

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA e AGROCHIMICA

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA
BIOTECNOLOGIE VEGETALI - XXII Ciclo

**“ Basi molecolari e biochimiche del carattere *sofficità*
nella cariosside del genere *Avena*”**

settore scientifico-disciplinare
AGR/07

Coordinatore: **Prof.ssa STEFANIA MASCI**

Firma

Tutor: **Dott. NORBERTO POGNA**

Firma.....

Dottorando: **D.ssa LAURA GAZZA**

Firma

INDICE

1	<u>Introduzione</u>	5
1.1	L'avena	5
1.1.1	Morfologia	5
1.1.2	Classificazione e filogenesi	6
1.1.3	Composizione della cariosside e utilizzo	7
1.1.4	Composizione chimica della cariosside di avena	12
1.1.4.1	Lipidi	12
1.1.4.2	Amido	12
1.1.4.3	Proteine	12
1.2	La durezza della cariosside	13
1.2.1	La durezza della cariosside in frumento ed avena	14
1.2.2	Le basi genetiche della durezza della cariosside	16
1.2.2.1	Friabiline, puroindoline e proteine 2S	16
1.2.2.2	Polimorfismo allelico e durezza della cariosside in frumento tenero	19
1.2.2.3	Le puroindoline in avena ed in altri cereali	20
1.2.3	Gli effetti tecnologici delle puroindoline	22
1.2.4	Altre proprietà delle puroindoline	23
2	<u>Scopo della tesi</u>	25
3	<u>Materiali e metodi</u>	26
3.1	Materiale vegetale	26
3.2	Determinazione della durezza della cariosside	26
3.3	Estrazione del DNA	27
3.4	Estrazione dell'RNA	27
3.5	Amplificazione PCR da DNA genomico	28
3.6	Retro-trascrizione, amplificazione PCR (RT-PCR) e RACE	28
3.7	Purificazione dei prodotti di PCR da gel di agarosio	30
3.8	Clonaggio e sequenziamento dei prodotti di amplificazione	30
3.9	Trasformazione	30
3.10	Estrazione dei granuli d'amido	32
3.11	Estrazione delle proteine legate all'amido	32

3.12	Estrazione delle proteine totali dell'endosperma.....	33
3.13	Trattamento delle proteine legate all'amido con cloroformio e metanolo.....	34
3.14	Riduzione ed alchilazione delle proteine.....	34
3.15	Trattamento delle proteine con monobromobimane.....	34
3.16	Separazioni elettroforetiche.....	34
3.16.1	Elettroforesi A-PAGE (Acid-Polyacrylamide Gel Electrophoresis).....	34
3.16.2	Elettroforesi Sodio Dodecil Solfato (SDS-PAGE).....	35
3.16.3	Elettroforesi bidimensionale A-PAGE x SDS-PAGE.....	36
3.17	Western Blotting e immunoreazioni.....	36
4	<u>Risultati</u>	38
4.1	Durezza della cariosside	38
4.2	Amplificazione PCR di DNA genomico di <i>A. sativa</i> e grano tenero con primers specifici per puroindoline e le triptofanine...	38
4.3	Separazione elettroforetica A-PAGE delle proteine legate ai granuli di amido in avena e grano tenero.....	39
4.4	Separazione elettroforetica SDS-PAGE delle proteine legate ai granuli di e grano tenero e amido in avena dosaggio proteico....	41
4.5	Marcatura dei gruppi sulfidrilici con monobromobimane.....	42
4.6	Separazione elettroforetica bidimensionale A-PAGE x SDS-PAGE delle proteine legate ai granuli di amido in avena	42
4.6.1	Separazione elettroforetica bidimensionale A-PAGE x SDS-PAGE delle proteine legate ai granuli di amido nelle specie diploidi e tetraploidi di avena.....	43
4.7	Solubilità delle proteine legate all'amido in cloroformio-metanolo.....	44
4.8	Immunoreazioni con l'anticorpo anti-Pin-A.....	45
4.9	Immunoreazioni con l'anticorpo anti-Vin-B2 e anti-Vin-B3.....	47
4.10	Cinetica di accumulo delle proteine legate all'amido in <i>A. sativa</i>	48
4.11	Cinetica di accumulo degli mRNA per Vin-B2, Vin-B3 e Pin-A...	49
4.12	Identificazione del gene codificante per la vromindolina-B1.....	50
4.13	Sequenziamento dei geni per le vromindoline B.....	51
4.14	Amplificazione PCR di DNA genomico di diversi cereali con primer specifici per i geni delle vromindoline.....	52
4.15	Immunoreazioni con l'anticorpo anti-Vin-B2 e RT-PCR in grano monococco.....	54
4.16	Analisi spettrometrica di massa MALDI delle vromindoline A...	55
4.17	Amplificazione PCR di DNA genomico di specie cerealicole con	

	primer specifici per il gene <i>Aati</i> di avena.....	58
4.18	Immunoreazioni con l'anticorpo anti-AATI.....	59
4.19	Trasformazione del grano duro cv Svevo con i geni <i>Vin-2</i> e <i>Vin- b3</i> di avena.....	59
4.20	Analisi della durezza SKCS sulle piante transgeniche di grano duro.....	62
4.21	Segregazione dei geni <i>Vinb-2</i> e <i>Vinb-3</i> nella progenie delle piante transgeniche G5,G29 e G30.....	64
5	<u>Discussione</u>	66
5.1	La tessitura della cariosside di avena.....	66
5.2	Le proteine legate all'amido in <i>Triticum</i> e <i>Avena</i>	67
5.3	La natura delle proteine legate all'amido in <i>Avena</i>	69
5.4	Cinetica di accumulo delle vromindoline e dei relativi mRNA.....	70
5.5	Vromindoline B e tessitura della cariosside di avena.....	70
5.6	Le vromindoline B negli altri cereali.....	71
5.7	Le vromindoline A e le proteine AATI di avena.....	72
5.8	Il ruolo delle vromindoline B nella determinazione della tessitura della cariosside.....	73
6	<u>Bibliografia</u>	76

1. INTRODUZIONE

1.1 L'avena

1.1.1 Morfologia

L'avena (Fig.1.1 e 1.2) è una pianta dotata di diversi culmi, fusti erbacei tipici delle graminacee, vuoti, eretti, piuttosto robusti, con 5 o 6 internodi. Le foglie sono alterne con lamina allungata e sottile, margine intero e apice appuntito. La guaina è a cilindro aperto, la sua base ispessita fornisce un meccanismo per contrastare l'allettamento. La pianta possiede due sistemi radicali: quello seminale si forma durante lo sviluppo dell'embrione e consiste delle radici primarie e di due o tre radici laterali; l'apparato avventizio ha origine dai nodi del culmo appena sotto la superficie del terreno e rappresenta nella pianta adulta la massa di radici principale. Gli organi di riproduzione sono costituiti da un'infiorescenza a panicolo aperto il cui asse principale costituisce la continuazione dello stelo e termina con una spighetta singola. Il frutto è una cariosside di forma cilindrica piuttosto allungata, ricca di amido. Le glumette che avvolgono le cariossidi si prolungano in due caratteristiche ariste sottili.

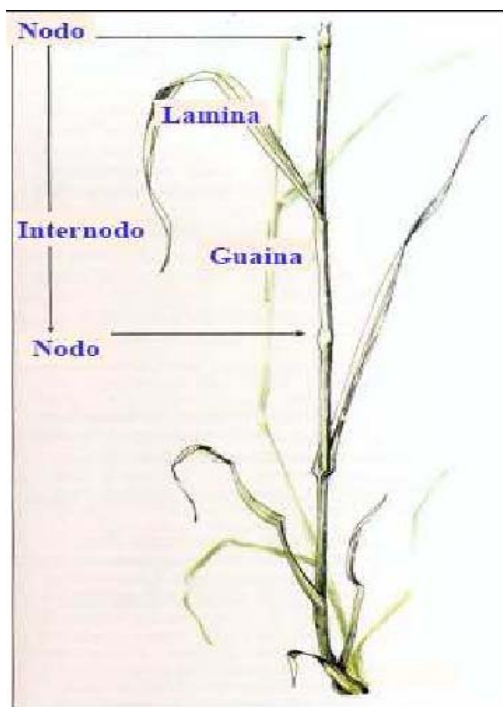


Figura 1.1 Morfologia dell'avena



Figura 1.2 *Avena sativa*

Il genere *Avena* comprende diverse specie coltivate, selvatiche ed infestanti. In base al livello di ploidia le diverse specie sono suddivise in diploidi, tetraploidi ed esaploidi tutte con un numero aploide di cromosomi uguale o multiplo di 7. Secondo Vavilov (1950) l'avena coltivata costituiva originariamente un'infestante del frumento dicocco (farro, *T. turgidum* ssp *dicoccum*) nel Vicino Oriente e nell'area mediterranea. Nel momento in cui la coltivazione del frumento dicocco si estese nel nord del Vecchio Continente, le infestanti soppiantarono il dicocco stesso nelle coltivazioni. Già 3.000 anni fa era nota ai cinesi; in seguito anche altre popolazioni, fra cui i latini, ne facevano uso. La specie più diffusa è *Avena sativa* (Fig.1.2), usata come foraggio. È una pianta erbacea annuale, facilmente adattabile a qualsiasi clima, esaploide con genoma AACDD. Grazie alla sua capacità di adattamento a climi poco favorevoli, nel corso del tempo è divenuta, fino al XIX secolo, il cereale più diffuso nel Nord Europa. I maggiori produttori mondiali sono Russia, USA, Canada, Polonia e Germania. Nel periodo 2008-2009 la produzione di avena nell'UE è stata pari a 8,4 milioni di tonnellate mentre quella italiana è stata di circa 440.000 tonnellate. Sul totale di produzione di avena in Italia, l'80% è costituito dall'*A. sativa*, il restante 20% è costituito da *A. byzantina* più adatta alle regioni meridionali.

1.1.2 Classificazione e filogenesi

In letteratura sono presenti molti studi sulla filogenesi delle specie di avena finalizzati a mostrare le relazioni che intercorrono tra esse sulla base della loro composizione genomica. Da questi studi emerge che i genomi A e C, presenti nelle specie diploidi, hanno avuto origine da un progenitore comune attraverso divergenza evolutiva.

Le specie con genoma A, il cui progenitore probabilmente è *A. canariensis*, sono cariologicamente più primitive rispetto a quelle con genoma C, il cui progenitore è *A. ventricosa*; queste ultime, al contrario sono più primitive a livello morfologico. Tutte le specie di avena diploidi hanno avuto origine nella regione mediterranea occidentale. Riguardo all'evoluzione delle specie tetraploidi è possibile identificare due gruppi indipendenti (Fig.1.3): le specie con genoma AB e quelle con genoma AC, le cui differenze sono state evidenziate con l'analisi RAPD e con l'uso di marcatori proteici per le avenine (Loskutov, 2008). Le specie tetraploidi con genoma AC probabilmente hanno come progenitore *A. magna*, originata dall'ibridazione di due specie diploidi con genoma A e C, con la formazione di una specie diploide a genoma AC seguito dal raddoppiamento cromosomico. Le specie con genoma AB hanno avuto origine dalle specie diploidi con

genoma A_s. L'identificazione delle specie diploidi e tetraploidi coinvolte nell'evoluzione delle specie esaploidi è ancora controversa. Secondo Holden *et al.* (1966) i probabili donatori dei genomi A e C delle specie tetraploidi sono rispettivamente *A. strigosa* e *A. ventricosa*, mentre *A. maroccana* e *A. murphy* sembrano essere le specie tetraploidi da cui si sono originate le specie esaploidi. Secondo Jellen *et al.* (1994) è la specie *A. canariensis* la donatrice del genoma A presente nelle specie tetraploidi e esaploidi.

Rajhathy e Thomas (1974) hanno ipotizzato che le specie esaploidi si siano evolute attraverso il processo di convergenza allopoloide dalle specie tetraploidi con genoma AC e da specie sconosciute con genoma D. Da ulteriori studi (Leggett e Markland, 1995) emerge che i genomi A e D sono molto simili tra loro. Il genoma A dei progenitori diploidi potrebbe essere il donatore dei genomi A e D delle specie esaploidi. Più recentemente è stata scoperta una specie tetraploide a genoma CD, *A. insularis*, che potrebbe essere il progenitore diretto delle specie esaploidi (Ladizinsky, 1998). Il progenitore delle diverse specie esaploidi (genoma ACD) è *A. sterilis* L. (Coffman *et al.*, 1977) originaria del continente asiatico. Altre specie ad essa filogeneticamente legate sono *A. byzantina* e *A. fatua*. Sono state dimostrate inoltre relazioni genetiche tra accessioni di *A. byzantina* con le forme di *A. sterilis* presenti nel nord della Mesopotamia e tra le accessioni di *A. sativa* e le forme di *A. sterilis* presenti nella regione est dell'Anatolia. Da un recente studio di Loskutov (2008) emerge che i donatori dei genomi A e C sono rispettivamente le diploidi *A. canariensis* e *A. ventricosa*. Il progenitore delle specie esaploidi è *A. magna* anche se la specie *A. insularis* è probabilmente coinvolta ma il suo contributo non è ancora stato chiarito (Fig.1.3). Molto probabilmente il centro di origine del genere *Avena* L. è la regione mediterranea, dove ha avuto origine la specie *A. byzantina*, mentre la specie *A. sativa* ha avuto origine in Asia Minore.

1.1.3 Composizione della cariosside e utilizzo

L'avena è caratterizzata da un frutto secco noto come cariosside (Fig.1.4) avvolto dal tegumento e da un rivestimento esterno detto pericarpo. Immediatamente sotto è presente uno strato aleuronico ricco di grassi e proteine depositati sotto forma di granuli. La maggior parte della cariosside di avena è occupata dall'endosperma amilaceo, un tessuto di riserva (55-70% del peso totale della cariosside) ricco di amido e contenente le maggiori riserve di proteine e lipidi. L'embrione, all'estremità del chicco, comprende un fusticino avvolto in un rivestimento chiamato coleoptile, e una radichetta anch'essa protetta da un

apposito rivestimento. Trattandosi di piante monocotiledoni, il cotiledone è uno solo e prende il nome di scutello. Esso è costituito da due distinti tessuti: il parenchima, che rappresenta l'80% del peso dell'embrione, e l'epitelio. L'epitelio è un tessuto assorbente per assimilare i nutrienti che vengono rilasciati dall'idrolisi del materiale di riserva presente nell'endosperma amilaceo.

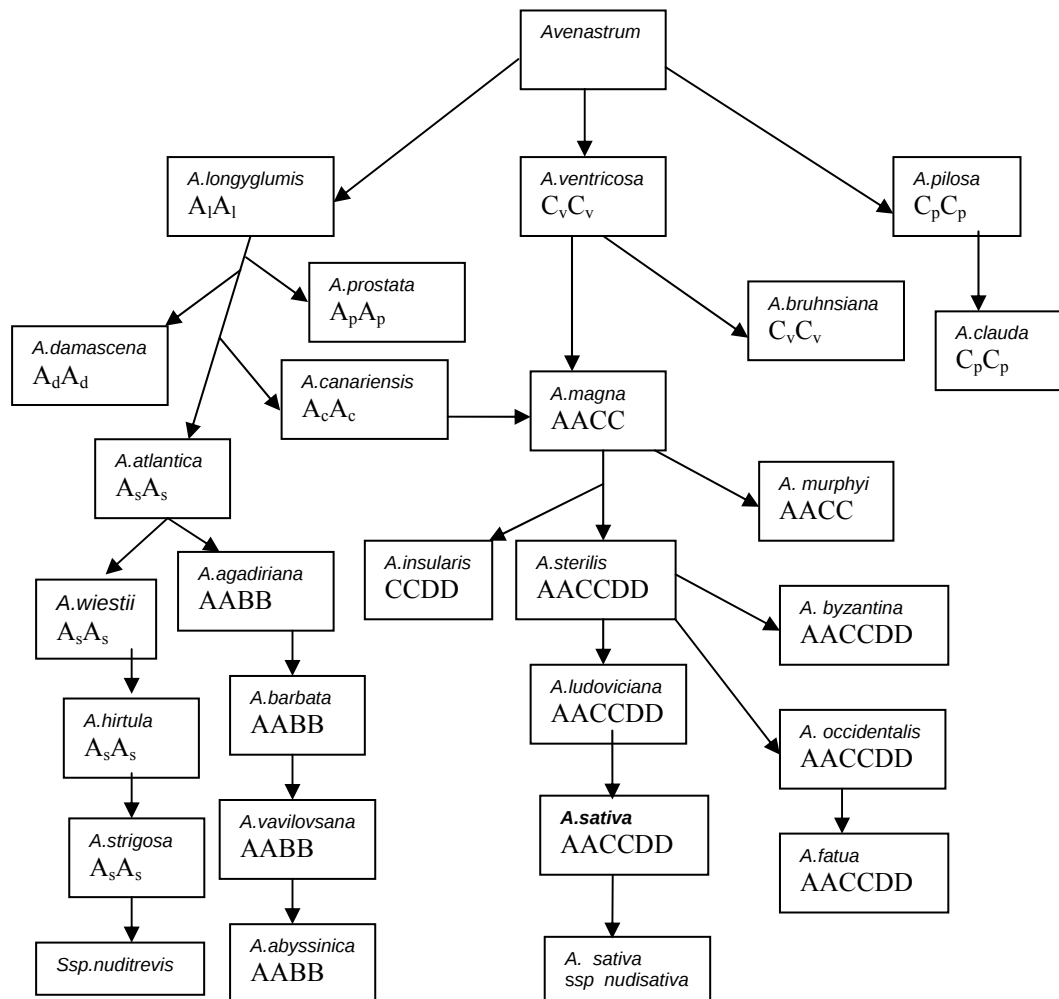


Figura 1.3. Relazioni filogenetiche tra specie di Avena (Loskutov, 2008).

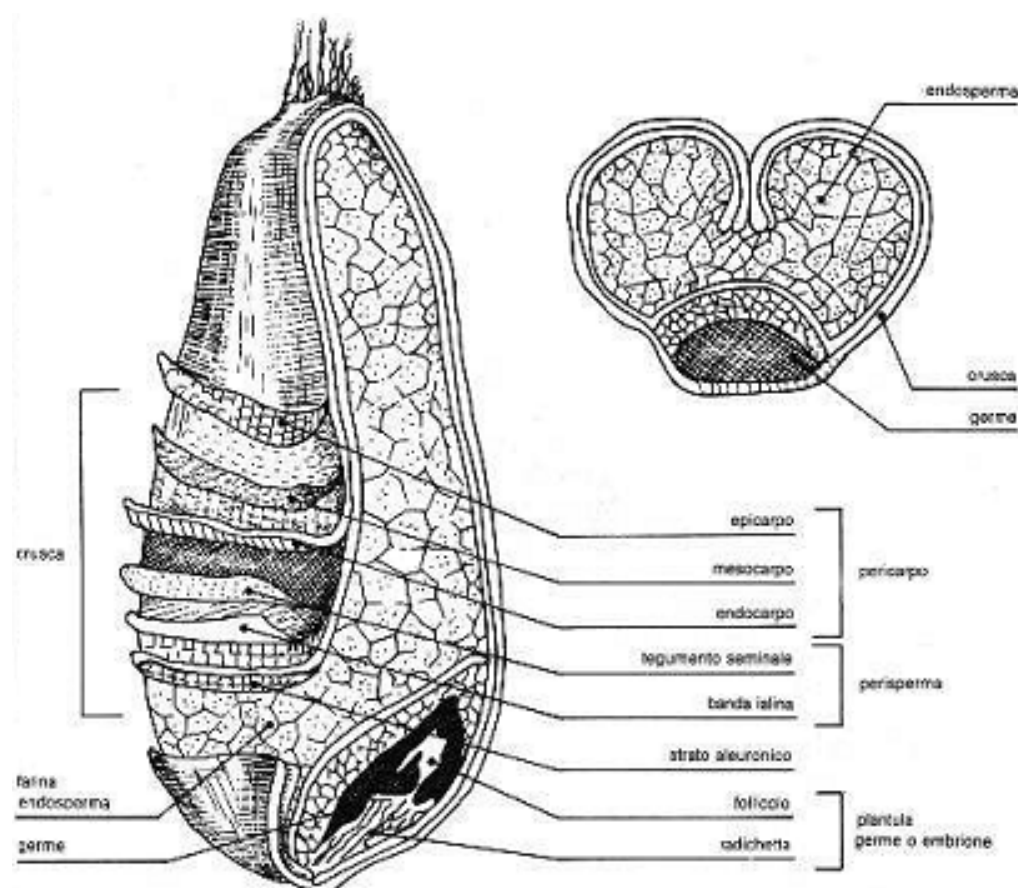


Figura 1.4. Cariosside di avena

L'avena, ritenuta in passato un cereale minore noto soprattutto come mangime di elevata qualità per gli equini e per altri animali da allevamento (Givens e Brunnen, 1987), è stata rivalutata recentemente sulla base del suo valore nutrizionale per l'alimentazione umana (Redaelli *et al.*, 2005).

Tabella 1.1. Composizione percentuale di aminoacidi essenziali nelle cariossidi di alcuni cereali (Ewart, 1967)

Aminoacidi	Riso	Frumento	Mais	Sorgo	Orzo	Avena	Triticale
Triptofano	1,08	1,24	0,61	1,12	1,25	1,29	1,08
Treonina	3,92	2,88	3,98	3,58	3,38	3,31	3,11
Isoleucina	4,69	4,34	4,62	5,44	4,26	5,16	3,71
Leucina	8,61	6,71	12,96	16,06	6,95	7,50	6,87
Lisina	3,95	2,82	2,88	2,72	3,38	3,67	2,77
Metionina	1,8	1,29	1,86	1,73	1,44	1,47	1,44
Cisteina	1,36	2,19	1,3	1,66	2,01	2,18	1,55
Fenilalanina	5,03	4,94	4,64	4,97	5,16	5,34	5,26
Tirosina	4,57	3,74	6,11	2,75	3,64	3,69	2,14

Rispetto agli altri cereali infatti l'avena è ricca di proteine (15-20%), grassi (5-9%) e fibre (12-14%), pertanto i prodotti alimentari a base di avena sono molto nutritivi, con un più elevato contenuto di aminoacidi essenziali rispetto al più utilizzato frumento (Tabella 1.1).

La frazione proteica più rappresentativa è quella delle globuline (50% delle proteine totali), le avenine sono il 4-14%, mentre le due restanti frazioni proteiche, albumine e glutenine sono presenti rispettivamente per il 9-20% e 21-27% delle proteine totali.

L'avena è anche importante per l'alto contenuto di fibre solubili e insolubili tra cui il β -glucano, la lignina, la cellulosa e l'emicellulosa. La fibra più importante è il (1-3) (1-4) - β -D-glucano (Miller *et al*, 1993). Tra le funzioni di questo composto, legate alla sua viscosità, troviamo il potenziamento delle difese naturali contro le infezioni causate da virus, batteri e funghi, l'attenuazione del livello di glucosio nel plasma, e l'abbassamento del livello di colesterolo nel sangue (Kahlon, 1989; Rondanelli *et al*, 2009). Ciò avviene poiché il β -glucano favorisce l'escrezione degli acidi biliari, che sono prodotti a partire dal colesterolo, la cui quantità nel sangue diminuisce. Inoltre sembra che il β -glucano, e le fibre in generale, diminuiscano l'attività dell'enzima HMG-CoA reduttasi, coinvolto nella sintesi del colesterolo. Quindi l'avena, se assunta regolarmente con la dieta, si rivela utile per la prevenzione di malattie cardiovascolari, causate dal diabete e dall'ipercolesterolemia (Trunswell, 2002). E' risaputo inoltre che le fibre in generale aiutano a mantenere efficiente l'apparato digerente e hanno proprietà lassative.

L'attività antiossidante dell'avena è legata a numerosi composti: tocoli, acidi fenolici, flavonoidi, steroli, acido fitico e avenantramidi (Collins, 1986; Handelman *et al*, 1999; Peterson, 2001), che in quanto antiossidanti contribuiscono all'azione di prevenzione e controllo dei danni ossidativi causati dai radicali liberi coadiuvando il sistema endogeno, in modo particolare in situazioni di eccessivo stress ossidativo.

Negli ultimi anni per l'alimentazione umana viene preferita l'avena a granella nuda, perché non deve essere decorticata. In passato l'avena nuda non è stata considerata a causa della bassa potenzialità produttiva dei genotipi disponibili. Le nuove linee di avena a granella nuda invece hanno caratteristiche agronomiche più favorevoli: maggiore precocità di spigatura, rese più elevate e migliore qualità merceologica. Inoltre sono caratterizzate da un più elevato contenuto di aminoacidi essenziali (lisina, metionina, cisteina), una più alta percentuale di lipidi e una maggior quantità di composti antiossidanti e fibre (Valentine, 1987;

Doyle e Valentine, 1988). Tra gli utilizzi più comuni dell'avena a granella nuda rientrano la produzione di mangimi per cavalli da corsa e animali domestici, la produzione di prodotti alimentari, come i flakes (fiocchi) per la colazione, biscotti, pane, e l'estrazione di oli per l'utilizzo nell'industria farmaceutica e cosmetica (Valentine, 1990, 1995).

Oltre alle interessanti proprietà dal punto di vista nutrizionale, l'avena ha caratteristiche molto importanti dal punto di vista dermatologico ed è infatti utilizzata in preparati cosmetici con funzionalità molto particolari. Già nell'antichità la farina d'avena aveva un uso terapeutico associata all'effetto benefico attribuito ai bagni. Infatti l'avena ha una spiccata azione detergente, ma molto delicata, rispetta le funzioni epidermiche fondamentali, senza cioè intaccare e denaturare le proteine dello strato corneo e senza avere gli effetti indesiderati che purtroppo molti detergenti comuni possiedono. Oltre a rispettare l'epidermide, l'avena svolge una serie di azioni benefiche per la pelle che la rendono unica tra tutti i cereali utilizzati topicamente; ha infatti azione idratante, emolliente, protettiva, lenitiva e tamponante del pH cutaneo. Per le sue caratteristiche l'avena è utilizzata, oltre che in prodotti detergenti, anche in creme emollienti, soprattutto per l'infanzia. I cosmetici contenenti avena non causano reazioni allergiche nei soggetti affetti da dermatite atopica sensibili agli altri cereali (Goujon *et al*, 2009).

La celiachia è una malattia immuno-mediata che si manifesta in persone geneticamente suscettibili, in seguito all'introduzione nella dieta di alimenti contenenti glutine. Si scatena quindi una risposta auto-immunitaria che provoca danni ai villi intestinali, che una volta danneggiati non permettono il corretto assorbimento dei nutrienti. I danni all'intestino sono però totalmente reversibili in seguito all'eliminazione delle proteine del glutine dalla dieta. Visto che queste proteine (prolamine) in avena rappresentano solo il 4-14% sul totale delle proteine, rispetto al 60-70% del grano, e sembrano mancare di alcune sequenze tossiche e immunogeniche, sono stati condotti studi per verificare la possibilità di assunzione di alimenti a base di avena da parte di persone affette da celiachia. Gli ultimi dati indicano l'avena come alimento potenzialmente "gluten free" da inserire nella dieta di persone affette da celiachia (Sadiq Butt *et al*, 2008; Koskinen *et al*, 2009). Tuttavia la possibilità di includere l'avena nella dieta del celiaco è un aspetto che rimane ancora controverso.

1.1.4 Composizione chimica della cariosside di avena

1.1.4.1 Lipidi

L'avena ha un contenuto lipidico piuttosto elevato, in particolare di lipidi insaturi, tra cui l'acido linoleico, essenziale per la sintesi delle prostaglandine. La frazione lipidica dell'avena è composta per il 40% da trigliceridi, per il 6-8% da acidi grassi liberi mono e digliceridi, per il 2% da steroli e per il 10-12% da fosfolipidi. La frazione lipidica contiene anche componenti biologicamente attivi tra cui la vitamina E e i carotenoidi (Sahasrabudhe, 1979). Per quanto riguarda la composizione in acidi grassi risultano maggiormente presenti l'acido oleico (27-48%) e il linoleico (33-46%). Il contenuto e la composizione dei lipidi dell'avena possono essere influenzati dalle condizioni di crescita della pianta, in particolare dalla temperatura, che può modificare il grado di saturazione (Hammomd, 1983).

1.1.4.2 Amido

L'amido è il maggiore polisaccaride di riserva delle piante ed è formato da amilosio e amilopectina, differenti per struttura e proprietà fisiche e chimiche. L'amilosio ha una struttura lineare, mentre l'amilopectina è ramificata. Il rapporto tra le due componenti dipende dalla specie, ma nelle specie vegetali più note l'amilosio è presente per il 15-25% e l'amilopectina per il 75-85%. La struttura dell'amido è altamente organizzata e si differenzia per forma e dimensione da specie a specie. L'amido di avena si differenzia da quello degli altri cereali, infatti è formato da una sola popolazione di granuli, di forma irregolare, spesso poliedrici ma anche ovoidali o semisferici. Singolarmente i granuli hanno dimensioni che vanno dai 3 ai 10 μm , ma si associano tra loro a dare aggregati che possono raggiungere 60 μm (Zhou *et al*, 1998). La struttura e le proprietà dell'amido di avena sono influenzate dalla quantità di lipidi ad esso legati, quantità che è maggiore rispetto alla gran parte degli altri cereali (Acker e Becker, 1971; Gudmundsson e Eliasson, 1989). L'amido di avena è più elastico, più resistente alla retrogradazione ed è caratterizzato da una viscosità diversa da quella dell'amido di mais e frumento. La viscosità dell'amido dell'avena è comunque influenzata da diversi fattori, quali la temperatura, la solubilità in acqua, il contenuto di amilosio e il contenuto di lipidi (Paton, 1977, 1979, 1986).

1.1.4.3 Proteine

L'avena è caratterizzata da un contenuto in prolamine pari al 12-20% del contenuto proteico totale (in grano e orzo le prolamine sono presenti in una concentrazione compresa tra 30 e

60%). La frazione alcool-solubile dell'avena è costituita prevalentemente dal complesso delle avenine, la cui concentrazione rispetto al contenuto proteico totale oscilla tra il 4 e il 14% e il cui peso molecolare varia tra 20 e 34 KDa. La frazione proteica più rappresentativa (circa il 50% delle proteine totali), è costituita dalle globuline (proteine solubili in soluzione saline) distinte in α -, β -, γ - e δ -globuline in funzione del loro peso molecolare. Le due restanti frazioni proteiche, le albumine (proteine solubili in acqua) e le gluteline (solubili in soluzioni debolmente acide o basiche) sono invece rispettivamente presenti ad una concentrazione pari al 9-20% e al 21-27% delle proteine totali (Peterson e Smith, 1976). Tenuto conto che le globuline sono la frazione proteica predominante, è comprensibile come il contenuto in lisina delle farine di avena, e quindi la qualità nutrizionale delle sue proteine, siano superiori a quella degli altri cereali. Anche altri aminoacidi essenziali, ad esclusione della tirosina, sono ben rappresentati in avena rispetto agli altri cereali (Tabella 1.2). (Ewart, 1967; FAO/WHO, 1973; Eggum *et al*, 1989; Welch, 1995; Shewry e Halford, 2002).

