant* (Macherey-Nagel, Düren, Germania) e trattato con *rDNAse* (Macherey-Nagel, Germania) secondo le specifiche del produttore. La concentrazione di RNA è stata determinata utilizzando lo spettrofotometro *NanoDrop ND-1000* (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Per la sintesi del cDNA, è stato retro-trascritto 1 µg di RNA totale utilizzando il kit *PrimeScript RT reagent kit with gDNA eraser* (Takara Bio, Inc., Otsu, Giappone). Utilizzando il programma Primer3Plus ([https://primer3plus.com/;](https://primer3plus.com/)) sono state disegnate le coppie di primer (Tabella 1), la cui specificità è stata confermata con sequenziamento Sanger standard degli ampliconi ottenuti. Per la PCR quantitativa (qPCR), il volume totale per ciascuna reazione era di 10 µl, contenente 5 µl di *PowerUp SYBR Green Master Mix* (ThermoFisher, Vilnius, Lituania), 0,5 µl di cDNA e 200 nmol di ciascun primer, normalizzando il volume con acqua distillata. Il gene che codifica per la proteina inibitrice della RNasi L (RLI(a)), precedentemente testato per la stabilità nel nostro materiale sperimentale, è stato utilizzato come riferimento

interno (Curci et al., 2017, 2018; Zuluaga et al., 2017, 2018). La quantificazione genica è stata eseguita utilizzando il sistema *StepOnePlus Real-Time PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Le condizioni del ciclo termico sono state impostate nella seguente modalità: 95°C per 3 min, seguiti da 40 cicli di 95°C per 15 s e 60°C 30 s, con acquisizione dei dati di fluorescenza a 60°C. L'analisi della curva di Melting è stata eseguita per verificare la specificità delle sequenze amplificate. In totale sono state analizzate tre repliche biologiche, ciascuna con tre repliche tecniche e ogni esperimento di qPCR è stato ripetuto due volte per accertare l'affidabilità dei risultati. I dati lineari sono stati normalizzati rispetto al Ct medio del gene RLI(a) e il rapporto di espressione relativa è stato calcolato utilizzando il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001) ad ogni tempo selezionato e per ciascun campione stressato rispetto al corrispondente controllo (campione non stressato). È stata calcolata la deviazione standard ed è stato eseguito il test t di Student per la significatività statistica.

Tabella 1 | Coppie di primer utilizzate per l'analisi di espressione qPCR

ID gene	Nome gene	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	Lunghezza (bp)
TRITD6Av1G075070.1	TdMYB1A002	CGCGCCAGGACGAGGAT	GCGCCGGTGGAGGAGA	135
TRITD5Bv1G041300.1	TdMYB2A023	GTCACCCTCATCATCTTCATC	GCAGGCGTGCCCTTCAAT	135
TRITD2Bv1G181360.1	TdMYB2B143	GACGTGCTGGACTTCCTGTG	GACCATACTCCTCGCTCGT	98
TRITD4Av1G058610.1	TdMYB4A063	CATATGCGACACGGACCAG	AAGCTGCCCATCTCGAAGTC	129
TRITD4Bv1G183820.1	TdMYB4A064	GGAGGAGACGCAGATGAGTG	ACTTGACCCAGTCCCAGTCC	127
TRITD4Av1G135660.2	TdMYB4B184	GAGGGGACTGGATGCAGGAA	AGCCGAAACGCCGACGTC	140
TRITD2Av1G077240.1	TdMYB5B189	CCCACGACCGAACAGCAG	GCACCATGTGATCCTGGTGTA	187
TRITD1Av1G026820.1	TdMYB6A089	GATGGCTCGATGATGCAGTG	CCGAACTCAAAGTCCGGGATA	137
	RLI(a)	TTGAGCAACTCATGGACCAG	GCTTTCCAAGGCACAAACAT	84

NETWORK REGOLATORI DEI GENI TDR2R3-MYB IN CONDIZIONI DI STRESS ABIOTICO

È stato eseguito uno screening approfondito della letteratura scientifica per recuperare esperimenti di RNA-seq del grano duro su stress abiotici con disponibilità di dati grezzi sul database *Sequence Read Archive* (SRA). I dati grezzi di RNA-Seq ottenuti sono stati elaborati con *Trimmomatic* (v0.38) (Bolger et al., 2014) per eseguire le analisi di *Adapter clipping* e *Quality trimming*. Il programma *Kallisto* (v0.44.0) (Bray et al., 2016) è stato utilizzato per quantificare i livelli di espressione genica con valori normalizzati in trascritti per milione (TPM). Per eseguire il *clipping* con *Trimmomatic*, la dimensione della *sliding window* è stata impostata su 4 e le discrepanze sono state impostate su 2. Per il *trimming*, abbiamo impostato la *simple clip threshold* su 10 e la richiesta di qualità minima su 15. A seguito del controllo di qualità, le letture inferiori a 32 bp sono state scartate. Per il programma *Kallisto*, è stato creato un indice per i trascritti del grano duro cv. Svevo (Maccaferri et al., 2019) con una dimensione k-mer di 31, una lunghezza media del frammento impostata su 200 e la deviazione standard impostata su 20. Il set di dati di espressione risultante è stato utilizzato per la visualizzazione dell'espressione genica, mantenendo solo i geni espressi (TPM > 5 in almeno un campione) e gli studi con replicati biologici (≥ 3). Per questi esperimenti sono state eseguite delle analisi di espressione differenziale mediante il pacchetto *R DESeq2* (Love et al., 2014) (utilizzando conteggi

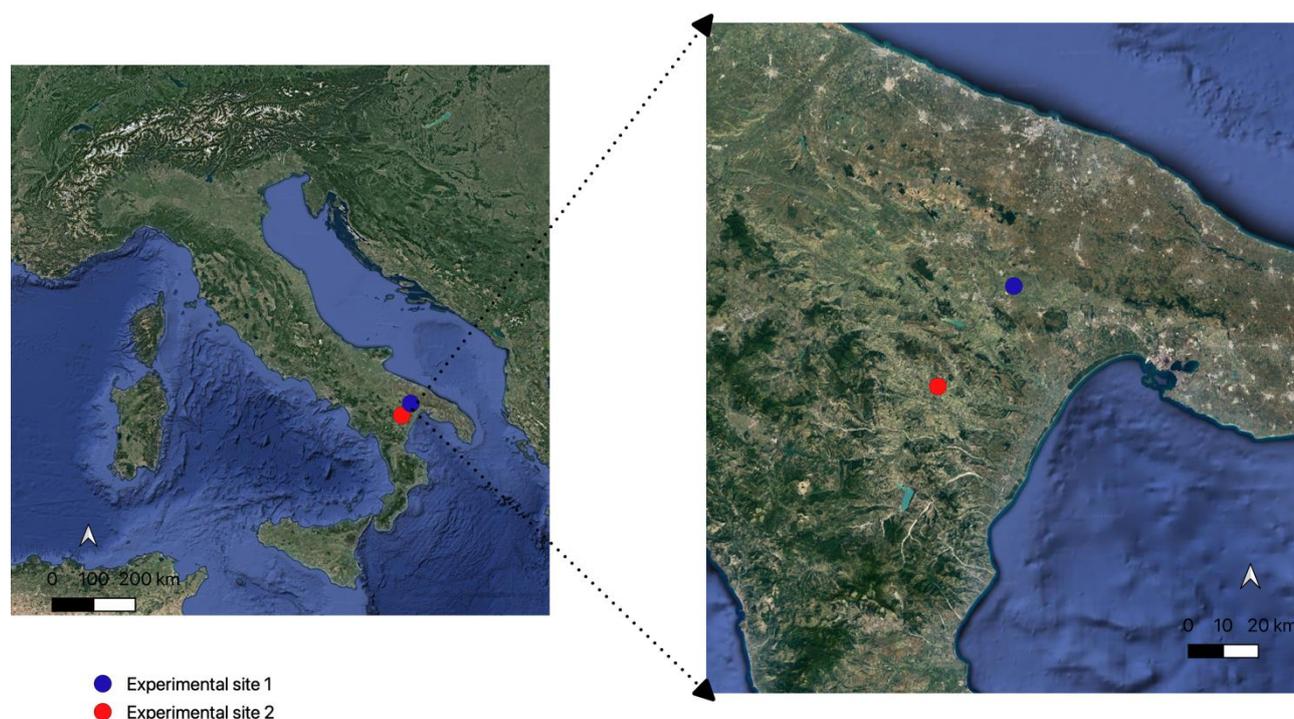
anziché TPM). I geni sono stati considerati espressi in modo differenziale se up- o downregolati > 2 volte con un valore P corretto con FDR < 0,05. Per l'inferenza del network sono stati utilizzati tutti i campioni trattati, mantenuti i geni espressi, e il set di dati, incentrato sullo stress risultante, è stato fornito come input a *GENIE3* per costruire il network di regolazione genica (*GRN, Gene Regulatory Network*) (Irrthum et al., 2010). Per definire i geni regolatori da fornire come input per *GENIE3*, i fattori di trascrizione del grano duro sono stati predetti utilizzando lo strumento online PlantTFDB v5.0 (<http://planttfdb.gao-lab.org/prediction.php>). Le informazioni sull'ortologia e l'annotazione funzionale sono state invece ottenute da *PLAZA Monocots 4.5* (Van Bel et al., 2018) e l'arricchimento funzionale eseguito con *GOfuncR* (Grote, 2022) concentrandosi sui processi biologici (BP) ed escludendo termini GO BP molto generali e troppo specifici ($10 \leq$ numero di geni annotati per categoria ≤ 1000). L'annotazione funzionale è stata riassunta con *REVIGO* (Supek et al., 2011). Per studiare i fenotipi vegetali dei bersagli del GRN, il database *RARGE II* (Akiyama et al., 2014) è stato sottoposto a screening per esplorare l'esistenza di linee mutanti per i geni bersaglio previsti e l'eventuale presenza di cambiamenti significativi nei caratteri fenotipici nei mutanti rispetto ai controlli.

PROVA AGRONOMICA VARIETALE

VARIETÀ E SITI SPERIMENTALI

Quattro genotipi di frumento duro, di cui due moderni: Marco Aurelio e Kanakis; uno degli anni Settanta: Svevo e uno antico: Senatore Cappelli, sono stati coltivati durante la stagione 2020-2021 (dicembre 2020-luglio 2021) in due siti sperimentali differenti (Figura 2).

Figura 2 | Siti sperimentali. Sito sperimentale 1 in agro Matera (blu); sito sperimentale 2 in agro Ferrandina (rosso).



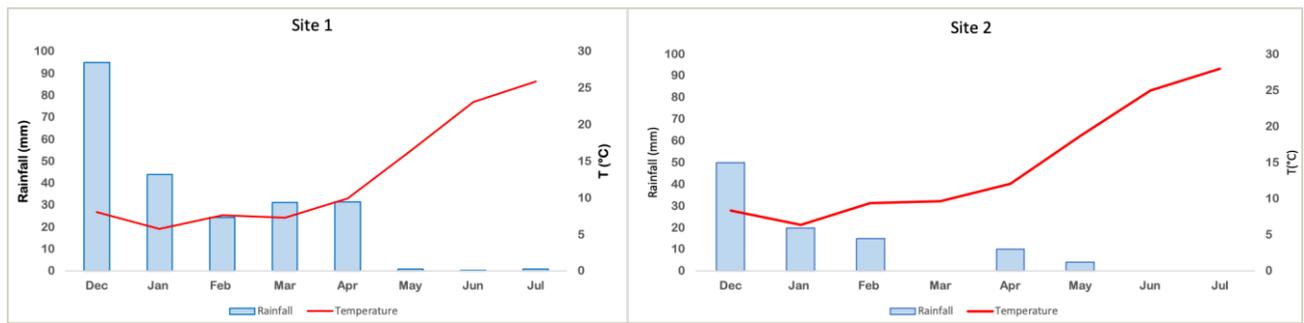
I due siti sono stati scelti con la finalità di coltivare le quattro varietà in due aree di studio con caratteristiche pedoclimatiche differenti. Il sito 1, in agro di Matera ($40^{\circ} 42'12.1''$ N $16^{\circ} 42'31.0''$ E), possiede caratteristiche favorevoli: buona attitudine alla coltivazione del

frumento duro e buone condizioni climatiche: le temperature medie trentennali oscillano tra i 5,4 °C del mese più freddo (gennaio) e i 24,6 °C del mese più caldo (luglio) e le precipitazioni totali medie trentennali del periodo di coltivazione del frumento (novembre-luglio) sono pari a 634 mm. Il suolo del sito di Matera presenta buone caratteristiche fisico chimiche ed è inoltre caratterizzato da un buon drenaggio (Tabella 2). Il sito 2, in agro di Ferrandina (40° 26'50.0" N 16° 26'46.0" E), è caratterizzato da condizioni marginali: suoli poco fertili a tessitura argillosa, mal drenati (Tabella 2), e caratterizzati in aggiunta da condizioni climatiche sfavorevoli: le temperature medie trentennali oscillano tra i 5,8 °C del mese più freddo (gennaio) e i 28,2 °C del mese più caldo (luglio) e le precipitazioni totali medie trentennali del periodo di coltivazione del frumento (novembre-luglio) sono pari a 334 mm. In Figura 3 è riportato l'andamento climatico del periodo di prova che conferma il diverso andamento climatico dei due areali, anche se con un andamento, in entrambe i siti, sensibilmente più siccitoso rispetto alla media trentennale, particolarmente nel periodo primaverile.

Tabella 2 | Parametri di riferimento relativi alle caratteristiche del suolo dei due siti sperimentali

Parametri di riferimento	Sito 1	Sito 2
Azoto tot.	1,9 g/kg	0,7 g/kg
fosforo assimilabile	15 mg/kg	2,5 mg /kg
C/N	6,6	48,5
Argilla %	43,2	58,3
Sabbia %	37,4	6,8
Limo %	19,6	34,9

Figura 3 | Andamento climatico nei due siti sperimentali



SEMINA E ANALISI DEL RACCOLTO

Per la semina delle 4 varietà nei due siti sperimentali sono state utilizzate interfile di 0,13 m e 250 kg/ha di semi. La lavorazione del terreno è consistita in un'aratura di 40 cm e due erpicature per preparare il letto di semina; Durante il ciclo colturale sono state eseguite le pratiche agronomiche standard per la coltivazione del frumento duro in Basilicata.

Per valutare la risposta agronomica delle diverse varietà oggetto di studio, per ogni singola varietà sono state isolate parcelle di 2x2 m² replicate tre volte, in queste parcelle non è stata applicata nessuna dose di concime azotato (N 0); su tutto l'appezzamento, contrariamente, è stata distribuita una dose di concime pari a 120 kg/ha di N, che corrisponde alla quantità generalmente applicata dall'agricoltore in queste aree. Alla raccolta, è stata determinata la produzione di granella, le sue componenti e le principali caratteristiche qualitative (contenuto proteico, peso specifico, indice di glutine, indice di giallo) mediante lo strumento FOSS Infratec 1241.

ANALISI STATISTICA DELLA VARIANZA

Il set di dati è stato testato secondo i presupposti di base dell'analisi della varianza (ANOVA). La distribuzione normale dell'errore sperimentale e la varianza sono state verificate attraverso i test di Shapiro-Wilk e Levene. La significatività statistica della differenza tra le medie è stata determinata utilizzando il test post hoc della differenza di significatività di Tukey al livello di probabilità del 5%. L'analisi ANOVA è stata eseguita utilizzando "il pacchetto lme4" del software statistico "R", versione 3.6.3 (R Core Team, 2018).

RISULTATI

R2R3-MYB NEL GRANO DURO: IDENTIFICAZIONE NELL'INTERO GENOMA, CLUSTER POACEAE-SPECIFICI, ESPRESSIONE E DINAMICHE REGOLATORIE IN CONDIZIONE DI STRESS ABIOTICI

IDENTIFICAZIONE DEI FATTORI DI TRASCRIZIONE R2R3-MYB NEL FRUMENTO DURO

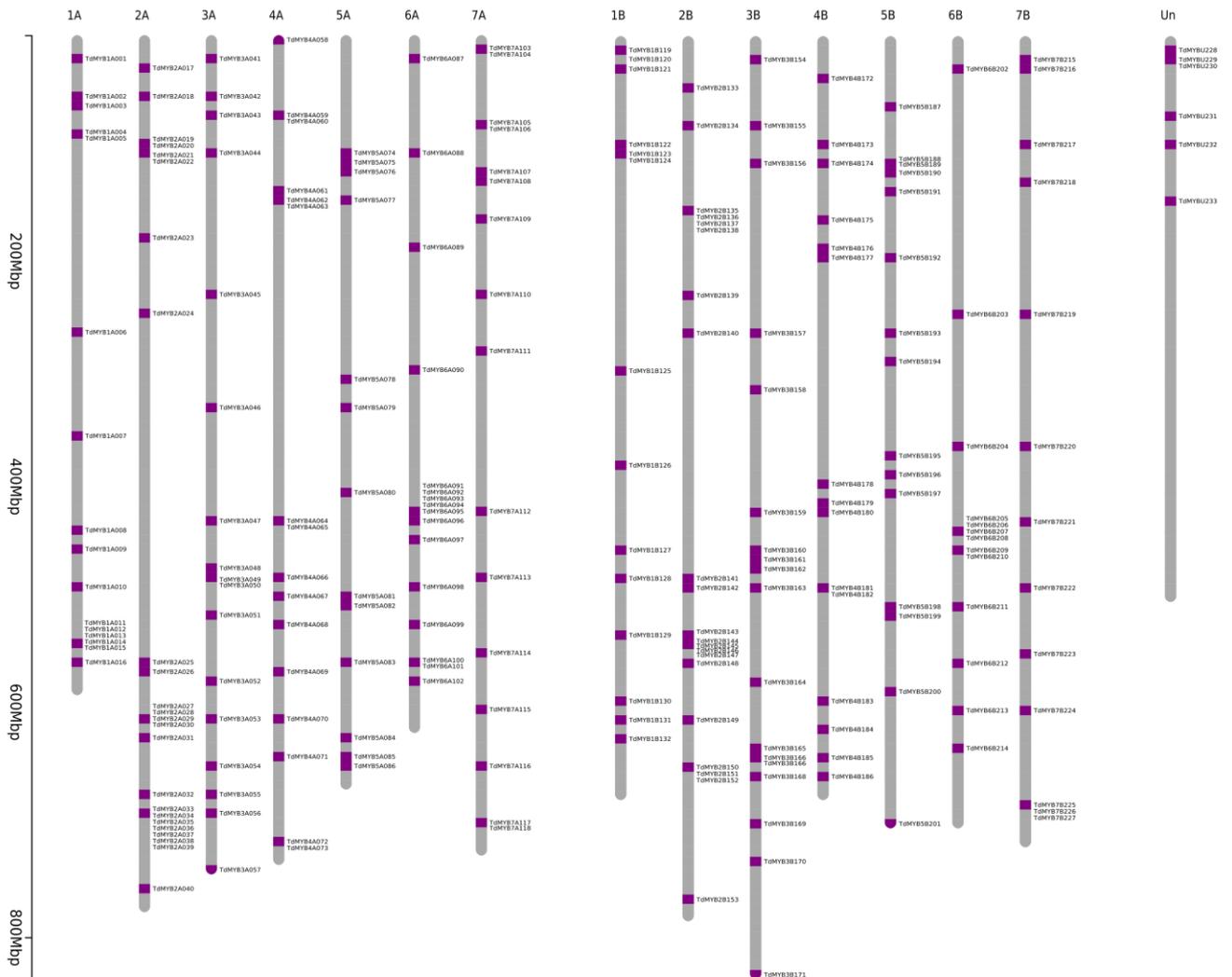
Per identificare i fattori di trascrizione R2R3-MYB nel genoma del grano duro, sono stati seguiti due approcci convergenti: ricerche BLASTP sull'intera banca dati proteica del grano duro cv. Svevo e analisi HMMER, entrambe sia sul prodotto di BLASTP che sulle proteine del grano duro annotate come FT MYB putativi nel genoma. Le analisi BLAST, per le quali sono state utilizzate le sequenze amminoacidiche MYB di *O. sativa* subsp. *japonica* o *A. thaliana* come "query", hanno generato un totale di 507 sequenze. Le analisi HMMER invece, rispetto ai risultati del BLAST e di tutte le proteine MYB annotate dal genoma del grano duro, hanno restituito un totale di 976 presunte sequenze MYB.

Sono quindi stati eseguiti ulteriori processi di filtraggio per affinare la ricerca R2R3-MYB: sono state eliminate le sequenze ridondanti dei geni

candidati mentre la variante più lunga di ciascun gene è stata mantenuta, arrivando a 557 sequenze. È stata confermata la presenza dei DBD MYB caratterizzati e le proteine con domini MYB correlati o tronchi sono state escluse dalle analisi successive. Per le isoforme più lunghe, con dominio MYB incompleto, sono state recuperate le seconde varianti più lunghe per l'analisi con CDD. È stata poi eseguita un'ispezione manuale per perfezionare la lista dei putativi FT R2R3-MYB. In totale, sono stati identificati 415 geni MYB putativi nel grano duro, inclusi 233 R2R3-MYB, 162 geni correlati a MYB e altre classi (3R-MYB, MYB4R1 atipico e CDC5).

Infine, ulteriori analisi si sono concentrate sui 233 FT R2R3-MYB identificati, denominati da TdMYB1A001 a TdMYBU233 in base alla loro posizione e ordine nei cromosomi (ordine del genoma: da A a B, U: non annotato; ordine cromosomico: da 1 a 7; Tabella supplementare 1 e Figura 4).

Figura 4 | Distribuzione dei TdMYB sui cromosomi del grano duro. Posizione relativa dei TdMYB e distribuzione sui cromosomi del grano duro. Il pannello è stato disegnato utilizzando il chromoMap. Il numero del cromosoma è indicato nella parte superiore di ogni cromosoma. A: Genoma A, B: Genoma B, Un: genoma non annotato (Unknown) (Blanco et al., 2022).

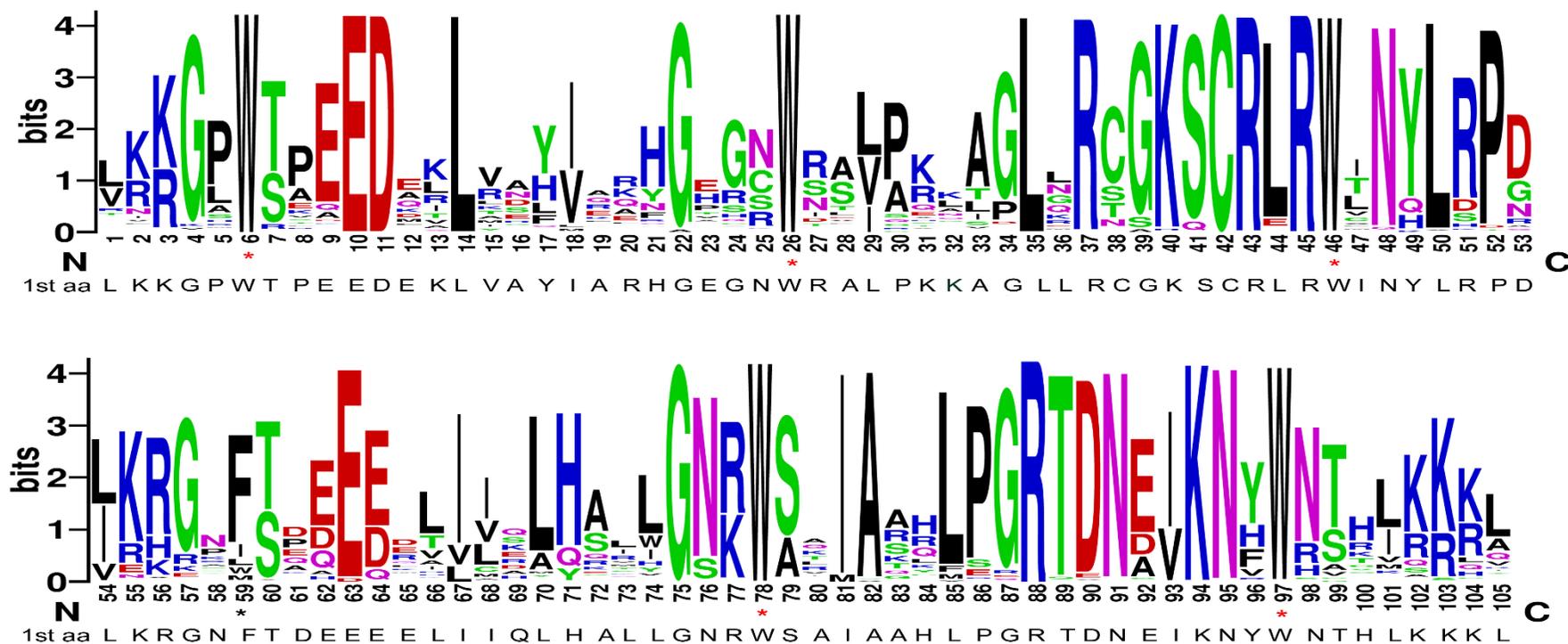


CARATTERIZZAZIONE DEL DOMINIO R2R3

Al fine di studiare la struttura del dominio e il suo livello di conservazione nel grano duro, i domini R2R3 sono stati allineati ed è stato generato il logo specifico della sequenza R2R3 (Figura 5). I risultati hanno mostrato che quasi tutti gli omologhi includono cinque residui di triptofano altamente conservati (Trp, W) nelle due ripetizioni, che svolgono ruoli importanti nell'interazione tra la proteina MYB e le sequenze di DNA bersaglio (Ogata et al., 1992; Zargarian et al., 1999) e sono considerati punti di riferimento del dominio MYB. In particolare, i residui W si trovano nelle posizioni 6, 26 e 46 della ripetizione R2 e nelle posizioni 78 e 97 della ripetizione R3 (Figura 5). Il primo ed il secondo residuo W della regione R2 sono completamente conservati in tutte le sequenze di frumento duro. Nella ripetizione R3, il primo amminoacido W, tipico degli omologhi dei vertebrati c-MYBs, è generalmente sostituito da fenilalanina idrofobica (Phe, F) o isoleucina (Ile, I), come già riscontrato in molte specie vegetali (Dubos et al., 2010; Zhang et al., 2012a; Singh et al., 2020). Il secondo e il terzo residuo W della ripetizione R3 sono altamente conservati, ad eccezione di tre sequenze, trasportando rispettivamente una sostituzione idrofobica di fenilalanina (TdMYB2A022 e TdMYB2B138) o tirosina (Tyr, Y; TdMYB1B123). In generale, il dominio R2R3-MYB del grano duro ha 105 residui basici con rare delezioni o inserzioni, che sono stati esclusi dalla rappresentazione del logo di sequenza. Oltre ai cinque triptofani altamente conservati, anche i residui Glu-10, Asp-11, Leu-14,

Gly-22, Cys-42, Arg-43, Arg-45 nella ripetizione R2 e Glu-63, Gly-75, Ala-82, Arg-88, Lys-94 e Asn-95 nella ripetizione R3 sono altamente conservati (Figura 5). Inoltre, nel frumento duro, come in altre specie vegetali, i maggiori residui conservati nei domini MYB sono principalmente distribuiti tra il secondo e il terzo Trp conservato in entrambe le ripetizioni (Figura 5). L'inserimento del residuo di leucina Leu-35 tra la seconda e la terza elica, si trova in 194 proteine del grano duro. Inoltre, secondo risultati precedenti, la regione del *linker* tra le ripetizioni R2 e R3 contiene il motivo altamente conservato LRPD (Williams e Grotewold, 1997; Stracke et al., 2001; Zhang et al., 2012a; Li et al., 2016, 2020b2020c; Singh et al., 2020).

