

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA
BIOTECNOLOGIE VEGETALI - XXIII CICLO

***“La tessitura della cariosside in relazione con le proprietà
tecnologiche in grano duro”***

Settore scientifico-disciplinare

AGR/07

Coordinatore: Prof.ssa **STEFANIA MASCI**

Firma:.....

Tutor: Dott. **NORBERTO POGNA**

Firma:.....

Dottorando: D.ssa **CARLA CASALE**

Firma:.....

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 <i>Caratteristiche principali dei cereali</i>	1
1.2 <i>Filogenesi dei grani polipoidi</i>	1
1.3 <i>Il grano duro (<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>durum</i>)</i>	3
1.4 <i>Il grano monococco (<i>Triticum monococcum</i> ssp. <i>monococcum</i>)</i>	3
1.5 <i>Aspetti morfologici dei frumenti</i>	4
1.6 <i>Amido e proteine di riserva</i>	5
1.7 <i>La tessitura della cariosside nelle specie del genere <i>Triticum</i></i>	7
1.7.1 <i>Basi genetiche della durezza della cariosside</i>	9
1.7.2 <i>Puroindoline e friabilina</i>	10
1.7.3 <i>Struttura delle puroindoline</i>	10
1.7.4 <i>Polimorfismo genetico e variazioni nella tessitura della cariosside</i>	13
1.7.5 <i>Le puroindoline in altre specie cerealicole</i>	15
1.7.6 <i>Puroindoline e qualità tecnologica delle farine</i>	18
1.7.7 <i>Altri ruoli fisiologici delle puroindoline</i>	18
1.7.8 <i>Modificazioni della tessitura della cariosside di grano duro e selezione assistita con marcatori molecolari (MAS)</i>	20
1.8 <i>Il processo di trasformazione dei cereali</i>	22
1.8.1 <i>La pastificazione</i>	23
1.9 <i>Qualità tecnologica dei frumenti</i>	24
1.10 <i>Qualità nutrizionale dei frumenti</i>	25
 2. SCOPO DELLA TESI	 27
 3. MATERIALI E METODI	 28
3.1 <i>Caratterizzazione molecolare</i>	28
3.1.1 <i>Materiale vegetale</i>	28
3.1.2 <i>Metodi estrattivi</i>	28
3.1.2.1 <i>Estrazione dei granuli d'amido</i>	28
3.1.2.2 <i>Estrazione delle puroindoline dai granuli d'amido</i>	28
3.1.2.3 <i>Estrazione delle proteine totali</i>	29
3.1.2.4 <i>Estrazione delle gliadine</i>	29

3.1.2.5 Estrazione del DNA con CTAB	29
3.1.2.6 Estrazione del DNA con il metodo “Della Porta”	30
3.1.2.7 Estrazione del DNA da gel	30
3.1.3 Amplificazione tramite PCR da DNA genomico	30
3.1.4 Tecniche di sequenziamento	33
3.1.4.1 Purificazione del prodotto di PCR	33
3.1.4.2 Analisi di sequenza	33
3.1.4.3 Preparazione delle reazioni di PCR di sequenza	34
3.1.4.4 Programma di PCR per un totale di 30 cicli	34
3.1.4.5 Precipitazione con Etanolo	35
3.1.5 Separazioni elettroforetiche	35
3.1.5.1 Elettroforesi A-PAGE (Acid-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)	35
3.1.5.2 Elettroforesi in presenza di Sodio Dodecil Solfato (SDS-PAGE)	36
3.1.6 Trasferimento (<i>Western Blotting</i>) su membrana di nitrocellulosa e Immunoreazione	37
3.2 Caratterizzazione tecnologica	37
3.2.1 Materiale vegetale	37
3.2.2 Determinazione della durezza della cariosside	38
3.2.3 Test di sedimentazione	38
3.2.4 Determinazione del contenuto di umidità	38
3.2.5 Determinazione del contenuto proteico mediante “micro-Kjeldahl”	40
3.2.6 Determinazione farinografica	40
3.2.7 Determinazione alveografica	42
3.2.8 Determinazione dell’Indice di caduta o <i>Falling Number</i>	43
4. RISULTATI	
4.1 Caratterizzazione molecolare	45
4.1.1 Materiale vegetale	45
4.1.2 Caratteristiche morfo-fisiologiche delle progenie F4	45
4.1.3 Analisi genetiche e biochimiche	46
4.1.3.1 Amplificazione tramite PCR	47
4.1.3.2 Separazione delle puroindoline tramite elettroforesi A-PAGE e immunoelettroforesi	48
4.1.3.3 Analisi delle proteine totali tramite SDS-PAGE	52

4.1.3.4 Separazione delle gliadine mediante elettroforesi acida A-PAGE	53
4.1.4 <i>Analisi PCR con marcatori molecolari SSR</i>	54
4.1.4.1 <i>Analisi PCR con marcatori molecolari SSR sui campioni di generazione F5</i>	56
4.1.4.2 <i>Analisi PCR con marcatori molecolari SSR su 10 plantule F6 ricombinanti</i>	59
4.1.5 <i>Sequenziamento</i>	62
4.1.6 <i>Allevamento e incrocio delle linee ricombinanti selezionate</i>	63
4.2 Caratterizzazione tecnologica	63
4.2.1 <i>Analisi della tessitura della cariosside mediante SKCS delle linee di grano duro ricombinanti</i>	63
4.2.2 <i>Analisi qualitative su cariossidi della generazione F6</i>	65
4.2.3 <i>Analisi tecnologiche su cariossidi F7</i>	70
 5. DISCUSSIONE	 72
5.1 <i>Geni Pina-D1a e Pinb-D1a e loro espressione in linee di grano duro</i>	72
5.2 <i>Proteine di riserva e qualità del glutine in linee di grano duro contenenti i geni Puroindolinici</i>	73
5.3 <i>Analisi PCR delle progenie F5 e F6 con i marcatori molecolari SSR</i>	74
5.4 <i>Conclusioni</i>	75
 6. BIBLIOGRAFIA	 77

1. INTRODUZIONE

1.1 Caratteristiche principali dei cereali

I cereali comprendono diverse specie, quasi tutte appartenenti alla famiglia della *Graminaceae*, che producono semi amidacei, farinosi, commestibili in numerose preparazioni alimentari.

Quello dei cereali è il gruppo di colture più importanti nell'economia agricola mondiale, l'alimentazione della maggior parte delle civiltà da sempre si è basata sulla cerealicoltura.

A livello nutrizionale, i cereali pur presentando un contenuto proteico assai variabile (8-15% del peso secco della cariosside) scarseggiano di aminoacidi essenziali come lisina, treonina e triptofano. Uno dei cereali più coltivati al mondo è il frumento; con questo termine si identificano diverse specie appartenenti al genere *Triticum*, le quali vengono distinte in base al numero di cromosomi in:

- diploidi con $2n=2x=14$. Contengono il genoma A (per esempio *Triticum aegilopoides*, *Triticum monococcum*, *T. urartu*, *T. beoticum*);
- tetraploidi con $2n=4x=28$. Contengono i genomi AB (per esempio *T. turgidum* ssp *durum*, *T. turgidum* ssp *dicoccum*, *T. turgidum* ssp *polonicum*) oppure AG (*T. timopheevii*);
- esaploidi con $2n=6x=42$. Contengono i genomi ABD (*T. aestivum* e *T. aestivum* ssp *spelta*) oppure AAG (*T. zhukowskyi*).

1.2 Filogenesi dei grani polipoidi

La filogenesi dei grani polipoidi coinvolge una specie di *Triticum* selvatico diploide e due specie di *Aegilops* strettamente correlate. Dati citologici riguardanti il comportamento di ibridi interspecifici tra $2x/4x$ e $4x/6x$ nell'accoppiamento indicano che *T. monococcum* e *T. turgidum* hanno un genoma in comune mentre *T. turgidum* e *T. aestivum* hanno due genomi in comune (Kiara, 1919; Sax, 1922) (Figura 1). La citologia però non discriminava tra i genomi di *T. urartu* e *T. monococcum* (Johnson and Dhaliwal, 1976) mentre studi molecolari dimostrarono che *T. urartu* era il donatore ancestrale del genoma A per entrambi i grani polipoidi (Dvorak *et al.*, 1988, 1993). Più difficoltosa è stato capire l'origine dei genomi B e G dei grani polipoidi ma con lo sviluppo di tecnologie molecolari si è giunti alla conclusione che i genomi G e B dei grani tetraploidi provengono da *Aegilops speltoides* (Dvorak and Zhang, 1990).

Inoltre è stato dimostrato che *Ae. tauschii* è il donatore ancestrale del genoma D ai grani che da tetraploidi (*T. turgidum*) incrociandosi con *Ae. tauschii* spp. *strangulata* sono diventati esaploidi (Dovrak *et al.*, 1998).

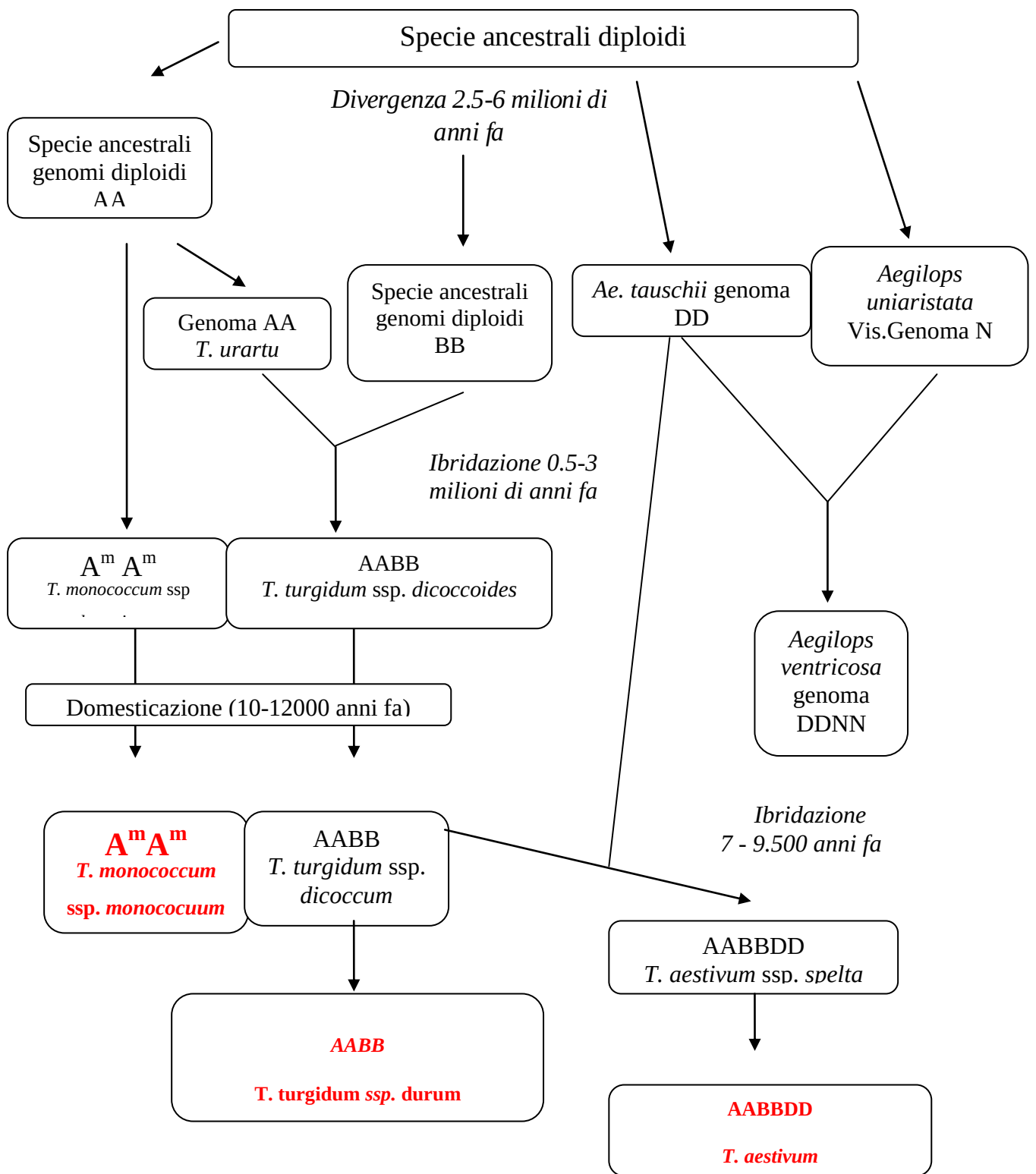


Figura 1: Filogenesi dei grani poliploidi

1.3 Il grano duro (*Triticum turgidurum* ssp. *durum*)

Il valore nutrizionale associato agli alimenti derivati dai cereali è un elemento oramai consolidato nella nostra cultura ed è sempre più al centro dell'attenzione in programmi di ricerca orientati alla definizione di una corretta e sana alimentazione (Cannella e Piredda, 2006). I cereali rappresentano in generale la fonte primaria di calorie e proteine per una gran parte dell'umanità (Panatta, 1997); tra questi il frumento duro è quello che certamente riveste un ruolo fondamentale nel sistema agroalimentare italiano, non solo dal punto di vista nutrizionale ma anche economico, ambientale e culturale.

Il ruolo che il grano duro esercita nell'alimentazione è determinato oltre che dall'insieme dei costituenti nutrizionali, anche dalla versatilità con la quale è possibile utilizzarlo nella produzione di alimenti largamente diffusi e particolarmente graditi dai consumatori.

Il frumento duro costituisce la principale materia prima sia per la produzione di pasta sia per la preparazione del pane e del couscous nei paesi mediterranei. In altri Paesi lo stesso cereale è usato per produrre un'ampia gamma di prodotti e spesso costituisce la principale fonte alimentare (Flagella, 2006).

1.4 Il grano monococco (*Triticum monococcum* ssp. *monococcum*)

Il *Triticum monococcum*, come accennato precedentemente, è una specie di 'antica' coltivazione che ha avuto un ruolo fondamentale nell'alimentazione umana. L'interesse verso questa specie, per la prima volta seminata nel territorio siciliano, scaturisce dalla crescente sensibilità dei consumatori per le caratteristiche dietetico-nutrizionali degli alimenti che ne derivano.

E' una specie tollerante a stress ambientali capace di dare una produzione economicamente valida in condizioni di modesta fertilità del terreno. L'antichità della coltivazione ed il legame con le tradizioni ne hanno fatto una coltura tipica di determinate aree geografiche. La rusticità, l'alto contenuto proteico e l'abbondanza di sostanze biologicamente attive come tocoli, carotenoidi e fibre alimentari nella cariosside, la ridotta tossicità delle farine verso i pazienti celiaci, il gradevole e "diverso" sapore dei prodotti a base di grano monococco sono i caratteri unici di questa specie, sufficienti per giustificarne la reintroduzione in coltivazione. D'altra parte, la ridotta produttività (20-25 q/ha), l'aderenza delle glume alle cariossidi e l'elevata sofficietà delle cariossidi stesse sono i principali difetti di questa specie, alla cui correzione è dedicata l'attività di miglioramento genetico.

1.5 Aspetti morfologici dei frumenti

A livello morfologico i cereali presentano un apparato radicale fascicolato che inizia a svilupparsi con radici embrionali presto sostituite, durante lo sviluppo, da quelle avventizie. Il fusto, chiamato culmo, è cilindrico costituito da nodi ognuno dei quali porta una foglia a disposizione alterna e da internodi internamente cavi il cui numero va da 7 a 9 a seconda delle varietà.

Il germoglio primario non resta unico; all'ascella delle foglie sono presenti e possono svilupparsi altri apici vegetativi che danno luogo a culmi secondari e terziari originando quello che viene chiamato accestimento.

L'infiorescenza dei frumenti è una spiga composta, terminale costituita da un asse principale, o rachide, formato da internodi corti su ognuno dei quali è inserita una spighetta pluriflora da cui si origina il frutto detto cariosside. La cariosside è un frutto secco, indeiscente, costituito dall'embrione (2-4% in peso) posto ad un'estremità, dall'endosperma (87-89%) e dai tegumenti (8-10% circa) (Figura 2).

L'endosperma è la parte preponderante del chicco. Esso contiene proteine di riserva ed è formata da uno strato aleuronico esterno e da un parenchima interno costituito da cellule ricche di amido; contiene inoltre piccole percentuali di grassi, sostanze minerali ed enzimi utili soprattutto alla germinazione.

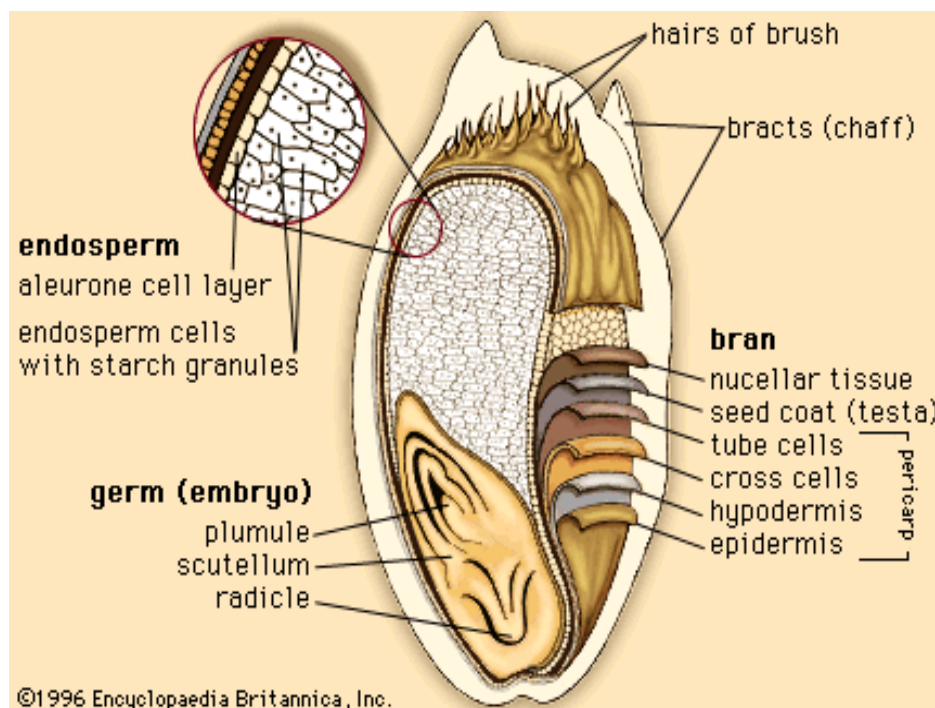


Figura 2: Schema descrittivo della morfologia della cariosside

Il grano duro (*Triticum turgidum* spp. *durum*, genoma tetraploide AABB) presenta rispetto al grano tenero (*Triticum aestivum* L., genoma esaploide AABBDD) alcune differenze morfologiche come una spiga lateralmente compressa piuttosto che a sezione quadrata, l'ultimo internodo pieno e quindi resistente allo schiacciamento, spighe sempre aristate e cariosside vitrea dovuta all'elevato contenuto proteico (Bonciarelli e Bonciarelli, 1998).

1.6 Amido e proteine di riserva

L'amido rappresenta il principale polisaccaride di riserva dei cereali; esso viene accumulato all'interno delle cellule dell'endosperma in organelli detti amiloplasti a partire da un punto detto ilo, dando origine ai granuli secondo vie metaboliche che hanno come precursore il saccarosio (Duffus, 1987).

Nel granulo di amido sono presenti due polimeri:

- Amilosio: macromolecola lineare costituita da circa 10^3 molecole di glucosio (P.M. 10^5 - 10^6 Da) e rappresentante il 18-20% dell'amido. Il legame α 1-4 fra le diverse unità di glucosio permette alla catena di assumere in particolari situazioni una conformazione tridimensionale ad elica con i gruppi OH delle unità saccaridiche rivolti verso l'esterno, così da creare una cavità interna idrofobica (Blueon *et al.* 1990).
- Amilopectina: macromolecola ramificata, costituita da 10^4 - 10^5 da molecole di glucosio (P.M. 10^7 - 10^9 Da) e rappresentante l'80-82% del granulo di amido; ha la stessa composizione chimica dell'amilosio ma presenta, oltre ai legami α 1-4, anche legami α 1-6 da cui prendono origine le ramificazioni, ognuna delle quali è mediamente lunga 20-25 molecole di glucosio. Questa complessa struttura assume una configurazione cosiddetta a "grappolo" dove si può osservare un'alternanza di zone amorfe (punti di ramificazione) e zone cristalline, dette micelle (Ring, 1987); in queste ultime zone si formano legami -H tra le catene vicine.

Nei granuli di amido di tutti i cereali, si osserva un elevato grado di cristallinità, responsabile delle proprietà di birifrangenza, alla luce polarizzata, derivante dal particolare ordine assunto dai due polimeri amilosio e amilopectina. A temperatura ambiente, l'amido risulta insolubile in acqua, sia per l'elevato peso molecolare dei suoi costituenti, sia per la stabilizzazione mediante legami -H tra i numerosi gruppi ossidrilici ma quando viene posto in acqua a temperature di superiori a 50-55°C, si osserva il fenomeno della gelatinizzazione, che consiste nel rigonfiamento del granulo di amido fino al collasso dell'ordine molecolare con irreversibile cambiamento delle proprietà quali perdita di cristallinità e birifrangenza e solubilizzazione di una parte delle molecole di amilosio a cui segue un aumento di viscosità.

Quando l'amido gelatinizzato viene raffreddato si osserva il fenomeno della retrogradazione (soprattutto a carico dell'amilosio), cioè la riassociazione di diverse molecole di amilosio ed amilopectina in una nuova struttura ordinata.

La grandezza e la forma dei granuli di amido (granuli grandi o di tipo A e granuli piccoli o di tipo B) possono influenzare il comportamento termodinamico dell'amido. I due tipi di granuli differiscono nelle loro caratteristiche fisiche e chimiche, e possono avere differenti usi. Le caratteristiche fisico chimiche dei granuli piccoli e grandi dell'amido sono state investigate per rilevare se le caratteristiche di gelatinizzazione ed il comportamento termodinamico differiscono tra misure di classi d'amido di grano. Infatti, i granuli di tipo A e B hanno notevoli differenze di gelatinizzazione e di caratteristiche reologiche, indicando che essi possono avere differenti applicazioni nell'industria alimentare (Chiotelli et al., 2002).

Un altro aspetto molto interessante riguarda il cosiddetto amido resistente. In base alla suscettibilità enzimatica, l'amido viene classificato come amido rapidamente digeribile (RDS), amido lentamente digeribile (SDS) e amido resistente (RD).

Vi sono parecchie ragioni per cui l'amido non può essere digerito: più elevato è il contenuto di amilosio più grande è la resistenza alla digestione perché l'amido forma granelli imballati in cellule; quando l'amido è riscaldato, i granuli si gonfiano e gelatinizzano e questo fa sì che l'amido venga attaccato da enzimi digestivi. L'amido con un elevato contenuto in amilosio è più suscettibile alla gelatinizzazione e quindi più resistente alla digestione; quando l'amido viene riscaldato e successivamente raffreddato avviene la retrogradazione che porta l'amido gelatinizzato in forma cristallina che è resistente alla digestione (Akerberg *et al*, 1998).

La composizione delle proteine di riserva è il più importante fattore qualitativo del grano (Pogna *et al*. 1990). Le proteine di riserva appartengono a tre famiglie principali (Gianibelli *et al*. 2001):

- gliadine
- subunità gluteniniche a basso peso molecolare (LMW)
- subunità gluteniniche ad alto peso molecolare (HMW)

Esse costituiscono la parte preponderante del glutine, una massa proteica elastica che si ottiene impastando la semola o la farina sotto un rivoletto d'acqua corrente. Le proprietà reologiche degli impasti di grano duro dipendono soprattutto dalle caratteristiche di elasticità ed estensibilità del glutine.

Le gliadine costituiscono il 40% circa delle proteine dell'endosperma di grano e sono una miscela eterogenea di proteine monomeriche solubili in alcool. Sulla base della loro mobilità elettroforetica i componenti di queste proteine vengono classificati in α , β , γ , e ω gliadine.

Le subunità gluteniniche LMW e HMW si legano tra loro mediante ponti disolfuro per formare nell'endosperma grandi polimeri ramificati.

I geni che codificano per le proteine di riserva di grano tenero sono portati dai cromosomi 1A, 1B, 1D, 6A, 6B e 6D. In particolare i geni che controllano la sintesi delle gliadine sono riuniti in gruppi di 10-15 sequenze codificanti in corrispondenza dei loci *Gli-A1*, *Gli-B1* e *Gli-D1* (localizzati rispettivamente nei bracci corti dei cromosomi 1A, 1B e 1D) e *Gli-A2*, *Gli-B2* e *Gli-D2* (nei bracci corti dei cromosomi 6A, 6B e 6D) (Payne, 1987). Esiste una vasta serie di forme alleliche per ciascun locus gliadinico, per un totale di alcune decine di alleli/locus.

Oltre a questi loci gliadinici principali ne esistono altri contenenti uno o pochi geni. Questi loci “selfish” (ad esempio *GliA-5*, *Gli-B5*, *Gli-A6*) sono localizzati nei bracci corti dei cromosomi della serie omeologa 1. Ovviamente nei frumenti diploidi con genoma A mancano i loci portati dai cromosomi 1B, 1D, 6B e 6D, mentre nelle specie tetraploidi con genoma AB mancano i loci portati dal genoma D. I geni che codificano per le subunità gluteniniche HMW sono presenti in due esemplari nei loci *Glu-A1*, *Glu-B1* e *Glu-D1* localizzati nel braccio lungo dei cromosomi 1A, 1B e 1D (quest'ultimo presente solo nelle specie esaploidi) (Payne, 1987), mentre i geni per le subunità LMW sono localizzati in *cluster* di 10 o più elementi nei loci *Glu-A3*, *Glu-B3* e *Glu-D3* i quali sono in stretta concatenazione (< 2cM) con i loci gliadinici *Gli-1* nei bracci corti dei cromosomi della serie omeologa 1 (Payne, 1987; Pogna *et al.*, 1990)

1.7 La tessitura della cariosside nelle specie del genere *Triticum*

Le varietà coltivate di grano vengono separate in classi distinte in base alla durezza delle cariossidi che producono. Le varietà di frumento tenero (*Triticum aestivum* L.) sono raggruppate in tre categorie a diversa tessitura (Morris 2002; Corona *et al.* 2001):

- soffice (*soft*)
- dura (*hard*)
- intermedia (*medium hard*).

D'altra parte le varietà di frumento duro (*Triticum turgidum* spp. *durum*) sono tutte caratterizzate da granella extra dura.

La tessitura della cariosside, definita come resistenza alla deformazione, è un parametro di rilevante importanza tecnologica poiché determina la durata ed il consumo energetico della macinazione, influisce sulla resa in farina e la digeribilità, soprattutto condiziona la granulometria e lo stato fisico dei granuli d'amido. Le cariossidi di grano tenero a tessitura soffice si frantumano più facilmente,

rilasciando numerosi granuli d'amido intatti e producendo una farina con particelle più fini. I grani teneri a tessitura *hard* producono una farina con particelle più grossolane e con un elevato danneggiamento dei granuli d'amido con la conseguenza che la farina stessa assorbe molta più acqua per sviluppare l'impasto ed è necessario un tempo di condizionamento doppio prima della macinazione rispetto al frumento tenero a tessitura *soft*.

Il grano duro *Triticum turgidum* spp. *durum* e la sua variante *Triticum turgidum* spp. *dicoccum*, nota come “farro”, presentano elevati valori di durezza delle cariossidi per la cui molitura è quindi richiesta un'energia maggiore. Le semole o le farine di grano duro danno perciò origine ad impasti tenaci e poco estensibili dai quali si ottiene un'ottima pasta ma anche un pane “pesante” e poco voluminoso (Boggini e Pogna 1989). Il maggior assorbimento idrico delle varietà di grano tenero a tessitura *hard*, se accompagnato ad un elevato contenuto di proteine di buona qualità, le rende particolarmente adatte alla produzione di prodotti a lunga lievitazione, come i dolci da ricorrenza (panettone, pandoro, colomba ecc). Viceversa le varietà di grano tenero a granella soffice sono utilizzate soprattutto per la produzione di biscotti, fette biscottate ed alcune tipologie di pane.

Le varietà di frumento tenero coltivate in Italia sono state classificate in base alla loro durezza utilizzando la metodica denominata SKCS (Single Kernel Characterization System) che misura direttamente la forza ed il tempo necessari per frantumare la singola cariosside (Ferraresi *et al.* 1997; Corona *et al.* 2001). Possono essere usate comunque anche misurazioni più indirette, come il “particle size index”, che misura la distribuzione della taglia delle particelle dopo la macinazione delle cariossidi (Symes 1961), lo spettro di assorbimento nell'infrarosso vicino (Near-Infrared-Reflectance) e l’“electron microscopy of cross-sections of the grain”, che è utilizzato per differenziare il grano duro dal tenero (Bechtel e Wilson 1997; Turnbull *et al.* 2002).

Il valore di SKCS cresce con la durezza della granella ed è compreso tra -20 e +120. Le varietà di grano tenero a granella soffice hanno generalmente valori di SKCS compresi tra 14 e 45.

Le singole cariossidi di una varietà mostrano valori di durezza molto simili, come dimostrato dai valori di deviazione standard raramente superiori al 13-15 unità SKCS. Inoltre gli indici medi di SKCS di una singola varietà di grano tenero nelle diverse annate di raccolta variano del 10% circa (Ferraresi *et al.* 1997). Le varietà italiane di grano tenero si distribuiscono in 4 gruppi definiti dai seguenti valori di durezza:

- inferiori a 14 (tessitura supersoffice)
- tra 20 e 43 (soffice)
- tra 55 e 70 (moderatamente dura)
- tra 70 e 90 (dura)

Le varietà di grano duro hanno generalmente valori di SKCS compresi tra 80 e 100.

1.7.1 Basi genetiche della durezza della cariosside

Il carattere durezza della cariosside ha una forte base genetica ed è scarsamente influenzato dall'ambiente; è un carattere genetico semplice in cui il fenotipo “granella soffice” (*Ha*) è dominante sul fenotipo “granella dura” (*ha*).

Il locus *Ha* che controlla questo carattere è localizzato nella parte terminale del braccio corto del cromosoma 5D (Mattern *et al.*, 1973; Jolly *et al.*, 1993) ed è pertanto assente nel frumento duro.

Triticum aestivum L. è un alloesaploide derivato dall'ibridazione del grano tetraploide *T. turgidum* (AABB) (contenente il genoma AA di *Triticum urartu*, e il genoma BB di *Aegilops speltoides*), con *Aegilops tauschii* ($2n = 2x = 14$, genoma DD). Proprio da questa ibridazione il grano esaploide ha acquisito il locus *Ha*.