Tabella 1.2. Composizione aminoacidica nelle frazioni proteiche e nel macinato di avena.
Dati ricalcolati come g/100g di aminoacidi totali (Draper, 1973)

Aminoacidi	Albumine	Globuline	Avenine	Gluteline	Macinato totale
Lisina	7,5	5,6	3,0	4,9	4,4
Istidina	2,6	2,9	1,6	3,0	1,8
Arginina	4,8	9,8	4,4	9,2	7,0
Acido aspartico*	11,2	8,9	3,1	9,7	8,9
Treonina	5,1	3,6	2,1	4,3	3,4
Serina	6,0	4,9	2,7	4,9	5,4
Acido glutammico*	12,5	20,3	34,7	17,0	21,8
Prolina	5,6	5,5	8,4	5,3	6,9
Cisteina	1,3	1,3	3,8	0,8	3,4
Glicina	6,1	5,4	2,2	4,9	5,5
Alanina	7,3	5,7	4,1	4,9	5,3
Valina	6,0	4,9	5,4	5,3	4,7
Metionina	2,2	1,8	3,4	1,7	1,5
Isoleucina	4,4	4,3	3,4	4,8	3,7
Leucina	7,8	6,9	9,8	7,8	7,0
Tirosina	2,8	2,4	1,6	4,8	4,1
Fenilalanina	6,6	5,9	6,6	6,6	5,1
Triptofano	-	-	-	-	1,7

*Acido glutammico e glutamina sono sommati, acido aspartico e asparagina sono sommati.

1.2 La durezza della cariosside

Nei cereali utilizzati nell'alimentazione come farine o semole, la durezza della cariosside cioè la sua resistenza alla rottura durante il processo di macinazione, è un carattere

di grande importanza tecnologica poiché influenza le dimensioni delle particelle di farina (granulometria), lo stato fisico dei granuli di amido e l'assorbimento idrico da parte dei granuli stessi durante il "condizionamento" (fase di idratazione che precede la molitura) e lo sviluppo dell'impasto (Pomeranz e Williams, 1990; Morris e Rose, 1996). La durezza influenza inoltre la durata e il consumo energetico della macinazione, la resa in farina e gli usi tecnologici di quest'ultima.

La durezza della granella è correntemente stimata in termini di (i) Indice di PSI (Particle Size Index), (ii) riflettanza nel vicino infrarosso (NIR) oppure (iii) indice SKCS (Single Kernel Characterization System). L'indice PSI è il peso (in grammi) di macinato che passa attraverso un setaccio con maglie di sezione prefissata dopo molitura di 20 g di granella in condizioni standardizzate (Worzella e Cutler, 1939). Avendo una granulometria superiore, il macinato di cariossidi a tessitura "hard" o "extra-hard" passa attraverso il setaccio in piccole quantità rispetto al macinato di varietà soffici. Pertanto queste ultime hanno indici PSI più elevati.

Il valore NIR corrisponde alla riflettanza ottica del macinato all'infrarosso vicino in corrispondenza di una determinata lunghezza d'onda. L'indice SKCS (generalmente con un range di valori che varia tra 10 e 45 per le varietà soffici, tra 60 e 90 per le varietà dure e tra 90 e 110 per le varietà extradure) dipende dal valore medio della forza e del tempo necessari per frantumare singolarmente 300 cariossidi (Williams, 1979; Osborne *et al*, 2001).

1.2.1 La durezza della cariosside in frumento ed avena

Il grado di durezza della granella è comunemente usato per classificare i diversi tipi di frumento (Pomeranz e Williams, 1990; Jolly *et al*, 1996). Infatti, in base alla durezza della cariosside, il frumento è suddiviso in tre classi qualitative principali: soffice (*soft*), duro (*hard*) e extra-duro. Al frumento tenero appartengono sia varietà a cariosside soffice sia varietà a cariosside dura, mentre le varietà di frumento duro producono solo cariossidi extradure.

Gli studi condotti su varietà di frumento caratterizzati da cariossidi soffici o dure hanno evidenziato una differente forza di legame tra i granuli di amido presenti nell'endosperma e la matrice proteica che circonda i granuli stessi (Pomeranz e Williams, 1990). Le cariossidi a tessitura dura sono infatti caratterizzate da una maggior forza di legame tra la matrice proteica e i granuli d'amido, mentre c'è una minore adesione tra proteine e amido nelle varietà a tessitura soffice (Barlow, 1973; Simmonds *et al*, 1973). Nei frumenti soffici la minore forza di legame tra amido e proteine permette una buona

separazione tra queste due macromolecole e minori danneggiamenti dell'amido durante la molitura in quanto la "linea di frattura" scorre all'interfaccia tra granulo d'amido e matrice circostante (Symes 1965, 1969), mentre nel caso di varietà a cariosside dura o extradura la linea di frattura attraversa i granuli di amido.

Dal punto di vista tecnologico le varietà di frumento a granella soffice sono caratterizzate da una cariosside più friabile che richiede meno energia, meno tempo e meno acqua per la macinazione. Esse hanno una maggior resa in farina rispetto alle varietà *hard*, con una granulometria molto piccola e ridotto danneggiamento dei granuli d'amido. Le farine di queste varietà sono preferenzialmente usate per la preparazione di biscotti e torte. Le varietà a granella dura assorbono una quantità maggiore d'acqua durante la fase di formazione dell'impasto e sono usate preferenzialmente per produrre pane e prodotti da forno lievitati.

Infine le varietà della specie tetraploide *T. turgidum* ssp. *durum* sono caratterizzate da cariossidi extradure che producono un macinato grossolano denominato semola, usato principalmente per produrre pasta oppure, dopo un' ulteriore macinazione, pani tipici dell'Italia meridionale (Cutler e Brinson, 1935; Tipples *et al*, 1994; Morris e Rose, 1996; Devaux *et al*, 1998).

La specie *Avena sativa* è caratterizzata da cariossidi estremamente soffici con valori medi di SKCS sempre fortemente negativi, mai riscontrati in altri cereali (Corona *et al*, 2001a; Pogna *et al*, 2002; Hansen *et al*, 2004; Iwami *et al*, 2005; Pedersen *et al*, 1996; Li *et al*, 1996). Soltanto le cariossidi di alcune rare varietà extra-soffici di grano tenero possono raggiungere valori di SKCS leggermente inferiori a -10 (Gazza *et al*, 2006a), mentre *T. monococcum*, grano diploide con genoma AA coltivato su piccole superfici in Italia e in Nord Europa, produce cariossidi soffici con valori medi di SKCS vicino a zero o leggermente negativi (Pogna *et al*, 2002; Taddei *et al*, 2009). Al contrario, le cariossidi di orzo e segale presentano sempre valori positivi di SKCS, in genere superiori a 40 (Iwami *et al*, 2005; Hansen *et al*, 2004), mentre quelle di riso, mais e sorgo hanno generalmente una tessitura *hard*, sebbene esistano genotipi (*opaque-2*) di mais e sorgo a tessitura più soffice.

L'estrema sofficià della cariosside di avena comporta alcuni aspetti negativi dal punto di vista agronomico e tecnologico, soprattutto per le varietà a cariosside nuda, nelle quali viene a mancare la protezione meccanica offerta dalle glume. Infatti, l'elevata incidenza di cariossidi frantumate durante la raccolta meccanica e la trebbiatura di varietà particolarmente soffici riduce notevolmente la percentuale di germinazione, la vitalità e salubrità del seme (Valentine e Hale, 1990; Peltonen-Sainio *et al*, 2001). Anche la qualità dei *flakes* di avena è

influenzata negativamente dalla frantumazione delle cariossidi. Un basso numero di cariossidi rotte significa infatti *flakes* più numerosi e più grandi.

1.2.2 Le basi genetiche della durezza della cariosside

Nell'ultimo decennio c'è stato un forte incremento degli studi sulle basi genetiche, biochimiche e fisiologiche della durezza della cariosside. In particolare, gli studi genetico-molecolari hanno dimostrato che le variazioni nella tessitura delle cariossidi di grano tenero e il loro utilizzo industriale, sono fortemente influenzati dal contenuto in alcune proteine dell'endosperma legate ai granuli d'amido, note come **puroindoline**.

Nel grano, le differenze nella durezza della cariosside riscontrate tra le diverse varietà sono state da tempo associate a fattori genetici (Symes, 1961). In particolare, in seguito allo studio delle progenie di incroci tra varietà *soft* e varietà *hard* allo scopo di studiare la trasmissione ereditaria del carattere tessitura della cariosside, è stato scoperto che le differenze in durezza sono in gran parte dovute ad un singolo locus, denominato *Ha* (*Hardness*) (Symes 1965, 1969; Mattern *et al*, 1973; Baker e Dick, 1975; Law *et al*, 1978). Esso è localizzato in posizione distale nel braccio corto del cromosoma 5D ed è quindi assente nel frumento duro, notoriamente caratterizzato da cariossidi particolarmente dure. La durezza della cariosside è un carattere genetico semplice, in cui il fenotipo a granella soffice (*Ha*) è dominante sul fenotipo a granella dura (*ha*) (Law *et al*, 1978).

Chantret *et al* (2005) hanno dimostrato che il locus *Ha* è costituito da due geni principali denominati *Pina-D1* e *Pinb-D1* molto vicini tra loro (circa 18.000 basi di distanza), e da un terzo gene denominato *Gsp-D1* i cui rispettivi prodotti proteici sono la puroindolina a (Pin-A), la puroindolina b (Pin-B) e la Grain Softness Protein (GSP). In realtà, le GSP non sembrano coinvolte nella determinazione della durezza della cariosside. Recentemente nei tre cromosomi della serie omologa 7 di frumento tenero è stato individuato un locus denominato *Pinb-2* che codifica per una variante della Pin-B caratterizzata da solo due residui di triptofano rispetto ai tre della Pin-B e dalla incapacità di accumularsi sui granuli di amido (Chen *et al*, 2009).

1.2.2.1 Friabiline, puroindoline e proteine 2S

Greenwell e Schofield (1986) furono i primi a fornire l'evidenza sperimentale che la tessitura soffice della cariosside di frumento è correlata con la presenza sui granuli di amido di un gruppo di proteine denominate “**friabiline**”, assenti o rare nelle cariossidi dure o extradure. Le friabiline sono risultate costituite da diversi componenti, appartenenti alla

super-famiglia proteica 2S che comprende anche gli inibitori della tripsina e delle α -amilasi e le proteine non specifiche per il trasferimento dei lipidi (ns-LTP) (Greenwell e Schofield, 1989; Jolly *et al*, 1993; Gautier *et al*, 1994; Oda, 1994; Morris *et al*, 1994; Oda e Schofield, 1997). Le proteine appartenenti alla famiglia 2S sono caratterizzate da punti isoelettrici basici e da 10 residui di cisteina in posizioni conservate a costituire uno scheletro caratteristico. E' inoltre da notare la presenza di particolari motivi conservati come il dimero CC e il trimero CRC. Gli inibitori α -amilasi sono stati ritrovati in diverse specie (grano, segale e orzo) e sono caratterizzati da una massa molecolare monomerica di circa 13 KDa; esse deriverebbero da un unico gene ancestrale (Iulek *et al*, 2000). Le α -amilasi sono enzimi che catalizzano l'idrolisi iniziale dell'amido in oligosaccaridi più corti. Tre ipotesi sono state suggerite per spiegare l'esistenza di questi inibitori nel seme: potrebbero essere coinvolti in meccanismi di regolazione di germinazione del seme, essere proteine di stoccaggio o essere coinvolte in meccanismi di difesa della pianta. L'ultima ipotesi è supportata dal fatto che alcuni di questi inibitori sono specifici per le amilasi degli insetti (Feng *et al*, 1996; Franco *et al*, 2000).

Studi basati sul confronto delle sequenze N-terminali hanno fornito evidenze che le friabiline sono costituite da sei proteine di cui due, successivamente identificate come due isoforme con elevata omologia di sequenza, costituiscono le componenti principali direttamente coinvolte nella modulazione della tessitura della cariosside (Blochet *et al*, 1991, 1993; Greenwell e Schofield, 1986; Dubreil *et al*, 1997). Il sequenziamento della proteina più abbondante tra le due ha dimostrato la presenza di un dominio centrale idrofobico contenente cinque residui di triptofano, fatto che ha suggerito la denominazione di **puroindoline** (Pin), con riferimento all'anello indolico del triptofano e al nome greco del grano (*puros*) (Blochet *et al*, 1993). Lavori successivi di amplificazione PCR con primers specifici basati sulle sequenze delle puroindoline (Gautier *et al*, 1994) hanno portato all'isolamento di due famiglie di cloni di cDNA corrispondenti alla Pin-A e alla Pin-B. Queste sono quindi proteine basiche (punto isoelettrico, $pI > 10$) ricche in triptofano (3,5-4,3%), lisina (8,4%) e cisteina (8,5%), che presentano un'omologia di sequenza aminoacidica pari al 60%. Le proteine mature hanno peso molecolare di 12,9 –13,2 KDa e contengono un "signal peptide" di 19 aminoacidi. La Pin-A matura (Fig.1.5a) possiede 117 aminoacidi mentre la Pin-B matura (Fig.1.5b) ne contiene uno in meno. Rispetto al prodotto di traduzione, oltre al "signal peptide" nelle puroindoline mature mancano i primi nove amminoacidi nella regione N-terminale e gli ultimi 3-5 nella regione C-terminale. La presenza nelle puroindoline di una regione comprendente cinque residui di triptofano nella Pin-A e tre residui nella Pin-B, caratteristica estremamente rara tra le proteine del mondo vegetale, le rende parzialmente idrofobiche e conferisce loro la

capacità di legare i lipidi. In particolare la puroindolina A è in grado di legarsi saldamente a fosfolipidi e glicolipidi, mentre la puroindolina B interagisce solo con i fosfolipidi carichi negativamente (Gautier *et al*, 1994). Greenblatt *et al* (1995) hanno dimostrato che l'interazione di Pin-A e Pin-B con l'amido della granella matura è mediata dai lipidi polari presenti sulla superficie dei granuli d'amido, lipidi verosimilmente derivati dalle membrane degli amiloplasti.



Figura 1.5a Struttura molecolare della puroindolina A di frumento.

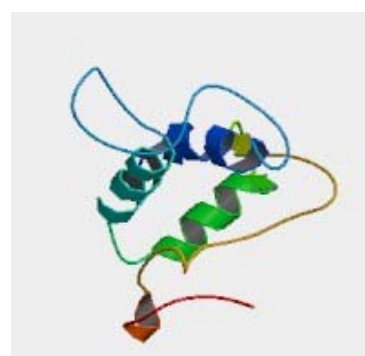


Figura 1.5b Struttura molecolare della puroindolina B di frumento.

Come già accennato le puroindoline presentano dieci cisteine in specifiche posizioni della molecola. I cinque ponti disolfuro intramolecolari che interessano questi residui cisteinici conferiscono alla molecola una struttura secondaria costituita mediamente dal 30% di α -eliche e dal 30% di β -foglietti. I legami disolfuro sono coinvolti nella stabilizzazione del ripiegamento delle proteine stesse, pattern di ripiegamento che è inoltre simile a quello delle ns-LTP e delle altre proteine 2S. Queste caratteristiche permettono di classificare le puroindoline e le proteine omologhe di orzo (ordoindoline, Hin) e segale (secaloindoline, Sec) (Figura 1.6) come appartenenti ad una superfamiglia di proteine, tutte probabilmente coinvolte nella difesa contro i patogeni, e probabilmente derivate da una comune proteina ancestrale elicoidale (Le Bihan *et al*, 1996).

<i>Pin-A</i>	MKALFLIGL	LALVASTAFA	QYSEVVGSY-	DVAGGGGAQQ	CPVE-TKLNS	RNYLLDRS	TMKDFPVTWR	WVKWKGGQ
<i>Pin-B</i>	MKTLFLLAL	LALVASTTFA	QYSEVGGWYN	EVGGGGGSQQ	PQERPKLSS	KDYVMERF	TMKDFPVTWP	-TKWKGGDE
<i>Hin-A</i>	MKALFLMGL	LALVASAFA	QYGEVVGSYE	GGAGGGGAQQ	PLG-TKLD	RNYLLDRT	TMKDFPVTWR	WWTWKGGDE
<i>Hin-B1</i>	MKTLFLLAI	LALVASTTFA	QYS-VGGGYN	DVGGGGGSQQ	PQERPNLGS	KDYVMERF	TMKDFPVTWP	-TKWKGGDE
<i>Hin-B2</i>	MKTLFLLAL	LALVASTTSA	QYS-VGGGYN	DVGGGGGSQQ	PQERPNLGS	KDYVMERF	TMKDFPVTWP	-TKWKGGDE
<i>Sec-B</i>	MKTLFLLAL	LALVASTTLA	QISEVGGWIN	EVGGGGGAQQ	PLERPKLSS	KDYVMERF	TMKDFPVTWP	TRWKGGDE

<i>Pin-A</i>	-ELLGE	CSR	LGQMPPQR	NIIQGSIQGD	LGGIFGFQRD	RASKVIEAK	NLPPRNQGP	P	NIPGTIGY	YW
<i>Pin-B</i>	HEVREK	CKQ	LSQIAPQR	DSIRRVIQGR	LGGFLGIWRG	EVFKQLQRAQ	SLPSKNMGA	D	KFPS--GY	YW
<i>Hin-A</i>	-ELLHD	CSQ	LSQMPPQR	NIIQGSIQRD	LGGFFGFQRD	RTVKVIAAK	NLPPRNQGP	A	NIPSTTGY	YW
<i>Hin-B1</i>	QEVREK	CCQ	LSQIAPQR	DAIRGVIQK	LGGIFGIGGG	DVFKQIQRAQ	ILPSKNMGA	D	KFPS--GY	YW
<i>Hin-B2</i>	HEVREK	CCQ	LSQIAPHQR	LGGIFGIGGG	AVFKQIQRAQ	ILPSKNMGV	D	KFPS--GY	YW	
<i>Sec-B</i>	HEVREK	CCQ	LSQIAPQR	DSIRGMIOQK	FGGFFGIWRG	DVFKOTORAQ	SLPSKNMGA	D	KFPRGYW	

Figura 1.6. Sequenza aminoacidica delle proteine Pin-A, Pin-B, Hin-A, Hin-B1, Hin-B2 e Sec-B. I residui di cisteina sono evidenziati in rosso.

Studi sulla cinetica di sintesi delle puroindoline hanno permesso di dimostrare che queste proteine sono prodotte a partire dalla seconda settimana dopo l'antesi fino ad oltre il 35 giorno, mentre studi di immunolocalizzazione hanno dimostrato che Pin-A e Pin-B sono localizzate soprattutto nell'endosperma amilaceo, nell'interfaccia tra i granuli di amido e la matrice proteica.

1.2.2.2 Polimorfismo allelico e durezza della cariosside in frumento tenero

Le cariossidi soffici di frumento presentano elevate quantità di Pin-A e Pin-B legate ai granuli di amido rispetto alle cariossidi dure o extra-dure (Corona *et al*, 2001a,b). Nelle cariossidi a tessitura soffice sono sempre presenti gli alleli *wild-type Pina-D1a* e *Pinb-D1a* (Giroux e Morris, 1997, 1998; Corona *et al*, 2001a) mentre nelle cariossidi dure sono state identificate diverse varianti alleliche ad entrambi i loci puroindolinici, soprattutto al locus *Pinb-D1*.

La prima variante allelica identificata, denominata *Pinb-D1b*, è caratterizzata da una sostituzione aminoacidica in posizione 46 all'interno del dominio ricco in triptofano. A seguito di questa mutazione, il codone codificante per la glicina è sostituito da un codone codificante per la serina. La sostituzione avviene in una zona critica della molecola, il dominio ricco in triptofano verosimilmente implicato nel legame con la membrana dell'amiloplasto. Le varietà che contengono l'allele *Pinb-D1b* in presenza dell'allele selvatico *Pina-D1a* producono cariossidi di durezza intermedia (60-70 unità SKCS) e accumulano quantità estremamente ridotte di Pin-B sui granuli d'amido. Inoltre presentano una quantità leggermente inferiore di Pin-A rispetto alle varietà a cariosside soffice (Corona *et al*, 2001a; Gazza *et al*, 2005).

Le varianti alleliche *Pinb-D1c* e *Pinb-D1d* del gene codificante per la Pin-B sono caratterizzate da una singola sostituzione nucleotidica rispettivamente in posizione 60 e in posizione 44, variazione che provoca la sostituzione leucina-prolina nel primo caso e triptofano-arginina nel secondo. In particolare l'allele *Pinb-D1d* riduce drasticamente l'accumulo di Pin-B sui granuli d'amido e influisce anche sull'accumulo di Pin-A (Corona *et al*, 2001b; Gazza *et al*, 2005). Gli alleli *Pinb-D1e*, *Pinb-D1f* e *Pinb-D1g* caratterizzati da una sostituzione nucleotidica rispettivamente nei codoni codificanti per il triptofano in posizione 39 nel primo caso, per il triptofano in posizione 44 nel secondo e per la cisteina in posizione 56 nel terzo, sono alleli nulli in quanto le suddette mutazioni determinano l'insorgenza di codoni di stop (Giroux e Morris, 1997, 1998; Lillemo e Morris, 2000; Morris e Allan, 2001).

Le rare varietà che contengono questi alleli hanno durezza intermedia e non accumulano Pin-B sui granuli di amido. Xia *et al* (2005) hanno identificato un'ulteriore mutazione, indicata *Pinb-D1p*, caratterizzata dalla delezione di un singolo nucleotide con la conseguente comparsa di un codone di stop in posizione 60 nella sequenza proteica, mentre Chen *et al* (2006), Ikeda *et al* (2005) e Ram *et al* (2005) hanno identificato le varianti alleliche *Pinb-D1q*, *Pinb-D1r*, *Pinb-D1s*, *Pinb-D1t* e *Pinb-D1i(t)*, tutte caratterizzate dalla sostituzione, delezione o inserzione di una singola base e dal ridotto o nullo accumulo di Pin-B sui granuli di amido. Da un recente studio di mutagenesi condotto su una varietà *soft* di grano tenero (Feiz *et al*, 2009) è emerso che tutte le mutazioni che comportano una perdita di funzionalità delle puroindoline e quindi un aumento della durezza della cariosside avvengono in prossimità della regione ricca in triptofano sia della Pin-A che della Pin-B.

Giroux e Morris (1998) hanno identificato alcune varietà di frumento a tessitura particolarmente dura (mediamente superiore a 70 unità SKCS) contenenti l'allele "wild-type" *Pinb-D1a* accoppiato con l'allele nullo *Pina-D1b*. Si ritiene che in queste varietà manchi il locus codificante per la Pin-A a causa di una delezione cromosomica. Tuttavia Gazza *et al* (2005) hanno individuato un altro allele nullo denominato *Pina-D1c* caratterizzato dalla delezione di una citosina in posizione 267, delezione che determina uno scivolamento del reading-frame e la comparsa di un codone di stop in posizione 361. Più recentemente, Chen *et al* (2006) hanno identificato una varietà di grano con una doppia mutazione, denominata *Pina-D1b/Pinb-D1h(t)*. In questa varietà Pin-A e Pin-B sono entrambe assenti, come avviene in *T. turgidum* ssp *durum*. In ogni caso è interessante notare che nelle varietà contenenti l'allele nullo *Pina-D1b* o *Pina-D1c*, nonostante la presenza dell'allele wild-type *Pinb-D1a*, sul granulo d'amido si depositano quantità estremamente ridotte di Pin-B (Corona *et al*, 2001a; Capparelli *et al*, 2003), a dimostrazione del fatto che il legame di Pin-B con l'amiloplasto richiede la presenza di Pin-A. D'altra parte, Swan *et al* (2006a) hanno osservato che una maggiore sintesi di Pin-B ottenuta in varietà transgeniche di grano tenero contenenti dosi aggiuntive di *Pinb-D1a* determina un incremento della quantità di Pin-A legata ai granuli d'amido. Queste osservazioni suggeriscono una interazione tra Pin-A e Pin-B nel loro processo di deposito sulla superficie dei granuli di amido.

1.2.2.3 Le puroindoline in avena ed in altri cereali

Ulteriori varianti alleliche codificanti per la Pin-A e per la Pin-B, contenenti mutazioni all'interno o nelle vicinanze del dominio ricco in triptofano in entrambe le proteine, sono state

individuare nei genomi C, D, S, M e U di diverse specie appartenenti al genere *Aegilops*, tra le quali *Ae. tauschii* e *Ae. speltoides* (Massa et al, 2004; Chen et al, 2005). In *Ae. ventricosa*, una specie tetraploide selvatica di frumento (genoma DDNN), Gazza et al (2006b) hanno dimostrato che Pin-A e Pin-B sono presenti ciascuna in duplice copia, codificate dagli alleli *Pina-D1a* e *Pina-N1a* (Pin-A) e *Pinb-D1h* e *Pinb-N1a* (Pin-B).

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). 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*) i geni puroindolinici sono assenti a seguito di delezioni probabilmente avvenute subito dopo la formazione delle specie tetraploidi stesse (Gautier et al, 2000). L'assenza dei geni codificanti per le puroindoline dai genomi A e B delle specie poliploidi è probabilmente dovuta a eventi in cui sono stati coinvolti elementi trasponibili (Devos et al, 2002; Ma et al, 2004; Chantret et al, 2005). Nei genomi A^uG (*T. timopheevii*) e A^uA^mG (*T. zhukovskyi*) sono stati identificati entrambi i geni puroindolinici, appartenenti al solo genoma A^u (Simeone et al, 2007; Li et al, 2008).

In letteratura non sono disponibili informazioni su eventuali proteine 2S legate all'amido di avena (*Avena sativa*). Tuttavia Gautier et al (2000) utilizzando primer specifici per le sequenze codificanti per Pin-A e Pin-B di frumento tenero hanno ottenuto in *Avena sativa* due prodotti di amplificazione da PCR, denominati **avenoindolina A** (Avin-A) e **avenoindolina B** (Avin-B). In particolare, la sequenza aminoacidica dedotta da quella nucleotidica di avenoindolina A è identica a quella di Pin-A salvo per la sostituzione di un residuo di acido glutammico con un residuo di valina in posizione 81, mentre tra avenoindolina B e Pin-B l'omologia di sequenza è risultata superiore al 91%. Inoltre uno studio condotto da Tanchak et al (1998) sulla varietà canadese Hinoat di avena ha portato all'identificazione di quattro cloni di cDNA (3B3-5, 3B3-7, 3B3T-3 e 3B3T-5) appartenenti ad una famiglia multigenica che codifica per proteine simili alle puroindoline. In particolare i cDNA 3B3-5 e 3B3-7 differiscono tra loro per due aminoacidi su 147, mentre i cDNA 3B3T-3 e 3B3T-5 sono identici salvo che nella regione non codificante. 3B3-5 e 3B3T-5 hanno una similarità del 66,2% e contengono in posizioni conservate i 10 tipici residui di cisteina delle proteine 2S oltre a un dominio centrale con quattro residui di triptofano. Rispetto alla avenoindolina-A, questi cDNA hanno mostrato una similarità del 53-55%, mentre rispetto alla

avenoindolina-B è stata stimata una similarità del 54-55%. Per questa somiglianza con le avenoindoline, Tanchak *et al* (1998) hanno definito le proteine codificate da questi cDNA come appartenenti alla famiglia delle **triptofanine** che include anche le puroindoline di grano, le ordoindoline di orzo e le avenoindoline di avena.

Sequenze codificanti per proteine omologhe alle puroindoline sono state osservate anche in orzo (*Hordeum vulgare*) 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 *Hina-1*, *Hinb-1* e *Hinb-2* (Gautier *et al*, 2000; Darlington *et al*, 2001). Questi ultimi sono presenti nell'estremità distale del braccio corto del cromosoma 5H di orzo. È interessante notare che in orzo esistono due geni (*Hinb-1* e *Hinb-2*) con omologia pari al 95,7% che codificano entrambi per una proteina simile all' 87% alla Pin-B di grano tenero (Takahashi *et al*, 2009).

L'assenza dei geni puroindolinici in riso, mais e sorgo è accompagnata da una tessitura *hard* delle cariossidi. E' interessante notare come le cariossidi di riso (Krishnamurthy e Giroux, 2001) e mais transgenici (Zang *et al*, 2009) in cui sono stati inseriti i geni per le puroindoline di grano hanno manifestato una forte riduzione della durezza e una maggiore resa di estrazione dell'amido in mais.

1.2.3 Gli effetti tecnologici delle puroindoline

La qualità panificatoria delle farine di grano, cioè la loro capacità unica tra i prodotti di macinazione dei cereali di dare impasti elastici ed estensibili da cui si ottengono, dopo lievitazione e cottura, pani di alto volume con alveolatura regolare, dipende principalmente dalla quantità e dalla struttura delle proteine di riserva dell'endosperma (prolamine, cioè gliadine e glutenine).

D'altra parte, le puroindoline condizionano il grado di danneggiamento dell'amido nelle farine il quale a sua volta influenza fortemente l'assorbimento idrico delle farine stesse e, di conseguenza, le caratteristiche reologiche (elasticità, estensibilità e viscosità) degli impasti. E' inoltre noto che i lipidi, soprattutto quelli polari (fosfolipidi e glicolipidi), svolgono un ruolo altrettanto essenziale, in quanto migliorano lo sviluppo dell'impasto, mentre i lipidi non polari (trigliceridi e acidi grassi liberi) sono deleteri per lo sviluppo dell'impasto stesso (MacRitchie e Gras, 1973). Questo effetto è il risultato di un meccanismo complesso coinvolgente i lipidi polari e le proteine disperse nella fase acquosa dell'impasto, le cui proprietà sono essenziali per la formazione e la stabilità dell'impasto (Gan *et al*, 1995).

E' stato suggerito che le puroindoline, essendo in grado di legare i lipidi, possono influenzare direttamente le proprietà reologiche dell'impasto (Dubreil *et al*, 1997). Esse inoltre sembrano coinvolte nell'aumento delle dimensioni della mollica e potrebbero essere utilizzate come tensioattivi naturali da aggiungere alla farina durante la produzione del pane per aumentarne il volume o per accrescere l'estensibilità e la tenacità degli impasti (Dubreil *et al*, 1998a; Giroux e Morris, 1998; Igrejas *et al*, 2001).