Figura 5 | Sequenza consenso e livello di conservazione dei domini R2R3-MYB dal grano duro. I loghi di sequenza delle ripetizioni MYB R2 e R3 sono basati su allineamenti a tutta lunghezza di tutti i domini. L'altezza di ogni lettera indica la conservazione della sequenza in quella posizione e il punteggio indica la relativa frequenza dell'aminoacido corrispondente. I residui conservati di triptofano (W) nel dominio MYB sono contrassegnati da asterischi rossi. L'asterisco nero evidenzia la posizione del primo W canonico nella ripetizione R3 sostituito da fenilalanina idrofobica o isoleucina (Blanco et al., 2022).



POSIZIONE CROMOSOMICA, STRUTTURA GENICA, PROPRIETÀ PROTEICHE E LOCALIZZAZIONE CELLULARE

Sono state studiate la posizione cromosomica e la struttura genica dei geni R2R3-MYB di grano duro identificati. Un totale di 122 sequenze codificanti (CDS) sono orientate sul filamento *forward* e 111 sul filamento *reverse*. La lunghezza della sequenza variava da 702 bp (geni TdMYB4B182 e TdMYB4B187) a 101.175 bp (gene TdMYB2A030). L'analisi della posizione cromosomica ha mostrato che 119 e 108 geni MYB si trovano rispettivamente sul genoma A e B; per sei geni, non è stato possibile determinare la posizione (Figura 4). Il numero di geni per cromosoma varia da 13, sui cromosomi 5A e 6B, a 24 sul cromosoma 2A, che contiene il maggior numero di geni MYB, seguito dal cromosoma 2B, con 21 geni. L'analisi dell'organizzazione esone-introne di ciascun gene ha mostrato che la maggior parte dei geni R2R3-MYB del grano duro contengono pochi introni (da 0 a 3), anche se, in alcuni casi, abbiamo trovato quattro (tre geni), sei (due geni) o undici (due geni) introni (Tabella 3).

Nella Tabella supplementare 2 vengono riportati il punto isoelettrico predetto (pI) e il peso molecolare (Mw) delle proteine R2R3-MYB di grano duro. Il pI varia da 4,57 (TdMYB6B211) a 10,31 (TdMYB2B135) e il Mw varia da 22.387,62 (TdMYB2B135) a 92.544,91 Dalton (TdMYB2B138). Per quanto riguarda la predizione della localizzazione cellulare la maggior parte delle proteine codificate dai nostri geni TdMYB aveva una localizzazione

nucleare. Tuttavia, quattro di essi (TdMYB1A007, TdMYB1A011, TdMYB3A058 e TdMYB1B130) risultavano localizzati nel cloroplasto e altri quattro (TdMYB1A013, TdMYB5A082, TdMYB2B134 e TdMYB6B210) nel mitocondrio (Tabella supplementare 3) come già visto con lo stesso strumento nel girasole (Li et al., 2020a) e nel peperoncino (Arce-Rodríguez et al. 2021).

Tabella 3 | Annotazione MYB, seguendo Jiang e Rao (2020) e l'annotazione funzionale di Stracke et al. (2010) (Blanco et al., 2022).

gene ID	gene name	Jiang group	Stracke Subfamily	intron number
TRITD5Av1G223080	TdCDC55A2	CDC5		
TRITD5Bv1G222580	TdCDC55B2	CDC5		
TRITD5Bv1G166570	TdCDC55B1	CDC5		
TRITD5Av1G177290	TdCDC55A1	CDC5		
TRITD6Av1G109670	TdMYB6A090			6
TRITD6Bv1G114040	TdMYB6B204			6
TRITD2Av1G047580	TdMYB2A022	FLP		11
TRITD2Bv1G061120	TdMYB2B138	FLP		11
TRITD1Bv1G037500	TdMYB1B123	II		2
TRITD1Av1G038350	TdMYB1A004	II		2
TRITD1Av1G039510	TdMYB1A005	II		2
TRITD3Av1G046610	TdMYB3A044	II		2
TRITD3Bv1G207660	TdMYB3B167	II		2
TRITD3Av1G222290	TdMYB3A053	II		2
TRITD3Bv1G207560	TdMYB3B166	II		2
TRITD7Av1G035980	TdMYB7A105	II	S25	2
TRITD7Bv1G007040	TdMYB7B215	II	S25	2
TRITD3Bv1G205810	TdMYB3B165	III	S23	1
TRITD4Av1G029120	TdMYB4A059	poaceae specific		1
TRITD4Bv1G140220	TdMYB4B182	poaceae specific		0
TRITD5Bv1G023620	TdMYB5B187	poaceae specific		0
TRITD4Av1G029150	TdMYB4A060	poaceae specific		0
TRITD4Bv1G140200	TdMYB4B181	poaceae specific		0
TRITD4Bv1G173440	TdMYB4B183	IV		0
TRITD4Av1G000100	TdMYB4A058	IV		0
TRITD5Av1G118710	TdMYB5A079	IV	S22	1
TRITD5Bv1G098410	TdMYB5B194	IV	S22	1
TRITD6Av1G075070	TdMYB6A089	IV	S22	0
TRITD6Bv1G079910	TdMYB6B203	IV	S22	0
TRITD7Bv1G221990	TdMYB7B227	IV	S22	0
TRITD7Av1G269520	TdMYB7A118	IV	S22	0
TRITD7Bv1G221920	TdMYB7B225	IV	S22	0
TRITD7Bv1G221970	TdMYB7B226	IV	S22	0
TRITD7Av1G269510	TdMYB7A117	IV	S22	0
TRITD4Bv1G039440	TdMYB4B174	V	S21	1
TRITD4Av1G161800	TdMYB4A067	V	S21	1

TRITD4Av1G190440	TdMYB4A069	V	S21	3
TRITD4Bv1G016080	TdMYB4B172	V	S21	3
TRITD3Av1G093070	TdMYB3A045	V	S21	2
TRITD3Bv1G093860	TdMYB3B157	V	S21	2
TRITD3Av1G249330	TdMYB3A055	V	S21	1
TRITD3Bv1G241070	TdMYB3B170	V	S21	2
TRITD5Av1G041490	TdMYB5A074	ARP		0
TRITD5Bv1G039350	TdMYB5B188	ARP		0
TRITD7Av1G096030	TdMYB7A110	VI		2
TRITD2Bv1G204990	TdMYB2B149	VI		2
TRITD2Av1G244360	TdMYB2A032	VI		2
TRITD1Av1G185000	TdMYB1A010	VII	S18	3
TRITD1Bv1G173280	TdMYB1B129	VII	S18	3
TRITD3Bv1G187900	TdMYB3B164	VII	S18	3
TRITD3Av1G207740	TdMYB3A052	VII	S18	3
TRITD7Bv1G156840	TdMYB7B222	VII	S18	3
TRITD7Av1G203290	TdMYB7A114	VII	S18	3
TRITD7Bv1G011660	TdMYB7B216	VII	S18	2
TRITD7Av1G038860	TdMYB7A106	VII	S18	2
TRITD6Av1G046350	TdMYB6A088	VII	S18	2
TRITD7Av1G244610	TdMYB7A116	VII	S18	2
TRITD7Bv1G192660	TdMYB7B224	VII	S18	2
TRITD5Av1G244760	TdMYB5A085	VIII-E		1
TRITD4Bv1G193370	TdMYB4B185	VIII-E		1
TRITD2Bv1G181360	TdMYB2B143	VIII-E		2
TRITD2Av1G218280	TdMYB2A027	VIII-E		2
TRITD6Bv1G133120	TdMYB6B205	VIII-E		2
TRITD6Av1G146010	TdMYB6A096	VIII-E		2
TRITD3Av1G286170	TdMYB3A057	VIII-E		1
TRITD3Bv1G281370	TdMYB3B171	VIII-E		1
TRITD1Bv1G013050	TdMYB1B121	VIII-E		1
TRITD1Av1G009570	TdMYB1A001	VIII-E		1
TRITD4Bv1G063360	TdMYB4B176	VIII-E		2
TRITD4Av1G136700	TdMYB4A065	VIII-E		2
TRITD5Av1G044060	TdMYB5A075	VIII-E		4
TRITD5Bv1G041300	TdMYB5B189	VIII-E		4
TRITD3Av1G152340	TdMYB3A047	VIII-E	S19	1
TRITD3Bv1G134760	TdMYB3B159	VIII-E	S19	1
TRITD1Av1G208130	TdMYB1A015	VIII-E	S19	1
TRITD4Bv1G064320	TdMYB4B177	VIII-E	S20	1
TRITD4Av1G135660	TdMYB4A064	VIII-E	S20	1
TRITD5Bv1G043640	TdMYB5B190	VIII-E	S20	2
TRITD5Av1G046770	TdMYB5A076	VIII-E	S20	2
TRITD1Bv1G034590	TdMYB1B122	VIII-E	S20	1
TRITD1Av1G026820	TdMYB1A002	VIII-E	S20	1
TRITD3Bv1G231250	TdMYB3B169	VIII-E	S20	0
TRITD3Av1G239730	TdMYB3A054	VIII-E	S20	0
TRITD3Av1G010860	TdMYB3A041	VIII-E	S20	1
TRITD3Bv1G009950	TdMYB3B154	VIII-E	S20	1
TRITD4Av1G058610	TdMYB4A063	VIII-E	S20	1
TRITD4Bv1G112780	TdMYB4B178	VIII-E	S20	1
TRITD2Bv1G032330	TdMYB2B134	VIII-E	S20	0
TRITD2Av1G024990	TdMYB2A018	VIII-E	S20	0
TRITD4Bv1G116710	TdMYB4B179	VIII-E	S7	2
TRITD4Av1G057610	TdMYB4A062	VIII-E	S7	2

TRITD1Bv1G004350	TdMYB1B120	VIII-E	S7	2
TRITD1Bv1G004300	TdMYB1B119	VIII-E	S7	2
TRITD0Uv1G004450	TdMYBU228	VIII-E	S7	2
TRITD3Bv1G152230	TdMYB3B162	VIII-E		2
TRITD3Av1G172210	TdMYB3A050	VIII-E		1
TRITD3Av1G260970	TdMYB3A056	VIII-E	S5	2
TRITD7Av1G053110	TdMYB7A107	VIII-E	S5	1
TRITD5Av1G238760	TdMYB5A084	VIII-E	S5	1
TRITD4Bv1G183820	TdMYB4B184	VIII-E	S5	1
TRITD3Bv1G214900	TdMYB3B168	VIII-E	S4	1
TRITD1Av1G168580	TdMYB1A009	VIII-E	S4	1
TRITD1Bv1G154540	TdMYB1B128	VIII-E	S4	1
TRITD5Bv1G068810	TdMYB5B192	VIII-E	S4	2
TRITD0Uv1G030270	TdMYBU231	VIII-E	S4	2
TRITD4Av1G171580	TdMYB4A068	VIII-E	S4	2
TRITD4Bv1G035080	TdMYB4B173	VIII-E	S4	2
TRITD7Av1G114530	TdMYB7A111	VIII-E	S4	0
TRITD7Bv1G085160	TdMYB7B219	VIII-E	S4	0
TRITD5Bv1G175020	TdMYB5B199	VIII-E	S4	1
TRITD5Av1G185470	TdMYB5A082	VIII-E	S4	1
TRITD6Av1G169300	TdMYB6A098	VIII-D	S3	2
TRITD6Bv1G154920	TdMYB6B211	VIII-D	S3	1
TRITD2Bv1G217080	TdMYB2B150	VIII-D	S3	2
TRITD2Bv1G217170	TdMYB2B151	VIII-D	S3	2
TRITD2Av1G254090	TdMYB2A035	VIII-D	S3	2
TRITD1Bv1G100870	TdMYB1B125	VIII-D	S2	2
TRITD1Av1G097550	TdMYB1A006	VIII-D	S2	2
TRITD2Bv1G188380	TdMYB2B148	VIII-D	S2	2
TRITD2Av1G225810	TdMYB2A031	VIII-D	S2	2
TRITD6Av1G143290	TdMYB6A095	VIII-D	S2	0
TRITD6Bv1G134360	TdMYB6B206	VIII-D	S2	0
TRITD6Av1G143260	TdMYB6A092	VIII-D	S2	0
TRITD6Bv1G134380	TdMYB6B207	VIII-D	S2	1
TRITD6Av1G143210	TdMYB6A091	VIII-D	S2	0
TRITD6Av1G143270	TdMYB6A093	VIII-D	S2	0
TRITD6Bv1G134430	TdMYB6B208	VIII-D	S2	0
TRITD6Av1G143280	TdMYB6A094	VIII-D	S2	0
TRITD5Bv1G124230	TdMYB5B195	VIII-A-2		1
TRITD0Uv1G038930	TdMYBU232	VIII-A-2		1
TRITD7Av1G070470	TdMYB7A109	VIII-A-2		2
TRITD7Bv1G046440	TdMYB7B218	VIII-A-2		2
TRITD6Bv1G173340	TdMYB6B212	VIII-A-2		2
TRITD6Av1G183650	TdMYB6A099	VIII-A-2		2
TRITD5Av1G182550	TdMYB5A081	VIII-A-2		1
TRITD5Bv1G171890	TdMYB5B198	VIII-A-2		1
TRITD6Av1G007200	TdMYB6A087	VIII-A-1	S16	2
TRITD6Bv1G010730	TdMYB6B202	VIII-A-1	S16	2
TRITD6Bv1G138550	TdMYB6B209	VIII-A-1	S16	3
TRITD6Av1G152410	TdMYB6A097	VIII-A-1	S16	2
TRITD2Bv1G183410	TdMYB2B146	VIII-A-1	S16	2
TRITD2Av1G221060	TdMYB2A029	VIII-A-1	S16	2
TRITD2Bv1G183440	TdMYB2B147	VIII-A-1	S16	2
TRITD2Bv1G183370	TdMYB2B145	VIII-A-1	S16	2
TRITD2Av1G221150	TdMYB2A030	VIII-A-1	S16	2
TRITD5Bv1G051400	TdMYB5B191	VIII-A-1		1

TRITD5Av1G057530	TdMYB5A077	VIII-A-1		1
TRITD7Bv1G116120	TdMYB7B220	VIII-A-1		2
TRITD7Av1G157180	TdMYB7A112	VIII-A-1		2
TRITD2Bv1G097990	TdMYB2B140	VIII-A-1		2
TRITD2Av1G098880	TdMYB2A024	VIII-A-1		2
TRITD3Bv1G146500	TdMYB3B160	VIII-A-1		3
TRITD3Av1G168410	TdMYB3A048	VIII-A-1		3
TRITD1Bv1G039500	TdMYB1B124	VIII-A-1	S13	2
TRITD1Av1G030230	TdMYB1A003	VIII-A-1	S13	2
TRITD7Bv1G138850	TdMYB7B221	VIII-A-1	S13	2
TRITD7Av1G177140	TdMYB7A113	VIII-A-1	S13	3
TRITD4Av1G227090	TdMYB4A071	VIII-A-1	S13	2
TRITD2Bv1G058760	TdMYB2B136	VIII-A-1	S13	1
TRITD2Av1G045170	TdMYB2A019	VIII-A-1	S13	1
TRITD2Av1G045220	TdMYB2A020	VIII-A-1	S13	1
TRITD2Bv1G058650	TdMYB2B135	VIII-A-1	S13	1
TRITD3Av1G027730	TdMYB3A042	VIII-A-1	S13	1
TRITD3Bv1G031790	TdMYB3B155	VIII-A-1	S13	1
TRITD3Bv1G104140	TdMYB3B158	VIII-A-1	S13	2
TRITD3Av1G121270	TdMYB3A046	VIII-A-1	S13	2
TRITD3Av1G170610	TdMYB3A049	VIII-A-1	S13	2
TRITD3Bv1G149310	TdMYB3B161	VIII-A-1	S13	2
TRITD1Av1G205760	TdMYB1A014	VIII-A-1	S13	1
TRITD1Bv1G199880	TdMYB1B131	VIII-A-1	S13	1
TRITD1Av1G205750	TdMYB1A013	VIII-A-1	S13	1
TRITD0Uv1G008510	TdMYBU229	VIII-A-1	S13	1
TRITD1Av1G205720	TdMYB1A011	VIII-A-1	S13	1
TRITD1Bv1G194250	TdMYB1B130	VIII-A-1	S13	1
TRITD0Uv1G008520	TdMYBU230	VIII-A-1	S13	2
TRITD1Av1G205740	TdMYB1A012	VIII-A-1	S13	1
TRITD6Bv1G138770	TdMYB6B210	VIII-D	S9	2
TRITD2Bv1G183230	TdMYB2B144	VIII-D	S9	2
TRITD2Av1G220910	TdMYB2A028	VIII-D	S9	2
TRITD2Av1G199440	TdMYB2A025	VIII-D	S9	2
TRITD2Bv1G162800	TdMYB2B141	VIII-D	S9	2
TRITD2Bv1G253750	TdMYB2B153	VIII-D	S9	4
TRITD2Av1G285890	TdMYB2A040	VIII-D	S9	2
TRITD2Bv1G085850	TdMYB2B139	VIII-D	S11	2
TRITD2Av1G077240	TdMYB2A023	VIII-D	S11	2
TRITD7Av1G058060	TdMYB7A108	VIII-D	S24	2
TRITD7Bv1G034690	TdMYB7B217	VIII-D	S24	2
TRITD6Bv1G187300	TdMYB6B213	VIII-D	S24	2
TRITD6Av1G194510	TdMYB6A101	VIII-D	S24	2
TRITD6Av1G194500	TdMYB6A100	VIII-D	S24	2
TRITD0Uv1G057910	TdMYBU233	VIII-D	S24	2
TRITD7Av1G006480	TdMYB7A104	VIII-D	S10	2
TRITD4Av1G256700	TdMYB4A072	VIII-D	S10	2
TRITD7Av1G006440	TdMYB7A103	VIII-D	S10	2
TRITD4Av1G256770	TdMYB4A073	VIII-D	S10	2
TRITD2Av1G255320	TdMYB2A036	VIII-D	S10	1
TRITD2Av1G255330	TdMYB2A037	VIII-D	S10	1
TRITD2Av1G255350	TdMYB2A039	VIII-D	S10	1
TRITD2Av1G255340	TdMYB2A038	VIII-D	S10	1
TRITD2Av1G253680	TdMYB2A033	VIII-D	S10	1
TRITD2Bv1G217740	TdMYB2B152	VIII-D	S10	1

TRITD2Av1G253690	TdMYB2A034	VIII-D	S10	1
TRITD2Av1G047010	TdMYB2A021	VIII-D		1
TRITD2Bv1G060490	TdMYB2B137	VIII-D		1
TRITD5Av1G144700	TdMYB5A080	VIII-D		2
TRITD5Bv1G134610	TdMYB5B197	VIII-D		2
TRITD5Bv1G250220	TdMYB5B201	VIII-D	S1	2
TRITD4Av1G209780	TdMYB4A070	VIII-D	S1	2
TRITD4Bv1G056290	TdMYB4B175	VIII-D	S1	1
TRITD4Av1G155930	TdMYB4A066	VIII-D	S1	1
TRITD5Av1G108560	TdMYB5A078	VIII-D	S1	1
TRITD5Bv1G090290	TdMYB5B193	VIII-D	S1	1
TRITD2Bv1G165690	TdMYB2B142	VIII-B		2
TRITD2Av1G202420	TdMYB2A026	VIII-B		2
TRITD4Bv1G118730	TdMYB4B180	VIII-B		2
TRITD4Av1G054810	TdMYB4A061	VIII-B		2
TRITD1Bv1G126350	TdMYB1B126	VIII-C		2
TRITD1Av1G131700	TdMYB1A007	VIII-C		2
TRITD3Bv1G158850	TdMYB3B163	VIII-C		2
TRITD1Bv1G205600	TdMYB1B132	VIII-C		1
TRITD1Av1G216690	TdMYB1A016	VIII-C		1
TRITD3Bv1G041490	TdMYB3B156	VIII-C		2
TRITD3Av1G033470	TdMYB3A043	VIII-C		2
TRITD3Av1G186610	TdMYB3A051	VIII-C		2
TRITD5Av1G251090	TdMYB5A086	VIII-C		2
TRITD4Bv1G200630	TdMYB4B186	VIII-C		2
TRITD7Av1G223690	TdMYB7A115	VIII-C		1
TRITD7Bv1G174390	TdMYB7B223	VIII-C		1
TRITD6Bv1G201940	TdMYB6B214	VIII-C	S14	2
TRITD6Av1G206130	TdMYB6A102	VIII-C	S14	3
TRITD5Bv1G130580	TdMYB5B196	VIII-C	S14	1
TRITD1Av1G161280	TdMYB1A008	VIII-C	S14	2
TRITD1Bv1G148030	TdMYB1B127	VIII-C	S14	2
TRITD5Bv1G205200	TdMYB5B200	VIII-C	S14	2
TRITD5Av1G208870	TdMYB5A083	VIII-C	S14	2
TRITD2Bv1G020620	TdMYB2B133	VIII-C	S14	2
TRITD2Av1G015370	TdMYB2A017	VIII-C	S14	2

ANALISI FILOGENETICHE E DEL MOTIVO

Per definire le sottofamiglie MYB di grano duro, facilitare la previsione della funzione genica e guidare le successive analisi di espressione, sono stati condotti studi filogenetici: i TdMYB sono stati elaborati in combinazione con i FT R2R3-MYB di *Arabidopsis* o riso annotati come in Jiang e Rao (2020) e in conformità ai precedenti sottogruppi funzionali di *Arabidopsis*, organizzati da S1 a S25 (Stracke et al., 2001; Dubos et al., 2010; Katiyar et al., 2012). Abbiamo sfruttato gli studi completi condotti da Jiang e Rao (2020), in cui l'evoluzione delle proteine vegetali R2R3-MYB è stata ampiamente esplorata su un'ampia collezione di piante e alghe. Gli autori hanno fornito un nuovo schema di classificazione per i R2R3-MYB nelle piante, raggruppandoli in 10 sottofamiglie e confrontando questo modello con i sistemi di classificazione proposti in studi precedenti.

Per le radici dell'albero filogenetico del grano duro con gli omologhi di *Arabidopsis* (Figura 6) sono state utilizzate sequenze AtCDC5 e le proteine putative CDC5 di grano duro, poiché divergono dagli R2R3-MYB (Du et al., 2015). L'analisi filogenetica ha collocato i 233 R2R3-MYB di grano duro in nove dei gruppi precedentemente identificati (Jiang e

Rao, 2020), da II a VIII, più gli omologhi FLP e ARP. Il raggruppamento basato su *Arabidopsis* è stato confermato dall'analisi filogenetica che combina riso e omologhi di grano duro (Figura 7). In generale, le proteine del grano duro rientravano nei 25 gruppi funzionali di *Arabidopsis*. È interessante notare che TdMYB6A090 e TdMYB6B204 si trovavano in una posizione più esterna nell'albero filogenetico con *Arabidopsis* o con riso (Figura 6, Figura 7). Sono stati inoltre definiti gli ortologhi di *T. aestivum* (Figura 8).

Figura 6 | Analisi filogenetica di proteine R2R3-MYB da grano duro e *Arabidopsis thaliana*. Albero di massima probabilità di 237 FT R2R3-MYB di grano duro (TRITD-TdMYBs) e 127 di *Arabidopsis* (AtMYBs). Per le radici dell'albero sono state utilizzate sequenze CDC5. I numeri romani indicano gruppi filogenetici secondo Jiang e Rao, 2020; i numeri esterni colorati si riferiscono ai gruppi funzionali di *Arabidopsis* secondo Stracke et al. (2001) e Dubos et al. (2010). Le stelle sono riferite ai geni MYB analizzati tramite qPCR. I numeri sui nodi del ramo indicano i valori del bootstrap (sono mostrati solo bootstrap > 60) (Blanco et al., 2022).

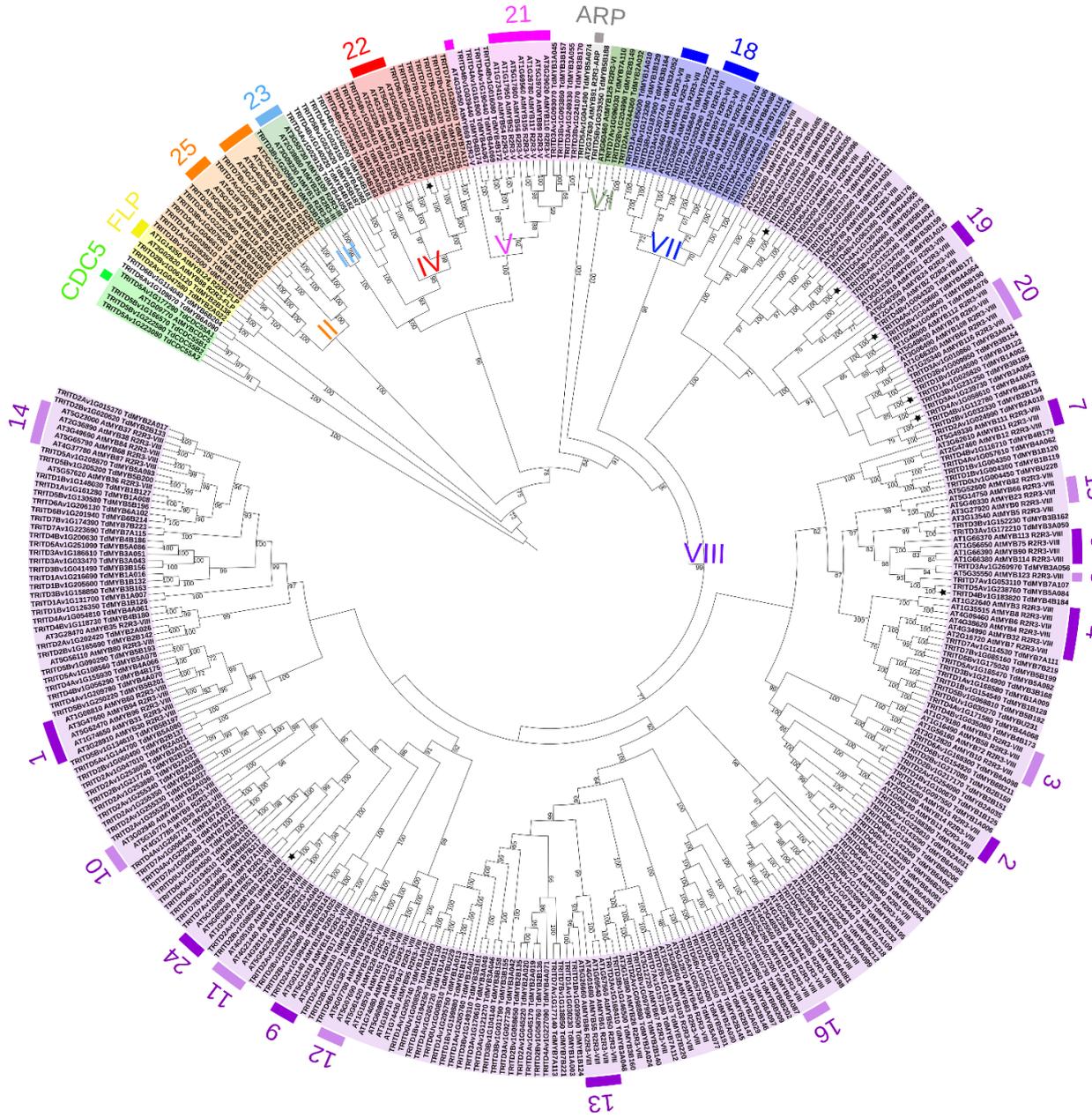


Figura 7 | Analisi filogenetica delle proteine R2R3-MYB di frumento duro e *Oryza sativa*. L'albero di massima verosimiglianza è radicato con sequenze CDC5. I numeri sui nodi di diramazione indicano i valori di bootstrap (sono indicati solo i bootstraps >60) (Blanco et al., 2022).