Il locus *Ha* è definito come la regione cromosomica che porta i geni *Gsp-D1*, *Pina-D1* e *Pinb-D1*. Inoltre nel cromosoma 5D di *Ae. tauschii* e *T. aestivum*, il locus *Ha* contiene due addizionali copie degenerate del gene *Pinb-D1* (*PseudoPinb* e *Pinb-relic*) (Chantret *et al.* 2005). *Gsp-1* (Grain Softness Protein) è lungo 495 bp ed è strutturato come un singolo esone. Altre copie di questo gene sono presenti nei cromosomi 5A e 5B e nel braccio lungo del cromosoma 5D (Jolly *et al.*, 1996). Il gene *Pina-D1* è lungo 447 bp, strutturato come un singolo esone, e codifica la proteina nota come **puroindolina A**. Anche il gene *Pinb-D1* è lungo 447 bp ed è strutturato come un singolo esone che codifica per la proteina nota come **puroindolina B**. Lo pseudogene *PseudoPinb* è localizzato 2500 bp a valle del gene *Pinb-D1*, ed è accompagnato da una più corta duplicazione del gene *Pinb-D1* nota come *Pinb-relic*. *Gsp-D1*, *Pina-D1* e *Pinb-D1* sono presenti solo nelle specie della sottofamiglia delle *Pooideae*, comprendente i generi *Triticum*, *Aegilops*, *Avena*, *Hordeum* e *Secale*, dove la tessitura soffice dell'endosperma si riscontra nei primi tre generi (Gautier *et al.* 2000; Darlington *et al.* 2001; Morris 2002). Analisi dettagliate del cromosoma batterico artificiale (BAC) di 105-Kbp contenente la regione del locus *Ha* mostrano che questi geni sono disposti nell'ordine *Gsp-D1/Pina-D1/Pinb-D1/Pinb-relic/PseudoPinb* all'interno di un frammento di circa 60-Kbp (Chantret *et al.* 2005). Oltre ai geni che codificano per le due puroindoline, altri geni contribuiscono alla variazione della tessitura della cariosside. In particolare QTL (Quantitative Trait Loci) con effetti sulla tessitura della cariosside sono stati identificati su tutti i cromosomi salvo 4A, 4D, 6A, 7B e 7D. Comunque, gli effetti di questi QTL sono molto piccoli rispetto a quelli dei geni delle puroindoline (Campbell *et al.* 1999). Studi recenti hanno evidenziato diversi fattori ambientali che, all'interno di una varietà o genotipo, sono in grado di influenzare la tessitura della cariosside. E' stato osservato infatti che esiste una correlazione negativa tra la durezza della cariosside ed il suo peso ($r = -0.47^{**}$ per le cultivar a tessitura soft e $r = -0.64^{**}$ per quelle a tessitura dura), mentre è positiva ($r = 0,40^{**}$) quella tra il peso e i livelli di Pin-A e Pin-b nelle varietà di grano tenero a

tessitura *hard*, come anche quella tra la durezza del seme ed il contenuto proteico ($r = 0.36^{**}$) nelle varietà a tessitura *soft* (Gazza *et al.* 2007). Questi dati suggeriscono che la variazione della durezza delle cariossidi all'interno delle diverse classi di tessitura è largamente determinata dalle condizioni colturali (clima, temperature, terreno, presenza di patologie ecc) e dalle pratiche agronomiche quali la concimazione, la densità di semina, l'irrigazione, i trattamenti antiparassitari (Hazen e Ward 1997; Lyon e Shelton 1999; Peterson *et al.* 1992).

1.7.2 *Puroindoline e friabilina*

Nessun marker biochimico della durezza della cariosside era stato trovato prima che Greenwell e Schofield (1986) investigassero su alcune proteine associate ai granuli d'amido. Essi scoprirono che una banda proteica con peso molecolare di circa 15 kDa, visibile dopo separazione elettroforetica su gel di poliacrilamide in presenza di Sodio-Dodecil Solfato (SDS-PAGE), poteva essere estratta con una soluzione acquosa al 2% di SDS dai granuli di amido nelle varietà di grano tenero a tessitura *soft* ma era assente nelle varietà di grano tenero a tessitura "*hard*" e nelle varietà di grano duro. Questa banda, denominata **friabilina**, è costituita da alcune proteine di cui le due principali sono la puroindolina A (Pin-A) e la puroindolina B (Pin-B), così denominate per il loro alto contenuto in triptofano (da "*puros*", nome greco del grano, e "*indoline*", l'anello indolico del triptofano) (Blochet *et al.* 1993; Jolly *et al.* 1993; Gautier *et al.* 1994, Rahman *et al.* 1994; Oda 1994; Morris *et al.* 1994).

Il terzo componente del locus *Ha* (*Gsp-D1*), inizialmente ritenuto responsabile della sofficità, codifica per una proteina non associata ai granuli di amido e non coinvolta nel controllo della tessitura della cariosside (Rahman *et al.* 1994).

Le puroindoline, componenti principali delle friabiline, hanno caratteristiche strutturali simili agli inibitori delle α -amilasi e alle non-specific Lipid Transfer Protein (ns-LTP).

1.7.3 *Struttura delle puroindoline*

A livello aminoacidico Pin-A e Pin-B mostrano una identità di sequenza del 60%; la GSP è simile alle puroindoline per il 40% della sequenza.

Pin-A e Pin-B sono entrambe localizzate nell'endosperma amilaceo, all'interfaccia tra i granuli d'amido e la matrice proteica (Dubreil *et al.* 1998; Morris 2002).

Sono proteine basiche, ricche di cisteina (dieci residui su 114-117 amminoacidi nelle proteine mature), in grado di legare i lipidi, con peso molecolare di circa 13 kDa. A pH 7 esse presentano una struttura secondaria costituita da α -eliche (30%), foglietti β (30%) e strutture non ordinate (40%) (Le Bihan *et al.* 1996) (Figura 3).

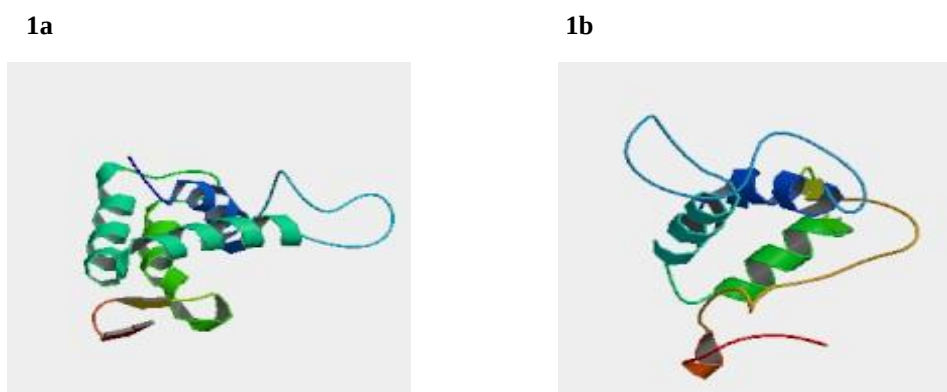


Figura 3: Struttura molecolare della puroindolina A (**1a**) e della puroindolina B (**1b**) di frumento.

Una parte essenziale della struttura primaria delle puroindoline è il dominio centrale ricco di residui di triptofano accoppiati con residui basici di arginina o lisina. Questo dominio presenta delle differenze tra le due puroindoline: Pin-A presenta un dominio centrale (WRWWKWWK) contenente 5 residui di triptofano e 3 residui basici, mentre in Pin-B la regione ricca centrale è troncata (WPTKWWK) e contiene solo 3 residui di triptofano e 2 residui basici (Figura 4).

<i>Pina-D1a</i>	MKALFLIGL	LALVASTAFA	QYSEVGSY-	DVAGGGGAQQ	CPVE-TKLNS	CRNYLLDRS	TMKDFPVTWR	WKWWKGGGQ
<i>Pinb-D1a</i>	MKTLFLLAL	LALVASTTFA	QYSEVGGWYN	EVGGGGGSQQ	CPQERPKLSS	CKDYVMERC	TMKDFPVTWP	-TKWWKGGGE
<i>HOI-A</i>	MKALFLMGL	LALVASAAFA	QYGEVGSYE	GGAGGGGAQQ	CPVG-TKLDS	CRNYLLDRCT	TMKDFPVTWR	WWTWWKGGGE
<i>HOI-B1</i>	MKTLFLLAI	LALVASTTFA	QYS-VGGGYN	DVGGGGGSQQ	CPQERP NLGS	CKDYVMERC	TMKDFPLTWP	-TKWWKGGGE
<i>HOI-B2</i>	MKTLFLLAL	LALVASTTSA	QYS-VGGGYN	DVGGGGGSQQ	CPQERP NLGS	CKDYVMERC	TMKDFPVTWP	-TKWWKGGGE
<i>Sec-B</i>	MKTLFLLAL	LALVASTTFA	QISEVGGWIN	EVGGGGGAQQ	CPLEPKLSS	CM DYVMERC	TMKDFPVTWP	TRWWKGGGE

<i>PinA-D1a</i>	-ELLGEC	SR	LGQMPPO	RC	NIIQGSIQD	LGGIFGFQD	RASKVIEAK	NLPPRC	NQGP	PCNIPGTIGY	YW
<i>Pinb-D1a</i>	HEVREKCC	KQ	LSQIAPQ	RC	DSIRRVIQGR	LGGFLGIWRG	EVFKQLQRAQ	SLPSK	NMGA	DCKFPS--GY	YW
<i>HOI-A</i>	-ELLHDC	CSQ	LSQMPPO	RC	NIIQGSIQD	LGGFFGFQD	RTVKVIQAAK	NLPPRC	NQGP	ACNIPSTTGY	YW
<i>HOI-B1</i>	QEVREKCC	QO	LSQIAPQ	RC	DAIRGVIQK	LGGIFGIGG	DVFKQIQRAQ	ILPSK	NMGA	DCKFPS--GY	YW
<i>HOI-B2</i>	HEVREKCC	QO	LSQIAPH	RC	DAIRGVIQK	LGGIFGIGG	AVFKQIQRAQ	ILPSK	NMGV	DCKFPS--GY	YW
<i>Sec-B</i>	HEVREKCC	QO	LSQIAPQ	RC	DSIRGMIQSK	FGGFFGIWRG	DVFKQTQRAQ	SLPSK	NMGA	DCKFPRGYW	

Figura 4: Sequenza aminoacidica delle proteine Pin-A, Pin-B, Hoi-A, Hoi-B1, Hoi-B2 e Sec-B. I residui di cisteina sono evidenziati in rosso.

Il punto isoelettrico delle due puroindoline è quasi identico, $pI = 10,5$ per Pin-A e $pI = 10,7$ per Pin-B.

Le puroindoline vengono sintetizzate come precursori di una molecola più grande che comprende i propeptidi C ed N-terminali. Entrambe le puroindoline contengono un peptide N-terminale di 29-30 amminoacidi (aa) che viene tagliato durante la maturazione della proteina. Questo peptide contiene nella sua parte iniziale un *leader-peptide* di 19 aa. Nelle puroindoline mature manca anche una breve sequenza di 3 o 5 aa localizzati nella regione C-terminale. Il prodotto di trascrizione del

gene codificante per Pin-A contiene una sequenza non tradotta al 5' (5'-UTR) di 42 nucleotidi seguita da un *open reading frame* (OPR) ininterrotto di 444 nucleotidi ed una sequenza non tradotta al 3' (3'UTR) di 145 nucleotidi. La trascrizione inizia al primo ATG dando origine ad un OPR che codifica per un polipeptide di 149 amminoacidi con una massa molecolare teorica di 16.387 Da. A seconda della lunghezza del peptide C-terminale eliminato nella proteina matura, la massa molecolare di Pin-A varia da 12.759 Da (115 residui) a 12.965 (117 residui). Il prodotto di trascrizione del gene codificante per Pin-B è lungo 598 nucleotidi e contiene un 5'-UTR di 16 nucleotidi seguito da un OPR ininterrotto di 444 nucleotidi ed una sequenza 3'-UTR di 119 nucleotidi. L'OPR codifica per un polipeptide di 148 aa con una massa molecolare teorica di 16.794 Da. A seconda del processamento dell'estremità C-terminale la Pin-B matura ha un peso molecolare di 12.945 Da (114 residui) o 13.125 Da (116 aa) (Gautier *et al.* 1994).

Quando determinato tramite SDS-PAGE il peso molecolare delle puroindoline risulta di 16 KDa a causa dell'alto rapporto massa-carica che modifica la loro migrazione.

Nelle varietà a tessitura soffice di *Triticum aestivum* l'm-RNA codificante per Pin-A inizia ad accumularsi tra l'ottavo ed il dodicesimo giorno dopo l'antesi, aumenta tra il quindicesimo ed il diciottesimo giorno e raggiunge il picco tra il ventiseiesimo ed il trentesimo giorno per declinare rapidamente e scomparire del tutto al quarantesimo giorno. La stessa cinetica di accumulo si rileva per Pin-B (Turnbull *et al.* 2003; Gautier *et al.* 1994). Comparando i livelli di Pin-A e Pin-B a diversi stadi della maturazione della cariosside in cultivar di grano tenero *super-soft* (SKCS inferiore a 14), *soft* e *medium hard* si è potuto osservare che nelle varietà a cariosside *medium hard* il rapporto Pin-B/Pin-A è fortemente spostato a favore della Pin-A (1:5) probabilmente a causa della minore affinità per gli amiloplasti della Pin-B “di tipo serina”, tipica di questi frumenti, determinando il valore più basso di SKCS di queste varietà (Gazza *et al.* 2006). Si riscontra comunque che il livello del trascritto di Pin-A è sempre più alto rispetto a quello di Pin-B (Gautier *et al.* 1994), salvo nei frumenti *super-soft* in cui avviene l'inverso (Gazza *et al.* 2006).

Oltre alla scoperta di nuovi alleli ai loci *Pina-D1* e *Pinb-D1* in diversi taxa, alcuni lavori hanno identificato l'esistenza di duplicazioni di geni correlati alle puroindoline. Questi includono *Pinb-relic* e *Pseudo-Pinb* (Chantret *et al.*, 2005.; Pogna *et al.*, 2002; Gazza *et al.*, 2006a)

Più recentemente Wilkinson *et al.* (2008) hanno segnalato nel grano esaploide tre nuovi geni con sequenza simile alle puroindoline. I geni condividono una stretta omologia con gli alleli al locus *Pinb-D1* e quindi sono stati designati come “varianti” *Pinb*. La variante 1 di *Pinb* è stata mappata mediante analisi linkage sul braccio lungo del cromosoma 7A, ed il locus è stato definito come *Pinb-A2*. Recentemente (Chen *et al.*, 2009) è stata confermata l'esistenza di tre varianti omeologhe, in cui la variante 1 (*Pinb-2v1*) si trova sul braccio lungo del cromosoma 7D (7DL), la variante 2

(Pinb-2v2) si trova sul 7BL, e la variante 3 sul 7B; la variante 3 può essere allelica alla variante 2. Inoltre nello stesso lavoro è riportata la scoperta di una quarta variante (Pinb-2v4) posizionata sul braccio lungo del cromosoma 7A (7AL).

In termini di similarità Pinb-2v1 e Pinb-2v4 esibiscono un alto livello (95%) di omologia di sequenza. Tuttavia, tutte e quattro le varianti Pinb sono almeno per il 91% omologhe tra di loro ed hanno 72-73% di omologia con *Pinb-D1a* (Tabella 1).

Varianti	<i>Pinb-D1a</i>	Pinb-2v1	Pinb-2v2	Pinb-2v3
Pinb-2v1	73	-	-	-
Pinb-2v2	72	92	-	-
Pinb-2v3	73	91	93	-
Pinb-2v4	73	95	94	92

Tabella 1: Somiglianza (%) di sequenza tra i geni *Pinb-2*

Il confronto a livello aminoacidico mostra che le varianti di *Pinb-2* condividono caratteristiche notevoli con *Pinb-D1a*. In particolare il dominio di 10 cisteine è perfettamente conservato tra le quattro sequenze delle proteine Pin-B2 e Pin-B. Una delle differenze più importanti sta nel motivo del triptofano che è WRWWKWWK in Pin-A, WPTKWWK in Pin-B, e KWWK nelle quattro varianti PIN-B2.

Non ci sono evidenze sperimentali che le puroindoline B2 si accumulino sui granuli d'amido e modulino la tessitura delle cariossidi. Al contrario, è stato dimostrato che l'espressione dei geni *Pinb-2* è limitata ai primi giorni dello sviluppo delle cariossidi ed avviene con una efficienza almeno 10 volte inferiore rispetto ai geni puroindolinici *Pina-D1* e *Pinb-D1* (Wilkinson *et al.* 2008).

1.7.4 Polimorfismo genetico e variazioni nella tessitura della cariosside

Le proteine Pin-A e Pin-B funzionano insieme controllando la sofficità della cariosside.

L' espressione di entrambe è richiesta per la tessitura soffice dato che una mutazione in una delle due proteine può modificare la tessitura dell'endosperma.

Sono noti molti alleli per ciascuno dei due geni che codificano per le puroindoline (Giroux e Morris, 1997, 1998; Lillemo e Morris, 2000; Morris *et al.*, 2001).

In particolare *Pina-D1* presenta vari alleli tra i quali i più importanti e diffusi sono *Pina-D1a* (selvatico) e *Pina-D1b* (mutante nullo). Inoltre l'allele nullo *Pina-D1c* differisce da quello selvatico

per la delezione di un nucleotide in posizione 265 che determina la comparsa di un codone di stop in posizione 361 (Gazza *et al.* 2005).

Il gene *Pinb-D1* ha oltre 20 forme alleliche, tra le quali le più importanti e comuni sono *Pinb-D1a* (selvatico), *Pinb-D1b*, *Pinb-D1c* e *Pinb-D1d* (mutanti puntiformi con una sostituzione amminoacidica) e *Pinb-D1e*, *Pinb-D1f* e *Pinb-D1g* (mutanti nulli troncati per mutazione puntiforme e comparsa di un codone non-senso).

Il mutante nullo per Pin-A (allele *Pina-D1b*) è associato a valori di SKCS superiori a 70 (tessitura *hard*), mentre le mutazioni puntiformi nella sequenza codificante di Pin-B sono associate a valori di SKCS compresi tra 55 e 70, tipici delle varietà *medium hard* (Giroux e Morris, 1998; Lillemo e Morris, 2000; Corona *et al.*, 2001). Una forma particolare di Pin-B presente nella maggior parte dei grani teneri a tessitura moderatamente *hard*, consiste in una sostituzione amminoacidica in posizione 46 che determina un cambiamento di sequenza da glicina a serina e la modifica della struttura secondaria e terziaria, con riduzione dell'idrofobicità e della forza di legame con i lipidi. La sostituzione avviene al confine con una regione critica della molecola, il dominio ricco di triptofano, implicato nel legame con la membrana dell'amiloplasto. La sostituzione amminoacidica ed il conseguente cambiamento nella conformazione della proteina sembrano determinare una minore forza di adesione della Pin-B al granulo d'amido.

Alcune varietà di grano tenero con granella moderatamente dura sono caratterizzate dalla presenza di una variante di Pin-B contenente l'aminoacido arginina al posto dell'aminoacido triptofano in posizione 44 (allele *Pinb-D1d*) o l'aminoacido prolina al posto della leucina in posizione 60 (allele *Pinb-D1c*) con alterazione della conformazione ad α -elica della Pin-B (Morris e Lillemo, 1999; Corona *et al.*, 2001).

Le mutazioni che determinano la durezza della cariosside sembrano verificarsi indipendentemente l'una dall'altra; alcune possono essere rintracciate in specifiche aree geografiche e determinano un grande cambiamento nella tessitura dell'endosperma del grano tenero, mentre altre possono dare piccole variazioni nel grado di durezza.

Per verificare la capacità delle puroindoline di modificare la tessitura della cariosside, i geni *Pina-D1a* e *Pinb-D1a* sotto il controllo del promotore dell'ubiquitina di mais sono stati introdotti mediante transgenesi in riso (*Oryza sativa* L.), cereale caratterizzato da cariosside a tessitura *hard*. Nel riso transgenico l'espressione dei geni suddetti riduce la durezza della cariosside (riduzione della pressione richiesta per la molitura delle cariossidi tra il 15.2% ed il 27.3% rispetto al controllo) e il grado di danneggiamento dell'amido (-10%) (Krishnamurthy e Giroux, 2001).

Secondo Oda e Schofield (1997), i grani teneri *hard* e *soft* conterrebbero nell'endosperma maturo approssimativamente la stessa quantità di puroindolina totale, ma differiscono nella quantità di

friabilina associata all'amido, che è alta nei grani soffici e bassa in quelli *hard*. In realtà, risulta che le varietà a tessitura moderatamente *hard* contenenti gli alleli *Pinb-D1b* o *Pinb-D1d* in presenza dell'allele wild-type *Pina-D1a* contengono quantità molto ridotte di Pin-B e quantità di Pin-A leggermente inferiori a quelle presenti nelle varietà a tessitura soffice (composizione allelica *Pina-D1a* + *Pinb-D1a*). Le varietà a tessitura dura che contengono l'allele nullo *Pina-D1b* o *Pina-D1c* non contengono nell'endosperma maturo la puroindolina A e mostrano solo tracce della puroindolina B (Gazza *et al.*, 2007).

L'associazione delle puroindoline con il granulo d'amido sembra creare una linea preferenziale di rottura durante la macinazione della cariosside. In questa situazione, la frantumazione del chicco avviene prevalentemente lungo la superficie dei granuli d'amido e non all'interno di essi. Pertanto nelle farine ottenute da granella soffice contenente entrambe le puroindoline strettamente legate ai granuli d'amido, questi ultimi sono integri o poco danneggiati. D'altra parte la scarsa presenza di puroindoline sulla superficie dei granuli d'amido delle cariossidi a tessitura *hard* contenenti la Pin-B di tipo "serina" o l'allele nullo *Pina-D1b* (o *Pina-D1c*) non è in grado di proteggere i granuli stessi dalla rottura durante le operazioni di macinazione.

La composizione in puroindoline consente di assegnare le varietà di grano tenero alle diverse classi di durezza con il test SKCS. In particolare, l'assenza di Pin-A indica un elevato grado di durezza (SKCS = 70-90), mentre la presenza della variante selvatica (o "glicina") della Pin-B in presenza di Pin-A selvatica contraddistingue senza eccezioni le varietà a cariosside soffice con valori medi di SKCS non superiori a 45. Le varietà con cariossidi a durezza intermedia, SKCS = 55-70, possiedono generalmente le varianti "serina" o "arginina" della Pin-B.

La variazione della tessitura dell'endosperma è probabilmente dovuta alla diversa affinità del dominio ricco di triptofano delle puroindoline per i lipidi polari della membrana degli amiloplasti. Inoltre in varietà transgeniche di grano tenero contenenti copie aggiuntive di Pin-B, si individua un aumento della quantità totale di puroindoline legate all'amido (da 2.6 a 4.8) e si ottiene una diminuzione della durezza della cariosside maggiore di quella ottenibile aumentando solo l'espressione del gene codificante per Pin-A. Questo dimostra che l'adesione alla membrana dell'amiloplasto comporta una interazione tra Pin-A e Pin-B (Corona *et al.*, 2001; Swan *et al.*, 2006).

1.7.5 Le puroindoline in altre specie cerealicole

Lo studio delle puroindoline ha interessato anche altre specie di frumento ed altri cereali appartenenti alla famiglia delle *Poaceae* (Gautier *et al.*, 2000; Lillemo *et al.*, 2002; Massa *et al.*, 2004; Gazza *et al.*, 2006a). Geni codificanti per le puroindoline sono stati identificati nelle specie

diploidi di frumento con genoma A, B o D (*T. urartu*, *T. monococcum*, *T. speltoides* e *Ae. tauschii*) o con altri genomi (*T. searsii*, *T. longissimum*, *T. dichasians*), mentre nelle specie tetraploidi contenenti i genomi AB (*T. turgidum* ssp *dicoccoides*, *T. turgidum* ssp *dicoccum* e *T. turgidum* spp. *durum*) o AG (*T. timopheevi*) i geni puroindolinici sono assenti a seguito di delezioni probabilmente avvenute subito dopo la formazione delle specie tetraploidi stesse (Gautier *et al.*, 2000). L'eliminazione dei geni codificanti per le puroindoline dai genomi A e B in frumento duro e frumento tenero è probabilmente dovuta a eventi di ricombinazione in cui sono stati coinvolti elementi trasponibili (Devos *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2004; Chantret *et al.*, 2005).

Nel genoma di *Aegilops tauschii*, la specie donatrice del genoma D di frumento tenero, sono state inoltre trovate due copie addizionali degenerate del gene codificante per Pin-B (*PseudoPinb* e *Pinb-relic*) (Chantret *et al.*, 2005). Il gene *Pinb-relic* si trova anche in *Triticum monococcum* (frumento diploide con genoma A) e nel cromosoma 5D di *Triticum aestivum*, a dimostrazione che la duplicazione di *Pinb-relic* è avvenuta prima della divergenza dei genomi A e D.

Sequenze codificanti per proteine omologhe alle puroindoline sono state osservate in orzo (*Hordeum vulgare*), avena (*Avena sativa*) e segale (*Secale cereale*), mentre non sono state identificate in riso (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum vulgare*) e mais (*Zea mais*) (Gautier *et al.*, 2000; Darlington *et al.*, 2001). In segale i geni codificanti per le puroindoline sono denominati *Pina-R1* e *Pinb-R1*, mentre in orzo sono denominati *Hoi-A*, *Hoi-B1* e *Hoi-B2* (Gautier *et al.*, 2000; Darlington *et al.*, 2001). Questi ultimi sono presenti nell'estremità distale del braccio corto del cromosoma 5H di orzo, cromosoma omeologo del cromosoma 5D di grano. È interessante notare che in orzo esistono due geni (*Hoi-B1* e *Hoi-B2*) che codificano per una proteina simile a Pin-B.

L'assenza dei geni puroindolinici in riso, mais e sorgo è accompagnata da una tessitura “hard” delle cariossidi. E' interessante notare che le cariossidi di riso transgenico in cui sono stati inseriti i geni puroindolinici di grano hanno manifestato una forte riduzione della durezza (Krishnamurthy e Giroux, 2001).

In letteratura sono disponibili informazioni sulle puroindoline legate all'amido di grano monococco (*T. monococcum*) (Pogna *et al.*, 2002) dalle quali risulta che le accessioni di questa specie hanno valori medi di SKCS di circa -5, molto più bassi di quelli di grano tenero a tessitura *soft*. Questa particolare sofficità della cariosside comporta una maggiore fragilità della stessa al momento della mietitura e trebbiatura, con la conseguenza negativa di un'elevata frequenza di cariossidi spezzate, fatto che diminuisce la germinabilità del seme ed aumenta il rischio di attacchi fungini durante l'immagazzinamento.

Il frazionamento elettroforetico A-PAGE delle proteine legate ai granuli d'amido di oltre un centinaio di accessioni di grano monococco ha messo in evidenza una banda (*b2*) con intensità

paragonabile a quella delle puroindoline A e B e mobilità intermedia rispetto a quelle delle puroindoline stesse. Una banda con queste caratteristiche non è mai stata riscontrata nelle centinaia di varietà di grano tenero finora analizzate (Corona *et al.*, 2001a; Pogna *et al.*, 2002; Gazza *et al.*, 2006). Il polipeptide *b2* è meno basico delle puroindoline, come dimostra anche il suo spostamento elettroforetico verso l'anodo quando le proteine legate all'amido di monococco sono trasferite in tampone a pH 11 su membrana PVDF dopo separazione A-PAGE. Il sequenziamento N-terminale della banda *b2* è risultato nell'esamero SVGDQC che mostra un'alta omologia di sequenza con l'estremità N-terminale SVGGQC dell'inibitore RTI (Rye Trypsin Inhibitor) della tripsina di segale (Lyons *et al.*, 1987). Pertanto, la banda *b2* di grano monococco è stata denominata ETI (Einkorn Trypsin Inhibitor). La sequenza parziale di 80 aminoacidi della proteina ETI matura ottenuta tramite MALDI-Tof-Tof, è risultata identica alla proteina RTI (Lyons *et al.*, 1987) salvo due sostituzioni aminoacidiche. D'altra parte, il sequenziamento del prodotto di amplificazione RACE verso l'estremità 3' utilizzando una serie di sei primer costruiti sulla sequenza N-terminale SVGDQC ha dimostrato la presenza di altre due variazioni aminoacidiche (da Q a H in posizione 101 e da P a H in posizione 106) della RTI rispetto alla ETI. Come altri inibitori della tripsina, ad esempio TI CMe di orzo, MTI di mais e RBI di miglio indiano (Indian finger millet, *E. coracana*) (Odani *et al.*, 1983; Mahoney *et al.* 1984; Campos e Richardson, 1983), ETI presenta i 10 residui C (cisteina) tipici della famiglia 2S, a cui appartengono anche le puroindoline, gli ns-LTP (Greenwell e Schofield, 1989; Jolly *et al.*, 1993; Gautier *et al.*, 1994; Oda, 1994; Morris *et al.*, 1994; Oda e Schofield, 1997) e gli inibitori della α -amilasi (Lazaro *et al.*, 1988; Maeda *et al.*, 1985; Wang *et al.*, 2006; Garcia-Maroto *et al.*, 1990). Inoltre presenta i residui R (arginina) e L (leucina) in posizione 34 e 35 caratteristici del sito attivo degli inibitori della tripsina identificati in segale, mais, orzo e miglio indiano (Odani *et al.*, 1983; Mahoney *et al.*, 1984; Campos e Richardson, 1983). Manca invece della regione ricca in triptofano tipica delle puroindoline, pur presentando alcuni domini altamente idrofobici (VPgLAMP, LLAIPA, oppure AAtLVAP) che potrebbero determinare una certa affinità per i lipidi della membrana amiloplastica. Al pari delle altre Trypsin Inhibitor vegetali (presenti non solo nei cereali suddetti ma anche in solanacee, leguminose etc.), la proteina ETI potrebbe essere coinvolta nei meccanismi di difesa della pianta contro attacchi di insetti e microrganismi, soprattutto nel distretto amilaceo della cariosside, come dimostrerebbe la presenza in essa del sito inibitorio anti-tripsina. D'altra parte, per il suo alto contenuto in cisteina (10 residui), lisina (11 residui) e treonina (7), la proteina ETI costituisce una importante riserva di aminoacidi essenziali, particolarmente scarsi nelle altre proteine dell'endosperma.

La proteina ETI si presenta sotto due forme elettroforetiche verosimilmente alleliche, di cui una molto diffusa (*wild-type*, *ETIa*) e l'altra piuttosto rara (*ETIb*).

È interessante notare che le dieci accessioni di grano monococco con la variante rara *ETIb* presentano cariossidi a tessitura più soffice (valore medio di SKCS pari a -7,1) rispetto a quelle con la versione *wild-type ETIa*. Questa osservazione richiede tuttavia una conferma sperimentale in quanto la differenza di sofficietà non è risultata statisticamente significativa a causa dello scarso numero di accessioni contenenti la *ETIb* e dell'elevata deviazione standard dei singoli dati. D'altra parte, sebbene la proteina ETI sia stata estratta da una sospensione di granuli d'amido, mancano evidenze di un legame specifico di tale proteina con i granuli d'amido stessi. Qualora questo legame esistesse, implicherebbe un meccanismo analogo a quello delle puroindoline, nella modulazione della tessitura della cariosside.

1.7.6 Puroindoline e qualità tecnologica delle farine

Per le loro proprietà lipofile, le puroindoline manifestano effetti positivi sulla tessitura della mollica e sul volume del pane. Le puroindoline inducono inoltre un aumento della resa in farina durante la macinazione, un aumento dell'assorbimento idrico delle farine, una crescita della tenacità dell'impasto, probabilmente dovuto ad un maggior grado di interazione proteina-proteina che ha effetto anche sull'interazione tra puroindoline e lipidi (Dubreil *et al.*, 1998).

La ricostituzione di farine con l'aggiunta di puroindolina A ha dimostrato un effetto positivo sul volume del pane e sul calibro della mollica (Dubreil *et al.*, 1998); aggiungendo lo 0.1% di puroindoline si ottiene un impatto significativo sulle proprietà reologiche delle farine testate. L'estensibilità diminuisce da 33.8 al 30%, la forza dell'impasto viene ridotta da 8 a 7.4% e la tenacità (resistenza alla deformazione) subisce un aumento dal 2 al 16%. La trasformazione di linee di grano duro con i geni delle puroindoline confermano l'entità dei cambiamenti reologici dovuti alla presenza di queste proteine (Hogg *et al.*, 2005).

1.7.7 Altri ruoli fisiologici delle puroindoline

Le piante contengono numerosi peptidi antimicrobici coinvolti nella protezione della pianta dai patogeni. La maggior parte di questi esercitano la propria attività sulle membrane batteriche formando dei canali ionici o dei pori, dissolvendo la membrana come un detergente, o inducendo difetti nella membrana stessa.

E' stato trovato inoltre che molti fattori, come la lunghezza del peptide, la sequenza aminoacidica, la carica, l'idrofobicità e l'anfipaticità, possono modificare drammaticamente la potenzialità e lo spettro d'azione dei peptidi antimicrobici (Dubreil *et al.*, 1998). Comprendere questi fattori può aiutare a sviluppare nuovi peptidi con aumentata potenza d'azione e specificità.