1.2.4 Altre proprietà delle puroindoline

Il legame delle puroindoline con i lipidi polari è alla base delle loro spiccate proprietà emulsionanti, rendendole come già accennato interessanti per l'industria alimentare come tensioattivi naturali. Ad esempio, l'aggiunta di 10-20 µg/mL di puroindoline protegge la birra dalla destabilizzazione della schiuma indotta dai lipidi (Clark *et al*, 1994; Douliez, 2000).

Le puroindoline sono inoltre strutturalmente correlate ad altre proteine vegetali che hanno proprietà antimicrobiche e antifungine in vitro, proprietà dovute alla loro capacità di alterare il doppio strato lipidico delle membrane cellulari (Molina *et al*, 1993; Marion *et al*, 1994). Questo suggerisce che le puroindoline, alla pari di altre proteine, come le defensine, le chitinasi, le β -1-3-glucanasi, l'indolicina e la tripticina, potrebbero svolgere un ruolo nei meccanismi di difesa delle piante contro l'invasione di patogeni batterici o fungini (Kagan *et al*, 1990; Hill *et al*, 1991; Broekaert *et al*, 1992; Boman, 1995; Nicolas e Mor, 1995; Broekaert *et al*, 1997; Dubreil *et al*, 1998b; Thevissen *et al*, 1999; Conceicao e Broekaert, 1999; Osbourn, 1999; Hancock e Scott, 2000; Zasloff, 2002; Capparelli *et al*, 2005). In effetti, in alcuni genotipi di riso transgenico l'espressione costitutiva nei tessuti fogliari di entrambe le puroindoline di grano è risultata associata ad una crescita ridotta di *Magnaporthe grisea* e *Rhizoctonia solani*, due tra i maggiori patogeni fungini del riso (Krishnamurthy *et al*, 2001).

Inoltre Jing *et al* (2003) hanno dimostrato che i frammenti peptidici puroA e puroB (FPVTWRWWKWWKG e FPVTWPTKWWKG) derivati rispettivamente dal dominio ricco in triptofano di Pin-A e Pin-B sono in grado di interagire, anche se con diversa affinità, con i lipidi della membrana batterica dei batteri gram-positivi e gram-negativi e di inibirne la crescita. Il peptide, carico positivamente grazie ai residui di arginina e lisina, si dispone in una conformazione energeticamente favorevole e forma un legame con la membrana cellulare ricca di fosfolipidi carichi negativamente, perturbandone la struttura e formando dei "pori" o canali che inibiscono la crescita del batterio.

Capparelli *et al*. (2005) hanno verificato la capacità delle puroindoline, purificate da semi di grano, di inibire la crescita in vitro di cellule di 6 diversi ceppi batterici. Inoltre hanno

verificato che puroindoline native e ricombinanti hanno attività antibatterica comparabile (Capparelli *et al.*, 2006).

Le puroindoline sono inoltre interessanti per l'alto contenuto in aminoacidi essenziali, soprattutto triptofano, lisina e cisteina, anche se in natura non sono in grado di correggere lo scarso valore nutrizionale del grano perché costituiscono solo lo 0,07-0,1% del peso secco della granella.

Infine Swan *et al* (2006b) hanno osservato una ridotta digeribilità dell'amido nei bovini alimentati con farine di frumento tenero transgenico ad alto contenuto in puroindoline ed hanno avanzato l'ipotesi che le puroindoline possano proteggere le molecole di amido dalla digestione microbica nel rumine, aumentando la quantità di amido che riesce ad arrivare nell'intestino.

2. SCOPO DELLA TESI

Le cariossidi di avena (*Avena sativa*) sono caratterizzate da un'estrema sofficità rispetto a quelle degli altri cereali a paglia, carattere con gravi effetti negativi sulla integrità delle cariossidi raccolte meccanicamente e sulla qualità tecnologica di questo cereale, con particolare riferimento alla produzione di *flakes*. Le basi genetiche e biochimiche di questa particolare tessitura della cariosside sono l'argomento di questa tesi. In particolare si è proceduto alla caratterizzazione biochimica, genetica e molecolare delle proteine 2S legate all'amido di *A. sativa* e di alcune specie selvatiche del genere *Avena*. La tesi si occupa anche della cinetica di accumulo di queste proteine durante la maturazione delle cariossidi. Allo scopo di individuare le proteine 2S associate ai granuli d'amido di avena, proteine mai descritte precedentemente, sono stati analizzati genotipi diploidi, tetraploidi ed esaploidi mediante tecniche elettroforetiche monodimensionali (A-PAGE ed SDS-PAGE) e bidimensionali (A-PAGE x SDS-PAGE), spettrometria di massa e tecniche immunoelettroforetiche (Western Blotting) utilizzando anticorpi policlonali specifici per le proteine in analisi. Inoltre sono state utilizzate tecniche di amplificazione PCR e RT-PCR, RACE e sequenziamento genico per identificare e caratterizzare i geni coinvolti nella sintesi delle suddette proteine. Sono state inoltre acquisite informazioni sul ruolo delle proteine 2S di avena nel determinare la tessitura delle cariossidi, producendo a tal fine piante transgeniche di grano duro contenenti geni codificanti per queste proteine.

3. MATERIALI e METODI

3.1 Materiale vegetale

Per questo lavoro sono state utilizzate cariossidi di varietà di *Avena sativa* coltivate presso il campo sperimentale del CRA-QCE (Unità di Ricerca per la Valorizzazione Qualitativa dei Cereali) di Roma e cariossidi di frumento tenero, frumento duro e avena diploide, tetraploide ed esaploide provenienti dalla collezione del CRA-MAS (Bergamo). In particolare, sono state analizzate le seguenti 34 varietà coltivate di *A. sativa*: Abel, Adam, Algeri bee, Argentina, Arne, Bikini, Bionda, Boa Fè, Bullion, Cilla, Checota, Corbit, Donata, Flavia, Fulvia, Genziana, Grafton, Harpoon, Icon, Jim, Klaus, Konradin, Krypton, Kynon, Lisbeth, Nave, Nigra, Prevision, Primula, Rogar 8, Teo BD40, Terra, Tropicale e Vir 2301. Sono state inoltre analizzate le avene diploidi *A. atlantica*, *A. heriantha*, *A. hirtula*, *A. nuda*, *A. strigosa* e le avene tetraploidi *A. barbata*, *A. insularis* e *A. magna* Vir 1786. Sono stati analizzate anche le altre seguenti specie di cereali: *Triticum monococcum* cv. Monlis, *T. monococcum* accessione ID 508, *Secale cereale* (cv. Treviso), *Hordeum vulgare* (cv. Arda), *Sorghum vulgare* (cv. Iside e cv. APS2), *Aegilops columnaris*, *Ae. triuncialis*, *Ae. ventricosa*, *Ae. trivialis* e *Ae. tauschii* coltivate presso il campo sperimentale del CRA-QCE di Roma. Le analisi sono state condotte anche su accessioni di *T. urartu* (ID1542, ID1543 e ID1545), *T. zhukovskyi* (Far77 e Far75), *T. timopheevii* (Lonigo e TR110) e *Ae. speltoides* (A352) gentilmente fornite dal CRA-SCV (S. Angelo Lodigiano, Lo) e su varietà di *Oryza sativa* (cv. Vialone nano e cv. Opale) fornite dal CRA-RIS (Vercelli). Le piante transgeniche sono state ottenute trasformando la cv. Svevo di *T. turgidum* ssp *durum*.

3.2 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, mediante l'utilizzo dell'apparecchiatura Perten 4100 (Perten Instruments, Springfield, IL, USA), la forza necessaria per frantumare singole cariossidi. L'apparecchiatura Perten 4100 è stata impostata in un intervallo di valori di durezza compreso tra -40 e +120. Per ciascuna varietà sono stati analizzate 300 cariossidi private delle glume manualmente. Le cariossidi ottenute direttamente dalle piante T1 rigenerate dai calli trasformati sono state analizzate in numero non superiore a 20. Varietà commerciali di grano tenero e di grano duro a tessitura nota sono state utilizzate come controllo.

3.3 Estrazione del DNA

Circa 250mg di epicotili sono stati triturati in azoto liquido all'interno di una provetta da 1,5 mL, e la polvere ottenuta è stata sospesa in 2 mL di tampone CTAB (2% Cetyl-Trimethyl-Ammonium-Bromide; Tris-HCl 0,1M pH 8,00; NaCl 1,4M; EDTA 20mM) preriscaldato a 65°C (avendo aggiunto precedentemente 10 µL di β-mercaptoetanolio ogni 5 mL di CTAB da utilizzare). La soluzione è stata poi trasferita in una provetta Falcon da 15 mL. Il campione è stato incubato in bagno termostato a 60°C per un'ora agitando saltuariamente. Sono stati successivamente aggiunti 2 mL di cloroformio-alcol isoamilico (24:1) (v/v), e dopo una breve agitazione la soluzione è stata centrifugata a 6000 rpm (rivoluzioni per minuto) per 10 min a 20°C; si ottengono così due fasi. La fase superiore è stata trasferita in una nuova provetta e gli acidi nucleici sono stati precipitati aggiungendo un volume di isopropanolo freddo. Dopo una blanda agitazione il campione è stato incubato a -20°C per un'intera notte (o/n) o un'ora a -80°C. Successivamente il campione è stato centrifugato a 13000 rpm per 30 min a 4°C e il pellet ottenuto è stato lavato con etanolo freddo al 70%. Dopo il lavaggio in etanolo il campione è stato centrifugato a 13000 rpm per 10 min a 4°C. Il pellet contenente gli acidi nucleici è stato asciugato all'aria e sospeso in 100 µL di H₂O distillata sterile. Il DNA è stato estratto anche in modo automatizzato con lo strumento Maxwell[®]16 Instrument (Promega, USA) seguendo il protocollo del costruttore.

Per l'estrazione del DNA da seme, la cariosside è stata schiacciata con una pinza e si sono aggiunti 100 µL di NaOH 125mM. La soluzione è stata incubata per 1 ora a temperatura ambiente, agitando saltuariamente e successivamente a 70°C per 10 min (Shariflou *et al*, 2003). Si sono poi aggiunti 100 µL di Tris-HCl 250 mM pH 8.8, e dopo una centrifugazione a 13000 rpm per 10 min, il surnatante è stato prelevato e conservato a 4°C fino al momento dell'uso.

3.4 Estrazione dell'RNA

L'RNA è stato estratto dalle cariossidi di *A. sativa*, varietà Donata, raccolte 7, 14, 21, 28 e 35 Giorni Dopo l'Antesi (GDA). Le cariossidi sono state conservate a -80 °C fino al momento dell'estrazione. Dopo aver pesato 1-2 semi per campione, pari a circa 80-100 mg, e averli inseriti in provette sterili da 1,5 mL, questi sono stati omogeneizzati in 1 mL di Trizol (Trizol Reagent, Invitrogen, USA) mediante l'utilizzo di pestelli. I campioni sono stati poi centrifugati a 4 °C per 10 min a 12000 rpm e il supernatante è stato trasferito in un'altra provetta sterile da 1,5 mL ed incubato per 5 min a temperatura ambiente per dissociare completamente i complessi nucleoproteici. Dopo aver aggiunto 200 µL di cloroformio, i

campioni sono stati agitati vigorosamente per 15 secondi, incubati nuovamente a temperatura ambiente per 2 min e centrifugati a 12000 rpm per 15 min a 4 °C. La fase acquosa contenente l'RNA è stata recuperata, trasferita in una nuova provetta e quindi precipitata con 500 µL di isopropanolo. I campioni sono stati incubati per 10 min a temperatura ambiente e centrifugati per 10 min a 4 °C a 12000 rpm. Il pellet contenente l'RNA è stato sospeso in 1 mL di etanolo 70% (v/v) e centrifugato a 7500 rpm per 5 min a 4 °C. Il pellet ottenuto è stato asciugato a temperatura ambiente per circa 15 min e poi sospeso in 100 µL di acqua sterile per 10 min a 55 °C. Il contenuto in RNA è stato stimato mediante analisi allo spettrofotometro, osservando il rapporto tra le densità ottiche a 260 e 280 nm. I campioni con rapporto compreso tra 1,5 e 1,8 sono stati conservati a -80 °C. Le soluzioni ed il materiale plastico sono stati sterilizzati in autoclave a 121 °C per 40 min.

3.5 Amplificazione PCR da DNA genomico

Circa 200 ng di DNA genomico sono stati utilizzati per le reazioni di amplificazione PCR. Le reazioni sono state effettuate in un volume di 50 µL utilizzando le DNA polimerasi con proprietà Hot-start ed High-fidelity: JumpStart™ REDAccuTaq® LA DNA Polymerase (Sigma-Aldrich) o GoTag Hot Start Polymerase (Promega).

Le soluzioni di reazione contenevano il buffer REDAccuTaq® 1X (Sigma-Aldrich) o Green GoTaq Flexi Buffer 1X (Promega), dNTP (100 µM), 2 unità di JumpStart™ REDAccuTaq® LA DNA Polymerase oppure 1,25 u di GoTag Hot Start Polymerase (Promega) e gli opportuni primer (Tabella 3.1) ad una concentrazione 0,5 pM. Le reazioni termocicliche prevedevano un'incubazione di 3 min a 94 °C e successivi 35 cicli di amplificazione secondo la seguente modalità: 1 min a 94 °C, 1,5 min a T_m (Temperatura di melting) (Tabella 3.1) e 1,5 min a 72 °C, seguiti da una reazione di 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). Dopo la separazione elettroforetica il gel contenente bromuro di etidio (10mg/mL) è stato visualizzato all'UV.

3.6 Retro-trascrizione, amplificazione PCR (RT-PCR) e RACE

Per la sintesi di cDNA è stato utilizzato il Kit Improm II RT System (Promega), seguendo le istruzioni del fabbricante. Per la reazione di retro-trascrizione sono stati utilizzati circa 750 ng di RNA e 500 ng di oligo-dT, cui è stata aggiunta acqua sterile per arrivare ad un volume totale di 5 µL. I campioni sono stati successivamente incubati per 5 min a 70 °C per

denaturare i filamenti di RNA e subito dopo conservati in ghiaccio sino alla reazione di retro-trascrizione.

Tabella 3.1. Primers e T_m utilizzati per l'amplificazione PCR

Gene	Primer senso	Primer antiseno	T _m
<i>Vinb-1</i>	5'-GAAACATGAAGACCTTACTGC-3'	5'-CCAGTAGTAGCCAGTAGTAAG-3'	58°C
<i>Vinb-2</i> (3B3-5/7)	5'-ATGAAGATCTTCTTCTTCT-3'	5'-CCAGTAATAGCCAAAAGTC-3'	48°C
<i>Vinb-3</i> (3B3T-3/5)	5'- ATGAAGGCCTTATTCCTCCTAGCTT-3'	5'- GTAATATCCAAGATTGGTAGGGAAG-3'	58°C
<i>Aati</i>	5'-ATGGCGTCCAAGTGCAATTGC-3'	5'- TCAGAATGTTTCTCTTTATTC-3'	54°C
<i>Pina-D1</i>	5'-ATGAAGGCCCTCTTCCTCA-3'	5'-TCACCAAGTAATAGCCAATAGTG-3'	58°C
<i>Pinb-D1</i>	5'-ATGAAGACCTTATTCCTCC-3'	5'-TCACCAAGTAATAGCCACTAGG-3'	54°C
<i>β-tubulina</i>	5'-ATGGACCTTGAGCCCGGT-3'	5'-CTGATACTGTGGTTGAGCC-3'	*

*La T_m per i primer della β-tubulina è corrispondente a quella dei primers per i geni coamplificati.

Le reazioni sono state effettuate in un volume di 20 µL contenente il tampone Improm II 1X, dNTP (500 µM), MgCl₂ (1,5 mM), RNAsi (20 U) e Improm-II RT (1 µL). I campioni sono stati incubati per 5 min a temperatura ambiente per 1 ora a 42 °C ed infine incubati a 70 °C per 15 min per inattivare l'enzima. Il prodotto di ogni reazione (5 µL) è stato poi utilizzato per la reazione di amplificazione PCR, usando il protocollo seguente. I geni delle proteine 2S e il gene “house-keeping” della β-tubulina (Accession Number: X54852.1) utilizzato per la normalizzazione quantitativa dei diversi prelievi sono stati amplificati utilizzando il Kit GoTaq DNA Polimerase (Promega) in un volume finale di 50 µL costituito dal tampone GoTaq 0,8X, dNTP (150 µM), 2,5 unità di GoTaq DNA Polimerase e gli opportuni primer (Tabella 3.1) ad una concentrazione di 1 µM. Dopo pre-riscaldamento per 2 min a 94 °C e successiva aggiunta di GoTaq DNA Polimerase, ogni campione è stato incubato per 2 min a 94°C. Sono stati quindi effettuati 35 cicli di amplificazione secondo la seguente modalità: 1 min a 94°C, 1 min a T_m (Tabella 3.1) e 1,5 min a 72 °C, seguiti da una estensione finale a 72°C per 7 min. I prodotti di amplificazione sono stati poi analizzati su gel d'agarosio (1,6%), con il tampone di corsa TAE 1X , e visualizzati all'UV. Per le reazioni di RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends), 10µg di RNA estratti da semi immaturi (cv.Donata) raccolti a 28 GDA sono stati sottoposti ad amplificazione di 3'e 5' RACE utilizzando il “3' and 5'RACE System” (Invitrogen, USA) secondo le istruzioni dei Kit ed utilizzando i primers opportuni per l'estensione del cDNA (Tabella 3.1) come precedentemente citato.

3.7 Purificazione dei prodotti di PCR da gel di agarosio

Il DNA, amplificato tramite reazione di PCR, dopo la corsa elettroforetica su gel di agarosio è stato estratto utilizzando il kit commerciale NucleoSpin[®] (Macherey-Nagel, Germania) ed eluito in 30µL di H₂O sterile.

3.8 Clonaggio e sequenziamento dei prodotti di amplificazione

I prodotti di amplificazione eluiti da gel sono stati clonati usando il TOPO[®] TA Cloning Kit for Sequencing contenente One Shot TOP10 Electrocomp *E.coli*, seguendo le istruzioni del costruttore (Promega, USA). I plasmidi con gli opportuni frammenti di DNA inseriti sono stati purificati con il metodo litico utilizzando il Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) e sequenziati. In alternativa il sequenziamento è stato effettuato direttamente sui prodotti di amplificazione PCR eluiti da gel di agarosio. Circa 13 ng del prodotto di amplificazione PCR purificato da gel di agarosio sono stati utilizzati per la ulteriore reazione di amplificazione PCR per il sequenziamento. Le reazioni sono state effettuate in un volume di 20 µL contenente 8 µL della mix per il sequenziamento (Beckman Coulter, CA,USA) e 3 pmoli del primer opportuno (Tabella 3.1). Le reazioni termocicliche prevedevano 30 cicli di amplificazione secondo la seguente modalità: 20 sec a 96 °C, 20 sec a 50 °C e 4 min a 60 °C. Il prodotto di PCR è stato poi purificato aggiungendo 2 µL di sodio acetato 3M, 2 µL EDTA 100mM, 1 µL glicogeno e 60 µL etanolo assoluto freddo e lasciato a -80 °C per 30 min. Il campione è stato poi centrifugato a 14000 rpm a 4 °C per 15 min e il pellet è stato lavato due volte con 200 µL di etanolo al 70% freddo centrifugando per 10 min a 4 °C a 14000 rpm. Il pellet, asciugato per 10 min sottovuoto, è stato poi risospeso in 40 µL di Sample Loading Solution (SLS, Beckman Coulter) prima di essere sottoposto a sequenziamento utilizzando il sequenziatore, modello CEQ 8000, seguendo le istruzioni del costruttore (Beckman Coulter).

3.9 Trasformazione

Dagli embrioni immaturi prelevati 14 giorni dopo l'antesi dalla varietà di grano duro Svevo ed allevati *in vitro* sono stati ottenuti 1800 calli i quali sono stati bombardati con due costrutti preparati con il plasmide pRDPT5 gentilmente fornito dal Prof. R. D'Ovidio (Università della Tuscia). I costrutti contenevano la regione codificante del gene *Vinb-X2a* o quella del gene *Vinb-X3a* (vedi figura 4.16) inserita nei siti Sall e Xba del suddetto plasmide tra il promotore *Dx5Prom* e il terminatore *Dx5T* (Fig. 3.1). Il promotore *Dx5Prom* e il

terminatore *Dx5T* provengono dal gene *Glu-D1x5* codificante per la subunità gluteninica HMW 5, gene che viene espresso solo nell'endosperma. I siti di restrizione *SalI* e *XbaI* fiancheggianti i geni *Vinb-X2a* o *Vinb-X3a* sono stati generati mediante amplificazione PCR in un volume finale di 50 µL con 300 ng di DNA genomico della varietà di avena Donata, 2,5 U di High Fidelity Tag (Promega), 1X Taq buffer, 10 pmoli di ciascun primer e 100 µM di ciascun dNTP. Le condizioni di amplificazione sono state di 1 ciclo iniziale a 94°C e 35 cicli a 94°C per 1 min, 58°C per 1,5 min e 72°C per 1,5 min. La reazione è stata conclusa con un ciclo finale a 72°C per 10 min. Dopo digestione con *SalI* e *XbaI*, gli ampliconi dei geni *Vinb-X2a* e *Vinb-X3a* sono stati inseriti nel plasmide pRDPT5 generando un costrutto di 5660 bp. Contemporaneamente ai due costrutti contenenti *Vinb-2* e *Vinb-3*, i calli sono stati trasformati con il plasmide pAHC20 contenente il gene *Bar* che codifica per l'enzima fosfinotricina acetil trasferasi (*PAT*) il quale acetila, detossificandola, la fosfinotricina (PPT) o glufosinato ammonio, principio attivo contenuto nei diserbanti totali come *Bialaphos*, *Basta* e *Liberty*. Il costrutto contenente il gene *Vinb-2*, il costrutto contenente il gene *Vinb-3* e quello contenente il gene *Bar* sono stati utilizzati in un rapporto molare di 1:1:6. Per la trasformazione, eseguita presso il laboratorio del Prof. Renato D'Ovidio è stato usato il modello PDS-1000/He Biolistic Particle (Bio-Rad, USA). Dopo 4 settimane di coltura *in vitro* su terreno non selettivo, i calli bombardati sono stati indotti alla rigenerazione in un terreno contenente 5mg/L di PPT per selezionare le piante transgeniche contenenti il gene *Bar*. Le stesse piante sono poi state fatte radicare su mezzo selettivo contenente 6mg/L di PPT. Le piante sono state allevate in fitotrone fino alla spigatura. La trasformazione è stata verificata mediante analisi PCR sul DNA genomico estratto da piante T1 e T2 usando i primers specifici del gene *Vinb-2* e *Vinb-3*.

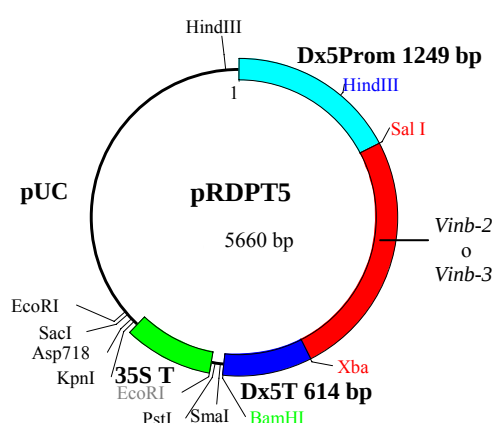


Figura 3.1. Costrutto utilizzato per la trasformazione mediante “gene gun” del grano duro Svevo. Dx5 Prom = promotore del gene *Glu-D1x5* di grano tenero. Gene = sequenza della regione codificante del gene *Vinb-2* o del gene *Vinb-3*. Dx5T = terminatore del gene *Glu-D1x5*. 35S T = terminatore del gene 35S del virus del mosaico del cavolfiore (CMV)

3.10 Estrazione dei granuli d'amido

I granuli d'amido sono stati ottenuti dalle cariossidi con il metodo descritto da Corona *et al* (2001a). Le cariossidi dopo essere state schiacciate mediante l'utilizzo di pinze, sono state sottoposte ad imbibizione per 20 min in H₂O distillata e successivamente sospese in una soluzione di NaCl (0,1 M), soluzione che permette l'estrazione dei granuli d'amido previa moderata agitazione delle cariossidi nella soluzione stessa. L'operazione è stata ripetuta 3 volte. La soluzione ottenuta è stata centrifugata a 4500 rpm per 10 min a temperatura ambiente e quindi la centrifugazione e la sospensione del pellet è stata ripetuta per altre due volte al fine di eliminare il sale presente. Dopo l'ultima centrifugazione, il pellet è stato sospeso in 10 mL di metanolo all' 85% (v/v) in modo da disidratarlo. La soluzione ottenuta è centrifugata nuovamente a 6000 rpm per 10 min a temperatura ambiente; anche questa operazione è stata ripetuta 2 volte. Il pellet contenente i granuli d'amido è stato esposto all'aria fino a completa asciugatura.

3.11 Estrazione delle proteine legate all'amido

Le proteine legate all'amido sono state ottenute sospendendo i granuli di amido in rapporto 1:6 (p/v) in una soluzione 0,05 M di NaCl e 50% di isopropanolo. La sospensione è stata sottoposta a sonicazione per alcuni secondi e a vigorosa agitazione per 1 ora a temperatura ambiente, e poi centrifugata a 10500 rpm per 10 min a temperatura ambiente. Il supernatante è stato trasferito in una nuova provetta e precipitato a -20 °C o/n previa aggiunta di 2 volumi di acetone. Dopo centrifugazione per 15 min a 4 °C a 10500 rpm, il pellet è stato portato a secco sottovuoto per 20-25 min. Una volta essiccato, il campione è stato sospeso in 30 µL di tampone "sample buffer", contenente volumi uguali di lattato di sodio (8.5mM, pH 3,1) e glicerolo, con l'aggiunta di 0,1% in p/v di Pironina Y. Il campione (5-10 µL) è stato poi caricato su gel di poliacrilamide per la separazione elettroforetica mediante A-PAGE (Acid-PAGE) (vedi oltre).

In alternativa l'estrazione delle proteine legate all'amido è stata effettuata nelle modalità appena descritte utilizzando una soluzione di etanolo al 50% (v/v). Le proteine sono state anche estratte sospendendo i granuli d'amido in 500 µL di una soluzione di SDS 1%. La sospensione è stata quindi sottoposta ad un passaggio di sonicazione della durata di alcuni secondi, incubata per 30 min a 50 °C e centrifugata a 8000 rpm per 10 min a temperatura ambiente. Il supernatante è stato poi trasferito in una nuova provetta e dializzato a 4 °C o/n in una soluzione 0,1 M di NaCl e le proteine sono state precipitate a -20 °C o/n previa aggiunta

di 2 volumi di acetone. Dopo centrifugazione per 15 min a 4 °C a 10500 rpm, il pellet è stato portato a secco sottovuoto per 20-25 min.

Infine le proteine sono state estratte anche con Triton X-114 (TX-114), un detergente specifico per l'estrazione delle proteine legate alle membrane, sospendendo i granuli di amido in 400 µL di una soluzione costituita da Tris (10 mM), NaCl (150 mM) e 1% di TX-114. Dopo vigorosa agitazione per 1 ora a temperatura ambiente, la sospensione è stata centrifugata a 11000 rpm per 20 min a 4 °C. Il supernatante ottenuto è stato incubato per 1 ora a 37 °C e successivamente centrifugato a 10000 rpm per 15 min a 30 °C. Dopo centrifugazione, si è provveduto alla separazione della fase superiore (S1) e della fase inferiore. La fase inferiore è stata sospesa in 400 µL di una soluzione costituita da Tris (10 mM), NaCl (0,15 M) e 0,05% di TX-114, è stata sottoposta a vigorosa agitazione per 15 min a temperatura ambiente e successivamente centrifugata a 11000 rpm per 20 min a 4 °C, per ottenere una fase superiore S2 che è stata aggiunta alla fase superiore S1 e precipitata o/n previa aggiunta di 2 volumi di acetone. La stessa procedura di precipitazione è stata fatta sulla fase organica (fase inferiore).

3.12 Estrazione delle proteine totali dell'endosperma

Le proteine sono state estratte direttamente dalle cariossidi frantumate con l'uso di pinze con la soluzione NaCl 0,05 M contenente 50% (v/v) di isopropanolo in rapporto 1:6 (p/v). La sospensione è stata sottoposta ad un passaggio di sonicazione della durata di alcuni secondi, ad un passaggio di vigorosa agitazione per 1 ora a temperatura ambiente ed a centrifugazione a 10500 rpm per 10 min a temperatura ambiente. Il supernatante è stato trasferito, inserito in una nuova provetta e precipitato a -20 °C o/n previa aggiunta di 2 volumi di acetone.

Per l'estrazione delle proteine totali le cariossidi sono frantumate tramite l'utilizzo di una pinza e sospese 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-mercaptoetanolo. L'estrazione è stata effettuata sotto forte agitazione per un'ora a temperatura ambiente. Prima della corsa elettroforetica le proteine sono state incubate a 80°C per 20 min al fine di completare la riduzione dei ponti disolfuro. Prima del caricamento su gel i campioni sono stati centrifugati a 6000 rpm per 10 min a temperatura ambiente e il surnatante (5-10 µL) caricato su un gel di poliacrilamide per la separazione elettroforetica mediante SDS-PAGE (vedi oltre).

3.13 Trattamento delle proteine legate all'amido con cloroformio e metanolo

Dopo estrazione delle proteine da 30 mg di granuli di amido con NaCl 0,1M e 50% isopropanolo e centrifugazione a 10500 rpm per 10 min a 4 °C, il pellet è stato sospeso in 300 µL di una soluzione contenente cloroformio e metanolo (CM) in rapporto 2:1 e sottoposto ad agitazione per 3 ore a 30 °C. Dopo centrifugazione a 4 °C per 15 min a 4500 rpm, il supernatante è stato prelevato e portato a secco sotto vuoto, mentre al pellet sono stati aggiunti 300 µL di una soluzione contenente CM in rapporto 2:1. Dopo agitazione per 1 ora a 30 °C, la sospensione è stata centrifugata a 4 °C per 15 min a 4500 rpm e il pellet ottenuto è stato lasciato ad asciugare o/n a temperatura ambiente.