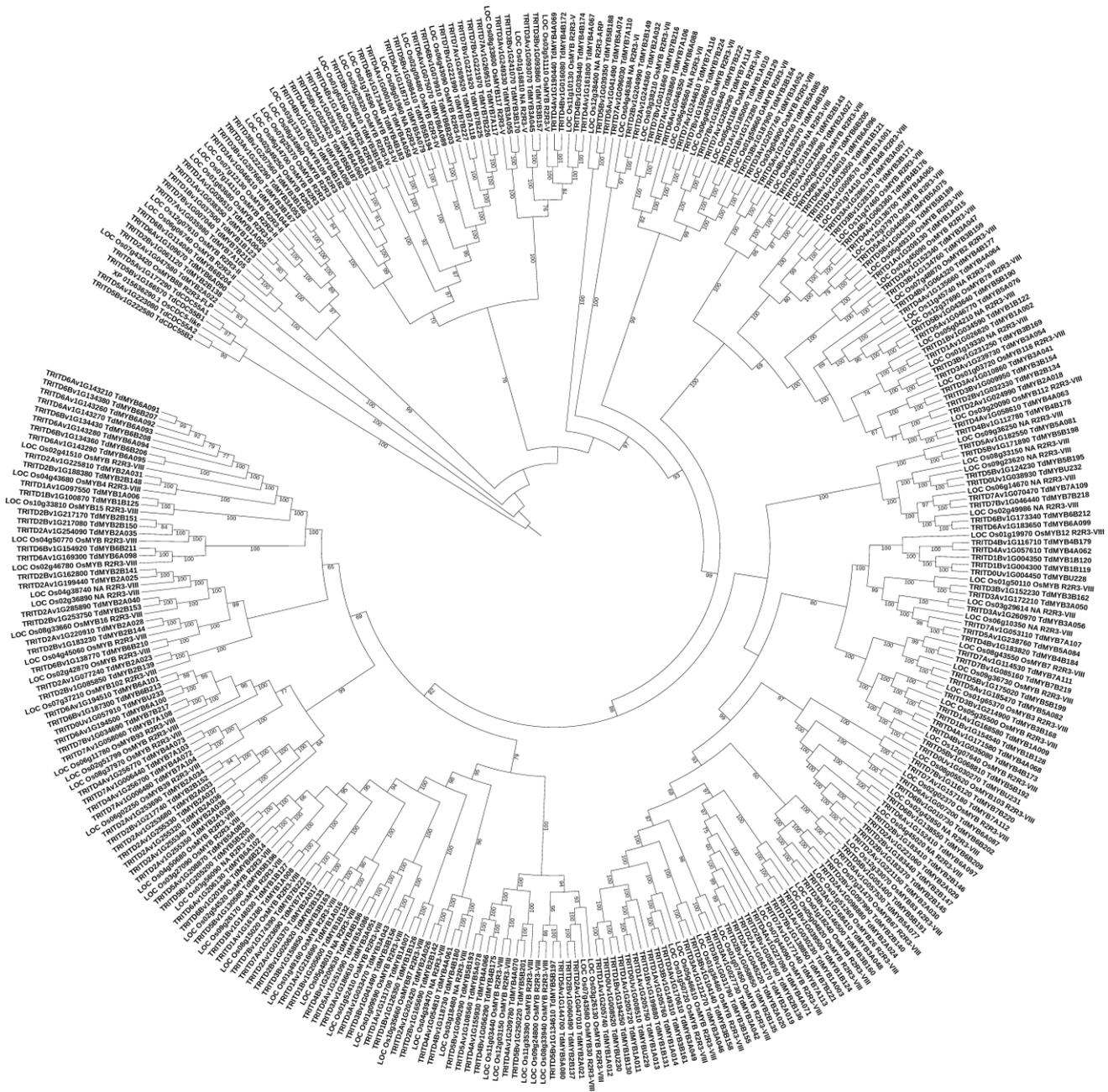
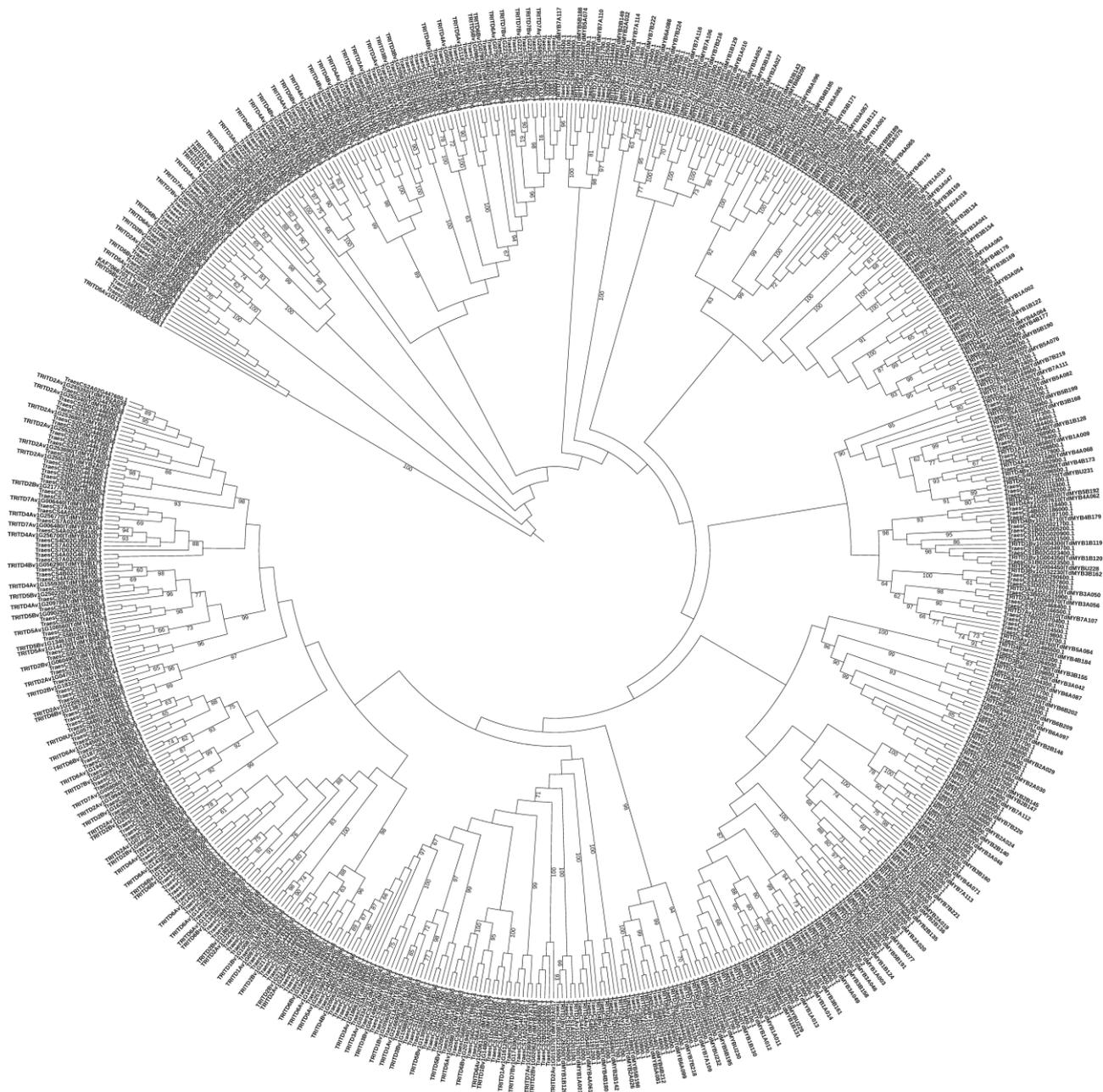


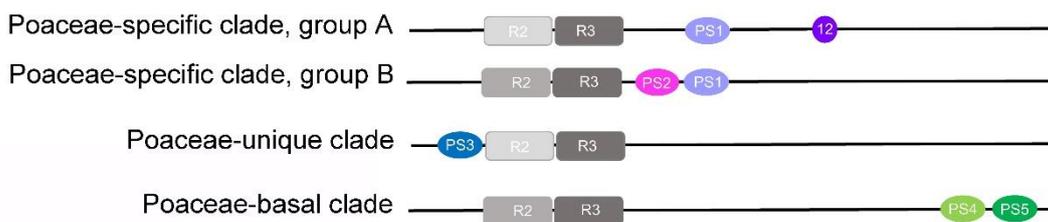
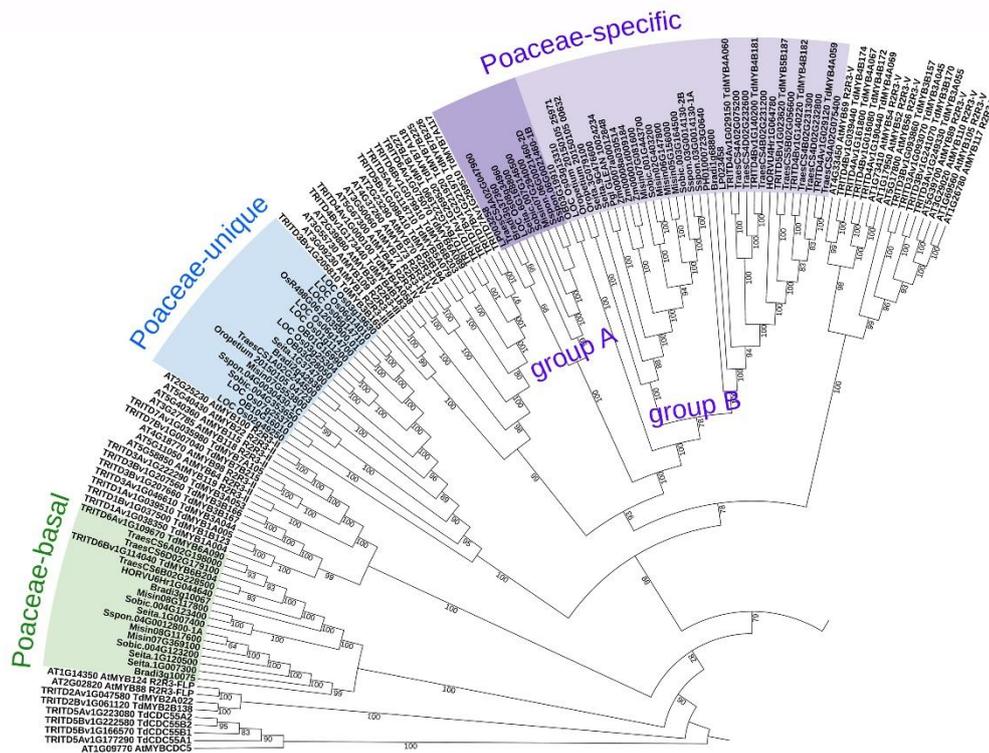
Figura 8 | Analisi filogenetica delle proteine R2R3-MYB di frumento duro e frumento tenero. L'albero di massima verosimiglianza è radicato con sequenze CDC5. I numeri sui nodi di diramazione indicano i valori di bootstrap (sono indicati solo i bootstrap>60) (Blanco et al., 2022).



La topologia dell'albero filogenetico del riso (Figura 7) ha consentito l'identificazione di fattori R2R3-MYB specifici delle Poaceae, come descritto da Jiang e Rao (2020), i quali hanno riportato l'esistenza di due

cladi trovati nelle Poaceae, non raggruppati con nessun'altra nota sottofamiglia R2R3-MYB. Il primo clado, comprendente due sequenze di riso, è stato chiamato "specifico delle Poaceae" ed è stato considerato divergente dalla sottofamiglia IV, poiché alcune delle sue sequenze condividono il motivo 12 (motivo 12-Jiang) con questa sottofamiglia (Jiang e Rao, 2020). La particolarità di questo clado è dovuta alla presenza di un motivo specifico (PS1, Figura 9), che è assente in altre sequenze. Per supportare questa identificazione, abbiamo ampliato la ricerca, cercando il motivo PS1 in tutti i genomi vegetali disponibili nel database *PLAZA*, e abbiamo identificato un totale di 43 geni che ospitano un dominio R2R3 completo. Tutte le specie vegetali che presentano questi geni appartengono alla famiglia delle Poaceae e tutti i 43 geni contengono il motivo PS1 specifico delle Poaceae, mentre solo 10 di questi geni includono anche il motivo 12-Jiang. Nelle 33 sequenze senza il motivo 12-Jiang abbiamo identificato un motivo aggiuntivo (PS2), correlato al motivo PS1 (coefficiente di correlazione di Pearson = 0,6) (Figura 9).

Figura 9 | Relazioni filogenetiche di sequenze peculiari di Poaceae con altri R2R3-MYB e loro motivi. Pannello superiore: una porzione dell'albero filogenetico che include l'*Arabidopsis thaliana* (127 AtMYBs), il frumento duro (237 TRITD-TdMYBs) e i R2R3-MYBs esclusivi della famiglia delle Poaceae (77 sequenze), raggruppati in tre cladi, cioè specifici di Poaceae (gruppi A e B), unici di Poaceae e basali. Pannello inferiore: rappresentazione grafica della posizione dei motivi peculiari di R2R3 e Poaceae (da PS1 a PS5); nel clado specifico di Poaceae gruppo A, 12 si riferisce al motivo 12-Jiang. Bradi: *Brachypodium distachyon*; Pgl_GLEAN: *Cenchrus americanus*; HORVU: *Hordeum vulgare*; LP: *Lolium perenne*; Misin: *Miscanthus sinensis*; Oropetium: *Oropetium thomaeum*; OB: *Oryza brachyantha*; LOC_Os: *Oryza sativa subsp. japonica*; Os: *Oryza sativa subsp. indica*; PH: *Phyllostachys edulis*; Spson: *Saccharum spontaneum*; Seita: *Setaria Italica*; Sobic; *Sorghum bicolor*; Traes: *Triticum aestivum*; Zm: *Zea mays* (Blanco et al., 2022).

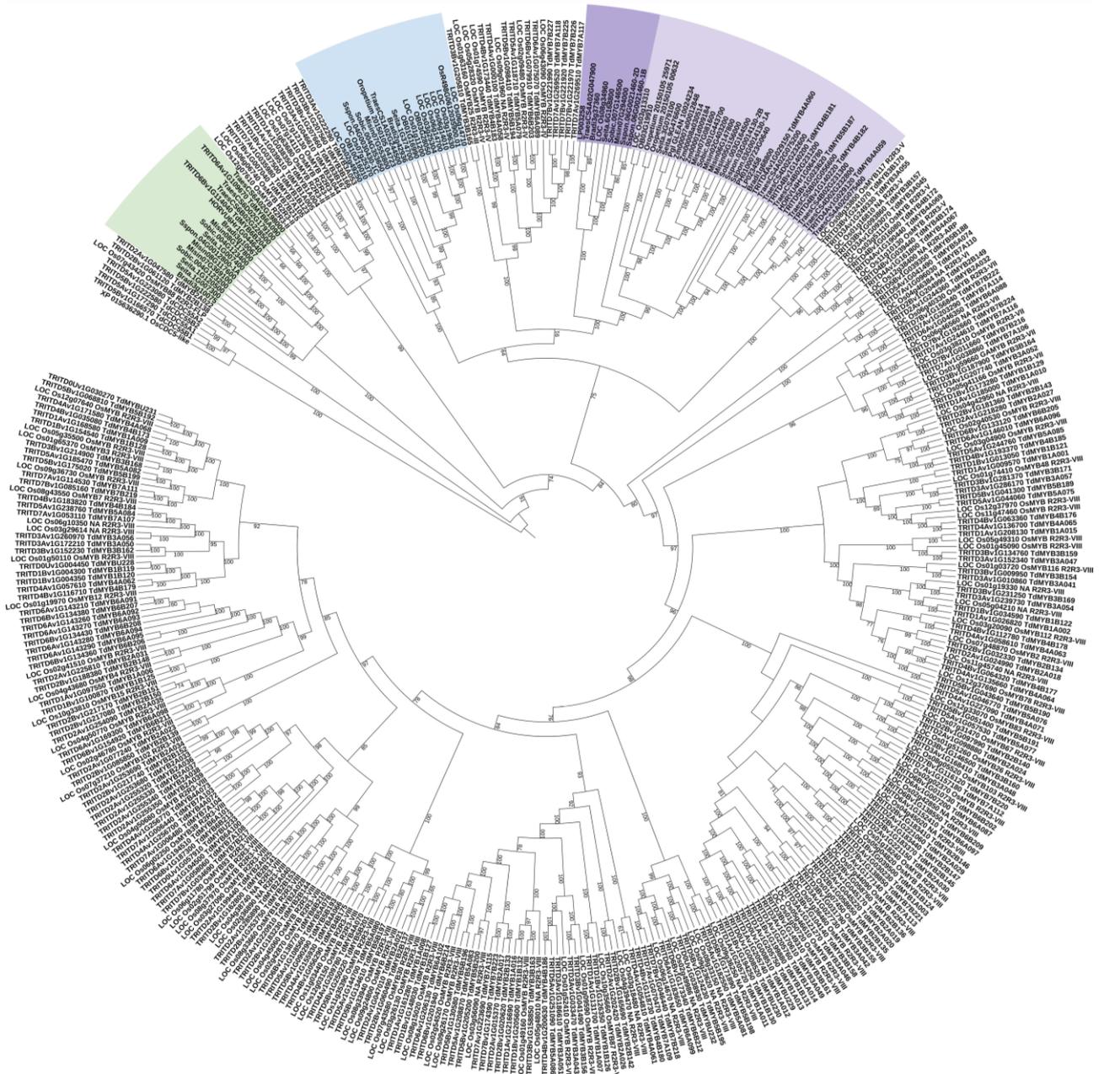


Per ottenere un quadro migliore delle relazioni dei geni specifici delle Poaceae con gli altri geni R2R3-MYB, abbiamo aggiunto le 43 sequenze all'albero filogenetico del grano duro con le sequenze di *Arabidopsis* o

di riso, separatamente (Figura 9, Figura 10). I geni specifici delle Poaceae confermano la formazione di un clado divergente derivante dal gruppo R2R3-MYB IV. Inoltre, questo gruppo specifico è ulteriormente suddiviso in due gruppi: il primo (gruppo A) comprendente sequenze che portano il motivo 12-Jiang (tranne LOC_Os03g13310, che è basale rispetto all'altro gruppo) ma non il motivo PS2, e il secondo gruppo (gruppo B) che comprende le sequenze con la PS2, ma non il motivo 12-Jiang (Figura 9).

Il secondo clado riportato da Jiang e Rao (2020) è stato chiamato "*Unique Poaceae R2R3-MYB*" e includeva sei sequenze di riso. Per supportare questo risultato, abbiamo esteso l'analisi a tutte le proteine e abbiamo identificato 19 geni in cui è stato rilevato il motivo PS3, ad eccezione di LOC_Os02g49250 (Figura 9). Tutte le specie vegetali portatrici di questi geni appartengono alla famiglia delle Poaceae, con un solo rappresentante delle Triticeae, ovvero una sequenza di *T. aestivum*, mentre in questo gruppo non sono presenti sequenze di frumento duro. Nell'albero filogenetico, questo insieme di sequenze uniche di Poaceae è chiaramente separato dal gruppo R2R3-MYB III, IV e V (Figura 9, Figura 10).

Figura 10 | Relazioni filogenetiche delle sequenze peculiari delle Poaceae con altri MYBs di riso. Albero filogenetico tra R2R3-MYB di riso, frumento duro e R2R3-MYB esclusivi della famiglia delle Poaceae, raggruppati in 3 cladi: specifici per le Poaceae (viola), cladi uniche delle Poaceae (blu) e Poaceae basali (verdi) (Blanco et al., 2022).



Oltre agli insiemi specifici e unici di sequenze sopra descritti, abbiamo osservato che due R2R3-MYB di grano duro (TdMYB6B204 e TdMYB6A090) occupavano una posizione più basale negli alberi filogenetici, essendo

posti tra CDC5 e FLP (albero di Arabidopsis, Figura 6), o tra i geni FLP e R2R3-MYB gruppo II (albero di riso, Figura 7). In queste sequenze, abbiamo identificato un dominio R2R3-MYB peculiare. Durante la ricerca nel database PLAZA, abbiamo recuperato in totale 17 sequenze, tutte appartenenti alla specie Poaceae, la maggior parte delle quali (15) portava due motivi distintivi identificati in questo studio (PS4 e PS5). Tutte queste 17 sequenze sono state aggiunte agli alberi filogenetici e hanno occupato la stessa posizione, tra FLP e gruppo II (Figura 9, Figura 10).

Le informazioni sulla filogenesi hanno consentito l'attribuzione di funzioni putative ai FT R2R3-MYB di grano duro basati sui gruppi funzionali in Arabidopsis (Matus et al., 2008; Dubos et al., 2010). La più grande sottofamiglia di R2R3-MYB nelle piante terrestri è rappresentata dal gruppo VIII (Jiang e Rao, 2020), che comprende più della metà delle sequenze di grano duro, ovvero 179 proteine (Figura 6). I TdMYB appartenenti al gruppo VIII si raggruppano con 18 sottofamiglie di Arabidopsis, i cui membri sono coinvolti in diversi processi (Dubos et al., 2010). Il gruppo II comprende nove TdMYB (famiglia S25), mentre il gruppo III contiene un solo omologo di grano duro, simile ai membri S23 di Arabidopsis. I gruppi IV, V e VII comprendono membri MYB di grano

duro che si raggruppano rispettivamente con le sottofamiglie Arabidopsis S22, S21 e S18. Tre gruppi di TdMYB si raggruppano con AtMYB125/DUO1 (gruppo VI), mentre due sequenze di grano duro con Arabidopsis ARP. Infine, due FLP putativi R2R3-MYB di frumento duro sono raggruppati con i loro omologhi di Arabidopsis.

Abbiamo utilizzato il programma online MEME per cercare motivi conservati condivisi dai FT TdMYB al fine di supportare ulteriormente e definire le sottofamiglie R2R3-MYB di grano duro. Per facilità di visualizzazione, abbiamo concentrato la nostra analisi su un gene per ogni coppia di omologhi (139 TdMYB in totale, Figura 6), partendo dai MYB localizzati nel genoma A e considerando i corrispondenti omologhi B o U quando mancava il relativo TdAMYB. Abbiamo elaborato le intere sequenze, per evidenziare ulteriormente le somiglianze anche nelle ripetizioni R2R3, tra membri dello stesso gruppo. Sono stati cercati un totale di 36 motivi (Figura 6). Sei di questi motivi (da 1 a 5 e motivo 17) rappresentano porzioni di regioni conservate all'interno dei domini R2R3-MYB. I motivi 3, più 5 o 17 e la parte sinistra del motivo 2 compongono la ripetizione R2, mentre la parte destra del motivo 2, motivo 4 e 1 formano la ripetizione R3 (Figura 11). I motivi da 1 a 4 sono conservati in quasi

tutti i TdMYB; il motivo 17 è conservato nel dominio MYB delle proteine appartenenti ai gruppi da II a V, mentre i membri dei gruppi VII e VIII contengono il motivo 5 al posto del motivo 17 (Figura 11). I membri ARP e del gruppo VI non possiedono né il motivo 5 né 17. Oltre ai motivi altamente conservati delle ripetizioni MYB R2 e R3, i membri TdMYB all'interno dello stesso clado condividono altri motivi ausiliari. Ad esempio, i motivi 6 e 7 sono presenti e altamente conservati solo nel gruppo VIII e corrispondono rispettivamente ai motivi 31 e 32 precedentemente identificati (Jang e Rao, 2020), essendo il motivo 7 condiviso dalla sottofamiglia S24 (Dubos et al., 2010). Il motivo 11 (sottofamiglia S10) caratterizza un clado di 10 sequenze nel gruppo VIII (Figura 11). Il motivo 18 e il motivo 28 (motivi 10 e 14 rispettivamente in Jiang e Rao, 2020) si trovano solo nel gruppo IV.

ESPRESSIONE GENICA NEI TESSUTI DI GRANO DURO IN CONDIZIONI DI STRESS ABIOTICO

Otto geni R2R3-MYB (TdMYB1A002, TdMYB2A023, TdMYB4A063, TdMYB4A064, TdMYB6A089, TdMYB2B143, TdMYB4B184 e TdMYB5B189) sono stati selezionati poiché rientrano nei cluster di risposta allo stress abiotico di *Arabidopsis* (Figura 6), o perché i loro omologhi sono stati precedentemente caratterizzati. I loro livelli di espressione relativa sono stati analizzati in piante di grano duro sottoposte a trattamenti di stress salino o di siccità o mancanza di N in esperimenti temporali, poiché, sulla base di precedenti risultati in altre specie, si è ritenuto probabile un possibile coinvolgimento di questi geni TdMYB in risposta alle sollecitazioni elencate sopra. La Figura 12 riporta i risultati dell'analisi di espressione rilevata in qPCR per gli otto geni, in cui il valore dell'espressione di controllo in ogni punto temporale è rappresentato dalla linea nera impostata su 1 in ciascun grafico.

Nella Figura 12A sono mostrati i risultati per lo stress salino. L'abbondanza del trascritto TdMYB6A089 è aumentata gradualmente nelle foglie da 6 ore (\cong 3,5 volte) a 12 ore di trattamento (\cong 7,8 volte). Questo trascritto non ha mostrato cambiamenti di espressione rilevanti nelle radici. Il trascritto TdMYB5B189 era significativamente down-regolato nelle radici da 2 ore (\cong 4,0 volte) a 12 ore di trattamento (\cong 2,6 volte), sebbene non abbia mostrato evidenti cambiamenti di espressione nelle foglie. Il trascritto TdMYB4A063 è risultato sempre up-regolato nelle radici durante

il trattamento raggiungendo un massimo di $\cong 3,4$ volte a 2 ore. Anche nelle foglie, il trascritto ha mostrato un immediato e marcato aumento dell'espressione a 2 ore di trattamento ($\cong 10$ volte). È stata rilevata anche una maggiore abbondanza di questo trascritto a 12 ore ($\cong 2,6$ volte). Il trascritto TdMYB4B184 ha mostrato un andamento opposto nei due tessuti analizzati. Nelle radici stressate, è partito dai livelli di espressione di controllo; quindi, è aumentato linearmente fino a raggiungere il livello massimo a 12 ore ($\cong 14,0$ volte), poi è diminuito a 24 ore, rimanendo comunque up-regolato ($\cong 3,6$ volte). Nelle foglie, invece, partendo dai livelli di espressione di controllo a 2 ore è poi diminuito a 6 e 12 ore, mostrando una down-regolazione di $\cong 3,2$ volte. Il trascritto TdMYB4A064 ha mostrato un rapido e significativo aumento dell'espressione nelle radici a 2 ore di trattamento ($\cong 9,0$ volte), è poi diminuito a 6 ore ($\cong 3,3$ volte) ed è tornato ai livelli di controllo a 12 e 24 ore. Questo trascritto risultava anche up-regolato nelle foglie durante il trattamento salino, mostrando un valore massimo di variazione della regolazione a 12 e 24 ore (rispettivamente $\cong 5,0$ volte e $4,8$ volte up-regolato). Tre degli otto trascritti genici analizzati, TdMYB2B143, TdMYB2A023 e TdMYB1A002 erano significativamente e abbondantemente up-regolati nelle radici stressate in tutti i punti temporali. Sebbene abbiamo notato l'attivazione del gene per TdMYB2A023 e TdMYB1A002 nelle foglie stressate, non abbiamo potuto quantificare l'espressione relativa, poiché i livelli di espressione non erano tracciabili (poco espresso/non espresso) nelle foglie di controllo.