L'attività antimicrobica in vitro delle puroindoline Pin-A e Pin-B, contro diversi patogeni fungini, è stata dimostrata da Dubreil *et al.* (1998). Le puroindoline sono strutturalmente correlate ad altre proteine della pianta con proprietà antimicrobiche come le tionine e le nsLTPs (Broekaert *et al.*, 1997). Inoltre Pin-A e Pin-B presentano una sequenza assente in altre proteine antimicrobiche delle piante cioè un dominio idrofobico ricco di triptofano con capacità di legare i lipidi (Dubreil *et al.* 1998). In particolare, un frammento di 13-residui aminoacidici (FPVTWRWWKWWKG-NH₂) presente nella puroindolina A e denominato puroA, mostra attività sia contro i batteri gram-positivi che i gram-negativi (Jing *et al.*, 2003). Questo suggerisce che puroA possa essere il dominio battericida della puroindolina A interagendo fortemente con le cariche negative delle vescicole fosfolipidiche ed inducendone il disgregamento. L'effetto microbica di puroA potrebbe essere dovuto all'interazione con le membrane batteriche. Questo dominio si localizza all'interfaccia con la membrana, probabilmente grazie all'alto contenuto di residui di triptofano che hanno un'alta propensione a distribuirsi all'interno della regione lipidica della membrana stessa. La penetrazione di questi residui di triptofano nella carica negativa delle vescicole fosfolipidiche fa sì che la membrana batterica si disassembli.

Dalle piante transgeniche di riso che esprimono costitutivamente i geni codificanti per Pin-A e Pin-bB è stato ottenuto un estratto di puroindoline in grado di ridurre la crescita in vitro di *Magnaporthe grisea* (inibizione della crescita del 35%) e *Rhizoctonia solani* (inibizione della crescita del 40%), due dei maggiori patogeni fungini del riso (Krishnamurthy, *et al.*, 2001). Il riso transgenico esprimente Pin-A e/o Pin-B inoltre mostra un significativo aumento della tolleranza a *M. grisea*. Si pensa che l'attività antimicrobica delle puroindoline intatte sia dovuta all'interazione con le membrane cellulari grazie all'abilità di legare fortemente i lipidi polari.

E' stato inoltre scoperto che la puroindolina A *in vitro* determina tossicità sulle cellule dei vertebrati (Mattei *et al.*, 1998) causando la dissipazione del gradiente di concentrazione ionica essenziali per il mantenimento dell'omeostasi cellulare. Quindi, la tossicità delle puroindoline può essere relazionata alla capacità di permeabilizzare le membrane grazie alla formazione di canali ionici.

Il gene per la puroindolina B ed il gene di resistenza contro la *Venturia inaequalis* sono stati usati per trasformare piante di *Malus domestica*; è stata osservata una correlazione negativa significativa tra il contenuto di Pin-B (minima concentrazione inibitrice, MIC, sotto i 100 µgml⁻¹) e la suscettibilità alla malattia nelle linee transgeniche dopo l'inoculo del patogeno (Faize *et al.* 2004). Questo è il primo risultato di resistenza parziale ai patogeni di piante legnose indotta tramite l'espressione di puroindoline.

1.7.8 Modificazioni della tessitura della cariossida di grano duro e selezione assistita con marcatori molecolari (MAS)

Sono stati portati avanti diversi approcci per l'introggressione dei geni puroindolinici all'interno di varietà di grano duro al fine di osservarne il comportamento in un diverso contesto genetico e verificarne le possibili attività. Due sono le metodiche utili a questo scopo:

- transgenesi con sistema biolistico (Giroux e Krishnamurthy, 2001).
- approccio basato sull'incrocio tra varietà sfruttando la ricombinazione tra cromosomi omologhi o ingegneria cromosomica.

Per mettere in atto la seconda opzione è necessario che una delle due varietà utilizzate per l'incrocio presenti una mutazione al locus *Ph1* presente nella regione centrale del braccio lungo del cromosoma 5B e responsabile dell'esclusivo appaiamento tra cromosomi omologhi.

In assenza di *Ph1*, nei nuclei premeiotici si può verificare l'associazione somatica tra cromosomi omologhi ed omeologhi dei genomi A, B e D. Sono noti tre diversi mutanti del locus *Ph1*:

- *ph1b*, una delezione che quando omozigote induce appaiamento omeologo sia nel grano tenero che negli ibridi interspecifici;
- *ph1c*, una delezione che comprende il locus *Ph* isolata da Giorgi (1978) nella varietà di grano duro Cappelli;
- una duplicazione di un segmento identico a quello deleto nel mutante *ph1c* e che contiene due loci *Ph1*.

Non si conosce con certezza il meccanismo di azione del locus *Ph1* anche se alcune evidenze suggeriscono che possa alterare la struttura delle subunità microtubulari ed interferire così nel movimento dei cromosomi omologhi ed omeologhi l'uno verso l'altro nelle mitosi premeiotiche e durante l'interfase premeiotica (Bianchi, Lorenzoni e Salamini, 1989).

L'approccio che sfrutta l'azione della mutazione *ph1c* del locus *Ph1* è stato scelto per trasferire i geni puroindolinici in grano duro da Gazza *et al.* (2002). In particolare è stata utilizzata la linea tetraploide di sostituzione cromosomica Langdon 5D(5B) in cui il cromosoma 5B è sostituito dal cromosoma 5D proveniente dalla varietà di grano tenero Chinese Spring a tessitura *soft*. Questa linea di sostituzione possiede 29 cromosomi invece dei 28 attesi in quanto oltre a due cromosomi 5A e due cromosomi 5D contiene anche un cromosoma 5B che mantiene la fertilità della linea ed impedisce l'appaiamento tra cromosomi omeologhi. Questa linea è stata incrociata come parentale maschile (impollinatore) con la linea mutata "Cappelli *ph1c*" (denominata Cappelli mutante) al fine di ottenere una progenie F1 con $2n = 28$ e due cromosomi 5A, un cromosoma 5B e un cromosoma 5D, sfruttando il fatto che il cromosoma 5B soprannumerario presente in Langdon 5D(5B) non si trasmette per via maschile per ragioni di "competizione gametofitica". Nella progenie F1 la meiosi

in assenza del locus *Ph1* consente l'appaiamento e quindi la ricombinazione tra il cromosoma 5B (proveniente da Cappelli Mutante) e il cromosoma 5D fornito dalla linea di sostituzione. In effetti nella progenie F2 sono state individuate piante positive per la presenza delle puroindoline A e B ma prive di un gene marcatore, *Ibf-D1* (Iodine Binding Factor), localizzato nel braccio lungo del cromosoma 5D. E' atteso che gran parte degli individui con questo fenotipo siano frutto di ricombinazione allosindetica tra il cromosoma 5D e 5B, salvo rari casi di delezione o mutazione a carico del gene marcatore.

La presenza o assenza dei geni introdotti per incrocio è stata visualizzata attraverso una tecnologia che permette di effettuare una selezione assistita dall'utilizzo di marcatori molecolari (MAS - **Marker Assisted Selection**). La MAS è una delle applicazioni della genetica molecolare capace di fornire applicazioni pratiche nel breve periodo, in quanto facilita e velocizza l'introduzione di caratteri agronomicamente/tecnologicamente utili durante il processo di breeding. Si basa sulla identificazione di marcatori molecolari di facile utilizzo (basati sulla PCR) associati geneticamente a caratteri utili e sulla loro utilizzazione per effettuare una selezione indiretta del carattere. La selezione in questo caso non si basa, quindi, sul fenotipo (valutazione che talvolta risulta dispendiosa, richiede tempi lunghi ed è talora incerta) ma sul genotipo del marcatore molecolare associato al carattere; di conseguenza la valutazione del genotipo è oggettiva, veloce e non influenzata da fattori ambientali.

Le piante così selezionate sono state autofecondate per 2 generazioni. L'analisi con il metodo SKCS 4100 ha poi permesso di identificare 11 piante F4 con un valore medio di 33, tipico di frumenti a tessitura soffice. La progenie da autofecondazione di queste piante, verosimilmente omozigoti per la presenza dei loci *Pina-D1* e *Pinb-D1*, ha dato origine a 11 Linee Ricombinanti Autofecondate (LRA), ciascuna delle quali è stata incrociata con la varietà commerciale di grano duro Colosseo allo scopo di reintrodurre il gene *Ph1* e altri geni con effetto positivo sulle proprietà viscoelastiche del glutine, operazione necessaria considerata la scarsa qualità tecnologica delle linee parentali Cappelli Mutante e Lagdon 5D(5B).

Le progenie F2 ottenute da questi incroci sono state analizzate per la presenza dei loci *Pina-D1* e *Pinb-D1* tramite amplificazione con PCR usando primers specifici per le puroindoline.

La presente tesi utilizza come materiale di studio le progenie F6, F7 e F8 dell'incrocio tra Colosseo e le 11 LRA succitate. Queste linee (LRA) potrebbero essere utilizzate per la creazione di genotipi di grano tenero in cui il numero dei geni puroindolinici è stato raddoppiato per entrambi i geni o per uno di questi due.

1.8 Il processo di trasformazione dei cereali

I cereali vengono utilizzati nell'alimentazione umana dopo la trasformazione in sfarinati (semola per frumento duro e farina per frumento tenero) da cui poi si ottengono i prodotti finiti. Prima tappa della trasformazione del grano è la macinazione. Questa operazione prevede un pre-trattamento della cariosside detto condizionamento che consiste in un'umidificazione della granella; è un'operazione molto importante perché consente di ridurre la friabilità che le parti tegumentali presentano allo stato secco, evitandone una eccessiva frammentazione, e migliora la friabilità della mandorla.

Dopo essere stato umidificato, il grano viene sottoposto alla macinazione vera e propria che consente di:

- separare le diverse parti anatomiche che compongono la cariosside (endosperma, tegumenti, ecc;
- frammentare l'endosperma in particelle più o meno fini.

La macinazione consiste essenzialmente:

- Operazioni di rottura, che consentono, mediante il passaggio attraverso rulli rigati, la separazione della mandorla farinosa dalla parte corticale della cariosside senza polverizzare la crusca;
- Operazioni di svestimento, condotto con rulli finemente rigati o lisci al fine di rimuovere le particelle di crusca aderenti ai piccoli frammenti di endosperma;
- Operazioni di rimacina, una macinazione ripetitiva durante la quale la mandorla, essendo friabile, si lascia aprire, frantumare, tritare, schiacciare, mentre le parti corticali, a causa della loro struttura fibrosa, oppongono maggiore resistenza all'azione meccanica dei rulli macinanti e, salvo venire tagliate, restano praticamente integre.

Il chicco viene così trasformato in semole o farine e cruscanti attraverso una serie di passaggi di macinazione parziale, ognuno dei quali non può essere considerato a se stante, perché perfeziona i prodotti del passaggio precedente e condiziona quelli dei passaggi successivi.

Dalla macinazione, nel caso del frumento duro, si ottiene come principale prodotto la semola, nel caso del frumento tenero la farina.

1.8.1 La pastificazione

Il principale prodotto finito ottenuto dal frumento duro è la pasta. Il processo di pastificazione consente di trasformare di una massa senza coesione (sfarinato) in un impasto omogeneo, caratterizzato da forma propria (pasta fresca) che può essere stabilizzato con il processo di essiccamento (pasta secca). L'attuale tecnologia di produzione è caratterizzata da un processo industriale continuo, grazie all'impiego 'presse continue', capaci di compiere da sole le prime fasi di lavorazione (dal dosaggio all'estrusione).

Le fasi della pastificazione sono: Dosaggio, Miscelazione, Impastamento, Compressione ed Estrusione, Essiccamento.

Il *dosaggio* e la *miscelazione* consistono nell'aggiunta di acqua ad una determinata quantità di semola fino a che la massa che si ottiene raggiunge circa il 30% di umidità.

Nella fase di *impastamento* si completa l'idratazione della semola che favorisce l'esposizione dei gruppi idrofilici delle proteine e quindi una loro interazione mediante legami di diversa natura (Graveland *et al.*, 1987; Bloksma *et al.*, 1988) dando luogo alla formazione del glutine, il complesso proteico che costituisce l'impalcatura della pasta. L'operazione di impastamento viene nella pressa dove l'impasto viene spinto attraverso una vite senza fine ed estruso dai fori della trafilatura. Questa è costituita da una piastra di bronzo o di acciaio dotata di fori diversi a seconda del formato di pasta desiderato, generalmente ricoperti di teflon.

Il processo di formatura dell'impasto mediante *estrusione* sotto pressione, è sempre accompagnato, dallo sviluppo di notevoli pressioni all'interno della macchina, causate dal passaggio forzato di una massa poco fluida da un orifizio di grande sezione (la campana) ad una sezione molto più ridotta (fori della trafilatura). Il lavoro meccanico eseguito dalla vite, attraverso il contatto forzato delle singole particelle, consente la trasformazione della semola umidificata in un prodotto uniforme, amalgamato e compatto.

La pasta estrusa presenta una struttura compatta con granuli d'amido inglobati nella matrice proteica.

In generale, le proprietà della pasta trafilata rispecchiano le caratteristiche qualitative della semola utilizzata; questo significa che in caso di sfarinati di modesta qualità, il processo di pressione/estrusione può dare luogo a rotture e lacerazioni della maglia proteica dell'impasto con conseguenze negative sul comportamento in cottura del prodotto (Dalbon, 1983; Pagani *et al.*, 1989). Pressioni di estrusione elevate sembrano tuttavia indispensabili per conferire al prodotto la compattezza necessaria affinché la pasta non si sfaldi durante la cottura (Pagani *et al.*, 1989). All'uscita della trafilatura la pasta ha un contenuto di umidità intorno al 30% (pasta fresca); tale condizione, corrisponde a valori di attività dell'acqua (*aw*) vicini a 1 e, se mantenuta, può far insorgere degradazioni enzimatiche o crescite microbiche e fermentazioni incompatibili con una lunga shelf-life.

L'essiccazione rappresenta il punto cruciale del processo di pastificazione in quanto da essa dipendono la conservabilità e le caratteristiche sensoriali e nutrizionali del prodotto finale. Inoltre, essendo la fase più lunga, determina la velocità dell'intera produzione, di conseguenza, la sua economicità. L'essiccamento consente di ridurre il contenuto di umidità dal 30% circa al 12.5%, valore massimo imposto dalla legge italiana, condizione che garantisce una facile conservazione

della pasta secca; di determinare la qualità del prodotto per quanto riguarda il colore, la tenuta di cottura, il sapore e l'integrità nutrizionale; di minimizzare i costi di processo e di materie prime.

Il ciclo di essiccazione può essere per semplicità distinto in più fasi:

- fase di pre-essiccazione o di incartamento;
- fase di essiccazione vera e propria;
- stabilizzazione;
- raffreddamento.

Durante la fase di incartamento si assiste ad una veloce evaporazione dell'acqua dalla superficie del prodotto che viene così 'asciugata' con formazione di una sottile crosta, detta appunto 'carta' (Ceschina, 1907), caratteristica che facilita il mantenimento della forma ottenuta con la transazione. In questa fase può venir allontanato circa il 50% dell'acqua da eliminare nell'intero processo, raggiungendo tassi di umidità nel prodotto pari al 19-17%. La perdita di umidità in questo stadio è molto rapida in quanto l'evaporazione dell'acqua avviene alla stessa velocità con la quale essa si sposta dall'interno del prodotto alla superficie (Paraventi, 1984). Terminato l'incartamento, segue l'essiccazione vera e propria, fase in cui il prodotto presenta una distribuzione di umidità non omogenea; più precisamente la parte esterna è molto più secca (15%) rispetto a quella interna, dove il contenuto di acqua si mantiene pressoché uguale a quello riscontrato al termine dell'estrusione (28-30%). La continua esposizione della pasta al calore ed alla ventilazione provocherebbe fissurazioni nel prodotto secco (bottature) a seguito delle tensioni che si vengono a creare fra le due zone a diversa umidità, pertanto se il prodotto viene sottoposto a "fasi di riposo" in ambiente saturo di umidità (rinvenimento): in questo modo si consente all'acqua di migrare dall'interno del prodotto alla superficie e di distribuirsi in maniera omogenea nel prodotto (Paraventi, 1984) si alternano quindi fasi di essiccazione e di riposo. Solo quando si sarà nuovamente raggiunto l'equilibrio si potrà effettuare una nuova ventilazione, con ulteriore eliminazione di umidità. In questa fase del processo la velocità di essiccamento decresce progressivamente. Al termine dell'essiccazione, la pasta viene raffreddata a temperatura ambiente in modo da consentire il passaggio da condizioni di prodotto plastico a vitreo senza fenomeni di condensa. Tale aspetto è fondamentale al fine di permettere un adeguato confezionamento del prodotto finito.

1.9 Qualità tecnologica dei frumenti

La qualità tecnologica dei cereali considera la predisposizione delle materie prime (granella e sfarinati) a subire processi di trasformazione ottimali e standardizzati; per questo focalizza l'attenzione su variabili come vitrosità, durezza, colore giallo, quantità e qualità delle proteine, umidità, parametri reologici (che descrivono il comportamento viscoelastico degli impasti).

Come già riportato in precedenza, la composizione delle proteine di riserva è il più importante fattore qualitativo del grano.

Damidaux *et al.* (1978) sono stati i primi a trovare una relazione tra la presenza di una gliadina nota come γ -45 e la buona qualità del glutine di grano duro (che si manifesta come buona tenuta alla cottura della pasta) e tra la presenza della gliadina γ -42 e la scadente qualità della pasta. Queste gliadine, separabili facilmente mediante elettroforesi in ambiente acido (A-PAGE), sono forme alleliche codificate dal locus *Gli-B1* nel cromosoma 1B. In realtà è stato dimostrato che queste gliadine sono solo dei marcatori genetici della qualità (Pogna *et al.*, 1990), la quale dipende invece dalle subunità gluteniniche LMW-2 codificate dal locus *Glu-B3* distante solo 1,8 cM da *Gli-B1*.

Successivamente sono state ottenute correlazioni significative tra la presenza di certe subunità HMW o LMW e la qualità panificatoria del grano tenero o del grano duro (Payne *et al.*, 1987; Boggini e Pogna, 1989). In particolare, l'allele *Glu-D1d* che codifica per la coppia di subunità HMW denominata '5+10' è risultato associato ad una elevata elasticità del glutine.

Per ciò che riguarda il grano duro, la variabilità allelica per le subunità HMW è piuttosto limitata rispetto a quella di grano tenero, anche perché mancano o sono rare le proteine codificate dal locus *Glu-A1*. Tuttavia è stato osservato che le subunità 7+8 danno un glutine più forte delle subunità 6+8 e 20 (Pogna *et al.*, 1990) e ciò è in accordo con l'osservazione che le migliori varietà italiane di grano duro contengono queste subunità.

Per ciò che riguarda il grano monococco (*T. monococcum* ssp *monococcum*), le poche ricerche condotte sulla variabilità delle proteine di riserva e sulla loro relazione con la qualità del glutine hanno dimostrato la buona o ottima qualità panificatoria di alcune accessioni di questo grano primitivo e la possibile relazione tra qualità del glutine e assenza o scarsità di alcune ω -gliadine codificate dal locus *Gli-A^m1* (Saponaro *et al.*, 1995).

1.10 Qualità nutrizionale dei frumenti

Il valore nutrizionale associato agli alimenti derivati dai cereali è un elemento oramai consolidato nella nostra cultura ed è sempre più al centro dell'attenzione in programmi di ricerca orientati alla definizione di una corretta e sana alimentazione (Cannella e Piredda, 2006). I cereali rappresentano in generale la fonte primaria di calorie e proteine per una gran parte dell'umanità (Panatta, 1997); tra questi il frumento duro è quello che certamente riveste un ruolo fondamentale nel sistema agroalimentare italiano, non solo dal punto di vista nutrizionale ma anche economico, ambientale e culturale.

Il frumento duro costituisce la principale materia prima sia per la produzione di pasta sia per la preparazione del pane e del couscous nei paesi che si affacciano nel Mediterraneo. In altri Paesi lo

stesso cereale è usato per produrre un'ampia gamma di prodotti e spesso costituisce la principale fonte alimentare (Flagella, 2006).

I costituenti e la struttura stessa della cariosside del grano duro (e più in generale dei cereali), influenzano le caratteristiche tecnologiche e nutrizionali dei relativi prodotti trasformati.

Le tecniche ed i metodi impiegati per lo stoccaggio e la trasformazione condizionano in diversa misura la qualità finale dei prodotti trasformati. Considerando la struttura istologica della cariosside del grano duro si può notare come ogni distretto tissutale è caratterizzato dall'accumulo di particolari nutrienti. In particolare gli zuccheri sono rappresentati prevalentemente nell'endosperma della cariosside; la maggior parte delle proteine è localizzata invece nello strato aleuronico, i lipidi nell'embrione mentre le fibre sono confinate prevalentemente nei tegumenti esterni.

Il monococco da un punto di vista nutrizionale si differenzia dal frumento tenero, dal frumento duro, dal farro e dallo spelta per l'alto contenuto in proteine delle granella, in media intorno al 15-18%, e per l'elevata quantità di antiossidanti quali luteina e i carotenoidi tra cui il β -carotene precursore della vitamina A (contenuto che va da 12.7 a 23 ppm) (Borghi *et al.*, 1996) e i tocoferoli (vitamina E), che sono presenti con livelli 2-6 volte maggiori rispetto agli altri frumenti. Tutto questo conferisce al monococco un alto valore nutrizionale, dietetico e salutistico.

2. SCOPO DELLA TESI

Obiettivo principale di questa tesi di dottorato è stata la caratterizzazione genetica , biochimica e tecnologica di linee di grano duro (*Triticum turgidum* ssp *durum*) contenenti i geni *Pina-D1a* e *Pinb-D1a* del cromosoma 5DS a seguito di ricombinazione allosindetica. In particolare sono presentati e discussi i risultati di analisi condotte sulla presenza ed espressione dei geni puroindolinici mediante amplificazione PCR, e sulla presenza e comportamento delle puroindoline mediante elettroforesi monodimensionale A-PAGE ed immunoelettroforesi “*Western Blotting*” con anticorpi specifici. La struttura dei cromosomi omeologhi 5A e 5B presenti nelle piante contenenti i geni puroindolinici è stata analizzata utilizzando marcatori molecolari SSR (Simple Sequence Repeats o microsatelliti) specifici per le diverse regioni dei suddetti cromosomi. Infine è stata determinata la variazione della tessitura della cariosside nelle linee ricombinanti e la loro composizione in proteine di riserva. Linee di grano duro omozigoti per i geni puroindolinici sono state allevate in parcelle replicate e confrontate con linee sorelle prive di questi geni allo scopo di valutare come alcuni importanti caratteri tecnologici quali durata e consumo energetico della macinazione, resa in farina, granulometria e stato fisico dei granuli d’amido o alcuni parametri alveografici (P,L e W alveografici), farinografici (assorbimento, Peak Time, stabilità, caduta) possano essere modulati dalla tessitura della cariosside in genotipi tetraploidi.

3. MATERIALI E METODI

3.1 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

3.1.1 *Materiale vegetale*

Le piante e le cariossidi utilizzate in questi anni di dottorato appartengono alle progenie F6, F7 e F8 degli incroci tra la varietà commerciale di grano duro Colosseo e 11 RILs (*Recombinant Inbred Lines*) di grano duro contenenti Pin-A e Pin-B (Gazza et al. 2003). Le 11 RILs derivano a loro volta dall'incrocio tra la linea di sostituzione Langdon 5D (5B) contenente il cromosoma 5D del grano tenero Chinese Spring , e la varietà di grano duro “Cappelli mutante” privo del locus Ph1. Le piante sono state coltivate secondo gli standard agronomici nei campi sperimentali dell'Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura di Roma in località Montelibretti (RM).

3.1.2 *Metodi estrattivi*

3.1.2.1 Estrazione dei granuli d'amido

I granuli d'amido sono stati isolati con il metodo descritto da Corona *et al.* (2001a). L' estrazione viene svolta partendo da 10 cariossidi per campione, schiacciate tramite l'uso di pinze, poste in un tubo da 10 ml e sottoposte ad imbibizione con 500 μ l di H₂O distillata per un tempo che va dai 20 ai 30 minuti. In seguito si aggiungono 5 ml di NaCl 0.1 M ad ogni campione e si pestella fino a far diventare la soluzione lattiginosa; questa operazione viene ripetuta tre volte trasferendo la soluzione senza impurità in un nuovo tubo fino ad ottenere un totale di 10 ml per campione.

Si procede quindi con una centrifugazione a 6000 r.p.m. (rivoluzioni per minuto) per 10 min a T.A. (temperatura ambiente); il precipitato (pellet), contenete i granuli d'amido, viene sospeso in 10 ml H₂O distillata; si ripete quindi la centrifugazione e la sospensione del pellet per altre due volte al fine di eliminare il sale presente. Dopo l'ultima centrifugazione, il pellet viene sospeso in 10 ml di metanolo all' 85% in modo da disidratarlo. La soluzione ottenuta è centrifugata nuovamente a 6000 r.p.m. per 10 min. a T.A. ; anche questa operazione viene ripetuta 2 volte. Si lascia quindi il pellet all'aria fino a completa asciugatura.

3.1.2.2 Estrazione delle puroindoline dai granuli d'amido

Vengono pesati 100 mg di granuli d'amido per ogni campione in una provetta da 1,5 ml e vi si aggiunge una soluzione contenente 50% (v/v) (volume/volume) di NaCl (0.1 M) e il 50% di isopropanolo in rapporto 1:6 (p/v) (peso/volume). Quindi si agita e si sonica per qualche secondo; di seguito si lasciano i campioni in forte agitazione per un'ora. Trascorso il tempo i campioni vengono centrifugati a 11000 r.p.m. per 10 min. a T.A. , il supernatante viene trasferito in nuovi tubi, si

aggiungono due volumi di acetone freddo per precipitare le proteine e si invertono le provette. I campioni vengono lasciati a -20°C o/n (overnight = per una notte) .

Successivamente si passa ad una centrifugazione a 11000 r.p.m. per 10 min. a T.A., il supernatante viene eliminato ed il pellet è asciugato all'aria o utilizzando una pompa da vuoto. Una volta essiccato il campione viene sospeso in 30 μl di tampone "sample buffer", tampone contenente volumi uguali di lattato di sodio (8.5mM, pH 3,1) e glicerolo, con l'aggiunta di 0,1% in p/v di pironinaY. Il campione (20-25 μl) viene poi caricato su gel di poliacrilamide per la separazione mediante A-PAGE (vedi oltre).

3.1.2.3 Estrazione delle proteine totali

Una singola cariosside viene frantumata in una provetta tramite l'utilizzo di una pinza e sospesa in rapporto di 1:20 (p/v) in un tampone di estrazione costituito da una soluzione contenente Tris HCl (62 mM, pH 6,8), 2% (p/v) di SDS, 0,01% (p/v) di pironinaY, 10% (v/v) di glicerolo e 5% (v/v) di β -mercaptoetanololo. L'estrazione avviene in forte agitazione per un'ora a T.A. In seguito la provetta viene posta a 80°C per 20 min per completare la riduzione dei ponti disolfuro, si centrifuga a 6000 r.p.m. per 10 min. a T.A, si preleva il sovrinatante (25-30 μl) e lo carica su un gel di poliacrilamide per la separazione elettroforetica mediante SDS-PAGE (vedi oltre).

3.1.2.4 Estrazione delle gliadine

Si procede pesando un seme del campione, lo si schiaccia con una pinza in una provetta, si aggiungono 3 volumi di etanolo al 70 %, e si lascia in estrazione su Vortex per un'ora a T.A. Dopo centrifugazione a 6.000 r.p.m. per 10 min. a T.A si preleva il sovrinatante (20-25 μl) contenente le gliadine. Il campione può essere conservato per circa 1 mese a 4°C .

3.1.2.5 Estrazione del DNA con CTAB

Si triturano circa 250mg di epicotili in N_2 liquido all'interno di una provetta da 1,5 ml, si sospende la polvere ottenuta in 2 ml di tampone CTAB preriscaldato a 65°C (avendo aggiunto precedentemente 10 μl di β -mercaptoetanololo ogni 5 ml di CTAB) trasferendo la soluzione in una provetta Falcon da 15 ml. Si lascia poi il campione in bagno termostato a 60°C per un'ora agitandolo ogni tanto con il vortex. Si aggiungono poi 2 ml di cloroformio-alcol isoamilico (24:1)(v/v), si agita la soluzione e si centrifuga a 6000 r.p.m. per 10 min. a T.A. ottenendo così due fasi all'interno della provetta Falcon. La fase superiore viene trasferita in una nuova provetta e si procede alla precipitazione degli acidi nucleici aggiungendo un volume di isopropanolo freddo, si inverte e si lascia il campione a -20°C o/n o un'ora a -80°C . Successivamente il campione viene

centrifugato a 13.000 r.p.m. per 30 min a 4°C, ottenendo un pellet che viene lavato con etanolo al 70% freddo. Si procede con una centrifugazione a 13.000 r.p.m. per 10 min a 4°C. Il pellet contenente gli acidi nucleici viene fatto asciugare all'aria e sospeso in 100 µl di H₂O distillata sterile.

3.1.2.6 Estrazione del DNA con il metodo "Della Porta"

Si triturano circa 250mg di epicotili in N₂ liquido all'interno di una provetta da 1,5 ml, si sospende la polvere ottenuta in 600 µl di tampone di estrazione (Tris-HCl 1M pH 8,0, EDTA 0.5 M pH 8,0, NaCl 5M) con β-mercaptoetanololo (10 µl ogni 15 ml di tampone di estrazione). Di seguito si aggiungono 120 µl di SDS al 10% preriscaldato a 65°C, si agita e si lascia in bagno termostato a 65°C per 10 min. Si aggiungono poi 200 µl di acetato di potassio 5 M freddo, si agita e si lascia il campione in ghiaccio per 20 min. Dopo centrifugazione a 12.000 r.p.m. per 20 min. a 4°C il supernatante viene trasferito in una nuova provetta alla quale si aggiungono 1,2 volumi di isopropanolo freddo. Dopo inversione la provetta viene lasciata a -20°C o/n.. Il campione viene poi centrifugato a 14.000 r.p.m. per 20 min. a 4°C ed il pellet viene sospeso in una soluzione contenente 700 µl di H₂O distillata sterile, 500 µl di isopropanolo, 75 µl di acetato di sodio 3M. Dopo centrifugazione a 14.000 r.p.m. per 20 min a 4°C. Il pellet viene lavato con 200 µl di etanolo al 70% e sottoposto nuovamente a centrifugazione a 14.000 r.p.m. per 5 min. a 4°C. Il pellet viene asciugato all'aria e successivamente sospeso in 150 µl di H₂O distillata sterile.

3.1.2.7 Estrazione del DNA da gel

Il DNA, amplificato tramite reazione di PCR, a seguito della corsa elettroforetica su gel di agarosio all' 1,8% è stato estratto utilizzando il kit commerciale NucleoSpin[®] (Macherey-Nagel).

3.1.3 Amplificazione tramite PCR da DNA genomico

Circa 150 ng di DNA genomico sono stati utilizzati per le reazioni di amplificazione PCR. Le reazioni sono state effettuate in un volume di 25 µl utilizzando la DNA polimerasi Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen).

Le soluzioni di reazione contenevano il tampone PCR 10x Rxn Buffer (Invitrogen), dNTP (100 µM), 1,25 unità di Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen) e i primers elencati nelle Tabelle 3.1 e 3.2 ad una concentrazione 0.5 pM. Le reazioni termocicliche prevedevano una incubazione di 3 minuti a 94°C e 35 cicli di amplificazione secondo la seguente modalità: 1 min. a 94 °C, 1,5 min. a T_m (Tabelle 2 e 3) e 1,5 min. a 72°C, seguiti da una estensione finale a 72°C per 7

min. I prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio (1.8%), utilizzando il tampone di corsa TAE 1X (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 1 mM pH 8,0).

Gene	Primer senso	Primer antisenso	T_m
<i>Pina-D1a</i> (Pin-A)	T1a 5'-ATGAAGGCCCTCTTCCTCA-3'	T2a 5'-TCACCAGTAATAGCCAATAGTG-3'	58°C
	Int1a 5'-ACAAAGCTAAATTCATG-3'	T2a2 5'-ATCACGCTGAAATCCGAA -3'	48°C
<i>Pinb-D1a</i> (Pin-B)	T1b 5'-ATGAAGACCTTATTCCTCC-3'	T2b 5' -TCACCAGTAATAGCCACTAGG-3'	54°C

Tabella 2: Primers e T_m utilizzati per l'amplificazione PCR del DNA genomico codificante per le puroindoline A (Pin-A) e B (Pin-B).