3.14 Riduzione ed alchilazione delle proteine

Le proteine estratte dai granuli d'amido delle varietà di avena sono state ridotte ed alchilate prima della separazione elettroforetica in A-PAGE. In particolare, le proteine sono state incubate per 30 min a 60 °C in 100 µL di una soluzione ottenuta sciogliendo 4,5 mg di DTT in 1,5 mL della soluzione A costituita da 0,75 mL di isopropanolo e 0,75 mL di Tris (163 mM) pH 8,8. Dopo aggiunta di 100 µL di una soluzione ottenuta sciogliendo 6,46 µL di vinilpiridina in 1,5 mL della soluzione A, le proteine sono state incubate per 45 min a 37 °C e poi precipitate o/n a -20 °C previa aggiunta di 2 volumi di acetone.

3.15 Trattamento delle proteine con monobromobimane

Le proteine estratte da 50 mg di granuli d'amido con NaCl 0,05M e 50% isopropanolo sono state centrifugate a 10500 rpm per 10 min a 4 °C ed il pellet ottenuto è stato trattato con 50 µL di una soluzione acquosa di ditiotreitolo (DTT, 20 mM), per 30 min a 60 °C. La soluzione, addizionata di 11,2 µL di acetonitrile contenente monobromobimane (100 mM), un composto in grado di legarsi ai residui di cisteina, è stata incubata o/n a 4 °C al buio. Dopo 30 min a temperatura ambiente, prima della corsa elettroforetica, è stato aggiunto 1 volume di lattato di sodio 10X (pH 3,1) e 2.7% di glicerolo.

3.16 Separazioni elettroforetiche

3.16.1 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* (2005). Al campione preparato come

precedentemente descritto nel paragrafo 3.8 è stata aggiunta una soluzione contenente volumi uguali di lattato di sodio (8.5mM, pH 3,1) e glicerolo, con l'aggiunta di 0,1% (p/v) di pironina Y. Sul gel sono stati caricati 5-10µL di estratto proteico. Le composizioni dello “stacking gel” (4,5% di acrilamide) e del “running gel” (17% di acrilamide) per la separazione elettroforetica delle proteine 2S sono riportate nella Tabella 3.2.

La corsa elettroforetica di un'ora è stata effettuata a 430 Volt (V) costanti 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. I gel (10 cm x 10 cm, o 20 cm x 20 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 e sottoposte ad analisi densitometrica mediante il programma UV-PRO (Eppendorf).

Tabella 3.2. Composizione del gel A-PAGE

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

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

3.16.2 Elettroforesi Sodio Dodecil Solfato (SDS-PAGE)

In questo tipo di elettroforesi la migrazione delle catene polipeptidiche dipende prevalentemente dal loro peso molecolare. Prima del caricamento sul gel, i campioni preparati come descritto nel paragrafo 3.9, dopo essere stati centrifugati a 10.500 rpm per 10 min a 4 °C, sono stati incubati per 20 min a 80 °C nel tampone di caricamento, una soluzione composta da 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-mercaptoetanolo. Le composizioni dello “stacking gel” (4,5% di acrilamide) e del “running gel” (17% di acrilamide) sono riportate in Tabella 3.3. La corsa elettroforetica è stata effettuata a 10°C a voltaggio costante (180 V), utilizzando come tampone di corsa una soluzione costituita da glicina (187 mM), Tris (25 mM) e SDS (3 mM). I gel (10 cm x 10 cm, o 20 cm x 20 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 decolorati in una soluzione di TCA al 6%. Le immagini sono state acquisite con programma UV-PRO (Eppendorf).

Tabella 3.3. Composizione del gel per la separazione mediante SDS-PAGE

Componente	Stacking gel	Running gel
Acrilamide/N.N'-metilenbisacrilamide	4,5%	17%
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%

3.16.3 Elettroforesi bidimensionale A-PAGE x SDS-PAGE

L'elettroforesi bidimensionale è stata effettuata seguendo il protocollo descritto da Redaelli *et al* (1995). I gel per l'A-PAGE sono stati preparati seguendo il protocollo precedentemente descritto. Dopo la prima separazione, il gel è stato tagliato in strisce corrispondenti a ciascuna corsia e incubato per 45 min a temperatura ambiente in una "soluzione di equilibrio" contenente 20% (v/v) di Tris-HCl (1 M, pH 6,8) e 0,25% (p/v) di SDS in acqua distillata. La striscia è stata fatta aderire al gel per la seconda separazione (SDS-PAGE al 20% di acrilamide), preparato seguendo il protocollo descritto sopra, utilizzando una soluzione calda di agarosio all'1% colorata con qualche goccia di blu-bromofenolo, contenente Tris-HCl (0,13 M, pH 6,8). La corsa elettroforetica è stata effettuata a temperatura ambiente a voltaggio costante (180V) per circa 4 ore. I gel 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 Coomassie Blue Silver e successivamente decolorati in una soluzione di TCA al 6%. Le immagini sono state acquisite mediante il programma UV-PRO (Eppendorf).

3.17 Western Blotting e immunoreazioni

Prima del trasferimento su membrana di nitrocellulosa (Hibond™-C EXTRA, GE Healthcare, USA) i gel contenenti le proteine separate mediante SDS-PAGE sono stati equilibrati per 45 min a temperatura ambiente in un tampone contenente Tris (80 mM), glicina (13 mM) e 20% (v/v) di metanolo in acqua distillata pH 9,2, mentre i gel contenenti le proteine separate mediante A-PAGE sono stati equilibrati per 45 min a temperatura ambiente

in un tampone contenente TrisHCl (25 mM), glicina (192 mM) e 20% (v/v) di metanolo in acqua distillata, pH 8,3 con l'aggiunta di 2-β-mercaptoetanol (1%). 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 (Phosphate Buffer Saline) composto da NaCl (150 mM) e fosfato di sodio (50 mM) contenente 5% (p/v) di agente bloccante (latte in polvere, GE Healthcare). Le membrane sono state poi incubate o/n in presenza dell'anticorpo policlonale specifico.

Gli anticorpi policlonali per le proteine legate all'amido di avena sono stati ottenuti da siero di coniglio immunizzato con peptidi sintetici di 15 aminoacidi coniugati con la siero albumina bovina (BSA) con sequenza LGGFFGTQQGLIGKR identica a quella situata nella regione 106-120 carbossi-terminale della proteina codificata dal clone 3B3-7 di avena o con sequenza LGGFLGFQQSEIMKQ identica a quella situata nella regione 102-116 carbossi-terminale della proteina codificata dal clone 3B3T-5 (Tanchak *et al*, 1998). L'anticorpo policlonale per la puroindolina A è stato ottenuto dal siero di coniglio immunizzato con un peptide sintetico di 15 aminoacidi (DRASKVIQEAKNLPP) coniugato con la BSA, identico alla sequenza aminoacidica situata nella regione 116-131 carbossi-terminale della Pin-A.

Le membrane sono state quindi incubate o/n in presenza dell'anticorpo anti-3B3-7 (diluizione 1:500), o anti-3B3T-5 (diluizione 1:250) o anti-PinA nel tampone PBS contenente 0,2% di agente bloccante. 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 min e due da 5 min. 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 le bande di immunoreazione sono state sviluppate secondo il metodo "colorimetrico" utilizzando 50 mL di tampone PBS addizionato con 10 mL di metanolo e 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 min in una soluzione (100 µL per cm² di membrana) costituita da volumi uguali di Stable Peroxide Solution e Luminol/Enhancer Solution (Pierce, USA) e messa a contatto al buio con una lastra radiografica, successivamente sviluppata con prodotti fotografici commerciali.

4. RISULTATI

4.1 Durezza della cariosside

L'analisi della durezza delle cariossidi mediante il sistema di caratterizzazione a singolo seme (SKCS) ha dimostrato che le varietà di *Avena sativa* esaminate hanno un indice SKCS medio di - 22,7 (Tabella 4.1), che corrisponde ad un grado di sofficietà particolarmente elevato. E' interessante notare tuttavia la notevole variabilità nel livello di sofficietà tra le varietà analizzate, con valori di SKCS compresi tra -14,0 (cv. Bikini) e -36,9 (cv. Harpoon) con un coefficiente di variazione (C.V.) uguale al 24,1%.

Tabella 4.1. Valori di SKCS di varietà di *A. sativa*

Varietà	Indice SKCS	Varietà	Indice SKCS
Abel	-18,4	Konradin	-24,8
Adam	-24,2	Krypton	-17,2
Bikini	-14,0	Kynon	-18,1
Bullion	-26,2	Lisbeth	-24,7
Donata	-23,9	Primula	-30,0
Flavia	-19,8	Terra	-22,0
Grafton	-19,5	Tropicale	-22,4
Harpoon	-36,9	Vir 2301	-18,0
Icon	-26,5	<i>Indice medio</i>	-22,7

4.2 Amplificazione PCR di DNA genomico di *A. sativa* e grano tenero con primers specifici per le puroindoline e le triptofanine

L'amplificazione PCR del DNA genomico di *A. sativa* con la coppia di primers terminali specifici per la regione codificante del gene per la puroindolina A (Pin-A) (Tab. 3.1) ha fornito ampliconi di debole intensità (Fig. 4.1, corsie 1 e 2), con sequenza identica, fatta eccezione per un aminoacido (E al posto di V in posizione 81), a quella della Pin-A "wild-type" di grano tenero. Allo stesso modo *A. sativa* ha dato prodotti di amplificazione delle dimensioni attese (447 bp) di bassissima intensità e con molte bande aspecifiche con la coppia di primers terminali specifici per la puroindolina B (Pin-B) (corsie 8 e 9). Come atteso, le stesse due coppie di primers hanno fornito gli ampliconi delle dimensioni attese (447 bp) quando sono state utilizzate per amplificare il DNA genomico di grano tenero (corsie 3 e 11, freccia e doppia freccia). Viceversa, quando sono stati utilizzati i primers terminali specifici

per i cloni 3B3-5/7 codificanti per le triptofanine, *A. sativa* ha fornito un amplicone con sequenza identica a quella descritta da Tanchak *et al* (1998) (corsie 5 e 6, punta di freccia), mentre dal DNA genomico di grano tenero non si è ottenuto alcun prodotto di amplificazione (corsia 7). Come atteso, dal DNA genomico di grano duro (*T. turgidum* ssp *durum*) non sono stati ottenuti ampliconi corrispondenti ai geni delle puroindoline (corsie 4 e 10).

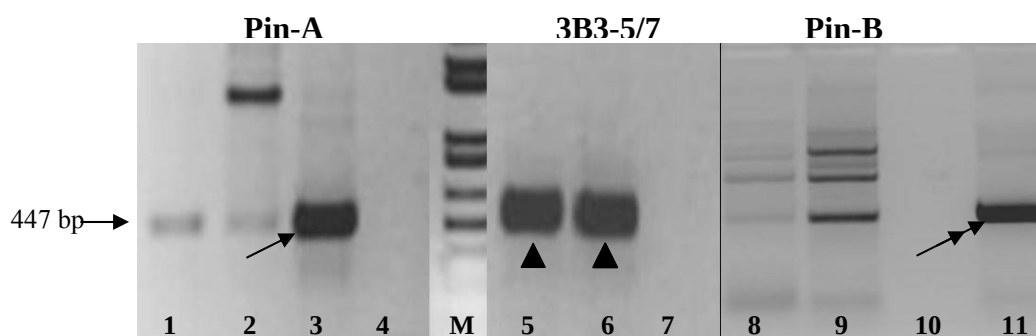


Figura 4.1. Amplificazione PCR di DNA genomico con primers specifici per le puroindoline Pin-A e Pin-B e per le triptofanine 3B3-5/7. Corsie: (1, 5 e 8) *A. sativa* cv. Donata; (2, 6 e 9) *A. sativa* cv. Primula; (3, 7 e 11) grano tenero cv. Bolero; (4 e 10) grano duro cv. Colosseo e (M) Marcatore Molecolare 1 kb ladder (Invitrogen).

4.3 Separazione elettroforetica A-PAGE delle proteine legate ai granuli di amido in avena e grano tenero

La separazione elettroforetica monodimensionale A-PAGE delle proteine estratte dai granuli di amido della varietà di frumento tenero Chinese Spring ha evidenziato la presenza di due bande corrispondenti a Pin-A e Pin-B (Fig. 4.2A, ultima corsia). Le proteine estratte dai granuli d'amido di otto varietà di *Avena sativa*, sottoposte alla stessa tecnica di separazione elettroforetica, si presentano come un gruppo poco definito di bande con mobilità intermedie rispetto a quelle delle puroindoline di grano (Fig. 4.2A, prime otto corsie da sinistra). Tuttavia queste proteine, una volta trattate con ditiotreitolo e successivamente con 4-vinilpiridina per ridurre ed alchilare i residui cisteinici, si presentano come due bande principali qui denominate **vromindoline** (Vin) con riferimento alla parola greca “vromi”(avena). Per analogia con le puroindoline, la banda meno mobile e meno intensa è stata denominata Vin-A, quella più mobile Vin-A (Fig. 4.2B).

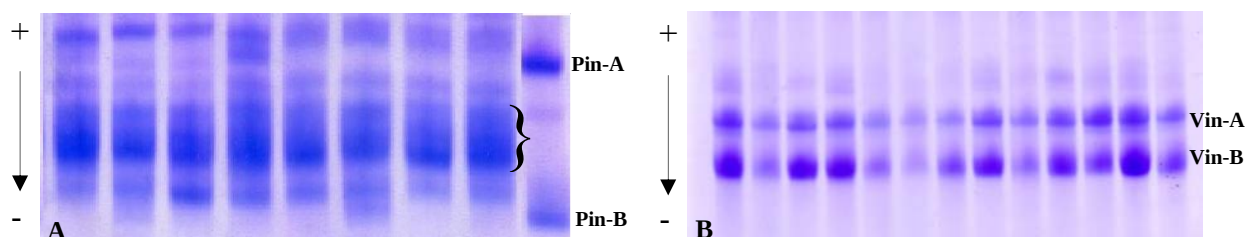


Figura 4.2. Separazione elettroforetica monodimensionale A-PAGE delle proteine estratte dai granuli d'amido. **A.** Proteine native della varietà di grano tenero Chinese Spring (ultima corsia a destra) e di otto varietà di avena (da sinistra: Jim, Kynon, Arne, Cilla, Checota, Boa Fè, Corbit e Algeri bee). La graffa indica le proteine di avena con mobilità intermedia rispetto a quelle della puroindolina A (Pin-A) e della puroindolina B (Pin-B) di grano. **B.** Proteine ridotte ed alchilate estratte dai granuli d'amido di 13 varietà di avena (da sinistra a destra: Algeri bee, Boa fè, Kynon, Cilla, Arne, Jim, Corbit, Primula, Checota, Nigra, Argentina, Teo BD40 e Donata). Le proteine si presentano come due bande principali denominate vromindolina A (Vin-A) e vromindolina B (Vin-B). + = anodo ; - =catodo; la freccia indica la direzione della corsa elettroforetica.

La separazione elettroforetica A-PAGE (Fig. 4.3) delle proteine ridotte ed alchilate estratte dai granuli d'amido delle specie diploidi di avena *A. strigosa* (genoma A_sA_s , corsie 1 e 3) e *A. nuda* (genoma A_sA_s , corsia 4) e della specie tetraploide *A. barbata* (genoma AABB, corsia 2) mostra nella regione catodica del gel le stesse bande Vin-A e Vin-B già osservate nelle varietà coltivate di *A. sativa*. Nella specie tetraploide *A. barbata* (corsia 2) la banda Vin-B è più intensa della banda Vin-A, mentre nelle specie diploidi (corsie 1, 3 e 4) le due bande hanno un'intensità equivalente. Inoltre nelle avene diploidi è possibile osservare una debole banda (freccia) leggermente più mobile della banda Vin-B. E' interessante notare che le puroindoline di grano (corsia 5, Pin), una volta ridotte ed alchilate, si presentano in A-PAGE come una sola banda con mobilità intermedia tra Vin-A e Vin-B.

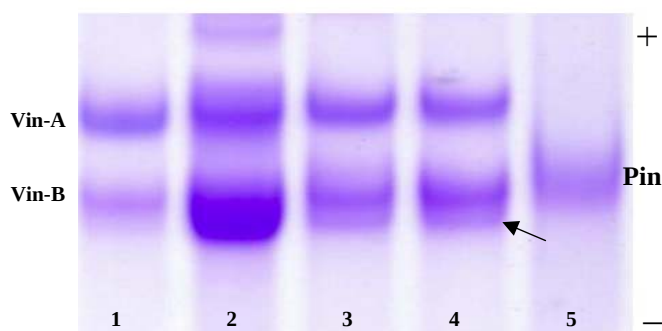


Figura 4.3. Separazione elettroforetica monodimensionale A-PAGE delle proteine legate all'amido di (1 e 3) *Avena strigosa*; (2) *Avena barbata*; (4) *Avena nuda* e (5) *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring. Le proteine sono state ridotte ed alchilate prima della separazione elettroforetica. Pin= puroindoline. Nelle specie diploidi di avena, oltre alle bande principali Vin-A e Vin-B , si distingue (freccia) una banda leggermente più mobile di Vin-B.

4.4 Separazione elettroforetica SDS-PAGE delle proteine legate ai granuli di amido in avena e grano tenero e dosaggio proteico

Quando vengono ridotte con β -mercaptoetanolo e separate mediante elettroforesi SDS-PAGE, le puroindoline (Pin-A e Pin-B) di grano tenero si presentano come una larga banda intensamente colorata nella regione anodica del gel compresa tra i marcatori di peso molecolare di 6 e 16 KDa (Fig. 4.4A, corsia 1). Nella stessa regione del gel si localizza la maggior parte delle proteine estratte dall'amido di *A. sativa* (corsie 2 e 3, freccia). Anche nelle specie diploidi e tetraploidi di avena è presente questo gruppo di proteine con peso molecolare apparente di circa 13 KDa (risultati non mostrati). Sia in grano tenero che in avena, l'amido è associato ad altre proteine con pesi molecolari compresi tra 22 e 36 KDa.

Se sono ridotte ed alchilate prima della separazione mediante SDS-PAGE, le proteine legate all'amido di *A. sativa* si presentano come due bande intense ed una più debole al di sotto del marcatore molecolare di 16 KDa (Fig. 4.4B, corsie 4 e 5, graffa). L'analisi densitometrica condotta sulle proteine legate all'amido della varietà Donata ha fornito una stima del contenuto di queste proteine come percentuale del peso secco della cariosside, stima che è risultata $\leq 1,5\%$, valore assai elevato rispetto a quello misurato per le proteine analoghe in grano tenero.

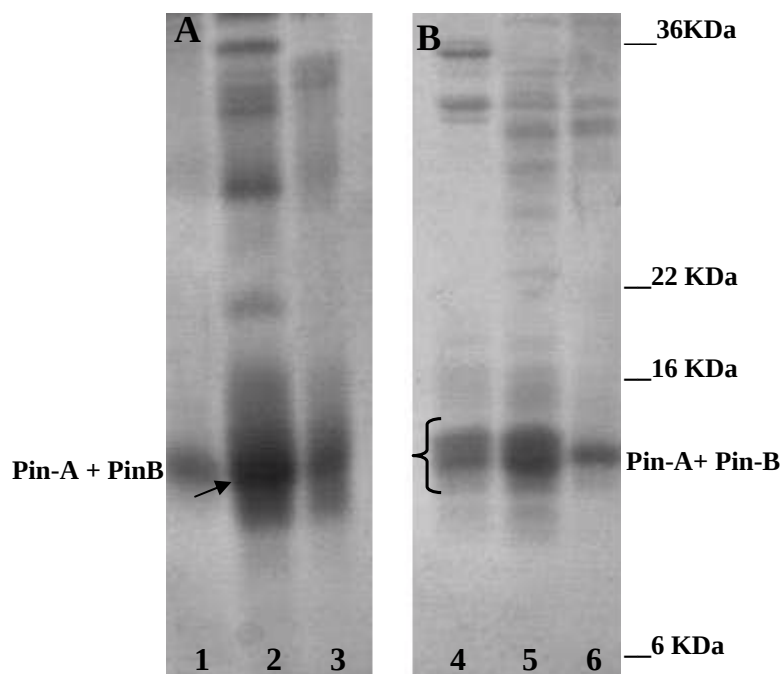


Figura 4.4. Separazione elettroforetica SDS-PAGE di proteine legate all'amido in (1 e 6) *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring e in *A. sativa* (2 e 5) cv. Primula e (3 e 4) cv. Donata. **A.** Proteine ridotte. **B.** Proteine ridotte ed alchilate. Pin-A = Puroindolina A; Pin-B = Puroindolina B. La freccia e la graffa indicano le principali proteine legate all'amido in avena. A destra sono riportati i marcatori di peso molecolare.

4.5 Marcatura dei gruppi sulfidrilici con monobromobimane

Le proteine di *A. sativa* estratte da 50 mg di granuli d'amido sono state ridotte con ditiotreitolo e alchilate con monobromobimane, un agente fluorescente con formula $C_{10}H_{11}BrN_2O_2$ in grado di legarsi ai gruppi sulfidrilici ridotti della cisteina.

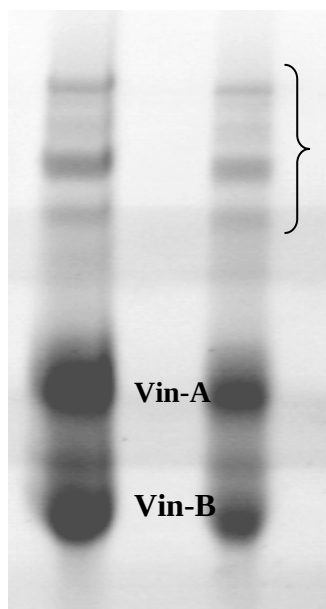


Figura 4.5. Separazione elettroforetica A-PAGE delle proteine legate all'amido della varietà Donata di *A. sativa*. Le proteine sono state ridotte ed alchilate con monobromobimane prima della separazione elettroforetica e successivamente evidenziate per esposizione a raggi UV. Vin-A e Vin-B = proteine fortemente fluorescenti omologhe alle puroindoline. La graffa indica proteine debolmente fluorescenti a ridotta mobilità.

Dopo separazione elettroforetica A-PAGE le proteine Vin-A e Vin-B di *A. sativa* esposte ai raggi UV hanno evidenziato una forte fluorescenza (Fig.4.5), a dimostrazione di un elevato contenuto in residui cisteinici, come atteso per le proteine appartenenti alla famiglia 2S. Al contrario, le altre proteine legate all'amido (graffa) hanno mostrato una debole o nulla fluorescenza.

4.6 Separazione elettroforetica bidimensionale A-PAGE x SDS-PAGE delle proteine legate ai granuli di amido in avena

Le tecniche elettroforetiche monodimensionali sono state combinate nella tecnica bidimensionale A-PAGE x SDS-PAGE in cui le proteine legate ai granuli di amido di *A. sativa* sono state ridotte ed alchilate prima di essere separate in prima dimensione mediante A-PAGE a pH 3,1 e mediante SDS-PAGE in seconda dimensione.

Le bande Vin-A e Vin-B visibili nel gel A-PAGE sono risultate in realtà costituite ciascuna da tre componenti principali denominati Vin-A1, Vin-A2, Vin-A3, Vin-B1, Vin-B2 e Vin-B3 (Fig. 4.6). I componenti Vin-A1 e Vin-B1 presentano lo stesso peso molecolare

apparente e lo stesso vale per i componenti Vin-A2 e Vin-B2. Vin-B3 e Vin-A3 hanno invece un peso molecolare leggermente inferiore; inoltre Vin-B1 e Vin-B2 sono molto più intensi degli altri quattro componenti.

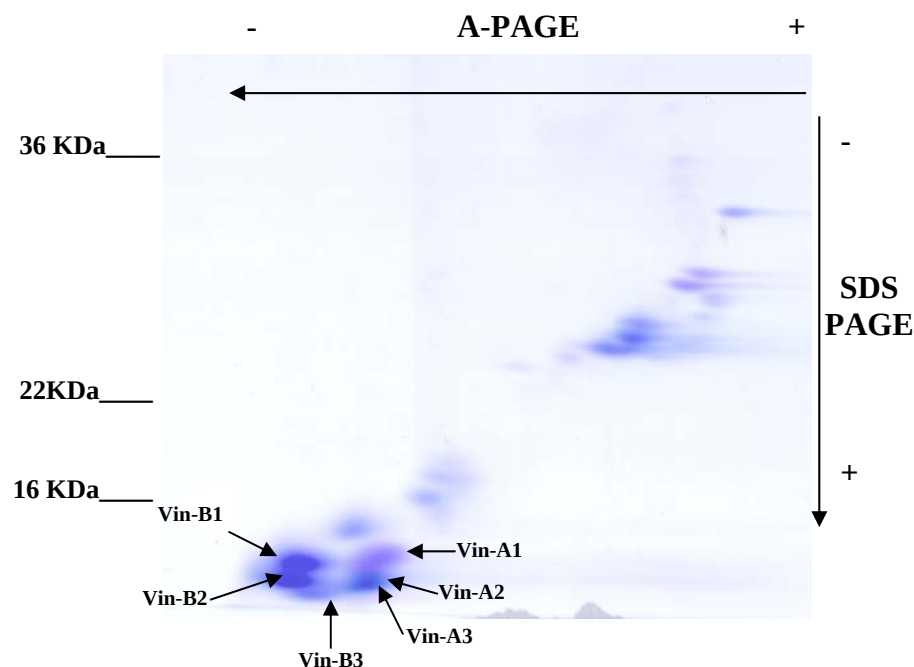


Figura 4.6. Separazione elettroforetica bidimensionale A-PAGE x SDS-PAGE di proteine legate all'amido della cv. Rogar 8 di *A. sativa*. A sinistra sono indicate le posizioni dei marcatori di peso molecolare.

4.6.1 Separazione elettroforetica bidimensionale A-PAGE x SDS-PAGE delle proteine legate ai granuli di amido nelle specie diploidi e tetraploidi di avena

La separazione elettroforetica bidimensionale (A-PAGE X SDS-PAGE) è stata condotta anche sulle specie diploidi *A. strigosa* (genoma A_sA_s), *A. nuda* (genoma AA), *A. canariensis* (genoma A_cA_c) e *A. clauda* (genoma C_pC_p). Nella specie *A. strigosa* (Fig.4.6.1) è possibile distinguere tutti e 6 gli spot presenti nel profilo elettroforetico bidimensionale di avena esaploide (Fig. 4.6). Un profilo elettroforetico bidimensionale molto simile si osserva nella specie *A. strigosa* diploide con genoma A_sA_s . Il profilo bidimensionale di *A. clauda* si differenzia da quello delle specie diploidi con genoma A. In questa avena diploide con genoma C_pC_p mancano infatti le proteine Vin-A1 e Vin-A2 e Vin-B3, mentre le vromindoline Vin-B1 e Vin-B2 sono parzialmente sovrapposte e la vromindolina Vin-A3 si presenta come uno spot di debole intensità (dati non mostrati). Il profilo bidimensionale della specie tetraploide *A. barbata* (genoma AABB) mostra la presenza delle 6 vromindoline Vin-

A1, Vin-A2, Vin-A3, Vin-B1, Vin-B2 e Vin-B3 ed è molto simile a quello riscontrato in altre specie tetraploidi analizzate come *A. insularis* (genoma CCDD), *A. magna* (genoma AACC), *A. maroccana* (genoma AACC) e *A. murphyi* (genoma AACC) (dati non mostrati).

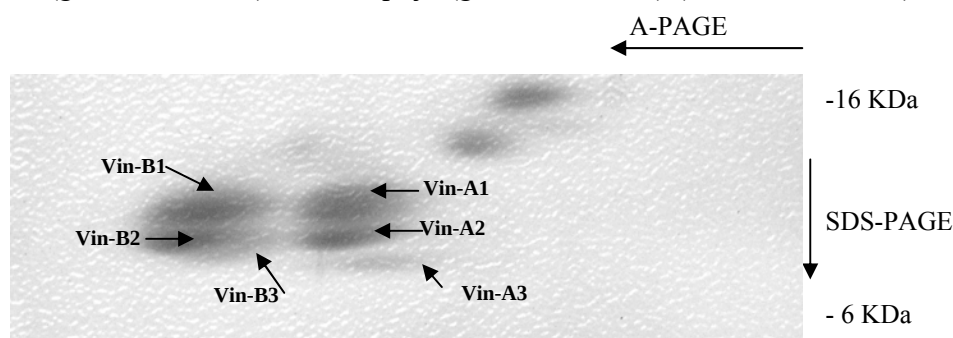


Figura 4.6.1. Separazione elettroforetica bidimensionale A-PAGE x SDS-PAGE di proteine legate all'amido della specie diploide *Avena strigosa* (genoma A_sA_s).

4.7 Solubilità delle proteine legate all'amido in cloroformio-metanolo

Le proteine estratte con NaCl 0,1M e isopropanolo al 50% dall'amido isolato dall'endosperma di grano tenero ed avena sono state incubate per 3 ore a 30°C in una soluzione contenente cloroformio e metanolo (CM) in rapporto 2:1. Dopo centrifugazione, le proteine presenti nel supernatante e quelle presenti nel sedimento sono state ridotte e separate mediante SDS-PAGE (Fig. 4.7).

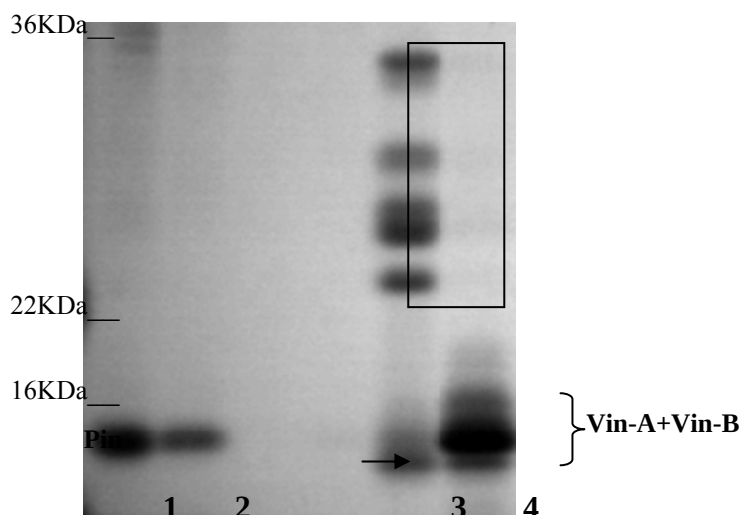


Figura 4.7. Separazione elettroforetica SDS-PAGE di (1,2) puroindoline (Pin) della varietà di grano tenero Chinese Spring e (3,4) proteine associate all'amido della varietà Nave di *A. sativa*. (1 e 3) Proteine contenute nel supernatante CM; (2 e 4) proteine contenute nel pellet. Vin-A e Vin-B: proteine di avena legate all'amido. La freccia indica una proteina di avena a basso peso molecolare presente sia nel supernatante che nel pellet. Il rettangolo contiene proteine a maggior peso molecolare legate all'amido e solubili in CM. I marcatori di peso molecolare sono riportati a sinistra.