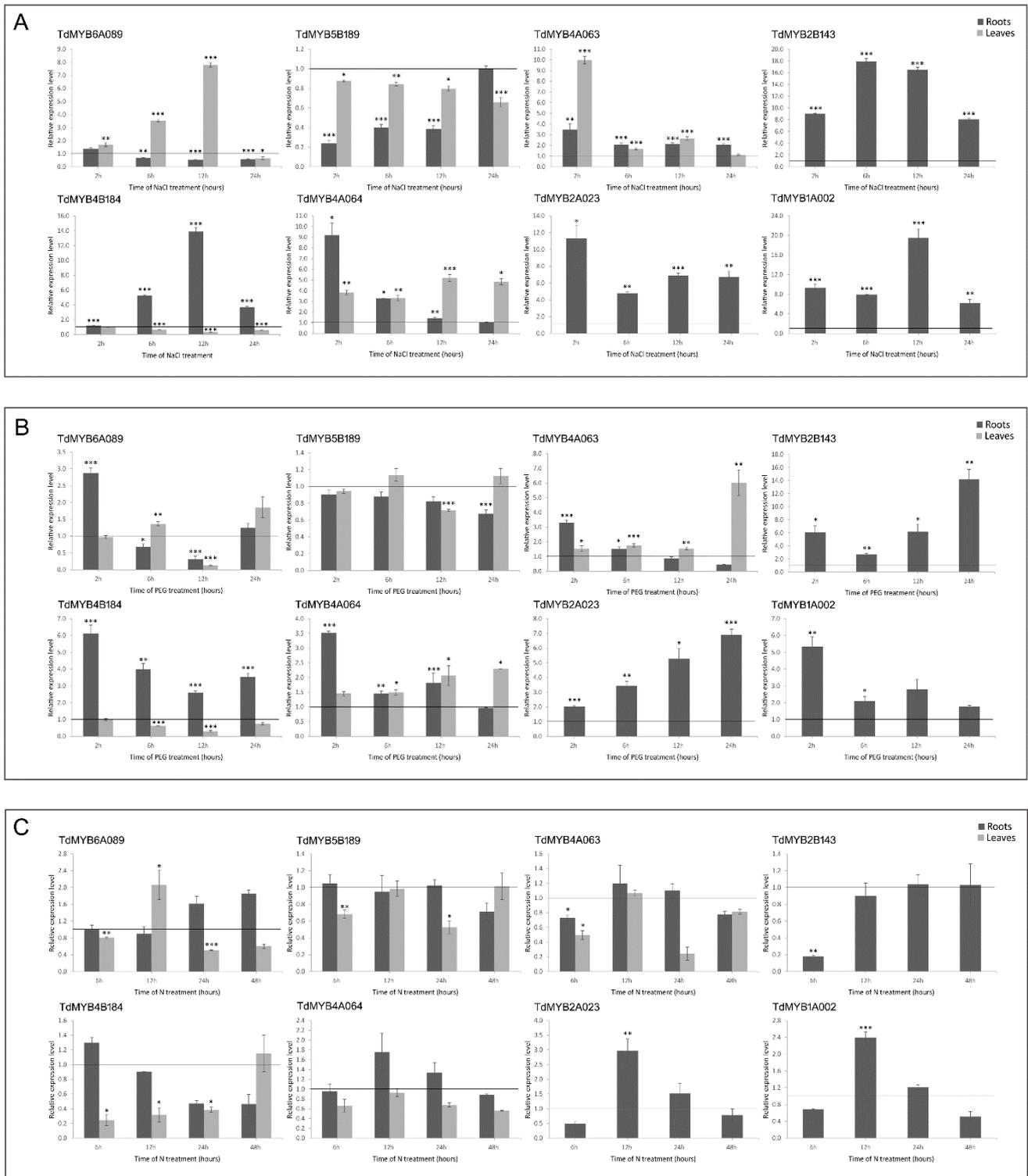
TdMYB2B143 non ha mostrato alcuna espressione sia nel controllo che nelle foglie stressate.

In seguito allo stress da siccità (Figura 12B), l'espressione del trascritto TdMYB6A089 nelle foglie era significativamente down-regolata solo a 12 ore, mentre nelle radici è stata significativamente up-regolata ($\cong 2,9$ volte) a 2 ore di trattamento e down-regolata a 12 ore ($\cong 3,3$ volte). Il trascritto TdMYB5B189 non ha mostrato alcun cambiamento in nessuno dei tessuti analizzati. L'espressione di TdMYB4A063 nelle radici era significativamente superiore rispetto al controllo a 2 ore ($\cong 3,3$ volte), ed è diminuita gradualmente fino a raggiungere una down-regolazione ($\cong 2,2$ volte) a 24 ore, mentre nelle foglie i livelli di espressione erano aumentati significativamente a 24 ore ($\cong 6,0$ volte). La trascrizione di TdMYB4B184 è risultata significativamente up-regolata nelle radici raggiungendo un massimo a 2 ore ($\cong 6,0$ volte), mentre nelle foglie la sua espressione era significativamente down-regolata a 12 ore ($\cong 3,3$ volte). L'analisi del trascritto TdMYB4A064 nelle radici stressate ha mostrato un aumento significativo dei livelli di espressione ($\cong 3,5$ volte) a 2 ore. Nei tessuti fogliari, i livelli di espressione risultavano aumentati a 12 ore e 24 ore ($\cong 2,0$ volte in entrambi i punti temporali). Anche in questo trattamento, i trascritti TdMYB2B143, TdMYB2A023 e TdMYB1A002, quasi non rilevabili nei tessuti fogliari, hanno mostrato alti livelli di espressione nelle radici stressate. In particolare, TdMYB2B143 e TdMYB2A023 erano significativamente up-regolati in tutti i punti

temporali, mentre TdMYB1A002 mostrava un'espressione significativamente più alta a 2 ore ($\cong 5,3$ volte) per poi diminuire. Gli effetti della privazione di N sui livelli di espressione dei geni testati sono risultati molto meno marcati rispetto agli altri stress (Figura 12C). Il trascritto TdMYB6A089 non ha mostrato alcun cambiamento di espressione in questa condizione, ad eccezione di un leggero ma significativo aumento a 12 ore nelle foglie ($\cong 2,0$ volte). I livelli del trascritto di TdMYB5B189 erano simili ai controlli in entrambi i tessuti in tutti i punti temporali, senza modifiche rilevanti. Il trascritto TdMYB4A063 non ha mostrato alcun cambiamento di espressione nelle radici, mentre nelle foglie era down-regolato a 6 ore e 24 ore di trattamento, con una diminuzione più evidente a 24 ore ($\cong 4,0$ volte). La trascrizione di TdMYB4B184 era significativamente down-regolata nelle foglie da 6 ore ($\cong 4,0$ volte) a 24 ore ($\cong 2,6$ volte). È stata rilevata anche una debole down-regolazione nelle radici trattate a 24 e 48 ore ($\cong 2,0$ volte in entrambi i punti temporali). L'analisi di espressione del trascritto TdMYB4A064 non ha mostrato cambiamenti significativi in questo trattamento. I tre geni, TdMYB2B143, TdMYB2A023 e TdMYB1A002 erano appena rilevabili nel controllo e nelle foglie stressate. Nelle radici, l'espressione di TdMYB2B143 era significativamente inferiore a 6 ore ($\cong 6,0$ volte), dopo i livelli di espressione sono tronati ai valori di controllo. I livelli di espressione di TdMYB2A023 hanno mostrato una diminuzione di $\cong 2,0$ volte a 6 ore, un aumento significativo di $\cong 3,0$ volte a 12 ore e valori di espressione simili al controllo a 24 e 48 ore. Le trascrizioni di

TdMYB1A002 hanno mostrato una diminuzione dei livelli di espressione $\cong 2,0$ volte a 6 ore, un aumento significativo a 12 ore ($\cong 2,4$ volte), poi l'espressione è tornata ai livelli di controllo (Figura 12C).

Figura 12 | Livelli di espressione relativa (PCR quantitativa in tempo reale, qPCR) di otto geni R2R3-MYB in radici e foglie di grano duro. Le piante sono state sottoposte a stress salino (A), stress da siccità (B) e a stress da mancanza di azoto (N)(C), in esperimenti temporali. L'espressione genica relativa è stata calcolata in ogni punto temporale per il campione stressato rispetto al corrispondente controllo (campione non stressato). Il valore dell'espressione di controllo in ciascun punto temporale è impostato su 1 ed è rappresentato dalla linea nera in ciascuno grafico. *, ** e *** indicano la significatività a $p < 0,1$, $0,05$ e $0,01$, rispettivamente. REL, livello di espressione relativo (Blanco et al., 2022).



PATTERN REGOLATORI DEI TDR2R3-MYB SELEZIONATI

Al fine di esplorare le dinamiche regolatorie dei FT TDR2R3-MYB selezionati e analizzati in qPCR, e di identificare così efficaci bersagli genetici per l'accelerazione e la riproduzione delle piante, abbiamo esaminato la letteratura scientifica e recuperato studi di trascrittomica incentrati sulla risposta del grano duro agli stress abiotici. Abbiamo selezionato sei studi (Tabella 4) che affrontano la risposta del grano duro a diversi stress, tra cui siccità, calore, una combinazione di calore e siccità e privazione di N in diversi tessuti, ovvero radici, foglie, spighe e cereali, per un totale di 63 campioni di RNA-seq (28 controlli e 35 campioni trattati). I dati grezzi sono stati elaborati e filtrati mantenendo solo i geni espressi e ottenendo 40.333 geni, 141 di questi erano TdR2R3-MYB identificati in questo studio. I restanti 92 TdR2R3-MYB non sono stati mantenuti perché probabilmente non espressi nei tessuti e/o nelle condizioni incluse nel set di dati di espressione.

Tutti gli otto geni selezionati per i nostri esperimenti di qPCR hanno superato il filtro per essere inclusi nel set di dati di espressione; quindi, è possibile visualizzare i loro livelli di espressione assoluta (come valori TPM) in risposta a stress abiotici (Figura 13A). Le analisi di espressione differenziale hanno mostrato down-regolazioni significative per TdMYB5B189, TdMYB2A023 e TdMYB4A063 nei tessuti radicali in risposta allo stress da siccità. Sotto stress da N, è stata osservata una up-regolazione per TdMYB2B143 nelle radici e TdMYB4B184 nelle foglie a

bandiera, mentre è stata osservata una down-regolazione per TdMYB1A002 nelle radici. È stato previsto un elenco di regolatori con PlantTFDB per il grano duro da fornire al programma GENIE3. Questo strumento ha portato all'identificazione di un totale di 3.532 FT. Dopo il filtraggio per i FT presenti in un set di dati di espressione incentrato sullo stress, sono stati mantenuti 1.812 FT. Questi FT sono stati utilizzati come regolatori di input per una costruzione GENIE3 GRN per estrarre le sottoreti dei nostri otto geni selezionati per gli esperimenti di qPCR. Dalle analisi GRN, sono state mantenute solo le interazioni principali (16.000 classificate in base al peso). Questo elenco includeva tre (TdMYB4B184, TdMYB5B189, TdMYB6A089) degli otto R2R3-MYB di grano duro selezionati, con 41 interazioni, che rappresentano bersagli putativi (Figura 13B).

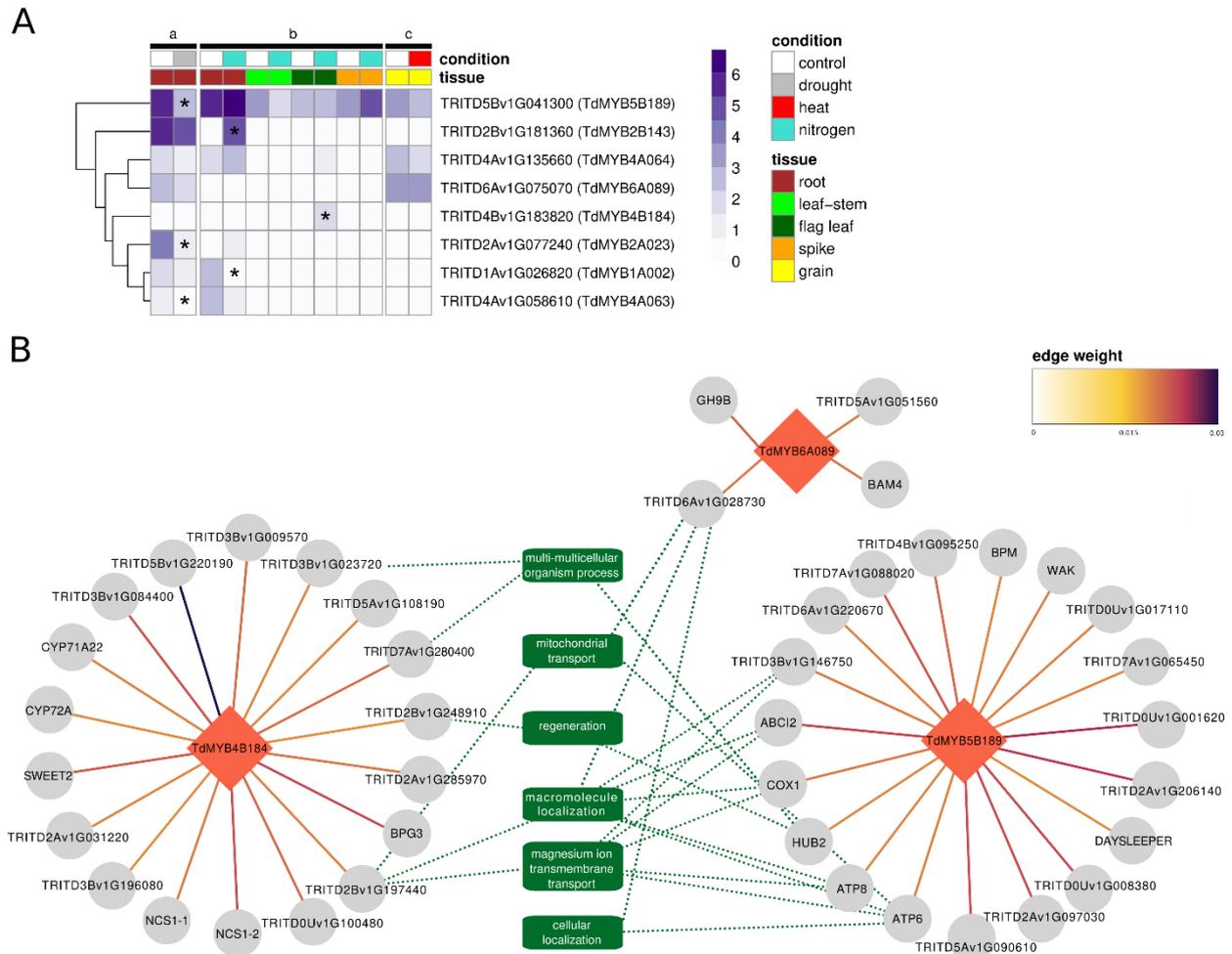
TdMYB4B184 ha mostrato interazioni con 18 geni (Figura 13B). Questo cluster non ha mostrato alcun significativo arricchimento nel database Gene Ontology (GO). Tuttavia, tra questi 18 geni, è interessante notare che cinque avevano ortologhi in Arabidopsis. Le linee di sovra-espressione per gli ortologhi di Arabidopsis hanno mostrato un fenotipo legato alle dimensioni della pianta (foglie della rosetta, stelo e dimensioni dell'intera pianta), come nei casi di BPG3 (ortologo di TRITD3Av1G213390), SWEET2 (ortologo di TRITD3Av1G171110) e AT2G40400 (ortologo di TRITD3Bv1G196080), e al numero di semi, come nel caso del gene NCS1 (ortologo di TRITD7Av1G160600 e TRITD7Bv1G118700). Molti di questi geni sono infatti legati ai processi che

avvengono nei cloroplasti (NCS1, BPG3). Altri target predetti erano le protein-chinasi, ad esempio TRITD5Bv1G220190, il più rilevante tra tutti i target predetti dei TdR2R3-MYB testati in questo studio (Figura 13B). È stato predetto anche un membro della famiglia GDSL esterasi/lipasi G (TRITD3Bv1G084400). Questa famiglia è stata collegata alla salinità e alla tolleranza alla siccità (Su et al., 2020). TdMYB5B189 ha mostrato interazioni con 19 geni (Figura 13B). Questo cluster ha mostrato un arricchimento significativo (FWER <0,05) per diversi processi biologici GO tutti correlati al trasporto ionico (GO:0006810) e al metabolismo dell'ATP (GO:0046034). Tra questi, sono stati trovati due geni che codificano per le sub-unità ATPasi (ATP6, ATP8), uno per la biogenesi del citocromo c (ABC12) e un E3 ubiquitina-protein ligasi BRE1-like 2 (HUB2). Altri bersagli previsti erano TRITD3Bv1G006290, ortologo di BPM in Arabidopsis, noto per essere coinvolto nella risposta allo stress salino, e TRITD6Av1G005530, ortologo di wall-associated kinases (WAK) in Arabidopsis, ipotizzati per essere sensori di stress salino che partecipano al processo di acclimatazione in questa condizione (Le Gall et al., 2015). TdMYB6A089 ha mostrato interazioni con solo quattro geni (Figura 13B). Tra questi è stata trovata una beta-amilasi, che è nota per essere coinvolta in stress da caldo e freddo (Kaplan e Guy, 2004).

Tabella 4 | Esperimenti RNA-seq estratti dal database Sequence Read Archive (SRA) (Blanco et al., 2022).

SRA accession number	SRA study	Study code	Species	Stress	Tissue	Publication	Publication link
PRJEB20904	ERP023105	a	Triticum turgidum subsp. durum	Drought	Root	Cagirici et al. 2017	https://www.nature.com/articles/s41598-017-11170-8#citeas
PRJNA353753	SRP094621	b	Triticum turgidum subsp. durum	Nitrogen	Root, Leaf-stem, Flag leaf, Spike	Curci et al. 2017	https://www.nature.com/articles/s41598-017-01377-0
PRJNA773969	SRP342868	c	Triticum turgidum subsp. durum	Heat	Grain	Arenas-M et al. 2022	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8747107/
PRJNA641098	SRP268301	d	Triticum turgidum subsp. durum	Heat, Drought, Heat + Drought	Flag leaf	Liu et al. 2020	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32825615/
PRJNA644573	SRP270662	e	Triticum turgidum subsp. durum	Heat, Drought, Heat + Drought	Grain	Liu et al. 2020	https://www.mdpi.com/1422-0067/21/20/7772
PRJNA680308	SRP293764	f	Triticum turgidum subsp. durum	Drought	Flag leaf, Grain	Liu et al. 2021	https://www.nature.com/articles/s41598-021-83074-7

Figura 13 | Espressione genica e interazioni regolatorie nei dati trascrittomici pubblici sugli stress abiotici. (A) Profili di espressione degli otto geni TdR2R3-MYB selezionati per gli esperimenti di qPCR, in un sottoinsieme di studi trascrittomici pubblici (a-c) elencati nella **Tabella 4** per i quali erano disponibili 3 repliche. I valori di espressione sono dati come $\log_2(\text{TPM}+1)$ della media dei replicati biologici per condizione per studio. I geni differenzialmente espressi sono contrassegnati da un asterisco. (B) Rete di regolamentazione GENIE3 di FT TdMYB5B189, TdMYB4B184 e TdMYB6A089 (rombi rossi). I geni bersaglio sono rappresentati con cerchi grigi. Le linee di collegamento tra i geni mostrano, a seconda del colore, il grado di relazione. Le linee tratteggiate verdi mostrano le connessioni con i relativi processi biologici riassunti da REVIGO in comune tra i cluster normativi (minimo due). Se disponibile, viene mostrato il nome del gene (dall'ortologo di *Arabidopsis thaliana*) al posto dell'ID del gene (Blanco et al., 2022).



PROVA AGRONOMICA VARIETALE: PRODUZIONE E QUALITÀ DELLE QUATTRO VARIETÀ DI FRUMENTO COLTIVATE

CONFRONTO TRA I DUE SITI DI COLTIVAZIONE

Mettendo in relazione i due siti, dall'analisi dei dati relativi alla coltivazione delle quattro varietà emerge una differenza significativa sui livelli produttivi e qualitativi. Nello specifico, considerando tutte le varietà coltivate, il sito 1 (Matera) mostra in media una maggiore produzione di granella e una percentuale maggiore di contenuto proteico rispetto a quanto calcolato per il sito 2 (Ferrandina). In Tabella 5 vengono mostrati i risultati ottenuti attraverso l'analisi della varianza (ANOVA). I risultati confermano quanto atteso, ovvero che il sito 1 possiede caratteristiche ambientali più favorevoli che conferiscono a questo areale una maggiore attitudine alla coltivazione del frumento duro rispetto al sito 2.

Tabella 5 | Parametri qualitativi e produttivi del frumento duro in relazione al sito. Codici di significatività: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' Significatività per P<0.05; **, significatività per P< 0.01; ns, no differenze significative

Sito	Resa produttiva (t/Ha)	Proteine %	N. Di Spighe/m ²	Glutine	Colore
1. Matera	2,9 A	14,2 A	307 a	11,0 A	15
2. Ferrandina	2,0 B	11,7 B	261 b	8,8 B	14
	**	***	*	***	ns

CONFRONTO TRA AREE A CONCIMAZIONE STANDARD E AREE PRIVE
DI CONCIMAZIONE AZOTATA

Analizzando i dati relativi alla prova di di concimazione, frumento concimato uniformemente con 120 Kg/ha di N e non concimato, si evince come le aree concimate abbiano raggiunto livelli produttivi e qualitativi significativamente più alti rispetto alle parcelle non concimate (Tabella 6).

Tabella 6 | Parametri qualitativi e produttivi del frumento duro in relazione al grado di concimazione azotata. Codici di significatività: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' Significatività per P<0.05; **, significatività per P< 0.01; ns, no differenze significative

Concimato	Resa produttiva (t/Ha)	Proteine %	N. Di Spighe	Glutine	Colore
si	2,9 A	13,6 A	345,8 A	11 a	15
no	2,0 B	12,2 B	225,8 B	9 b	14
	**	**	***	*	ns

CONFRONTO TRA VARIETÀ

Prendendo in considerazione i risultati relativi alla risposta produttiva e qualitativa di ogni singola varietà per i diversi siti e per la diversa strategia di concimazione, i risultati in Tabella 7 mostrano una differenza altamente significativa tra le varietà moderne e le varietà antiche. Nello specifico Marco Aurelio, Kanakis e Svevo mostrano livelli produttivi significativamente più alti rispetto a Cappelli, che risulta essere la varietà con la minor resa produttiva. Non si evidenziano invece differenze significative tra le varietà in assenza di concimazione. Il contenuto in proteine è risultato significativamente inferiore nella varietà Marco Aurelio in assenza di concimazione azotata; tuttavia, anche le varietà nella tesi non concimata hanno evidenziato un contenuto in proteine tendenzialmente, anche se non significativamente, più basso.

Tabella 7 | Parametri qualitativi e produttivi del frumento duro in relazione alla varietà. Codici di significatività: 0 ****' 0.001 ***' 0.01 **' 0.05 *.' Significatività per P<0.05; **, significatività per P< 0.01; ns, no differenze significative

Varietà	Resa produttiva (T/Ha)	Proteine %	N_Spighe/m ²	Glutine	Colore
M_Aurelio	3,6 a	13,2 a	430,4 a	10	15,5 a
Kanakis	3,2 a	13,8 a	388,0 ab	10	13,5 ab
Svevo	3,0 a	13,6 a	338,5 b	11	15,3 a
Cappelli	2,2 b	14,1 a	226,9 c	11	15,1 a
Kanakis_no_con	2,2 b	12,5 ab	238,5 c	10	12,1 b
M_Aurelio_no_con	2,1 b	11,7 b	253,8 c	9	14,8 a

Svevo_no_con	1,9 b	12,7 ab	207,7 c	10	15,4 a
Cappelli_no_con	1,8 b	12,0 ab	203,8 c	9	15,2 a
	***	*	***	ns	*

DISCUSSIONI

IDENTIFICAZIONE DEI GENI R2R3-MYB NEL GRANO DURO, CLUSTER POACEAE-SPECIFICI, ESPRESSIONE E DINAMICHE REGOLATORIE IN CONDIZIONE DI STRESS ABIOTICI

La famiglia dei geni MYB è uno dei più grandi gruppi di FT nelle piante, ampiamente esplorato in diverse specie vegetali, incluso il grano tenero (Wei et al., 2020; Xiao et al., 2020). In questo studio, è stata eseguita un'analisi dell'intero genoma per l'identificazione dei FT R2R3-MYB nel grano duro, evidenziando le caratteristiche delle sequenze, le relazioni filogenetiche e la risposta agli stress abiotici.

I principali residui conservati nel dominio MYB del grano duro, principalmente distribuiti tra il secondo e il terzo residuo Trp conservato in entrambe le ripetizioni, riflettono quanto precedentemente osservato nelle piante (Jiang e Rao, 2020). L'inserimento del residuo di leucina (L35) nella ripetizione R2, il residuo idrofobico all'inizio del dominio R3 e la regione del linker R2R3 sono considerati passaggi importanti per l'origine e l'evoluzione delle proteine R2R3-MYB specifiche per la pianta (Williams e Grotewold, 1997; Stracke et al., 2001; Zhang et al., 2012a; Li et al., 2016, 2020c; Wei et al., 2020).

D'altra parte, la presenza di alcune inserzioni/sostituzioni di amminoacidi in siti specifici delle ripetizioni R2 e R3, può determinare caratteristiche specifiche della sottofamiglia e/o del lignaggio (Du et al., 2015).

L'identificazione di nove sottofamiglie di R2R3-MYB nel grano duro, come osservato in un'ampia gamma di piante terrestri, conferma che gruppi di geni in questa famiglia hanno subito eventi di espansione e funzionalizzazione (Jiang e Rao, 2020). In effetti, si prevede che gli R2R3-MYB di grano duro che rientrano nei gruppi funzionali di *Arabidopsis* condividano ruoli biologici simili. Ad esempio, i TdMYB appartenenti al gruppo VIII possono essere coinvolti in: risposta allo stress ambientale (S1, S2, S11, S20), regolazione della biosintesi dei fenilpropanoidi (S4, S5, S6 e S7), destino e identità cellulare (S15 e S9), regolazione dello sviluppo delle piante (S14, S16, S18, S19), controllo della biosintesi della parete cellulare (S3 e S13) e difesa delle piante (S12) (Dubos et al., 2010). La famiglia S25 nel gruppo II può essere coinvolta nell'embriogenesi, mentre i membri S23 nel gruppo III, come ortologi di *Arabidopsis*, potrebbero regolare lo stress salino ed essere coinvolti nella risposta dell'acido abscissico (Beathard et al., 2021). I gruppi IV, V e VII includono membri MYB eventualmente implicati nella regolamentazione dello sviluppo delle piante (S22, S21 e S18). Il gruppo VI include AtMYB125/DUO1, coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare (Cominelli e Tonelli, 2009). Il cluster ARP contiene MYB di grano che probabilmente svolgono un ruolo nei processi di divisione cellulare (Sun et al., 2002), mentre gli R2R3-

MYB FLP possono essere implicati nella differenziazione e nel patterning stomatico (Dubos et al., 2010).