SSR	Primer senso	Primer antisenso	T _m	Cromosoma
Xbarc 180 (11.135 cM)	5'-GCGATGCTTGTGTTACTTCTC-3'	5'- GCGATGGAACCTCTTTTGCTCTA-3'	60°	5AS
Xbarc 117(18.83 cM)	5'- TCATGCGTGCTAAGTGCTAA-3'	5'- GAGGGCAGGAAAAAGTGACT-3'	59°	5AS
Xbarc 141 (45.26 cM)	5'-GGCCCATGGATAATTTTTGAAATG-3'	5'-CAATTCGGCCAAAGAAGAAGTCA-3'	61°	5A
Xbarc 151(64cM)	5'- TGAGGAAAATGTCTCTATAGCATCC-3'	5'- CGCATAAACACCTTCGCTCTTCCACTC-3'	55°	5A
X cdf 5 (0 cM)	5'- TGCCCTGTCCACAGTGAAG	5'-TTGCCAGTTCCAAGGAGAAT	56°	5BS
Xgwm 234 (1.8 cM)	5'-GAGTCCTGATGTGAAGCTGTTG-3'	5'-CTCATTGGGGTGTGTACGTG-3'	63°	5BS
Xgpm 1056 (8 cM)	5'- TATCTGTGGGGTGCAATGTG	5'-GATCTCTTCTCCCTCTCCC	60°	5BS
Xgwm 443.2 (12 cM)	5'- GGGTCTTCATCCGGAACCTCT	5'- CCATGATTATATAAATTCCACC	56°	5BS
X barc 32 (14.3 cM)	5'- GCGTGAATCCGGAACCCAATCTGTG-3'	5'-TGGAGAACCTTCGCATTGTGTCATTA-3'	52°	5BS
Xbarc 340 (24 cM)	5'-GCAACCAAGGCAGCGTAAATG-3'	5'-GCGTGTAGCCGTCCATAAGCATCAT-3'	57°	5BS
Xbarc 4 (27.9 cM)	5'- GCGTGTTTGTGTCTGCGTTCTA-3'	5'- CACCACACATGCCACCTTCTTT-3'	65°	5BS
Xbarc 340.1 (21.22 cM)	5'- GCAACCAAGGCAGCGTAAATG-3'	5'- GCGTGTAGCCGTCCATAAGCATCAT-3'	57°	5BL
Xbarc 89 (37.29 cM)	5'- GGGCGCGGCACCAGCACTACC-3'	5'- CTCCGAGGCCACCGAAGACAAGATG-3'	65°	5BL
Xbarc 140 (100.39 cM)	5'-CGCCAACACCTACCATT-3'	5'-TTCTCCGCACTCACAAAC-3'	55°	5BL
Xbarc 130 (0 cM)	5'-CGGCTAGTAGTTGGAGTGTGG-3'	5'- ACCGCCTCTAGTTATTGCTCTC-3'	64°	5DS
X barc 190 (8.6 cM)	5'-GTGCTTGCTGAGCTATGAGTC-3'	5' GTGCCACGTGGTACCTTTG-3'	60°	5DS
Xbarc 205 (18.4 cM)	5' -GCGACAGTTGTAGCGGCAGTAGC 3'	5'-GAGCGTAGTAGAAGCAGAAGGAG-3'	52°	5DS
Xbarc 44 (34.4 cM)	5'- CCCTACAAAATACGAACATGAAGTCAG-3'	5'- GGGTCCTACTCAGATAGTGACAGTCAAC-3'	55°	5DS
Xbarc 320 (94.2 cM)	5'- CGTCTTATCAAATCCGAACTG -3'	5'-AAAATCTATGCGCAGGAGAAAC-3'	57°	5DL
Xbarc 322 (126.0 cM)	5'-GAGAACATGAACGTGATTACC-3'	5'-CGCAAACCTTGTGTATCCTTATC-3'	52°	5DL
Xbarc 110 (140.4 cM)	5'- CCCGAACAATGGCTTTGGTGTCGTAAT-3'	5'-CATGGTGACGGCAAGTGTGAGGT-3'	63°	5DL
Xgwm 169 (169 cM)	5' ACCACTGCAGAGAACACATACG 3'	5' GTGCTCTGCTCTAAGTGTGGG 3'	60°	5DL
Pin a 5' UTR	5'- CTAGTCTGTAAAATACAGTCTC	5'-GAATAGATGAGATGAGGCCAC	58°	5D
Pin b 5' UTR	5'-CGTGAGCATTGGTACAAAAC	5'-CATGCTCCATCACGTAATC	58°	5D
GSP 1° int	5'-GTCTGCACCGTTCTGGCTTTA-3'	5'-CGGATGGTTTTGGGGSST-3'	54°	5D
GSP	5'- GCAAGCTCCCACCGCGGATG-3'	5'-TGATGGGGATGTTGCAGA-3'	54°	5D

Tabella 3: Primers e T_m utilizzati per l'amplificazione PCR .

3.1.4 Tecniche di Sequenziamento

3.1.4.1 Purificazione del prodotto di PCR

Al fine di rimuovere dai prodotti di PCR enzimi, oligonucleotidi, primers, dimeri dei primers e sali e ottenere così un buon esito di sequenziamento, è stato utilizzato il kit commerciale di purificazione della PCR “*NucleoSpin Extract II*”(protocollo 5).

Il kit prevedeva 3 passaggi:

- legame reversibile del DNA alla matrice di silice presente all'interno della colonnina mediante l'uso del *Binding Buffer NT*,
- lavaggio del DNA da proteine, sali e nucleotidi liberi mediante *Wash Buffer NT3* diluito con etanolo 100%,
- eluizione del DNA purificato con *Elution Buffer*.

3.1.4.2 Analisi di sequenza

Il sequenziamento genico dei geni è stato ottenuto mediante l'impiego della piattaforma ad alta processività “*GenomeLab GeXP Genetic Analysis System*” (*Beckman*) (Figura 5).

Durante il sequenziamento, i frammenti di DNA corrono lungo il capillare e vengono rilevati, in modo automatico, da una luce laser di una lunghezza d'onda tale da eccitare la fluorescenza dei ddNTP marcati ed aggiunti alla PCR di sequenza. Il segnale risultante produce un pattern di bande con aree proporzionali all'intensità di emissione e che correla con una sequenza di DNA, detto Elettroferogramma. La sequenza ottenuta è, quindi, confrontata con la sequenza di riferimento ottenibile attraverso un software specifico che si basa sul programma Gene Bank BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), il più diffuso programma di allineamento locale delle sequenze.

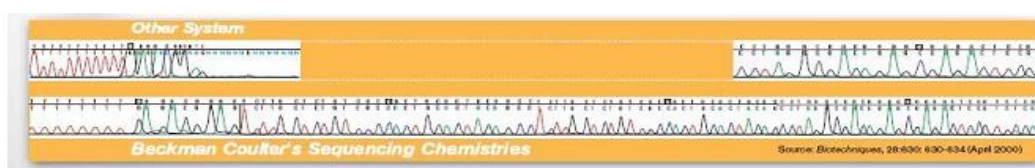


Figura 5: Sequenziatore automatico CEQ8800 (Beckman); GenomeLab DTCS Quick Start kit ed esempio di sequenza ottenuta.

3.1.4.3 Preparazione delle reazioni di PCR di sequenza:

H ₂ O	0-9 µl
DNA purificato	0,5-10,0 µl
Primer F (1,6 µM)	2,0 µl
Primer R (1,6 µM)	2,0 µl
DTCS Quick Start Master Mix	8,0 µl
TOTALE	20 µl

3.1.4.4. Programma di PCR per un totale di 30 cicli:

96°C	20 secondi
50°C	20 secondi
60°C	4 minuti

3.1.4.5 Precipitazione con Etanolo

- Preparazione di una “Stop Solution” da aggiungere al prodotto di PCR di sequenza (2µl di Sodio Acetato 3M a pH 5.2, 2µl di 100 mM Na₂-EDTA a pH 8.0 e 1µl di 20 mg/ml di glicogeno),
- Precipitazione con Etanolo 95%,
- Precipitazione con Etanolo 70%,
- Lisi del pellet ottenuto mediante *Sample Loading Solution*.

3.1.5 Separazioni elettroforetiche

3.1.5.1 Elettroforesi A-PAGE (Acid-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

E'una tecnica separativa effettuata in ambiente acido che prevede la separazione delle proteine in base alla loro carica ed al loro peso molecolare; è stata effettuata a pH 3,1 seguendo la metodologia descritta da Gazza *et al.* (2005a). Il campione proviene dall'estrazione delle puroindoline dai granuli d'amido o dall'estrazione delle gliadine; in questo caso ai campioni viene aggiunta la soluzione di glicerolo+pironina (volumi uguali di lattato di sodio (8.5mM, pH 3,1) e glicerolo, con l'aggiunta di 0,1% (p/v) di pyronina Y) pari al volume di etanolo al 70% utilizzato per l'estrazione. Sul gel si caricano 20 - 25µl di estratto proteico.

Le composizioni dello “stacking gel” (5% di acrilamide) e del “running gel” (17% di acrilamide) per la separazione elettroforetica delle puroindoline sono riportate nella Tabella 4; la concentrazione del gel (7,5% di poliacrilamide) per la separazione elettroforetica delle gliadine è riportata nella Tabella 5.

Componente	Stacking gel	Running gel
Acrilamide/N.N'-metilenbisacrilamide	5%	17%
H ₂ O distillata	1,77%	3%
Urea (p/v)	0,1%	0,5%
H ₂ O ₂ 2.5%	0,004 %	0,006%
Soluzione di complemento*	0,5%	4,12%

Tabella 4: Composizione del gel per la separazione delle puroindoline mediante A-PAGE.

*Acqua, 40% (v/v) di lattato di sodio 10X, pH 3,1, 0.5% (v/v) di solfato ferroso e 23 mM acido ascorbico.

Componente	Gel
Acrilamide	7,5%
N.N'-metilenbisacrilamide	0,0038%
Acido ascorbico	1%
Sodio lattato 10x pH 3.1	0,1%
Solfato ferroso 1x	1,5%
H ₂ O distillata	89%
H ₂ O ₂ 2,5%	0,6%

Tabella 5: Composizione del gel per la separazione delle gliadine mediante A-PAGE.

La corsa elettroforetica di 4 ore è stata effettuata a 430 Volt (V) costanti (utilizzando l'apparato *Oefer SE6000 della Amersham Pharmacia Biotech AB*, con un gel di 17 cm x 14 cm) ad una temperatura di 4°C, utilizzando come tampone di corsa una soluzione costituita dal 5% di lattato di sodio 8.5 mM, pH 3,1 in acqua distillata.

3.1.5.2 Elettroforesi in presenza di Sodio Dodecil Solfato (SDS-PAGE)

Le composizioni dello “stacking gel” (4,5% di acrilamide) e del “running gel” (15% di acrilamide) sono riportate in Tabella 6.

Componente	Stacking gel	Running gel
Acrilamide/N.N'-metilenbisacrilamide	4,5%	15%
H ₂ O distillata	95%	84%
Tris-HCl 1M, pH 6,8	0,062%	
Tris-HCl 1M, pH 8,8		0,38%
SDS 10% (p/v)	0,005 %	0,01%
Persolfato di ammonio 1% (p/v)	0,025%	0,025%
TEMED	0,38%	0,018%

Tabella 6: Composizione del gel per la separazione mediante SDS-PAGE.

La corsa elettroforetica è stata effettuata o/n a temperatura ambiente ad amperaggio costante (19 mA), utilizzando come tampone di corsa una soluzione costituita da glicina (187 mM), Tris (25 mM) e SDS (3 mM). I gel (16 cm x 18,5 cm) sono stati colorati o/n in lenta agitazione con una soluzione acquosa al 6% (p/v) di acido tricloroacetico (TCA) contenente 0,25% (p/v) di Comassie Brilliant Blue R250 e successivamente decolorati in una soluzione di TCA al 6%. Le immagini sono state acquisite mediante il programma UV-PRO (Eppendorf).

3.1.6 Trasferimento (Western Blotting) su membrana di nitrocellulosa e immunoreazione

Prima del trasferimento su membrana di nitrocellulosa (HibondTM-C EXTRA, Amersham Biosciences) i gel contenenti le proteine separate mediante A-PAGE sono stati equilibrati per 45 minuti a T.A. in un tampone di contenente Tris (25 mM), glicina (192 mM), 20% (v/v) di metanolo in acqua distillata e 1% di β -mercaptoetanolo.

Il trasferimento è stato effettuato per 1 ora a 24 V con l'apparecchiatura Semi Dry Transfer Cell (Biorad). Dopo il trasferimento le membrane sono state incubate per 1 ora nel tampone acquoso PBS composto da NaCl (150 mM) e 50 mM fosfato di sodio (50 mM) contenente 5% (p/v) di agente bloccante (latte in polvere Amersham Biosciences). Le membrane sono state poi incubate o/n in presenza dell'anticorpo anti-puroindolina A diluito 1:500 nel tampone PBS contenente 0,2% di agente bloccante. L'anticorpo policlonale per la puroindolina A è stato ottenuto dal siero di coniglio immunizzato con un peptide sintetico di 15 amminoacidi con sequenza DRASKVIQEAKNLPP (posizione da 129 a 143 nella regione carbossi-terminale di Pin-A) coniugato con la siero albumina bovina (BSA). I sieri sono stati forniti dalla ditta Primm SRL (Milano, Italia).

Dopo trattamento con l'anticorpo, la membrana è stata sottoposta a tre lavaggi con tampone PBS, uno da 10 minuti e due da 5 minuti. Successivamente la membrana è stata incubata per 4 ore in tampone PBS contenente 0,2% di agente bloccante e una diluizione 1:2500 di anticorpo secondario (*Goat Antirabbit Horseradish peroxidase coniugate*, Promega). La membrana è stata poi sottoposta a tre ulteriori lavaggi con tampone PBS come descritto precedentemente e quindi sviluppata secondo il metodo colorimetrico utilizzando 50 ml di tampone PBS addizionato di 10 mL di metanolo, 30 mg di 4-cloro-1-naftolo e 1 mL di H₂O₂ (30%). In alternativa, dopo i lavaggi, la membrana è stata incubata per 5 minuti in una soluzione (100 μ L per cm² di membrana) costituita da volumi uguali di Stable Peroxide Solution e Luminol/Enhancer Solution (Pierce) e messa a contatto al buio con una lastra radiografica, successivamente sviluppata con prodotti commerciali.

3.2 CARATTERIZZAZIONE TECNOLOGICA

3.2.1 Materiale vegetale

Per le analisi reologiche, condotte presso il laboratorio "Città del Grano di Raddusa- Consorzio di Ricerca "G.P. Ballatore", sono state utilizzate 3 varietà di monococco seminate per la prima volta in Sicilia: ID 331, Monlis e Stendhal.

Le prove eseguite sul monococco sono state fatte su un campione di grano duro, varietà Simeto, che è stato utilizzato come testimone e che prima della esecuzione delle prove è stato sottoposto anch'esso a molitura.

3.2.2 Determinazione della durezza della cariosside

La durezza della cariosside è stata determinata mediante il “sistema di caratterizzazione del singolo seme” (*Single Kernel Characterization System*”, *SKCS*) misurando, attraverso l'utilizzo dell'apparecchiatura Perten 4100 (Perten Instruments, Springfield, IL, USA), la forza necessaria per frantumare singole cariossidi. I campioni di generazione F5 erano costituiti da 2 a 10 cariossidi mentre per l'analisi della generazione F6 sono stati utilizzati 50 cariossidi per campione. Varietà commerciali di grano tenero e di grano duro a tessitura nota sono state utilizzate come controllo.

3.2.3 Test di sedimentazione

Questa analisi permette di misurare la forza relativa del glutine, attraverso l'osservazione dell'altezza del sedimento di grano duro (Preston *et al.*, 1984). Valori superiori a 40 per l'altezza del sedimento sono imputabili ad una buona qualità proteica del campione.

Sono stati utilizzati 500 mg di macinato (con Ciclone mill, Tecator Cyclotec con setaccio 0.8 – 1 mm) integrale per campione e tre soluzioni:

- A – costituita da 29,4 gr di SDS (sodio dodecil solfato) sciolti in un litro d'acqua distillata
- B – 10 ml di acido lattico all' 88% in 80 ml di acqua distillata
- C – 100 ml della soluzione A più 1,8 ml della soluzione B

Al tempo 0 i campioni vengono posti in cilindri da 10 ml con 5 ml di acqua distillata e vengono agitati per 15 volte mettendo poi i cilindri in posizione orizzontale.

- Dopo 2 minuti i campioni vengono invertiti di nuovo per 15 volte e riportati alla posizione iniziale.
- Dopo 4 minuti si ripetono le 15 inversioni e si aggiungono 5 ml della soluzione C. Si agitano i campioni per 4 volte e si rimettono in orizzontale.
- Dopo 6 minuti si effettuano 4 inversioni.
- Dopo 8 minuti si ripete l'operazione precedente.
- Dopo 10 minuti i campioni si invertono per 4 volte e si lasciano in posizione verticale.
- Dopo 25 minuti viene rilevata l'altezza del sedimento.

3.2.4 Determinazione del contenuto di umidità.

Il contenuto in ceneri è stato determinato tramite metodo UNI ENE ISO 712:2010.

Apparecchiatura

Bilancia analitica, capace di pesare con un'accuratezza di $\pm 0,001$ g.

Molino di macinazione, avente le seguenti caratteristiche:

- a) Fatto di materiale che non assorbe umidità;
- b) Da pulire facilmente e avente uno spazio morto minore possibile;
- c) Che permettere una macinazione da effettuare rapidamente e uniformemente, senza apprezzabile sviluppo di calore (la differenza di temperatura prima e dopo la macinazione deve essere minore o uguale a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$);
- d) Tenuta dell'aria per evitare lo scambio di acqua tra il campione e l'aria esterna;
- e) Regolabile in modo da ottenere particelle delle dimensioni indicate nella Tabella di riferimento.

Capsule di metallo, non corrodibili sotto le condizioni di prova, o capsule di vetro, con un coperchio e aventi l'area effettiva della superficie capace di distribuire l'aliquota di prova una massa per unità di area non superiore a $0,3\text{ g/cm}^2$.

Stufa a temperatura costante, riscaldata elettricamente, controllata in modo che, durante il normale lavoro, la temperatura dell'aria e dei ripiani che sorreggono le aliquote di prova sia mantenuta all'interno dell'intervallo da $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $133\text{ }^{\circ}\text{C}$ nella vicinanza delle aliquote di prova.

Essiccatore, contenente un agente essiccante efficace.

Procedimento:

- Pesare rapidamente, con approssimazione $0,001$ g, una quantità di $5\text{ g} \pm 1\text{ g}$ del campione di laboratorio nella capsula. Registrare la massa dell'aliquota di prova e la capsula non essiccate come m'_0 . Preventivamente essiccare e tarare la capsula, insieme col suo coperchio, e registrare la massa, m_d , con approssimazione $0,001$ g.
- Collocare la capsula aperta contenente l'aliquota di prova, insieme con il suo coperchio, nella stufa e lasciare per $120\text{ min} \pm 5\text{ min}$ (90 min per farine).
- Dopo l'essiccamento, rimuovere velocemente la capsula dalla stufa, coprire, e mettere nell'essiccatore. Quando sono state effettuate varie prove, non mettere mai le capsule una sull'altra nell'essiccatore, ma metterle una a fianco all'altra.
- Quando la capsula si è raffreddata alla temperatura di laboratorio (generalmente $30\text{ min} - 45\text{ min}$ dopo essere stata messa nell'essiccatore), pesare con approssimazione $0,001$ g. Registrare la massa dell'aliquota di prova essiccata e della capsula come m'_1 .

Il contenuto di umidità, w_{H_2O} , espresso in grammi per 100 g di prodotto così come ricevuto, è dato da:

$$w_{H_2O} = \left(1 - \frac{m_1}{m_0}\right) * 100$$

dove

$m_0 = m'_0 - m_d$ è la massa, in grammi, dell'aliquota di prova ;

$m_1 = m'_1 - m_d$ è la massa, in grammi, dell'aliquota di prova dopo l'essiccamento.

Calcolare la media aritmetica dei due risultati.

3.2.5 Determinazione del contenuto proteico mediante “micro-Kjedahl”

La metodica permette di valutare la quantità di sostanze azotate contenute nei cereali.

L'analisi segue il metodo di riferimento standard Kjeldahl ICC Standard N° 105/1 ed il prefisso micro si riferisce alle piccole quantità di sfarinato utilizzato (200 mg).

La procedura prevede un'iniziale taratura dello strumento tramite una soluzione di ammonio cloruro a contenuto noto di azoto con cui viene monitorato il sistema. Il metodo comprende tre fasi successive denominate Mineralizzazione, Distillazione e Titolazione. Nella fase di Mineralizzazione 200 mg di macinato integrale vengono posti dentro provette contenenti acido solforico concentrato (96% p/v), selenio (come catalizzatore) ed acqua ossigenata. Al termine della mineralizzazione (circa 2 ore) i campioni si presentano incolori. Segue la fase di Distillazione che avviene in ambiente alcalino in presenza di soda al 32% e rosso metile (indicatore). L'azoto viene raccolto in beute contenenti acido borico al 2% ed un indicatore misto (rosso metile e verdebromocresolo). L'ultima fase dell'analisi (Titolazione) prevede l'aggiunta di acido solforico 0,5 N fino al viraggio cromatico da verde a rosa-lilla. Il volume in ml di acido solforico utilizzato per la titolazione sono moltiplicati per un fattore di conversione (5,7) specifico per il frumento, ottenendo così il contenuto proteico, che viene poi espresso in % del peso del macinato.

3.2.6 Determinazione farinografica

Il test farinografico è stato condotto utilizzando il Farinografo di Brabender seguendo il metodo UNI 10790:1999.

Il farinografo è un dinamometro in grado di misurare, e riprodurre in forma grafica, la resistenza che l'impasto oppone ad una sollecitazione meccanica costante condotta in condizioni operative Standard. Il test farinografico Standard consiste di due prove: la prova di assorbimento (o “titolazione” della farina) e la registrazione del farinogramma vero e proprio.

Per la prima prova (Figura 6 A), si portano 300 g di farina nell'impastatrice. Si avvia lo strumento e, mediante un'apposita buretta si aggiunge acqua (velocemente fino al 45% e poi goccia a

goccia) fino a che si ottiene un impasto con consistenza ottimale, pari a 500 Unità Brabender (UB). La quantità di acqua utilizzata si esprime in percentuale e rappresenta il primo risultato del test: la capacità di assorbimento d'acqua (%) della farina, proprietà correlata positivamente alla quantità di proteine e negativamente all'amido danneggiato in essa presenti. Tale parametro è in grado di fornire indicazioni sulla “resa in impasto” della farina: la maggiore percentuale d'acqua assorbita significa una maggiore resa d'impasto e, quindi, un maggior valore commerciale della farina in questione.

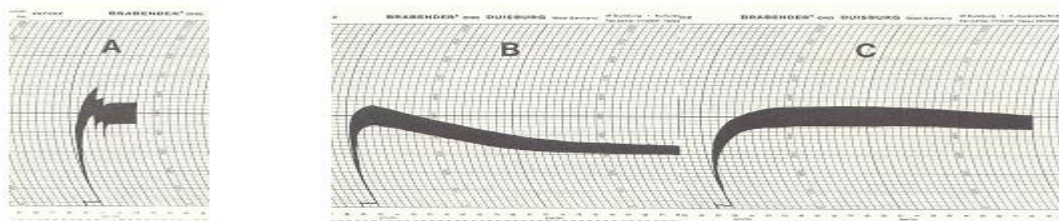


Figura 6. (A)(Fase di titolazione di un impasto; (B) Tracciato farinografico di una farina di frumento debole; (C) Tracciato farinografico di una farina di frumento forte.

Per la seconda parte del test, la registrazione del tracciato, si pongono 300 g di farina nell'impastatrice e, dopo aver avviato lo strumento, si aggiunge in una sola volta il quantitativo d'acqua determinato con la prova di assorbimento. L'impasto viene quindi lavorato per un tempo prefissato di 20 minuti e si ottiene un tracciato, detto farinogramma (Figura 6 B e C), che riporta in ascisse il tempo espresso in minuti e in ordinate, in una scala variabile da 0 a 1000 UB, la consistenza dell'impasto.

Da tale tracciato si ricavano importanti parametri utili a definire la “forza” della farina:

- Tempo di sviluppo (min): è il tempo necessario all'impasto per raggiungere la consistenza di 500 UB (il grafico deve essere centrato sulle 500 UB in corrispondenza del picco massimo della curva); cioè, il tempo necessario affinché la farina possa assorbire l'acqua e formare un impasto ben strutturato e dalla consistenza prefissata;
- Stabilità (min): è indicata dall'intervallo di tempo in cui la parte superiore della banda rimane sopra le 500 UB (dato dall'intersezione della curva in ascesa e in discesa con la linea delle 500 UB); cioè, il periodo di tempo in cui l'impasto, dopo aver raggiunto la consistenza ottimale, sebbene continuamente lavorato, mantiene tale condizione. È la resistenza offerta dall'impasto alla continua sollecitazione meccanica. Tempi lunghi corrispondono a caratteristiche di forza della maglia proteica che assicura all'impasto un'elevata resistenza alla lavorazione;
- Grado di rammollimento o Caduta (UB): è dato dalla distanza tra il centro della curva e la linea della 500 UB dopo un certo intervallo di tempo (dopo 10 minuti dall'inizio del test o

dopo 12 minuti dal massimo sviluppo della curva); esprime la perdita di consistenza dell'impasto dopo un intervallo di tempo prefissato: tale indice risulta tanto più contenuto quanto più forte è la farina;

- Elasticità (mm): è data dall'ampiezza della banda del tracciato al massimo dello sviluppo. Quanto più larga è la banda, tanto maggiore è l'elasticità dell'impasto.

3.2.7 Determinazione alveografica

Il test alveografico è stato condotto utilizzando l'Alveografo di Chopin seguendo il metodo UNI EN ISO 27971:2008.

Con l'Alveografo di Chopin si ricavano due indici:

- W (area della curva descritta sull'Alveografo dall'impasto di semola), legato alla forza del glutine: valori elevati indicano la presenza di un'abbondante e fitta rete proteica;
- P/L (rapporto tra altezza -forza- e lunghezza -estensibilità- della stessa curva) dà informazioni sulla tenacità (o resistenza a spezzarsi) e sull'elasticità (o attitudine a tendersi) (ICC 1986, 121; Borghi et al., 1995).

Questi indici vengono determinati tramite Alveografo di Chopin (Figura 7) .

Reagenti:

- 1) Soluzione di NaCl.

Dissolvere 25 g di NaCl in acqua distillata e portare a 1 litro di volume finale.

- 2) Olio di paraffina o olio vegetale.

Procedura:

- oleare con olio di paraffina o vegetale tutte le parti dello strumento che verranno a contatto con l'impasto;
- introdurre 250 g di semola o farina nell'impastatrice e aggiungere un quantitativo di soluzione di NaCl in base all'umidità del campione (tramite buretta graduata);
- impastare per 1 minuto, pulire l'impastatrice per un altro minuto e impastare nuovamente per 6 minuti;
- far riposare l'impasto fino al 20° minuto e impastare per altri 4 minuti;
- estrarre l'impasto e formare 5 dischetti di pasta dopo aver effettuato per ciascuno di essi 12 rullate;
- far riposare i dischi di pasta fino al 28° minuto;
- pressare il disco su di una lastra con un foro, attraverso il quale s'immette aria, in modo da gonfiare la pasta e formare una bolla fino al punto di rottura. Fare ciò per tutti e 5 i dischi di pasta. L'apparecchio registra graficamente il variare della pressione dell'aria nella bolla.

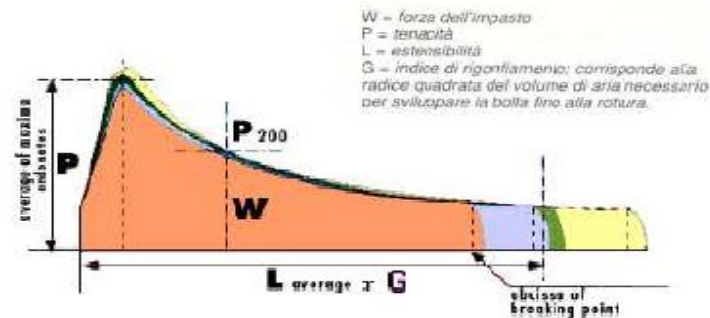


Figura 7: Esempio di alveogramma

3.2.8 Determinazione dell'Indice di caduta o Falling Number

L'attività dell' α -amilasi è valutata utilizzando come substrato l'amido presente nel campione. La determinazione è basata sulla capacità di una sospensione acquosa di farina, semola o prodotto integrale di cereale a gelatinizzare rapidamente in un bagno di acqua bollente, e sulla misura della liquefazione dell'amido attraverso l' α -amilasi presente nel campione.

La liquefazione influenza lo spessore del gel di amido e, quindi, la resistenza dell'agitatore viscosimetro e il tempo impiegato per cadere ad una determinata distanza.

L'analisi del indice di caduta viene condotto secondo il metodo UNI EN ISO 3093:2010.

Reagenti

Acqua, prodotta dalla distillazione o demineralizzazione, conforme alla ISO 3696, grado 3.

Apparecchiatura

L'usuale strumentazione di laboratorio e, in particolare, la seguente.

Strumentazione per la determinazione del FN, compresi i seguenti componenti

Bagno di acqua, con unità di calore integrata, sistema di raffreddamento e indicatore del livello dell'acqua.

Timer elettronico

Agitatore viscosimetro, metallico, capace di muoversi liberamente all'interno del tappo di ebanite.

Le sue aste devono essere dritte e le sue ruote prive di distorsioni e usura.

Tubi viscosimetri di precisione, prodotti con vetro speciale, con le seguenti dimensioni:

- diametro interno: 21,00 mm $\pm$ 0,02 mm;
- diametro esterno: 23,80 mm $\pm$ 0,25 mm;
- altezza interna: 220,0 mm $\pm$ 0,3 mm;

Tappi di gomma, che si adattino ai tubi viscosimetri.

Dispensatore automatico o pipetta, ISO 8655, permettendo di dispensare un volume di 25,0 ml $\pm$ 0,2 ml.

Bilancia analitica, capace di essere letta approssimando a 0,01 g.

Molino da laboratorio

Setaccio da laboratorio, dalle dimensioni nominali delle aperture di 800 µm, ISO 565 e ISO 3310 (tutte le parti).

Procedimento:

- Riempire il bagno di acqua con acqua fino al livello massimo possibile. Accendere il sistema di raffreddamento e garantire che l'acqua fredda scorra attraverso il coperchio di raffreddamento. Accendere l'apparecchiatura del FN e portare l'acqua a ebollizione. L'acqua del bagno deve bollire vigorosamente prima di ogni determinazione e nel corso dell'intera prova.
- Trasferire il campione pesato in un tubo viscosimetro pulito e asciutto. Aggiungere $25 \text{ ml} \pm 0,2 \text{ ml}$ di acqua a $22 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ usando il dispensatore automatico e una pipetta.
- Chiudere immediatamente con un tappo il tubo viscosimetro e agitare vigorosamente su e giù 20-30 volte in modo da ottenere una sospensione uniforme. Garantire che farine asciutte o materiali di base non rimangano intrappolate nella parte superiore del tubo verso il tappo. Se necessario, liberare il materiale intrappolato allentando leggermente il tappo verso l'alto e, se necessario, rimescolarlo.
- Rimuovere il tappo, raschiare il materiale ancora giacente sul fondo del tappo nel tubo e, con l'agitatore viscosimetro raschiare giù ogni materiale che aderisce alle pareti del tubo. Lasciare l'agitatore nel tubo.
- Mettere immediatamente il tubo viscosimetro, insieme con l'agitatore, all'interno del foro del coperchio nel bagno con acqua bollente. Attivare la testa dell'agitatore (singola o doppia testa) in conformità con le istruzioni del produttore. Le attrezzature possono poi effettuare in maniera automatica le operazioni fino a completare la prova. La prova è considerata completa quando l'agitatore viscosimetro ha raggiunto il fondo della sospensione gelatinizzata. Registrare il tempo mostrato sul timer . Questo costituisce il numero di FN.
- Fare ruotare tutta la testa dell'agitatore o premere il pulsante "STOP" ed estrarre l'agitatore dal bagno. Rimuovere il tubo e il suo agitatore con attenzione perché sono caldi. Pulire completamente i tubi e l'agitatore, assicurandosi che nessun materiale sia rimasto nella cavità del tappo di ebanite che potrebbe interferire con la discesa dell'agitatore nella successiva prova. Risciacquare i tubi e lasciare asciugare. Assicurarsi che l'agitatore è asciutto prima del suo riutilizzo.