Le puroindoline di grano (Pin-A e Pin-B) si distribuiscono prevalentemente nel supernatante contenente CM (corsia 1) e, in minor quantità, nel *pellet* (corsia 2), mentre le proteine legate all'amido in avena (proteine Vin-A e Vin-B) sono poco solubili in CM (corsia 3), e si accumulano prevalentemente nel *pellet* (corsia 4). Solo il componente a più basso peso molecolare di questo gruppo di proteine (freccia) è presente in quantità equivalenti in entrambe le frazioni. Le proteine di avena con pesi molecolari superiori a 16 KDa (rettangolo, corsia 3) sono tutte solubili in CM e si riscontrano solo nella frazione del supernatante.

4.8 Immunoreazioni con l'anticorpo anti-Pin-A

L'anticorpo policlonale contro la puroindolina A (anti-Pin-A) ottenuto da siero di coniglio immunizzato con il peptide sintetico DRASKVIQEAKNLPP equivalente alla regione 116-131 di Pin-A, è stato utilizzato in immunoreazioni contro le puroindoline e le proteine di avena legate all'amido. Dopo separazione elettroforetica A-PAGE, le proteine estratte dai granuli di amido sono state ridotte con β -mercaptoetanolo e trasferite su membrana di nitrocellulosa. Come atteso le puroindoline di grano tenero hanno dato una forte reazione con l'anticorpo anti-Pin-A (Fig. 4.8), mentre le proteine omologhe estratte da *A. sativa* non hanno dato alcuna reazione.

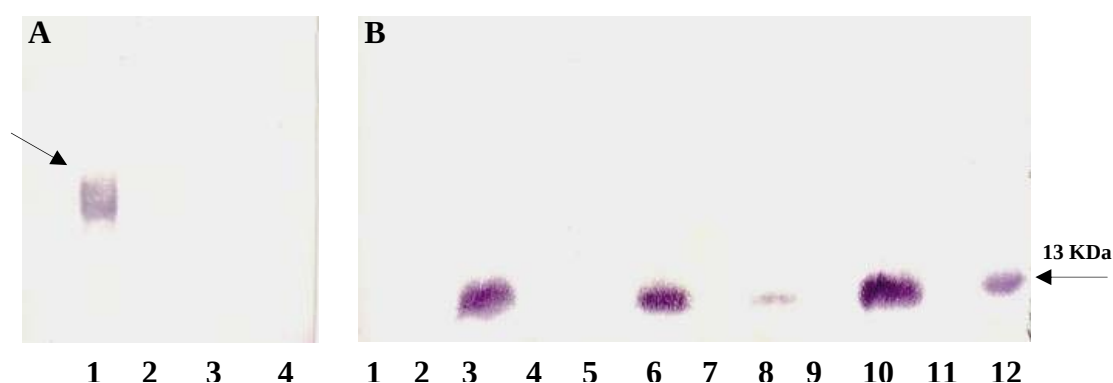


Figura 4.8. Immunoreazione con l'anticorpo specifico per la puroindolina A delle proteine (A) estratte dai granuli di amido e separate mediante elettroforesi A-PAGE e (B) estratte da cariossidi (1, 4, 7 e 8) o da granuli di amido (2, 3, 5, 6 e 9-12) con diversi solventi e separate mediante SDS-PAGE. I solventi usati in (B) sono (1, 2, 3, 9 e 10) NaCl + isopropanolo, (4, 5 e 6) Triton X-114, (7 e 8) etanolo 50% e (11 e 12) SDS 1%. Le varietà analizzate in (A) sono: grano tenero (1) (cv. Bolero), (2) avena (cv. Klaus), (3) avena (cv. Jim) e (4) grano duro (cv. Colosseo). Le varietà analizzate in (B) sono (1, 2, 4, 7 e 9) avena (cv. Kinon), (3, 6, 8, 10 e 12) grano tenero (cv. Bolero) e (5 e 11) avena (cv. Jim). La freccia indica la puroindolina A (Pin-A).

Quando sono state separate mediante SDS-PAGE e trasferite su una membrana di nitrocellulosa, le proteine estratte dai granuli di amido isolati dall'endosperma della cariosside di grano tenero con NaCl 0,1M e 50% isopropanolo o con Triton X-114, un detergente specifico per le proteine legate alle membrane, hanno dato la stessa forte reazione positiva con il siero anti-Pin-A (Fig.4.8 B, corsie 3, 6 e 10), mentre quelle estratte con una soluzione acquosa di SDS (1%) o etanolo (50%) hanno dato una reazione più debole (Fig.4.8 B, corsie 8 e 12). Al contrario, le proteine di avena estratte sia dai granuli di amido isolati sia dall'intera cariosside con gli stessi solventi non hanno mai dato alcuna reazione con il siero anti-Pin-A (Fig.4.8 B, corsie 1, 2, 4, 5, 7, 9 e 11). E' da notare che la sequenza aminoacidica dedotta da quella nucleotidica di avenoindolina A è identica a quella di Pin-A nella regione dell'epitopo riconosciuto dall'anticorpo anti-Pin-A (Gautier *et al*, 2000).

Inoltre le proteine estratte da cariossidi intere o da granuli d'amido con NaCl 0,1M e isopropanolo 50%, separate mediante SDS-PAGE e fatte reagire contro l'anticorpo anti-Pin-A, sono state evidenziate anche mediante chemiluminescenza su lastra autoradiografica, una tecnica 1000 volte più sensibile di quella colorimetrica. Tuttavia, anche in queste condizioni, solo le proteine estratte da grano tenero e grano monococco (Fig. 4.9, corsie 1, 2) hanno dato una forte banda di immunoreazione, mentre le varietà di *A. sativa* hanno dato una reazione molto debole (Fig.4.9 corsie 3 e 4). Le specie diploidi *A. hirtula* (genoma A_sA_s), *A. atlantica* (genoma A_sA_s) e *A. eriantha* (genoma CC) e le specie tetraploidi *A. magna* Vir 1786 (genoma AACCC), *A. insularis* (genoma CCDD) e *A. barbata* (genoma AABB) non hanno dato alcuna reazione (dati non mostrati).

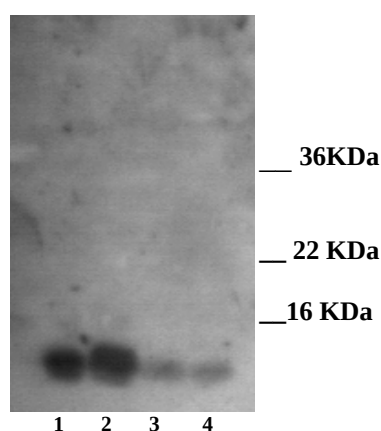


Figura 4.9. Immunoreazione contro l'anticorpo anti-Pin-A, delle proteine estratte con NaCl /isopropanolo e separate in SDS-PAGE da cariossidi di: (1) grano monococco cv Monlis; (2) grano tenero cv Chinese Spring; (3,4) *A. sativa* cv Primula e Donata. Dopo la reazione, l'anticorpo è stato evidenziato mediante chemiluminescenza su lastra autoradiografica.

4.9 Immunoreazioni con l'anticorpo anti-Vin-B2 e anti-Vin-B3

Tra le proteine estratte dai granuli d'amido di *Avena sativa* e separate mediante A-PAGE, la banda Vin-B (Fig. 4.10 A) ha dato una forte reazione in presenza dell'anticorpo contro il peptide sintetico LGGFFGTQQGLIGKR presente nella "triptofanina" codificata dal clone 3B3-7 (Tanchak *et al*, 1998) (Fig.4.10B), e una reazione meno intensa con l'anticorpo contro il peptide sintetico con sequenza LGGFLGFQQSEIMKQ presente nella proteina codificata dal clone 3B3T-5 (Tanchak *et al*, 1998, dato non mostrato). Dopo separazione bidimensionale A-PAGE x SDS-PAGE, l'anticorpo contro la triptofanina codificata dal clone 3B3-7 ha dato una netta reazione con la proteina Vin-B2 (Fig. 4.11), mentre l'anticorpo contro la triptofanina codificata dal clone 3B3T-5 ha dato una risposta di immunoreazione in corrispondenza dello spot Vin-B3 (dato non mostrato).

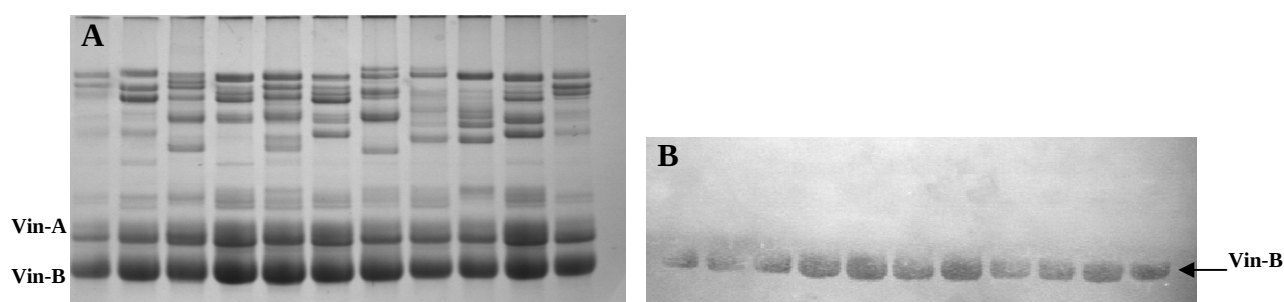


Figura 4.10. (A) Separazione elettroforetica A-PAGE delle proteine ridotte ed alchilate estratte dai granuli d'amido di varietà coltivate di *A. sativa*. (B) Immunoreazione con l'anticorpo anti-3B3-7. Le varietà di avena analizzate sono (da sinistra a destra): Bionda, Fulvia, Checota, Primula, Donata, Rogar 8, Abel, Cilla, Nave, Prevision e Kinon.

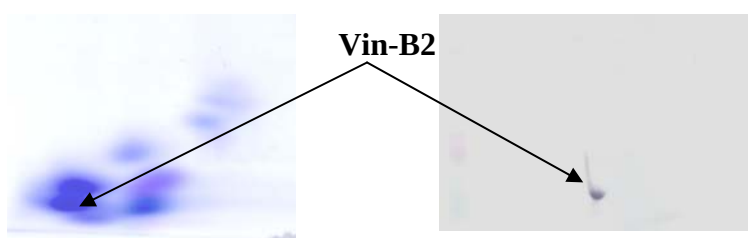


Figura 4.11. A sinistra. Separazione elettroforetica bidimensionale A-PAGE x SDS-PAGE delle proteine legate all'amido nella varietà Abel di *A. sativa*. A destra. Immunoreazione con l'anticorpo contro la triptofanina 3B3-7.

Questi risultati indicano che la proteina codificata dal clone 3B3-7 di Tanchak corrisponde a Vin-B2, mentre quella codificata dal clone 3B3T-3 corrisponde a Vin-B3.

Le proteine estratte dai granuli di amido di avena (cv. Donata) con Triton X-114 sono state separate per centrifugazione in due frazioni, una frazione superiore acquosa ed una inferiore organica contenente Triton X-114. In questa frazione organica non sono state riscontrate proteine nella regione delle vomindoline (Fig. 4.12A, corsia 2). Dopo separazione per A-PAGE e trasferimento su membrana di nitrocellulosa, le proteine presenti nella frazione acquosa hanno dato una forte reazione con gli anticorpi anti-3B3-7 e anti-3B3T-5 in corrispondenza delle vomindoline Vin-B (Fig. 4.12B, corsia 1).

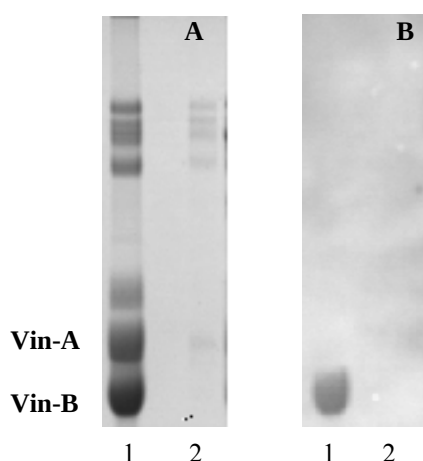


Figura 4.12. (A) Separazione elettroforetica A-PAGE delle proteine estratte dall'amido con Triton X-114 dalla varietà Donata di *A. sativa*. (B) Immunoreazione del gel precedente con l'anticorpo anti-3B3-7. (1) Proteine presenti nella frazione acquosa e (2) proteine presenti nella frazione organica.

4.10 Cinetica di accumulo delle proteine legate all'amido in *A. sativa*

La cinetica di accumulo delle proteine legate all'amido durante la formazione della cariosside è stata analizzata nelle varietà Donata e Primula di *A. sativa*, raccogliendo le pannocchie ad intervalli di tempo regolari a partire da sette giorni dopo l'antesi (GDA). Le proteine legate all'amido sono state poi frazionate mediante A-PAGE e fatte reagire con gli anticorpi specifici per la vomindolina -B2 e la vomindolina-B3. Nella cv. Donata le proteine relative alla banda Vin-A sono già presenti nelle cariossidi prelevate 7 GDA, mentre le proteine Vin-B sono visibili solo a partire da 14 GDA (Fig.4.13A). La quantità di entrambe le famiglie proteiche cresce in modo continuo fino a 35 GDA, per poi calare leggermente a maturazione. La reazione dell' anticorpo anti-Vin-B2 nella cv. Primula è visibile solo a partire da 21 GDA (Fig. 4.14).

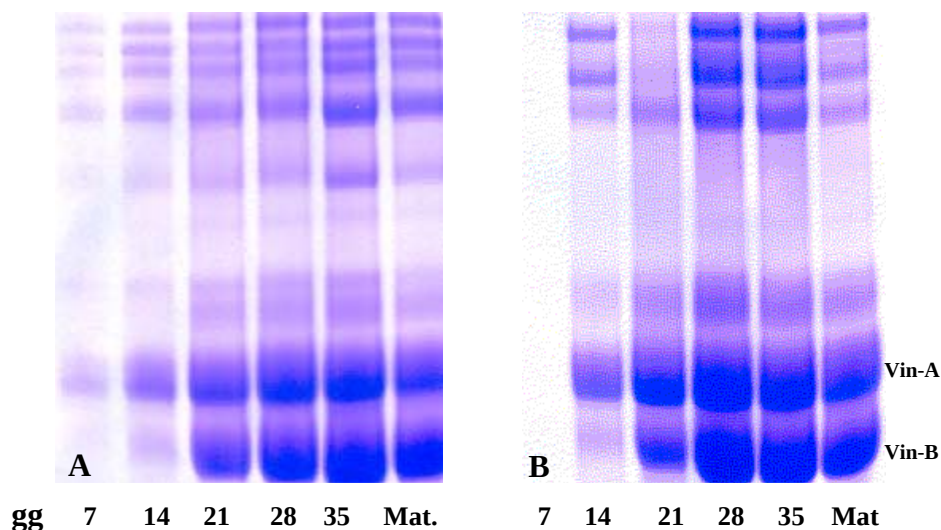


Figura 4.13. Separazione elettroforetica A-PAGE delle proteine legate all'amido estratte 7, 14, 21, 28 e 35 giorni dopo l'antesi dalle varietà (A) Donata e (B) Primula. Mat: cariosside matura (> 45 gg) .

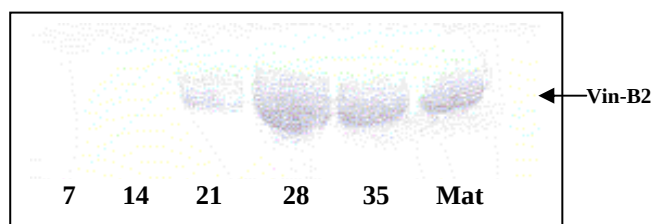


Figura 4.14. Immureazione del gel B della Fig. 4.13 con l'anticorpo per la vromindolina-B2. Mat = cariosside matura. 7-35 = giorni dopo l'antesi.

4.11 Cinetica di accumulo degli mRNA per Vin-B2, Vin-B3 e Pin-A

Il cDNA ottenuto per retro-trascrizione del mRNA estratto dalle cariossidi delle varietà Primula e Donata prelevate ad intervalli regolari da 7 a 35 GDA è stato amplificato mediante PCR con i primers terminali specifici per i cloni 3B3-5/7 e 3B3T-3/5 (Tanchak *et al*, 1998) (Tab. 3.1) codificanti per la Vin-B2 e per la Vin-B3 e con i primer terminali specifici per la puroindolina A (Pin-A). La quantità di cDNA amplificato è stata determinata sulla base di quella del gene “house-keeping” della β -tubulina (Accession Number: X54852.1). La sintesi del mRNA del clone 3B3-5/7, corrispondente alla Vin-B2, è già evidente nelle cariossidi raccolte 7 GDA, raggiunge il valore massimo 21 GDA e continua oltre il 35 GDA (Fig. 4.15 A). La sintesi del mRNA corrispondente alla Vin-B3 invece è appena evidente al 7 GDA, aumenta drasticamente al 14 GDA, raggiunge il massimo a 21 GDA e continua fino a 35 GDA (Fig.4.15B). Nella cv. Donata è possibile osservare modeste quantità di mRNA

codificante per Pin-A da 7 fino a 28 GDA, mentre non ci sono tracce di mRNA nelle cariossidi raccolte 35 GDA (Fig. 4.15C).

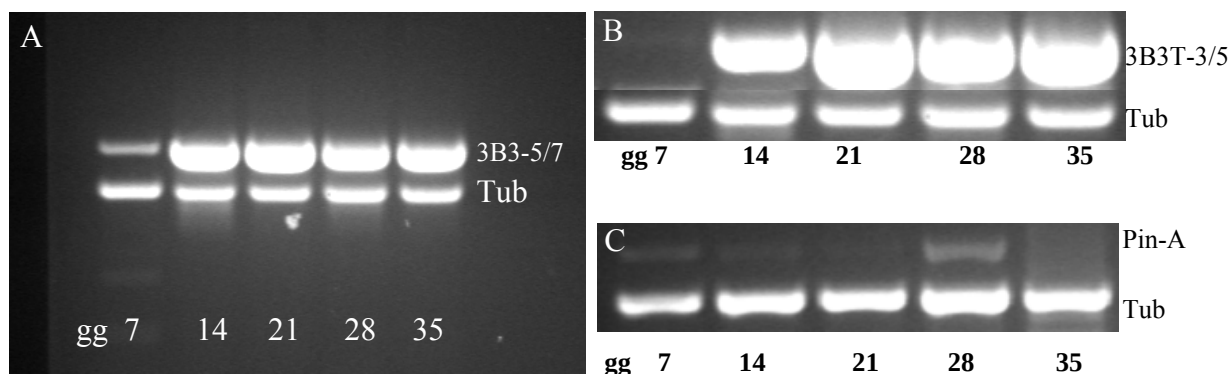


Figura 4.15. (A) e (B) Elettroforesi su gel d'agarosio dei prodotti di amplificazione ottenuti da cDNA della cv. Donata di *A. sativa* amplificato con primers terminali specifici per la triptofanina 3B3-5/7 (=Vin-B2) e 3B3T-3/5 (=Vin-B3), rispettivamente. (C) Elettroforesi su gel d'agarosio dei prodotti di amplificazione ottenuti da cDNA della cv. Donata di *A. sativa* amplificato con primers terminali specifici per Pin-A. Il cDNA è stato ottenuto da cariossidi immature raccolte 7, 14, 21, 28 e 35 giorni dopo l'antesi. Tub = ampliconi della β -tubulina

4.12 Identificazione del gene codificante per la vromindolina-B1

Allo scopo di identificare il gene corrispondente alla Vin-B1, lo spot corrispondente (Figura 4.6) è stato prelevato da gel, sottoposto a digestione con tripsina porcina (Promega, USA), chimotripsina o Glu-C di *Staphylococcus aureus* ceppo V8 (Aldrich, USA) ed analizzato mediante MALDI-TOF MS (Voyager DE-PRO, Applied Biosystems, USA) e RP-HPLC/n-ESI-MSMS (LTQ, Thermo Fischer Scientific, USA) come descritto da Fontanini *et al* (2007). Le analisi spettrometriche sono state condotte presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Catania dalla dr.ssa Vera Muccilli nel laboratorio diretto dal prof. S. Foti. L'interpretazione degli spettri MS e MSMS è stata condotta manualmente a causa della mancanza delle sequenze di avena nei databases. Parallelamente è stata condotta un'amplificazione RACE dell'mRNA estratto da cariossidi di avena cv Donata a 14 GDA, ottenendo alcune sequenze di DNA associabili a proteine 2S simili ma non identiche a quelle delle vromindoline Vin-B2 e Vin-B3. Una di queste sequenze è risultata corrispondere ai peptidi ottenuti dall'analisi Maldi Tof-Tof dello spot Vin-B1.

Una coppia di primer disegnati sulle regioni terminali del gene corrispondente allo spot Vin-B1 e le coppie di primer corrispondenti ai geni per la Vin-B2 e la Vin-B3 sono stati utilizzati per l'amplificazione PCR del DNA genomico della cv Donata.

Proteina Locus/allele		Sequenza			
Vromindolina B1					
Vin-B1	Vinb-X1a	¹ MKTLLLLALL	¹¹ ALAASTAFaq	²¹ YAQDDGWNEQ	³¹ GGEATGCEQQ ⁴⁰
	Vinb-Y1a	¹ MKTLLLLALL	¹¹ ALAASTAFaq	²¹ YAQDDGWNEQ	³¹ GGEATGCEQQ ⁴⁰
	Vinb-X1a	⁴¹ QANLDSCKDY	⁵¹ VTERCFTMKD	⁶¹ FPLTWPWKWW	⁷¹ KGGCEHEVRY ⁸⁰
	Vinb-Y1a	⁴¹ QANLDSCKDY	⁵¹ VMERCFTMKD	⁶¹ FPLTWPWKWW	⁷¹ KGGCEKEVRY ⁸⁰
			*		*
	Vinb-X1a	⁸¹ QCCEQLNQVS	⁹¹ QRCRCKAIWR	¹⁰¹ AVEHELGGFL	¹¹¹ GLQKGEIGKRL ¹²⁰
	Vinb-Y1a	⁸¹ QCCEQLNQVS	⁹¹ QRCRCKAIWR	¹⁰¹ AVEHELGGFL	¹¹¹ GLQKGEIGKHL ¹²⁰
					*
Vinb-X1a	¹²¹ LRAKSIPSKC	¹³¹ NMGPPQCNFPL	¹⁴¹ TT GYYW ¹⁴⁷		
Vinb-Y1a	¹²¹ LRAKSIPSKC	¹³¹ NMGPPQCNFPL	¹⁴¹ TT GYYW ¹⁴⁷		
Vromindolina B2					
Vin-B2	Vinb-X2a	¹ MKIFFFLALL	¹¹ ALVVSATFAQ	²¹ YVESDGSYEE	³¹ VEG AHDRCCQ ⁴⁰
	Vinb-Y2a	¹ MKIFFFLALL	¹¹ ALVVSATFAQ	²¹ YVESDGSYEE	³¹ VEG PHDRCCQ ⁴⁰
	Vinb-Z2a	¹ MKIFFFLALL	¹¹ ALVVSATFAQ	²¹ YVESDGSYEE	³¹ VEG SHDRCCQ ⁴⁰
					*
	Vinb-X2a	⁴¹ HQMKLDSCRE	⁵¹ YVAERCTTMR	⁶¹ DFPITWPWKW	⁷¹ WKGCCCEVRN ⁸⁰
	Vinb-Y2a	⁴¹ HQMKLDSCRE	⁵¹ YVAERCTTMR	⁶¹ DFPITWPWKW	⁷¹ WKGCCCEVRN ⁸⁰
	Vinb-Z2a	⁴¹ HQMKLDSCRE	⁵¹ YVAERCTTMR	⁶¹ DFPITWPWKW	⁷¹ WKGCCCE LRN ⁸⁰
					*
	Vinb-X2a	⁸¹ ECCQLLGQMP	⁹¹ SECRCDAIWR	¹⁰¹ SIQHELGGFF	¹¹¹ GTQQGLIGKR ¹²⁰
	Vinb-Y2a	⁸¹ ECCQLLGQMP	⁹¹ SECRCDAIWR	¹⁰¹ SIQHELGGFF	¹¹¹ GTQQGLIGKR ¹²⁰
	Vinb-Z2a	⁸¹ ECCQLLGQMP	⁹¹ SECRCDAIWR	¹⁰¹ SIQRELGGFF	¹¹¹ GTQQGLIGKR ¹²⁰
				*	
Vinb-X2a	¹²¹ LKIAKSLPTQ	¹³¹ CNMGPECNIP	¹⁴¹ VTFGYYW ¹⁴⁷		
Vinb-Y2a	¹²¹ LKIAKSLPTQ	¹³¹ CNMGPECNIP	¹⁴¹ VTFGYYW ¹⁴⁷		
Vinb-Z2a	¹²¹ LKIAKSLPTQ	¹³¹ CNMGPECNIP	¹⁴¹ VTMGYYW ¹⁴⁷		
Vromindolina B3					
Vin-B3	Vinb-X3a	¹ MKALFLLAFL	¹¹ ALAASAAFAQ	²¹ QYADTGVGGW	³¹ DGCMPEKARL ⁴⁰
	Vinb-Y3a	¹ MKALFLLAFL	¹¹ ALAASAAFAQ	²¹ QYADTGMGGW	³¹ DGCMPEKARL ⁴⁰
				*	
	Vinb-X3a	⁴¹ NSCKDYVVER	⁵¹ CLTLKDIPIT	⁶¹ WPWKWWKGGC	⁷¹ ESEVRGQCCM ⁸⁰
	Vinb-Y3a	⁴¹ NSCKGYVVER	⁵¹ CLTLKDIPIT	⁶¹ WPWFWWKGGC	⁷¹ ESEVRGQCCM ⁸⁰
		*		*	
	Vinb-X3a	⁸¹ ELNQIAPHCR	⁹¹ CKAIWRAVQG	¹⁰¹ ELGGFLGFQQ	¹¹¹ SEIMKQVHVA ¹²⁰
	Vinb-Y3a	⁸¹ ELNQIAPHCR	⁹¹ CKAIWRAI QG	¹⁰¹ ELGGFLGFQQ	¹¹¹ SEIMKQVHVA ¹²⁰
		*			
Vinb-X3a	¹²¹ QSLPSRCNMG	¹³¹ PNCNFPTNLG	¹⁴¹ YY ¹⁴²		
Vinb-Y3a	¹²¹ QSTPSKCNMG	¹³¹ PNCNFPTNLG	¹⁴¹ YY ¹⁴²		
	*	*			

*Varianti aminoacidiche tra geni.

Le sequenze sottolineate corrispondono agli epitopi utilizzati per la produzione degli anticorpi policlonali

*Varianti aminoacidiche tra geni.

Le sequenze sottolineate corrispondono agli epitopi utilizzati per la produzione degli anticorpi policlonali

Figura 4.16. Sequenze amminoacidiche delle vromindoline codificate dai geni *Vinb-1*, *Vinb-2* e *Vinb-3* nella varietà di avena Donata.

4.13 Sequenziamento dei geni per le vromindoline B

Utilizzando le suddette coppie di primer, nella varietà di avena Donata sono stati ottenuti prodotti di amplificazione che previo clonaggio in *E. coli* sono stati sequenziati, ottenendo due sequenze codificanti per la vromindolina Vin-B1 (denominati *Vinb-X1a* e *Vinb-Y1a*), tre sequenze per la vromindolina Vin-B2 (*Vinb-X2a*, *Vinb-Y2a* e *Vinb-Z2a*) e due sequenze per la vromindolina Vin-B3 (*Vinb-X3a* e *Vinb-Y3a*). Le sequenze amminoacidiche delle proteine codificate da questi geni sono riportate nella Figura 4.16.

Le vromindoline B presentano un dominio centrale con quattro residui di triptofano (W), diversamente dalle puroindoline e dalle avenoindoline A e B, che ne possiedono rispettivamente cinque e tre. Due residui W sono seguiti da un residuo di lisina (K) carico positivamente. Inoltre c'è un ulteriore residuo di triptofano seguito da un residuo di arginina (R) nella metà C-terminale, a distanza di 26 aminoacidi dal dominio centrale ricco in triptofano (posizione 99 - 100 di Vin-B1 e Vin-B2, e posizione 95-96 di Vin-B3). Infine nelle vromindoline Vin-B1 e Vin-B2 si nota la presenza di aminoacidi carichi negativamente (E, D) nella regione N-terminale e di aminoacidi carichi positivamente (K, R, H) in prossimità della regione C-terminale. Queste caratteristiche suggeriscono che le triptofanine, per la presenza del dominio centrale ricco in triptofano, siano in grado di interagire con i lipidi. Tuttavia, diversamente dalle puroindoline, le vromindoline hanno una spiccata solubilità nei solventi acquosi dovuta alla polarità della molecola e alla alta percentuale (21.5-27,6%) di aminoacidi carichi, di cui 9-13% carichi negativamente e 13-15% carichi positivamente nella proteina matura di 116 aminoacidi. Tra le proteine codificate dai due geni *Vinb-X1a* e *Vinb-Y1a* si osservano tre sostituzioni aminoacidiche così come tra le proteine codificate dai tre geni *Vinb-X2a*, *Vinb-Y2a* e *Vinb-Z2a*, mentre cinque sostituzioni aminoacidiche interessano le proteine codificate dai due geni *Vinb-X3a* e *Vinb-Y3a*. Tutte queste sostituzioni aminoacidiche non comportano mai un cambiamento nella carica totale della molecola.