Cercando ortogruppi ed eseguendo successive analisi filogenetiche, siamo stati in grado di dimostrare l'esistenza di FT R2R3-MYB specifici e unici per le Poaceae su un numero più ampio di specie di Poaceae, incluso il grano duro. Queste sequenze, che formano due gruppi principali divergenti dai gruppi III e IV, possono essere considerate geni in rapida evoluzione (Jiang e Rao, 2020). Inoltre, abbiamo rilevato un ulteriore gruppo di geni esclusivo delle specie di Poaceae, situato in posizione più basale nell'albero, ascrivibile ai FT R2R3-MYB, rappresentando così un'altra particolarità per la famiglia delle Poaceae. Infatti, sebbene la principale diversificazione di R2R3-MYB si sia verificata prima della scissione di monocotiledoni e dicotiledoni, ogni lignaggio ha continuato ad espandersi, risultando in una molteplicità di cladi specifici del lignaggio, che possono contribuire alla divergenza funzionale (Sun et al., 2002; Du et al., 2015; Millard et al., 2019; Jiang e Rao, 2020; Li et al., 2020c; Singh et al., 2020).

I fattori di trascrizione MYB hanno dimostrato di rispondere agli stimoli ambientali in diverse specie vegetali. TdMYB6A089 mostra un alto livello di somiglianza con il grano tenero TaMYB1 (identità del 99%). I livelli di espressione di TaMyb1 in *T. aestivum* risultavano diversi in relazione a vari trattamenti abiotici, aumentando nelle radici in condizioni di siccità e stress salino (Lee et al., 2007), differendo in qualche modo da quanto

osservato in questo studio per TdMYB6A089, considerando che le condizioni di crescita e le fasi fisiologiche non erano le stesse.

TdMYB4B184, che è l'ortologo di TaMYB82 di *T. aestivum* (identità del 99%), ha mostrato una up-regolazione complessiva nelle radici e nelle foglie stressate dalla siccità (almeno in determinati momenti). Nel grano tenero, TaMYB82 è risultato up-regolato nelle piantine durante il trattamento con PEG che mimava la siccità (Zhao et al., 2017). L'up-regolazione è stata osservata anche nel grano duro dalle nostre analisi in silico di RNAseq in foglie a bandiera sotto stress da N (Figura 13A), il che porta a ipotizzare che questo gene sia coinvolto in una gamma più ampia di stress abiotici.

TdMYB2A023, fortemente attivato durante la siccità e lo stress salino nel grano duro (Figura 12), ma down-regolato nelle radici di grano duro (cultivar Kiziltan) soggetto a stress da siccità a lungo termine (Figura 13), è simile al 98% a TaMYB80 o TaMYB74. Bi et al. (2016) hanno riportato che TaMYB74 risultava up-regolato sia a seguito di una rapida disidratazione che di siccità ad azione lenta, in conformità con i dati ottenuti per le loro controparti in *Arabidopsis*, AtMYB41 e AtMYB96.

TdMYB1A002, up-regolato in risposta alla siccità e allo stress salino nel nostro studio, è molto simile (> 98% di identità) a TaPIMP1 e al gene MYB2-like in *T. aestivum*. TaPIMP1 è un importante mediatore positivo nelle risposte di difesa del grano a *B. sorokiniana* e allo stress da siccità (Zhang et al., 2012c). In sintesi, in seguito all'infezione da *B. sorokiniana* e allo

stress da siccità, TaPIMP1 veniva up-regolato, attivando i geni legati alla difesa e allo stress nelle vie di segnalazione ABA e SA, portando a una maggiore resistenza allo stress sia biotico che abiotico. L'espressione del gene TaPIMP1 è risultata up-regolata nei tessuti radicali del genotipo HD2967 in condizione di carenza di N (Mahmoud et al., 2020). D'altra parte, i nostri risultati di qPCR hanno mostrato un aumento dei livelli di trascrizione a 12 ore dalla mancanza di N, seguito da una diminuzione nei punti temporali successivi. Questa down-regolazione potrebbe essere in linea con quanto osservato nelle piante di grano duro adulte dopo la privazione di N a lungo termine (Figura 13A).

I geni bersaglio per TdMYB6A089, TdMYB4B184 e TdMYB5B189 identificati attraverso la rete di regolazione genica erano per lo più collegati a processi biologici coinvolti nel trasporto e nella fosforilazione. Questi processi partecipano al mantenimento del potenziale biologico della membrana e all'attivazione di cascate di segnalazione coinvolte nelle risposte allo stress abiotico (Conde et al., 2011). È stato precedentemente osservato che un'alta percentuale (77%) di coppie di geni ortologi ha conservato la co-espressione tra *Arabidopsis* e riso, il che implica che i moduli genici, coinvolti anche nella risposta allo stress abiotico, sono spesso conservati tra dicotiledoni e monocotiledoni (Movahedi et al., 2011; Obertello et al., 2015; Vercruyssen et al., 2020). D'altra parte, è stabilito che duplicazioni recenti e ancestrali hanno causato un'espansione di R2R3-MYB che potrebbe comportare eventi di

neo e sub-funzionalizzazione ed evoluzione della rete di regolazione genica, anche a livello di specie (Agarwal et al., 2016; Gordon et al., 2017; Jiang e Rao., 2020).

Uno degli interessanti bersagli di TdMYB5B189 è un'ubiquitina ligasi E3 (ortologa di Arabidopsis HUB2), coinvolta nella mono-ubiquitinazione dell'istone H2B. È stato recentemente dimostrato che HUB2 è coinvolto nella regolazione dello stress, infatti la sua sovra-espressione ha aumentato l'espressione di geni correlati alla siccità nelle piante di cotone transgeniche (Chen et al., 2019). TRITD6Av1G220670, un altro target di TdMYB5B189, è un membro della famiglia delle proteine anchirine. È stato dimostrato che i membri di questa famiglia di geni sono coinvolti nella risposta alla siccità e agli stress salini in Arabidopsis e soia (Zhao et al., 2020a). Tra i target previsti per TdMYB4B184, TRITD3Bv1G009570, una proteina della famiglia delle protein-chinasi receptor-like, con ripetizioni ricche di leucina, è ortologa di AT2G34930, che è implicato nella risposta a stress sia abiotici che biotici (Ma e Bohnert, 2007).

PRODUZIONE E QUALITÀ DI QUATTRO VARIETÀ DI FRUMENTO DURO IN CONDIZIONE DI STRESS DA CARENZA DI AZOTO

Da un punto di vista eco-fisiologico, in questo studio emerge una conferma della complessa relazione tra resa delle colture e suolo e che questa dipende, oltre che da complesse interazioni tra le proprietà fisiche e chimiche del suolo, anche da altri fattori naturali esterni come le condizioni pedoclimatiche. Comprendere la variabilità delle proprietà del paesaggio e del suolo e il loro effetto sulla resa delle colture è fondamentale per i sistemi di gestione sostenibili e specifici del sito e della pianificazione dell'uso del suolo (Juhos et al., 2015). Il rendimento medio delle coltivazioni nei due siti sperimentali selezionati in questo studio evidenzia chiaramente come la marginalità compositiva del suolo di Ferrandina e l'andamento climatico poco favorevole abbiano influito negativamente su tutti i parametri esaminati, risultando in una produzione più scarsa sia a livello quantitativo che qualitativo per tutte le varietà rispetto a quanto ottenuto nel sito sperimentale di Matera (Tabella 5). Risulta pertanto ovvio che le caratteristiche ambientali influiscano in maniera significativa sul raccolto. Altra evidenza sperimentale in questo studio è l'influenza in entrambi i siti dello stress indotto dalla mancata concimazione azotata. In entrambi i siti la differenza appare significativa a tutti i livelli tra le piante coltivate con una dose standard di concime e quelle che invece non hanno ricevuto alcuna dose di concime, confermando ancora una volta come

l'apporto di N esterno risulta essenziale per raggiungere delle rese produttive e qualitative adeguate, a prescindere dal genotipo in esame. È interessante notare che se si osservano i risultati confrontando le diverse varietà in esame, in entrambi i siti, emerge una differenza significativa tra le varietà se queste vengono coltivate con una dose standard di concime, mentre tale differenza non è significativamente apprezzabile nel caso in cui queste non siano state addizionate di una dose standard di concime azotato. In particolare, le varietà moderne Marco Aurelio, Kanakis e Svevo mostrano livelli produttivi significativamente più alti rispetto a Cappelli, che risulta essere la varietà con la minor resa produttiva, sia per le aree concimate che non concimate. Malgrado la bassa resa, emerge una relazione inversa tra produttività e contenuto proteico, che risulta tendenzialmente superiore per la varietà Cappelli in condizione di concimazione standard. Nella condizione di non concimato invece, il contenuto proteico diventa lievemente inferiore nella varietà Cappelli rispetto alle varietà Kanakis e Svevo, con il più basso contenuto proteico nella varietà Marco Aurelio (Tabella 7). Complessivamente i risultati ottenuti mostrano una risposta differente delle quattro varietà allo stress indotto dalla mancata concimazione. In particolare, è importante notare come una varietà come il Cappelli, non particolarmente produttiva ma qualitativamente superiore alle altre in condizioni di concimazione standard, non mantiene questa sua peculiarità se posta in condizione di stress, suggerendo una minore capacità adattativa a questa particolare

condizione. Per garantire la sicurezza alimentare e la salvaguardia ambientale, è diventato oggi imperativo ottimizzare il tasso di utilizzo dei fertilizzanti. Obiettivo comune è pertanto il miglioramento dell'efficienza d'uso dei nutrienti delle colture e in particolare dell'azoto (NUE), caratteristica altamente desiderabile sia dal punto di vista economico che ambientale. La maggior parte delle misurazioni di NUE per il frumento e altri cereali si basano su valutazioni in campo delle rese delle colture a determinati input di N, risposte prestazionali all'aggiunta di fertilizzanti azotati o quantificando i tassi di recupero dei fertilizzanti azotati. Tuttavia, la NUE è un tratto complesso che comprende due componenti principali chiave, l'assorbimento di N e l'efficienza di utilizzo dell'N, ciascuno dei quali coinvolge molti processi fisiologici e percorsi biochimici. Inoltre, gli eventi di poliploidizzazione, l'addomesticamento delle varietà autoctone e il recente allevamento selettivo hanno tutti introdotto delle restrizioni nella diversità genetica ed è probabile che molti alleli vantaggiosi o addirittura geni relativi a tratti di valore, tra cui la NUE, potrebbero essere andati perduti nelle moderne linee commerciali (Malcolm et al., 2017).

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Nel complesso, il presente studio, in relazione ai due approcci sperimentali utilizzati, fornisce una interessante visione della risposta del frumento duro agli stress abiotici. Da un lato è risultato evidente il ruolo dei geni R2R3-MYB, che, insieme alle analisi sperimentali e alle dinamiche regolatorie svelate, costituisce una solida base per esplorare ulteriormente le funzioni di questa famiglia di geni nella risposta a stress abiotici e selezionare validi candidati da studiare per futuri programmi di miglioramento genetico del grano duro.

Per di più, la presente indagine rafforza l'esigenza di una selezione più approfondita e diversificata del germoplasma di frumento, anche tra le varietà più vecchie, ecotipi e parenti selvatici, nella più ampia selezione possibile, con l'obiettivo di individuare quelle componenti (loci, alleli o geni) includibili in un ampio programma di miglioramento genetico, mirato al raggiungimento del tanto ricercato compromesso: resa e qualità al passo con le esigenze attuali e nel rispetto dell'ambiente.

L'approccio agronomico ha messo in evidenza l'importante ruolo della scelta varietale, della tecnica di concimazione azotata e dell'ambiente di coltivazione al fine di raggiungere il giusto compromesso tra quantità, qualità delle produzioni ed uso efficiente delle risorse.

Nello specifico sono risultate, a parità di qualità della granella, più efficienti e produttive le nuove varietà Kanakis, Marco Aurelio e Svevo

rispetto alla antica varietà Cappelli, sia in ambienti favorevoli che marginali per la coltivazione del frumento.

La concimazione azotata, se applicata in modo agronomicamente corretto, ha migliorato quantità, qualità ed efficienza d'uso delle risorse in tutti e due gli areali di coltivazione.

TABELLE SUPPLEMENTARI

Tabella supplementare 1 | Localizzazione cromosomica, trascritti e numero di introni dei geni MYB (Blanco et al., 2022).

Ensembl_gene_id	Nome	Cromosoma	Posizione di inizio	Posizione di fine	Strand	ID trascritto	Numero introni
TRITD1Av1G009570	TdMYB1A001	1A	20670835	20671733	1	TRITD1Av1G009570.1	1
TRITD1Av1G026820	TdMYB1A002	1A	56834557	56835796	1	TRITD1Av1G026820.1	1
TRITD1Av1G030230	TdMYB1A003	1A	64709329	64710870	1	TRITD1Av1G030230.2	2
TRITD1Av1G038350	TdMYB1A004	1A	86821384	86838357	-1	TRITD1Av1G038350.1	2
TRITD1Av1G039510	TdMYB1A005	1A	90589999	90599447	1	TRITD1Av1G039510.2	2
TRITD1Av1G097550	TdMYB1A006	1A	266940787	266942538	-1	TRITD1Av1G097550.1	2
TRITD1Av1G131700	TdMYB1A007	1A	355677121	355678606	1	TRITD1Av1G131700.1	2
TRITD1Av1G161280	TdMYB1A008	1A	436268556	436269750	1	TRITD1Av1G161280.1	2
TRITD1Av1G168580	TdMYB1A009	1A	455378854	455379696	-1	TRITD1Av1G168580.1	1
TRITD1Av1G185000	TdMYB1A010	1A	491891514	491894686	-1	TRITD1Av1G185000.2	3
TRITD1Av1G205720	TdMYB1A011	1A	536078613	536079633	1	TRITD1Av1G205720.1	1
TRITD1Av1G205740	TdMYB1A012	1A	536240109	536241140	1	TRITD1Av1G205740.1	1
TRITD1Av1G205750	TdMYB1A013	1A	536248392	536249400	-1	TRITD1Av1G205750.3	1
TRITD1Av1G205760	TdMYB1A014	1A	536263962	536264923	-1	TRITD1Av1G205760.2	1
TRITD1Av1G208130	TdMYB1A015	1A	542552644	542553811	-1	TRITD1Av1G208130.2	1
TRITD1Av1G216690	TdMYB1A016	1A	559861240	559862258	1	TRITD1Av1G216690.1	1
TRITD2Av1G015370	TdMYB2A017	2A	29378377	29380761	-1	TRITD2Av1G015370.1	2
TRITD2Av1G024990	TdMYB2A018	2A	50064821	50065801	-1	TRITD2Av1G024990.1	0
TRITD2Av1G045170	TdMYB2A019	2A	99730480	99741162	-1	TRITD2Av1G045170.2	1
TRITD2Av1G045220	TdMYB2A020	2A	99892008	99892915	-1	TRITD2Av1G045220.1	1
TRITD2Av1G047010	TdMYB2A021	2A	103502164	103503231	1	TRITD2Av1G047010.1	1
TRITD2Av1G047580	TdMYB2A022	2A	104648329	104652583	1	TRITD2Av1G047580.5	11
TRITD2Av1G077240	TdMYB2A023	2A	182709707	182711004	1	TRITD2Av1G077240.1	2
TRITD2Av1G098880	TdMYB2A024	2A	245694947	245696267	1	TRITD2Av1G098880.1	2
TRITD2Av1G199440	TdMYB2A025	2A	552755801	552757913	1	TRITD2Av1G199440.3	2

TRITD2Av1G202420	TdMYB2A026	2A	561009521	561010771	-1	TRITD2Av1G202420.1	2
TRITD2Av1G218280	TdMYB2A027	2A	601218012	601220267	-1	TRITD2Av1G218280.1	2
TRITD2Av1G220910	TdMYB2A028	2A	606219460	606220667	-1	TRITD2Av1G220910.1	2
TRITD2Av1G221060	TdMYB2A029	2A	606421711	606423714	-1	TRITD2Av1G221060.1	2
TRITD2Av1G221150	TdMYB2A030	2A	606569618	606670793	-1	TRITD2Av1G221150.2	2
TRITD2Av1G225810	TdMYB2A031	2A	618991705	618993612	1	TRITD2Av1G225810.1	2
TRITD2Av1G244360	TdMYB2A032	2A	667082097	667083840	-1	TRITD2Av1G244360.1	2
TRITD2Av1G253680	TdMYB2A033	2A	687054037	687055144	-1	TRITD2Av1G253680.1	1
TRITD2Av1G253690	TdMYB2A034	2A	687094437	687095568	-1	TRITD2Av1G253690.1	1
TRITD2Av1G254090	TdMYB2A035	2A	687911074	687912364	-1	TRITD2Av1G254090.1	2
TRITD2Av1G255320	TdMYB2A036	2A	690641273	690642363	1	TRITD2Av1G255320.1	1
TRITD2Av1G255330	TdMYB2A037	2A	690735103	690736263	1	TRITD2Av1G255330.2	1
TRITD2Av1G255340	TdMYB2A038	2A	690744992	690746119	1	TRITD2Av1G255340.2	1
TRITD2Av1G255350	TdMYB2A039	2A	691248651	691250005	1	TRITD2Av1G255350.2	1
TRITD2Av1G285890	TdMYB2A040	2A	755188307	755189861	1	TRITD2Av1G285890.1	2
TRITD3Av1G010860	TdMYB3A041	3A	20564451	20565586	1	TRITD3Av1G010860.2	1
TRITD3Av1G027730	TdMYB3A042	3A	55772968	55773908	1	TRITD3Av1G027730.1	1
TRITD3Av1G033470	TdMYB3A043	3A	67993168	67994173	-1	TRITD3Av1G033470.1	2
TRITD3Av1G046610	TdMYB3A044	3A	103313889	103317129	-1	TRITD3Av1G046610.1	2
TRITD3Av1G093070	TdMYB3A045	3A	231228730	231230180	-1	TRITD3Av1G093070.2	2
TRITD3Av1G121270	TdMYB3A046	3A	334690557	334691724	1	TRITD3Av1G121270.1	2
TRITD3Av1G152340	TdMYB3A047	3A	432942625	432943384	-1	TRITD3Av1G152340.1	1
TRITD3Av1G168410	TdMYB3A048	3A	473716268	473717724	-1	TRITD3Av1G168410.2	3
TRITD3Av1G170610	TdMYB3A049	3A	478876918	478877958	1	TRITD3Av1G170610.2	2
TRITD3Av1G172210	TdMYB3A050	3A	481986850	481987721	-1	TRITD3Av1G172210.1	1
TRITD3Av1G186610	TdMYB3A051	3A	517142679	517144114	-1	TRITD3Av1G186610.1	2
TRITD3Av1G207740	TdMYB3A052	3A	574274464	574279949	1	TRITD3Av1G207740.1	3
TRITD3Av1G222290	TdMYB3A053	3A	609775892	609778006	-1	TRITD3Av1G222290.1	2
TRITD3Av1G239730	TdMYB3A054	3A	651517076	651518002	1	TRITD3Av1G239730.1	0
TRITD3Av1G249330	TdMYB3A055	3A	673520768	673521636	-1	TRITD3Av1G249330.1	1
TRITD3Av1G260970	TdMYB3A056	3A	694983038	694991683	1	TRITD3Av1G260970.3	2
TRITD3Av1G286170	TdMYB3A057	3A	743609528	743610465	-1	TRITD3Av1G286170.2	1
TRITD4Av1G000100	TdMYB3A058	4A	338574	339395	-1	TRITD4Av1G000100.1	0

TRITD4Av1G029120	TdMYB4A059	4A	69795623	69798673	1	TRITD4Av1G029120.1	1
TRITD4Av1G029150	TdMYB4A060	4A	69810409	69811149	1	TRITD4Av1G029150.1	0
TRITD4Av1G054810	TdMYB4A061	4A	135083366	135084889	-1	TRITD4Av1G054810.1	2
TRITD4Av1G057610	TdMYB4A062	4A	142799625	142804677	-1	TRITD4Av1G057610.1	2
TRITD4Av1G058610	TdMYB4A063	4A	145451852	145453305	1	TRITD4Av1G058610.1	1
TRITD4Av1G135660	TdMYB4A064	4A	430475438	430481853	-1	TRITD4Av1G135660.2	1
TRITD4Av1G136700	TdMYB4A065	4A	433843531	433844463	-1	TRITD4Av1G136700.2	2
TRITD4Av1G155930	TdMYB4A066	4A	482609246	482610278	-1	TRITD4Av1G155930.2	1
TRITD4Av1G161800	TdMYB4A067	4A	497349449	497351779	-1	TRITD4Av1G161800.1	1
TRITD4Av1G171580	TdMYB4A068	4A	525985199	525986551	1	TRITD4Av1G171580.1	2
TRITD4Av1G190440	TdMYB4A069	4A	567360822	567362239	-1	TRITD4Av1G190440.1	3
TRITD4Av1G209780	TdMYB4A070	4A	604117929	604119302	-1	TRITD4Av1G209780.1	2
TRITD4Av1G227090	TdMYB4A071	4A	637282331	637283365	-1	TRITD4Av1G227090.1	2
TRITD4Av1G256700	TdMYB4A072	4A	719690567	719942447	1	TRITD4Av1G256700.1	2
TRITD4Av1G256770	TdMYB4A073	4A	720070558	720071915	1	TRITD4Av1G256770.3	2
TRITD5Av1G041490	TdMYB4A074	5A	100378242	100379336	1	TRITD5Av1G041490.1	0
TRITD5Av1G044060	TdMYB5A075	5A	110781806	110784795	1	TRITD5Av1G044060.1	4
TRITD5Av1G046770	TdMYB5A076	5A	117512346	117513980	-1	TRITD5Av1G046770.2	2
TRITD5Av1G057530	TdMYB5A077	5A	147806204	147808444	1	TRITD5Av1G057530.1	1
TRITD5Av1G108560	TdMYB5A078	5A	309479419	309480508	1	TRITD5Av1G108560.1	1
TRITD5Av1G118710	TdMYB5A079	5A	333601498	333602749	-1	TRITD5Av1G118710.1	1
TRITD5Av1G144700	TdMYB5A080	5A	404716354	404717543	-1	TRITD5Av1G144700.1	2
TRITD5Av1G182550	TdMYB5A081	5A	496675292	496678107	-1	TRITD5Av1G182550.2	1
TRITD5Av1G185470	TdMYB5A082	5A	502106688	502107611	-1	TRITD5Av1G185470.4	1
TRITD5Av1G208870	TdMYB5A083	5A	558995932	559001918	-1	TRITD5Av1G208870.3	2
TRITD5Av1G238760	TdMYB5A084	5A	621954256	621955108	1	TRITD5Av1G238760.1	1
TRITD5Av1G244760	TdMYB5A085	5A	636554058	636554953	1	TRITD5Av1G244760.1	1
TRITD5Av1G251090	TdMYB5A086	5A	651012846	651014121	-1	TRITD5Av1G251090.1	2
TRITD6Av1G007200	TdMYB5A087	6A	16750801	16752428	1	TRITD6Av1G007200.1	2
TRITD6Av1G046350	TdMYB6A088	6A	107398676	107400093	-1	TRITD6Av1G046350.2	2
TRITD6Av1G075070	TdMYB6A089	6A	185039817	185040713	-1	TRITD6Av1G075070.1	0
TRITD6Av1G109670	TdMYB6A090	6A	298503709	298508094	-1	TRITD6Av1G109670.9	6
TRITD6Av1G143210	TdMYB6A091	6A	418205710	418206480	1	TRITD6Av1G143210.1	0

TRITD6Av1G143260	TdMYB6A092	6A	418335071	418335844	1	TRITD6Av1G143260.1	0
TRITD6Av1G143270	TdMYB6A093	6A	418453514	418457241	1	TRITD6Av1G143270.2	0
TRITD6Av1G143280	TdMYB6A094	6A	418597870	418598622	1	TRITD6Av1G143280.1	0
TRITD6Av1G143290	TdMYB6A095	6A	418693841	418694566	1	TRITD6Av1G143290.1	0
TRITD6Av1G146010	TdMYB6A096	6A	425633292	425634329	1	TRITD6Av1G146010.1	2
TRITD6Av1G152410	TdMYB6A097	6A	442968169	442970443	1	TRITD6Av1G152410.1	2
TRITD6Av1G169300	TdMYB6A098	6A	487349469	487350776	1	TRITD6Av1G169300.2	2
TRITD6Av1G183650	TdMYB6A099	6A	522948666	522950167	-1	TRITD6Av1G183650.2	2
TRITD6Av1G194500	TdMYB6A100	6A	549292483	549293682	1	TRITD6Av1G194500.1	2
TRITD6Av1G194510	TdMYB6A101	6A	549379854	549381091	1	TRITD6Av1G194510.1	2
TRITD6Av1G206130	TdMYB6A102	6A	573640743	573642983	-1	TRITD6Av1G206130.1	3
TRITD7Av1G006440	TdMYB6A103	7A	10439367	10440745	-1	TRITD7Av1G006440.1	2
TRITD7Av1G006480	TdMYB7A104	7A	10552887	10554212	-1	TRITD7Av1G006480.1	2
TRITD7Av1G035980	TdMYB7A105	7A	75660441	75662744	1	TRITD7Av1G035980.1	2
TRITD7Av1G038860	TdMYB7A106	7A	81343535	81345901	-1	TRITD7Av1G038860.2	2
TRITD7Av1G053110	TdMYB7A107	7A	117987002	117987868	1	TRITD7Av1G053110.1	1
TRITD7Av1G058060	TdMYB7A108	7A	131420436	131421569	1	TRITD7Av1G058060.1	2
TRITD7Av1G070470	TdMYB7A109	7A	164904267	164905270	1	TRITD7Av1G070470.1	2
TRITD7Av1G096030	TdMYB7A110	7A	232707416	232709194	1	TRITD7Av1G096030.1	2
TRITD7Av1G114530	TdMYB7A111	7A	282321578	282322300	-1	TRITD7Av1G114530.1	0
TRITD7Av1G157180	TdMYB7A112	7A	424165142	424166913	1	TRITD7Av1G157180.1	2
TRITD7Av1G177140	TdMYB7A113	7A	481763136	481764239	-1	TRITD7Av1G177140.1	3
TRITD7Av1G203290	TdMYB7A114	7A	546870065	546873215	-1	TRITD7Av1G203290.1	3
TRITD7Av1G223690	TdMYB7A115	7A	600597284	600598184	-1	TRITD7Av1G223690.1	1
TRITD7Av1G244610	TdMYB7A116	7A	647840901	647844946	1	TRITD7Av1G244610.2	2
TRITD7Av1G269510	TdMYB7A117	7A	702063227	702064120	1	TRITD7Av1G269510.1	0
TRITD7Av1G269520	TdMYB7A118	7A	702070651	702071526	1	TRITD7Av1G269520.1	0
TRITD1Bv1G004300	TdMYB7A119	1B	9711109	9714763	-1	TRITD1Bv1G004300.1	2
TRITD1Bv1G004350	TdMYB1B120	1B	9948983	9952894	1	TRITD1Bv1G004350.1	2
TRITD1Bv1G013050	TdMYB1B121	1B	32307767	32308685	1	TRITD1Bv1G013050.1	1
TRITD1Bv1G034590	TdMYB1B122	1B	93544573	93545811	-1	TRITD1Bv1G034590.1	1
TRITD1Bv1G037500	TdMYB1B123	1B	102318877	102325802	1	TRITD1Bv1G037500.1	2
TRITD1Bv1G039500	TdMYB1B124	1B	108722504	108724051	1	TRITD1Bv1G039500.3	2