4. RISULTATI

4.1 Caratterizzazione molecolare di genotipi di grano duro con cariossidi soffici

4.1.1 Materiale vegetale

Dall'incrocio tra il genotipo di grano duro "Cappelli mutante", privo del gene *Ph₁* per una piccola delezione interstiziale a carico del braccio lungo del cromosoma 5B (Giorgi 1978), e la linea di sostituzione 5D(5B) della varietà di grano duro Langdon sono state selezionate 11 piante F4 derivate da cinque piante F2. Queste piante F4 erano caratterizzate dalla presenza dei geni *Pina-D1a* e *Pinb-D1a* codificanti rispettivamente per la puroindolina A (Pin-A) e per la puroindolina B (Pin-B) e dall'assenza del gene *Ibf-D1*. Quest'ultimo gene è localizzato nel braccio lungo del cromosoma 5D e codifica per una proteina nota come Iodine Binding Factor (Liu e Gale 1989). Pertanto, le piante F4 selezionate contenevano solo parte del cromosoma 5D. Alcune piante della progenie di autofecondazione delle suddette 11 piante F4 denominate Linee Ricombinanti Soffici (LRS) sono state incrociate con la varietà commerciale di grano duro "Colosseo" allo scopo di reintrodurre il gene *Ph₁* ed altri geni in grado di migliorare le scadenti caratteristiche morfo-fisiologiche (altezza eccessiva della pianta, ridotto accestimento ecc.) e tecnologiche (glutine "debole") delle piante stesse. Le progenie di questi incroci sono state poi allevate in serra (2 generazioni/anno) fino ad ottenere le cariossidi F4.

4.1.2 Caratteristiche morfo-fisiologiche delle progenie F4

Le progenie F4 degli incroci tra linee di grano duro ricombinanti con cariossidi a tessitura soffice (LRS) con la varietà commerciale Colosseo sono state allevate in pieno campo in file-spiga in località Montelibretti (RM). Complessivamente sono state allevate 335 linee (Tabella 7).

Con l'eccezione di alcune linee, queste progenie si presentavano in campo piuttosto eterogenee, sia per l'altezza delle piante che per il colore delle reste.

Origine	No. di file F4	Numerazione delle file F4	Colore delle reste	Altezza delle piante (cm)
<i>Colosseo</i> x <i>LRS</i>				
	03/62.2	56	da 273 a 328	nero 60-150
	03/62.4	42	da 330 a 371	bianco/nero 60-146
	03/63.1	8	da 272 a 379	nero 95-140
	03/64.1	30	da 380 a 409	bianco 70
		21	da 410 a 430	bianco/nero 60-136
	03/64.2	38	da 431 a 468	bianco/nero 70-150
	03/64.3	39	da 469 a 507	bianco/nero 75-152
	03/64.4	25	da 508 a 532	bianco 40-134
	03/64.5	14	da 533 a 546	bianco/nero 75
	03/64.7	38	da 547 a 584	bianco/nero 100-145
	03/64.8	6	da 585 a 590	bianco 130
	03/64.10	7	da 591 a 597	bianco/nero 125
		11	da 598 a 608	nero 130
Totale	335			

Tabella 7: Caratteristiche morfologiche di linee F4 di grano duro ottenute dall'incrocio tra Linee Ricombinanti Soffici (LRS) e la varietà Colosseo.

4.1.3 Analisi genetiche e biochimiche

Le analisi genetiche e biochimiche sono state condotte su un campione di cariossidi e plantule F5 ottenute dalle piante F4 allevate in pieno campo (Tabella 7). In particolare per ciascuno degli incroci tra le 11 LRS e la varietà Colosseo sono state analizzate le cariossidi/plantule F5 prodotte da 5 piante rappresentative di altrettante file F4. In presenza di file eterogenee per l'altezza della pianta o per il colore delle reste, sono state utilizzate le progenie F5 di due piante morfologicamente differenti per ciascuna fila F4 allevata in campo.

Complessivamente sono stati raccolti 81 campioni che sono stati sottoposti ad analisi genetica, biochimica e tecnologica al fine di determinare (i) la presenza dei geni puroindolinici *Pina-D1a* e *Pinb-D1a* e delle corrispondenti proteine Pin-A e Pin-B, (ii) la struttura dei cromosomi ricombinanti, (iii) la tessitura delle cariossidi e (iv) la composizione in proteine di riserva.

4.1.3.1 Amplificazione tramite PCR

Il DNA estratto da 4 plantule per ciascuno degli 81 campioni utilizzando il protocollo descritto da Della Porta *et al.* (1983) è stato amplificato attraverso la reazione a catena della polimerasi (PCR) utilizzando due primers terminali (T1a e T2a, vedi Tabella 2) specifici per il gene della puroindolina A (*Pina-D1a*) e successivamente due primers terminali (T1b e T2b) specifici per il gene della puroindolina B (*Pinb-D1a*) (Figura 8).

Tra gli 81 campioni analizzati, 49 sono risultati positivi per la presenza di entrambi i geni puroindolinici (concordanti positivi, CP), 17 sono risultati privi di entrambi i geni (concordanti negativi, CN) e 15 sono risultati positivi per la presenza del gene *Pina-D1a* ma non hanno dato prodotti di amplificazione con i primers specifici per *Pinb-D1a* (discordanti, D). I risultati delle analisi sono riportati nella Figura 9.

Come si può notare dalla Figura 8, esiste una certa variazione dell'intensità dell'amplificato nei campioni analizzati, variazione verosimilmente dovuta alla condizione omozigote/eterozigote delle plantule analizzate e/o ad un effetto di posizione (zona cromosomica) dei geni puroindolinici all'interno del cromosoma ricombinante.

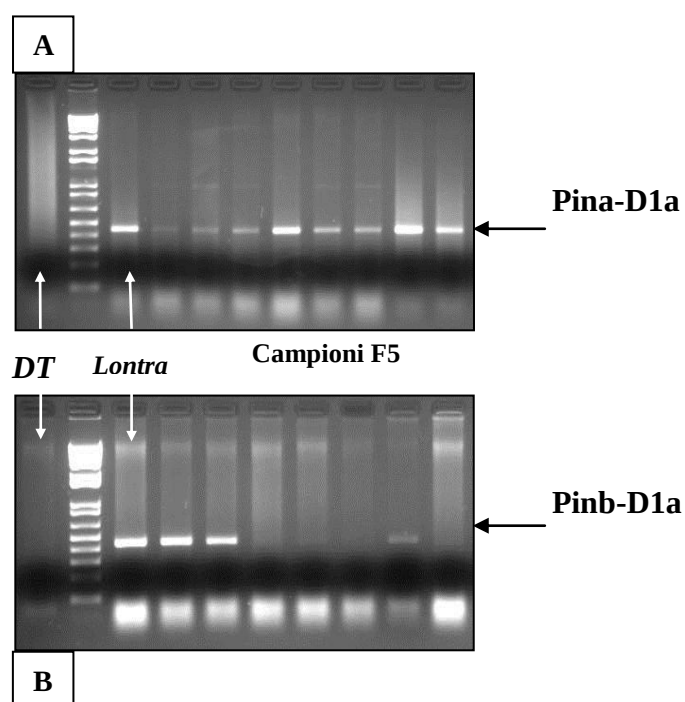


Figura 8

Amplificazione PCR con primers specifici per il gene *Pina-D1a* (A) e per il gene *Pinb-D1a* (B) su plantule F5 derivate dall'incrocio LRS x Colosseo.

DT = Linea ditelosomica 5DL della varietà di grano tenero Chinese Spring (controllo negativo)

Lontra: Varietà di grano tenero con cariossidi soffici (controllo positivo).

La seconda corsia da sinistra contiene gli standard di peso molecolare.

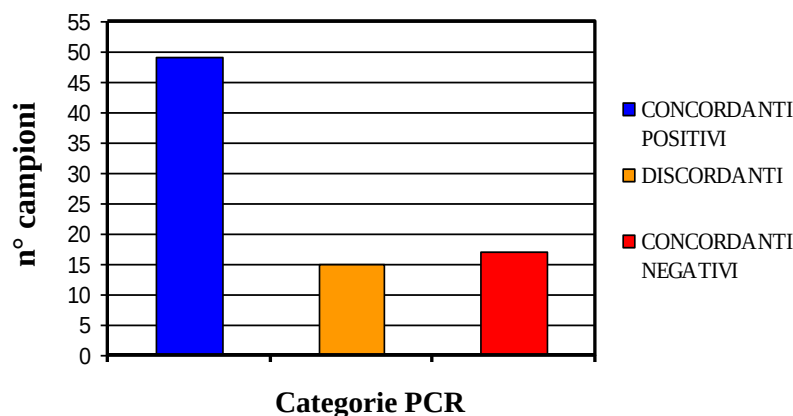


Figura 9: Risultati delle analisi PCR su plantule F5 derivate dall'incrocio LRS x Colosseo
 Concordanti positivi (CP): *Pina-D1a* / *Pinb-D1a*
 Concordanti negativi (CN): - / -
 Discordanti (D): *Pina-D1a* / -

Gli ampliconi ottenuti dai 49 campioni CP con i primers T1a e T2a specifici per *Pina-D1a* sono stati estratti dal gel ed amplificati nuovamente mediante “semi-nested PCR” utilizzando il primer T2a accoppiato al primer interno Int1a (vedi Tabella 2). L'esperimento ha dato prodotti di amplificazione con le dimensioni attese. Inoltre le sequenze degli ampliconi ottenuti con i primers terminali specifici per i due geni puroindolinici sono risultate identiche a quelle degli alleli *Pina-D1a* e *Pinb-D1a*.

4.1.3.2 Separazione delle puroindoline tramite elettroforesi A-PAGE e immunoelettroforesi

Una volta verificata la presenza dei geni codificanti per le puroindoline A e B nelle progenie F5 si è proceduto a determinare la presenza-assenza dei loro prodotti di traduzione, le proteine Pin-A e Pin-B. A questo scopo, 10 cariossidi per campione sono stati sottoposti ad estrazione dei granuli d'amido e da 40 mg di questi granuli sono state estratte le puroindoline. L'estratto proteico è stato poi sottoposto a separazione mediante elettroforesi in ambiente acido (A-PAGE) su gel di poliacrilamide al 17% (rapporto tra acrilammide e bis-acrilammide 29:1) e colorato con Coomassie R250.

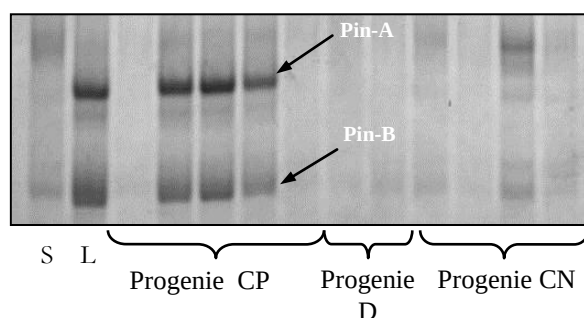


Figura 10: Separazione elettroforetica A-PAGE di proteine legate ai granuli di amido in cariossidi F5 derivate dall'incrocio LRS x Colosseo.

S = grano duro, varietà Simeto
 L = grano tenero, varietà Lontra (soffice)
 CP = Progenie concordante positiva
 D = Progenie discordante
 CN = Progenie concordante negativa

I risultati dell'analisi (Figura 10 e 11) indicano che le cariossidi delle piante CN e D sono prive di entrambe le puroindoline. Sorprendentemente, lo stesso risultato è stato ottenuto in 30 delle 49 piante CP in cui era stata dimostrata la presenza dei geni puroindolinici. Soltanto in 19 progenie F5 appartenenti al gruppo CP è stata riscontrata la presenza di una coppia di bande con mobilità ed intensità corrispondenti a quelle delle puroindoline A e B nelle varietà di grano tenero con cariossidi a tessitura soffice (Figura 10, corsia L).

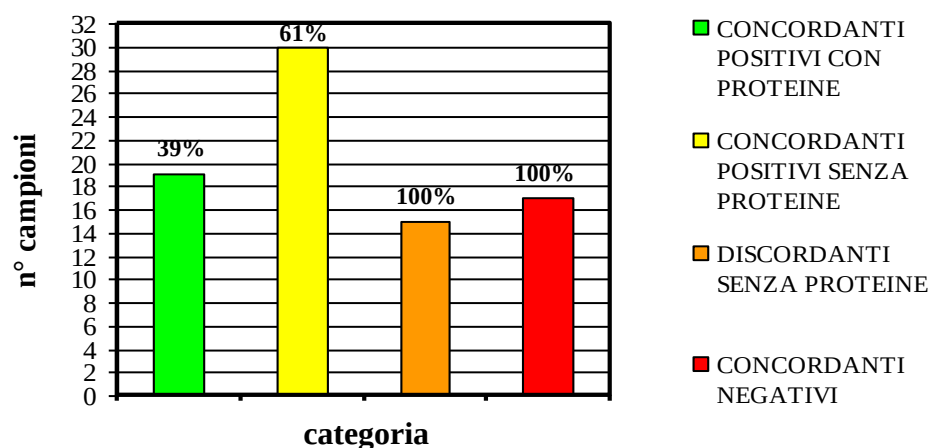


Figura 11: Classificazione delle progenie F5 derivate dall'incrocio LRS x Colosseo in base ai risultati delle analisi PCR e A-PAGE.

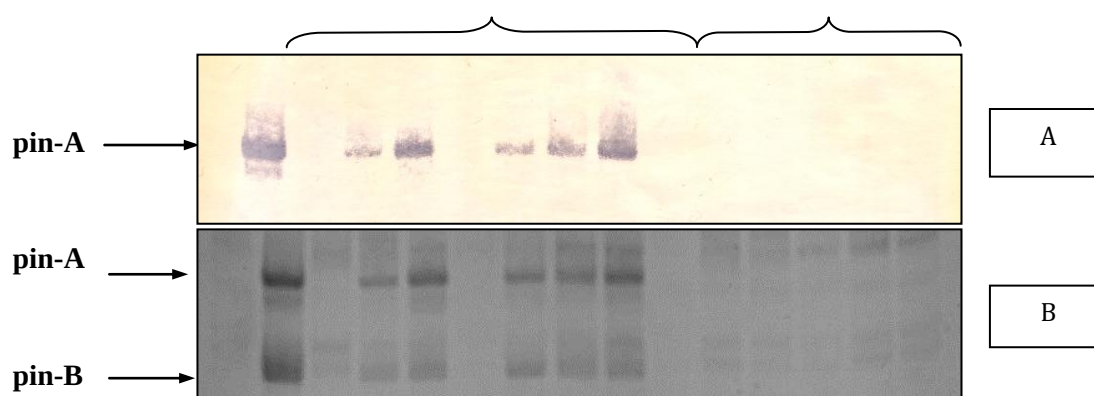


Figura 12: (A) Immunoreazione dell'anticorpo anti-Pin-A specifico per la puroindolina A con le proteine estratte dalle progenie F5 dell'incrocio LRS x Colosseo e trasferite su membrana di nitrocellulosa dopo (B) separazione mediante elettroforesi A-PAGE. S = grano duro, varietà Simeto. L = grano tenero, varietà Lontra (soffice). CP = concordante positiva. CN = concordante negativa.

Come atteso, tra le proteine separate mediante A-PAGE (Fig. 12, B) e trasferite su membrana di nitrocellulosa, quella identificata come Pin-A ha dato una forte reazione con l'anticorpo policlonale

specifico per la puroindolina A (Fig. 12, A, freccia), confermando la presenza di questa proteina in 19 progenie F5.

L'immunoreazione delle proteine separate mediante A-PAGE con l'anticorpo anti-Pin-A è stata ripetuta utilizzando la luminescenza come tecnica di rilevamento del legame antigene-anticorpo, tenuto conto che questa tecnica è circa 1000 volte più sensibile di quella colorimetrica basata sull'ossidazione del cloro naftolo, e quindi, in grado di rilevare anche piccole quantità del prodotto di espressione del gene *Pina-D1a*.

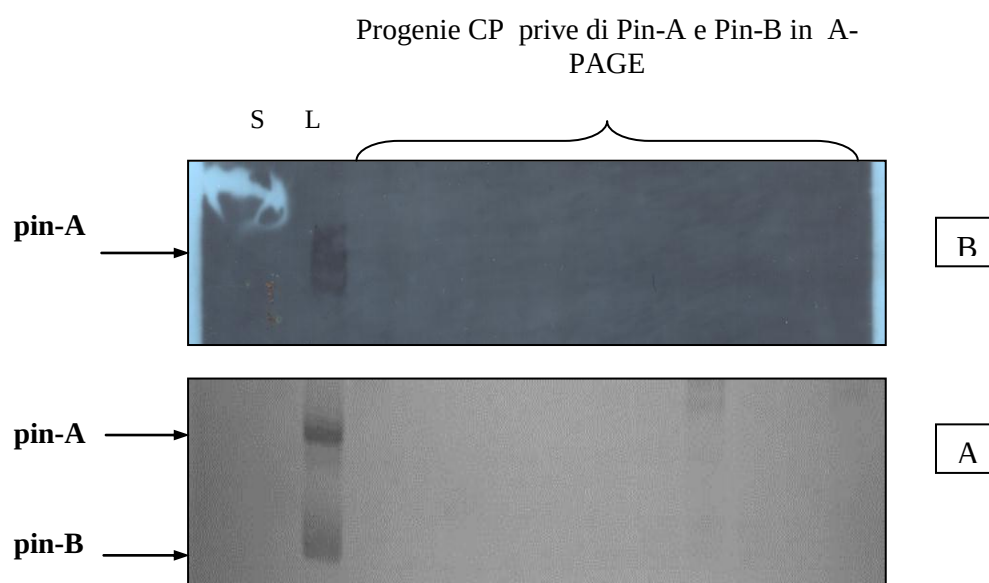


Figura 13: (A) Separazione elettroforetica A-PAGE di proteine legate all'amido e (B) immunoreazione con l'anticorpo anti-Pin-A evidenziata mediante luminescenza.
S = grano duro, varietà Simeto. L = grano tenero, varietà Lontra (soffice).

Tuttavia, i campioni CP che non avevano mostrato proteine immunoreattive con il metodo colorimetrico, non hanno dato bande nemmeno con il luminolo, confermando la totale assenza di espressione del gene codificante per la puroindolina A (Figura 13).

Nella Tabella 8, le 19 progenie in cui è stata riscontrata la presenza di entrambe le puroindoline sono state suddivise in base alla loro provenienza dagli incroci LRS x Colosseo. La presenza delle puroindoline è stata riscontrata nella progenie di otto delle 11 linee d'origine. Non è stata osservata alcuna associazione tra la presenza delle puroindoline e l'altezza della pianta o il colore delle reste.

Famiglia d'origine	Fila F4 e pianta contenente le puroindoline
03/62-2	320, pianta 1, alta con reste nere
03/62-4	343, pianta 1, alta con reste nere 343, pianta 2, alta con reste nere
03/64-1	414, pianta 1, bassa con reste nere 428, pianta 2, alta con reste nere
03/64-2	443, pianta 1, alta con reste bianche 443, pianta 2, bassa con reste bianche 447, pianta 1, alta con reste bianche
03/64-3	482, pianta 1, alta con reste bianche 504, pianta 1, alta con reste bianche
03/64-4	514, pianta1, alta con reste bianche 514, pianta 2, bassa con reste bianche 530, pianta 1, alta con reste bianche
03/64-5	539 , pianta 1, bassa con reste bianche 533, pianta 1, bassa con reste nere 543, pianta 1, bassa con reste nere 546, pianta 1, bassa con reste nere
03/64-10	602, pianta 1, alta con reste nere 606, pianta 1, alta con reste nere

Tabella 8: Campioni positivi per la presenza delle puroindoline divisi per famiglia di appartenenza.

4.1.3.3 Analisi delle proteine totali tramite SDS-PAGE

Su 17 delle 19 linee F4 di grano duro contenenti le puroindoline è stata effettuata l'estrazione delle proteine dell'endosperma e la separazione elettroforetica su gel SDS-PAGE al 15% di acrilammide allo scopo di (i) verificare la loro natura tetraploide sulla base dell'assenza delle proteine codificate dai cromosomi appartenenti al genoma D, (ii) stimare il grado di omozigosi sulla base della composizione in prolamine, (iii) definire l'origine parentale delle proteine presenti nell'endosperma e (iv) determinare la composizione delle subunità gluteniniche ad alto peso molecolare (HMW), note per la loro influenza sulla qualità del glutine (Fig. 14 e 15).

Tutti i campioni sono risultati privi delle subunità HMW codificate dal cromosoma 1D (come ad esempio, le subunità 2 e 12 tipiche della varietà di grano tenero Chinese Spring) a dimostrazione della loro natura tetraploide. Inoltre, come atteso, sono state riscontrate piante eterozigoti per geni codificanti per prolamine (gliadine e subunità gluteniniche LMW) o albumine, mentre tutte le piante analizzate sono risultate omozigoti per il locus *Glu-B1* (cromosoma 1B) codificante per le subunità HMW "6+8" (11 casi) o "13+16" (6 casi) derivate rispettivamente da Langdon 5D(5B) e Colosseo.

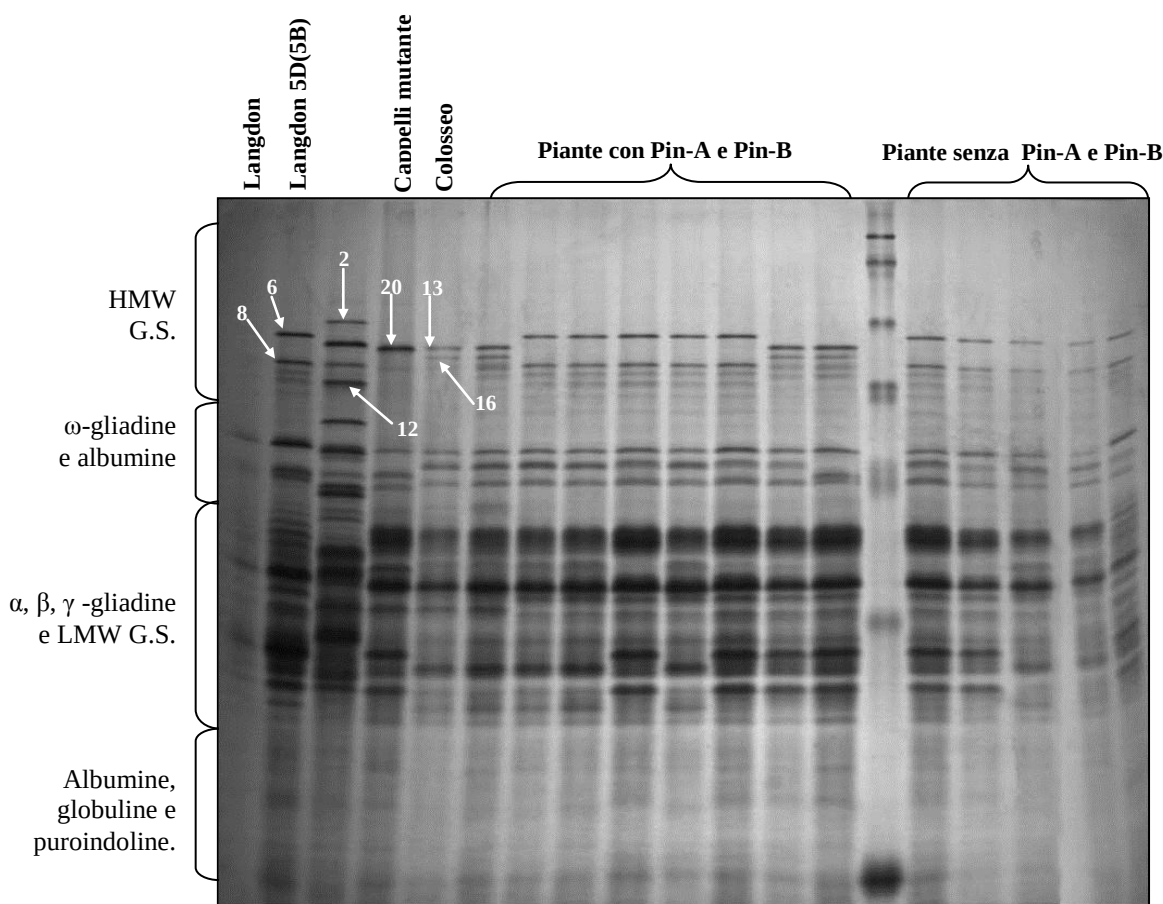


Figura 14: Separazione SDS-PAGE delle proteine dell'endosperma.

G.S. = Subunità gluteniniche ad alto peso molecolare. HMW

G.S. = Subunità gluteniniche a basso peso molecolare. LMW

I numeri indicano le subunità gluteniniche HMW secondo la nomenclatura di Payne e Lawrence.

Nelle progenie non è stata riscontrata la subunità HMW “20” presente in Cappelli mutante, subunità controllata anch’essa dal locus *Glu-B1*.

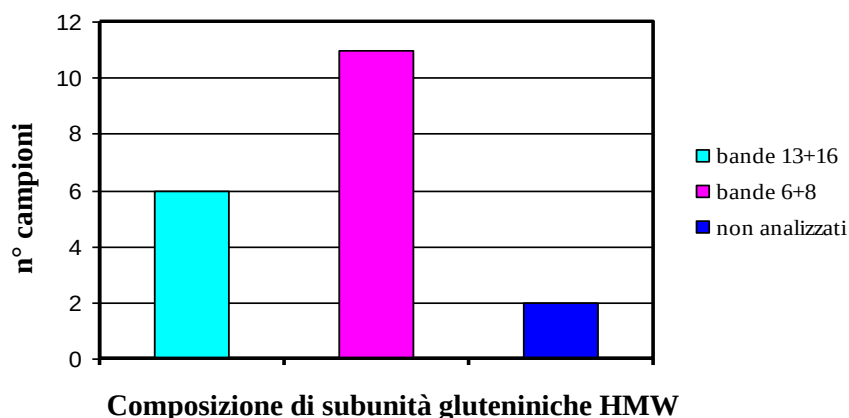


Figura 15: Composizione in subunità gluteniniche ad alto peso molecolare (HMW G.S.) delle piante di grano duro contenenti le puroindoline A e B.

4.1.3.4 Separazione delle gliadine mediante elettroforesi acida A-PAGE

Le gliadine estratte dai campioni risultati positivi per la presenza delle puroindoline sono state sottoposte ad elettroforesi A-PAGE (Figura 16).

In particolare è stata determinata la presenza delle bande γ -45 e ω -35 (singoletto), presenti nei parentali Cappelli mutante e Colosseo, ma assenti nel parentale Langdon 5D(5B), importanti marcatori di buona qualità. La Figura 17 mostra che la maggior parte delle linee contenenti entrambe le puroindoline possiede le gliadine associate all’alta qualità invece delle gliadine γ -42 e ω -33, ω -35 e ω -37 (tripletto) notoriamente associate a glutine scadente.

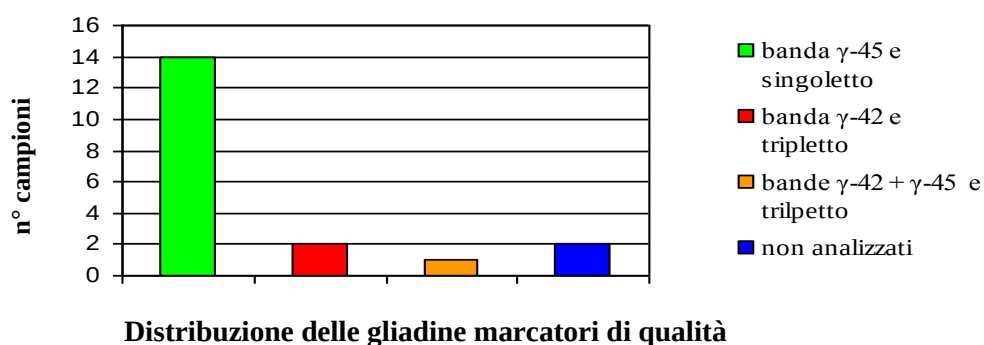
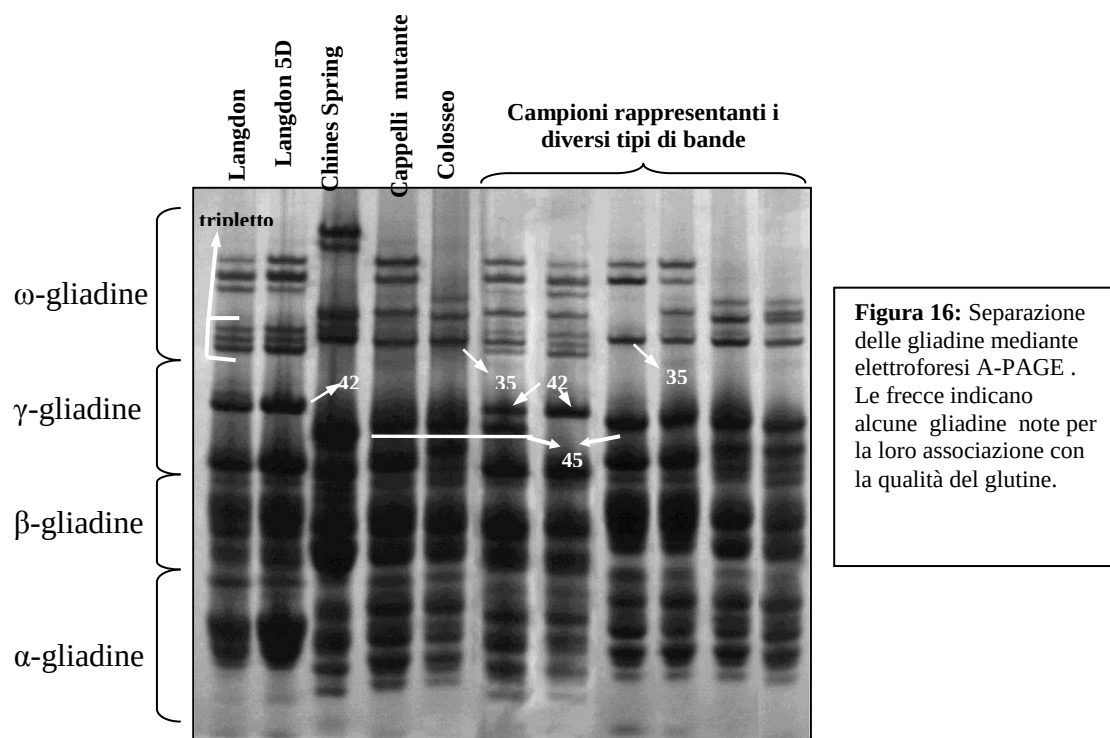


Figura 17: Distribuzione delle gliadine γ -45 + ω -35 (“singoletto”) e γ -42 + ω -33, ω -35, ω -37 (“tripletto”) nelle piante di grano duro contenenti le puroindoline A e B.

4.1.4 Analisi PCR con marcatori molecolari SSR

Alcune piante appartenenti alla generazione F5 sono stati sottoposte ad amplificazione del DNA, tramite PCR, utilizzando primers specifici per sequenze SSR localizzate nei cromosomi 5A, 5B e 5D scelti tra quelli descritti da Song *et al.* (2005). In particolare, sono state utilizzate 4 coppie di primers per il cromosoma 5A e per il cromosoma 5B, di cui due localizzate nel braccio corto e due nel braccio lungo, e 5 coppie di primers per il cromosoma 5D (Figura 18). La distanza tra i

marcatori SSR va da 7 a 63 cM con una media di 23,4 cM. Il braccio corto e la parte pericentromerica del cromosoma 5D sono stati caratterizzati in modo più dettagliato, mantenendo una distanza di 16-18 cM tra le sequenze SSR.