4.14 Amplificazione PCR di DNA genomico di diversi cereali con primer specifici per i geni delle vromindoline

L'amplificazione PCR del DNA genomico di avena, *T. zhukovskyi* e *T. monococcum* con la coppia di primers 5'-ATGAAGATCTTCTTCTTCT-3' e 5'-CCAGTAATAGCCAAAAGTC-3' relativi alle estremità dei geni che codificano per la vromindolina Vin-B2 (Tab. 3.1) di *A. sativa* ha prodotto in tutte e tre le specie un amplicone di 447 bp (Fig. 4.17). Nel caso di *T. zhukovskyi* (Fig. 4.17, corsia 2) il prodotto di amplificazione è risultato appena evidente. Il sequenziamento diretto del prodotto di amplificazione ottenuto dal grano monococco ha fornito una sequenza nucleotidica (Fig.4.18) identica a quella del gene *Vinb-X2a* di avena (Fig. 4.16). Il sequenziamento dell'amplicone ottenuto in *T. zhukovskyi* non è stato eseguito per la scarsità dell'amplicato disponibile. L'amplificazione PCR con la coppia di primer succitata in *T. urartu*, *T. timopheevii*, *Hordeum vulgare*, *Secale cereale*, *Aegilops ventricosa*, *Ae. speltoides*, *Ae. columnaris*, *Ae. triuncialis*,

4.15 Immunoreazioni con l'anticorpo anti-Vin-B2 e RT-PCR in grano monococco

L'anticorpo policlonale specifico per la vomindolina B2 (anti-Vin-B2) ottenuto da siero di coniglio immunizzato con il peptide sintetico LGGFFGTQQGLIGKR presente nella regione 106-120 della Vin-B2 di avena (Fig. 4.16), è stato utilizzato in immunoreazioni sulle proteine totali estratte dalle cariossidi di *T. monococcum*, *T. zhukovskyi* ed altri cereali per verificare la presenza del prodotto di espressione del gene *Vinb-2*. In particolare, le proteine endospermatiche totali sono state ridotte con β -mercaptoetanolo e frazionate mediante SDS-PAGE (Fig. 4.19A), e poi trasferite su una membrana di nitrocellulosa per la immunoreazione (Fig. 4.19B). Come atteso, nella regione corrispondente ai pesi molecolari tra 14 - 16KDa, l'anticorpo ha riconosciuto la vomindolina Vin-B2 presente tra le proteine estratte da *A. sativa* (Fig.4.19 B, corsia 5), mentre non ha dato reazione in *T. monococcum* (Fig.4.19B, corsie 2, 3 e 4) e *T. zhukovskyi* (Fig.4.19B, corsia 6).

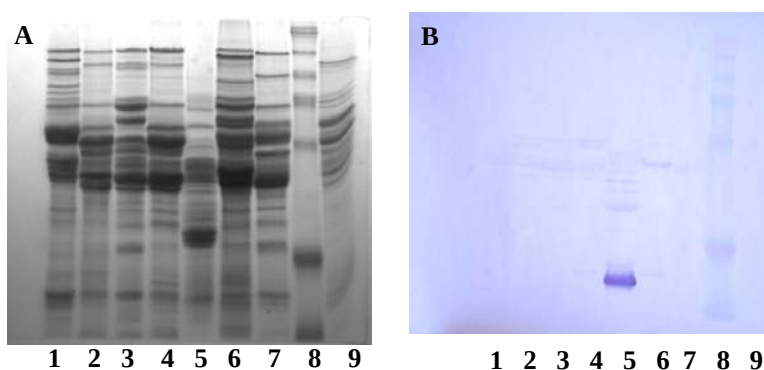


Figura 4.19. (A) Separazione SDS-PAGE delle proteine endospermatiche totali e (B) loro reazione con l'anticorpo policlonale specifico per la vomindolina Vin-B2. (1) *T. aestivum* cv. Bolero, (2-4) *T. monococcum* cv. Monlis e accessioni ID508 e ID331, (5) *A. sativa* cv. Donata (6) *T. zhukovskyi* accessione Far77, (7) *T. urartu*, (8) Marcatori di peso molecolare e (9) *T. turgidum* ssp *durum* cv. Colosseo.

Anche le proteine endospermatiche di grano tenero (Fig.4.19B, corsia 1), *T. urartu* (corsia 7) e grano duro (corsia 9) non hanno dato reazioni con l'antisiero anti-Vin-B2. L'immunoreazione delle proteine separate mediante SDS-PAGE contro l'anticorpo anti-Vin-B2 è stata ripetuta utilizzando la luminescenza come tecnica di rilevamento del legame antigene-anticorpo, tecnica circa 1000 volte più sensibile di quella colorimetrica basata sull'ossidazione del cloro-naftolo descritta precedentemente. Anche in questo caso, la forte reazione delle proteine di avena, è stata accompagnata da una debolissima o nulla reazione

delle proteine di *T. monococcum* e *T. zhukovskyi* (dati non mostrati). Anche nelle altre specie cerealicole analizzate non è stata osservata alcuna immunoreazione.

Il cDNA ottenuto per retro-trascrizione del mRNA estratto dalle cariossidi di avena e dell'accessione ID331 di grano monococco prelevate 14 giorni dopo l'antesi sono stati amplificati con i primer terminali specifici per i geni *Vinb-2* (Tab.3.1), ottenendo un'intensa banda di amplificazione in avena (Fig. 4.20, corsia 3) e una debole in *T. monococcum* (Fig. 4.20, corsia 1).

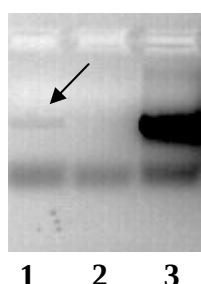


Figura 4.20. RT-PCR con primer specifici per i geni *Vinb-2* in (1) *T. monococcum* accessione ID331 e (3) *A. sativa* cv. Donata. (2) controllo negativo (campione senza RNA). La freccia indica la banda ottenuta nel grano monococco.

4.16 Analisi spettrometrica di massa MALDI delle vromindoline A

Allo scopo di determinare la struttura dei polipeptidi che compongono le vromindoline A (Figura 4.6), gli spot relativi sono stati sottoposti ad analisi spettrometrica MALDI come già descritto nel paragrafo 4.12. Gli spettri di massa MALDI dello spot S1 corrispondente a Vin-A1 (Fig. 4.21A) e dello spot S2 corrispondente a Vin-A2+Vin-A3 (Fig. 4.21B) sono risultati composti da numerosi peptidi, le cui sequenze aminoacidiche sono state determinate mediante RP-HPLC/n-ESI-MSMS. I peptidi con rapporto massa/carica (m/z) di “822,4”, “976,5”, “994,5”, “1186,7”, “1332,7”, “1346,8”, “1352,7”, “1460,8”, “1504,8”, “1954,1”, “1972,0”, “1980,1”, “2417,1” e “2781,8” ottenuti dallo spot S1 (=Vin-A1) (Fig. 4.22) hanno mostrato sequenze compatibili con quella dedotta dalla sequenza nucleotidica di un clone di cDNA di avena depositato nella banca GenBank con il codice gi|42745915. In particolare, se questo cDNA è tradotto a partire dal primo ATG all'estremità 5', nella metà N-terminale della proteina così ottenuta si riscontrano sequenze identiche ad alcuni peptidi presenti nello spot S1. Altri peptidi dello spot S1 si riscontrano nella parte C-terminale della proteina (dalla posizione 88 in poi) quando la traduzione del suddetto clone di cDNA viene fatta a ritroso a partire dal codone finale di stop TGA all'estremità 3'. Alcuni peptidi succitati

(peptidi con m/z di “822,4” , “976,5” , “994,5” , “1186,7” , “1954,1” , “1980,1” e “1972,0”) sono risultati presenti in tracce anche nello spot S2 (Vin-A2+Vin-A3).

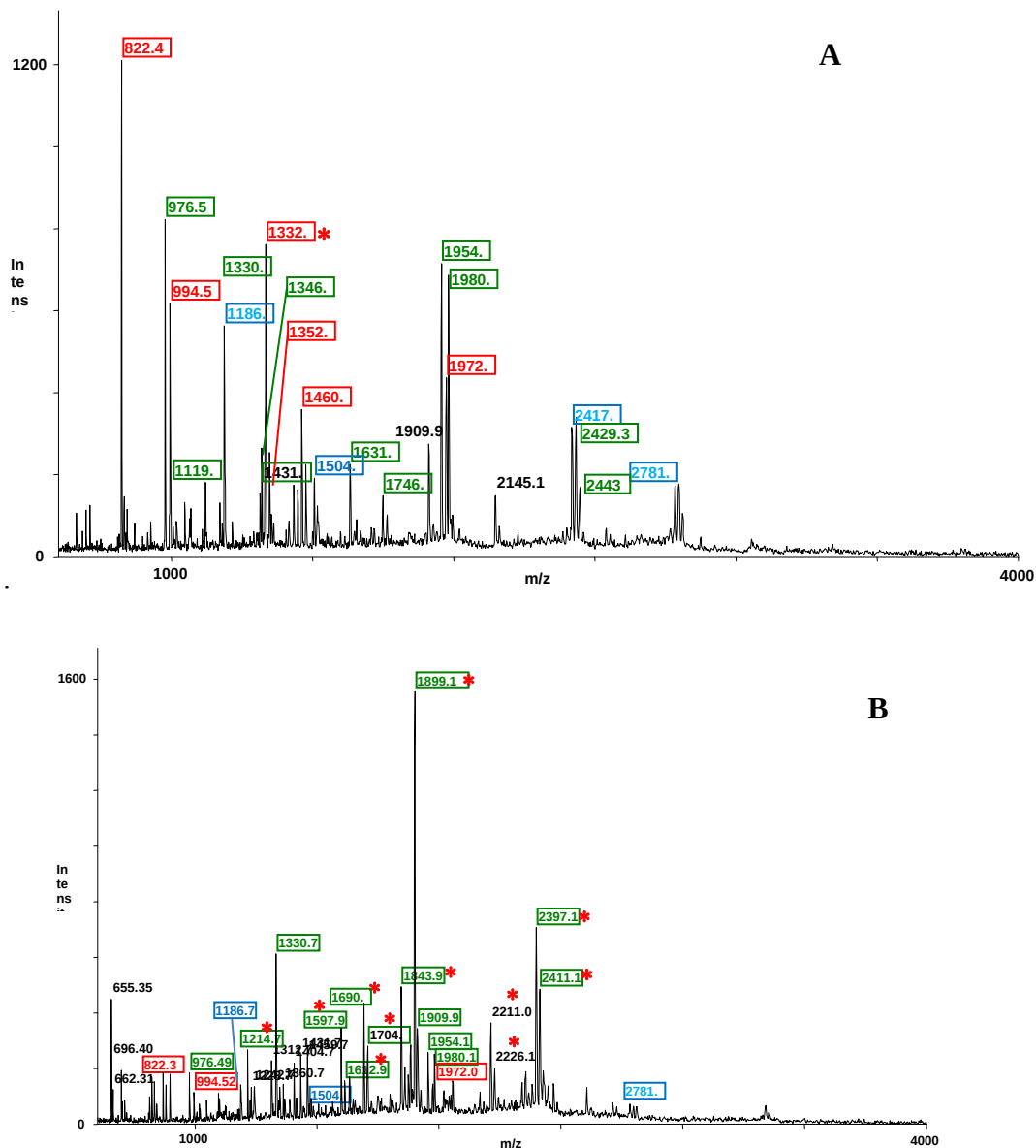
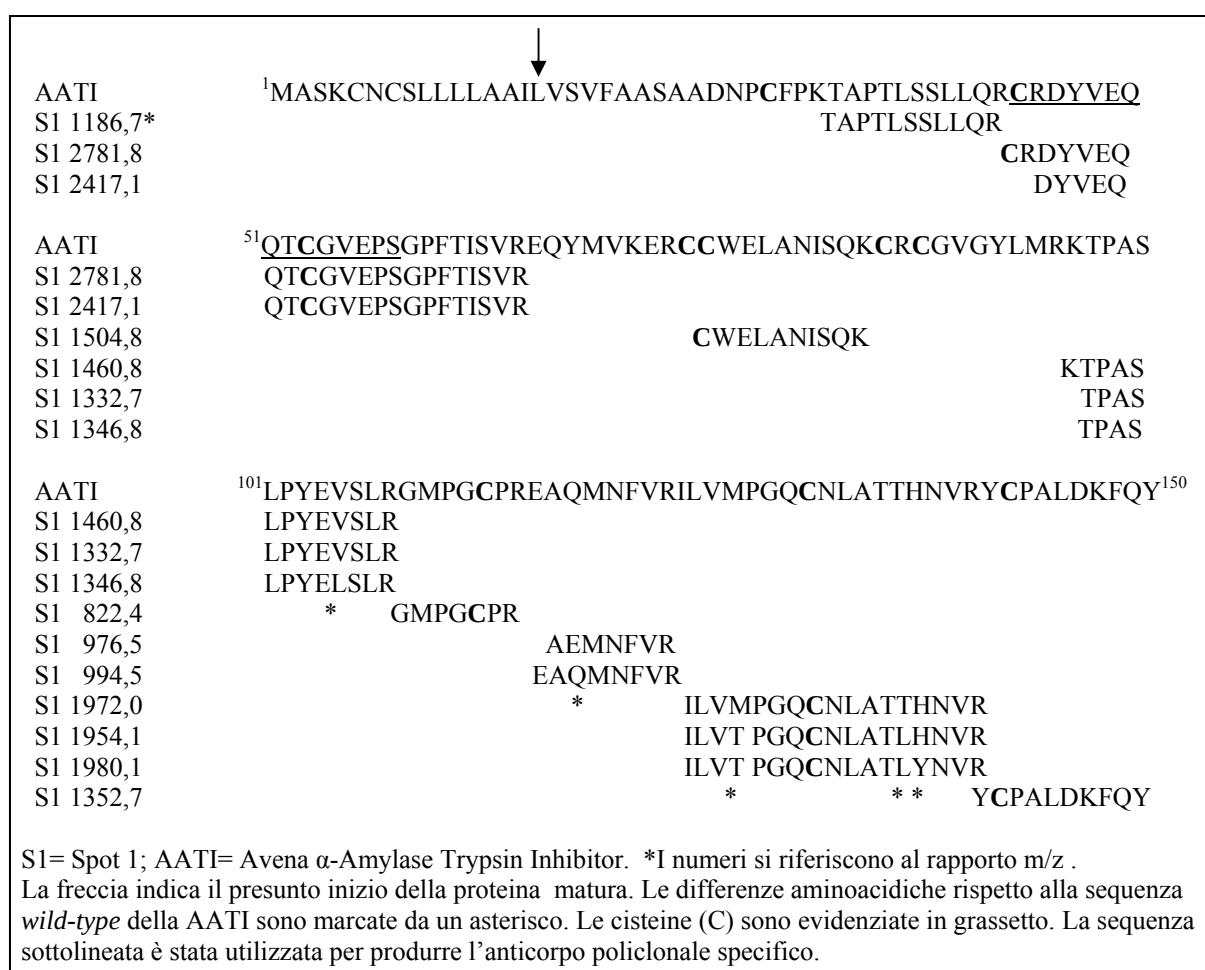


Figura 4.21. Spettro di massa MALDI dei peptidi triptici ottenuti da (A) spot S1 e (B) spot S2 delle Vin-A

Pertanto, sulla base della sequenza gi|42745915 sono stati disegnati due primer corrispondenti alle estremità della regione codificante della sequenza stessa (Tabella 3.1) e con questi primer è stata fatta l’amplificazione PCR del DNA genomico della cv. Donata ottenendo una sequenza nucleotidica di 589 bp (Fig. 4.24, corsia 11). Questa sequenza è

risultata identica al cDNA gi|42745915 di 591 bp salvo per l'assenza dei nucleotidi Adenina e Guanina dopo il nucleotide Guanina in posizione 265 della regione codificante (Fig. 4.23). Poiché il clone di cDNA gi|42745915 è stato identificato come inibitore tripsino/ α -amilasico, il gene amplificato per PCR è stato denominato Avena α -Amylase/Trypsin Inhibitor (*Aati*), e la proteina corrispondente è stata denominata AATI (Fig. 4.22). In questa proteina si riscontra la presenza di dieci cisteine, del dimero CC e del trimero CRC tipici delle proteine appartenenti alla famiglia 2S.

Figura 4.22. Sequenza della AATI di avena a confronto con le sequenze ottenute per ESI-MSMS dallo spot S1 delle vromindoline A di avena.



Si può inoltre notare che i peptidi con rapporto m/z di “1972,0” , “1954,1” e “1980,1” (Fig. 4.22) corrispondono alla stessa regione della proteina AATI ma differiscono tra loro per alcune sostituzioni aminoacidiche, fatto che suggerisce la presenza in avena di almeno tre forme alleliche del gene *Aati*. Anche tra i peptidi con rapporto m/z di “1460,8”, “1332,7” e “1346,8” è stata osservata una sostituzione aminoacidica.

Sia nello spot S1 che nello spot S2 sono state identificate tracce di peptidi con un certo grado di omologia di sequenza con segmenti di proteine depositate nella GenBank con il nome di “avenin precursor” (gi|114720), “ α -amylase inhibitor” (gi|18955 e gi|758343), hordoinoline b (gi|112442385) e “putative puroindoline-like protein” (gi|169788571). Inoltre, il peptide con m/z di “1899,1”, che rappresenta il componente principale dello spettro ottenuto dallo spot 2 (Fig.4.21 B), ha mostrato una sequenza di quindici o sedici aminoacidi con un basso livello di omologia con le proteine depositate nella GenBank. Dalla digestione enzimatica degli spot S1 e S2 non sono stati ottenuti peptidi contenenti il dominio ricco in triptofano tipico delle vromindoline, con la sola eccezione di un peptide a bassa intensità con m/z di “1690,7” derivato dallo spot S2 in cui è presente la sequenza WWK tipica delle avenoindoline e delle vromindoline.



Figura 4.23. Sequenza nucleotidica dell’inibitore tripsino/ α -amilasico di avena (*Aati*). La freccia indica la posizione in cui il cDNA gi 42745915 presenta l’inserzione dei nucleotidi Adenina e Guanina.

4.17 Amplificazione PCR di DNA genomico di specie cerealicole con primer specifici per il gene *Aati* di avena

L’amplificazione PCR del DNA genomico di *T. monococcum* e *T. urartu* con la coppia di primers terminali della regione codificante del gene *Aati* (Tab.3.1), ha prodotto bande di amplificazione di 589 bp poco intense (Fig. 4.24, corsie 2 e 8) rispetto a quella delle stesse dimensioni ottenuta in avena (Fig. 4.24, corsia 11). Anche l’amplificazione di *T.*

zhukovskyi (corsia 1), *Aegilops speltoides* (corsia 3), *T. timopheevii* (corsie 4 e 5), *Hordeum vulgare* (corsia 6) e *T. aestivum* (corsia 9) ha dato ampliconi più o meno intensi ma tutti leggermente più grandi di 589 bp. Al contrario, dall'amplificazione di *Ae. tauschii* (corsia 7) non è stato ottenuto alcun amplicone.

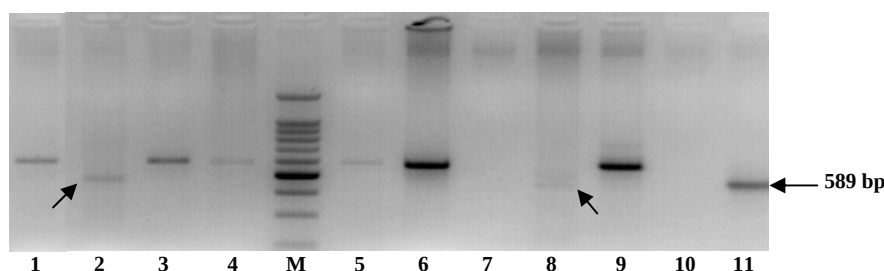


Figura 4.24. Amplificazione PCR di DNA genomico con primer specifici per il gene *Aati* di avena. (1) *T. zhukovskyi* accessione Far77, (2) *T. urartu* accessione ID1545, (3) *Ae. speltoides* accessione A352, (4,5) *T. timopheevii* accessioni Lonigo e TR110, (6) *Hordeum vulgare* cv. Arda, (7) *Ae. tauschii*, (8) *T. monococcum* cv. Monlis, (9) *T. aestivum* cv. Carisma, (10) Controllo negativo e (11) *A. sativa* cv. Fulvia. M=marcatore di peso molecolare. Le frecce indicano gli ampliconi di 589 bp.

4.18 Immunoreazioni con l'anticorpo anti-AATI

L'anticorpo policlonale per l'inibitore tripsino/ α -amilasico di avena (AATI) ottenuto da siero di coniglio immunizzato con il peptide sintetico CRDYVEQQTCGVEPS (Fig. 4.22) non ha dato immunoreazioni verso le proteine estratte da granuli d'amido di avena ed altri cereali (dati non mostrati).

4.19 Trasformazione del grano duro cv. Svevo con i geni *Vinb-2* e *Vinb-3* di avena

Linee transgeniche di *T. turgidum* ssp. *durum* cv Svevo contenenti i geni delle vomindoline sono state ottenute con il metodo biolistico utilizzando due costrutti separati, uno contenente il gene *Vinb-X2a* e l'altro il gene *Vinb-X3a* (Fig. 3.1). Inoltre le piante sono state co-trasformate con un costrutto contenente il gene *Bar* che conferisce resistenza alla fosfinotricina (PPT) componente attivo di diserbanti totali. La trasformazione è stata eseguita dalla D.ssa M. Ianni presso il laboratorio del prof. R. D'Ovidio (Università "La Tuscia" VT), su 1800 calli ottenuti da embrioni prelevati a 14 giorni dall'antesi da spighe di grano duro allevate in pieno campo. Dopo 2 cicli di selezione su mezzo contenente PPT, i 108 (6%) calli sopravvissuti sono stati fatti rigenerare su un mezzo per la radicazione, trasferiti in vasetti contenenti terra e portati a spigatura in cella climatica. La presenza dei geni per le vomindoline nelle 108 piante resistenti alla PPT è stata verificata mediante PCR utilizzando

il DNA genomico prelevato da frammenti di foglie di piante T1, usando i primer specifici per la regione codificante dei geni *Vinb-X2a* e *Vinb-X3a* (Tab. 3.1). Delle 108 piante resistenti all'erbicida, 47 (43,5%, equivalente al 2,6% dei calli) sono risultate positive per uno o entrambi i geni. Delle 47 piante rigenerate, 44 sono giunte a maturazione in due momenti successivi (R1 e R2) a distanza di 15 giorni. Le spighe di ciascuna pianta sono state raccolte separatamente e 10 cariossidi T2 rappresentative di ciascuna pianta sono state utilizzate per l'analisi della durezza mediante il metodo SKCS. Una parte del macinato ottenuto dalle 10 cariossidi sottoposte al test SKCS è stato utilizzato per estrarre i granuli d'amido, mentre dalla parte restante è stato estratto il DNA con la metodologia descritta da Shariflou *et al* (2003).

Tabella 4.2. Numero, peso medio (mg), analisi PCR, immunoreazioni e analisi SKCS di cariossidi T2 ottenute da piante transgeniche di grano duro con i geni *Vinb-X2a* e *Vinb-X3a*. Raccolto R1.

Immunoreazione su proteine											
Piante	Cariossidi T2		Legate all'amido				Totali		SKCS		
			Analisi PCR								
	T1	No.	Peso	Vinb-2	Vinb-3	Vin-B2	Vin-B3	Vin-B2	Vin-B3	Media	DS
G0	134	35,0	-	-	-	-	ND	ND	100,4	9,2	98-111
G1	43	37,2	+	+	+	-	+	-	85,8	17,6	55-114
G2	39	28,2	+	+	+	-	+	-	82,2	9,7	69-101
G3	29	41,4	-	+	-	-	-	-	99,1	5,0	89-104
G4	64	37,5	+	+	+	+	ND	ND	80,8	27,9	26-111
G5	121	41,3	+	+	+	+	ND	ND	83,8	26,0	9-108
G6	41	48,8	+	+	+	+	+	+	87,4	13,2	85-100
G7	59	47,4	-	-	-	-	ND	ND	93,7	17,1	77-108
G8	55	29,0	+	+	+	-	+	-	97,9	15,3	68-116
G9	46	39,1	-	-	-	-	ND	ND	97,2	9,1	90-110
G10	42	19,0	+	+	+	-	+	-	103,3	10,7	86-107
G11	46	41,3	+	-	+	-	ND	ND	84,9	9,0	73-102
G12	8	20,0	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
G13	19	10,0	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

DS = deviazione standard; ND = non determinato. In grassetto è evidenziata la linea oggetto di successive analisi di segregazione.

La presenza dei geni vomindolinici in questo DNA è stata verificata mediante PCR come descritto precedentemente. I risultati dell'analisi PCR, del test SKCS e delle immunoreazioni delle proteine estratte dai granuli d'amido con gli anticorpi specifici anti-Vin-B2 e anti-Vin-B3, sono riassunti nella Tabella 4.2 per le piante raccolte al tempo R1 e in Tabella 4.3 per quelle raccolte al tempo R2.

Tabella 4.3. Numero, peso medio (mg), analisi PCR, immunoreazioni e analisi SKCS di cariossidi T2 ottenute da piante transgeniche di grano duro con i geni *Vinb-X2a* e *Vinb-X3a*. Raccolto R2.

Piante T1	Cariossidi T2 No. Peso		Immunoreazioni su proteine								SKCS		
			Legate all'amido				Totali						
			Analisi PCR		Vinb-2	Vinb-3	Vin-B2	Vin-B3	Vin-B2	Vin-B3	Media	DS	min-max
			Vinb-2	Vinb-3									
G14	42	33,0	+	+	+	-	+	-	55,1	9,0	36-74		
G15	76	29,0	-	+	-	+	ND	ND	68,0	10,7	47-89		
G16	54	38,8	-	-	-	-	ND	ND	93,5	10,0	80-107		
G17	107	24,8	+	+	+	+	ND	ND	65,3	19,5	30-102		
G18	77	21,0	+	+	+	+	ND	ND	87,9	14,7	63-100		
G19	47	24,7	+	+	+	+	ND	ND	73,2	20,0	42-105		
G20	40	15,5	+	+	+	+	ND	ND	69,0	21,6	38-95		
G21	47	29,4	+	+	+	+	+	+	60,7	10,4	41-75		
G22	62	24,9	-	+	-	+	ND	ND	79,1	16,3	53-109		
G23	64	16,2	+	+	+	+	+	+	82,8	18,3	49-108		
G24	98	32,1	-	+	-	-	-	-	64,6	12,8	31-78		
G25	113	15,2	-	-	-	-	-	-	88,3	13,7	70-115		
G26	55	33,5	-	+	-	-	-	-	65,3	7,3	55-75		
G27	66	20,7	-	-	-	-	ND	ND	74,0	12,2	54-101		
G28	51	30,0	+	+	+	+	+	+	52,7	19,0	20-84		
G29	75	24,6	+	+	+	+	+	+	26,0	15,2	-2 - 44		
G30	48	19,6	+	+	+	+	ND	ND	65,9	22,4	15-92		
G31	26	33,3	+	+	+	+	+	+	74,1	16,3	50-90		
G32	55	21,8	+	+	-	-	-	-	58,2	7,2	46-73		
G33	76	24,3	+	+	+	-	+	-	65,3	7,6	55-84		
G34	21	31,1	-	-	-	-	ND	ND	94,1	12,6	70-109		
G35	88	21,7	-	-	+	+	+	+	77,7	19,0	41-108		
G36	29	21,2	+	+	+	+	ND	ND	54,0	13,2	39-82		
G37	53	15,9	+	+	+	+	ND	ND	90,7	19,8	52-112		
G38	33	37,7	-	-	-	-	ND	ND	76,7	13,8	49-97		
G39	34	14,4	-	-	-	-	-	-	68,8	19,4	26-73		
G40	57	11,4	+	+	-	+	+	+	69,1	15,5	43-92		
G41	93	25,6	-	-	-	-	-	-	71,9	12,9	41-86		
G42	82	27,3	-	+	-	+	-	+	82,0	15,4	51-97		
G43	62	28,6	+	+	-	+	+	+	57,3	14,8	32-84		

DS = deviazione standard; ND = non determinato. In grassetto sono evidenziate le linee oggetto di successive analisi di segregazione.

L'analisi PCR delle cariossidi T2 ha rilevato la presenza di entrambi i transgeni in 24 piante, del solo transgene *Vinb-3* in sei piante e del solo transgene *Vinb-2* nella pianta G11; inoltre 12 piante hanno dato cariossidi T2 prive di entrambi i transgeni. Nella tabella 4.2 è stata inserita come controllo negativo la pianta G0 priva di entrambi transgeni anche nella generazione T1. Nella maggior parte dei casi, i risultati delle immunoreazioni con gli anticorpi specifici per le vomindoline (Fig. 4.25) sono risultati concordi con le analisi PCR sui relativi geni. Tuttavia in otto casi (G1, G2, G3, G8, G14, G24, G26 e G33) la presenza del

transgene *Vinb-3* non è risultata accompagnata da una risposta anticorpale positiva con l'antisiero anti-Vin-B3. Nelle cariossidi di due piante (G40 e G43) contenenti il transgene *Vinb-2*, l'anticorpo anti-Vin-B2 ha dato reazioni con le proteine endospermatiche totali ma non con quelle legate all'amido. Infine le cariossidi prodotte dalla pianta G32 contenente entrambi i transgeni non hanno dato alcuna risposta con entrambi gli anticorpi, mentre le cariossidi della pianta G35, apparentemente priva di transgeni vromindolinici, hanno risposto ad entrambi gli anticorpi.

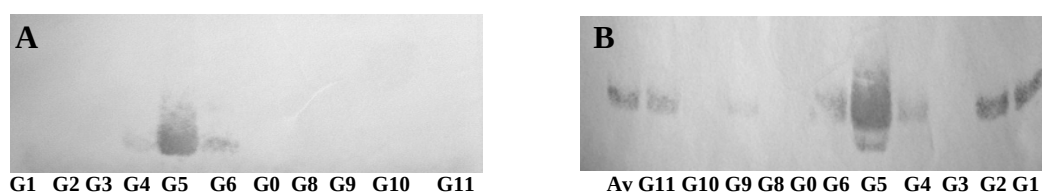


Figura 4.25. Reazioni immunochimiche delle proteine legate all'amido di cariossidi T2 prodotte da piante transgeniche di grano duro contenenti i geni *Vinb-2* e *Vinb-3*. Le proteine separate mediante A-PAGE sono state esposte all'anticorpo (A) anti-Vin-B3 o (B) anti-Vin-B2. Av = proteine di avena (controllo positivo).

4.20 Analisi della durezza SKCS sulle piante transgeniche di grano duro

La durezza media delle cariossidi delle 13 piante del raccolto R1 (SKCS medio = 91,4) è risultata significativamente superiore rispetto a quella delle cariossidi delle 30 piante del raccolto R2 (SKCS medio = 70,9). Pertanto, l'analisi della tessitura delle cariossidi è stata condotta tenendo separati i due raccolti. Tra le cariossidi prodotte da ciascuna delle 24 piante contenenti entrambi i transgeni sono stati osservati valori di SKCS molto discordanti, come dimostrato dall'elevata deviazione standard (DS), talvolta superiore a 20 unità SKCS. Alcune cariossidi hanno mostrato valori di SKCS <30, assenti nelle progenie delle piante che dall'analisi PCR erano risultate negative per uno o entrambi i transgeni (Tab.4.2 e 4.3). Una distribuzione tipica dei valori SKCS delle cariossidi di questo gruppo di piante è riportata nella Figura 4.26.