TRITD1Bv1G100870	TdMYB1B125	1B	300031301	300033063	-1	TRITD1Bv1G100870.1	2
TRITD1Bv1G126350	TdMYB1B126	1B	384267618	384269033	1	TRITD1Bv1G126350.1	2
TRITD1Bv1G148030	TdMYB1B127	1B	458873651	458874813	-1	TRITD1Bv1G148030.2	2
TRITD1Bv1G154540	TdMYB1B128	1B	480807186	480808023	-1	TRITD1Bv1G154540.1	1
TRITD1Bv1G173280	TdMYB1B129	1B	535508714	535512145	-1	TRITD1Bv1G173280.2	3
TRITD1Bv1G194250	TdMYB1B130	1B	595510806	595511950	-1	TRITD1Bv1G194250.2	1
TRITD1Bv1G199880	TdMYB1B131	1B	609104287	609109313	1	TRITD1Bv1G199880.2	1
TRITD1Bv1G205600	TdMYB1B132	1B	626984056	626985098	1	TRITD1Bv1G205600.1	1
TRITD2Bv1G020620	TdMYB1B133	2B	44462433	44464771	-1	TRITD2Bv1G020620.1	2
TRITD2Bv1G032330	TdMYB2B134	2B	77579882	77580880	1	TRITD2Bv1G032330.1	0
TRITD2Bv1G058650	TdMYB2B135	2B	151791344	151792202	1	TRITD2Bv1G058650.1	1
TRITD2Bv1G058760	TdMYB2B136	2B	152061682	152062995	1	TRITD2Bv1G058760.1	1
TRITD2Bv1G060490	TdMYB2B137	2B	157110105	157111139	1	TRITD2Bv1G060490.1	1
TRITD2Bv1G061120	TdMYB2B138	2B	158432433	158437160	-1	TRITD2Bv1G061120.10	11
TRITD2Bv1G085850	TdMYB2B139	2B	227358207	227359480	1	TRITD2Bv1G085850.1	2
TRITD2Bv1G097990	TdMYB2B140	2B	266970468	266971805	-1	TRITD2Bv1G097990.1	2
TRITD2Bv1G162800	TdMYB2B141	2B	481854224	481856356	1	TRITD2Bv1G162800.2	2
TRITD2Bv1G165690	TdMYB2B142	2B	490363198	490364450	-1	TRITD2Bv1G165690.1	2
TRITD2Bv1G181360	TdMYB2B143	2B	536187263	536189380	-1	TRITD2Bv1G181360.1	2
TRITD2Bv1G183230	TdMYB2B144	2B	540635545	540636772	-1	TRITD2Bv1G183230.1	2
TRITD2Bv1G183370	TdMYB2B145	2B	540943210	541159134	-1	TRITD2Bv1G183370.5	2
TRITD2Bv1G183410	TdMYB2B146	2B	541294548	541296907	-1	TRITD2Bv1G183410.1	2
TRITD2Bv1G183440	TdMYB2B147	2B	541438245	541440260	-1	TRITD2Bv1G183440.1	2
TRITD2Bv1G188380	TdMYB2B148	2B	557708354	557709844	1	TRITD2Bv1G188380.1	2
TRITD2Bv1G204990	TdMYB2B149	2B	612758980	612760565	-1	TRITD2Bv1G204990.1	2
TRITD2Bv1G217080	TdMYB2B150	2B	650893626	650894908	1	TRITD2Bv1G217080.2	2
TRITD2Bv1G217170	TdMYB2B151	2B	651467146	651468455	1	TRITD2Bv1G217170.1	2
TRITD2Bv1G217740	TdMYB2B152	2B	652933793	653002906	1	TRITD2Bv1G217740.1	1
TRITD2Bv1G253750	TdMYB2B153	2B	758629572	758632533	1	TRITD2Bv1G253750.1	4
TRITD3Bv1G009950	TdMYB2B154	3B	20687054	20688210	-1	TRITD3Bv1G009950.2	1
TRITD3Bv1G031790	TdMYB3B155	3B	83063102	83064048	1	TRITD3Bv1G031790.1	1
TRITD3Bv1G041490	TdMYB3B156	3B	110849412	110850437	-1	TRITD3Bv1G041490.1	2
TRITD3Bv1G093860	TdMYB3B157	3B	265527140	265528523	-1	TRITD3Bv1G093860.1	2

TRITD3Bv1G104140	TdMYB3B158	3B	312084808	312085980	1	TRITD3Bv1G104140.1	2
TRITD3Bv1G134760	TdMYB3B159	3B	420307321	420308084	-1	TRITD3Bv1G134760.1	1
TRITD3Bv1G146500	TdMYB3B160	3B	454990490	454991934	-1	TRITD3Bv1G146500.2	3
TRITD3Bv1G149310	TdMYB3B161	3B	461917096	461918156	1	TRITD3Bv1G149310.2	2
TRITD3Bv1G152230	TdMYB3B162	3B	469726734	469730606	-1	TRITD3Bv1G152230.2	2
TRITD3Bv1G158850	TdMYB3B163	3B	488155443	488156673	1	TRITD3Bv1G158850.1	2
TRITD3Bv1G187900	TdMYB3B164	3B	573023891	573030134	1	TRITD3Bv1G187900.1	3
TRITD3Bv1G205810	TdMYB3B165	3B	629681049	629682702	1	TRITD3Bv1G205810.1	1
TRITD3Bv1G207560	TdMYB3B166	3B	636019755	636021940	1	TRITD3Bv1G207560.2	2
TRITD3Bv1G207660	TdMYB3B167	3B	636423730	636426422	1	TRITD3Bv1G207660.1	2
TRITD3Bv1G214900	TdMYB3B168	3B	656406911	656407836	1	TRITD3Bv1G214900.1	1
TRITD3Bv1G231250	TdMYB3B169	3B	702517300	702518220	-1	TRITD3Bv1G231250.1	0
TRITD3Bv1G241070	TdMYB3B170	3B	734123623	734126347	-1	TRITD3Bv1G241070.1	2
TRITD3Bv1G281370	TdMYB3B171	3B	830589167	830590198	-1	TRITD3Bv1G281370.3	1
TRITD4Bv1G016080	TdMYB3B172	4B	39595493	39596824	1	TRITD4Bv1G016080.2	3
TRITD4Bv1G035080	TdMYB4B173	4B	99088779	99090133	1	TRITD4Bv1G035080.1	2
TRITD4Bv1G039440	TdMYB4B174	4B	111356233	111358628	1	TRITD4Bv1G039440.1	1
TRITD4Bv1G056290	TdMYB4B175	4B	166728572	166729581	1	TRITD4Bv1G056290.2	1
TRITD4Bv1G063360	TdMYB4B176	4B	189899947	189900881	1	TRITD4Bv1G063360.1	2
TRITD4Bv1G064320	TdMYB4B177	4B	193159847	193161112	1	TRITD4Bv1G064320.1	1
TRITD4Bv1G112780	TdMYB4B178	4B	397501776	397503235	1	TRITD4Bv1G112780.2	1
TRITD4Bv1G116710	TdMYB4B179	4B	410002106	410006724	1	TRITD4Bv1G116710.1	2
TRITD4Bv1G118730	TdMYB4B180	4B	417566440	417567973	1	TRITD4Bv1G118730.1	2
TRITD4Bv1G140200	TdMYB4B181	4B	487103013	487103747	-1	TRITD4Bv1G140200.1	0
TRITD4Bv1G140220	TdMYB4B182	4B	487108371	487109072	-1	TRITD4Bv1G140220.1	0
TRITD4Bv1G173440	TdMYB4B183	4B	589195024	589195803	-1	TRITD4Bv1G173440.1	0
TRITD4Bv1G183820	TdMYB4B184	4B	617402083	617402925	-1	TRITD4Bv1G183820.1	1
TRITD4Bv1G193370	TdMYB4B185	4B	641835918	641836816	1	TRITD4Bv1G193370.1	1
TRITD4Bv1G200630	TdMYB4B186	4B	658573438	658574717	-1	TRITD4Bv1G200630.1	2
TRITD5Bv1G023620	TdMYB4B187	5B	63361672	63362373	-1	TRITD5Bv1G023620.1	0
TRITD5Bv1G039350	TdMYB5B188	5B	110669972	110671063	-1	TRITD5Bv1G039350.1	0
TRITD5Bv1G041300	TdMYB5B189	5B	115294315	115297377	1	TRITD5Bv1G041300.1	4
TRITD5Bv1G043640	TdMYB5B190	5B	122244483	122246135	-1	TRITD5Bv1G043640.1	2

TRITD5Bv1G051400	TdMYB5B191	5B	141875721	141877963	1	TRITD5Bv1G051400.1	1
TRITD5Bv1G068810	TdMYB5B192	5B	199602252	199603291	-1	TRITD5Bv1G068810.1	2
TRITD5Bv1G090290	TdMYB5B193	5B	265671414	265672512	1	TRITD5Bv1G090290.1	1
TRITD5Bv1G098410	TdMYB5B194	5B	289117145	289118152	-1	TRITD5Bv1G098410.2	1
TRITD5Bv1G124230	TdMYB5B195	5B	368441442	368442449	1	TRITD5Bv1G124230.1	1
TRITD5Bv1G130580	TdMYB5B196	5B	389782059	389783075	1	TRITD5Bv1G130580.1	1
TRITD5Bv1G134610	TdMYB5B197	5B	401436891	401438075	-1	TRITD5Bv1G134610.1	2
TRITD5Bv1G171890	TdMYB5B198	5B	504371718	504374667	-1	TRITD5Bv1G171890.2	1
TRITD5Bv1G175020	TdMYB5B199	5B	512201079	512202000	-1	TRITD5Bv1G175020.1	1
TRITD5Bv1G205200	TdMYB5B200	5B	582566304	582567519	-1	TRITD5Bv1G205200.2	2
TRITD5Bv1G250220	TdMYB5B201	5B	693802421	693804253	1	TRITD5Bv1G250220.1	2
TRITD6Bv1G010730	TdMYB5B202	6B	28670860	28672486	1	TRITD6Bv1G010730.1	2
TRITD6Bv1G079910	TdMYB6B203	6B	241821120	241822013	-1	TRITD6Bv1G079910.1	0
TRITD6Bv1G114040	TdMYB6B204	6B	365802276	365807061	-1	TRITD6Bv1G114040.8	6
TRITD6Bv1G133120	TdMYB6B205	6B	434372702	434373789	-1	TRITD6Bv1G133120.1	2
TRITD6Bv1G134360	TdMYB6B206	6B	438594093	438594824	-1	TRITD6Bv1G134360.1	0
TRITD6Bv1G134380	TdMYB6B207	6B	439010814	439063628	-1	TRITD6Bv1G134380.3	1
TRITD6Bv1G134430	TdMYB6B208	6B	439123841	439124602	-1	TRITD6Bv1G134430.1	0
TRITD6Bv1G138550	TdMYB6B209	6B	453943280	453945543	1	TRITD6Bv1G138550.1	3
TRITD6Bv1G138770	TdMYB6B210	6B	454783718	454786842	1	TRITD6Bv1G138770.2	2
TRITD6Bv1G154920	TdMYB6B211	6B	503068302	503069413	-1	TRITD6Bv1G154920.1	1
TRITD6Bv1G173340	TdMYB6B212	6B	551415979	551416956	1	TRITD6Bv1G173340.1	2
TRITD6Bv1G187300	TdMYB6B213	6B	590954494	590955725	-1	TRITD6Bv1G187300.1	2
TRITD6Bv1G201940	TdMYB6B214	6B	629970219	629972456	-1	TRITD6Bv1G201940.1	2
TRITD7Bv1G007040	TdMYB6B215	7B	18074285	18076584	1	TRITD7Bv1G007040.1	2
TRITD7Bv1G011660	TdMYB7B216	7B	29786972	29789580	-1	TRITD7Bv1G011660.3	2
TRITD7Bv1G034690	TdMYB7B217	7B	97060675	97061807	1	TRITD7Bv1G034690.1	2
TRITD7Bv1G046440	TdMYB7B218	7B	127852344	127853339	1	TRITD7Bv1G046440.1	2
TRITD7Bv1G085160	TdMYB7B219	7B	251545145	251545852	1	TRITD7Bv1G085160.3	0
TRITD7Bv1G116120	TdMYB7B220	7B	366946525	366948403	1	TRITD7Bv1G116120.1	2
TRITD7Bv1G138850	TdMYB7B221	7B	436690986	436692041	1	TRITD7Bv1G138850.2	2
TRITD7Bv1G156840	TdMYB7B222	7B	493556235	493559157	-1	TRITD7Bv1G156840.1	3
TRITD7Bv1G174390	TdMYB7B223	7B	552240338	552241226	1	TRITD7Bv1G174390.1	1

TRITD7Bv1G192660	TdMYB7B224	7B	602907977	602912031	1	TRITD7Bv1G192660.2	2
TRITD7Bv1G221920	TdMYB7B225	7B	689220872	689221684	1	TRITD7Bv1G221920.1	0
TRITD7Bv1G221970	TdMYB7B226	7B	689299389	689300285	1	TRITD7Bv1G221970.1	0
TRITD7Bv1G221990	TdMYB7B227	7B	689322792	689323658	1	TRITD7Bv1G221990.1	0
TRITD0Uv1G004450	TdMYBU228	Un	8835028	8838782	1	TRITD0Uv1G004450.1	2
TRITD0Uv1G008510	TdMYBU229	Un	19913822	19914814	1	TRITD0Uv1G008510.1	1
TRITD0Uv1G008520	TdMYBU230	Un	19925559	20033494	-1	TRITD0Uv1G008520.1	2
TRITD0Uv1G030270	TdMYBU231	Un	72084526	72085487	1	TRITD0Uv1G030270.2	2
TRITD0Uv1G038930	TdMYBU232	Un	93922153	93923190	1	TRITD0Uv1G038930.1	1
TRITD0Uv1G057910	TdMYBU233	Un	143415630	143416782	1	TRITD0Uv1G057910.1	2

Tabella supplementare 2 | Punto isoelettrico (pI) e peso molecolare per le proteine MYB (Blanco et al., 2022).

ID sequenza genica codificante proteina MYB	Nome	pI teorico	Peso molecolare (medio)
TRITD1Av1G009570.1	TdMYB1A001	5,84	29528,85
TRITD1Av1G026820.1	TdMYB1A002	6,01	35537,77
TRITD1Av1G030230.2	TdMYB1A003	6,32	47438,99
TRITD1Av1G038350.1	TdMYB1A004	6,49	45670,83
TRITD1Av1G039510.2	TdMYB1A005	8,25	46362,93
TRITD1Av1G097550.1	TdMYB1A006	6,31	28720,81
TRITD1Av1G131700.1	TdMYB1A007	6,24	28335,1
TRITD1Av1G161280.1	TdMYB1A008	5,85	35334,1
TRITD1Av1G168580.1	TdMYB1A009	9,06	26924,48
TRITD1Av1G185000.2	TdMYB1A010	5,12	50578,18
TRITD1Av1G205720.1	TdMYB1A011	5,05	32621,35
TRITD1Av1G205740.1	TdMYB1A012	5,07	31974,47
TRITD1Av1G205750.3	TdMYB1A013	5,7	32470,34
TRITD1Av1G205760.2	TdMYB1A014	5,52	31987,74
TRITD1Av1G208130.2	TdMYB1A015	9,5	26989,22
TRITD1Av1G216690.1	TdMYB1A016	7,63	32903,47

TRITD2Av1G015370.1	TdMYB2A017	8,53	37824,33
TRITD2Av1G024990.1	TdMYB2A018	5,6	35795,23
TRITD2Av1G045170.2	TdMYB2A019	6,12	38395,49
TRITD2Av1G045220.1	TdMYB2A020	9,51	26182,68
TRITD2Av1G047010.1	TdMYB2A021	8,93	33397,18
TRITD2Av1G047580.5	TdMYB2A022	4,99	82620,58
TRITD2Av1G077240.1	TdMYB2A023	5,98	38605,53
TRITD2Av1G098880.1	TdMYB2A024	7	40768,99
TRITD2Av1G199440.3	TdMYB2A025	6,38	34864,88
TRITD2Av1G202420.1	TdMYB2A026	5,85	37784,46
TRITD2Av1G218280.1	TdMYB2A027	5,93	29094,42
TRITD2Av1G220910.1	TdMYB2A028	7,01	30437,14
TRITD2Av1G221060.1	TdMYB2A029	6,31	29646,08
TRITD2Av1G221150.2	TdMYB2A030	7,1	30686,55
TRITD2Av1G225810	TdMYB2A031	6,02	30663,38
TRITD2Av1G244360.1	TdMYB2A032	8,26	36578,08
TRITD2Av1G253680.1	TdMYB2A033	5,77	34604,91
TRITD2Av1G253690.1	TdMYB2A034	6,3	35103,56
TRITD2Av1G254090.1	TdMYB2A035	4,84	39334,13
TRITD2Av1G255320.1	TdMYB2A036	5,62	33305,36
TRITD2Av1G255330.2	TdMYB2A037	6,36	36112,77
TRITD2Av1G255340.2	TdMYB2A038	5,87	35144,83
TRITD2Av1G255350.2	TdMYB2A039	5,82	35237,92
TRITD2Av1G285890.1	TdMYB2A040	6,68	38525,4
TRITD3Av1G010860.2	TdMYB3A041	5,65	37137,81
TRITD3Av1G027730	TdMYB3A042	6,01	29748,11
TRITD3Av1G033470.1	TdMYB3A043	5,52	28363,69
TRITD3Av1G046610.1	TdMYB3A044	8,66	41904,1
TRITD3Av1G093070.2	TdMYB3A045	8,35	35812,68
TRITD3Av1G121270.1	TdMYB3A046	5,47	33541,42
TRITD3Av1G152340.1	TdMYB3A047	6,76	23550,26
TRITD3Av1G168410.2	TdMYB3A048	7,12	31227,23
TRITD3Av1G170610.2	TdMYB3A049	5,69	31112,42

TRITD3Av1G172210.1	TdMYB3A050	8,45	28911,66
TRITD3Av1G186610.1	TdMYB3A051	4,87	31431,94
TRITD3Av1G207740.1	TdMYB3A052	4,97	63311,13
TRITD3Av1G222290.1	TdMYB3A053	6,15	44282,71
TRITD3Av1G239730.1	TdMYB3A054	6,35	33923,85
TRITD3Av1G249330.1	TdMYB3A055	9,3	28431,85
TRITD3Av1G260970.3	TdMYB3A056	5,4	27764,16
TRITD3Av1G286170.2	TdMYB3A057	8,69	29114,53
TRITD4Av1G000100.1	TdMYB3A058	9,69	29059,17
TRITD4Av1G029120.1	TdMYB4A059	9,13	35717,51
TRITD4Av1G029150.1	TdMYB4A060	7,54	26799,6
TRITD4Av1G054810.1	TdMYB4A061	5,56	32636,39
TRITD4Av1G057610.1	TdMYB4A062	5,19	37722,93
TRITD4Av1G058610.1	TdMYB4A063	4,8	35147,06
TRITD4Av1G135660	TdMYB4A064	5,7	32355,94
TRITD4Av1G136700	TdMYB4A065	8,76	27342,25
TRITD4Av1G155930.2	TdMYB4A066	6,59	33579,66
TRITD4Av1G161800.1	TdMYB4A067	9,58	29839,17
TRITD4Av1G171580.1	TdMYB4A068	9,52	41459,15
TRITD4Av1G190440.1	TdMYB4A069	6,76	30558,15
TRITD4Av1G209780.1	TdMYB4A070	7,64	31070,18
TRITD4Av1G227090.1	TdMYB4A071	7,12	27383,55
TRITD4Av1G256700.1	TdMYB4A072	5,63	35772,24
TRITD4Av1G256770.3	TdMYB4A073	6,14	36841,56
TRITD5Av1G041490.1	TdMYB4A074	9,45	41783,72
TRITD5Av1G044060.1	TdMYB5A075	9,77	36202,42
TRITD5Av1G046770.2	TdMYB5A076	5,47	31726,07
TRITD5Av1G057530.1	TdMYB5A077	6,64	42031,92
TRITD5Av1G108560.1	TdMYB5A078	6,66	35614,3
TRITD5Av1G118710.1	TdMYB5A079	9,45	39708,15
TRITD5Av1G144700.1	TdMYB5A080	7,05	33331,23
TRITD5Av1G182550.2	TdMYB5A081	5,44	31884,79
TRITD5Av1G185470	TdMYB5A082	9,3	30213,62

TRITD5Av1G208870	TdMYB5A083	8,33	34268,83
TRITD5Av1G238760.1	TdMYB5A084	9,15	25676,89
TRITD5Av1G244760.1	TdMYB5A085	6,24	28443,97
TRITD5Av1G251090.1	TdMYB5A086	5,08	28958,21
TRITD6Av1G007200.1	TdMYB5A087	7,3	33015,65
TRITD6Av1G046350.2	TdMYB6A088	5,83	43687,37
TRITD6Av1G075070.1	TdMYB6A089	8,93	31862,8
TRITD6Av1G109670.9	TdMYB6A090	5,9	44700,88
TRITD6Av1G143210.1	TdMYB6A091	5,99	27832,03
TRITD6Av1G143260.1	TdMYB6A092	5,44	27860,98
TRITD6Av1G143270	TdMYB6A093	5,89	27819
TRITD6Av1G143280.1	TdMYB6A094	5,56	27383,47
TRITD6Av1G143290.1	TdMYB6A095	6,6	26404,57
TRITD6Av1G146010	TdMYB6A096	5,48	30562,72
TRITD6Av1G152410	TdMYB6A097	5,73	30828,26
TRITD6Av1G169300	TdMYB6A098	5,23	28382
TRITD6Av1G183650	TdMYB6A099	5,27	28093,48
TRITD6Av1G194500	TdMYB6A100	5,53	36185,68
TRITD6Av1G194510	TdMYB6A101	5,22	36545,93
TRITD6Av1G206130	TdMYB6A102	5,89	29964,76
TRITD7Av1G006440	TdMYB6A103	5,91	37291,04
TRITD7Av1G006480	TdMYB7A104	6,18	36038,83
TRITD7Av1G035980	TdMYB7A105	5,79	47301,27
TRITD7Av1G038860	TdMYB7A106	5,58	46820,26
TRITD7Av1G053110	TdMYB7A107	8,89	27424,83
TRITD7Av1G058060	TdMYB7A108	6,12	35980,36
TRITD7Av1G070470	TdMYB7A109	6,3	28971,94
TRITD7Av1G096030	TdMYB7A110	6,24	38833,58
TRITD7Av1G114530	TdMYB7A111	9,52	26853,97
TRITD7Av1G157180	TdMYB7A112	6	37659,28
TRITD7Av1G177140	TdMYB7A113	6,24	24585,75
TRITD7Av1G203290	TdMYB7A114	4,77	54371
TRITD7Av1G223690	TdMYB7A115	7,74	29385,79

TRITD7Av1G244610	TdMYB7A116	6,96	43931,99
TRITD7Av1G269510	TdMYB7A117	8,22	31861,36
TRITD7Av1G269520	TdMYB7A118	8,54	31543,19
TRITD1Bv1G004300.1	TdMYB7A119	4,78	35659,86
TRITD1Bv1G004350.1	TdMYB1B120	5,05	35645,04
TRITD1Bv1G013050.1	TdMYB1B121	5,53	30176,58
TRITD1Bv1G034590.1	TdMYB1B122	5,94	35817,11
TRITD1Bv1G037500.1	TdMYB1B123	6,33	47871,22
TRITD1Bv1G039500.3	TdMYB1B124	6,23	47465,98
TRITD1Bv1G100870.1	TdMYB1B125	5,91	28165,31
TRITD1Bv1G126350.1	TdMYB1B126	5,62	28105,65
TRITD1Bv1G148030.2	TdMYB1B127	6,31	34993,75
TRITD1Bv1G154540.1	TdMYB1B128	8,83	27070,63
TRITD1Bv1G173280.2	TdMYB1B129	5,24	50782,46
TRITD1Bv1G194250.2	TdMYB1B130	4,96	33164,01
TRITD1Bv1G199880.2	TdMYB1B131	5,62	31890,46
TRITD1Bv1G205600.1	TdMYB1B132	8,06	32828,22
TRITD2Bv1G020620.1	TdMYB1B133	8,68	38232,87
TRITD2Bv1G032330.1	TdMYB2B134	5,43	36334,87
TRITD2Bv1G058650.1	TdMYB2B135	10,31	22387,62
TRITD2Bv1G058760.1	TdMYB2B136	6,26	37319,31
TRITD2Bv1G060490.1	TdMYB2B137	8,77	33217,98
TRITD2Bv1G061120.10	TdMYB2B138	5,23	92544,91
TRITD2Bv1G085850.1	TdMYB2B139	6,05	38384,32
TRITD2Bv1G097990.1	TdMYB2B140	7,66	41141,39
TRITD2Bv1G162800.2	TdMYB2B141	6,27	35204,19
TRITD2Bv1G165690.1	TdMYB2B142	5,78	37893,58
TRITD2Bv1G181360.1	TdMYB2B143	5,93	28875,31
TRITD2Bv1G183230.1	TdMYB2B144	7,01	30942,72
TRITD2Bv1G183370.5	TdMYB2B145	6,45	30897,72
TRITD2Bv1G183410.1	TdMYB2B146	7,6	29740,21
TRITD2Bv1G183440.1	TdMYB2B147	6,75	30321,94
TRITD2Bv1G188380.1	TdMYB2B148	6,22	30818,5

TRITD2Bv1G204990.1	TdMYB2B149	8,25	36481
TRITD2Bv1G217080.2	TdMYB2B150	5,08	38728,62
TRITD2Bv1G217170.1	TdMYB2B151	4,92	38732,56
TRITD2Bv1G217740.1	TdMYB2B152	5,73	35496,95
TRITD2Bv1G253750.1	TdMYB2B153	6,18	45459,18
TRITD3Bv1G009950.2	TdMYB2B154	5,83	37358,04
TRITD3Bv1G031790	TdMYB3B155	6,25	30463,85
TRITD3Bv1G041490.1	TdMYB3B156	5,96	28769,14
TRITD3Bv1G093860.1	TdMYB3B157	8,34	33903,64
TRITD3Bv1G104140	TdMYB3B158	5,44	34168,13
TRITD3Bv1G134760.1	TdMYB3B159	6,45	23888,62
TRITD3Bv1G146500.2	TdMYB3B160	7,09	31156,15
TRITD3Bv1G149310.2	TdMYB3B161	5,58	30942,25
TRITD3Bv1G152230.2	TdMYB3B162	6,18	29680,36
TRITD3Bv1G158850.1	TdMYB3B163	8,39	32164,16
TRITD3Bv1G187900.1	TdMYB3B164	5,42	65311,44
TRITD3Bv1G205810.1	TdMYB3B165	5,59	49651,38
TRITD3Bv1G207560.2	TdMYB3B166	6,21	45590,92
TRITD3Bv1G207660.1	TdMYB3B167	6,36	44973,38
TRITD3Bv1G214900.1	TdMYB3B168	9,02	29124,08
TRITD3Bv1G231250.1	TdMYB3B169	6,01	34258,25
TRITD3Bv1G241070.1	TdMYB3B170	8,9	32267,76
TRITD3Bv1G281370.3	TdMYB3B171	7,78	29322,62
TRITD4Bv1G016080.2	TdMYB3B172	6,47	28360,55
TRITD4Bv1G035080.1	TdMYB4B173	9,67	41101,64
TRITD4Bv1G039440.1	TdMYB4B174	9,79	29809,18
TRITD4Bv1G056290.2	TdMYB4B175	6,36	33144,2
TRITD4Bv1G063360.1	TdMYB4B176	9,22	27329,28
TRITD4Bv1G064320.1	TdMYB4B177	5,57	32268,77
TRITD4Bv1G112780.2	TdMYB4B178	4,81	35292,26
TRITD4Bv1G116710.1	TdMYB4B179	5,19	37752,95
TRITD4Bv1G118730.1	TdMYB4B180	5,45	32804,6
TRITD4Bv1G140200.1	TdMYB4B181	6,31	27041,92