Lo scopo dell'analisi è stimare quanta parte del cromosoma 5D è rimasta nelle piante ricombinanti selezionate e l'origine parentale degli cromosomi del gruppo omeologo 5.

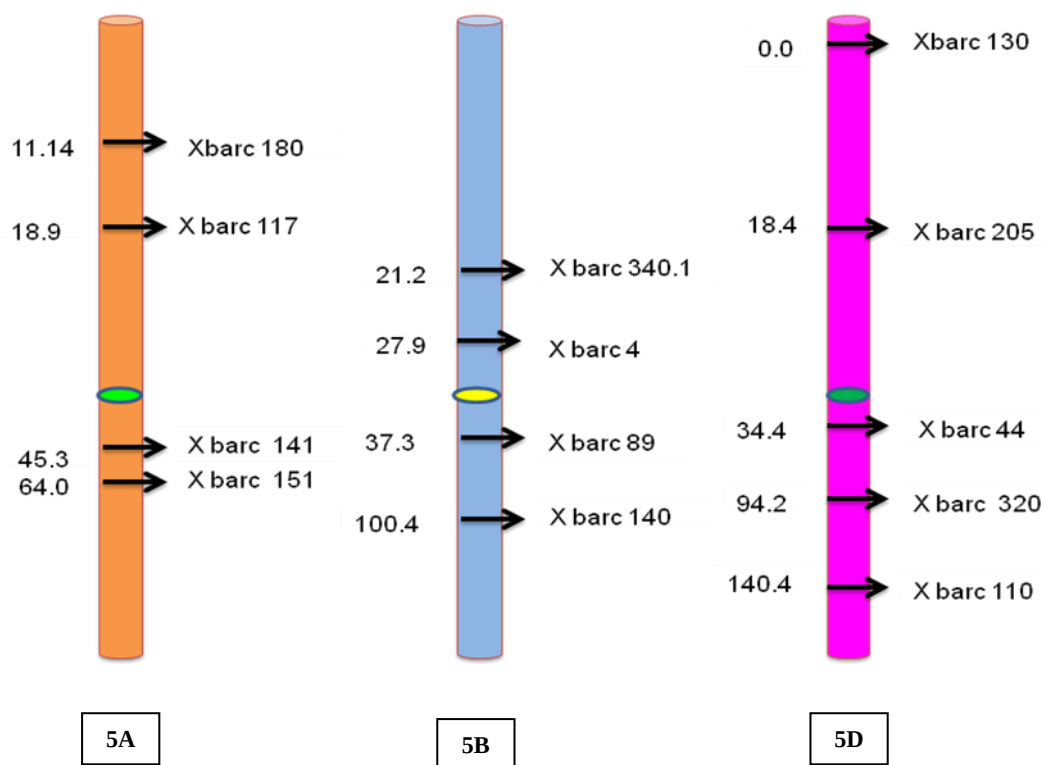


Figura 18 : Cromosomi 5A, 5B e 5D con i rispettivi microsatelliti.

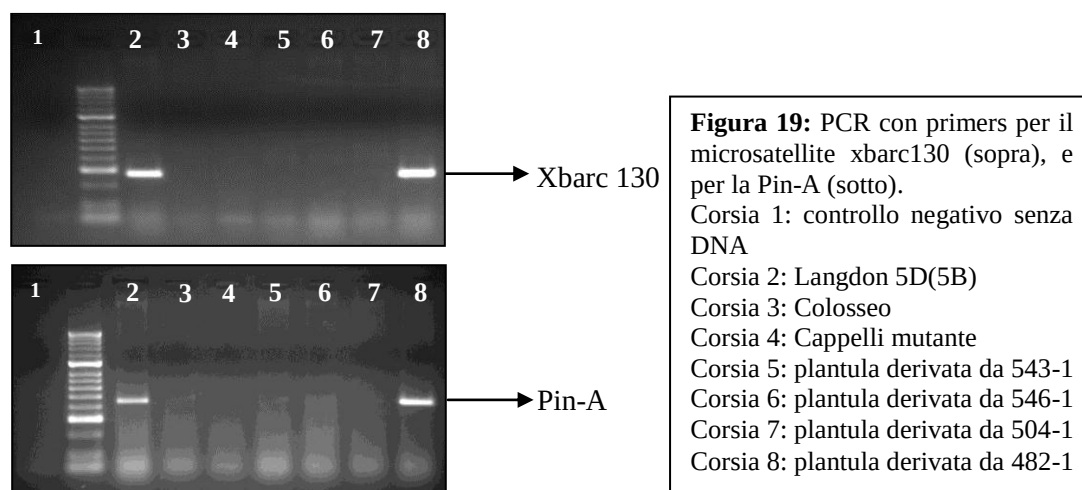
A sinistra del cromosoma sono riportate le distanze di mappa dei microsatelliti, a destra, la loro denominazione.

L'estrazione del DNA (metodo C-TAB) è stata effettuata sempre da singola plantula. Nelle analisi è stato utilizzato come controllo il DNA dei parentali Colosseo, Cappelli mutante, Langdon 5D(5B) e Langdon insieme alla varietà di grano tenero Chinese Spring.

In seguito alla messa a punto della PCR (temperatura di appaiamento) per ciascuna coppia di primers e prima di verificare la presenza-assenza dei marcatori SSR nelle progenie ricombinanti, i microsatelliti sono stati utilizzati per indagare i genotipi parentali. Come atteso, i grani duri utilizzati come controllo (Colosseo, Cappelli mutante e Langdon) non hanno dato prodotti di amplificazione con i primers specifici per i microsatelliti localizzati nel cromosoma 5D, mentre hanno fornito ampliconi delle dimensioni attese con i primers per gli SSR localizzati nei cromosomi

5A e 5B. In questo contesto è interessante notare che alcuni SSR erano in grado di discriminare tra i parentali producendo bande di altezza leggermente differente (Figura 21).

Il grano tenero Chinese Spring (utilizzato anche come controllo positivo nelle analisi con marcatori SSR del cromosoma 5D) ha dato prodotti di amplificazione per tutti i microsatelliti utilizzati. La linea di sostituzione Langdon 5D(5B) ha fornito ampliconi per tutti gli SSR dei cromosomi 5D e 5A e talvolta anche per quelli del cromosoma 5B (in altri casi, come quello riportato nella corsia 3 della Figura 21, non ha dato ampliconi). Ciò era atteso perché nella linea di sostituzione alcune piante contengono un cromosoma 5B soprannumerario, cromosoma che garantisce la fertilità di questa linea. Come è stato ricordato nel capitolo “Introduzione”, il cromosoma 5B soprannumerario non viene tuttavia trasmesso per via maschile quando la linea di sostituzione viene usata negli incroci come parentale impollinatore, come nel caso dell’incrocio con Cappelli mutante che ha dato origine alle linee LRS. Le progenie e i parentali sottoposti all’analisi con i marcatori SSR sono stati anche amplificati utilizzando primers per il gene *Pina-D1a* codificante per Pin-A. In presenza di questo gene, i primers specifici per il microsatellite *Xbarc130* localizzato all’estremità distale del braccio corto del cromosoma 5D hanno sempre fornito un prodotto di amplificazione, mentre non hanno dato ampliconi nei genotipi privi del gene *Pina-D1a*, a dimostrazione di una concatenazione completa tra quest’ultimo e il marcatore SSR. (Figure 19 e 23).



4.1.4.1 Analisi PCR con marcatori molecolari SSR su piante di generazione F5

L’analisi è stata condotta su 4-5 piante derivate da ciascuna di quattro piante F4 allo scopo di verificare l’eventuale condizione omozigote per i marcatori SSR del cromosoma 5D. I risultati sono riportati nella Figura 20. Le quattro plantule derivate dalla pianta F4 482-1 e le quattro derivate

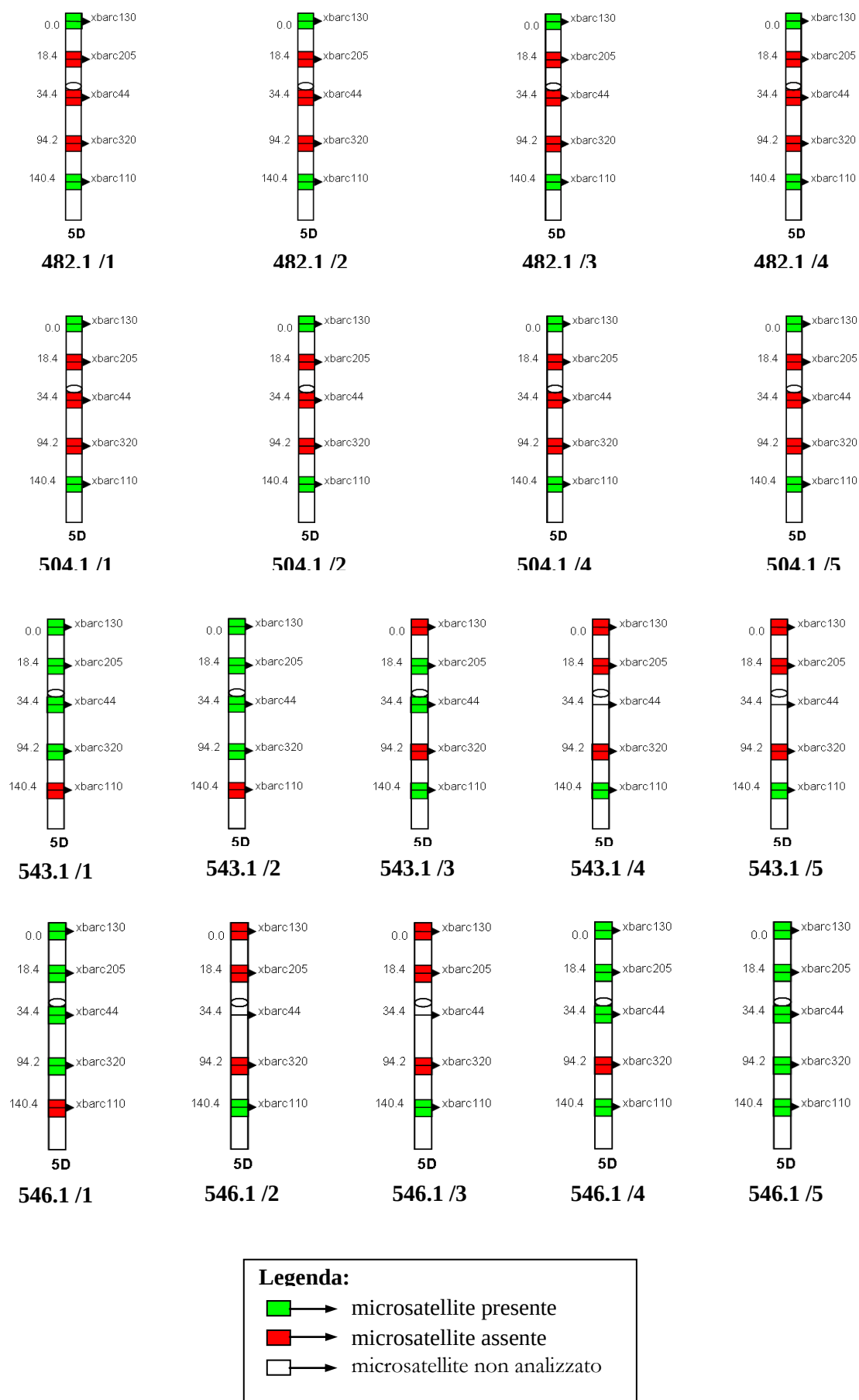


Figura 20: Distribuzione di 5 SSR specifici per il cromosoma 5D in 4 genotipi ricombinanti di grano duro.

dalla pianta 504-1 hanno fornito gli stessi risultati, cioè la presenza degli *SSR Xbarc-130* e *Xbarc-110* localizzati alle estremità dei due bracci cromosomici e l'assenza dei tre *SSR* intermedi. Ciò è in accordo con la comune origine delle piante 482-1 e 504-1, entrambe provenienti da 03/64.3, verosimilmente portatrice di un evento di ricombinazione frutto di due crossing-over, uno per ciascun braccio del cromosoma 5D. Le plantule appartenenti alla progenie di 543-1 e 546-1, entrambe membri della famiglia 03/64.5, sono risultate piuttosto eterogenee per la distribuzione dei microsatelliti.

La segregazione presenza : assenza per il satellite *Xbarc-130* associato ai geni puroindolinici è stata di 3 : 3 nella progenie della pianta 546-1 e di 2 : 4 nella progenie della pianta 543-1, cioè complessivamente di 5 : 7 invece del rapporto 9 : 3 atteso nella progenie da autofecondazione di un individuo eterozigote. Più vicina all'atteso (8 : 4) è stata la segregazione dell'*SSR xbarc-110*.

Vista la presenza di estese porzioni del cromosoma 5D nella progenie delle piante 543-1 e 546-1, l'analisi dei microsatelliti è proseguita solo nelle progenie delle piante 482-1 e 504-1 derivate dalla famiglia 03/64.3.

Le 10 plantule ottenute per autofecondazione dalle piante 482-1 e 504-1 presentavano tutti i marcatori satellitari dei cromosomi 5A e 5B. Poiché alcuni microsatelliti fornivano prodotti di amplificazione di dimensioni diverse in Cappelli mutante e Colosseo (Figura 21), è stato possibile determinare la provenienza parentale di questi microsatelliti nelle progenie ricombinanti analizzate. Le plantule ricombinanti sono risultate identiche a Colosseo per i microsatelliti del cromosoma 5B (Figura 21, A, corsia 4), indicando l'assenza di estese regioni del cromosoma 5B di Cappelli mutante nella progenie ricombinante, cromosoma portatore dell'allele mutato *ph1c*, causa di instabilità cromosomica e ridotta fertilità.

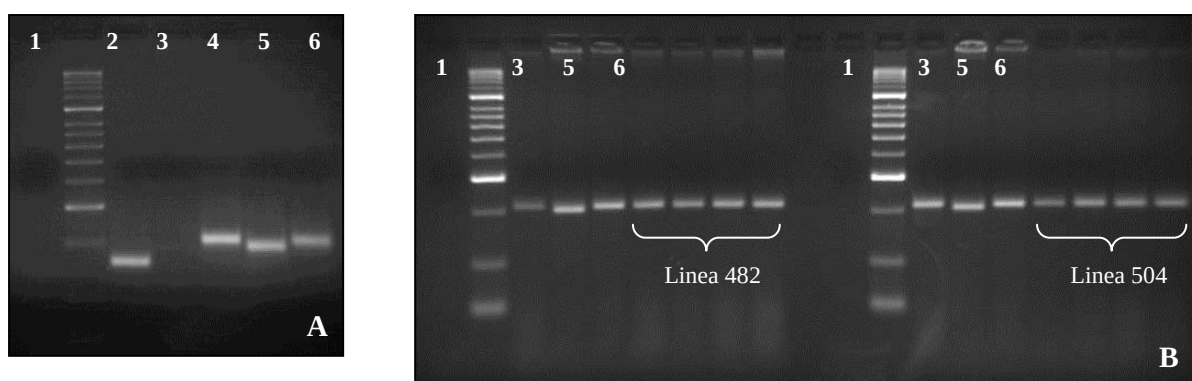
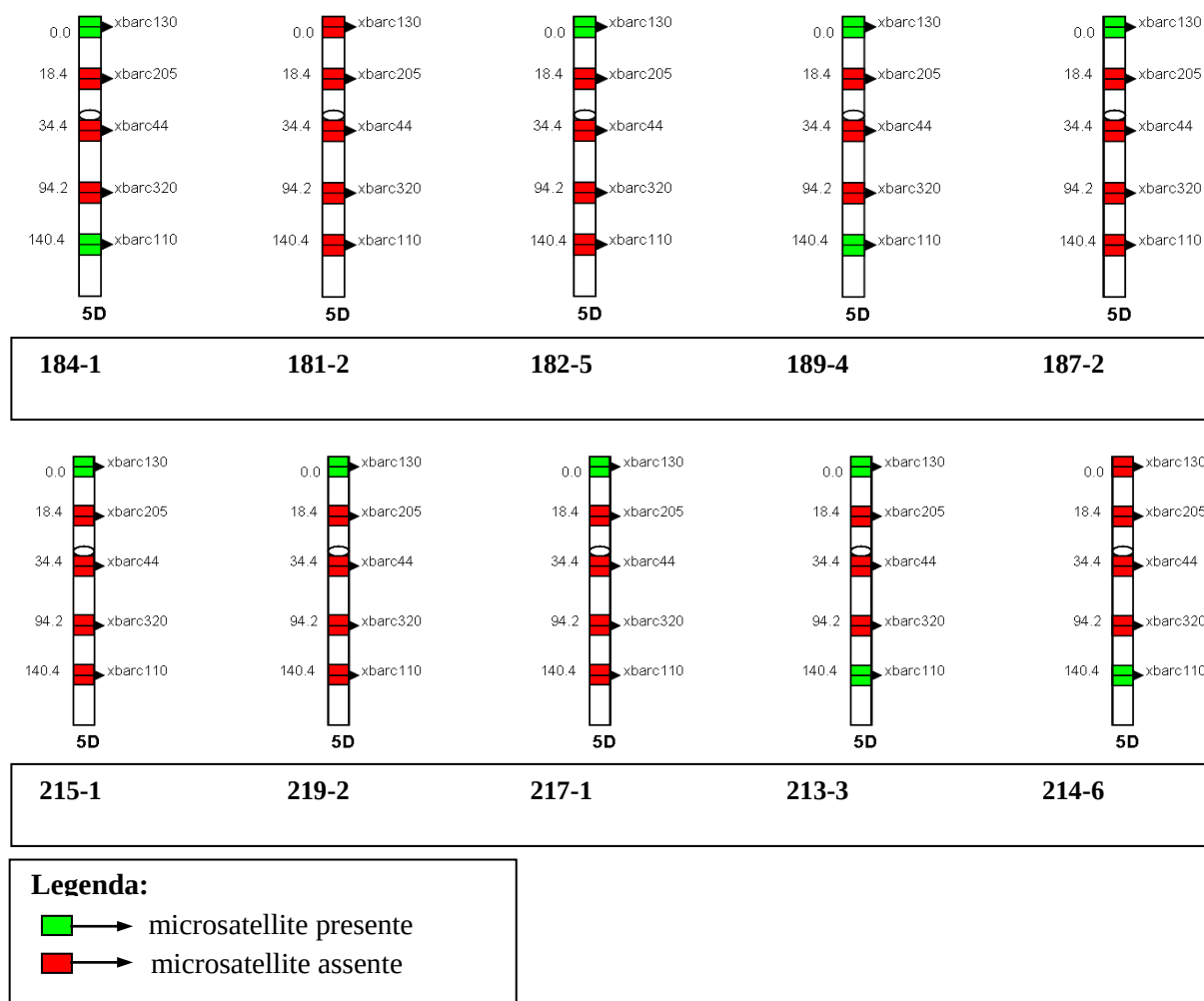


Figura 21: (A) PCR con primers per il microsatellite *Xbarc4* (cromosoma 5BS); (B) PCR con primers per il microsatellite *Xbarc151* (cromosoma 5AL). (1) Controllo negativo senza DNA; (2) Chinese Spring; (3) Langdon 5D(5B); (4) plantula della progenie della pianta 482-1; (5) Cappelli mutante (6) Colosseo.

4.1.4.2 Analisi PCR con marcatori molecolari SSR su 10 plantule F6 ricombinanti

L'analisi con i marcatori microsatellitari è stata estesa alla progenie F6 delle linee 482 e 504. In particolare, le cariossidi prodotte da 9 piante della linea 482 e da 8 piante della linea 504 sono state seminate in altrettante file F5 numerate da 181 a 189 (file derivate dalla linea 482) e da 213 a 220 (file derivate dalla linea 504).

A maturazione, dalle spighe di 10 piante delle file F5 è stato prelevato un seme e le plantule germinate da questi 10 semi (generazione F6) sono state utilizzate in esperimenti di amplificazione PCR con primers specifici per i micro satelliti. I risultati riguardanti i microsatelliti del cromosoma 5D sono riportati in Figura 22 .



Otto plantule su dieci hanno mostrato il microsatellite *Xbarc130* e il gene *Pina-D1a* (Figure 22 e 23). In tre di queste otto plantule è stata rilevata la presenza del microsatellite *Xbarc110* localizzato nella regione terminale del braccio lungo, nelle rimanenti cinque piante quest'ultimo SSR era assente.

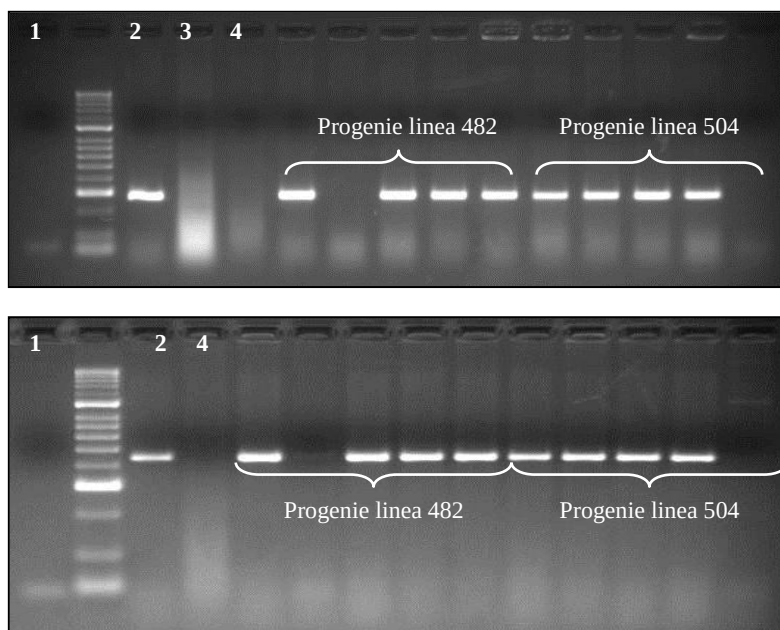


Figura 23:

Sopra: PCR con primers per il microsatellite *Xbarc130* su 5 plantule F6 appartenenti alla progenie delle linee 482 e 504.

Sotto: PCR con primers per *Pina-D1a*.

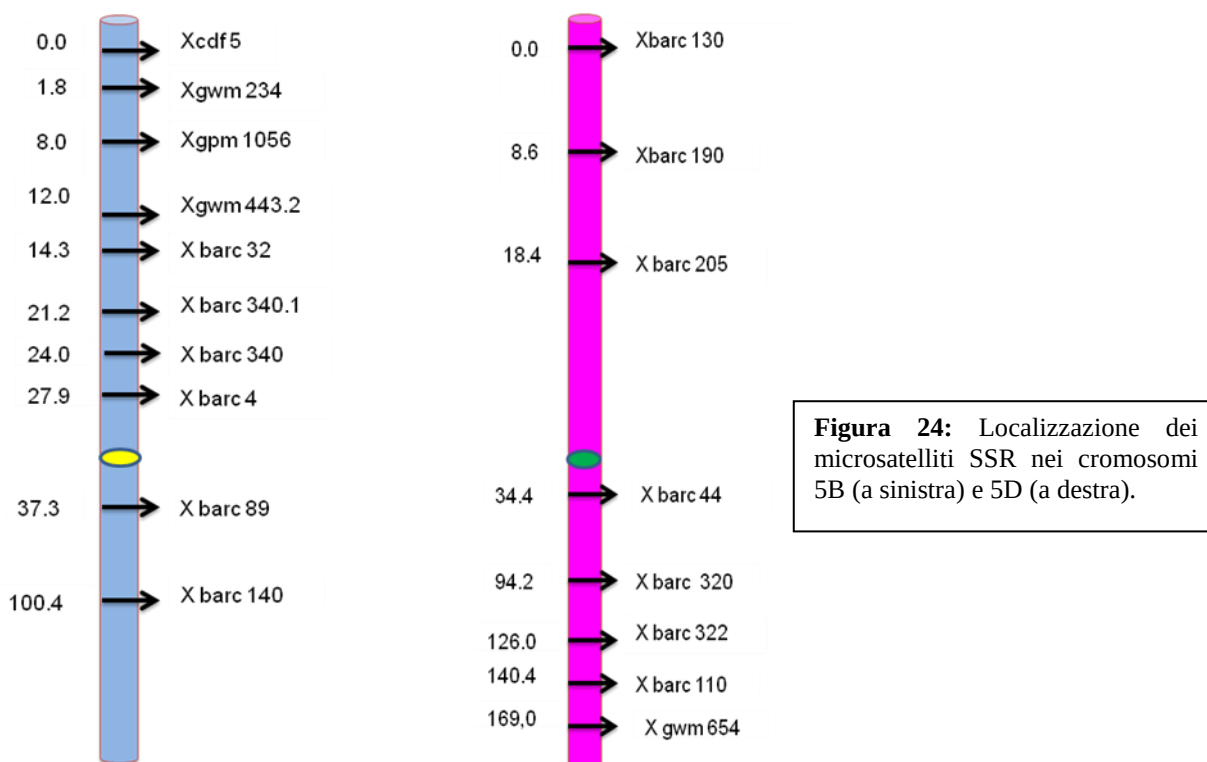
1: Controllo negativo senza DNA;
2: Chinese Spring (grano tenero soft);
3: Cappelli mutante ;
4: Colosseo

Come atteso, non sono stati ottenuti prodotti di amplificazione con i primers specifici per i microsatelliti intermedi. Infine, nella plantula derivata da 181-2 non è stata rilevata la presenza di nessuno dei cinque microsatelliti, mentre nella plantula derivata da 214-6 era presente solo il microsatellite *xbarc130*. Questi risultati indicano che le linee 482 e 504 derivano dall'autofecondazione di un individuo emizigote per gli SSR *Xbarc130* e *Xbarc110*, il quale ha prodotto gameti contenenti 0, 1 o 2 microsatelliti del cromosoma 5D.

Tenuto conto della distanza di mappa tra i microsatelliti *Xbarc130* e *Xbarc110*, nella progenie da autofecondazione di questo individuo emizigote erano attese piante con entrambi gli SSR, piante con uno solo di essi e piante senza SSR secondo il rapporto 9:3:3:1. Nel nostro campione di 10 plantule F6 il rapporto è stato 3:5:1:1.

I microsatelliti dei cromosomi 5A e 5B sono risultati tutti presenti nei campioni analizzati, con le stesse bande caratteristiche descritte nel paragrafo precedente.

L'analisi PCR è stata estesa ad altri 10 piante F6 derivate dalle linee 482 e 504 utilizzando altri SSR localizzati nei cromosomi 5D e 5B (Figura 24).

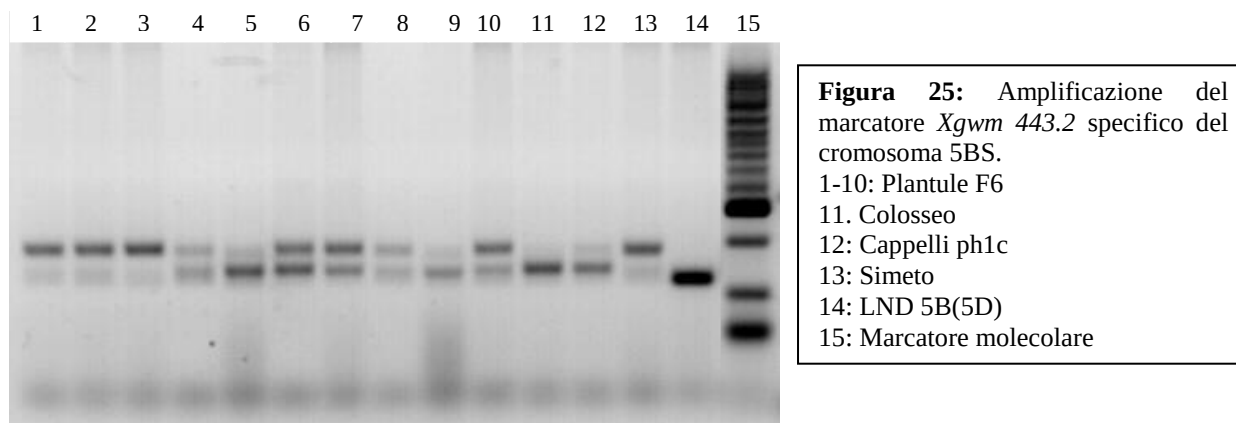


I microsatelliti compresi tra *Xbarc 205* (18.4 cM) e *Xbarc 322* sono risultati assenti in tutte le progenie analizzate, mentre in una sola pianta sono stati ottenuti ampliconi per *Xbarc 110* e *Xgwm 654* (169.0 cM). Otto plantule su dieci hanno mostrato il microsatellite *Xbarc130* (0.0 cM) e sette di queste linee presentavano anche il microsatellite *Xgwm 190* (8.6 cM) localizzato sul braccio corto del cromosoma 5D (Tabella 9). Il microsatellite *Xbarc130* strettamente associato al locus *Ha* contenente i geni puroindolici, era l'unico SSR del cromosoma 5DS presente in una pianta appartenente alla progenie della linea 504.

SSR	Progenie 482					Progenie 504				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Cromosoma 5DS										
<i>Xbarc 130</i> (0 cM)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>Xgwm 190</i> (8.6 cM)	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
Cromosoma 5BS										
<i>Xcdf 5</i> (0.0 cM)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Xgpm 1056</i> (8.0 cM)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Xgwm 443.2</i> (12.0 cM)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

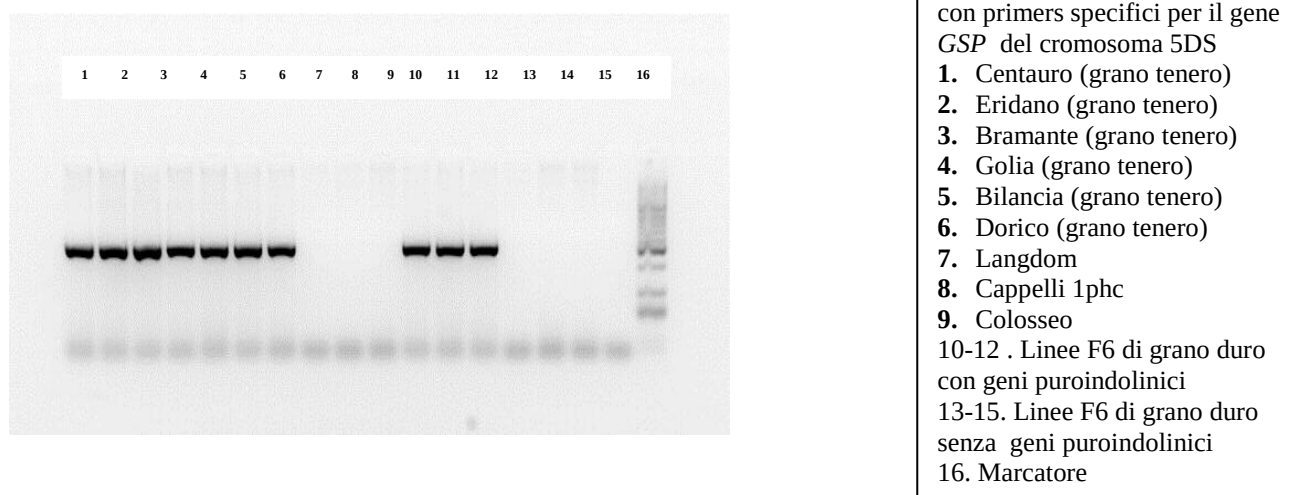
Tabella 9: Presenza (+) o assenza (-) di SSR in piante F6 derivate dalle linee ricombinanti 482 e 504

I primers specifici per i dieci SSR del cromosoma 5B hanno prodotto ampliconi delle dimensioni attese in tutte le plantule F6 analizzate. Inoltre, il micro satellite *Xgwm443.2* ha prodotto due ampliconi di intensità variabile nelle progenie F6 e nei loro parentali (Figura 25)



4.1.5 Sequenziamento

Tre linee F6 di grano duro contenenti i geni puroindolinici sono state sottoposte ad amplificazione PCR con primers specifici per il gene *GSP* (Grain Softness Protein) ottenendo un amplicone delle dimensioni attese (Figura 26). Il sequenziamento di questo amplicone e di quelli ottenuti nelle stesse linee F6 con i primers specifici per i geni *Pina-D1a* e *Pinb-D1a* ha fornito sequenze identiche a quelle dei rispettivi geni nella varietà di grano tenero Chinese Spring.