La pianta G11, unico caso con il solo transgene *Vinb-2*, ha prodotto cariossidi con SKCS medio di 84,9 e SKCS minimo di 73, caratteristici di cariossidi a tessitura hard. Le piante G15, G22 e G42 del raccolto R2, risultate positive al test anticorpale con l'anti-Vin-B3 ma negative con l'anti-Vin-B2 hanno prodotto cariossidi con valori di SKCS compresi tra 47 e 109 e DS intorno a 15. Le piante prive di transgeni vromindolinici presentavano valori medi di SKCS superiori a 93 nel raccolto R1 e superiori a 58 nel raccolto R2, associati a

deviazioni standard piuttosto basse, spesso inferiori a 10. Fa eccezione la pianta G39 caratterizzata da un'alta deviazione standard (19,4) e dalla presenza di cariossidi con valore minimo di 26. A questo proposito è da notare che la pianta G39 ha prodotto poche cariossidi (34), con un peso medio particolarmente basso (14,4 mg) (Tabella 4.3). La pianta G0 ottenuta da un callo contenente il gene *Bar* in assenza dei geni *Vinb-2* e *Vinb-3*, qui utilizzata come controllo negativo, ha prodotto una progenie a tessitura hard con indice medio di SKCS di 100 e deviazione standard di 9,2 (Tabella 4.2). Una distribuzione tipica dei valori SKCS delle cariossidi delle piante prive di transgeni vomindolinici è riportata nella Figura 4.27.

Infine meritano attenzione le piante G6 del raccolto R1 e G24 del raccolto R2. La prima è caratterizzata da elevati valori di SKCS (85-100) nonostante la presenza di entrambi i transgeni vomindolinici e dei loro prodotti di espressione, mentre la seconda è caratterizzata dall'assenza delle vomindoline associata a valori di SKCS compresi tra 31 e 78. Quest'ultima pianta all'analisi PCR è risultata contenere il transgene *Vinb-3*.

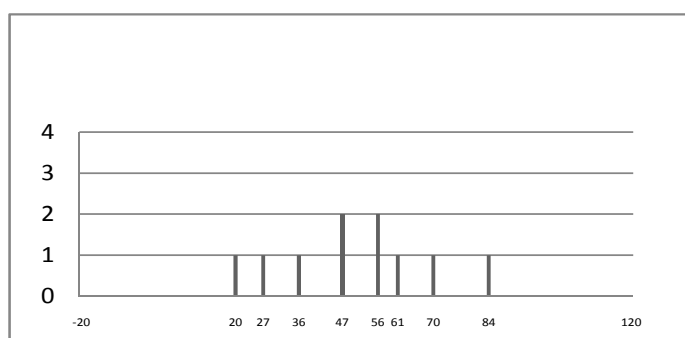


Fig.4.26 Una distribuzione tipica dei valori SKCS (in ascissa) in 10 cariossidi T2 ottenute dalla pianta G28 contenente i geni *Vinb-2* e *Vinb-3*.

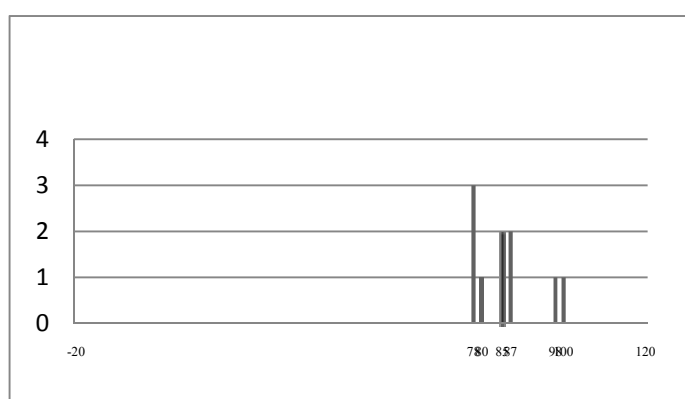


Fig.4.27 Una distribuzione tipica dei valori SKCS (in ascissa) in 10 cariossidi ottenute dalla pianta G7 priva dei geni vomindolinici.

4.21 Segregazione dei geni *Vinb-2* e *Vinb-3* nella progenie delle piante transgeniche G5, G29 e G30

La pianta transgenica G5 del raccolto R1 ha dato una progenie di 121 cariossidi con peso medio di 41,3 mg. I valori di SKCS osservati in questa progenie variano da 9 a 108 (Tabella 4.2). L'analisi PCR e le reazioni immunochimiche condotte su un miscuglio di 10 cariossidi hanno dimostrato la presenza e l'espressione dei transgeni *Vinb-2* e *Vinb-3*.

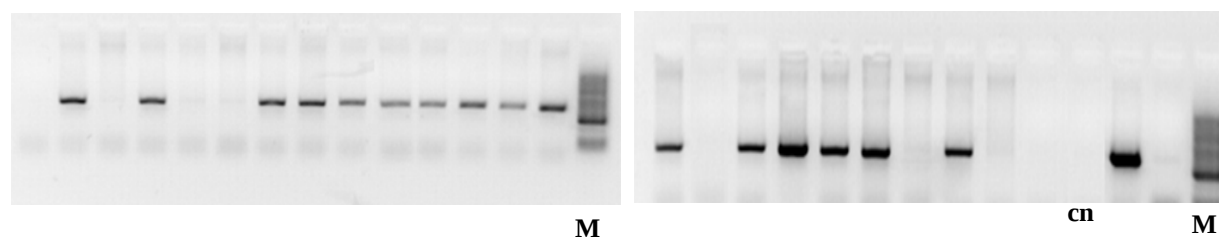


Figura 4.28. Amplificazione PCR di 25 cariossidi T2 prodotte dalla pianta transgenica di grano duro G5 utilizzando i primer specifici per il gene *Vinb-3*. M = marcatore molecolare. cn = controllo negativo.

Tabella 4.4. Segregazione dei transgeni *Vinb-2* e *Vinb-3* nella progenie T2 della pianta G5.

		Fenotipo			
<i>Vinb-2</i>	+	+	-	-	
<i>Vinb-3</i>	-	+	+	-	
Osservato	0	19	0	10	
Atteso* (3:1)		21,75		7,25	
χ^2 (3:1)		1,4 n.s.			

*Vedi testo

Pertanto, 29 cariossidi T2 sono state analizzate singolarmente per studiare la segregazione dei transgeni vomindolinici mediante amplificazione PCR del DNA genomico estratto dalle plantule T2 (Fig. 4.28). Complessivamente 19 cariossidi sono risultate contenere entrambi i transgeni (Tab. 4.4), mentre 10 cariossidi sono risultate prive di transgeni vomindolinici. Il test χ^2 per la segregazione monofattoriale 3:1 ha dato un valore non significativo, suggerendo l'inserzione di entrambi i transgeni in un unico sito e una loro segregazione regolare. Il sequenziamento degli ampliconi ottenuti dal DNA genomico di due plantule T2 della linea G5 ha evidenziato la presenza dei geni *Vinb-X2a* e *Vinb-X3a*, senza alcuna differenza di sequenza rispetto a quelli della varietà di avena Donata.

Anche nella pianta transgenica G30 del raccolto R2 (48 semi T2 con peso medio di 19,6 mg e indice SKCS tra 15 e 92), 28 cariossidi T2 sono state analizzate singolarmente mediante amplificazione PCR e di queste 21 sono risultate positive per la presenza di entrambi i transgeni, mentre 7 ne sono risultate prive, suggerendo anche in questo caso una segregazione genetica monofattoriale 3:1.

La pianta transgenica G29 del raccolto R2 ha dato una progenie di 75 cariossidi T2 con peso medio di 24,6 mg. I valori di SKCS osservati in questa progenie variano da -2 a 44 (Tab.4.3). Delle 32 cariossidi T2 investigate singolarmente per seguire la segregazione dei transgeni vromindolinici mediante amplificazione PCR con i primer specifici, 30 cariossidi sono risultate positive all'amplificazione di entrambi i transgeni e 2 sono risultate prive di transgeni vromindolinici secondo una segregazione 15:1 tipica di due fattori genetici indipendenti ed epistatici, suggerendo la presenza di entrambi i geni vromindolinici in due siti di inserzione su due cromosomi diversi o sullo stesso cromosoma a distanza ≥ 50 cM.

5. DISCUSSIONE

5.1 La tessitura della cariosside di avena

Tra i cereali coltivati appartenenti alla Famiglia delle *Poaceae* (*Gramineae*), che comprende anche *Triticum* (grano), *Secale* (segale), *Hordeum* (orzo), *Oryza* (riso), *Zea* (mais) e *Sorghum* (sorgo), la specie *Avena sativa* è caratterizzata da cariossidi estremamente soffici con valori medi di SKCS molto bassi e sempre negativi (Doehlert, 1997; Doehlert e McMullen, 2000), mai riscontrati negli altri cereali sopraccitati (Corona *et al*, 2001a; Pogna *et al*, 2002; Hansen *et al*, 2004; Iwami *et al*, 2005; Pedersen *et al*, 1996; Li *et al*, 1996). Infatti, nel gruppo di varietà di avena analizzate in questa tesi il valore medio di SKCS è risultato inferiore a -22, con una sola varietà al di sopra del valore di -17.

Questa estrema sofficià della cariosside di avena comporta alcuni aspetti negativi dal punto di vista agronomico e tecnologico, soprattutto per le varietà con cariossidi nude. Infatti, la raccolta meccanica e la trebbiatura di cariossidi particolarmente soffici determina un elevato numero di chicchi spezzati che riducono gravemente la percentuale di germinazione, la vitalità e la salubrità del seme (Valentine e Hale, 1990; Peltonen-Sainio *et al*, 2001). Anche la qualità dei *flakes* (fiocchi) di avena, uno dei principali prodotti a base di questo cereale utilizzato nell'alimentazione umana, è influenzata negativamente dalla frantumazione delle cariossidi. Un basso numero di cariossidi rotte significa infatti *flakes* più numerosi e grandi.

La tessitura della cariosside in grano è controllata principalmente dalle puroindoline Pin-A e Pin-B. In particolare, le cariossidi di frumento a tessitura *soft* accumulano elevate quantità di Pin-A e Pin-B sui granuli di amido rispetto alle cariossidi a tessitura *hard* o *extra-hard* (Corona *et al*, 2001 a,b). Nelle cariossidi soffici sono sempre presenti gli alleli “wild-type” *Pina-D1a* e *Pinb-D1a*, mentre nelle cariossidi dure compaiono mutazioni a carico dei loci puroindolinici, soprattutto al locus *Pinb-D1* (Giroux e Morris, 1997, 1998; Corona *et al*, 2001a,b; Feiz *et al*, 2009). Sui granuli d'amido delle cariossidi *extra-soft* di *T. monococcum* (indice di SKCS medio tra -5 e 0) si accumulano livelli di Pin-A e Pin-B anche 3 volte superiori a quelli misurati nelle cariossidi di grano tenero a tessitura *soft* (indice di SKCS tra 10 e 45) (Taddei *et al*, 2009), a dimostrazione della relazione tra sofficià e accumulo di puroindoline.

Le basi genetiche e biochimiche della tessitura extra-soffice delle cariossidi di avena, oggetto di questa tesi, non sono note. L'osservazione che *A. sativa* contiene varianti alleliche dei geni per le avenoindoline che in grano, orzo e segale codificano rispettivamente per le puroindoline (Pin-A e Pin-B), le ordoindoline e le secaloindoline (Gautier *et al*, 2000) ha

lasciato supporre che questi alleli svolgano un ruolo nel determinare la tessitura della cariosside anche in avena.

Tanchak *et al* (1998) hanno descritto quattro cloni di cDNA (3B3-5, 3B3-7, 3B3T-3 e 3B3T-5) dalle cui sequenze nucleotidiche sono state derivate tre sequenze polipeptidiche che per le dimensioni e la presenza di 10 residui cisteinici regolarmente distanziati e di un dominio centrale ricco in triptofano, sono ascrivibili alla famiglia delle proteine 2S. Tuttavia questi polipeptidi, inclusi nella famiglia delle **triptofanine** da Tanchak *et al* (1998), le cui sequenze sono solo parzialmente simili alle puroindoline, non sono mai stati studiati ulteriormente per dimostrarne l'associazione ai granuli di amido e l'eventuale presenza in altri cereali a paglia.

5.2 Le proteine legate all'amido in *Triticum* e *Avena*

L'amplificazione PCR del DNA genomico di 34 varietà di *Avena sativa* ha confermato la presenza dei geni 3B3 e 3B3T codificanti per proteine appartenenti alle triptofanine (Tanchak *et al*, 1998). Questi geni non sono stati riscontrati in grano tenero e in grano duro. D'altra parte, nelle varietà Donata e Primula di *A. sativa* è stato ottenuto un prodotto di amplificazione PCR che ha mostrato una sequenza identica a quella del gene codificante per Pin-A in avena (chiamata anche **avenoindolina A**, avin-A) isolato nella stessa specie da Gautier *et al* (2000). Tuttavia l'amplificazione di questo gene in avena ha dato un amplicone debolissimo rispetto a quello ottenuto per i geni 3B3 e 3B3T. Anche l'amplificazione per RT-PCR del mRNA codificante per Pin-A nelle cariossidi immature della cv. Donata ha dato pochissimo prodotto, a dimostrazione di un livello estremamente basso di espressione del gene codificante per Pin-A. Nelle varietà Donata e Primula è stato ottenuto con molte difficoltà un amplicone piuttosto debole corrispondente al gene codificante per Pin-B e con molti prodotti di amplificazione aspecifici. Tuttavia, è stata dimostrata la presenza di tracce di mRNA codificante per Pin-B di avena (**avenoindolina B**) nelle cariossidi immature delle varietà Primula e Donata.

Le proteine estratte dai granuli d'amido o direttamente dalle cariossidi di varietà di *A. sativa* hanno dato una reazione con l'anticorpo specifico per la puroindolina Pin-A (avenoindolina A), solo quando si ricorre a tecniche estremamente sensibili come la chemiluminescenza. Nelle specie diploidi (*A. hirtula*, *A. atlantica* e *A. eriantha*) o tetraploidi (*A. magna*, *A. insularis* e *A. barbata*) di avena non si è riscontrata nessuna reazione.

Da tutte queste osservazioni deriva che, contrariamente alle altre specie, l'estrema soffici   delle cariossidi di avena non   dovuta all'accumulo di proteine omologhe alle puroindoline di grano. In sostituzione delle avenoindoline, sui granuli d'amido dell'endosperma di avena sono accumulate grandi quantit  di proteine che abbiamo denominato **vromindoline** (Vin) dal nome greco dell'avena "vromi", un gruppo di proteine basiche con peso molecolare apparente di 13-14KDa che si separano in due famiglie denominate Vin-A e Vin-B quando sottoposte ad elettroforesi in ambiente acido (A-PAGE), dopo riduzione ed alchilazione. Vin-A e Vin-B presentano una mobilit  elettroforetica in A-PAGE diversa da quella delle puroindoline di grano tenero, sia in condizioni native che dopo riduzione ed alchilazione. Quando sono separate per SDS-PAGE, le proteine Vin-A e Vin-B presentano pesi molecolari apparenti di circa 13KDa, corrispondenti a quelli delle puroindoline di grano tenero.

Tuttavia queste proteine sono diverse dalle puroindoline per un altro importante aspetto. Infatti, diversamente dalle puroindoline, le proteine Vin-A e Vin-B (con l'eccezione di un componente a minor peso molecolare) non sono solubili in Cloroformio/Metanolo (CM). Al contrario, le proteine di maggior peso molecolare (>22 KDa) legate ai granuli d'amido in avena sono totalmente solubili in CM e quindi   interessante notare che la insolubilit  delle proteine Vin-A e Vin-B in CM pu  essere sfruttata per separare queste ultime dalle altre proteine associate ai granuli di amido e procedere ad una loro purificazione.

Le proteine Vin-A e Vin-B sono molto ricche in residui cisteinici, come dimostra la loro forte reazione con il fluorocromo alchilante monobromobimane. Ci    in accordo con l'appartenenza di queste proteine alla famiglia delle proteine 2S associate ai granuli di amido, famiglia alla quale appartengono anche le puroindoline e le proteine omologhe negli altri cereali.

L'elettroforesi bidimensionale A-PAGE x SDS-PAGE separa le proteine Vin-A e Vin-B in sei componenti principali, tre proteine Vin-A (1, 2 e 3) e tre proteine Vin-B (1, 2 e 3) (Fig. 4.6), con pesi molecolari comparabili ma carica elettrica totale differente. Inoltre le proteine Vin-A1, Vin-B1 e Vin-B2 sono depositate sui granuli d'amido in quantit  maggiori rispetto agli altri tre componenti. Ci  pu  essere dovuto ad un numero maggiore di geni codificanti per queste proteine, ad un loro pi  elevato grado di espressione oppure ad una maggiore affinit  di tali proteine per i granuli d'amido.

Entrambi le famiglie polipeptidiche Vin-A e Vin-B sono presenti nelle specie diploidi e tetraploidi di Avena. L'analisi elettroforetica bidimensionale (A-PAGExSDS-PAGE) delle

vromindoline estratte dalle specie diploidi *A.strigosa* e *A.nuda* con genoma A ha messo in evidenza la presenza dei tre componenti di entrambe le famiglie (Fig.4.6.1), a dimostrazione che la reiterazione dei geni vromindolinici è già presente a livello diploide. In questo contesto si può notare che recentemente è stata ottenuta l'evidenza di geni aggiuntivi codificanti per le puroindoline Pin-B localizzati nei cromosomi della serie omeologa 7 di grano tenero in aggiunta al locus *Pinb-D1* nel cromosoma 5D (Chen *et al*, 2009). D'altra parte in orzo la ordoindolina-B risulta essere codificata da due geni (*Hinb-1* e *Hinb-2*) entrambi localizzati nel cromosoma 5H.

5.3 La natura delle proteine legate all'amido in Avena

L'anticorpo specifico per la triptofanina codificata dal clone 3B3 (Tanchak *et al*, 1998) reagisce fortemente con il componente Vin-B2, mentre l'anticorpo specifico per la triptofanina codificata dal clone 3B3T reagisce con il componente Vin-B3. Nelle varietà di avena Donata e Primula sono stati identificati tre geni che codificano per Vin-B2 (*Vinb-X2*, *Vinb-Y2* e *Vinb-Z2*), fatto compatibile con l'isolamento delle due sequenze di cDNA 3B3-5 e 3B3-7 nella varietà di avena Hinoat da parte di Tanchak *et al* (1998). A questo proposito si può notare che le sequenze 3B3-5 e 3B3-7 differiscono per 2 o 3 aminoacidi dai geni *Vinb-X2a*, *Vinb-Y2a* e *Vinb-Z2a*, i quali a loro volta differiscono tra loro per 1 o 2 aminoacidi. Ciò significa che le differenze di sequenza tra i geni vromindolinici non sono molto maggiori di quelle tra gli alleli dello stesso gene in varietà diverse. In altri termini i geni vromindolinici sono altamente conservati. Anche le vromindoline Vin-B1 e Vin-B3 sono codificate da più geni. In particolare nelle varietà Primula sono stati identificati due geni (*Vinb-X1a* e *Vinb-Y1a*) che codificano per la Vin-B1, mentre la Vin-B3 è sotto il controllo genico di *Vinb-X3a* e *Vinb-Y3a*. Il clone 3B3T-3 di Tanchak *et al* (1998) è risultato differire di un solo aminoacido dall'allele *Vinb-X3a*. Una recente analisi condotta sulla varietà Donata ha dimostrato la presenza del gene *Vinb-X3a* anche in questa varietà la quale tuttavia non contiene il gene *Vinb-Y3a* ma una sequenza leggermente diversa denominata *Vinb-Z3a*. Quest'ultimo gene differisce per 4 aminoacidi da *Vinb-Y3a* e per questa ragione è stato considerato come un nuovo gene piuttosto che una variante allelica di *Vinb-Y3a*.

E' importante sottolineare che anche le specie diploidi presentano tutti e sei i componenti polipeptidici delle vromindoline a dimostrazione del fatto che la reiterazione dell'informazione genetica per queste proteine non è legata soltanto alla natura poliploide di *A. sativa* ma si riscontra anche all'interno di un singolo genoma.

In questa tesi si ha quindi la prima osservazione diretta delle proteine associate ai granuli di amido in avena (=vromindoline) e del loro controllo genico.

5.4 Cinetica di accumulo delle vromindoline e dei relativi mRNA

Già nella prima settimana dopo l'antesi è possibile vedere le proteine Vin-A associate ai granuli di amido nell'endosperma in formazione. L'accumulo delle proteine Vin-B sembra più lento o in ritardo di circa una settimana rispetto a quello delle proteine Vin-A. A 28 GDA i granuli di amido contengono quantità equivalenti di entrambe le famiglie proteiche. Come già osservato in grano tenero per le puroindoline Pin-A e Pin-B (Gazza *et al*, 2006a), nelle fasi finali della maturazione si osserva un leggero calo della quantità di proteine legate all'amido. La quantità di proteine Vin-A e Vin-B accumulate sui granuli di amido è particolarmente elevata (intorno all'1,5% del peso secco della cariosside nella cv. Donata), circa 10 volte maggiore di quella osservata per le puroindoline di grano. L'estrema sofficità delle cariossidi di avena potrebbe essere associata al forte accumulo di vromindoline sui granuli di amido; questo aspetto verrà discusso nei paragrafi successivi.

La sintesi di mRNA specifico per la Vin-B2 è un evento molto precoce che inizia nella prima settimana dopo l'antesi e continua per oltre 5 settimane, mentre la sintesi del messaggero della Vin-B3 è più tardiva cominciando a 14 GDA, mantenendosi comunque a livelli elevati fino a 35 GDA.

5.5 Vromindoline B e tessitura della cariosside di avena

L'avena è quindi il primo cereale a cariosside soffice in cui le puroindoline (avenoindoline) non sembrano svolgere un ruolo nella modulazione del grado di durezza. Questo ruolo potrebbe essere svolto dalle vromindoline, proteine caratteristiche di questa specie ed assenti in grano. Le vromindoline B per sequenza, peso molecolare e capacità di accumularsi sui granuli di amido, sono molto simili alle puroindoline. Tuttavia, esse hanno alcune caratteristiche peculiari (Fig.5.1) :

- presenza di un dominio centrale con quattro residui di triptofano (invece di 5 o 3 tipici rispettivamente di Pin-A e Pin-B), residui seguiti ciascuno da un aminoacido carico positivamente (lisina o arginina). E' interessante notare che i geni addizionali codificanti per la Pin-B presenti nei cromosomi della serie omeologa 7 in grano tenero producono proteine con soli 2 residui di triptofano e queste proteine non sono in grado di legarsi ai granuli di

amido anche quando manca la proteina Pin-B wild-type codificata dal gene *Pinb-D1a* nel cromosoma 5D (Chen *et al*, 2009). Ciò suggerisce che il legame con i granuli di amido e la sua forza dipendano dal numero di residui di triptofano, numero che non deve essere inferiore a tre. Se esiste una relazione tra numero di residui di triptofano e forza di legame con le membrane, le vromindoline avrebbero una forza di legame con i granuli di amido intermedia tra quella della Pin-A e della Pin-B.

- presenza di un ulteriore residuo di triptofano seguito da un residuo di arginina nella metà C-terminale, a distanza di 26 aminoacidi dal dominio centrale ricco in triptofano (posizione 71 e 72 della proteina matura);
- presenza di aminoacidi carichi negativamente nella regione N-terminale e di aminoacidi carichi positivamente in prossimità della regione C-terminale della stessa proteina. Per questa ragione, diversamente dalle puroindoline, le vromindoline B hanno una spiccata solubilità nei solventi acquosi dovuta alla polarità della molecola e alla alta percentuale (21,5-27,6%) di aminoacidi carichi, di cui 8,6-12,9% carichi positivamente (E + D) e 12,9-14,7% carichi negativamente (H + K + R) nella proteina matura di 116 aminoacidi (Fig.5.1).

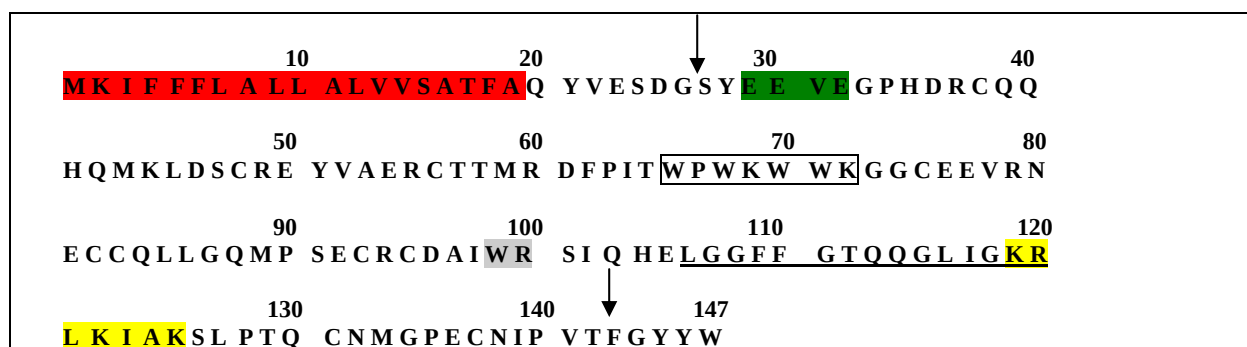


Figura 5.1. Sequenza aminoacidica della Vin-B2. Sono evidenziati il “signal peptide” (rosso), la regione N-terminale carica negativamente (verde), il dominio centrale ricco in triptofano (rettangolo), il dipeptide WR (grigio) e la regione C-terminale carica positivamente (giallo). Le frecce indicano i probabili punti di inizio e fine della proteina matura. Il peptide usato per la produzione dell’anticorpo anti-Vin-B2 è sottolineato.

5.6 Le vromindoline B negli altri cereali

L’amplificazione PCR con primer specifici per i geni *Vinb-1*, *Vinb-2* e *Vinb-3* ha dimostrato che il gene *Vinb-2* non è esclusivo dell’avena ma è presente anche nel grano diploide *T. monococcum* con genoma A^m, con lo stesso allele *Vinb-X2a* isolato nella varietà di avena Donata. Ciò suggerisce che questo gene si sia formato prima della separazione della tribù *Triticeae*, che comprende grano, orzo e segale, dalla tribù *Aveneae*. La presenza di

questo gene nel grano esaploide *T. zhukovskyi* con genoma A^uA^mG, ma non nei frumenti poliploidi appartenenti alla specie *T. turgidum* o *T. aestivum*, che contengono il genoma A^u ereditato da *T. urartu*, suggerisce un legame filogenetico esclusivo tra le specie appartenenti al genere *Avena* e i frumenti contenenti il genoma A^m.

Tuttavia il gene *Vinb-X2a* sembra essere poco espresso nel grano diploide monococco, il quale non risulta peraltro accumulare il prodotto di questo gene sui granuli d'amido dell'endosperma. Da uno studio recente (Taddei *et al*, 2009) risulta che l'estrema soffici   delle cariossidi di questo frumento   associata all'accumulo di grandi quantit  di puroindoline Pin-A e Pin-B e di una proteina con attivit  tripsino-inibitoria denominata Einkorn Tripsyn Inhibitor (ETI) sui granuli di amido. Pertanto, da tutte queste osservazioni risulta che non sia possibile l'accumulo contemporaneo di puroindoline e vromindoline sui granuli di amido: in avena si accumulano le vromindoline, in monococco invece le puroindoline. In nessuna delle numerose specie cerealicole investigate in questa ricerca le vromindoline B sono accumulate sui granuli d'amido dell'endosperma, a conferma che queste proteine sono caratteristiche delle specie appartenenti al genere *Avena*.

5.7 Le vromindoline A e le proteine AATI di avena

Lo studio della natura biochimica e genetica delle vromindoline A ha portato alla scoperta del gene *Aati* codificante per la proteina denominata "*Avena  -Amylase Trypsin Inhibitor*" (AATI) di 150 aminoacidi, caratterizzata da un peptide segnale di 19 aminoacidi. La proteina matura, verosimilmente lunga 131 aminoacidi, ha un alto contenuto in aminoacidi idrofobici (54) ed un peso molecolare di 17 KDa. Pur non avendo evidenze di un legame di questa proteina con i granuli di amido, l'alta idrofobicit  della AATI   compatibile con una sua possibile interazione con i lipidi di membrana dell'amiloplasto. L'identificazione dei frammenti peptidici con sequenza ILVMPGQC�LATTHNVR (m/z =1972,0), ILVTPGQC�LATLHNVR (m/z =1954,1) e ILVTPGQC�LATLYNVR (m/z =1980,1) corrispondenti alla stessa regione C-terminale di AATI suggerisce che in avena siano presenti almeno tre forme isoenzimatiche di AATI, in accordo con la natura esaploide di questa specie.

Geni simili ad *Aati* sono stati trovati in molte altre specie cerealicole. In particolare, in *T. monococcum* e *T. urartu* sembrano presenti alleli strettamente imparentati a quelli di avena, come suggerito dall'ottenimento in queste specie di ampliconi delle stesse dimensioni. Tuttavia, l'anticorpo specifico per AATI non ha dato reazioni con nessuna proteina estratta dalle cariossidi di avena, grano monococco e *T. urartu*, suggerendo che questa proteina non  

presente in quantità rilevabili con la tecnica immunochimica. Peraltro non si può escludere che l'antisiero sviluppato in coniglio non sia in grado di riconoscere l'inibitore AATI. Questo aspetto dovrà essere approfondito così come il sequenziamento degli ampliconi ottenuti in *T. monococcum* e *T. urartu*.

D'altra parte, l'analisi spettrometrica MALDI non ha identificato peptidi contenenti un dominio ricco in triptofano tra quelli ottenuti dalla digestione delle proteine Vin-A. Questi peptidi caratteristici della famiglia delle triptofanine, che comprende le puroindoline, le avenoindoline e le vromindoline, sono invece attesi tra i prodotti di digestione delle vromindoline A, tenuto conto che queste proteine sono molto simili alle vromindoline B per peso molecolare, intensità, solubilità, legame con l'amido, comportamento elettroforetico, reazione con il monobrobimane e modalità di sintesi e accumulo. Attualmente sono in corso ulteriori analisi MALDI delle vromindoline A alchilate con iodacetamide al posto della vinilpiridina finora utilizzata e dell'intera proteina estratta da gel e non digerita. Inoltre si sta tentando di ottenere il sequenziamento N-terminale delle vromindoline-A1 e -A2 previo loro trasferimento su membrana PVDF.