TRITD4Bv1G140220.1	TdMYB4B182	7,57	25809,24
TRITD4Bv1G173440.1	TdMYB4B183	9,75	27535,18
TRITD4Bv1G183820.1	TdMYB4B184	9,12	26493,92
TRITD4Bv1G193370.1	TdMYB4B185	6,5	28190,7
TRITD4Bv1G200630.1	TdMYB4B186	5,56	29127,59
TRITD5Bv1G023620.1	TdMYB4B187	6,89	25907,42
TRITD5Bv1G039350.1	TdMYB5B188	9,45	41702,64
TRITD5Bv1G041300.1	TdMYB5B189	9,82	36197,42
TRITD5Bv1G043640.1	TdMYB5B190	5,52	31683,09
TRITD5Bv1G051400.1	TdMYB5B191	6,42	42253,2
TRITD5Bv1G068810.1	TdMYB5B192	8,77	29200,05
TRITD5Bv1G090290.1	TdMYB5B193	6,69	36067,77
TRITD5Bv1G098410	TdMYB5B194	9,88	24895,56
TRITD5Bv1G124230.1	TdMYB5B195	5,43	30977,99
TRITD5Bv1G130580.1	TdMYB5B196	8,15	33176,2
TRITD5Bv1G134610.1	TdMYB5B197	7,66	33304,24
TRITD5Bv1G171890.2	TdMYB5B198	5,24	31815,62
TRITD5Bv1G175020.1	TdMYB5B199	9,05	29521,74
TRITD5Bv1G205200.2	TdMYB5B200	8,33	34193,84
TRITD5Bv1G250220.1	TdMYB5B201	6,44	31116,11
TRITD6Bv1G010730	TdMYB5B202	6,99	33397,04
TRITD6Bv1G079910	TdMYB6B203	8,52	31834,74
TRITD6Bv1G114040	TdMYB6B204	6,12	44776,1
TRITD6Bv1G133120	TdMYB6B205	5,73	30680,01
TRITD6Bv1G134360	TdMYB6B206	6,09	26605,75
TRITD6Bv1G134380	TdMYB6B207	6,09	27720,84
TRITD6Bv1G134430	TdMYB6B208	6,1	27690,96
TRITD6Bv1G138550	TdMYB6B209	8,52	22469,06
TRITD6Bv1G138770	TdMYB6B210	6,67	29987,83
TRITD6Bv1G154920	TdMYB6B211	4,57	35567,57
TRITD6Bv1G173340	TdMYB6B212	5,5	28225,65
TRITD6Bv1G187300	TdMYB6B213	5,14	36602,97
TRITD6Bv1G201940	TdMYB6B214	6,39	38642,44

TRITD7Bv1G007040	TdMYB6B215	5,78	47816,87
TRITD7Bv1G011660	TdMYB7B216	5,68	46475,87
TRITD7Bv1G034690	TdMYB7B217	6,18	36006,54
TRITD7Bv1G046440	TdMYB7B218	5,98	29130,07
TRITD7Bv1G085160	TdMYB7B219	9,43	26647,77
TRITD7Bv1G116120	TdMYB7B220	6	38002,66
TRITD7Bv1G138850	TdMYB7B221	5,67	32089,15
TRITD7Bv1G156840	TdMYB7B222	4,84	53640,9
TRITD7Bv1G174390	TdMYB7B223	7,71	28869,29
TRITD7Bv1G192660	TdMYB7B224	7,4	43595,84
TRITD7Bv1G221920	TdMYB7B225	7,16	29140,23
TRITD7Bv1G221970	TdMYB7B226	6,56	31998,56
TRITD7Bv1G221990	TdMYB7B227	7,16	31294,91
TRITD0Uv1G004450.1	TdMYBU228	4,84	35705,87
TRITD0Uv1G008510	TdMYBU229	5,22	31653,25
TRITD0Uv1G008520.1	TdMYBU230	6	32881,68
TRITD0Uv1G030270.2	TdMYBU231	8,93	26557,14
TRITD0Uv1G038930.1	TdMYBU232	5,32	31430,44
TRITD0Uv1G057910.1	TdMYBU233	5,44	36140,74

Tabella supplementare 3 | Previsione della localizzazione cellulare CELLO dei 233 geni che codificano per le proteine MYB (Blanco et al., 2022).

ID sequenza genica codificante proteina MYB	NAME	CELLO prediction				
		Predictor				
		Amminoacido Comp.	Di-pep.	Part-Comp.	Chemo-type.	Neighbor
Location based in reliable-index						
TRITD1Av1G009570	TdMYB1A001	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD1Av1G026820	TdMYB1A002	Mitochondrial	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Cloroplastica
TRITD1Av1G030230	TdMYB1A003	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD1Av1G038350	TdMYB1A004	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD1Av1G039510	TdMYB1A005	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Mitocontriiale
TRITD1Av1G097550	TdMYB1A006	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD1Av1G131700	TdMYB1A007	Cloroplastica	Cloroplastica	Nucleare	Nucleare	Cloroplastica
TRITD1Av1G161280	TdMYB1A008	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD1Av1G168580	TdMYB1A009	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD1Av1G185000	TdMYB1A010	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD1Av1G205720	TdMYB1A011	Nucleare	Citoplasmatica	Nucleare	Cloroplastica	Citoplasmatica
TRITD1Av1G205740	TdMYB1A012	Nucleare	Cloroplastica	Nucleare	Cloroplastica	Nucleare
TRITD1Av1G205750	TdMYB1A013	Nucleare	Citoplasmatica	Mitocontriiale	Cloroplastica	Mitocontriiale
TRITD1Av1G205760	TdMYB1A014	Nucleare	Citoplasmatica	Nucleare	Cloroplastica	Citoplasmatica
TRITD1Av1G208130	TdMYB1A015	Extracellulare	Mitocontriiale	Nucleare	Nucleare	Mitocontriiale
TRITD1Av1G216690	TdMYB1A016	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Av1G015370	TdMYB2A017	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Av1G024990	TdMYB2A018	Extracellulare	Mitocontriiale	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Av1G045170	TdMYB2A019	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Av1G045220	TdMYB2A020	Mitocontriiale	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Av1G047010	TdMYB2A021	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Av1G047580	TdMYB2A022	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Av1G077240	TdMYB2A023	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Av1G098880	TdMYB2A024	Nucleare	Vacuole	Mitocontriiale	Mitocontriiale	Nucleare
TRITD2Av1G199440	TdMYB2A025	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Av1G202420	TdMYB2A026	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare

TRITD2Av1G218280	TdMYB2A027	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Av1G220910	TdMYB2A028	Nucleare	Cloroplastica	Nucleare	Cloroplastica	Mitocontriale
TRITD2Av1G221060	TdMYB2A029	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Av1G221150	TdMYB2A030	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Av1G225810	TdMYB2A031	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Av1G244360	TdMYB2A032	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Mitocontriale	Nucleare
TRITD2Av1G253680	TdMYB2A033	Extracellulare	Nucleare	Citoplasmatica	Nucleare	Nucleare
TRITD2Av1G253690	TdMYB2A034	Extracellulare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Av1G254090	TdMYB2A035	Nucleare	Citoplasmatica	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Av1G255320	TdMYB2A036	Extracellulare	Nucleare	Citoplasmatica	Nucleare	Nucleare
TRITD2Av1G255330	TdMYB2A037	Extracellulare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Av1G255340	TdMYB2A038	Extracellulare	Nucleare	Citoplasmatica	Nucleare	Nucleare
TRITD2Av1G255350	TdMYB2A039	Extracellulare	Nucleare	Citoplasmatica	Nucleare	Nucleare
TRITD2Av1G285890	TdMYB2A040	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD3Av1G010860	TdMYB3A041	Extracellulare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD3Av1G027730	TdMYB3A042	Nucleare	Nucleare	Mitocontriale	Nucleare	Cloroplastica
TRITD3Av1G033470	TdMYB3A043	Extracellulare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD3Av1G046610	TdMYB3A044	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD3Av1G093070	TdMYB3A045	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD3Av1G121270	TdMYB3A046	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD3Av1G152340	TdMYB3A047	Mitocontriale	Mitocontriale	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD3Av1G168410	TdMYB3A048	Extracellulare	Extracellulare	Nucleare	Nucleare	Cloroplastica
TRITD3Av1G170610	TdMYB3A049	Nucleare	Citoplasmatica	Nucleare	Cloroplastica	Nucleare
TRITD3Av1G172210	TdMYB3A050	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD3Av1G186610	TdMYB3A051	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Cloroplastica	Nucleare
TRITD3Av1G207740	TdMYB3A052	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD3Av1G222290	TdMYB3A053	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD3Av1G239730	TdMYB3A054	Extracellulare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD3Av1G249330	TdMYB3A055	Nucleare	Cloroplastica	Nucleare	Nucleare	Cloroplastica
TRITD3Av1G260970	TdMYB3A056	Extracellulare	Cloroplastica	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD3Av1G286170	TdMYB3A057	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD4Av1G000100	TdMYB3A058	Cloroplastica	Cloroplastica	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD4Av1G029120	TdMYB4A059	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Mitocontriale	Nucleare

TRITD4Av1G029150	TdMYB4A060	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD4Av1G054810	TdMYB4A061	Extracellulare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD4Av1G057610	TdMYB4A062	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD4Av1G058610	TdMYB4A063	Citoplasmatica	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD4Av1G135660	TdMYB4A064	Mitocontriare	Mitocontriare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD4Av1G136700	TdMYB4A065	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD4Av1G155930	TdMYB4A066	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD4Av1G161800	TdMYB4A067	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Cloroplastica
TRITD4Av1G171580	TdMYB4A068	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD4Av1G190440	TdMYB4A069	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD4Av1G209780	TdMYB4A070	Nucleare	Mitocontriare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD4Av1G227090	TdMYB4A071	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD4Av1G256700	TdMYB4A072	Extracellulare	Nucleare	Citoplasmatica	Nucleare	Nucleare
TRITD4Av1G256770	TdMYB4A073	Extracellulare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Mitocontriare
TRITD5Av1G041490	TdMYB4A074	Extracellulare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD5Av1G044060	TdMYB5A075	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD5Av1G046770	TdMYB5A076	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD5Av1G057530	TdMYB5A077	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD5Av1G108560	TdMYB5A078	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD5Av1G118710	TdMYB5A079	Nucleare	Nucleare	Nucleare	PlasmaMembrane	Nucleare
TRITD5Av1G144700	TdMYB5A080	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Cloroplastica	Nucleare
TRITD5Av1G182550	TdMYB5A081	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD5Av1G185470	TdMYB5A082	Mitocontriare	Mitocontriare	Mitocontriare	Nucleare	Mitocontriare
TRITD5Av1G208870	TdMYB5A083	Nucleare	Cloroplastica	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD5Av1G238760	TdMYB5A084	Nucleare	Cloroplastica	Nucleare	Nucleare	Mitocontriare
TRITD5Av1G244760	TdMYB5A085	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD5Av1G251090	TdMYB5A086	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD6Av1G007200	TdMYB5A087	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD6Av1G046350	TdMYB6A088	Nucleare	Nucleare	Nucleare	PlasmaMembrane	Nucleare
TRITD6Av1G075070	TdMYB6A089	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Mitocontriare	Nucleare
TRITD6Av1G109670	TdMYB6A090	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD6Av1G143210	TdMYB6A091	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD6Av1G143260	TdMYB6A092	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare

TRITD6Av1G143270	TdMYB6A093	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD6Av1G143280	TdMYB6A094	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Cloroplastica	Nucleare
TRITD6Av1G143290	TdMYB6A095	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD6Av1G146010	TdMYB6A096	Nucleare	Citoplasmatica	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD6Av1G152410	TdMYB6A097	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD6Av1G169300	TdMYB6A098	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD6Av1G183650	TdMYB6A099	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD6Av1G194500	TdMYB6A100	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD6Av1G194510	TdMYB6A101	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD6Av1G206130	TdMYB6A102	Extracellulare	Citoplasmatica	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD7Av1G006440	TdMYB6A103	Extracellulare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD7Av1G006480	TdMYB7A104	Mitocontriare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Mitocontriare
TRITD7Av1G035980	TdMYB7A105	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD7Av1G038860	TdMYB7A106	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Citoplasmatica	Nucleare
TRITD7Av1G053110	TdMYB7A107	Nucleare	Cloroplastica	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD7Av1G058060	TdMYB7A108	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD7Av1G070470	TdMYB7A109	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Cloroplastica	Nucleare
TRITD7Av1G096030	TdMYB7A110	Nucleare	Cloroplastica	Mitocontriare	Cloroplastica	Nucleare
TRITD7Av1G114530	TdMYB7A111	Extracellulare	Mitocontriare	Nucleare	Nucleare	Extracellulare
TRITD7Av1G157180	TdMYB7A112	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD7Av1G177140	TdMYB7A113	Extracellulare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Mitocontriare
TRITD7Av1G203290	TdMYB7A114	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD7Av1G223690	TdMYB7A115	Nucleare	Mitocontriare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD7Av1G244610	TdMYB7A116	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD7Av1G269510	TdMYB7A117	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD7Av1G269520	TdMYB7A118	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD1Bv1G004300	TdMYB7A119	Nucleare	Extracellulare	Nucleare	Citoplasmatica	Nucleare
TRITD1Bv1G004350	TdMYB1B120	Nucleare	Extracellulare	Nucleare	Mitocontriare	Nucleare
TRITD1Bv1G013050	TdMYB1B121	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD1Bv1G034590	TdMYB1B122	Mitocontriare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Cloroplastica
TRITD1Bv1G037500	TdMYB1B123	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD1Bv1G039500	TdMYB1B124	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD1Bv1G100870	TdMYB1B125	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare

TRITD1Bv1G126350	TdMYB1B126	Cloroplastica	Cloroplastica	Nucleare	Nucleare	Mitocontriale
TRITD1Bv1G148030	TdMYB1B127	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD1Bv1G154540	TdMYB1B128	Extracellulare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD1Bv1G173280	TdMYB1B129	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD1Bv1G194250	TdMYB1B130	Nucleare	Citoplasmatica	Nucleare	Cloroplastica	Citoplasmatica
TRITD1Bv1G199880	TdMYB1B131	Nucleare	Nucleare	Mitocontriale	Cloroplastica	Nucleare
TRITD1Bv1G205600	TdMYB1B132	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Bv1G020620	TdMYB1B133	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Bv1G032330	TdMYB2B134	Extracellulare	Mitocontriale	Citoplasmatica	Extracellulare	Nucleare
TRITD2Bv1G058650	TdMYB2B135	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Bv1G058760	TdMYB2B136	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Bv1G060490	TdMYB2B137	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Bv1G061120	TdMYB2B138	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Bv1G085850	TdMYB2B139	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Bv1G097990	TdMYB2B140	Nucleare	Vacuole	Mitocontriale	Nucleare	Nucleare
TRITD2Bv1G162800	TdMYB2B141	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Citoplasmatica	Nucleare
TRITD2Bv1G165690	TdMYB2B142	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Bv1G181360	TdMYB2B143	Mitocontriale	Extracellulare	Nucleare	Nucleare	Mitocontriale
TRITD2Bv1G183230	TdMYB2B144	Nucleare	Cloroplastica	Nucleare	Cloroplastica	Mitocontriale
TRITD2Bv1G183370	TdMYB2B145	Nucleare	Citoplasmatica	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Bv1G183410	TdMYB2B146	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Bv1G183440	TdMYB2B147	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Bv1G188380	TdMYB2B148	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Bv1G204990	TdMYB2B149	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Bv1G217080	TdMYB2B150	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Bv1G217170	TdMYB2B151	Extracellulare	Citoplasmatica	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Bv1G217740	TdMYB2B152	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD2Bv1G253750	TdMYB2B153	Nucleare	Mitocontriale	Nucleare	Nucleare	Mitocontriale
TRITD3Bv1G009950	TdMYB2B154	Extracellulare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD3Bv1G031790	TdMYB3B155	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD3Bv1G041490	TdMYB3B156	Extracellulare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD3Bv1G093860	TdMYB3B157	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD3Bv1G104140	TdMYB3B158	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare

TRITD3Bv1G134760	TdMYB3B159	Mitocontriale	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD3Bv1G146500	TdMYB3B160	Extracellulare	Extracellulare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD3Bv1G149310	TdMYB3B161	Nucleare	Citoplasmatica	Nucleare	Mitocontriale	Mitocontriale
TRITD3Bv1G152230	TdMYB3B162	Nucleare	Nucleare	Mitocontriale	Nucleare	Nucleare
TRITD3Bv1G158850	TdMYB3B163	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD3Bv1G187900	TdMYB3B164	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD3Bv1G205810	TdMYB3B165	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Extracellulare	Nucleare
TRITD3Bv1G207560	TdMYB3B166	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD3Bv1G207660	TdMYB3B167	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD3Bv1G214900	TdMYB3B168	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD3Bv1G231250	TdMYB3B169	Extracellulare	Nucleare	Nucleare	Citoplasmatica	Nucleare
TRITD3Bv1G241070	TdMYB3B170	Nucleare	Cloroplastica	Nucleare	Nucleare	Mitocontriale
TRITD3Bv1G281370	TdMYB3B171	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD4Bv1G016080	TdMYB3B172	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD4Bv1G035080	TdMYB4B173	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD4Bv1G039440	TdMYB4B174	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Cloroplastica
TRITD4Bv1G056290	TdMYB4B175	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD4Bv1G063360	TdMYB4B176	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD4Bv1G064320	TdMYB4B177	Mitocontriale	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD4Bv1G112780	TdMYB4B178	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD4Bv1G116710	TdMYB4B179	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD4Bv1G118730	TdMYB4B180	Extracellulare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD4Bv1G140200	TdMYB4B181	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD4Bv1G140220	TdMYB4B182	Extracellulare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD4Bv1G173440	TdMYB4B183	Cloroplastica	Cloroplastica	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD4Bv1G183820	TdMYB4B184	Extracellulare	Cloroplastica	Nucleare	Nucleare	Mitocontriale
TRITD4Bv1G193370	TdMYB4B185	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD4Bv1G200630	TdMYB4B186	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD5Bv1G023620	TdMYB4B187	Mitocontriale	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Extracellulare
TRITD5Bv1G039350	TdMYB5B188	Extracellulare	Nucleare	Nucleare	Citoplasmatica	Nucleare
TRITD5Bv1G041300	TdMYB5B189	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD5Bv1G043640	TdMYB5B190	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD5Bv1G051400	TdMYB5B191	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare

TRITD5Bv1G068810	TdMYB5B192	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Mitocontriare	Extracellulare
TRITD5Bv1G090290	TdMYB5B193	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD5Bv1G098410	TdMYB5B194	Nucleare	Nucleare	Nucleare	PlasmaMembrane	Nucleare
TRITD5Bv1G124230	TdMYB5B195	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Cloroplastica	Nucleare
TRITD5Bv1G130580	TdMYB5B196	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD5Bv1G134610	TdMYB5B197	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Cloroplastica	Nucleare
TRITD5Bv1G171890	TdMYB5B198	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD5Bv1G175020	TdMYB5B199	Nucleare	Mitocontriare	Nucleare	Nucleare	Mitocontriare
TRITD5Bv1G205200	TdMYB5B200	Nucleare	Cloroplastica	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD5Bv1G250220	TdMYB5B201	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD6Bv1G010730	TdMYB5B202	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD6Bv1G079910	TdMYB6B203	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Mitocontriare	Nucleare
TRITD6Bv1G114040	TdMYB6B204	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD6Bv1G133120	TdMYB6B205	Nucleare	Citoplasmatica	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD6Bv1G134360	TdMYB6B206	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD6Bv1G134380	TdMYB6B207	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD6Bv1G134430	TdMYB6B208	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD6Bv1G138550	TdMYB6B209	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD6Bv1G138770	TdMYB6B210	Cloroplastica	Cloroplastica	Nucleare	Citoplasmatica	Mitocontriare
TRITD6Bv1G154920	TdMYB6B211	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD6Bv1G173340	TdMYB6B212	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD6Bv1G187300	TdMYB6B213	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD6Bv1G201940	TdMYB6B214	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD7Bv1G007040	TdMYB6B215	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD7Bv1G011660	TdMYB7B216	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD7Bv1G034690	TdMYB7B217	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD7Bv1G046440	TdMYB7B218	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Cloroplastica	Nucleare
TRITD7Bv1G085160	TdMYB7B219	Extracellulare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Mitocontriare
TRITD7Bv1G116120	TdMYB7B220	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD7Bv1G138850	TdMYB7B221	Extracellulare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Mitocontriare
TRITD7Bv1G156840	TdMYB7B222	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD7Bv1G174390	TdMYB7B223	Nucleare	Mitocontriare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD7Bv1G192660	TdMYB7B224	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare

TRITD7Bv1G221920	TdMYB7B225	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD7Bv1G221970	TdMYB7B226	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD7Bv1G221990	TdMYB7B227	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare
TRITD0Uv1G004450	TdMYBU228	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Citoplasmatica	Nucleare
TRITD0Uv1G008510	TdMYBU229	Extracellulare	Citoplasmatica	Mitocontriale	Nucleare	Nucleare
TRITD0Uv1G008520	TdMYBU230	Extracellulare	Cloroplastica	Nucleare	Cloroplastica	Nucleare
TRITD0Uv1G030270	TdMYBU231	Extracellulare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Mitocontriale
TRITD0Uv1G038930	TdMYBU232	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Cloroplastica	Nucleare
TRITD0Uv1G057910	TdMYBU233	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare	Nucleare

REFERENZE BIBLIOGRAFICHE

- Agarwal, T., Grotewold, E., Doseff, A. I., and Gray, J. (2016). MYB31/MYB42 syntelogs exhibit divergent regulation of phenylpropanoid genes in maize, sorghum and rice. *Sci. Rep.* 61:28502. doi:10.1038/srep28502
- Akiyama, K., Kurotani, A., Iida, K., Kuromori, T., Shinozaki, K., and Sakurai, T. (2014). RARGE II: an integrated phenotype database of Arabidopsis mutant traits using a controlled vocabulary. *Plant Cell Physiol.* 55:e4. doi: 10.1093/pcp/pct165
- An, J. P., Li, R., Qu, F. J., You, C. X., Wang, X. F., and Hao, Y. J. (2018). R2R3-MYB transcription factor MdMYB23 is involved in the cold tolerance and proanthocyanidin accumulation in apple. *Plant J.* 96, 562–577. doi: 10.1111/tpj.14050
- Anand, L., and Rodriguez Lopez, C. M. (2022). ChromoMap: an R package for interactive visualization of multi-omics data and annotation of chromosomes. *BMC Bioinformatics* 23:33. doi: 10.1186/S12859-021-04556-Z
- Arce-Rodríguez, M. L., Martínez, O., and Ochoa-Alejo, N. (2021). Genome-wide identification and analysis of the MYB transcription factor gene family in chili pepper (*Capsicum* spp.). *Int. J. Mol. Sci.* 22:2229. doi:10.3390/ijms22052229
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., De Castro, E., et al. (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res.* 40, W597–W603. doi: 10.1093/NAR/GKS400
- Bailey, T. L., Johnson, J., Grant, C. E., and Noble, W. S. (2015). The MEME suite. *Nucleic Acids Res.* 43, W39–W49. doi: 10.1093/nar/gkv416
- Beathard, C., Mooney, S., Al-Saharin, R., Goyer, A., and Hellmann, H. (2021). Characterization of Arabidopsis thaliana R2R3 S23 MYB transcription factors as novel targets of the ubiquitin proteasome-pathway and regulators of salt stress and abscisic acid response. *Front. Plant Sci.* 12:629208. doi:10.3389/fpls.2021.629208
- Bi, H., Luang, S., Li, Y., Bazanova, N., Morran, S., Song, Z., et al. (2016). Identification and characterization of wheat drought-responsive MYB transcription factors involved in the regulation of cuticle biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 67, 5363–5380. doi: 10.1093/jxb/erw298
- Blanco E, Curci PL, Manconi A, Sarli A, Zuluaga DL and Sonnante G (2022) R2R3-MYBs in Durum Wheat: Genome-Wide Identification, Poaceae-Specific Clusters, Expression, and Regulatory Dynamics Under Abiotic Stresses. *Front. Plant Sci.* 13:896945. doi: 10.3389/fpls.2022.896945
- Blanco, E., Sabetta, W., Danzi, D., Negro, D., Passeri, V., De Lisi, A., et al. (2018). Isolation and characterization of the flavonol regulator CcMYB12 from the globe artichoke [*Cynara cardunculus* var. *scolymus* (L.) Fiori]. *Front. Plant Sci.* 9:941. doi: 10.3389/fpls.2018.00941
- Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170

- Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., and Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat. Biotechnol.* 34, 525–527. doi: 10.1038/nbt.3519
- Chen, H., Feng, H., Zhang, X., Zhang, C., Wang, T., and Dong, J. (2019). An Arabidopsis E3 ligase HUB2 increases histone H2B monoubiquitination and enhances drought tolerance in transgenic cotton. *Plant Biotechnol. J.* 17, 556–568. doi: 10.1111/pbi.12998
- Cominelli, E., and Tonelli, C. (2009). A new role for plant R2R3-MYB transcription factors in cell cycle regulation. *Cell Res.* 26, 1231–1232. doi: 10.1038/cr.2009.123
- Conde, A., Chaves, M. M., and Gerós, H. (2011). Membrane transport, sensing and signaling in plant adaptation to environmental stress. *Plant Cell Physiol.* 52, 1583–1602. doi: 10.1093/pcp/pcr107
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M., and Brenner, S. E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 14, 1188–1190. doi: 10.1101/gr.849004
- Curci, P. L., Aiese Cigliano, R., Zuluaga, D. L., Janni, M., Sanseverino, W., and Sonnante, G. (2017). Transcriptomic response of durum wheat to nitrogen starvation. *Sci. Rep.* 7:1176. doi: 10.1038/s41598-017-01377-0
- Curci, P. L., Bergès, H., Marande, W., Maccaferri, M., Tuberosa, R., and Sonnante, G. (2018). Asparagine synthetase genes (*AsnS1* and *AsnS2*) in durum wheat: structural analysis and expression under nitrogen stress. *Euphytica* 214:36. doi: 10.1007/s10681-017-2105-z
- Deng, M., Wang, Y., Kuzma, M., Chalifoux, M., Tremblay, L., Yang, S., et al. (2020). Activation tagging identifies Arabidopsis transcription factor AtMYB68 for heat and drought tolerance at yield determining reproductive stages. *Plant J.* 104, 1535–1550. doi: 10.1111/tpj.15019
- Desclaux D, Nolot JM, Chiffolleau Y, Gozé E, Leclerc C (2008) Changes in the concept of genotype × environment interactions to fit agriculture diversification and decentralized participatory plant breeding: Pluridisciplinary point of view. *Euphytica* 163:533–546. <https://doi.org/10.1007/s10681-008-9717-2>
- Dinelli, G., I. Marotti, R. Di Silvestro, S. Bosi, V. Bregola, M. Accorsi, A. Di Loreto, S. Benedettelli, L. Ghiselli and P. Catizone. 2013. Agronomic, nutritional and nutraceutical aspects of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars under low input agricultural management. *Ital. J. Agron.* 8: 85-93
- Dosio A, Mentaschi L, Fischer E M and Wyser K 2018 Extreme heat waves under 1.5 and 2 degree global warming *Environ. Res. Lett.* 13 054006
- Du, H., Liang, Z., Zhao, S., Nan, M. G., Tran, L. S. P., Lu, K., et al. (2015). The evolutionary history of R2R3-MYB proteins across 50 eukaryotes: new insights into subfamily classification and expansion. *Sci. Rep.* 5:11037. doi: 10.1038/srep11037
- Du, H., Liang, Z., Zhao, S., Nan, M. G., Tran, L. S. P., Lu, K., et al. (2015). The evolutionary history of R2R3-MYB proteins across 50 eukaryotes: new insights into subfamily classification and expansion. *Sci. Rep.* 5:11037. doi: 10.1038/srep11037
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., and Lepiniec, L. (2010). MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* 15, 573–581. doi:10.1016/j.tplants.2010.06.005

- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., and Lepiniec, L. (2010). MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 15, 573–581. doi: 10.1016/j.tplants.2010.06.005
- Durinck, S., Spellman, P. T., Birney, E., and Huber, W. (2009). Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat. Protoc.* 4, 1184–1191. doi: 10.1038/nprot.2009.97
- El-kereamy, A., Bi, Y. M., Ranathunge, K., Beatty, P. H., Good, A. G., and Rothstein, S. J. (2012). The rice R2R3-MYB transcription factor OsMYB55 is involved in the tolerance to high temperature and modulates amino acid metabolism. *PLoS One* 7:e52030. doi: 10.1371/journal.pone.0052030
- Eurostat crop production annual data. Available online: <https://ec.europa.eu/eurostat/data/database>
- Fang, Q., Wang, X., Wang, H., Tang, X., Liu, C., Yin, H., et al. (2020). The poplar R2R3 MYB transcription factor PtrMYB94 coordinates with abscisic acid signaling to improve drought tolerance in plants. *Tree Physiol.* 40, 46–59. doi: 10.1093/treephys/tpz113
- Fontana G, Toreti A, Ceglar A and De Sanctis G 2015 Early heat waves over Italy and their impacts on durum wheat yields *Nat. Hazards Earth Syst. Sci.* 15 1631–7
- Giunta F, Pruneddu G, Motzo R (2019) Grain yield and grain protein of old and modern durum wheat cultivars grown under different cropping systems. *F Crop Res* 230:107–120. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2018.10.012>
- Gordon, S. P., Contreras-Moreira, B., Woods, D. P., Des Marais, D. L., Burgess, D., Shu, S., et al. (2017). Extensive gene content variation in the *Brachypodium distachyon* pan-genome correlates with population structure. *Nat. Commun.* 8:2184. doi: 10.1038/S41467-017-02292-8
- Grieve, C.M, Francois L.E. and Poss J.A. (2001). Salt stress during early seedling growth on phenology and yield of spring wheat. *Cereal Res. Comm.*:167–174.
- Grote, S. (2022). GOfuncR: Gene Ontology Enrichment Using FUNC. R Package Version 1.16.0.
- Guarda, G., Padovan, S., Delogu, G., 2004. Grain yield, nitrogen-use efficiency and baking quality of old and modern Italian bread-wheat cultivars grown at different nitrogen levels. *Eur. J. Agron.* 21, 181–192
- Gutierrez, Rodrigo. (2012). Systems Biology for Enhanced Plant Nitrogen Nutrition. *Science* (New York, N.Y.). 336. 1673-5. 10.1126/science.1217620.
- Guzmán C, Autrique J E, Mondal S, Singh R P, Govindan V, Morales-Dorantes A, Posadas-Romano G, Crossa J, Ammar K and Peña R J 2016 Response to drought and heat stress on wheat quality, with special emphasis on bread-making quality, in durum wheat *Field Crops Res.* 186 157–65
- Hamdy, A., Ragab, R. and Scarascia-Mugnozza, E. (2003), Coping with water scarcity: water saving and increasing water productivity. *Irrig. and Drain.*, 52: 3-20. <https://doi.org/10.1002/ird.73>
- Hu, B., Jin, J., Guo, A. Y., Zhang, H., Luo, J., and Gao, G. (2015). GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics* 31, 1296–1297. doi: 10.1093/bioinformatics/btu817

- Irrthum, A., Wehenkel, L., and Geurts, P. (2010). Inferring regulatory networks from expression data using tree-based methods. *PLoS One* 5:e12776. doi: 10.1371/journal.pone.0012776
- Jiang, C. K., and Rao, G. Y. (2020). Insights into the diversification and evolution of R2R3-MYB transcription factors in plants. *Plant Physiol.* 183, 637–655. doi:10.1104/pp.19.01082
- Jin, J., Tian, F., Yang, D. C., Meng, Y. Q., Kong, L., Luo, J., et al. (2017). PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *Nucleic Acids Res.* 45, D1040–D1045. doi:10.1093/nar/gkw982
- Juhos Katalin, Szilárd Szabó, and Márta Ladányi. "Influence of soil properties on crop yield: a multivariate statistical approach." *International Agrophysics* 29.4 (2015)
- Kaplan, F., and Guy, C. L. (2004). β -amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiol.* 135, 1674–1684. doi: 10.1104/pp.104.040808
- Katiyar, A., Smita, S., Lenka, S. K., Rajwanshi, R., Chinnusamy, V., and Bansal, K. C. (2012). Genome-wide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and *Arabidopsis*. *BMC Genomics* 13:544. doi: 10.1186/1471-2164-13-544
- Katiyar, A., Smita, S., Lenka, S. K., Rajwanshi, R., Chinnusamy, V., and Bansal, K. C. (2012). Genome-wide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and *Arabidopsis*. *BMC Genomics* 13:544. doi: 10.1186/1471-2164-13-544
- Katoh, K., Rozewicki, J., and Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.* 20, 1160–1166. doi: 10.1093/bib/bbx108
- Kulkarni M, Soolanayakanahally R, Ogawa S, Uga Y, Selvaraj MG, Kagale S. Drought Response in Wheat: Key Genes and Regulatory Mechanisms Controlling Root System Architecture and Transpiration Efficiency. *Front Chem.* 2017 Dec 5;5:106. doi: 10.3389/fchem.2017.00106. PMID: 29259968; PMCID: PMC5723305.
- Lauchli, A. and Epstein E. (1990). Plant responses to saline and sodic conditions. In K.K. Tanji (ed). *Agricultural salinity assessment and management*. ASCE manuals and reports on engineering practice . 71: 113–137.
- Le Gall, H., Philippe, F., Domon, J. M., Gillet, F., Pelloux, J., and Rayon, C. (2015). Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants* 4, 112–166. doi: 10.3390/plants4010112
- Lee, T. G., Jang, C. S., Kim, J. Y., Kim, D. S., Park, J. H., Kim, D. Y., et al. (2007). A Myb transcription factor (TaMyb1) from wheat roots is expressed during hypoxia: roles in response to the oxygen concentration in root environment and abiotic stresses. *Physiol. Plant.* 129, 375–385. doi: 10.1111/j.13993054.2006.00828.x
- Letunic, I., and Bork, P. (2019). Interactive Tree of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* 47, W256–W259. doi: 10.1093/nar/gkz239
- Li, J., Liu, H., Yang, C., Wang, J., Yan, G., Si, P., et al. (2020a). Genome-wide identification of MYB genes and expression analysis under different biotic and abiotic stresses in *Helianthus annuus* L. *Ind. Crops Prod.* 143:111924. doi:10.1016/J.INDCROP.2019.111924

- Li, J., Liu, H., Yang, C., Wang, J., Yan, G., Si, P., et al. (2020a). Genome-wide identification of MYB genes and expression analysis under different biotic and abiotic stresses in *Helianthus annuus* L. *Ind. Crops Prod.* 143:111924. doi:10.1016/J.INDCROP.2019.111924
- Li, X., Tang, Y., Li, H., Luo, W., Zhou, C., Zhang, L., et al. (2020b). A wheat R2R3 MYB gene TaMpc1-D4 negatively regulates drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* and wheat. *Plant Sci.* 299:110613. doi: 10.1016/j.plantsci.2020.110613
- Li, X., Tang, Y., Li, H., Luo, W., Zhou, C., Zhang, L., et al. (2020b). A wheat R2R3 MYB gene TaMpc1-D4 negatively regulates drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* and wheat. *Plant Sci.* 299:110613. doi: 10.1016/j.plantsci.2020.110613
- Li, Y., Lin-Wang, K., Liu, Z., Allan, A. C., Qin, S., Zhang, J., et al. (2020c). Genomewide analysis and expression profiles of the StR2R3-MYB transcription factor superfamily in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Int. J. Biol. Macromol.* 148, 817–832. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.167
- Li, Z., Peng, R., Tian, Y., Han, H., Xu, J., and Yao, Q. (2016). Genome-wide identification and analysis of the MYB transcription factor superfamily in *Solanum lycopersicum*. *Plant Cell Physiol.* 57, 1657–1677. doi: 10.1093/pcp/pcw091
- Lilley, J., and Kirkegaard, J. (2011). Benefits of increased soil exploration by wheat roots. *Field Crops Res.* 122, 118–130. doi: 10.1016/j.fcr.2011.03.010
- Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15:550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8
- Lu, S., Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., et al. (2020). CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Res.* 48, D265–D268. doi: 10.1093/nar/gkz991
- Luisa Torri, Paola Migliorini, Giorgio Masoero (2013) Sensory test vs. electronic nose and/or image analysis of whole bread produced with old and modern wheat varieties adjuvanted by means of the mycorrhizal factor, *Food Research International*, Volume 54, Issue 2, 2013, Pages 1400-1408.
- Lupini A., Preiti G., Badagliacca G., Abenavoli M. R., Sunseri F., Monti M., Bacchi M. Nitrogen Use Efficiency in Durum Wheat Under Different Nitrogen and Water Regimes in the Mediterranean Basin. *Frontiers in Plant Science* 11 2021 <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.607226>
- Ma, S., and Bohnert, H. J. (2007). Integration of *Arabidopsis thaliana* stress-related transcript profiles, promoter structures, and cell-specific expression. *Genome Biol.* 8:R49. doi: 10.1186/gb-2007-8-4-r49
- Maathuis FJ. (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr Opin Plant Biol.* 12(3):250-8.
- Maccaferri, M., Harris, N. S., Twardziok, S. O., Pasam, R. K., Gundlach, H., Spannagl, M., et al. (2019). Durum wheat genome highlights past domestication signatures and future improvement targets. *Nat. Genet.* 51, 885–895. doi: 10.1038/s41588-019-0381-3

- Madaline D. Young, Gerard H. Ros, Wim de Vries, Impacts of agronomic measures on crop, soil, and environmental indicators: A review and synthesis of meta-analysis, *Agriculture, Ecosystems & Environment*, Volume 319, 2021, 107551, ISSN 0167-8809, <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107551>.
- Mahmoud, D., Pandey, R., Sathee, L., Dalal, M., Singh, M. P., and Chinnusamy, V. (2020). Regulation of expression of genes associated with nitrate response by osmotic stress and combined osmotic and nitrogen deficiency stress in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol. Rep.* 25, 200–215. doi: 10.1007/s40502-020-00503-x
- Malcolm J. Hawkesford, Genetic variation in traits for nitrogen use efficiency in wheat, *Journal of Experimental Botany*, Volume 68, Issue 10, 1 May 2017, Pages 2627–2632, <https://doi.org/10.1093/jxb/erx079>
- Malcolm John Hawkesford and Andrew B. Riche. (2020). Impacts of G x E x M on Nitrogen Use Efficiency in Wheat and Future Prospects. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1157.
- Martínez-Moreno, F.; Ammar, K.; Solís, I. (2022) Global Changes in Cultivated Area and Breeding Activities of Durum Wheat from 1800 to Date: A Historical Review. *Agronomy* 2022, 12, 1135. <https://doi.org/10.3390/agronomy12051135>
- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., & Suzuki, A. (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of botany*, 105(7), 1141–1157.
- Matus, J. T., Aquea, F., and Arce-Johnson, P. (2008). Analysis of the grape MYB R2R3 subfamily reveals expanded wine quality-related clades and conserved gene structure organization across *Vitis* and *Arabidopsis* genomes. *BMC Plant Biol.* 8:83. doi: 10.1186/1471-2229-8-83
- Mefleh, M.; Conte, P.; Fadda, C.; Giunta, F.; Motzo, R. From seed to bread: Variation in quality in a set of old durum wheat cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 2020, 100, 4066–4074.
- Meyer, C. and Stitt, M. (2001) Nitrate Reduction and Signaling. In: Lea, P.J. and Morot-Gaudry, J.F., Eds., *Plant Nitrogen*, Springer-Verlag, Berlin, 61-78.
- Miguel Sanchez-Garcia, Fanny Álvaro, Ariadna Peremarti, Juan A. Martín-Sánchez, Conxita Royo (2015) Changes in bread-making quality attributes of bread wheat varieties cultivated in Spain during the 20th century. *European Journal of Agronomy*, Volume 63, 2015, Pages 79-88, ISSN 1161-0301, <https://doi.org/10.1016/j.eja.2014.11.006>.
- Millard, P. S., Kragelund, B. B., and Burow, M. (2019). R2R3 MYB transcription factors – functions outside the DNA-binding domain. *Trends Plant Sci.* 24,934–946. doi: 10.1016/j.tplants.2019.07.003
- Movahedi, S., Van De Peer, Y., and Vandepoele, K. (2011). Comparative network analysis reveals that tissue specificity and gene function are important factors influencing the mode of expression evolution in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.* 156, 1316–1330. doi: 10.1104/pp.111.177865
- Naumann G, Alfieri L, Wyser K, Mentaschi L, Betts R A, Carrao H, Spinoni J, Vogt J and Feyen L 2018 Global changes in drought conditions under different levels of warming *Geophys. Res. Lett.* 45 3285–96

- Obertello, M., Shrivastava, S., Katari, M. S., and Coruzzi, G. M. (2015). Crossspecies network analysis uncovers conserved nitrogen-regulated network modules in rice. *Plant Physiol.* 168, 1830–1843. doi: 10.1104/pp.114.255877
- Oerke E.C., Debne H.W., Schonbeck F. and Weber A. (1994). *Crop production and crop protection*. Amsterdam: Elsevier: xxii + 800 pp
- Ogata, K., Hojo, H., Aimoto, S., Nakai, T., Nakamura, H., Sarai, A., et al. (1992). Solution structure of a DNA-binding unit of Myb: a helix-turn-helix-related motif with conserved tryptophans forming a hydrophobic core. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 6428–6432. doi: 10.1073/pnas.89.14.6428
- Pask, A., and Reynolds, M. (2013). Breeding for yield potential has increased deep soil water extraction capacity in irrigated wheat. *Crop Sci.* 53, 2090–2104. doi: 10.2135/cropsci2013.01.0011
- Passioura J. B. (2002). Environmental biology and crop improvement. *Func. Plant Biol.* 29 537–546. 10.1071/FP02020
- Perniola M., Lovelli S., Arcieri M., Amato M. (2015) Sustainability in Cereal Crop Production in Mediterranean Environments. In: Vastola A. (eds) *The Sustainability of Agro-Food and Natural Resource Systems in the Mediterranean Basin*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16357-4_2.
- Reynolds, M., Foulkes, M. J., Slafer, G. A., Berry, P., Parry, M. A., Snape, J. W., et al. (2009). Raising yield potential in wheat. *J. Exp. Bot.* 60, 1899–1918. doi: 10.1093/jxb/erp016
- Romero, I., Fuertes, A., Benito, M. J., Malpica, J. M., Leyva, A., and Paz-Ares, J. (1998). More than 80R2R3-MYB regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 14, 273–284. doi:10.1046/j.1365-313x.1998.00113.x
- Ron Mittler. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*, vol.11, pp 15–19.
- Ryo Nakabayashi, Kazuki Saito. (2015). Integrated metabolomics for abiotic stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 24, pp 10-16.
- Sharp, R. E., Poroyko, V., Hejlek, L. G., Spollen, W. G., Springer, G. K., Bohnert, H. J., et al. (2004). Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *J. Exp. Bot.* 55, 2343–2351. doi: 10.1093/jxb/erh276.
- Shivay Y. S. (2007). Effect of levels and neem (*Azadirachta indica* Juss) coated urea sources of nitrogen on productivity and nitrogen recovery of rice under Indo-Gangetic plains. *International Journal of Tropical Agriculture*. 25Mamta Kajla et al. / *J. Appl. & Nat. Sci.* 7 (2) : 1070–1080 (2015) (4): 111–123.
- Singh, V., Kumar, N., Dwivedi, A. K., Sharma, R., and Sharma, M. K. (2020). Phylogenomic analysis of R2R3 MYB transcription factors in sorghum and their role in conditioning biofuel syndrome. *Curr. Genomics* 21, 138–154. doi:10.2174/1389202921666200326152119
- Singh, V., Kumar, N., Dwivedi, A. K., Sharma, R., and Sharma, M. K. (2020). Phylogenomic analysis of R2R3 MYB transcription factors in sorghum and their role in conditioning biofuel syndrome. *Curr. Genomics* 21, 138–154. doi:10.2174/1389202921666200326152119

- Stracke, R., Werber, M., and Weisshaar, B. (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 447–456. doi: 10.1016/S1369-5266(00)00199-0
- Stracke, R., Werber, M., and Weisshaar, B. (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 447–456. doi: 10.1016/S1369-5266(00)00199-0
- Su, H. G., Zhang, X. H., Wang, T. T., Wei, W. L., Wang, Y. X., Chen, J., et al. (2020). Genome-wide identification, evolution, and expression of GDSL-type esterase/lipase gene family in soybean. *Front. Plant Sci.* 11:726. doi: 10.3389/fpls.2020.00726
- Sun, Y., Zhou, Q., Zhang, W., Fu, Y., and Huang, H. (2002). ASYMMETRIC LEAVES1, an *Arabidopsis* gene that is involved in the control of cell differentiation in leaves. *Planta* 214, 694–702. doi: 10.1007/s004250100673
- Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N., and Šmuc, T. (2011). REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One* 6:e21800. doi: 10.1371/journal.pone.0021800
- Thilert W. (2006). A unique product: The story of the imida-dopid stress shield. *Pflanzenschutz-Nachrichten sci-ence Forum*, Baye.r 59: 73-86.
- Tremblay, B. J. (2019). Universalmotif: Import, Modify, and Export Motifs with R. R package version 1.0.22. Available Online at: <https://github.com/bjmt/universalmotif>
- Trifinopoulos, J., Nguyen, L. T., von Haeseler, A., and Minh, B. Q. (2016). W-IQTREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* 44, W232–W235. doi: 10.1093/nar/gkw256
- Vaghar, M., Ehsanzadeh, P. Comparative photosynthetic attributes of emmer and modern wheats in response to water and nitrogen supply. *Photosynthetica* 56, 1224–1234 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0825-5>
- Van Bel, M., Diels, T., Vancaester, E., Kreft, L., Botzki, A., Van de Peer, Y., et al. (2018). PLAZA 4.0: an integrative resource for functional, evolutionary and comparative plant genomics. *Nucleic Acids Res.* 46, D1190–D1196. doi: 10.1093/nar/gkx1002
- Van Bel, M., Diels, T., Vancaester, E., Kreft, L., Botzki, A., Van de Peer, Y., et al. (2018). PLAZA 4.0: an integrative resource for functional, evolutionary and comparative plant genomics. *Nucleic Acids Res.* 46, D1190–D1196. doi: 10.1093/nar/gkx1002
- Vercruyse, J., Van Bel, M., Osuna-Cruz, C. M., Kulkarni, S. R., Storme, V., Nelissen, H., et al. (2020). Comparative transcriptomics enables the identification of functional orthologous genes involved in early leaf growth. *Plant Biotechnol. J.* 18, 553–567. doi: 10.1111/pbi.13223
- Wang, J., Song, K., Sun, L., Qin, Q., Sun, Y., Pan, J., et al. (2019). Morphological and transcriptome analysis of wheat seedlings response to low nitrogen stress. *Plants* 8:98. doi: 10.3390/PLANTS8040098
- Wang, M., Hao, J., Chen, X., and Zhang, X. (2020). SIMYB102 expression enhances low-temperature stress resistance in tomato plants. *PeerJ* 8:e10059. doi: 10.7717/peerj.10059/supp-7

- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., and Barton, G. J. (2009). Jalview version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189–1191. doi:10.1093/bioinformatics/btp033
- Wei, Q., Chen, R., Wei, X., Liu, Y., Zhao, S., Yin, X., et al. (2020). Genomewide identification of R2R3-MYB family in wheat and functional characteristics of the abiotic stress responsive gene TaMYB344. *BMC Genomics* 21:792. doi:10.1186/s12864-020-07175-9
- Wei, Q., Chen, R., Wei, X., Liu, Y., Zhao, S., Yin, X., et al. (2020). Genomewide identification of R2R3-MYB family in wheat and functional characteristics of the abiotic stress responsive gene TaMYB344. *BMC Genomics* 21:792. doi:10.1186/s12864-020-07175-9
- Wei, Q., Luo, Q., Wang, R., Zhang, F., He, Y., Zhang, Y., et al. (2017). A wheat R2R3-type MYB transcription factor TaODORANT1 positively regulates drought and salt stress responses in transgenic tobacco plants. *Front. Plant Sci.* 8:1374. doi: 10.3389/fpls.2017.01374
- Williams, C. E., and Grotewold, E. (1997). Differences between plant and animal myb domains are fundamental for DNA binding activity, and chimeric myb domains have novel DNA binding specificities. *J. Biol. Chem.* 272, 563–571. doi: 10.1074/jbc.272.1.563
- Xiao, C., Jia, Y., Watt, C., Chen, W., and Zhang, Y. (2020). Genome-wide identification and transcriptional analyses of the R2R3-MYB gene family in wheat. *bioRxiv* [Preprint] doi: 10.1101/2020.10.17.343632v1
- Xu, W., Jia, L., Shi, W., Liang, J., Zhou, F., Li, Q., et al. (2013). Abscisic acid accumulation modulates auxin transport in the root tip to enhance proton secretion for maintaining root growth under moderate water stress. *New Phytol.* 197, 139–150. doi: 10.1111/nph.12004.
- Yamaguchi, M., and Sharp, R. E. (2010). Complexity and coordination of root growth at low water potentials: recent advances from transcriptomic and proteomic analyses. *Plant Cell Environ.* 33, 590–603. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.02064.x
- Yanhui, C., Xiaoyuan, Y., Kun, H., Meihua, L., Jigang, L., Zhaofeng, G., et al. (2006). The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Mol. Biol.* 60, 107–124. doi: 10.1007/s11103-005-2910-y
- Yates, A. D., Allen, J., Amode, R. M., Azov, A. G., Barba, M., Becerra, A., et al. (2022). Ensembl genomes 2022: an expanding genome resource for nonvertebrates. *Nucleic Acids Res.* 50, D996–D1003. doi: 10.1093/NAR/GKAB1007
- Yi-Fang Tsay, Chi-Chou Chiu, Chyn-Bey Tsai, Cheng-Hsun Ho, Po-Kai Hsu. (2007). Nitrate transporters and peptide transporters, *FEBS Letters*. Vol. 581, Issue 12, pp 2290-2300.
- Yu, C. S., Chen, Y. C., Lu, C. H., and Hwang, J. K. (2006). Prediction of protein subcellular localization. *Proteins* 64, 643–651. doi: 10.1002/prot.21018
- Yu, C.-S., Lin, C.-J., and Hwang, J.-K. (2004). Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein Sci.* 13, 1402–1406. doi:10.1110/ps.03479604

- Zadoks, J. C., Chang, T. T., and Konzak, C. F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res.* 14, 415–421.
- Zargarian, L., Le Tilly, V., Jamin, N., Chaffotte, A., Gabrielsen, O. S., Toma, F., et al. (1999). Myb-DNA recognition: role of tryptophan residues and structural changes of the minimal DNA binding domain of c-myb. *Biochemistry* 38, 1921–1929. doi: 10.1021/BI981199J
- Zhang, L., Zhao, G., Jia, J., Liu, X., and Kong, X. (2012a). Molecular characterization of 60 isolated wheat MYB genes and analysis of their expression during abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 63, 203–214. doi:10.1093/JXB/ERR264
- Zhang, L., Zhao, G., Jia, J., Liu, X., and Kong, X. (2012a). Molecular characterization of 60 isolated wheat MYB genes and analysis of their expression during abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 63, 203–214. doi:10.1093/JXB/ERR264
- Zhang, L., Zhao, G., Jia, J., Liu, X., and Kong, X. (2012a). Molecular characterization of 60 isolated wheat MYB genes and analysis of their expression during abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 63, 203–214. doi: 10.1093/JXB/ERR264
- Zhang, L., Zhao, G., Xia, C., Jia, J., Liu, X., and Kong, X. (2012b). A wheat R2R3-MYB gene, TaMYB30-B, improves drought stress tolerance in transgenic Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 63, 5873–5885. doi: 10.1093/jxb/ers237
- Zhang, P., Wang, R., Yang, X., Ju, Q., Li, W., Shiyou, L., et al. (2020). The R2R3-MYB transcription factor AtMYB49 modulates salt tolerance in Arabidopsis by modulating the cuticle formation and antioxidant defence. *Plant Cell Environ.* 43, 1925–1943. doi: 10.1111/pce.13784
- Zhang, Z., Liu, X., Wang, X., Zhou, M., Zhou, X., Ye, X., et al. (2012c). An R2R3 MYB transcription factor in wheat, TaPIMP1, mediates host resistance to *Bipolaris sorokiniana* and drought stresses through regulation of defense and stress-related genes. *New Phytol.* 196, 1155–1170. doi: 10.1111/J.1469-8137.2012.04353.X
- Zhao, J. Y., Lu, Z. W., Sun, Y., Fang, Z. W., Chen, J., Zhou, Y. B., et al. (2020a). The ankyrin-repeat gene GmANK114 confers drought and salt tolerance in Arabidopsis and soybean. *Front. Plant Sci.* 11:584167. doi:10.3389/fpls.2020.584167
- Zhao, K., Cheng, Z., Guo, Q., Yao, W., Liu, H., Zhou, B., et al. (2020b). Characterization of the poplar R2R3-MYB gene family and over-expression of PsnMYB108 confers salt tolerance in transgenic tobacco. *Front. Plant Sci.* 11:571881. doi: 10.3389/fpls.2020.571881
- Zhao, Y., Yang, Z., Ding, Y., Liu, L., Han, X., Zhan, J., et al. (2019). Overexpression of an R2R3 MYB Gene, GhMYB73, increases tolerance to salt stress in transgenic Arabidopsis. *Plant Sci.* 286, 28–36. doi:10.1016/j.plantsci.2019.05.021
- Zuluaga, D. L., De Paola, D., Janni, M., Curci, P. L., and Sonnante, G. (2017). Durum wheat miRNAs in response to nitrogen starvation at the grain filling stage. *PLoS One* 12:e0183253. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0183253
- Zuluaga, D. L., Liuzzi, V., Curci, P. L., and Sonnante, G. (2018). MicroRNAs in durum wheat seedlings under chronic and short-term nitrogen stress. *Funct. Integr. Genomics* 18, 645–657. doi: 10.1007/S10142-018-0619-7

Zuluaga, D.L.; Sonnante, G. (2019). The Use of Nitrogen and Its Regulation in Cereals: Structural Genes, Transcription Factors, and the Role of miRNAs. *Plants*, 8, 294.