4.1.6 Allevamento e incrocio delle linee ricombinanti selezionate

Due linee F6 ricombinanti derivate dalla linea 482 ed una linea F6 ricombinante derivata dalla linea 504, tutte a cariosside soffice (vedi oltre) e contenenti i geni *Pina-D1a* e *Pinb-D1a* sono state moltiplicate in parcelle replicate di 10m² e messe a confronto con linee F6 sorelle a cariosside dura prive dei geni puroindolici. Le piante di queste linee si presentavano in campo estremamente omogenee sia per il colore delle reste (bianco) che per l'altezza (110±5 cm). Per ottenere un miglioramento delle linee sia dal punto di vista della riduzione della taglia che dell'allargamento del "background" genetico, due piante F6 appartenenti alla progenie della linea 482 sono state impollinate con il polline della varietà di grano duro "Simeto" e della varietà di grano duro "Svevo", entrambe caratterizzate da taglia ridotta, eccellente qualità pastificatoria ed elevata produttività (Figura 27).

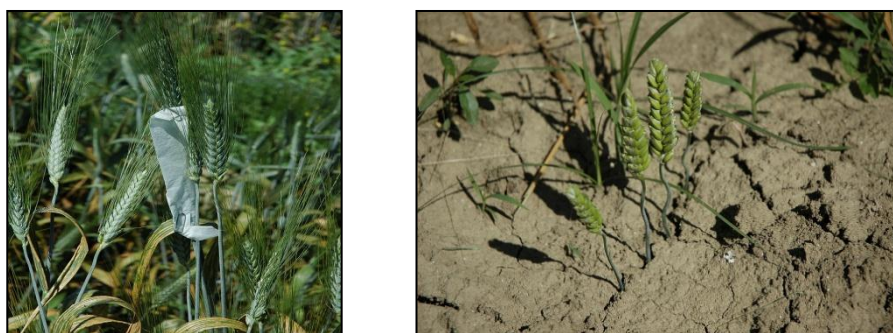


Figura 27: (A sinistra) spiga emasculata. La copertura della spiga è necessaria per impedire le impollinazioni indesiderate. (A destra) spighe delle varietà Simeto e Svevo in antesi pronte per il prelievo del polline.

4.2 CARATTERIZZAZIONE TECNOLOGICA

4.2.1 Analisi della tessitura della cariosside mediante SKCS delle linee di grano duro ricombinanti

La procedura nota come SKCS (Single Kernel Characterization System) misura la durezza della cariosside e ne stabilisce la tessitura. In base ai valori ottenuti con questo test le varietà di grano possono essere distinte in:

- supersoffici (valori inferiori a 14)
- soffici (valori compresi tra 20 e 45)
- moderatamente dure (valori compresi tra 55 e 70)
- dure (valori compresi tra 70 e 90)

Le varietà di grano duro, caratterizzate da cariosside a tessitura molto dura, hanno generalmente valori di SKCS compresi tra 80 e 100. La tessitura della cariosside è un carattere a forte determinazione genetica sulla quale tuttavia anche l'ambiente in senso lato (clima, temperatura, suolo, concimazione, malattie) esercita un certa influenza. In generale la deviazione standard è

compresa tra 10 e 15 punti SKCS per cui il coefficiente di variazione per le varietà a tessitura soffice o supersoffice è vicino a 50%, per quelle a tessitura hard è vicino a 15%. I valori di SKCS tendono a diminuire con la crescita del peso della cariosside e tendono ad aumentare con il crescere del contenuto proteico della cariosside stessa (Gazza *et al.* 2007).

Per valutare la tessitura delle cariossidi, 23 progenie F4 ottenute dagli incroci di linee di grano duro ricombinanti con cariossidi a tessitura soffice (LRS) con la varietà commerciale Colosseo sono state sottoposte ad analisi SKCS. Di queste 24 progenie, 18 erano “concordanti positive” (CP) contenenti le puroindoline, una era discordante, due erano “concordanti negative” (CN) e due erano CP ma prive di puroindoline (Tabella 10). Come campioni di riferimento (controlli) sono state utilizzate cariossidi di varietà commerciali di grano a tessitura nota quali il grano duro Colosseo ed i grani teneri Bolero (soffice), Mieti (moderatamente dura) ed Eridano (dura). All’interno dello stesso campione le cariossidi risultavano talvolta eterogenee per il valore di SKCS, come dimostrato dalle deviazioni standard piuttosto elevate. In particolare, con la sola eccezione del campione 2 proveniente dalla linea 343, tutti i campioni CP contenenti le puroindoline hanno dato valori medi di SKCS inferiori a 75, cioè minori di quelli del controllo Colosseo e dei campioni CN privi dei geni puroindolinici, con una variabilità di tessitura verosimilmente associata alla condizione omozigote o eterozigote dei geni stessi. D’altra parte, il campione 1 della linea 343 ha fornito valori di SKCS inferiori a 60, a dimostrazione che anche questa linea contiene piante a tessitura soft. Come atteso, i campioni CN e quelli discordanti hanno dato valori di SKCS vicini a quelli del parentale Colosseo, mentre due campioni CP senza puroindoline hanno fornito valori inferiori a 70, riscontrati anche in alcuni campioni CP contenenti le puroindoline.

Le quattro piante riportate in grassetto nella Tabella 10 sono state utilizzate per le analisi genetiche descritte precedentemente. In particolare le piante 482-1 e 504-1 derivano dalla famiglia 03/64-3, mentre le piante 543-1 e 546-1 derivano dalla famiglia 03/64-5 (vedi Tabella 8).

La Figura 28 riporta la distribuzione dei valori di SKCS riscontrati nelle cariossidi analizzate per ciascuna delle quattro piante selezionate per le analisi molecolari.

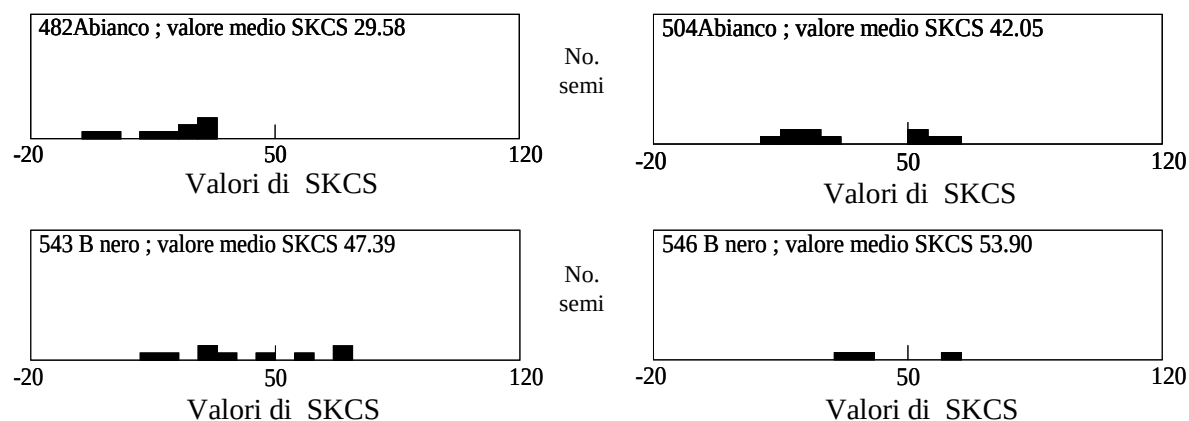


Figura 28: Distribuzione dei valori di SKCS nelle cariossidi ottenute dalle 4 piante scelte per le analisi molecolari.

4.2.2 Analisi qualitative su cariossidi della generazione F6

Dopo aver accertato la presenza dei geni puroindolinici nella progenie F6 attraverso l'analisi PCR (Vedi paragrafi precedenti) si è passati alla verifica della qualità tecnologica di queste linee ricombinanti. In particolare, le cariossidi F6 prodotte da 1-3 piante per ciascuna delle file F5 derivate dalle famiglie 482 e 504 sono state sottoposte a (i) test SKCS per determinare la tessitura, (ii) test di sedimentazione per stimare la qualità del glutine e (iii) micro-Kjeldhal per determinare il contenuto proteico.

Fila F4 e pianta	Valore SKCS	Deviazione standard	N° semi analizzati
320, pianta 1	71.47	8.1	10
343 , pianta 1	58.47	3.0	10
343 , pianta 2	80.24	12.2	10
443 , pianta 1	72.21	5.3	10
443 , pianta 2	62.89	7.3	10
447, pianta 1	50.22	7.6	2
482 , pianta 1	29.58	6.4	10
504 , pianta 1	42.05	5.3	10
514 , pianta 1	61.41	5.7	10
514 , pianta 2	71.95	3.5	2
530 , pianta 1	65.63	0.4	2
539 , pianta 1	63.15	12.0	10
533 , pianta 1	50.10	8.2	10
543 , pianta 1	47.39	8.9	10
546 , pianta 1	53.90	1.3	10
602 , pianta 1	52.75	6.2	10
606 , pianta 1	49.42	8.7	10
428 , pianta 1	70.01	7.4	10
363 , pianta 1	78.25	8.8	10
447 , pianta 1	91.70	1.1	2
460 , pianta 1	75.97	9.4	10
593 , pianta 1	61.09	9.0	10
516 , pianta 1	67.53	1.5	2
Colosseo	89.30	0.0	1
	94.71	15.01	10
	96.80	11.51	100
Bolero	26.98	2.55	2
	36.81	10.91	10
	36.67	14.34	100
Mieti	85.52	1.03	2
	77.30	13.22	10
	78.04	15.25	100
Eridano	102.26	0.87	2
	89.57	9.54	10
	101.22	13.99	100

Piante CP contenenti
Pin-A e Pin-B

Pianta discordante →

Piante CN

Piante CP senza puroindoline

Controlli

Tabella 10: Valori di SKCS delle piante prelevate dalle linee F4 ottenute dagli incroci LRS x Colosseo.

Per alcuni campioni non è stato possibile effettuare tutti e tre i test per mancanza di materiale.

I campioni in grassetto riportati nelle tabelle seguenti sono stati utilizzati anche nell'analisi dei marcatori satellitari descritta nel paragrafo precedente.

Il test di sedimentazione (Tabella 11 e Fig. 29) ha messo in evidenza una elevata qualità del glutine in tutte le progenie analizzate. In particolare, rispetto alla varietà commerciale Colosseo (volume

medio = 2,8 ml) i campioni hanno mostrato volumi di sedimento nettamente maggiori (media della famiglia 482 = 6,1 ml ; media della famiglia 504 = 5,5 ml) e simili tra loro all'interno della stessa famiglia (deviazione standard per la famiglia 482 : 0,6 ml; deviazione standard per la famiglia 504: 0,5 ml). La deviazione standard per tutti i campioni è risultata uguale a 0,6 ml, a dimostrazione che le progenie delle famiglie 482 e 504 sono simili tra di loro per la qualità del glutine.

Piante F5	Volume di sedimentazione (ml)	Piante F5	Volume di sedimentazione ml
	Dalla linea 482		Dalla linea 504
181-2	6,1	213-3	6,0
181-4	6,3	214-4	6,3
182-5	6,3	215-2	5,0
183-1	6,5	216-5	5,3
184-3	6,2	217-3	5,5
185-1	6,4	218-4	5,0
186-3	5,9	219-2	5,6
187-2	6,7		
188-8	5,5	Colosseo	2,8
189-4	4,7		

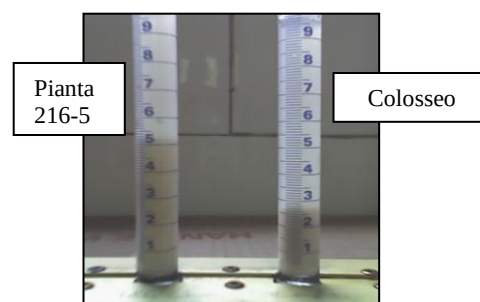
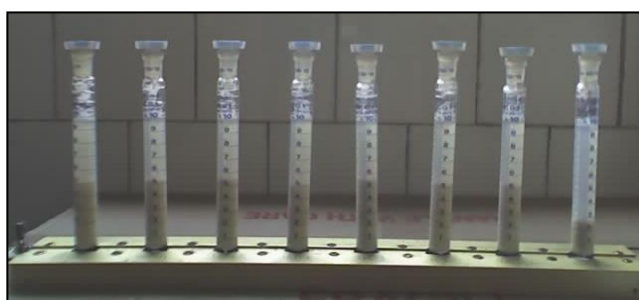


Figura 29: Test di sedimentazione su cariossidi F6 derivate dalle linee 482 e 504

Come atteso l'analisi SKCS condotta sulle cariossidi F6 ha mostrato che gran parte delle progenie delle famiglie 482 e 504 ha una tessitura *soft*, anche se alcuni campioni hanno fornito valori di SKCS tipici di genotipi *hard*, confermando i risultati ottenuti con i marcatori SSR (Tabella 12).

Linea	SKCS medio	Deviazione standard	CV %	Linea	SKCS medio	Deviazione standard	CV %
<i>Da famiglia 482</i>				<i>Da famiglia 504</i>			
181-2	94,4	13,2	14,0	213-1	82,7	22,6	27,3
181-4	90,7	11,8	13,0	213-3	<u>43,0</u>	10,4	24,2
181-5	90,3	11,8	13,0	214-3	89,2	10,8	12,0
182-2	<u>33,6</u>	11,9	35,5	214-4	91,8	10,4	11,4
182-4	<u>38,8</u>	11,7	31,2	215-1	67,4	19,0	28,1
182-5	<u>34,9</u>	11,4	32,7	215-2	61,3	24,1	39,4
183-1	<u>34,0</u>	11,1	32,6	215-5	64,0	25,5	39,8
184-1	<u>25,6</u>	10,3	40,3	216-1	87,7	12,1	13,8
184-3	61,0	23,9	39,2	216-5	87,5	11,5	13,1
184-4	64,0	20,3	31,7	217-1	<u>33,6</u>	12,0	35,7
185-1	89,9	13,6	15,1	217-3	<u>39,3</u>	10,9	27,6
186-3	92,2	12,1	13,2	218-1	<u>39,6</u>	12,4	31,1
186-4	68,0	21,7	32,0	218-4	<u>35,7</u>	11,7	32,9
187-2	<u>36,6</u>	12,5	34,1	219-2	69,1	21,6	31,3
187-4	<u>30,3</u>	9,5	31,4	219-4	64,6	25,6	39,7
187-5	<u>28,7</u>	9,7	33,5	220-1	<u>35,0</u>	14,5	41,4
188-7	65,7	22,6	34,4				
188-8	54,0	28,4	52,7	Colosseo	87,88	14,16	16,11
189-2	<u>36,6</u>	12,5	34,3	Bilancia	25,56	13,32	52,10
189-4	<u>33,1</u>	12,3	37,3				

Tabella 12 : Valori di SKCS delle progenie F6 delle famiglie ricombinanti 482 e 504. Le progenie caratterizzate per i marcatori microsatellitari sono riportate in grassetto. I valori di SKCS delle piante a tessitura *soft* sono sottolineati. Bilancia è una varietà di grano tenero *soft*.

La Tabella 12 mostra che 10 progenie derivate dalla linea 482 e 6 progenie derivate dalla famiglia 504 sono probabilmente omozigoti per i geni puroindolinici, come dimostrato dal basso valore di

SKCS (da 25,59 a 43,02) e dalla ridotta deviazione standard (da 9,51 a 12,54) (valori sottolineati), mentre 9 progenie con valori di SKCS superiori a 87 sono verosimilmente omozigoti per l'assenza dei geni puroindolici, come dimostrato dai ridotti valori di deviazione standard (da 10,8 a 13,6). Le rimanenti 11 progenie presentavano valori di SKCS compresi tra 54,0 e 69,1 (con l'eccezione della progenie 213-1 con SKCS = 89,7) ed elevati valori di deviazione standard (20,3 – 28,4), suggerendo la presenza di cariossidi a tessitura variabile a seguito di eventi di segregazione a carico dei loci puroindolici. I grafici riportati nella Figura 30 mostrano la distribuzione dei valori di SKCS osservati in alcuni campioni rappresentativi.

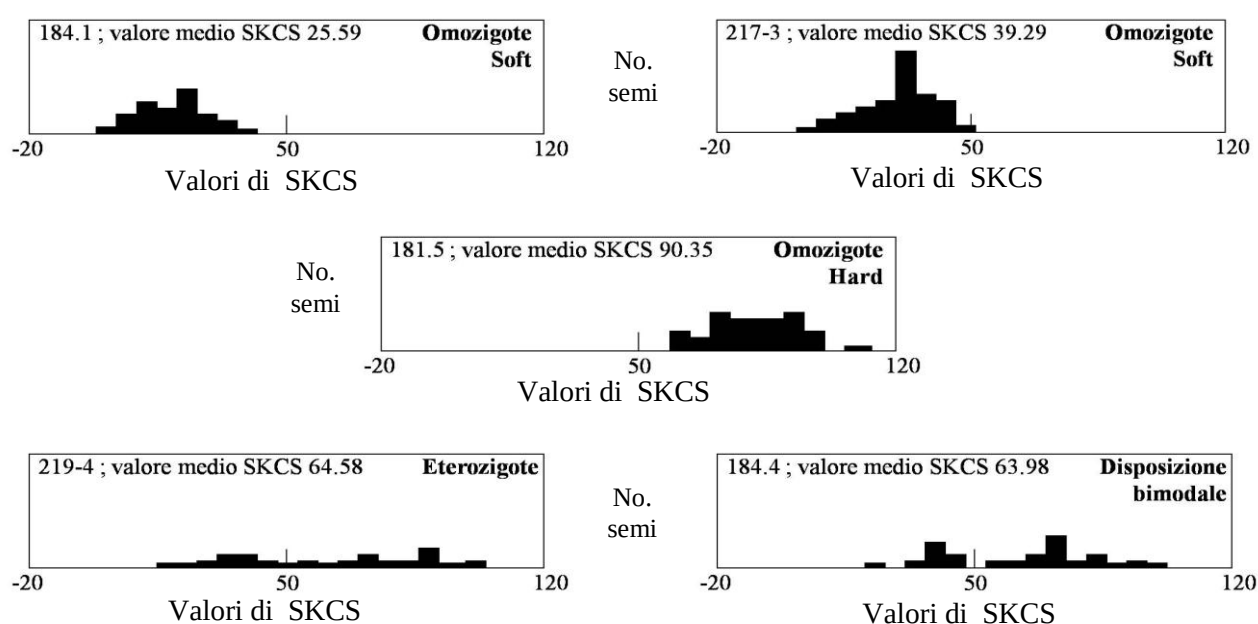


Figura 30: Distribuzione dei valori di SKCS in alcuni campioni F6.

L'analisi delle cariossidi con la metodica "Micro-Kjeldhal" ha fornito un contenuto proteico medio molto elevato (15,7%) e valori superiori a 14% nella maggior parte delle 15 progenie analizzate (Tabella 13). Il coefficiente di variazione (CV) è risultato inferiore all'8%, a dimostrazione della relativa uniformità delle progenie analizzate. Nelle progenie a tessitura *soft*, tre campioni su sette hanno mostrato contenuti proteici uguali o superiori alla media.

Piante F5	Contenuto proteico %	Piante F5	Contenuto proteico %
<i>Da famiglia 482</i>		<i>Da famiglia 504</i>	
181-2	16,3	<u>213-3</u>	16,2
181-4	16,1	215-2	16,4
<u>182-5</u>	15,7	216-5	17,3
<u>183-1</u>	14,9	<u>217-3</u>	16,1
184-3	18,2	<u>218-4</u>	14,3
185-1	16,0	<i>Media</i>	15,7
186-3	15,7	<i>Dev std</i>	1,2
<u>187-2</u>	14,1	<i>CV%</i>	7,6

Tabella 13: Contenuto proteico delle progenie F6 delle linee 482 e 504. I valori sono espressi in percentuale su cariossidi ad una umidità del 13% circa. Le piante usate nell'analisi PCR sono riportate in grassetto. Le progenie *soft* sono sottolineate.

4.2.3 Analisi tecnologiche su cariossidi F7

Due linee F6 derivate dalla linea 482 ed una linea F6 derivata dalla linea 504, tutte a cariosside soffice e contenenti i geni *Pina-D1a* e *Pinb-D1a* sono state moltiplicate in parcelle replicate di 10 m² e messe a confronto con tre linee F6 sorelle a cariosside dura prive dei geni puroindolici. Il disegno sperimentale era un blocco randomizzato con tre repliche. La parcella elementare di 10 m² consisteva di 8 file con 400 semi germinabili /m². Sulle singole parcelle sono stati stimati quattro parametri agronomici (produzione, altezza delle piante, data di spigatura e peso ettolitrico). Altri parametri sono stati stimati dopo aver riunito la produzione delle tre repliche (Tabella 14). Non sono state osservate differenze significative per resa produttiva, tempo di spigatura e peso ettolitrico tra le linee a tessitura *soft* e le loro linee sorelle a tessitura *hard*. Tutte le linee erano caratterizzate da un'altezza superiore a 120 cm. Rispetto al parentale Colosseo coltivato in parcelle adiacenti, le linee hanno dato una produzione inferiore del 10% circa. Inoltre le linee a cariosside soffice non si distinguevano da quelle a cariosside dura per peso specifico, peso dei 1000 semi e Falling Number. Invece, l'indice SKCS delle linee *soft* è risultato inferiore a 20, molto più basso di quello delle linee *hard* (>76). Inoltre, le linee *soft* hanno mostrato un incremento di circa il 25% nel volume di sedimentazione rispetto alle loro linee sorelle a tessitura *hard*.

La resa in farina delle cariossidi macinate con il mulino sperimentale Bona è risultata molto variabile. In particolare, le linee *soft* hanno mostrato una resa (>68%) significativamente superiore a quella delle linee *hard* (< 55%). Come atteso, la tessitura delle cariossidi ha avuto un forte impatto sull'assorbimento idrico al test farinografico. In particolare, la quantità d'acqua assorbita dalle linee *hard* è risultata più elevata (circa 23% in più) di quella delle linee *soft*, verosimilmente come conseguenza del maggior danneggiamento dell'amido nel macinato delle linee a cariosside dura.

Inoltre la stabilità farinografica delle linee *hard* è risultata decisamente inferiore a quella delle linee *soft*, probabilmente a seguito della incapacità dell'amido danneggiato di trattenere tutta l'acqua assorbita. Anche l'indice di tolleranza al mescolamento (MTI) è risultato significativamente più basso nelle linee *hard*, mentre il Tempo di Sviluppo dell'impasto è risultato piuttosto basso in tutte le linee analizzate.

Carattere	Linee soft ^a	Linee hard ^b	t-test	
			Value	df
Produzione(t/ha)	5.7±0.6	5.8±0.5	0.3 ns	16
Altezza pianta (cm)	120±2.0	122±1.6	0.3 ns	16
Spigatura (days) ^c	28±3.6	29±3.1	1.6 ns	16
Peso ettolitrico (Kg)	80.0±0.1	80.1±0.2	0.5 ns	16
Peso semi (g)	44.8±1.8	44.1±1.5	0.2 ns	4
SKCS	19.9±6.0	76.8±1.2	23.4**	4
Contenuto proteico (%)	15.6 ±0.1	15.4±0.2	1.2 ns	4
Vol. sedimentazione (ml)	79±1.5	64±2.0	12.6**	4
Falling number (s)	515±39.5	497±5.9	1.4 ns	4
Resa in farina (%)	68.1±1.4	54.4±0.6	30.5**	4
<i>Alveografo</i>				
W (J x 10 ⁻⁴)	221±19.1	291±12.4	4.3**	4
P (mm)	64±0.6	97±13.3	4.3**	4
L (mm)	104±9.3	90±12.7	0.8 ns	4
P/L	0.6±0.1	1.1±0.3	2.3*	4
<i>Farinografo</i>				
Tempo sviluppo (min)	1.5±0.2	1.5±0.1	0.0 ns	4
Stabilità (min)	6.8±0.6	4.4±0.1	2.3*	4
MTI (BU)	42±2.0	68±2.5	3.1*	4
Assorb. idrico (%)	53.6±0.1	66.7±0.2	10.6**	4

Tabella 14: Media e DS per alcuni caratteri agronomici e qualitativi condotti su linee di grano duro con tessitura soffice della cariosside a confronto con linee a tessitura dura

^aTre linee F6 a cariosside soffice ; ^b Tre linee F6 a cariosside dura; ^c Numero di giorni dal 1 Aprile;

Le linee a tessitura soffice si differenziavano nettamente da quelle a tessitura dura per tutti i parametri alveografici. In particolare, i parametri P e W che misurano l'elasticità e la "forza" (energia richiesta per gonfiare la bolla alveografica) erano significativamente più elevati nelle linee a tessitura dura rispetto a quelle a tessitura soffice. Al contrario, le linee hard mostravano valori di L (parametro che misura l'estensibilità dell'impasto) più bassi di quelli delle linee soft con conseguente elevato rapporto P/L, un parametro che stima il rapporto tra elasticità ed estensibilità.

5. DISCUSSIONE

5.1 Geni *Pina-D1a* e *Pinb-D1a* e loro espressione in linee di grano duro

L'amplificazione PCR con primers specifici per i geni *Pina-D1a* e *Pinb-D1a* e la separazione elettroforetica A-PAGE delle proteine estratte dai granuli di amido delle cariossidi F5 derivate dagli incroci tra la varietà di grano duro Colosseo e 11 linee tetraploidi LRS con cariossidi a tessitura soffice ha permesso di identificare quattro gruppi di progenie:

- 1. Progenie contenenti i geni *Pina-D1a* e *Pinb-D1a* ed entrambe le puroindoline.
- 2. Progenie contenenti i geni *Pina-D1a* e *Pinb-D1a* ma prive di puroindoline .
- 3. Progenie con il gene *Pina-D1a* ma prive di *Pinb-D1a* e di puroindoline legate all'amido .
- 4. Progenie prive di *Pina-D1a*, *Pinb-D1a* e puroindoline (progenie CN)

La prevalenza di linee di tipo 1, 2 o 4 rispetto alle linee di tipo 3 (complessivamente 66 su 81) è in accordo con la stretta concatenazione tra i geni puroindolinici *Pina-D1a* e *Pinb-D1a* (Morris 2002). Inoltre, a conferma del legame tra i due prodotti genici, dall'analisi elettroforetica A-PAGE emerge che la presenza/assenza delle due puroindoline a livello dei granuli d'amido riguarda entrambe le proteine e mai una soltanto. Anche la quantità relativa di Pin-A e Pin-B associata ai granuli di amido nelle progenie di tipo 1 (Fig. 10 e 12) è risultata simile a quella osservata (circa 6:5, rispettivamente per Pin-A e Pin-B) nelle varietà di grano tenero a tessitura soft (Gazza *et al.* 2007). Complessivamente 30 su 49 piante contenenti entrambi i geni puroindolinici non mostravano tracce di puroindoline sui granuli d'amido. Una parte di questi casi potrebbe essere dovuta al campionamento effettuato per le analisi PCR ed A-PAGE. Infatti, considerato che molte piante F4 erano emizigoti per i geni puroindolinici, le plantule F5 della loro progenie sottoposte all'analisi PCR potevano avere una composizione genotipica diversa da quella delle cariossidi F5 utilizzate per l'estrazione delle puroindoline da frazionare mediante elettroforesi A-PAGE. Sebbene per quest'ultima analisi siano state utilizzate almeno 4 cariossidi, rimane una certa probabilità che dalla progenie da autofecondazione di un individuo emizigote per *Pina-D1a* /*Pinb-D1a* si possa estrarre un campione di 4 cariossidi prive di questi geni e, pertanto, di puroindoline A e B. Questa probabilità è uguale a p^4 , dove p è la frequenza attesa di individui privi di *Pina-D1a* *Pina-D1a* /*Pinb-D1a* nella progenie dell'individuo emizigote. Il fatto che le progenie di alcune piante prive di puroindoline associate ai granuli di amido, abbiano tuttavia dato valori di SKCS (61-68) tipici di campioni misti *soft/hard*, sembra confermare la validità dell'ipotesi del campionamento. Tuttavia,

l'elevata frequenza di campioni senza puroindoline tra le progenie con entrambi i geni puroindolinici (61%, Figura 11) suggerisce che altri fenomeni, come ad esempio effetti di posizione (eterocromatinizzazione) associati al punto di inserimento di *Pina-D1a* e *Pinb-D1a* all'interno del cromosoma omeologo ospitante, possano avere influito sulla espressione dei geni puroindolinici nelle linee ricombinanti qui analizzate. In ogni caso, è evidente che il background genetico tetraploide non è incompatibile di per sé con una completa espressione di questi geni.

Un altro gruppo particolare è quello delle piante di tipo 3 in cui si osserva un prodotto di amplificazione PCR per il gene *Pina-D1a* ma nessun amplicone per *Pinb-D1a*. Si tratta di un gruppo abbastanza numeroso (circa 1/5 delle progenie analizzate, Figura 11) in cui si trovano molte plantule che hanno dato ampliconi molto intensi. I tentativi di sequenziamento degli ampliconi ottenuti dalle plantule D sono tutti falliti, non permettendo di trarre conclusioni sulla natura genetica di queste linee particolari. In questo contesto può essere importante ricordare che nel braccio lungo del cromosoma 5D è stata individuata una sequenza non espressa identica a *Pina-D1a* salvo che per una breve regione all'estremità 5' dell'OPR (Gazza *et al.* 2003).

Tutte le progenie di tipo 3 contenevano granuli d'amido privi di entrambe le puroindoline. Pertanto, se si assume che le progenie di tipo 3 siano in realtà prive dei geni *Pina-D1a* e *Pinb-D1a*, la segregazione osservata tra linee contenenti *Pina-D1a* e *Pinb-D1a* e linee prive di questi geni è 49 : 32, non molto diversa da quella attesa (9:7, cioè per 81 campioni, 45,6 : 35,4) per una popolazione F4 derivata da individui emizigoti per *Pina-D1a* e *Pinb-D1a*, fatto che suggerisce una trasmissione ereditaria regolare di questi geni sia per via maschile che per via femminile.

5.2 Proteine di riserva e qualità del glutine in linee di grano duro contenenti i geni puroindolinici

L'analisi elettroforetica A-PAGE e SDS-PAGE delle proteine di riserva di 17 progenie F5 contenenti le puroindoline A e B ha dimostrato in 16 di esse (Figure. 16 e 17) la presenza della γ -gliadina 45 e della ω -gliadina 35 associate alla buona qualità del glutine (Damideaux *et al.*, 1978; Pogna *et al.* 1990). Tutte le 17 progenie sono risultate omozigoti per la composizione in subunità gluteniniche HMW, mostrando la coppia "6+8" ereditata da Langdon 5D(5B) o la coppia "13+16" ereditata da Colosseo (Fig. 14). Come atteso, questo materiale non presenta la coppia di subunità gluteniniche "7+8" notoriamente associata ad un glutine tenace (Pogna *et al.* 1990) in quanto nessuno dei genotipi parentali contiene questa particolare composizione. Per questa ragione, due piante *soft* derivate dalla famiglia 482 sono state incrociate con le varietà commerciali di grano duro Svevo e Simeto, entrambe portatrici delle subunità "7+8". La buona qualità del glutine delle progenie F6 delle famiglie 482 e 504 dimostrata dagli elevati volumi (>4,5 ml) ottenuti nel test di sedimentazione (Tabella 11) è in perfetto accordo con la loro particolare composizione in proteine

di riserva. Tuttavia, gli elevati valori di sedimentazione sono anche dovuti al contenuto proteico particolarmente alto osservato in tutte le progenie F6, incluse quelle a tessitura *soft* (Tabella 13).