5.8 Il ruolo delle vromindoline B nella determinazione della tessitura della cariosside

Ci si può chiedere se l'estrema sofficietà della cariosside di avena, chiaramente non associata all'accumulo di avenoindoline sui granuli d'amido, lo possa essere a quello delle vromindoline A e B. Per ottenere una dimostrazione diretta del ruolo svolto da queste ultime proteine, i geni *Vinb-2* e *Vinb-3* sono stati trasferiti con il metodo biolistico in grano duro, specie caratterizzata da cariossidi estremamente dure con valori medi di SKCS superiori a 90, e le piante transgeniche T1 sono state caratterizzate per la loro struttura genetica e per la tessitura delle cariossidi T2 da esse ottenute.

In generale, le piante transgeniche più tardive del raccolto R2 hanno prodotto cariossidi con valori medi di SKCS più bassi di quelli tipici dei frumenti duri, indipendentemente dalla presenza o assenza dei transgeni vromindolinici. Questo effetto generale è verosimilmente dovuto prevalentemente alle condizioni colturali in camera di crescita, visto che le piante transgeniche più precoci del raccolto R1 hanno prodotto cariossidi con indici medi di SKCS più elevati e vicini a quelli attesi per una progenie T2 in cui le cariossidi prive di transgeni vromindolinici costituiscono una quota rilevante.

In ogni caso, nelle progenie delle piante contenenti entrambi i transgeni vromindolinici, indipendentemente dal tempo di raccolta (R1 o R2) sono state identificate cariossidi con valori di SKCS particolarmente bassi mai riscontrati nelle cariossidi di grano

duro, fatto che suggerisce un ruolo delle vromindoline nel determinare una tessitura *soft* delle cariossidi stesse. In generale, le progenie delle piante T1 transgeniche per entrambi i geni vromindolinici hanno mostrato una distribuzione dei valori di SKCS compatibili con la segregazione 3:1 di piante eterozigoti per un singolo fattore genetico. Inoltre, l'alto valore di deviazione standard di queste distribuzioni rispetto a quelle osservate nella progenie delle piante prive di geni vromindolinici è in accordo con un effetto di segregazione di fattori genetici nella progenie di un parentale eterozigote.

E' stato poi condotto uno studio della trasmissione dei transgeni vromindolinici nella progenie delle piante G5 (R1), G29 (R2) e G30 (R2) che mostravano cariossidi con valori di SKCS particolarmente bassi (Tab.4.2 e 4.3). Tale studio ha fornito l'evidenza di una co-segregazione dei transgeni *Vinb-2* e *Vinb-3*, secondo un rapporto atteso di 3:1 nella progenie delle piante G5 e G30. Nella progenie della pianta G29 è stata osservata una co-segregazione dei 2 transgeni secondo un rapporto 15:1 come atteso da un parentale eterozigote in cui l'inserzione della coppia di transgeni è avvenuta in due siti diversi e non concatenati. Questo aspetto potrà essere approfondito attraverso analisi RealTime-PCR e Southern blotting. In ogni caso è interessante notare che tra le cariossidi T2 di questa pianta sono stati osservati valori estremamente bassi di SKCS (-2), tipici di una tessitura estremamente soffice.

Infine la pianta G6 del raccolto R1 rappresenta un'eccezione perché pur essendo caratterizzata da valori di SKCS elevati (85-100) e da una deviazione standard non particolarmente alta, possiede entrambi i transgeni e i loro prodotti di espressione. Anche il peso dei semi, parametro che può influenzare la tessitura della cariosside (Gazza *et al*, 2008), non è risultato particolarmente basso e tale da giustificare un aumento dell'indice di SKCS. Il sequenziamento degli ampliconi ottenuti da entrambi i transgeni non ha evidenziato mutazioni di sequenza tali da determinare una variazione di affinità delle vromindoline con la superficie dei granuli d'amido con effetti sulla tessitura della cariosside, così come avviene per alcune mutazioni puntiformi a carico delle puroindoline di frumento tenero (Giroux e Morris, 1997, 1998; Corona *et al*, 2001a,b). Le ragioni del comportamento particolare di questo genotipo rimangono da chiarire.

In conclusione, per le peculiari caratteristiche biochimiche e la quantità con cui si accumulano durante la granigione, queste nuove proteine, le vromindoline, trovate associate ai granuli d'amido di avena, costituiscono un materiale biologico con notevoli potenzialità. Tenuto conto inoltre delle proprietà emulsionanti, antifungine ed antibatteriche dimostrate per le puroindoline di grano e degli effetti sulla resa molitoria, sull'assorbimento idrico degli impasti e sulla qualità panificatoria di queste proteine (oltre ai ben noti effetti sulla durezza

della cariosside) è atteso che nelle vromindoline, fortemente affini alle puroindoline come dimostrato in questa tesi, questi stessi effetti di elevato interesse tecnologico ed economico siano persino amplificati.

Pertanto le vromindoline potrebbero essere utilizzate nel miglioramento genetico delle piante per la resistenza ai patogeni, nella modulazione della tessitura della cariosside dei cereali, nel miglioramento della qualità panificatoria delle farine del grano e nella produzione di sostanze naturali di interesse industriale. In particolare, le vromindoline, data la loro natura di polipeptidi di origine vegetale, potrebbero trovare un impiego interessante nell'agricoltura biologica dove non è consentito il ricorso a prodotti chimici di sintesi per la difesa delle colture. Inoltre potrebbero dimostrarsi delle valide fonti naturali di nuovi peptidi ad azione antibiotica. Qualora risultasse in grado di accumularsi sul granulo di amido ed interagire con le membrane, anche la proteina AATI potrebbe avere applicazioni in campo agricolo ed industriale.

6. BIBLIOGRAFIA

Acker, V.L. and Becker, G. (1971). Recent studies on lipids of starches. II. Lipids of various types of starch and their binding to amylase. *Starch* 23: 419-424.

Andersson, K.E., Immerstrand, T., Sward, K., Bergensthal, B., Lindholm, M.W., Oste, R., Hellstrand, P. (2009). Effects of oats on plasma cholesterol and lipoproteins in C57BL/6 mice are substrain specific. *Br. J. Nutrition*. 20:1-9.

Baker, R.J. and Dick, P.L. (1975). Relation of several quality characteristics to hardness in two spring wheat crosses. *Can. J. Plant Sci.* 55: 625-627.

Barlow, K.K., Butrose, M.S., Simmonds, D.H. and Vesk, M. (1973). The nature of the starch-protein interface in wheat endosperm. *Cereal Chem.* 50: 443-454.

Blochet, J.E., Kaboulou, A., Compoin, J.P. and Marion, D. (1991). Amphiphilic proteins from wheat flour: specific extraction, structure and lipid binding properties. In: W. Bushuk and R. Tkachuk (Eds.) *Gluten Proteins 1990*, American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, pp. 314-325.

Blochet, J.E., Chevalier, C., Forest, E., Pebay-Peyroula, E., Gautier, M.-F., Joudrier P., Pezolet, M. and Marion, D. (1993). Complete amino acid sequence of puroindoline, a new basic and cysteine-rich protein with a unique tryptophan-rich domain, isolated from wheat endosperm by Triton X-114 phase partitioning. *FEBS Lett.* 329: 336-340.

Boman, H.G. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 61-92.

Broekaert, W.F., Marien, W., Terras, F.R.G., De Bolle, M.F.C., Proost, P., Van Damme, J., Dillen, L., Claeys, M., Rees, S.B., Vanderleyden, J. and Cammue, B.P.A. (1992). Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine rich domain of chitin binding protein. *Biochemistry* 31: 4308-4314.

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.

Capparelli, R., Borriello, G., Giroux, M.J. and Amoroso, MG. (2003). Puroindoline-A gene expression is involved in association of puroindolines to starch. *Theor Appl. Genet.* 107: 1463-1468.

Capparelli, R., Amoroso, MG., Palumbo, D., Iannaccone, M., Falieri, C. and Crestri M. (2005). Two plant puroindolines colocalize in wheat seed and in vitro synergistically fight against pathogens. *Plant Mol. Biol.* 58: 857-867.

Capparelli, R., Palumbo, D., Iannaccone, M., Ventimiglia, I., Di Salle, E., Capuano, F., Salvatore, P., Amoroso, MG. (2006). Cloning and expression of two plant proteins: similar antimicrobial activity of native and recombinant form. *Biotechnol. Lett.* 28: 943-949.

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 11. *J. Cereal Sci.* 42: 267-269.

Chen, F., He, Z.H., Xia, X.C., Xia, L.Q., Zhang, X.Y., Lillemo, M. and Morris, C.F. (2006). Molecular and biochemical characterization of puroindoline a and b alleles in Chinese landraces and historical cultivars. *Theor Appl. Genet.* 112: 400-409.

Chen, F., Beecher, B.S., 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.

Clark, D.C., Wilde, P.J. and Marion D. (1994). The protection of beer foam against lipid-induced destabilization. *J. Inst. Brew.* 100: 23-25.

Coffman, F.A. (1977). Oat history identification and classification. *USDA-ARS*, Washington.

Collins, F.W. (1986). Oat phenolics: Structure, occurrence and function. p. 227-295. In F.H. Webster (Ed.) *Oats chemistry and technology*. Amer. Assoc. Cereal Chemists, St Paul, MN.

Conceicao, A.S. and Broekaert, W.F. (1999). Plant defensins. Pages 247-260 in: *Pathogenesis-related protein in plants*. S.K. Datta and S. Muthukrishnan, eds CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A.

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.

Cutler, G.H. and Brinson, G.A. (1935). The granulation of whole wheat meal and a method of expressing it numerically. *Cereal Chem.* 12: 120-129.

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.

Devaux, M.-F., Deschault de Monredon, F.L., Guibert, D., Novales, B. and Abecassis, J. (1998). Particle size distribution of break, sizing and middling wheat flours by laser diffraction. *J. Sci. Food Agric.* 78: 237-244.

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.

Doehlert, D.C (1997). North Dakota Oat Quality Survey. Oat News Letters.

- Doehlert, D.C., and M.S. McMullen. (2000). Genotypic and environmental effects on oat milling characteristics and groat hardness. *Cereal Chem.* 77: 148–154.
- Douliez, J.P., Michon, T., Elmorjani, K. and Marion, D. (2000). Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels. *J. Cereal Sci.* 32: 1-20.
- Doyle, J.C. and Valentine, J. (1988). Naked oats: an assessment of economic potential for livestock feed in the United Kingdom. *Plant Varieties and Seeds* 1: 99-108.
- Draper, S.R. (1973). Amino acid profiles of chemical and anatomical fractions of oat grains. *J. Sci. Food Agric.* 24:1241-1250.
- Dubreil, L., Compoint, J.P. and Marion, D. (1997). Interaction of puroindoline with wheat flour polar lipids determines their foaming properties. *J. Agric. Food Chem.* 45: 108-116.
- 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-LTP) of *T. aestivum* seeds. Relationship with their in vitro antifungal properties. *Plant Sci.* 138: 121-135.
- Eggum B.O, Hansen, I. and Larsen, T. (1989). Protein quality and digestible energy of selected food determined in balance trials with rats. *Plant Foods Hum. Nutr.* 39: 13-21.
- Ewart, J.A.D. (1967). Aminoacid analyses of cereal flour proteins. *J. Sci. Agric.* 18: 548-552.
- FAO/WHO (1973). Energy and protein requirements. FAO Nutr. Rep. Ser. 52. Food and Agric. Org of the U.N., Rome. Also: Tech. Rep. Ser. 522. World Health Org., Geneva. pp 118.
- Feiz, L., Beecher, B.S., Martin, J.M., Giroux, M.J. (2009). In planta mutagenesis determines the functional regions of wheat puroindolines proteins. *Genetics* 183: 853-860.
- Feng, G.H., Richardson, M., Chen, M.S., Kramer, K.J., Morgan, T.D., Reeck, G.R. (1996). Amylase inhibitors from wheat: amino acid sequences and patterns of inhibition of insect and human α -amylases. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 26: 419-429.
- Fontanini, D., Capocchi, A., Muccilli, V., Saviozzi, F., Cunsolo, V., Saletti, R., Foti, S., Galleschi, L. (2007). Dimeric inhibitors of human salivary α -amylase from emmer (*Triticum dicoccon* Schrank) seeds. *J. Agric. Food Chem.* 25:10452-60.
- Franco, O.I., Rigden, D.J., Melo, F.R., Bloch, C., Silva, C.P., Grossi de Sà, M.F. (2000). Activity of wheat α -amylases inhibitors towards bruchid α -amylases and structural explanation of observed specificities. *Eur. J. Biochem.* 267: 2166-2173.
- Gan, Z., Ellis, P.R. and Schofield, J.D. (1995). Mini Review: Gas cell stabilization and gas retention in wheat bread dough. *J. Cereal Sci.* 21: 215-230.

- 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., Guirao, A., Alary, R. and Joudrier, P. (2000). Puroindoline genes are highly conserved in diploid ancestor wheats and related species but absent in tetraploid *Triticum* species. *Plant Sci.* 153: 81-91.
- Gazza, L., Nocente, F., Ng, P.K.W. and Pogna, N.E.(2005). Genetic and biochemical analysis of common wheat cultivars lacking puroindoline a. *Theor. Appl. Genet.* 110: 470-478.
- Gazza, L., Conti, S., Taddei, F., Ng, P.K. and Pogna, N.E.(2006a). Puroindoline synthesis in developing seeds of common wheat cultivars with contrasting grain texture characteristics. In: *Gluten Proteins 2006*. G.L. Lookart and P.K. Ng eds. (2-14) pp183-187.
- Gazza, L., Conti, S., Taddei, F. and Pogna, N. E. (2006b). Molecular characterization of puroindolines and their encoding genes in *Aegilops ventricosa*. *Mol. Breed.* 17: 191-200.
- Gazza, L., Taddei, F., Corbellini, M., Cacciatori, P. and Pogna, N.E.(2008). Genetic and environmental factors affecting grain texture in common wheat. *J.Cereal Sci.* 47: 52-58.
- Giroux, M.J. and Morris, C.F. (1997). 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.(1998).Wheat hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindolines a and b. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6262-6266.
- Givens, D.I. and Brunnen, J.M. (1987). Nutritive value of naked oats for ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 18: 83-87.
- Goujon, C., Jean-Decoster, C., Dahel, K., Bottigioli, D., Lahbari, F., Nicolas, J.F., Schmitt, A.M. (2009). Tolerance of oat-based topical products in cereal-sensitized adults with atopic dermatitis. *Dermatology* 218: 327-333.
- 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.
- Gudmundsson, M. and Eliasson, A.C. (1989). Some physico-chemical properties of oat starches extracted from varieties with different oil content. *Acta Agric. Scand.* 39: 101-111.

- Hammond, E.G. (1983). Oat lipids. In: Barnes, P.J. (ed.). *Lipids in cereal technology*. Academic Press Inc. London. P. 331-352.
- Hancock, R.E.W. and Scott, M.G. (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97: 8856-8861.
- Handelman, G.J., Cao, G., Walter, M.F., Nightingale, Z.D., Paul, G.L., Prion, R.L., Blumberg, J.B. (1999). Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4888-4893.
- Hansen, H. B., Møller, B., Andersen, S.B., Jørgensen, J.R. and Hansen, A. (2004). Grain characteristic, chemical composition, and functional properties of rye (*Secale Cereale* L.) as influenced by genotype and harvest year. *J. Agric. Food Chem.* 52: 2282-2291.
- Hill, C.P., Yee, J., Selsted, M.E. and Eisenberg, D. (1991). Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: Mechanisms of membrane permeabilization. *Science* 251: 1481-1485.
- Holden, J.H. W. (1966). Species relationship in the *Avena*. *Chromosoma* 20: 75-124.
- Igrejas, G., Gaborit, T., Oury, F.-X., Chiron, H., Marion, D. and Branlard, G. (2001). Genetic and environmental effects on puroindoline-a and puroindoline-b content and their relationship to technological properties in French bread wheat. *J. Cereal Sci.* 34: 37-47.
- Iulek, J., Franco, O.L., Silva, M., Slivinski, C.T., Jr, B.G., Ridgen, D.J., Grossi de Sà, M.F. (2000). Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new α -amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye). *I.J.B.C.B.* 32: 1195-1204.
- Ikeda, T. M., Ohnishi, N., Nagamine, T., Oda, S., Hisatomi, T and Yano, H. (2005). Identification of new puroindoline genotypes and their relationship to flour texture among wheat cultivars. *J. Cereal Sci.* 41: 1-6.
- Iwami, A., Osborne, B.G., Huynh, H.-N., Andersen, R.S., Wesley, I.J., Kajiwar, Y., Takashita, H. and Omori, T. (2005). The measurement of structural characteristics of barley for Shochu using Single-kernel characterization system 4100 crush-response profiles. *J. Inst. Brew.* 111: 181-189.
- Jellen, E.N., Gill, B.S. and Cox, T.S. (1994). Genomic in situ hybridization differentiates between A/D- and C-genome chromatin and detects intergenomic translocation in polyploid oat species (genus *Avena*). *Genome* 37: 613-618.
- Jing, W., Alistair, R.D. and Vogel, H. J. (2003). Conformation of a bactericidal domain of puroindoline a: structure and mechanism of action of a 13- residue antimicrobial peptide. *J. Bacteriol.* 185: 4938- 4947.
- Jolly, C.J., Rahman, S., Kortt, V. and Higgins, T.J.V. (1993). Characterization of the wheat M_r 15 000 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., Glenn, G.M. and Rahman, S. (1996). GSP-1 genes are linked to the grain hardness locus (Ha) on wheat chromosome 5D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2408–2413.

- Kagan, B.L., Selsted, M.E., Ganz, T. and Leher, R.I. (1990). Antimicrobial defensin peptides from voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 87: 210-214.
- Kahlon, T.S. and Chow, F.I. (1997). Hypercholesterolic effects of oat, rice and barley dietary fibers and fractions. *Cereals Foods World* 42: 86-92.
- Koskinen, O., Villanen, M., Korponay-Szabo, I., Linfors, K., Maki, M., Kaukinen, K. (2009). Oats do not induce systemic or mucosal autoantibody response in children with coeliac disease. *J. Pediatric Gastroenterol. Nutr.* 48: 559-565.
- Krishnamurthy, K., Balconi, C., Sherwood, J.E. and Giroux, M.J. (2001). Wheat puroindolines enhance fungal disease resistance in transgenic rice. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14: 1255-1260.
- Krishnamurthy, K. and Giroux, M.J. (2001). Expression of wheat puroindoline genes in transgenic rice enhances grain softness. *Nature Biotechnol.* 19: 1-5.
- Ladizinsky, G. (1998). A new species of *Avena* from Sicily, possible the tetraploid progenitor of hexaploid oats. *Genet. Res. Crop Evol.* 45: 263-269.
- Law, C.N., Young, C.F., Brown, J.W.S., Snape, J.W. and Worland, J.W. (1978). The study of grain protein control in wheat using whole chromosome substitution lines. In: *Seed Protein Improvement by Nuclear Techniques*, Intern Atomic Agency, Vienna, Austria, pp. 483-502.
- Leggett, J.M., Markland, G.S. (1995). The genomic identification of some monosomics of *Avena sativa* L. cv. Sun II using genomic in situ hybridization. *Genome* 38: 747-751.
- 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.
- Li, P.X.-P., Hardacre, A.K., Campanella, O.H. and Kirkpatrick, K.J. (1996). Determination of endosperm characteristics of 38 corn hybrids using the Stenvert hardness test. *Cereal Chem.* 73: 466-471.
- Li, W., Huang, L. and Gill, B.S.(2008). Hardness deletions during polyploid wheat speciation. *Plant Physiol.* 146: 200-212.
- 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. (2002). Analysis of puroindoline a and b sequences from *T. aestivum* cv 'Penawawa' and related diploid taxa. *Euphytica* 126: 321-331.
- Loskutov, I.G. (2008). On evolutionary pathways of *Avena* species. *Genet. Res. Crop Evol.* 55: 211-220.

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.

MacRitchie, F. and Gras, P.W. (1973). The role of lipids in baking. *Cereal Chem.* 50: 292-302.

Marion, D., Gautier, M.F., Joudrier, P., Ptak, M., Pezolet, M., Forest, E., Clark, D.C. and Broekaert, W. (1994). Structure and function of wheat lipid binding proteins. Pp 175-180 in: *Wheat Kernel Proteins: Molecular and Functional Aspects*. S. Martino al Cimino, ed. Università Degli Studi della Tuscia, Viterbo, Italy.

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* Coss. *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 the wheat cultivar 'Cheyenne' using chromosome substitution lines. In: E.R. Sears and L.M.S. Sears (Eds.). *Proceedings of the 4th International Wheat Genetics Symposium* (Columbia, MO, 1-6 August 1973), Agricultural Experiment Station, University of Missouri, Columbia, MO, pp 703-707.

Miller, S.S., Wodd, P.J., Pietrzak, L.N. and Fulcher, R.G. (1993). Mixed linkage β -glucan, protein content, and kernel weight in *Avena* species. *Cereal Chem.* 70(2): 231-233.

Molina, A., Segura, A. and Garcia-Olmedo, F. (1993). Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Lett.* 316: 119-122.

Morris, C.F., Bettge, A.D., Greenblatt, G.A. and Demacon, V.L. (1994). The biochemical basis of endosperm texture in wheat. *Cereal Foods World* 39: 641.

Morris, C.F. and Rose, S.P. (1996). Wheat. pp. 3-54. In R.J. Henry and P.S. Kettlewell (Eds.) *Cereal grain quality*. Chapman and Hall, London.

Morris, C.F. and Allan, R.E. (2001). Registration of hard and soft near-isogenic lines of exaploid wheat genetic stocks. *Crop Sci.* 41:935-936.

Nicolas, P. and Mor, A. (1995). Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 277-304.

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

Oda, S. and Schofield, J.D. (1997). Characterization of friabilin polypeptides. *J. Cereal Sci.* 26: 29-36.

Osborne, B., Turnbull, K.-M., Anderssen, R.S., Rahman, S., Sharp, P.J. and Appels, R. (2001). The hardness locus in Australian wheat lines. *Aust. J. Cereal Res.* 58: 329-341.

Osbourn, A.E. (1999). Antimicrobial phytoprotectants and fungal pathogens: a commentary. *Fungal Genet. Biol.* 26: 163-168.

- Paton,D.(1977).Oat starch. Extraction, purification and pasting properties. *Starch* 29:149-154.
- Paton, D. (1979). Oat starch: Some recent developments. *Starch* 31: 184-187.
- Paton, D. (1986). Oat starch: Physical, chemical and structural properties. Pages 93-119 in: *Oats: Chemistry and Technology*. F. H. Webster, ed. Am. Assoc. Cereal Chem.: St. Paul, MN.
- Pedersen, J.F., Martin, C.R., Felker, F.C. and Steele, J.L. (1996). Application of the single kernel wheat characterization technology to sorghum grain. *Cereal Chem.* 73: 421-423.
- Peltonen-Sainio, P., Muurinen, S., Vilppu, M., Rajala, A., Gates, F. and Kirkkari, A.-M. (2001). Germination and grain vigour of naked oat in response to grain moisture at harvest. *J. Agric. Sci.* 137: 147-156.
- Peterson, D.M. and Smith, D. (1976). Changes in nitrogen and carbohydrate fractions in developing oat groats. *Crop Sci.* 16: 67-71.
- Peterson, D.M. (2001). Oat antioxidants. *J. Cereal Sci.* 33: 115-129.
- Pomeranz, Y. and Williams, P.C. (1990). Wheat hardness: its genetic, structural, and biochemical background, measurement, and significance. In: Y. Pomeranz (Ed.) *Advances in Cereal Science and Technology*, Vol. X, AACC, St. Paul, MN, pp 288-289.
- Pogna, N.E., Gazza, L., Corona, V., Zanier, R., Niglio, A., Mei, E., Palumbo, M. and Boggini, G. (2002). Puroindolines and kernel hardness in wheat species. In: *Wheat quality elucidation: the Bushuk legacy*. Ng, P.K.W. and Wrigley, C.W. (Eds.) American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, MN, pp 155-169.
- Rajhathy, T. and Thomas, H. (1974). Cytogenetics of oats (*Avena L.*). *Misc. Publ. Genet. Soc. Can.* 2: 1-90.
- Ram, S., Jain, N., Shoran, J and Singh, R. (2005). New frame shift mutation in puroindoline b in Indian wheat cultivars Hyb65 and NI5439. *J. Plant Biochem. Biotech.* 14: 45-48.
- Redaelli, R., Morel, M., Autran, J.C. and Pogna, N.E. (1995). Genetic analysis of low MR glutenin subunits fractionated by two dimensional electrophoresis A-PAGE X SDS-PAGE. *J. Cereal Sci.* 21: 5-13.
- Redaelli, R., Sgrulletta, D., Scalfati, G., De Stefanis, E., Conciatori, A., Cammerata, A., Pollini,C.M. (2005). L'avena per un prodotto alimentare ricco di proprietà salutari. Risultati della ricerca in Italia. *Tecnica Molitoria*.3: 257-267.
- Rondanelli, M., Opizzi, A., Monteferraio, F. (2009). The biological activity of beta-glucans. *Minerva med.* 100(3): 237-245.
- Sadiq Butt, M., Thair-Nadeem, M., Khan, M.K.I., Shabir, R. and Butt, M.S. (2008). Oat: unique among the cereals. *Eur J Nutr.* 47: 68-79.
- Sahasrabudhe, M.R. (1979). Lipid composition of oat (*Avena sativa L.*). *J. Americ. Oil Chem. Soc.* 56: 80-84.

Shariflou, M.R., Ghannadha, M.R., Rajesh, B., Sharp, P.J. (2003). Rapid preparation of template DNA for screening DNA markers in wheat and barley. In: Proceedings of 10th International Wheat Genetics Symposium. 2: 828-830.

Shewry, P.R. and Halford, N.G. (2002). Cereal seed storage proteins: structure, properties and role in grain utilization. *J. Exp. Botany* 53(370): 947-958.

Simeone, M.C., Sestili, F., Laino, P., La fiandra, D.(2007). Discovery and characterisation of puroindoline genes in wild tetraploid and hexaploid wheats (*Triticum araraticum*, *T. timopheevii* and *T. zhukowsky*). In: Proceed. 51^o SIGA Annual Congress, Riva del Garda (TN), Italy, 23-26 September, 2007. Poster Abstract-B.05.

Simmonds, D.H., Barlow, K.K. and Wrigley, C.W. (1973). The biochemical basis of grain hardness in wheat. *Cereal Chem.* 50: 553-562.

Swan, C.G., Meyer, F.D., Hogg, A.C., Martin, J.M., and Giroux, M.J. (2006a). Puroindoline B limits binding of Puroindoline A to starch and grain softness. *Crop. Sci.* 46: 1656-1665.

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

Symes, K.J. (1961) Classification of Australian wheat varieties based on the granularity of their wholemeal. *Austr. J. Esp. Agric. An. Hus.* 1: 18-23.

Symes, K.J. (1965). The inheritance of grain hardness in wheat as measured by the particle size index. *Austr. J. Cereal Res.* 16: 113-123.

Symes, K.J. (1969). Influence of a gene causing hardness on the milling and baking quality of two wheats. *Aust. J. Cereal Res.* 20: 971-979.

Taddei, F., Gazza, L., Conti, S., Muccilli, V., Foti, S., Pogna, N.E. (2009). Starch-bound 2S proteins and kernel texture in einkorn, *Triticum monococcum* ssp *monococcum*. *Theor. Appl. Genet.* 119:1205-1212.

Takahashi, A., Ikeda, T.M., Takayama, T., Yanagisawa, T. (2009). A barley Hordoindoline mutation resulted in an increase in grain hardness. *Theor. Appl. Genet.* DOI 10.1007/s00122-009-1172-5.

Tanchak, M.A., Schernthaner, J.P., Giband, M. and Altosaar, I. (1998). Tryptophanins: isolation and molecular characterization of oat cDNA clones encoding proteins structurally related to puroindoline and wheat grain softness proteins. *Plant Sci.* 137: 173-184.

Thevissen, K., Terras, F.R.G. and Broekaert, W.F.(1999).Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5451-5458.

Tippless, K.H., Kilborn, R.H. and Presto, K.R. (1994). Bread-wheat quality defined. pp 25-35. In Bushuk and Rasper (eds.) Wheat: production, properties and quality. Blackie Academic and Professional. Chapman and Hill, Glasgow, U.K.

- Trunswell, A.S. (2002). Cereal grains and coronary heart disease. *Eur. J. Clinical Nutr.* 56 (1): 1-14.
- Valentine, J. (1987). Breeding cereals of high nutritional quality with special reference to oats and naked oats. *Aspect of Applied Biology* 15: 541-548.
- Valentine, J. and Hale, O.D. (1990). Investigations into reduced germination of seed of naked oats. *Plant Varieties and Seeds* 3: 21-30.
- Valentine, J. (1990). Naked oats. *Aspect of Applied Biology* 25: 19-28.
- Valentine, J. (1995). Naked oats. In: The oat crop. Product and utilization. 504-532. Ed. Welch R.W. Newtownabbey, Northern Ireland, UK.
- Vavilov, N.I. (1950). The origin, variation immunity and breeding of cultivated plants. *Chronica Botanica* 13: 1-6.
- Welch, R.W. (1995). Oats in human nutrition and health. In: Welch, R.W. (Ed.) The Oat Crop. London: Chapman & Hall. Pp. 83-112.
- Williams, P.C. (1979). Screening wheat for protein and hardness by near Infrared reflectance spectroscopy. *Cereal Chem.* 56: 169-172.
- Worzella, W.W. and Cutler, G.H. (1939). A critical study of techniques for measuring granulation in wheat meal. *J. Agric. Sci.* 58: 329-341.
- Xia, L., Chen, F., He, Z., Chen, X. and Morris, C.F. (2005). Occurrence of puroindoline alleles in Chinese winter wheats. *Cereal Chem.* 82: 38-43.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-395.
- Zhang, J., Martin, J.M., Beecher, B., Morris, C.F., Curtis Hannah, L., Giroux, M.J. (2009). Seed specific expression of the wheat puroindoline genes improve maize wet milling yields. *Plant Biotechnol. J.* 7: 733-743.
- Zhou, M., Robards, K., Glennie-Holmes, M., Helliwell, S. (1998). Structure and pasting properties of oat starch. *Cereal Chem.* 75: 273-281.