Per ciò che riguarda la tessitura delle cariossidi, 18 delle progenie F5 contenenti le puroindoline hanno fornito valori medi di SKCS inferiori a quelli del parentale Colosseo e delle progenie prive di puroindoline (Tabella 10). Tuttavia la maggior parte di esse ha mostrato valori di durezza caratteristici di una popolazione eterogenea costituita da cariossidi a tessitura variabile da *soft* ad *extra-hard*, cioè di una popolazione ancora in segregazione per i geni puroindolinici. D'altra parte, nelle progenie F6 delle piante derivate dalle famiglie 482 e 504 (Tabella 12), 16 piante su 36 hanno dato valori di SKCS tipici di individui *soft* omozigoti per i geni *Pina-D1a* e *Pinb-D1a*, come suggerito dal basso valore della media e della deviazione standard. Il valore medio di SKCS di queste progenie (34,9) è equivalente a quello osservato in molte varietà commerciali italiane a tessitura *soft* (Corona *et al.* 2001).

In molte aree mediterranee caratterizzate da bassa piovosità ed alte temperature, il grano duro è preferito al grano tenero per la suo migliore adattamento. I cambiamenti climatici in corso potrebbero estendere le aree esposte a siccità ed alte temperature e pertanto favorire la diffusione della coltivazione del grano duro. Questa specie è nettamente preferita per la produzione di pasta e cous-cous ma è anche utilizzata per la produzione di pane. Per quest'ultimo impiego, il grano duro sembra inferiore al grano tenero a causa della scarsa estensibilità e della elevata tenacità degli impasti ottenuti dai macinati di grano duro, con effetti negativi sul volume e l'alveolatura del pane.

L'assenza del cromosoma 5DS nel grano duro determina una tessitura molto dura delle sue cariossidi (Pogna *et al.*, 2002) e può essere considerata in parte responsabile della ridotta qualità panificatoria di questa specie. Le tre linee F6 omozigoti per la presenza dei geni puroindolinici allevate in parcelle replicate (Tabella 14) hanno dimostrato che la ridotta sofficità delle loro cariossidi ha un forte impatto su diversi caratteri qualitativi di interesse tecnologico. Ad esempio, la resa in farina di queste linee *soft* è di oltre il 23% superiore a quella delle loro controparti a tessitura *hard*. Inoltre la sofficità delle cariossidi determina una forte riduzione della tenacità dell'impasto (P alveografico), del rapporto P/L e dell'assorbimento idrico durante le fasi di impastamento.

L'inferiore grado di danneggiamento dell'amido caratteristico delle cariossidi a tessitura *soft* spiega anche il più elevato indice di stabilità farinografica e la maggiore "mixing tolerance", entrambe correlate con il ridotto assorbimento idrico.

5.3 Analisi PCR delle progenie F5 e F6 con i marcatori molecolari SSR

Lo studio di 4 progenie F5 di cui due (482.1 e 504.1) derivate dalla famiglia 03/64.3 e due (543.1 e 546.1) derivate dalla famiglia 03/64.5 ha dimostrato la presenza di prodotti di ricombinazione

allosindetica assai diversi tra loro per l'estensione dei segmenti del cromosoma 5D. In particolare, nelle progenie F6 delle famiglie 482 e 504 sono stati riconosciuti quattro genotipi caratterizzati dall'assenza di tre marcatori interni del cromosoma 5D (*Xbarc44*, *Xbarc205* e *Xbarc320*) e dalla presenza di 0, 1 o 2 marcatori terminali (*Xbarc110* e *Xbarc130*) sul braccio lungo di questo cromosoma. Ciò è atteso nella progenie da autofecondazione di un individuo emizigote per la presenza degli SSR *Xbarc110* e *Xbarc130* e privo degli SSR *xbarc44*, *xbarc205* e *xbarc320*. Questo individuo è frutto di eventi di ricombinazione allosindetica che hanno trasferito le regioni terminali dei bracci 5DL e 5DS su un cromosoma omeologo, verosimilmente il cromosoma 5B.

Di particolare interesse è una progenie F6 della linea 504 in cui è presente soltanto il microsatellite *Xbarc130* strettamente associato al locus *Ha*, mentre mancano tutti gli altri marcatori associati al cromosoma 5D. Come atteso, tutte le linee di grano duro contenenti i geni puroindolinici hanno dato l'atteso prodotto di amplificazione quando sono state amplificate con i primer specifici per il gene GSP specifico per il cromosoma 5D. Le piante F6 omozigoti per i geni puroindolinici appartenenti alle famiglie 482 e 504 sono state sottoposte ad amplificazione con primers specifici per SSR localizzati nei cromosomi 5BS e 5BL. I marcatori SSR del cromosoma 5B del parentale Colosseo sono risultati diversi da quelli presenti nei parentali Langdon5D(5B) e Cappelli mutante e sono stati ritrovati nelle plantule F6 derivate dalle famiglie 482 e 504, suggerendo che gran parte del cromosoma 5B di Cappelli mutante, che è privo del locus *Ph₁* (Giorgi 1978), è assente in queste plantule, garantendone così la stabilità genetica e la fertilità. Tuttavia questa analisi non ha messo in evidenza la mancanza di nessuno degli SSR specifici per il cromosoma 5B, mancanza associabile ad un evento di ricombinazione allosindetica tra i cromosomi 5DS e 5BS.

5.4 Conclusioni

Le progenie delle famiglie 482 e 504 contenenti i geni puroindolinici in condizione omozigote e caratterizzate da valori di SKCS tipici dei grani teneri a tessitura *soft* costituiscono un materiale vegetale unico assente in natura, frutto di un programma di ingegneria cromosomica basato sulla ricombinazione allosindetica indotta in grano duro attraverso la rimozione del gene *Ph₁*. Gli effetti che la modificazione della tessitura della cariosside hanno su queste linee di grano duro sono numerosi e riguardano la qualità molitoria (aumento della resa in farina, riduzione dell'energia e dei tempi di macinazione, risparmio di acqua per il condizionamento del grano in pre-macinazione, ecc.), la granulometria dei macinati, il livello di danneggiamento dell'amido delle farine e semole. Dal ridotto danneggiamento dell'amido deriva un ridotto assorbimento idrico dei macinati per formare impasti a consistenza ottimale (Dubreil et al. 1998). Recenti studi condotti su due linee quasi isogeniche a tessitura contrastante (*soft* e *hard*) isolate all'interno della varietà commerciale di

grano tenero Enesco hanno dimostrato gli effetti delle puroindoline su numerosi parametri reologici degli impasti (Gazza *et al.* 2007b). Le linee ricombinanti analizzate in questa tesi forniranno materiale per sviluppare varietà di grano duro da destinare alla produzione di pane e pasta. Per ciò che riguarda la produzione di pasta è noto che meno acqua si aggiunge al macinato migliore è la resa sia in termini di quantità che di qualità del prodotto. Inoltre, le varietà di grano duro con le caratteristiche di sofficietà riscontrabili solo in grano tenero consentiranno lo sviluppo di prodotti alimentari fino ad ora esclusivi del grano tenero, come biscotti e fette biscottate. Per entrambe le utilizzazioni, l'aumentata resa di macinazione delle linee di grano duro a tessitura soft costituisce un certo vantaggio economico.

Un'altra applicazione di questi grani duri a tessitura soft riguarda il miglioramento genetico dei grani teneri attraverso l'aumento del dosaggio genico delle puroindoline. Piante F1 ottenute dall'incrocio di un genotipo *soft* di grano tenero con un genotipo ricombinante di grano duro con i geni *Pina-D1a* e *Pinb-D1a* sono state reincrociate con il parentale esaploide allo scopo di raddoppiare il numero di geni puroindolinici. Ciò consentirà di sviluppare varietà di grano tenero a tessitura "super soft" senza ricorrere alla transgenesi, certamente superiore per efficienza e velocità di applicazione alle tecniche classiche di miglioramento genetico, ma attualmente osteggiata dall'opinione pubblica (Hogg *et al.* 2005; See *et al.* 2004).

Ci sono evidenze che dimostrano che durante la filogenesi del grano sono comparsi frumenti appartenenti alla specie *T. turgidum* contenenti puroindoline codificate da geni portati dai cromosomi 5A e 5B. Tuttavia questi geni sono andati perduti a causa di delezioni indotte da elementi mobili appartenenti alla famiglia dei retrotrasposoni (Chantret *et al.* 2005). L'attività illustrata in questa tesi ha "semplicemente" reinstaurato una condizione ancestrale che peraltro è stata mantenuta nella specie tetraploide *Aegilops ventricosa* con genoma DDNN, specie imparentata con il grano duro (Gazza *et al.* 2006).

6. BIBLIOGRAFIA

- Akerberg, A. K., Liljeberg, H. G., Granfeldt, Y. E., Drews, A. W., & Bjorck, I. M. , (1998). “*An in vitro, based on chewing, to predict resistant starch content in foods allows parallel determination of potentially available starch and dietary fiber*”. J. Nutr, **128** (3) : 651-660.
- Bechtel, D. B., and Wilson, J. D. (1997). “*Ultrastructure of developing hard and soft red winter wheats after air- and freeze-drying and its relationship to endosperm texture*”. Cereal Chem. **74**:235-241.
- Angelo Bianchi, Carlo Lorenzoni, e Francesco Salamini (1989). “*Genetica dei cereali*”. Edagricole 42-45.
- J.E. Blochet, C. Chevalier, E. Forest, E. Pebay-Peyroula, M.F. Gautier, P. Joudrier, M. Pézole, D. Marion (1993). “*Complete amino acid sequence of puroindoline, a new basic and cystine-rich protein with a unique tryptophan-rich domain, isolated from wheat endosperm by Triton X-114 phase partitioning*”. FEBS Lett. **329**:336–340.
- Bloksma, A.H. and Bushuk, W. 1988. “*Rheology and chemistry of dough. Wheat: Chemistry and Technology*”, Vol. 2, (Y. Pomeranz, ed.) pp. 131-217, American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN.
- Blueon A., Colonna P., Leloup V. 1990. “*Les amidons et leurs derives dans les industries des cereales* » . I.I.A. (6), 515.
- Boggini G e Pogna NE (1989). “*Breadmaking quality and storage protein composition of Italian durum wheat*”. J Cereal Science **9**: 131-138.
- F. Bonciarelli e U. Bonciarelli (1998). “*Coltivazioni erbacee*”. Edagricole 3-37.
- Borghi, B., Castagna, R., Corbellini, M., Heun, M., Salamini, F. (1996). “*Breadmaking quality of einkorn wheat (Triticum monococcum ssp. Monococcum)*”. Cereal Chemistry **73**: 208-214.
- Broekaert, W.F., Cammue, B.P.A., De Bolle, M.F.C., Thevissen, K., De Samblanx, G.W. and Osborn, R.W. (1997). “*Antimicrobial peptides from plant*”. Crit. Rev. Plant Sci. **16**: 297-323.
- Maura Bonoli, Guido Cipriani, Laura Manzecchi, Walther Faedi (2005). “*Impiego di marcatori molecolari microsatelliti nella caratterizzazione varietale della fragola*”. Frutticoltura - n. **4**:30-32.
- Campbell, K.G., C.J. Bergman, D.G. Gualberto, J.A. Anderson, M.J. Giroux, G. Hareland, R.G. Fulcher, M.E. Sorrels, and P.L. Finney (1999). “*Quantitative Trait Loci associated with kernel traits in a Hard wheat cross*”. Crop Sci. **39**:1184–1195.
- Campos, F.A.P. e Richardson, M., (1983). “*The complete amino acid sequence of the bifunctional α -amylase/trypsin inhibitor from seeds of ragi (Indian finger millet; Eleusine coracana Goertn)*”. FEBS Lett **152**: 300-304.
- Cannella C., Piredda M., 2006. “*I cereali nella dieta mediterranea*”. L’Informatore Agrario, 12 suppl. n. 1 del 17/23 marzo pp. 7-8.

Ceschina G., 1907. "*Primo contributo allo studio dell'essiccazione delle paste alimentari*". Tipografia e litografia degli ingegneri, Milano

Chantret, N., Salse, J., Sabot, F., Rahman, S., Beliec, A., Laubin, B., Dubois, I., Dossat, C., Sourdille, P., Joudrier, P. and Gautier, M.F. (2005). "*Molecular basis of evolutionary events that shaped the hardness locus in diploid and polyploid wheat species (Triticum and Aegilops)*". *The Plant Cell* **17**: 1033-1045.

Chen, F., He, Z.H., Xia, X.C., Lillemo, M. and Morris, C.F. (2005). "*A new puroindoline b mutation present in Chinese winter wheat cultivar Jingdong*". *J. Cereal Sci.* **42**: 267-269.

Chen, F., Beecher, B.S. and Morris, C.F. (2009). "*Physical mapping and a new variant of Puroindoline b-2 genes in wheat*". *Theor. Appl. Genet.* DOI 10.1007/s00122-09-1195-y

Chiotelli E., Le Meste M., (2002). "*Effect of small and large wheat starch granules on thermomechanical behaviour of starch*". *Cereal Chemistry*, **79** (2) : 286-293.

Corona, V., Gazza, L., Boggini, G. and Pogna, N.E. (2001a). "*Variation in friabilin composition as determined by A-PAGE fractionation and PCR amplification, and its relationship to grain hardness in bread wheat*". *J. Cereal Sci.* **34**: 243-250.

Corona, V., Gazza, L., Zanier, R. and Pogna, N.E. (2001b). "*A tryptophan-to-arginine change in the tryptophan-rich domain of puroindoline b in five French bread wheat cultivars*". *J. Genet. and Breed.* **55**: 187-189.

Dalbon, G., Grivon, D., and Pagani, M. A. 1996. "*Pasta: Continuous manufacturing process*". Pages 13-58 in: *Pasta and Noodle Technology*. J. E. Kruger, R. B. Matsuo, and J. W. Dick, eds. Am. Assoc. Cereal Chem.: St. Paul, MN.

Damidaux R. , Autran J. C. , Grignac P. e Feillet P. (1978). « *Mise en évidence de relations applicables en sélection entre l'électrophorégramme des gliadines et les propriétés viscoélastiques du gluten de Triticum durum* ». *Desf. C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Sér. D* **287**:701-704.

Darlington, H.F., Rouster, J., Hoffmann, L., Halford, N.G., Shewry, P.R. and Simpson, D.J. (2001). "*Identification and molecular characterisation of hordoindolines from barley grain*". *Plant Mol. Biol.* **47**: 785-794.

Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B., (1983). « *A plant DNA miniprep: Version II* ". *Plant Molecular Biology Report* **1**:19-21.

Devos, K.M., Brown, J.K. and Bennetzen, J.L. (2002). "*Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in Arabidopsis*". *Genome Res.* **12**: 1075-1079.

Dvorak, J., McGuire, P.E. and Cassidy, B. 1988. "*Apparent sources of the A genomes of wheat inferred from polymorphism in abundance and restriction fragment length of repeated nucleotide sequences*". *Genome*, **30**: 680-689.

Dvorak, J., di Terlizzi, P., Zhang, H.B. and Resta, P. 1993. “*The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species*”. *Genome*, **36**: 21-31.

Dvorak, J. and Zhang, H.B. 1990. “*Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes*”. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**: 9640-9644.

Dvorak, J. Luo, M.C., Yang, Z.L. and Zhang, H.B. 1998. “*The structure of the Aegilops tauschii gene pool and the evolution of hexaploid wheat*”. *Theor. Appl. Genet.*, **97**: 657-670.

Dubreil L., Méliande S., Chiron H., Compoint J.-P., Quillien L. and Branlard G. (1998a). « *The effect of puroindolines on the breadmaking properties of wheat flour*”. *Cereal Chem.* **75**: 222-229.

Dubreil L., Gaborit T., Bouchet B., Gallant D.J., Broekaert W., Quillien L. and Marion D. (1998b). “*Spatial and temporal distribution of the major isoforms of puroindolines (puroindoline-a and puroindoline-b) and non specific lipid transfer protein (ns-LTPe1) of Triticum aestivum seeds. Relationship with their in vitro antifungal properties*”. *Plant Sci.* **138**: 121-135.

Duffus C.M., 1987. “*Physiological aspects of enzymes during grains development and germination. ‘Enzymes and their role in cereal technology’*”, L.E. Kruger, D.R. Lineback, C.E. Stauffer (eds), **117**. AACC Inc St.Paul, MN.

Mohamed Faize, Sophie Sourice, Fabrice Dupuis, Luciana Parisi, Marie Françoise Gautier, Elisabeth Chevreau (2004). “*Expression of wheat puroindoline-b reduces scab susceptibility in transgenic apple (Malus × domestica Borkh.)*”. *Plant Science* **167**:347–354.

Athos Ferraresi, Luciano Mazza, Maurizio Monti, Maria Corbellini e Basilio Borghi, (1997). “*Effetti genetici ed ambientali sul grado di durezza (“Hardness”) delle cariossidi di frumento tenero (Triticum aestivum L.) coltivate in Italia.*” *Riv. Di Agron.* **31**, **4**: 934-944.

Flagella Z., 2006 . “*Qualità nutrizionale e tecnologica del frumento duro*”. *Ital. J. Agron. / Riv. Agron.*, 2006, **1**:203-239

Garcia-Maroto F, Marañá C, Mena M, Garcia-Olmedo F e Carbonero Pilar 1990. “*Cloning of cDNA and chromosomal location of genes encoding the three types of subunits of the wheat tetrameric inhibitor of insect α -amylase*”. *Plant Mol Biol* **14**: 845-853.

Gautier M.-F., Aleman M.-E., Guirao A., Marion D. and Joudrier P. (1994). “*Triticum aestivum puroindolines, two basic cysteine-rich seed proteins: cDNA analysis and developmental gene expression*”. *Plant Mol. Biol.* **25**:43-57.

Gautier M. F., Cosson P. , Guivau A. , Alary R. , Joudrier P. (2000). “*Puroindolines genes are highly conserved in diploid ancestor wheats and related species but absent in tetraploide Triticum species*”. *Plant Sci.* **153**:81-91.

L. Gazza, A. Niglio, E. Mei, E. De Stefanis, D. Sgrulletta and N. E. Pogna, (2003). “*Production and characterization of durum wheat (Triticum turgidum ssp. Durum) lines containing puroindolines A and B*”. In: *Proceedings of second International Workshop Durum Wheat and Pasta Quality: Recent Achievements and New Trends*. Rome 19-20 November 2002. pp.285-288.

L. Gazza, A. Niglio, F. Nocente and N. E. Pogna, (2004). “Evidence of a gene coding for grain softness protein (GSP-1a) on the long arm of chromosome 5D in *Triticum aestivum*”. In: The Gluten Proteins pp.457-460. D. La Fiandra, S. Masci and R. D’Ovidio Eds. Royal Society of Chemistry books.

Gazza L., Nocente F., Ng P.K.W., Pogna N.E., (2005). “Genetic and biochemical analysis of common wheat cultivars lacking puroindoline a”. *Theoretical and Applied Genetics* **110**:470–478.

Gazza L., Conti S., Taddei F., Pogna N.E., (2006). “Molecular characterization of puroindolines and their encoding genes in *Aegilops ventricosa*”. *Molecular Breeding* **17**:191–200.

Gazza. L., Conti, S., Taddei, F., Ng, P.K.W. and Pogna, N.E. (2006). “Puroindoline synthesis in wheat kernels with contrasting texture characteristics”. International Gluten Workshop 2006.

L. Gazza, F. Taddeia, M. Corbellinib, P. Cacciatoria, N.E. Pogna, (2007a). “Genetic and environmental factors affecting grain texture in common wheat”. *Journal of Cereal Science* (in press).

Gazza L., Corbellini M., Mazza L., Perenzin M., Cacciatori P. e Pogna N.E (2007b). “Puroindolines in bread wheat near-isogenic-lines (nils) of cv. *Enesco*”. Proceedings of the 51st Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress Riva del Garda, Italy – 23/26 September, 2007. ISBN **978-88-900622-7-8**

Gianibelli MC, Larroque OR, MacRitchie F e Wrigley CW (2001). “Biochemical, genetic and molecular characterization of wheat endosperm proteins”. *Cereal Chemistry*, online review 1-20.

Giroux, M.J. and Morris, C.F. (1997a). “A glycine to serine change in puroindoline b is associated with wheat grain hardness and low levels of starch-surface friabilin”. *Theor. Appl. Genet.* **95**: 857-864.

Giroux, M.J. and Morris, C.F. (1997b). “Structure and presence of the amiloplast membrane proteins, puroindolines, are associated with wheat grain hardness”. *Plant Physiol.* **114**(S):46.

Giroux, M.J. and Morris, C.F. (1998). “Wheat hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindolines a and b”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 6262-6266.

Giroux, M.J., Talbert, L., Habernicht, D.K., Lanning, S., Hemphill, A. and Martin, J.M. (2000). “Association of puroindoline sequence type and grain hardness in hard red spring wheat”. *Crop Sci.* **40**: 370-374.

Greenblatt, G.A., Bettge, A.D. and Morris, C.F. (1995). “The relationship among endosperm texture, friabilin occurrence, and bound polar lipids on wheat starch”. *Cereal Chem.* **72**: 172-176.

Greenwell, P. and Schofield, J.D. (1986). “A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat”. *Cereal Chem.* **63**: 379-380.

Greenwell, P. and Schofield, J.D. (1989). “The chemical basis of grain hardness and softness”. In: H. Salovaara (Ed.) *Wheat End-Use Properties*, Proceedings ICC ’89 Symposium (Lathi, Finland, 13-15 June 1989), pp. 59-72.

- Graveland, A. & Henderson, M.H. 1987. "Structure and functionality of gluten proteins". In: Proceedings of the 3rd International Gluten Workshop, Budapest, Hungary, 9-12 May (edited by R.Laszitty & F.Bekes). Pp. 238–246. Singapore: World Scientific.
- Gedye, K. R., Morris, C. F., and Bettge, A. D. (2004). "Determination and evaluation of the sequence and textural effects of the puroindoline a and puroindoline b genes in a population of synthetic hexaploid wheat". *Theor. Appl. Genet.* **109**:1597–1063
- Helle A. Bloch, Helen F. Darlington, and Peter R. Shewry, (2001). "In Vitro Binding of Puroindolines to Wheat Starch Granules". *Cereal Chem.* **78** (1):74–78
- Hogg, A. C., Beecher, B., Martin, J. M., Meyer, F. D., Talbert, L. E., Lanning, S., and Giroux, M. J. (2005). "Hard wheat milling and bread baking traits affected by the seed-specific overexpression of puroindolines". *Crop Sci.* **45**:871-878.
- Jing, W., Demcoe, A.R., Vogel, H.J., (2003). "Conformation of a bactericidal domain of puroindoline a: structure and mechanism of action of a 13- residue antimicrobial peptide". *Journal of Bacteriology* **185**:4938–4947.
- Jolly, C. J., Rahman S., Kortt, A. A., and Higgins, T. J. V. (1993). "Characterisation of the wheat Mr 15000 "grain-softness protein" and analysis of the relationship between its accumulation in the whole seed and grain softness". *Theor. Appl. Genet.* **86**:589-597.
- Jolly, C.J., G.M. Glenn, and S. Rahman. (1996). "GSP-1 genes are linked to the grain hardness locus (*Ha*) on wheat chromosome 5D". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 2408–2413.
- Johnson, B.L. and Dhaliwal, H.S. 1976. "Reproductive isolation of *Triticum boeoticum* and *Triticum urartu* and the origin of the tetraploid wheat". *Am. J. Bot.*, **63**: 1088-1094
- Kiara, H. 1919. "Über cytologische Studien bei einigen Getreidearten". *Spezies-Bastarde des Weizens und Weizenroggen-Bastard*. *Bot. Mag.*, **32**: 17-38.
- K. Krishnamurthy, M.J. Giroux, (2001). "Expression of wheat puroindoline genes in transgenic rice confers grain softness". *Nature Biotechnol.* **19**:162–166.
- K. Krishnamurthy, C. Balconi, E.J. Sherwood, M.J. Giroux, (2001). "Wheat puroindolines enhance fungal disease resistance in transgenic rice. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**:1255–1260.
- Lazaro A, Sanchez-Monge R, Salcedo G, Paz-Ares J, Carbonero P, Garcia-Olmedo F 1988. "A dimeric inhibitor of insect α -amylase from barley. Cloning of the cDNA and identification of the protein". *Eur J. Biochem* **172**: 129-134.
- Le Bihan, T., Blochet, J-E, Dèsomeaux, A., Marion, D and Pèzolet, M. (1996). "Determination of the Secondary Structure and Conformation of Puroindolines by Infrared and Raman Spectroscopy". *Biochemistry* **35**: 12712-12722
- Lillemo, M., and Morris, C. F. (2000). "A leucine to proline mutation in puroindoline b is frequently present in hard wheats from Northern Europe". *Theor. Appl. Genet.* **100**:1100-1107.
- Lillemo, M., Simeone, M.C. and Morris, C.F. (2002b). "Analysis of puroindoline a and b sequences from *Triticum aestivum* cv. 'Penawawa' and related diploid taxa. *Euphytica*". **126**: 321-331.

Lyon D. J. e Shelton, (1999). "Fallow managment and nitrogen fertilizer influence winter wheat kernel hardness". *Crop. Sci.* **39**:448-452.

Lyons, A., Richardson, M., Tatham, A.S. and Shawry, P.R. (1987). "Characterization of homologous inhibitors of trypsin and α -amylase from seeds of rye (*Secale cereale* L.)". *Bioch. Et Biophys. Acta* **915**: 305-313.

Ma, J., Devos, K.M. and Bennetzen, J.L. (2004). "Analyses of LTR-retrotransposon structures reveal recent and rapid genomic DNA loss in rice". *Genome Res.* **14**: 860-869.

Maeda K, Kakabayashi S e Matsubura H1985. "Complete amino acid sequence of an α -amylase inhibitor in wheat kernel (0.19 inhibitor)". *Biochim Biophys Acta* **828**: 213-221.

Mahoney, W.C., Hermodson, M.A., Jones, B., Powers, D.D., Corfman, R.S., Reeck, G.Rr (1984). "Amino acid sequence and secondary structural analysis of the corn inhibitor of trypsin aand activated Hageman factor". *J Biol Chem* **259**: 8412 – 8416.

Massa, A. N., Morris, C. F., and Gill, B. S. (2004). "Sequence diversity of puroindoline-a, puroindoline-b, and the grain softness protein genes in *Aegilops tauschii* cross". *Crop Sci.* **44**:1808-1816.

Mattern, P. J., Morris, R., Schmidt, J. W., and Johnson, V. A. (1973). "Location of genes for kernel properties in wheat variety 'Cheyenne' using chromosome substitution lines". Pages 703-707 in: Proc. 4th Int. Wheat Genet. Symp. E. R. Sears, and L. M. S. Sears, eds. Agric. Exp. Stn. University of Missouri: Columbia, MO. wheat. *Theor. Appl. Genet.* **93**:580-586.

Morris, C. F. (2002). "Puroindolines: The molecular genetic basis of wheat grain hardness". *Plant Mol. Biol.* **48**:633-647.

Morris, C. F., Lillemo, M., Simeone, M. C., Giroux, M. J., Babb, S. L., and Kidwell, K. (2000). "Prevalence of puroindoline grain hardness genotypes among historically significant North American spring and winter wheats". *Crop Sci.* **41**:218-228.

Morris, C.F., G.A. Greenblatt, A.D. Bettge, and I. Malkawi, (1994). "Isolation and characterization of multiple forms of friabilin". *J. Cereal Sci.* **20**:167–174.

Oda, S. (1994). "Two-dimensional elctrophoretic analysis of friabilin". *Cereal Chem.* **71**: 394-395.

S. Oda and J. D. Schofield, (1997). "Characterisation of Friabilin Polypeptides". *Journal of Cereal Science* **26**:29–36.

Odani, S., Koide, T., Ono, T. (1983). "The complete amino acid sequence of barley trypsin inhibitor". *J Biol Chem* **258**: 7998-8003

Palombi M.A. "Molecular markers in the control of genetic integrity of vegetatively propagated fruit trees.

Payne, P.I., Seekings, J.A., Worland, A.J., Jarvis, M.C., Holt, L.M. (1987). "Allelic variation of glutenin subunitsand gliadins and its effect on breadmaking quality in wheat: analysis of F5 progeny from Chinese Spring x Chinese Spring (Hope 1°)". *J. Cereal Science* **6**: 103-118.

Panatta G. B., 1997 . “*Cereali e patate*”. In: F. Fidanza & G. Liguori. *Nutrizione Umana*. Pp. 268-289.

Pagani M.A., De Noni I., Resmini P. and Pellegrino L. 1986. “*Processing and heat damage of dry pasta*”. *Tec. Molitoria*, 47:345.

Paraventi R., 1984. “*L’attività dell’acqua nel processo di essiccazione della pasta*”. *Tecnica Molitoria* 35, 626.

Peterson C. J., Gray bosh R. A. , Baenziger P. S. and Grombacher A. W. , (1992). “*Genotype and environmental effects on quality characteristics of hard red winter wheat*”. *Crop Sci.* **32**:98-103.

Pogna N. E. , Autran J. C. , Mellini F. , La Fiandra D. and Feillet P., (1990). “*Cromosome 1B encoded gliadins and glutenin subunits in durum wheat: genetics and relationship to gluten strength*”. *J. C. S* **11**:15-34.

Pogna, N.E., Gazza, L., Corona, V., Zanier, R., Niglio, A., Mei, E., Palumbo, M. and Boggini, G. (2002). “*In Wheat quality elucidation*”, P.K.W. Ng and Wrigley, C.W. (Eds.) American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, MN, pp 155-168.

S. Rahman, G. J. Jolly, J. H. Skerritt, and A. Waelosheck, (1994). “*Cloning of a wheat 15-KDa grain softness protein (GSP)*”. *J. Biochem* **223**:917-925.

Ring S.G., Colonna P., L’Anson K.J., Kalichevsky M.T., Miles M.J., Morris V.J., Orford P.D., 1987. The gelation and crystallization of amylopectin. *Carbohydrates Res.*, 162, 277.

Saponaro, C., Pogna, N.E., Castagna, R., Pasquini, M., Cacciatori, P, Redaelli, R. (1995). “*Allelic variation at the Gli-A1^m, Gli-A2^m and Glu-A1^m loci and breadmaking quality in diploid wheat Triticum monococcum*”. *Genet. Res.* **66**: 127-137.

Sax, K. 1922. “*Sterility in wheat hibrids. II. Chromosome behavior in partially sterile hybrids*”. *Genetics*, **7**: 513-550.

D. R. See, M. Giroux, and B. S. Gill (2004). “*Effect of multiple copies of puroindoline genes on grain softness*”. *Crop Sci.* **44**:1248-1253.

Q. J. Song, J. R. Shi, S. Singh, E. W. Fickus, J. M. Costa, J. Lewis, B. S. Gill, R. Ward and P. B. Cregan. (2005). “*Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat*”. *TAG* **110**:550-560.

Symes, K.J. (1961). “*Classification of Australian wheat varieties based on the granularity of their wholemeal*”. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* **1**:18±23.

Swan C. G., Bowman J. G. P., Martin J. M. and Giroux M. J. (2006). “*Increased puroindoline levels slow ruminal digestion of wheat (Triticum aestivum L.) starch by cattle*”. *J. Anim. Sci.* **84**:641-650.

Turnbull KM, Marion D, Gaborit T, Appels R, Rahman S (2003). “*Early expression of grain hardness in the developing wheat endosperm*”. *Planta* **216**:699–706

K.-M. Turnbull and S Rahman (2002). “*Endosperm Texture in Wheat*”. Journal of Cereal Science **36**:327±337

Turnbull, K.-M., Marion, D., Gaborit, T., Appels, R. and Rahman, S. (2003). “*Early expression of grain hardness in the developing wheat endosperm*”. *Planta* **216**: 699 – 706.

Wang, J.R., Yan, Z.H., Wei, Y.M., Nevo, E., Baum, B., Zheng, Y.L. (2006). “*Molecular characterization of dimeric alpha-amylase inhibitor genes in wheat and development of genome allele-specific primers for the genes located on chromosome 3BS and 3DS*”. *J Cereal Sci*, **43**: 360-368.

Wilkinson, M., Wan, Y., Tosi, P., Leverington, M., Snape, J., Mitchel, R.A.C and Williams, P.C. (1979). “*Screening wheat for protein and hardness by near Infrared reflectance spectroscopy*”. *Cereal. Chem.* **56**: 169-172